



Efek Immunostimulator Propolis terhadap Proliferasi Limfosit T dan Viabilitas Sel Tumor *Mammae* Mencit secara *in Vitro*

Immunostimulator effect of propolis on T lymphocyte proliferation and the mammary tumor cells' viability in mice in vitro

ERMA MUSBITA TYASTUTI, SUTARNO^{1,*}, KUSMARDI²

¹ Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta 57126

² Bagian Immunopatologi Universitas Indonesia (UI) Jakarta 10430

Diterima: 12 Desember 2006. Disetujui: 23 Pebruari 2006.

ABSTRACT

The development of new medicines as immunostimulator agent has being increased according to the development of lethal diseases, for example tumor that suppress the immune responses. Propolis, which is resinous substance produced by honeybees known to have antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, immunostimulator, and anti-tumor activities. The aims of this experiment were to study the effect of propolis as immunostimulator agent in proliferation of mice-suffered with mammary tumor T lymphocyte and the mammary-tumor cells' viability after been treated with stimulated T lymphocyte. Three different dozes of propolis used in this experiment were 0.5 µg/mL, 1.5 µg/mL, 4.5 µg/mL, and added in cell culture to measure the proliferation of T lymphocyte. Proliferation activity of T lymphocyte was examined with 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. Data was analyzed by using Analysis of Variance (ANOVA) then followed by Duncan Multiple Ranges Test (DMRT) 5%. The result showed that the proliferation of T lymphocyte was increased after addition of propolis. The highest OD of T lymphocyte was reached in addition of propolis 4.5 µg/mL (2.363). In the examination of mice-mammary tumor cells' viability, stimulated T lymphocyte was added to tumor cells culture and the results showed that the viability of tumor cells was decreased according to the increasing of T lymphocyte proliferation. The lowest tumor cells' viability was reached in addition of stimulated T lymphocyte with propolis 4.5 µg/mL (4.667).

♥ Alamat korespondensi:

Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126
Tel. & Fax.: +62-271-663375.
e-mail: biology@mipa.uns.ac.id

Keywords: immunostimulator, OD of T lymphocyte, propolis, tumor cells viability, T lymphocyte.

PENDAHULUAN

Tumor merupakan kelompok sel abnormal di dalam kumpulan sel-sel normal yang tumbuh secara otonom dan tidak terkendali (Lukitto, 1984; Pinchuk, 2002). Tumor terbagi menjadi dua kelompok yaitu benigna (tumor jinak) dan maligna (tumor ganas/kanker) (Lukitto, 1984). Pada wanita, kanker payudara adalah jenis

kanker yang paling sering ditemukan dan menjadi penyebab utama kematian karena kanker (Romieu *et al.*, 1990). *The American Cancer Society* memperkirakan telah terjadi 30% kejadian kanker payudara (178.700 kasus) dan 16% antaranya menyebabkan kematian (43.500 kasus) pada tahun 1998 di Amerika (Xie *et al.*, 1999).

Kanker payudara terjadi saat sel-sel pada payudara mulai berkembang dengan tidak

terkendali dan selanjutnya mampu menyerang jaringan-jaringan di dekatnya atau bahkan menjalar ke seluruh tubuh (Koestedjo, 1984). Pertumbuhan jaringan kanker berkaitan erat dengan lemahnya *immunologic surveillance* yang dilakukan oleh sistem imun baik selular maupun humoral (Kresno, 2001).

Telah banyak terapi yang dikembangkan untuk mengatasi kanker payudara, antara lain dengan operasi pembedahan, kemoterapi, terapi radiasi, terapi hormonal dan terapi biologis (Sindutrisno, 1984; Goan, 1984). Dari beberapa jenis terapi yang telah tersebut di atas belum didapat hasil yang memuaskan dan memiliki efek samping yang merugikan, sehingga perlu dicari alternatif lain dalam usaha pengobatan penyakit tersebut salah satunya dengan penggunaan bahan-bahan yang bersifat *imunostimulator*. Imunostimulasi berhubungan dengan peningkatan respon imun spesifik atau non spesifik. Penambahan dapat secara intrinsik, yaitu timbul dari dalam hospes, atau ekstrinsik dan akibat sekunder dari pengaruh eksogen. Bahan-bahan yang mampu memacu peningkatan respon imun disebut *imunostimulator* (Fudenberg *et al.*, 1978).

Salah satu bahan alamiah yang berperan sebagai *imunostimulator* adalah propolis, yang dihasilkan oleh lebah madu. Lebah madu (*Apis mellifera*) adalah spesies yang berasal dari Eropa, Timur Tengah dan Afrika. Lebah madu membentuk koloni tahunan yang sangat besar di pohon-pohon berlubang atau tempat-tempat berlubang lainnya (Delaplane dan Mayer, 2000). Kehidupan lebah madu sangat tergantung pada bunga sebagai sumber pakannya. Hampir semua tanaman bunga pada umumnya adalah sumber pakan lebah madu. Lebah pekerja mengumpulkan empat macam bahan tanaman yaitu nektar, tepung sari, propolis dan air (Febriana *et al.*, 2003).

Propolis adalah substansi seperti lem yang dibentuk oleh lebah madu dari resin tumbuhan yang mempunyai kemampuan sebagai antimikrobia (Ikeno *et al.* 1991; Koo *et al.*, 2000) dan antiviral (Amoros *et al.*, 1994; Cowan, 1999), selain itu juga berfungsi sebagai antiinflamasi (Gregory *et al.*, 2000; Mirzoeva dan Calder, 1996), antimalaria (Wijayanti *et al.*, 2003), hepatoprotektif dengan aktivitas biologis melawan tumor (Dumitrescu *et al.*, 1993; Orsolich *et al.*, 2003, Suzuki *et al.*, 2002), antikanker (Su *et al.*, 1994) dan menstimulus sistem imun (Bankova, 2000; Custadio *et al.*, 2003; Harish *et al.*, 1997). Kemampuan anti-bakteri dari propolis

telah dibuktikan oleh para ilmuwan Maroko dalam Rhajaoui *et al.* (2001) bahwa ekstrak propolis mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan bakteri gram negatif.

Kemampuan propolis dalam melawan mikrobia dan menstimulasi sistem imun karena kandungan flavonoidnya yang tinggi. Nijveldt *et al.* (2001) menyatakan bahwa flavonoid termasuk dalam kelompok senyawa alamiah dengan struktur fenol yang bervariasi dan dapat ditemukan dalam buah, sayuran, kacang-kacangan, kulit kayu, akar, batang, bunga, teh dan anggur. Menurut Johnson dan Maddipati, (1998); dan Miller dan Rice-Evans (1995) senyawa flavonoid dari tumbuhan mempunyai aktivitas anti-oksidan yang sangat berguna bagi kesehatan manusia. Sedangkan Miller (1996) menyatakan bahwa flavonoid mempunyai berbagai efek, seperti imunstimulan, antitumor, anti-HIV, antioksidan, antiradang, antidiare, antifungal, antihepatotoksik, antihiperqlikemi, dan vasodilator. Karena kandungan flavonoidnya yang tinggi maka propolis merupakan antioksidan yang kuat. De la Fuente dan Victor (2000) mendapatkan hasil bahwa antioksidan mampu menstimulus sistem imun dengan meningkatkan perlekatan serta kemotaksis dari limfosit. Sedangkan menurut Hegazi *et al.* (1995), flavonoid dalam propolis terbukti meningkatkan persentase fagositosis makrofag pada ayam yang terserang *Newcastle disease*.

Semakin tingginya angka kejadian tumor/kanker payudara dan belum adanya terapi yang tepat bagi penanganan penyakit ini, maka penelitian efek imunostimulator propolis pada limfosit T terhadap viabilitas sel tumor *mammae* mencit secara *in vitro* perlu untuk dilakukan.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2005, di Laboratorium Ilmu Hayati LPPT UGM, Yogyakarta.

Bahan

Sebagai sumber T-limfosit dan sel tumor, digunakan mencit GR bertumor kelenjar *mammae* transplantabel setelah 2 minggu transplantasi berasal dari Laboratorium Patologi Eksperimental Bagian Patologi Anatomi FKUI. Propolis komersial merk Propolis Gold Psynergy, UK dengan kandungan propolis 20%. *Phosphat*

Bovine Serum (PBS), RPMI-1640 (FBS, Glutamin, Penicillin, Streptomycin), HCl 2 M, akuades, NH₄Cl, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), Isopropanolol, metanol, Giemsa 20 %

Cara kerja

Rancangan percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan 4 perlakuan masing-masing 3 ulangan.

Pelaksanaan percobaan

Sterilisasi propolis. Propolis disaring dengan menggunakan *syringe* 0,5 μ , agar terpisah dari endapan dan hanya didapatkan cairan kental. Propolis yang sudah disaring kemudian disimpan di dalam tabung eppendorp. Semua kegiatan di atas dilakukan di dalam *laminair air flow* untuk menghindari kontaminasi.

Kultur limfosit T. Limfosit T diisolasi dari limfa mencit. Limfa yang telah bersih dimasukkan ke dalam cawan petri steril kemudian ke dalam limfa disuntikkan spit yang berisi medium dan ditekan untuk mengeluarkan sel-sel limfosit. Setelah limfosit dikeluarkan dari limfa, kapsul limfa dibuang dan suspensi limfosit dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril dan disentrifus pada 2500 rpm selama 5menit. Supernatan dibuang, dan ditambahkan NH₄Cl untuk melisis eritrosit ,lalu disentrifus pada 2500 rpm selama 5menit. Supernatan dibuang, endapan dicuci dengan 2 mL RPMI dan disentrifus pada 2500 selama 5menit. Proses pencucian ini dilakukan 2 kali. Supernatan dibuang, endapan ditambahkan 1 mL RPMI . Kolom untuk menyaring limfosit T disiapkan dan dijenuhkan dengan medium RPMI dan didiamkan hingga medium membasahi nilon woll. Kemudian suspensi limfosit dimasukkan ke dalam kolom berisi nilon woll dan diinkubasi selama 30 menit. Setelah 30 menit suspensi dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril dengan cara menekan spuit menggunakan piston secara perlahan-lahan, prosedur ini bertujuan untuk memisahkan limfosit T dari limfosit B. Kemudian pada suspensi limfosit T ditambahkan RPMI 3 mL dan disentrifus pada 2500 rpm selama 5 menit. Endapan diambil dan ditambahkan 1 mL RPMI, lalu dihitung jumlah sel dengan menggunakan haemocytometer hingga didapatkan sel dengan kepadatan 1×10^6 sel/mL. Setelah dihitung suspensi sel siap dikultur pada mikroplate 24 dengan volume 500

μ L/sumuran di dalam inkubator CO₂ 5% 37°C selama 3 hari dengan penambahan propolis (Morgan dan Darling, 1993).

Pemberian propolis pada kultur limfosit T. Propolis diberikan pada medium pertumbuhan biakan T limfosit mencit untuk menjadi dosis perlakuan sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol tanpa penambahan propolis
2. Kelompok dosis A, dengan pemberian 0,5 μ g/mL propolis
3. Kelompok dosis B, dengan pemberian 1,5 μ g/mL propolis
4. Kelompok dosis C, dengan pemberian 4,5 μ g/mL propolis

Kemudian kultur sel diinkubasi pada 37°C dalam inkubator CO₂ 5% selama 3 hari (Kalra *et al.*, 2004).

Analisis OD limfosit T. Limfosit T yang telah dikultur ditambahkan MTT dengan konsentrasi 5 mg/mL, sebanyak 10 μ L setiap sumuran. Inkubasi dilanjutkan selama 4 jam. Reaksi dihentikan dengan menambah isopropanolol 0,04 M sebanyak 100 μ L/sumuran. Hasilnya dibaca pada ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm.

Kultur sel tumor. Sel tumor mammae mencit dikultur dalam mikroplate yang berisi RPMI 1640 yang mengandung FBS, Glutamin, Penicillin, Streptomycin dengan konsentrasi 5×10^4 sel/mL dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% 37°C selama 24 jam. Setelah proses inkubasi selesai akan terlihat bahwa sel tumor yang mampu hidup akan menempel di dasar plate. Sel tumor yang menempel kemudian dicuci dengan RPMI 1640 dan siap digunakan untuk uji viabilitas sel tumor (Kaeida *et al.*, 1989).

Uji viabilitas sel tumor. Ke dalam kultur sel tumor ditambahkan 10 μ l kultur limfosit T yang telah disiapkan pada cara kerja (d) kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% 37°C selama 4 jam untuk melisis sel tumor. Setelah 4 jam *plate* dicuci dengan PBS, sel tumor yang terlisasi oleh limfosit T akan lepas dari dasar *plate* sedang yang tidak terlisasi akan tetap menempel di dasar *plate*. Sel tumor yang tetap menempel di dasar *plate* difiksasi dengan metanol lalu diwarnai dengan larutan Giemsa. Sel tumor yang terwarnai Giemsa dihitung dibawah mikroskop. (Kaeida *et al.*, 1989).

Analisis data

Data OD limfosit T dan viabilitas sel tumor dianalisis dengan ANOVA untuk mengetahui ada tidaknya beda nyata. Bila ada beda nyata dilanjutkan dengan uji DMRT untuk mengetahui letak perbedaannya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proliferasi limfosit T setelah pemberian propolis

Propolis yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis propolis komersial dengan kadar propolis 20%. Sedangkan limfosit T didapatkan dari limfa mencit yang bertumor mammae. Limfa tersebut tampak berbeda dari limfa normal, yaitu tampak lebih besar dan berwarna lebih merah. Limfa yang telah diambil kemudian dibersihkan dari lemak-lemak yang masih menempel agar tidak mengganggu proses selanjutnya. Penambahan propolis pada kultur limfosit T memicu proliferasi. Hasil analisis terhadap OD limfosit T ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Proliferasi limfosit T setelah pemberian propolis dalam beberapa dosis perlakuan.

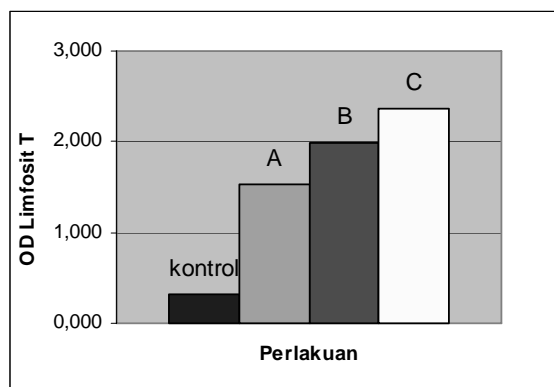
Dosis perlakuan	OD Proliferasi limfosit T (Rerata + SD)
Kontrol	0,318 ± 0,008 ^a
A (0,5µg/mL)	1,533 ± 0,035 ^b
B (1,5 µg/mL)	1,979 ± 0,090 ^c
C (4,5µg/mL)	2,363 ± 0,054 ^d

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata dengan uji DMRT pada taraf uji 5%.

Hasil analisis OD proliferasi menggunakan ANOVA yang dilanjutkan dengan uji DMRT dengan taraf uji 5% (Tabel 1) menunjukkan bahwa pemberian propolis dalam berbagai dosis berpengaruh nyata terhadap OD limfosit T pada tiap-tiap perlakuan dibandingkan dengan kontrol. OD limfosit T tertinggi terjadi pada pemberian propolis 4,5µg/mL. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Rubinstein et al. (1997) bahwa pada dosis 4,5µg/mL propolis mampu menstimulus respon imun secara optimal dalam penelitian *in vitro* yang dilakukan terhadap mencit yang menderita HIV. Secara keseluruhan pemberian propolis meningkatkan OD limfosit T (Gambar 4.).

Penambahan propolis pada kultur limfosit T mampu meningkatkan proliferasi limfosit T. Dalam hal ini propolis telah terbukti berfungsi sebagai imunostimulator. Hal ini sesuai dengan pernyataan Gu (2005) bahwa pemberian propolis mampu meningkatkan jumlah limfosit T. Hal yang sama juga dinyatakan oleh Wijayanti (2005) bahwa penambahan bahan yang bersifat imunostimulator akan meningkatkan respon pada limfosit dan menyebabkan pembelahan sel sehingga terjadi proliferasi. Penggunaan limfosit T yang telah teraktifasi pada mencit bertumor

meningkatkan proliferasi. Menurut Pinchuk (2002) limfosit T yang aktif menghasilkan limfokin, IL-2 yang berfungsi memicu proliferasi limfosit baik secara autokrin maupun parakrin. IL-2 juga berfungsi meningkatkan efek sitotoksik sel T sitotoksik dan merangsang produksi IFN. IL-2 diproduksi terutama oleh sel T *helper* dan dapat dirangsang produksinya dengan pemberian imunostimulator.



Gambar 1. Proliferasi limfosit T setelah pemberian propolis berbagai dosis. Keterangan: Kontrol: OD limfosit T tanpa penambahan propolis, A: OD limfosit T dengan penambahan propolis 0,5 µg/mL, B: OD limfosit T dengan penambahan propolis 1,5 µg/mL, C: OD limfosit T dengan penambahan propolis 4,5 µg/mL.

Pengaruh pemberian propolis terhadap proliferasi limfosit T tergantung pada besarnya dosis. Pada pemberian propolis dengan dosis terendah, yaitu 0,5µg/mL sudah menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kontrol dan terus meningkat seiring peningkatan dosis pemberian propolis. Pada perlakuan ini tidak ditemukan indikasi terjadinya supresi oleh propolis. Kemampuan propolis sebagai imunostimulator tidak terlepas dari kandungan bahan aktif di dalamnya yang didominasi oleh flavonoid. Ugar et al.(2004) menyatakan bahwa kandungan flavonoid dalam propolis menyebabkan propolis berfungsi sebagai antimikroba, antioksidan, antiinflamasi, antitumor dan imunostimulator.

Peningkatan proliferasi limfosit T dalam kondisi immunosupresi yang sering ditemukan pada penderita penyakit sangat penting karena mampu meningkatkan kemampuan melawan penyakit. Pada penderita tumor peningkatan jumlah limfosit T sangat penting mengingat perannya dalam menghambat perkembangan dan pertumbuhan sel-sel tumor sehingga penggunaan imunostimulator dapat dijadikan alternatif sebagai usaha peningkatan jumlah

limfosit T. Limfosit T yang aktif mampu menghasilkan TNF- α yang berfungsi menekan pertumbuhan sel tumor, meningkatkan pertumbuhan dan ekspresi IL-2R dan menstimulasi produksi IFN- γ yang juga berperan menghambat pertumbuhan sel tumor. Meningkatnya proliferasi limfosit T menyebabkan peningkatan jumlah TNF- α sehingga pertumbuhan sel tumor semakin mudah ditekan (Alexander *et al.*, 1993; Gu, 2005; Urban, 1982). Propolis dalam hal ini sebagai bahan yang mampu berperan sebagai imunostimulator juga layak untuk diperhitungkan menjadi salah satu bahan alami yang menjadi solusi bagi usaha-usaha penanganan penyakit dengan imunoterapi. Namun perlu diperhatikan bahwa zat yang mampu meningkatkan respon pada satu sistem dapat bersifat supresif pada sistem lain.

Viabilitas sel tumor setelah dipapari dengan limfosit T yang terstimulasi propolis

Untuk membuktikan peranan limfosit T yang telah distimulasi propolis dalam melawan tumor maka limfosit T yang sebelumnya telah distimulasi propolis dengan berbagai dosis kemudian dipaparkan pada kultur sel tumor. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa semakin besar proliferasi limfosit T yang menyebabkan semakin besar jumlah limfosit T maka semakin rendah pula viabilitas sel tumor. Hasil dapat dilihat pada Tabel 2.

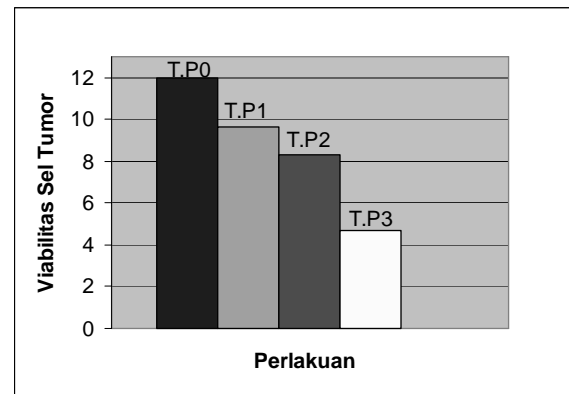
Tabel 2. Viabilitas sel tumor setelah dipapari limfosit T yang telah distimulasi propolis dalam berbagai dosis.

Dosis perlakuan	Viabilitas sel tumor (Rerata \pm SD)
Tanpa propolis (T.P0)	12,000 \pm 1,732 ^a
0,5 μ g/mL propolis (T.P1)	9,667 \pm 1,527 ^b
1,5 μ g/mL propolis (T.P2)	8,333 \pm 0,577 ^b
4,5μg/mL propolis (T.P3)	4,667 \pm 0,577^c

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata dengan uji DMRT pada taraf uji 5%.

Hasil analisis viabilitas sel tumor menggunakan ANOVA yang dilanjutkan dengan uji DMRT dengan taraf uji 5% (Tabel 2) menunjukkan bahwa penambahan limfosit T terstimulasi propolis dengan dosis 4,5 μ g/mL pada kultur sel tumor berpengaruh nyata terhadap viabilitas sel tumor, yaitu viabilitas sel tumor menurun secara signifikan dibandingkan kontrol dan perlakuan lain. Penambahan limfosit T terstimulasi propolis 0,5 μ g/mL dan limfosit terstimulasi propolis 1,5 μ g/mL pada kultur sel

tumor berpengaruh nyata terhadap viabilitas sel tumor dibandingkan kontrol. Penambahan limfosit T terstimulasi propolis 0,5 μ g/mL tidak berbeda nyata terhadap penambahan limfosit T terstimulasi propolis 1,5 μ g/mL. Viabilitas sel tumor terendah terdapat pada penambahan limfosit T terstimulasi propolis 4,5 μ g/mL sebesar 4,667. Viabilitas sel tumor yang dipapari limfosit T yang terstimulasi propolis berbagai dosis dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Viabilitas sel tumor setelah dipapari limfosit T yang telah terstimulasi propolis berbagai dosis. Keterangan: T.P0: sel tumor yang dipapari limfosit T tanpa penambahan propolis, T.P1: sel tumor yang dipapari limfosit T terstimulasi 0,5 μ g/mL propolis, T.P2: sel tumor yang dipapari limfosit T terstimulasi 1,5 μ g/mL propolis, T.P3: sel tumor yang dipapari limfosit T terstimulasi 4,5 μ g/mL propolis.

Penurunan viabilitas sel tumor terjadi karena limfosit T yang terstimulasi propolis aktif berproliferasi dan mensekresikan limfokin yang berperan dalam penghambatan pertumbuhan sel tumor. Semakin tinggi proliferasi limfosit T maka semakin rendah viabilitas sel tumor. Hal ini sesuai dengan pernyataan Rohrer *et al.* (1999) semakin banyak jumlah limfosit T yang aktif semakin besar jumlah bahan-bahan penghambat pertumbuhan sel tumor (TNF- α , IFN- γ , dan IL-2R) yang terekspresikan sehingga sel tumor semakin mudah ditekan perkembangannya. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) diproduksi oleh limfosit T yang aktif dan bersama-sama dengan Interferon- γ (IFN- γ) bersifat sitotoksik terhadap sel tumor. IFN- γ sangat berperan dalam pertahanan terhadap serangan tumor karena mampu meningkatkan ekspresi MHC kelas I dan II yang berperan dalam pengenalan antigen yang dihasilkan oleh sel tumor. Penurunan viabilitas sel tumor dapat terjadi karena limfosit T memiliki fungsi pengontrolan terhadap pertumbuhan sel tumor. Thome dan Tschopp

(2001) menyatakan bahwa fungsi pengontrolan limfosit T terhadap pertumbuhan sel tumor dapat terjadi secara langsung yang dilakukan oleh subset limfosit T sitotoksik (CTL) dengan mensekresi limfokin yang berpengaruh langsung dalam melisis sel tumor melalui pengrusakan membran dan nukleus. Fungsi pengontrolan juga terjadi secara tidak langsung yang dilakukan oleh limfosit T helper. Subset limfosit ini selain menghasilkan limfokin (TNF- α dan IFN- γ) yang mengaktifkan sel efektor lain, CTL, makrofag, NK, limfosit B dan menginduksi terjadinya respon inflamasi (Kresno, 2001). Menurut Urban et al. (1982), limfosit T memegang peranan yang sangat penting pada pertahanan terhadap tumor. Hal ini dibuktikan dalam sebuah penelitian terhadap mencit *nude* yang tetap mampu mengekspresikan sel *Natural Killer* (NK) seperti mencit normal tetapi tidak mampu mengekspresikan limfosit T. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tumor tumbuh lebih cepat pada mencit *nude* dibandingkan dengan pertumbuhan tumor pada mencit normal. Hasil penelitian tersebut membuktikan bahwa limfosit T berperan menghambat pertumbuhan sel tumor. Melemahnya sistem imun pada penderita tumor menyebabkan semakin mudah sel tumor berkembang. Kasus tersebut mendorong para peneliti untuk menemukan bahan-bahan yang berfungsi menguatkan sistem imun karena sistem imun yang kuat sangat dibutuhkan untuk menghasilkan respon yang baik (Cilento, 2001).

Dalam perkembangan kasus penyakit tumor, usaha penyembuhan dengan imunoterapi semakin dibutuhkan karena proses penyembuhan dengan metode-metode yang sudah sering dilakukan (operasi pengangkatan tumor dan kemoterapi) belum memberikan hasil yang optimal bahkan menimbulkan efek negatif pasca perlakuan. Belum lagi besarnya biaya yang harus dikeluarkan untuk melakukan upaya penyembuhan dengan metode-metode tersebut. Propolis sebagai salah satu bahan yang telah terbukti sebagai imunostimulator dapat dijadikan bahan alternatif yang dapat dipergunakan dalam imunoterapi pada kasus timbulnya tumor. Penelitian ini membuktikan bahwa propolis berpotensi menjadi bahan antitumor secara sekunder dengan meningkatkan proliferasi limfosit T yang aktif memproduksi limfokin yang dapat menghambat dan menekan pertumbuhan sel tumor. Propolis yang terbentuk dari kumpulan resin tumbuhan yang disekresikan oleh lebah mengandung banyak kandungan bahan alamiah yang tidak

membahayakan dan relatif tidak menimbulkan alergi. Ghisalberti (1979) melaporkan dalam suatu penelitian bahwa pemberian ekstrak eter propolis pada mencit dengan dosis 0,35 mg/g berat badan tidak menunjukkan gejala alergi. Sedangkan pada pemberian eter dan alkohol ekstrak didapatkan *Lethal Dosage*₅₀ (LD₅₀) sebesar 0,7 mg/g berat badan setelah 19 jam perlakuan. Penyebab kematian adalah kerusakan sistem respirasi. Sebagai pembanding, pemberian *procaine* pada mencit dengan dosis yang sama menyebabkan kematian 60% hewan uji dalam waktu yang lebih singkat.

Pada perkembangan penggunaan bahan-bahan imunostimulator timbul ketakutan karena adanya anggapan bahwa jika sistem imun terus menerus distimulasi akan menyebabkan perkembangan sel-sel imun yang tidak terkendali dan mengakibatkan penyakit autoimun (Thome dan Tschopp, 2001). Ketakutan ini seharusnya tidak perlu terjadi karena bila fungsi imun sudah kembali normal maka bahan-bahan imunostimulator tidak lagi bekerja meningkatkan kekebalan tubuh. Pinchuk (2002) mengatakan hal tersebut terjadi karena sistem imun bersifat *self limitation* yaitu respon imun akan terhenti dengan sendirinya jika antigen sudah dihilangkan. Perkembangan bahan imunostimulator di Indonesia seharusnya lebih ditingkatkan karena negara ini memiliki potensi bahan-bahan yang dapat berperan sebagai imunostimulator, selain dapat menekan biaya penyembuhan juga menekan resiko pasca penyembuhan.

KESIMPULAN

Propolis meningkatkan proliferasi limfosit T dan berfungsi sebagai imunostimulator. Proliferasi tertinggi terjadi pada pemberian propolis dosis 4,5 g/mL. Sedangkan proliferasi terendah pada pemberian propolis dengan dosis 0,5 μ g/mL. Penambahan limfosit T terstimulasi propolis pada kultur sel tumor menurunkan viabilitas sel tumor, hasil ini menunjukkan propolis berfungsi sebagai antitumor secara sekunder. Viabilitas sel tumor tertinggi setelah dipapari limfosit T yang terstimulasi propolis terdapat pada perlakuan sel tumor yang terpapar limfosit T tanpa penambahan propolis. Sedangkan viabilitas sel tumor terendah terdapat pada perlakuan sel tumor yang terpapar limfosit T terstimulasi propolis 4,5 g/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, J.P., S. Kudoh, K.A. Melsop, T.A. Hamilton, M.G. Edinger, R.R. Tubbs, D. Sica, L. Tuason, E. Klein, and R.M. Bukowski. 1993. T-cells infiltrating renal cell carcinoma display poor proliferative response even though they can produce interleukin 2 and express interleukin 2 receptors. *Cancer Research* 53 (6): 1380-1387.
- Amaros, M., E. Lurton, J. Boustie, L. Girre, F. Sauvager, and M. Cormier. 1994. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *Journal of Natural Product* 57 (5): 644-647
- Bankova V. 2000. Determining quality in propolis samples. *Bee Informed* 7 (2): 1-8.
- Cilento, R. 2001. Book Review: Natural Compounds in Cancer Therapy by John Boik. *Journal of ACNEM* 20 (2): 17-18
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4): 564- 582.
- Custadio A.R., M.M.C. Ferreira, G. Negri, and A. Salatino. 2003. Clustering of comb and propolis waxes based on the distribution of aliphatic constituents. *Journal of Brazilian Chemical Society* 14 (3): 354-357.
- De la Fuente, M. and V.M. Victor. 2000. Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunology and Cell Biology* 78: 49-54.
- Dumitrescu, M., I. Crisan, and V. Esanu. 1993. The mechanism of antiherpetic action of an aqueous propolis extract II. The action of the lectins of an aqueous propolis extract. *Review of Roum. Virology* 44: 49-54.
- Febriana, S., E. Mahajoeno, S. Listyawati. 2003. Perbandingan produksi telur ratu lebah (*Apis mellifera ligustica*) antara perkawinan alami dengan inseminasi buatan setelah dan tanpa pemberian karbon dioksida. *BioSMART* 5 (2): 115-119
- Fudenberg, H.H., D.D. Snels, J.J. Caldwell, and J.V. Wells. 1978. *Basic and Clinical Immunology*. 2nd Ed. Los Altos: Lange Medical Publications.
- Ghisalberti, E. L. 1979. Propolis: a review. *Bee World* 60: 59-84.
- Goan, T.T. 1984. Peranan Khemoterapi pada Penyakit Kanker. *Dalam: Koestedjo, R. dan H.R. Soemartono. (ed.). Diagnosa Dini Penyakit Kanker Dan Cara Menanggulangnya*. Bandung: Penerbit Alumni.
- Gregory, S., N. Piccolo, M. Piccolo, and M. Hegger. 2002. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 8 (1): 77-83.
- Gu, Yeun-hwa. 2005. Antioxidant activity and anti-tumor immunity by *Agaricus*, propolis and paffia in mice. Suzuka: University of Medical Science.
- Harish, Z., A. Rubinstein, M. Golodner, M. Elmaliah, and Y. Mizrachi. 1997. Suppression of HIV-1 replication by Propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs Experimental Clinic Research* 23 (2): 89-96
- Hegazi, A.G., H.F. El Miniawy, and F.A. El Miniawy. 1995. Effect of some honey bee products on immune response of chicken infected with virulent NDV. *Egyptan Journal of Immunology* 2 (2): 79-86.
- Ikeno, K., T. Ikeno, and C. Miyazawa. 1991. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Research* 25 (5): 347-351.
- Johnson J.L. and K.R. Maddipati 1998. Paradoxical effects of resveratrol on two Prostaglandin H synthases. *Prostaglandin and Other Lipid Mediator* 156: 131-143.
- Kaeida, T., K. Yamada, and N. Yamawaki. 1989. *Process for Producing Cytotoxic T-cells and Compositins Produced by Said Process*. Washington, D.C.: United States Patent.
- Koestedjo, R. 1984. Tumor ganas payudara. *Dalam: Koestedjo, R. dan H.R. Soemartono (Ed.). Diagnosa Dini Penyakit Kanker dan Cara Menanggulangnya*. Bandung: Penerbit Alumni.
- Koo, H., P.L. Rosalen, J.A. Cury, Y.K. Park, and W.H. Bowen. 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and glucosyltransferase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (5): 1302-1309.
- Kresno dan S. Boedina. 2001. *Imunologi: Diagnosa dan Prosedur Laboratorium*. Ed.4. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Lukitto, P. 1984. Pengertian tentang tumor ganas. *Dalam: Koestedjo, R. dan H.R. Soemartono (ed.). Diagnosa Dini Penyakit Kanker dan Cara Menanggulangnya*. Bandung: Penerbit Alumni.
- Miller, A.L. 1996. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alt Medical Review* 1 (2): 103-111.
- Miller, N. J. and C. Rice-Evans. 1995. Antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clinical Chemistry* 41: 1789
- Mirzoeva, O.K., and Calder, P.C. 1996. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prost. Leuk. Ess. Fatty Acids*. 55: 441-449.
- Morgan S. J. and D.C. Darling. 1993. *Animal Cell Culture*. Oxford: Bios Sci Pb Ltd.
- Nijdvelt, R. J., E. van Nood, D.E.C. van Horn, P.G. Boelens, K. van Norren, and P.A.M. van Leeuwen. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74 (4): 418-425.
- Orsolich, N., Knezevic, A., Sver, L., Terzic, S., Hackenberger, B. K., and Basic, I. 2003. Influence of honey bee products on transplantable murine tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 1 (4): 216.
- Pinchuk, G. 2002. *Theory and Problems of Immunology*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Rhajaoui M., H. Oumzil, M. Faid, M. Lyagoubi, and A. Benjouad. 2001. Antibacterial activity of Moroccan propolis extracts. *Science Letters* 3 (3): 1-3
- Rohrer, J.W., A.L. Barsoum, D.L. Dyess, J.A. Tucker, and J.H. Coggin, Jr. 1999. Human breast carcinoma patients develop clonable oncofetal antigen specific effector and regulatory T lymphocytes. *Journal of Immunology* 162: 6880-6892
- Romieu, I., Berlin, J. A., and Colditz, G. 1990. Oral contraceptives and breast cancer. *Cancer* 66: 2253-2263.
- Sindutrisno. 1984. Peranan Radioterapi pada Penyakit Kanker. *Dalam: Koestedjo, R. dan H.R. Soemartono (ed.). Diagnosa Dini Penyakit Kanker dan Cara Menanggulangnya*. Bandung: Penerbit Alumni.
- Su, Z.Z. J. Lin, D. Grunberger, and P.B. Fisher. 1994. Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. *Cancer Research* 54 (7): 1865-1870.
- Suzuki, I., I. Hayashi, T. Takaki, D.S. Groveman, and Y. Fujimiya. 2002. Antitumor and anticypogenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. *Cancer Biotherapy & Radiopharmacy* 17 (5): 553-562
- Thome, M. and J. Tschopp. 2001. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nature* 1: 42-57
- Ugar, A. and T. Arslan. 2004. An in vitro study on microbial activity of propolis from Mugla Province in Turkey. *Journal of Medicinal Foods* 7 (1): 90-94.
- Urban, J.L., R.C. Burton, J.M. Holland, M.L. Kripke, and H. Schreiber. 1982. Mechanisms of syngeneic tumour rejection; Susceptibility of host-selected progressor variants to various immunological effector cells. *Journal of Experimental Medicine* 155: 557-573
- Wijayanti, M.A., E. Herdiana, dan S.Y. Mardihusodo. 2003. Efek bee propolis terhadap infeksi Plasmodium berghei pada mencit Swiss. *Berkala Ilmu Kedokteran* 35 (2): 81-89.
- Wijayanti, L. 2005. Aktivitas proliferasi limfosit setelah imunisasi intranasal protein terlarut *Toxoplasma* selama infeksi *Toxoplasma gondii*. *BioSMART* 7 (1): 9-13
- Xie, B., S.W. Tsao, and Y.C. Wong. 1999. Sex hormone-induced mammary carcinogenesis in female noble rats: the role of androgens. *Carcinogenesis* 20 (8): 1597-1606.