

## UJI AKTIVITAS ANTIKOAGULAN EKSTRAK PROPOLIS *Trigona laeviceps* TERHADAP DARAH MENCIT (*Mus musculus* L.)

Weliyani<sup>1</sup>, Rudy Agung Nugroho<sup>2</sup>, Syafrizal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Fisiologi, Perkembangan dan Molekuler Hewan Jurusan Biologi  
FMIPA Universitas Mulawarman

<sup>2</sup>Jurusan Biologi FMIPA Universitas Mulawarman

\*Corresponding Author: [Weliyani1992@gmail.com](mailto:Weliyani1992@gmail.com)<sup>1</sup>

**Abstract.** This study was to describe the anticoagulant activity of propolis extract of *Trigona laeviceps* on the blood of mice (*Mus musculus* L.) of clotting time and blood smear morphology were determined to evaluate the effect of the volume of extract of propolis *Trigona laeviceps*. A-250  $\mu$ L blood of mice was mixed with various volume of propolis extract viz. 210  $\mu$ L, 250  $\mu$ L, 280  $\mu$ L and 320 $\mu$ L extract propolis *Trigona laeviceps* to examine anticoagulant effect and compare with negative control group (K-) without treatment and positive control group (K+) 250  $\mu$ L of 10% EDTA concentration. The results of the analysis of blood clotting time showed that propolis extracts had a potential anticoagulant due to it can prevent blood clots. The anticoagulant activity of extract propolis was suggested at volume 210  $\mu$ L which was characterized by the morphology of blood cells that has shape intact and contact separate from one to the other.

**Keywords:** Blood Clotting Time, Propolis *Trigona laeviceps*, Mice (*Mus musculus* L.)

### Pendahuluan

Propolis adalah bahan perekat atau resin yang dikumpulkan oleh lebah pekerja dari kuncup, kulit tumbuhan atau bagian-bagian lain dari tumbuhan<sup>[1]</sup>. Resin atau getah inilah yang menjadi bahan dasar pembentuk propolis. Dengan bantuan air liur lebah, campuran ini dibuat menjadi lentur, inilah yang disebut propolis<sup>[1]</sup>. Propolis merupakan produk terpenting kedua setelah madu yang digunakan lebah sebagai komponen pertahanan, sistem imun eksternal dan antimikroba<sup>[2]</sup>.

Salah satu jenis lebah yang mampu menghasilkan propolis dalam jumlah banyak yaitu jenis *Trigona* spp. Lebah madu ini termasuk kelompok serangga bangsa (ordo) *Hymenoptera* (bersayap bening) yang membesarkan anak-anaknya dengan serbuk sari dan madu<sup>[3]</sup>. *Trigona* merupakan *Stingless bee*, mereka tidak memiliki sengat untuk mempertahankan diri, beberapa spesies *Trigona* mempertahankan koloninya dengan gigitan<sup>[4]</sup>.

*Trigona* dapat ditemukan di Negara tropis seperti Malaysia, Filipina dan Indonesia, juga dapat ditemukan di Australia. *Trigona*

menghasilkan madu yang rasanya asam. Orang Jawa menyebutnya madu lenceng sedangkan orang Sunda menyebutnya teuweul<sup>[3]</sup>. Lebah *Trigona* menghasilkan lebih sedikit madu dan lebih sulit untuk diekstrak, namun jumlah propolis yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan jenis lebah lainnya<sup>[4]</sup>.

Propolis memiliki beberapa manfaat di bidang kesehatan dan kedokteran yaitu sebagai antibodi, antioksidan, antibakteri, antifungal, antikanker, antivirus dan antikoagulan<sup>[3]</sup>. Antikoagulan adalah zat yang digunakan untuk mencegah terjadinya pembekuan darah yang umumnya dipakai di klinik maupun laboratorium<sup>[5]</sup>. Antikoagulan digunakan untuk mencegah pembekuan darah dengan jalan menghambat beberapa faktor pembekuan darah<sup>[6]</sup>.

Namun, sejauh ini belum ada penelitian lebih lanjut tentang manfaat propolis sebagai antikoagulan. Menurut Gould dan Lister (2006) dalam Tangker *et al.*, (2013), menyatakan bahwa senyawa fitokimia golongan flavonoid dalam dunia kedokteran dimanfaatkan dalam pengobatan, antikoagulasi, antibiotik, antivirus dan antijamur. Berdasarkan hasil pengamatan,

ISBN: xxxx-xxxx-xxxx

ekstrak propolis *Trigona* spp. Memiliki flavonoid baik itu pada propolis konstruksi sarang, propolis pembukus madu ataupun propolis pembukus pollen<sup>[7]</sup>. Oleh sebab itu, maka dilakukanlah penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antikoagulan dari propolis *Trigona laeviceps* terhadap darah mencit (*Mus musculus* L.)

Untuk memperoleh gambaran aktivitas antikoagulan terhadap darah mencit (*Mus musculus* L.) yang diamati pada waktu koagulasi dan morfologi apusan darah dan untuk mengetahui volume ekstrak propolis *Trigona laeviceps* (210 µL, 250 µL, 280 µL dan 320 µL) mulai memberikan pengaruh antikoagulan terhadap darah mencit (*Mus musculus* L.)

## Teori dan Metodologi Penelitian

### Propolis

Propolis berasal dari bahasa Yunani, yakni pro yang artinya di depan dan polis yang artinya kota. Istilah ini diberikan untuk menggambarkan kegunaan propolis sebagai zat pelindung di pintu masuk sarang lebah madu, baik terhadap serangan serangga lain maupun terhadap cuaca<sup>[3]</sup>. Lem lebah atau propolis adalah nama generik yang diberikan untuk bahan resin yang dikumpulkan oleh lebah madu dari berbagai jenis tumbuhan, terutama pada bagian kuncup dan daun<sup>[2]</sup>.

Lebah madu pengelana mengumpulkan propolis hanya pada hari-hari tertentu, yakni ketika udara hangat agar cairan resin menjadi lebih lembut dan elastis. Biasanya, lebah pengelana pemburu propolis mendekati sumber resin, lalu menggigitnya dengan rahang hingga membentuk sebuah bongkahan kecil. Bongkahan kecil selanjutnya disimpan di dalam kantong pollen di kaki lebah. Prosedur ini dilakukan berulang kali hingga kantong pollen di kedua kakinya penuh dan seimbang. Proses ini bisa dilakukan hingga satu jam, berpindah dari satu sumber ke sumber yang lain. Setelah kantong penuh, lebah pengelana pulang ke sarang dan bertemu dengan lebah sarang atau lebah rumah yang akan membantunya mengangkat resin yang terkumpul<sup>[3]</sup>.

Propolis sudah mulai diteliti dan dipelajari sejak tahun 1960-an. Hal ini berdasarkan pada sifat uniknya yakni dipergunakan sejak dahulu oleh bangsa Yunani dan Romawi sebagai bahan antimikroba. Selama 40 tahun terakhir, banyak diungkapkan tentang propolis yang meliputi komposisi kimia, aktivitas biologi, farmakologi dan terapi penggunaan propolis<sup>[8]</sup>. Secara

lengkap, komponen kimia propolis dapat dijelaskan sebagai berikut:

**Tabel 1. Komponen kimia propolis**

Kelas Senyawa	Golongan Senyawa	Jumlah
Resin	Flavonoid, asam aromatik dan esternya	50%
Lilin	Asam lemak dan esternya	30%
Minyak esensial	Volatil	10%
Polen	Protein dan asam amino bebas	5%
Senyawa organik dan Mineral	Mineral, keton, lakton, quinon, steroid, vitamin dan gula	5%

(Tukan, 2008).

Pada saat ini kemajuan teknologi telah membawa manusia menemukan kekayaan manfaat propolis dalam berbagai segi kehidupan, terutama dibidang pencegahan dan pengobatan penyakit. Saat ini, dengan semakin meningkatnya kecenderungan orang untuk kembali kepada alam (*Back to nature*), yakni dengan mencari pengobatan alternatif yang lebih aman dan metode produksi yang menghindari pencemaran lingkungan maka keberadaan propolis pun semakin dimanfaatkan oleh manusia<sup>[3]</sup>.

Beberapa khasiat dari propolis di bidang kesehatan dan kedokteran, yang telah dibuktikan melalui beberapa penelitian dan studi kasus yaitu antibodi, antioksidan, antispasme, antikoagulan, antifungal, antiinflamasi, antikanker, analgenik, antivirus, antiseptik, antidiabetik, antitumor dan anti-alergi. Selain itu, propolis memiliki manfaat dalam dunia kosmetik dan kesehatan kulit yaitu propolis mampu memberikan efek yang positif dalam meregenerasi dan memperbaiki jaringan<sup>[3]</sup>.

### *Trigona laeviceps*

Lebah T. *laeviceps* merupakan salah satu dari jenis lebah *Trigona* spp. yang dapat dijumpai diseluruh pelosok Indonesia. Ciri-cirinya adalah tubuh berukuran kecil, ramping, panjangnya 2,5 mm - 3,25 mm. Tubuh berwarna coklat kehitaman, permukaan ventral abdomen

ISBN: 978-602-72658-1-3

memiliki bulu-bulu berwarna keputihan dan tarsusnya berbulu dengan warna pucat<sup>[9]</sup>.

Sarang lebah terbuat dari substansi yang berasal dari resin tumbuhan. Terdapat satu pintu masuk dan keluar bagi anggota koloni pada setiap sarang. Pintu tersebut dihiasi dengan corong yang terbuat dari resin tumbuhan dan memiliki bentuk yang bervariasi, ada yang pendek dan ada juga yang panjang, tergantung pada jenis lebahnya. Lebah tak bersengat memiliki struktur sarang yang berbeda-beda tergantung pada tingkat evolusinya. Menurut Salmah (1983) dalam Erniwati (2013) sarang terbagi menjadi tiga bagian, yaitu tempat nektar atau madu, tempat anakan dan tempat polen yang disebut sel. Susunan sel di dalam sarang lebah terdiri dari 2 tipe yaitu *Cluster* (susunan sel tidak teratur) dan susunan sel berbentuk *Comb* (susunan sel yang teratur seperti sisir).

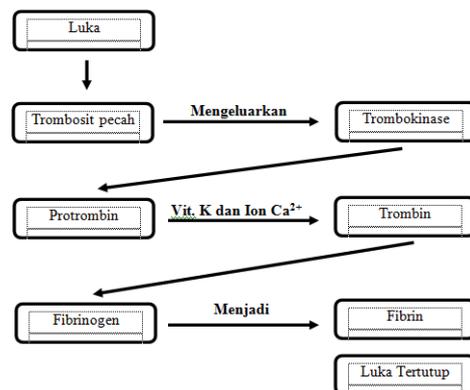
Bentuk sarang yang dimiliki oleh *T. laeviceps* adalah antara bentuk *Cluster* dan bentuk *Comb*. Lebah tak bersengat sering dijumpai hidup di hutan-hutan, namun beberapa jenis telah beradaptasi di daerah hutan terbuka, padang rumput, dan bahkan sudah banyak dijumpai di pemukiman. Selain itu sarang *T. laeviceps* sering dijumpai di daerah pemukiman penduduk, menempati rongga-rongga bambu penyangga atap atau dinding rumah, rongga-rongga pada celah pintu, tepi-tepi lantai, tepi jendela, rongga di bawah pot bunga dan pada tembok batu<sup>[9]</sup>.

### Proses Penggumpalan darah

Untuk menghasilkan penggumpalan darah maka diperlukan empat faktor penggumpalan darah, yaitu:

1. Garam kalsium, yang dalam keadaan normal ada dalam darah
2. Sel yang terluar, yang membebaskan trombokinase
3. Thrombin, yang terbentuk dari protrombin bila adanya trombokinase, dan
4. Fibrin, yang terbentuk dari fibrinogen di samping thrombin<sup>[10]</sup>.

Faktor anti penggumpalan dalam darah dalam keadaan normal mencegah penggumpalan secara spontan ketika tidak ada cedera atau luka. Akan tetapi, kadang-kadang trombosit mengumpul dan fibrin mengalami koagulasi di dalam pembuluh darah dan menghambat aliran darah. Gumpalan seperti itu disebut thrombus. Gumpalan ini lebih mungkin terbentuk pada individu yang mengidap penyakit kardiovaskuler (*cardiovascular disease*), yang merupakan penyakit jantung dan pembuluh darah<sup>[11]</sup>.



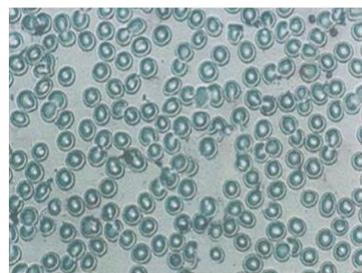
Gambar 1. Proses Penggumpalan darah

### Aktivitas Pembekuan darah

Menurut Geneser (1994) dalam Tangkery et al., 2013), menyatakan bahwa aktivitas pembekuan darah dapat juga dilihat dengan metode apusan darah yaitu untuk melihat keadaan sel darah secara mikroskopik.



Gambar 2. Darah mengalami pembekuan



Gambar 3. Darah tidak mengalami pembekuan

Pada apusan darah yang mengalami pembekuan atau koagulasi (Gambar 2), tampak sel-sel darah yang tidak terpisah satu sama lain. Trombosit darah mengalami pembekuan dan terlihat berkelompok serta memiliki daerah perifer yang transparan. Sedangkan, pada apusan darah yang tidak mengalami pembekuan atau koagulasi (Gambar 3), tampak sel-sel darah tidak saling berakaitan satu sama lain. Trombosit tampak berbentuk bulat dan

ISBN: xxxx-xxxx-xxxx

tidak berkelompok serta memiliki inti yang kosong<sup>[6]</sup>.

### Antikoagulan

Antikoagulan adalah zat yang digunakan untuk mencegah terjadinya pembekuan darah yang umumnya dipakai di klinik maupun di laboratorium<sup>[5]</sup>. Antikoagulan mencegah pembekuan darah dengan jalan menghambat fungsi beberapa faktor pembekuan darah<sup>[6]</sup>.

Antikoagulan digunakan untuk menghambat penggumpalan darah, baik secara *in vivo*, artinya pada makhluk hidup, maupun secara *in vitro*, di dalam tabung reaksi atau lebih umum lagi di luar tubuh. Penggunaan antikoagulan secara *in vivo* dimaksudkan untuk tujuan pengobatan, yaitu untuk mencegah terjadinya trombosis pada keadaan tertentu. Penggunaan antikoagulan secara *in vitro* dimaksudkan untuk memperoleh plasma (Bekuan serum) untuk tujuan analisis komponen tertentu dalam darah<sup>[12]</sup>.

Antikoagulan merupakan senyawa yang dapat menghambat proses penggumpalan darah. Antikoagulan ada yang bekerja dengan cara mengganggu pematangan protein faktor penggumpalan seperti thrombin, mengaktifkan antitrombin. Selain itu, ada pula antikoagulan yang mengikat Ion  $Ca^{2+}$ , sehingga tidak lagi bermuatan dan penggumpalan darah akan terhenti<sup>[12]</sup>.

### Mencit (*Mus musculus L.*)

Hewan coba atau sering disebut hewan laboratorium adalah hewan khusus diternakkan untuk keperluan penelitian biologi. Hewan laboratorium tersebut digunakan sebagai model untuk penelitian pengaruh bahan kimia atau obat pada manusia. Beberapa jenis hewan dari ukurannya terkecil dan sederhana ke ukuran yang besar dan lebih kompleks digunakan untuk keperluan penelitian. Salah satunya adalah mencit<sup>[13]</sup>.

Klasifikasi dari mencit (*Mus musculus L.*) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia  
Filum : Chordata  
Sub filum : Vertebrata  
Kelas : Mamalia  
Ordo : Rodentia  
Famili : Muridae  
Genus : Mus  
Spesies : *Mus musculus L.*  
(Soesilo. 1995).

Morfologi mencit yang kecil tampak praktis, sehingga dalam ruangan yang relatif kecil dapat dipelihara atau digunakan untuk penelitian dalam jumlah banyak. Di samping itu konsumsi makanannya relatif tidak banyak dibandingkan hewan lain. Dari segi reproduksi, berkembangbiak dalam waktu relatif singkat, sehingga keturunannya dapat diperoleh dalam waktu singkat pula. Maka penggunaannya sebagai hewan percobaan dapat memberikan beberapa keuntungan misalnya dalam hal tempat, waktu, tenaga dan biaya<sup>[13]</sup>.

### Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), yang terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan terdiri dari 3 kali ulangan, yaitu kontrol (-) darah tanpa diberi perlakuan, kontrol (+) darah diberi 250  $\mu$ l EDTA (konsentrasi 10%), perlakuan (I) darah diberi 210  $\mu$ l ekstrak propolis *T. laeviceps*, perlakuan (II) darah diberi 250  $\mu$ l ekstrak propolis *T. laeviceps*, perlakuan (III) : Darah diberi 280  $\mu$ l ekstrak propolis *T. laeviceps* dan perlakuan (IV) darah diberi 320  $\mu$ l ekstrak propolis *T. laeviceps*

### Teknis Penelitian

#### Pengambilan Sampel

Sampel Propolis diambil dari tempat budidaya lebah *Trigona laeviceps* di Fakultas MIPA, Universitas Mulawarman Samarinda. Sampel tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam plastik klip, kemudian sampel dibersihkan dari madu dan *bee pollen* yang melekat pada sampel tersebut. Setelah itu sampel dikering anginkan di dalam ruangan.

#### Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel dilakukan dengan menggunakan metode pengestraksian terhadap bahan alam, yaitu ekstraksi secara maserasi. Sampel yang telah dibersihkan, kemudian ditimbang dan dibekukan di dalam freezer kemudian diblender hingga halus, lalu sampel direndam dengan menggunakan pelarut etanol 95% selama 48 jam. Setelah itu sampel *dishaker* selama 24 jam dan didiamkan lagi selama 24 jam agar sampel mengendap. Kemudian sampel disaring dengan menggunakan kertas saring. Perlakuan diatas diulang lagi hingga diperoleh hasil sampel yang jernih. Kemudian sampel dipisahkan

ISBN: 978-602-72658-1-3

menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak murni<sup>[7]</sup>.

### Penyiapan Sampel Untuk pengujian (Titration)

Ekstrak propolis yang diperoleh sebelum diujikan pada sampel darah, terlebih dahulu dilakukan titrasi. Proses titrasi ini merupakan penelitian pendahuluan yang bertujuan untuk mengetahui kisaran volume minimum dari ekstrak propolis yang akan digunakan ke dalam 0,25 mL darah. Titrasi dilakukan dengan cara menaikkan volume ekstrak dan dihentikan ketika darah sudah tidak membeku, sehingga volume ekstrak yang akan digunakan adalah 0,21 mL, 0,25 mL, 0,28 mL dan 0,32 mL.

### Penyiapan Sampel Uji Darah

Sampel darah yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah yang diambil pada bagian leher mencit, dengan cara dipotong menggunakan gunting kemudian darah tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diambil dengan menggunakan alat suntik disposable 1 ml/cc steril dan jarum 26 G steril. Sebelum darah diambil, berat badan mencit ditimbang kemudian diaklimasi selama 1 minggu yaitu diberi makan berupa pellet dan air putih secukupnya. Setelah proses aklimasi selesai, mencit kembali ditimbang.

### Pengujian Ekstrak Propolis Pada Sampel Uji Darah

Ada 2 metode yang digunakan dalam pengujian ekstrak propolis ini yaitu yang pertama adalah Metode Lee-White yang sudah dimodifikasi<sup>[5]</sup>, merupakan metode yang digunakan untuk menentukan masa pembekuan darah yang diamati secara visual. Masa pembekuan darah normal pada manusia, umumnya terjadi diantara 2 – 5 menit<sup>[15]</sup>. Metode yang kedua adalah metode apusan darah, merupakan metode yang digunakan untuk melihat keadaan sel secara mikroskopik.

Pengamatan Masa Pembekuan Darah disiapkan 6 tabung reaksi yang bersih dan masing-masing tabung diberi label dari nomor 1 sampai nomor 6 sesuai dengan perlakuan, kemudian tabung tersebut diletakkan di dalam rak tabung. Terdapat 2 kontrol dan 4 perlakuan yang digunakan dalam metode ini yaitu tabung 1 merupakan kontrol (-) darah tidak diberikan perlakuan apapun. 250  $\mu$ L darah dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan pada saat bersamaan stopwatch dijalankan kemudian dihentikan ketika darah sudah membeku. Hal ini dilakukan untuk melihat masa pembekuan darah. Tabung 2 merupakan kontrol (+) yaitu 250  $\mu$ L darah ditambahkan 250  $\mu$ L EDTA kemudian

dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Pada waktu yang bersamaan stopwatch dijalankan untuk menentukan masa pembekuan darah yang terjadi. Tabung 3, merupakan perlakuan I yaitu 250  $\mu$ L darah ditambahkan 210  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps* kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Pada waktu yang bersamaan stopwatch dijalankan untuk menentukan masa pembekuan darah yang terjadi. Tabung 4, merupakan perlakuan II yaitu 250  $\mu$ L darah ditambahkan 250  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps* kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Pada waktu yang bersamaan stopwatch dijalankan untuk menentukan masa pembekuan darah yang terjadi.

Selanjutnya tabung 5, merupakan perlakuan III yaitu 250  $\mu$ L darah ditambahkan 280  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps* kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Pada waktu yang bersamaan stopwatch dijalankan dan dimatikan ketika darah membeku. Kemudian untuk tabung 6, merupakan perlakuan IV yaitu 250  $\mu$ L darah ditambahkan 320  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps* kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Pada waktu yang bersamaan stopwatch dijalankan untuk menentukan masa pembekuan darah yang terjadi.

Setelah 3 menit tabung reaksi diangkat dan masing-masing tabung dimiringkan untuk melihat apakah sudah terjadi pembekuan darah atau belum. Apabila belum terjadi pembekuan darah, maka diletakkan kembali pada rak tabung dan setiap 30 detik dilakukan hal yang sama. Pengukuran masa pembekuan darah dilakukan selama 4 hari atau 96 jam (5.760 menit), mulai dari darah diambil sampai darah dicampur dengan ekstrak hingga darah membeku.

### Apusan Darah

Sampel yang digunakan pada pengujian ini dipilih satu sampel darah dari masing-masing perlakuan. Disiapkan 6 buah kaca obyek yang bersih dan tidak berlemak dan masing-masing diberi label nomor 1 sampai 6. Kaca obyek nomor 1, untuk kontrol (-) yang tidak diberi perlakuan apapun. Kaca obyek nomor 2, untuk kontrol (+) darah yang diberi 250  $\mu$ L EDTA. Kaca obyek nomor 3, untuk darah yang diberi 210  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps*. Kaca obyek nomor 4, untuk darah yang diberi 250  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps*. Kemudian kaca obyek nomor 5, untuk darah yang diberi 280  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps*. Selanjutnya untuk

ISBN: xxxx-xxxx-xxxx

kaca obyek nomor 6, untuk darah yang diberi 320  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps*.

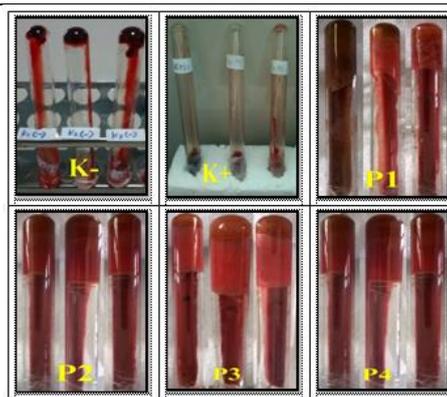
Darah diambil dari masing-masing perlakuan, kemudian darah diteteskan diatas kaca obyek nomor 1 sampai nomor 6 secara berurutan. Setelah itu dilakukan metode *slide* pada sampel darah, hingga di dapatkan apusan darah yang tipis. Selanjutnya preparat tadi difiksasi dengan alkohol 95% sampai menutupi bagian permukaannya selama 15 menit dan diangin-anginkan sampai kering. Preparat kemudian direndam dalam larutan Giemsa selama 30 menit dan preparat tersebut dibilas dengan air mengalir, selanjutnya diangin-anginkan sampai mengering. Kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop Zeiss Primo Star dengan perbesaran 400x dan didokumentasikan gambar dengan kamera.

Pengamatan mikroskopik apusan darah, dilakukan dengan mengamati morfologi dari sel darah tersebut. Trombosit pada sediaan apusan darah yang mengalami pembekuan tampak padat dan berkelompok serta memiliki daerah perifer yang transparan. Sedangkan pada sediaan apusan darah yang tidak membeku trombosit tampak berbentuk bulat dan tidak berkelompok serta memiliki inti yang kosong<sup>[6]</sup>.

## Hasil dan Pembahasan

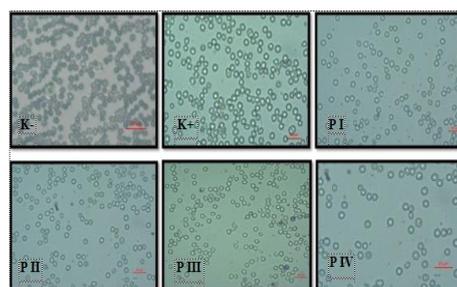
Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan masa (menit) pembekuan darah dari nilai terendah hingga tertinggi yaitu  $1.732 \pm 0$  Kontrol (-),  $33.777 \pm 0.910$  (Perlakuan I),  $37.825 \pm 0.938$  (Perlakuan II),  $38.650 \pm 1.045$  (Perlakuan IV),  $46.672 \pm 2.118$  (Perlakuan III) dan  $75.895 \pm 0$  Kontrol (+).

Sementara itu, uji statistika menunjukkan bahwa terdapat beda nyata yang signifikan pada masa pembekuan darah ( $P < 0.05$ ) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Perbedaan nyata antar kelompok terjadi pada kelompok kontrol (+) dengan kelompok kontrol (-) pada masa pembekuan darah. Baik, kelompok kontrol (+) maupun kelompok kontrol (-) juga memiliki beda nyata terhadap ke empat kelompok perlakuan yang ada yaitu perlakuan I, perlakuan II, perlakuan III dan perlakuan IV. Sedangkan untuk semua perlakuan (PI, PII, PIII dan PIV) tidak memiliki beda nyata yang signifikan ( $P > 0.05$ ).



Gambar 4. Gambaran keadaan darah saat diberi perlakuan. Kelompok kontrol, K (-) tanpa perlakuan, K (+) 250  $\mu$ L EDTA (konsentrasi 10%), kelompok perlakuan (P I) 210  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps*, (P II) 250  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps*, (P III) 280  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps* dan (P IV) 320  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps*.

Selain itu, masa pembekuan darah juga dapat diamati dengan menggunakan metode apusan darah (Gambar. 5). Metode apusan darah sendiri ialah metode yang digunakan untuk melihat keadaan sel darah secara mikroskopik<sup>[6]</sup>.



Gambar 5. Gambaran Preparat Apusan Darah Mencil. K (-) kelompok kontrol tanpa perlakuan, K (+) kelompok kontrol 250  $\mu$ L EDTA (konsentrasi 10%), (P I) kelompok perlakuan 210  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps*, (P II) kelompok perlakuan 250  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps*, (P III) kelompok perlakuan 280  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps* dan (P IV) kelompok perlakuan 320  $\mu$ L ekstrak propolis *T. laeviceps* dengan Perbesaran 400x.

Pembekuan darah adalah proses dimana komponen darah ditransformasikan menjadi material semisolid yang dinamakan bekuan darah. Bekuan darah tersusun terutama oleh sel-sel darah yang terperangkap dalam jaringan-jaringan fibrin. Proses pembekuan darah bermula saat terjadinya luka atau cedera, pembuluh darah yang putus mengalami kontriksi dan retraksi disertai dengan reaksi hemostatis. Fase hemeostatis terjadi karena trombosit yang

ISBN: 978-602-72658-1-3

keluar dari pembuluh darah saling melengket (membentuk sumbat trombosit), dan bersamaan dengan jala fibrin yang terbentuk membekukan darah yang keluar dari pembuluh darah<sup>[16]</sup>.

Pembentukan bekuan (Koagulasi darah) memperkuat sumbat trombosit dan mengubah darah disekitar tempat cedera menjadi suatu gel yang tidak mengalir. Sebagian besar faktor yang diperlukan untuk pembekuan darah selalu terdapat di dalam plasma dan dalam bentuk prekursor inaktif. Sewaktu pembuluh mengalami cedera, kolagen yang terpapar kemudian mengalami reaksi berjenjang yang melibatkan suksesif faktor-faktor pembekuan tersebut, yang akhirnya mengubah fibrinogen menjadi fibrin. Fibrin, suatu molekul berbentuk benang yang tidak larut, ditebarkan membentuk jaringan bekuan; jaringan ini kemudian menangkap sel-sel darah dan menyempurnakan pembentukan bekuan. Darah yang telah keluar ke dalam jaringan juga mengalami koagulasi setelah bertemu dengan tromboplastin jaringan, yang juga memungkinkan terjadinya proses pembekuan. Jika tidak lagi diperlukan, bekuan darah dilarutkan oleh plasmin, suatu faktor fibrinolitik yang juga diaktifkan apabila berkontak dengan kolagen<sup>[16]</sup>.

Komponen hemostatis akan melepaskan dan mengaktifkan sitokin yang meliputi faktor pertumbuhan epidermis, faktor pertumbuhan mirip insulin, faktor pertumbuhan yang berasal dari trombosit dan faktor pertumbuhan  $\beta$  yang bertransformasi. Berperan untuk terjadinya kemotaktis neutrofil, makrofag, mast sel, sel endothelial dan fibroblast. Fibroblast ini nantinya akan membentuk jaringan parut dalam proses penyembuhan luka. Bersamaan dengan ini terjadi pula fase inflamasi. Fase ini berlangsung sejak terjadinya luka hingga 4-5 hari<sup>[16]</sup>.

Salah satu cara untuk menghambat terjadinya pembekuan darah adalah dengan jalan menambahkan zat anti pembekuan darah yaitu antikoagulan. Antikoagulan sendiri adalah zat yang digunakan untuk menghambat terbentuknya bekuan darah atau menghambat beberapa faktor pembekuan darah dan berfungsi mempertahankan keadaan cairan darah. Jika bekuan darah terbentuk, maka akan menyebabkan terjadinya penyumbatan pada sirkulasi darah<sup>[17]</sup>.

Namun tidak semua jenis antikoagulan dapat dipakai, karena ada beberapa antikoagulan yang dapat mempengaruhi bentuk erosit atau leukosit yang akan diperiksa morfologinya. Pencampuran antara sampel darah dengan antikoagulan haruslah dilakukan dengan sangat

lembut, karena dapat menyebabkan hemolisis. Antikoagulan memiliki banyak jenis, sesuai dengan jenis pemeriksaan yang akan dilakukan ataupun sesuai dengan pengobatan yang sedang dijalani. Masing-masing jenis antikoagulan tersebut memiliki cara kerja yang berbeda-beda pula, dalam mencegah terbentuknya bekuan darah. antikoagulan yang baik adalah yang tidak merusak komponen-komponen yang terkandung di dalam darah dan sesuai dengan jenis pemeriksaan yang diinginkan.

Jenis antikoagulan antara lain, natrium sitrat (trisodium citrat) bersifat isotonis dengan darah dan tidak bersifat toksik sehingga dapat juga digunakan dalam transfusi darah. Antikoagulan *heparin* merupakan antikoagulan yang normal dalam tubuh, namun heparin jarang digunakan dalam pemeriksaan-pemeriksaan klinis laboratorium karena harganya yang mahal. *Double oxalate* merupakan antikoagulan yang digunakan untuk menghindari perubahan volume eritrosit. *NaF (Natrium florida)* dan *kalium oxalat*, merupakan antikoagulan yang dimaksudkan untuk pemeriksaan glukosa darah, namun masih bisa digunakan untuk pemeriksaan hematologi. Antikoagulan EDTA (*Ethylene diamine tetra acetate*), antikoagulan yang mengubah ion kalsium dari darah menjadi bentuk yang bukan ion sehingga pembekuan dapat dicegah. Antikoagulan ini sangat luas pemakaiannya dan paling sering digunakan di laboratorium, khususnya pada pemeriksaan hematologi. EDTA mampu membuat sel-sel darah bertahan lebih lama dibandingkan dengan antikoagulan lainnya. Selain itu, antikoagulan EDTA ini, sangat baik karena tidak mempengaruhi morfologi sel darah.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa darah tanpa diberikan perlakuan apapun (K-), masih dalam batas normal masa pembekuan darah menciit yaitu berkisar antara 2-5 menit<sup>[15]</sup>. Hal ini dikarenakan tidak adanya penambahan antikoagulan (EDTA ataupun ekstrak *T. laeviceps*), sehingga menyebabkan terjadinya pembekuan darah. Pada darah yang diberikan penambahan EDTA (K+), menunjukkan tidak terjadinya pembekuan darah. Hal ini, sesuai dengan pernyataan dari Rosmiati dan Gan (1995) dalam Tangkery *et al.*, (2013) menyatakan bahwa EDTA mampu mengikat ion kalsium ( $Ca^{2+}$ ) pada darah sehingga tidak bermuatan lagi (Ca). Ini sesuai dengan sifat yang dimiliki oleh EDTA yaitu sebagai pencelak kation bivalen (*chelating agent*), karena proses itulah sehingga tidak terjadinya pembekuan pada darah (K+).

ISBN: xxxx-xxxx-xxxx

EDTA (*Ethylene diamine tetra acetate*) adalah garam natrium atau kaliumnya. Antikoagulan ini tidak berpengaruh terhadap besar dan bentuknya eritrosit dan tidak juga terhadap leukosit. Selain itu EDTA mencegah trombosit bergumpal, karena itu EDTA sangat baik dipakai sebagai antikoagulan pada hitung trombosit. EDTA biasa digunakan dalam bentuk larutan 10% pada pemeriksaan hematologi. Selain itu EDTA memiliki harga yang lebih murah dibandingkan dengan jenis antikoagulan lainnya<sup>[5]</sup>.

Kemampuan dari ekstrak *T. laeviceps* dalam mencegah terjadinya pembekuan darah terlihat pada kelompok perlakuan PI, PII, PIII dan PIV, hal ini menguatkan dugaan bahwa ekstrak propolis *T. laeviceps* memiliki potensi sebagai antikoagulan seperti EDTA. Namun, jika dibandingkan antara waktu pembekuan darah ekstrak propolis *T. laeviceps* dengan EDTA, lebih panjang waktu pembekuan darah EDTA daripada ekstrak propolis *T. laeviceps* (melewati kisaran normal masa pembekuan darah).

Potensi antikoagulan yang dimiliki oleh ekstrak propolis *T. laeviceps*, diduga karena adanya senyawa aktif dari golongan flavonoid yang terkandung di dalamnya yang berperan dalam mencegah terjadinya proses pembekuan darah. Pendapat ini dikuatkan oleh (Tukan, 2008) yang menyatakan bahwa senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak propolis cukup tinggi  $\pm 50\%$ . Sementara itu, menurut Gould dan Lister (2006) dalam Lessy *et al.*, (2013) menyatakan bahwa senyawa fitokimia dari golongan flavonoid dalam dunia kedokteran dimanfaatkan dalam pengobatan yaitu sebagai antikoagulasi (mencegah terjadinya pembekuan darah). Senyawa flavonoid sendiri, berkerja dengan cara mencegah terjadinya aglutinasi (berkumpulnya trombosit) pada saat terjadinya luka. Hal ini, yang menyebabkan tidak terjadinya pembekuan darah pada saat ekstrak propolis *T. laeviceps* ditambahkan pada 250  $\mu$ l darah. Senyawa flavonoid juga sering disebut sebagai pengencer darah karena khasiatnya yang mampu mencegah terjadinya penggumpalan pada darah.

Akan tetapi, peningkatan volume ekstrak yang diberikan pada masing-masing perlakuan PI, PII, PIII dan PIV tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap lamanya masa pembekuan darah yang terjadi. Hal ini, terlihat pada perlakuan PIV ( $38.650 \pm 1.045$ ) yang mengalami penurunan masa pembekuan darah (lamanya waktu yang dibutuhkan oleh darah untuk membeku). Semestinya semakin tinggi volume ekstrak yang diberikan, maka akan

memberikan peningkatan pada masa pembekuan darah tersebut. Seperti pada PI ( $33.777 \pm 0.910$ ), PII ( $37.825 \pm 0.938$ ) dan PIII ( $46.672 \pm 2.118$ ) yang mengalami peningkatan masa pembekuan darah, seiring dengan peningkatan volume yang diberikan pada darah tersebut.

Sementara itu, pengamatan aktivitas antikoagulan tidak hanya dapat diamati dengan melihat masa pembekuan darah yang terjadi (waktu yang dibutuhkan oleh darah untuk membeku), akan tetapi dapat juga diamati dengan melihat keadaan sel-sel darah secara mikroskopik melalui metode apusan darah.

Berdasarkan hasil pengamatan preparat apusan darah (Gambar. 5), pada preparat (K-) tanpa perlakuan, sel-sel darah tampak padat dan berkelompok serta memiliki bentuk sel yang tidak teratur, bentuk sel yang tidak teratur ini dikarenakan trombosit darah pecah sehingga menyebabkan terjadinya pembekuan darah. Hal ini, sesuai dengan pernyataan dari (Fitriyah, 2011) bahwa pada saat terjadi pendarahan pada tubuh, trombosit akan pecah dan mengeluarkan enzim trombokinase (tromboplastin) yang menjadi awal dari proses pembekuan darah.

Pada preparat (K+) penambahan EDTA, tampak sel-sel darah tidak saling berkaitan satu dengan lainnya dan bentuk sel-sel darah masih terlihat utuh. Hal ini, sesuai dengan pernyataan (Tangkery *et al.*, 2013) yang menyatakan pada preparat apusan darah yang tidak mengalami pembekuan, sel-sel darah tampak berbentuk bulat dan tidak berkelompok serta memiliki inti yang kosong. Sedangkan, Pada preparat kelompok perlakuan I, II, III dan IV penambahan ekstrak propolis *T. laeviceps*, tampak memiliki kemiripan dengan preparat (K+) yaitu sel-sel darah masih memiliki bentuk utuh dan tidak saling berkaitan serta terpisah satu dengan lainnya.

Berdasarkan parameter pengamatan yang telah dilakukan, terlihat aktivitas antikoagulan dari ekstrak propolis *T. laeviceps* dalam mencegah terjadinya pembekuan darah. Hal ini, membuktikan potensi dari ekstrak propolis *T. laeviceps* yang memungkinkan untuk dijadikan sebagai alternatif antikoagulan alami. Sementara itu, potensi yang dimiliki ini memungkinkan propolis dijadikan sebagai obat alami terhadap penyakit pada sistem kardiovaskuler, misalnya serangan jantung. Sebagian besar serangan jantung terjadi akibat adanya penggumpalan darah. Seperti kita ketahui antikoagulan dikenal sebagai obat

ISBN: 978-602-72658-1-3

pengencer darah. Artinya, antikoagulan berfungsi untuk mencegah darah dari pembekuan atau koagulasi. Penggunaan obat-obatan ini penting untuk mencegah komplikasi aritmia jantung. Diantara obat-obatan yang sering digunakan yaitu warfarin dan aspirin.

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak propolis *Trigona laeviceps* memiliki potensi sebagai antikoagulan, ini terlihat dari aktivitas antikoagulan yang ditunjukkan pada saat pengamatan masa pembekuan darah ( $33.777 \pm 0.910$  -  $46.672 \pm 2.118$  melewati kisaran normal masa pembekuan darah) ataupun pengamatan morfologi sel darah pada preparat apusan darah. Volume ekstrak sebanyak 210  $\mu$ L mulai memberikan pengaruh sebagai antikoagulan pada darah mencit (*Mus musculus* L.), ditandai dengan lamanya waktu yang diperlukan darah untuk membeku, melewati kisaran normal masa pembekuan darah.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Rudy Agung Nugroho, M.Si., Ph.D dan Dr. Syafrizal, M.P yang telah banyak memberikan bimbingan dan masukan dalam penelitian ini. Disampaikan pula terimakasih kepada laboran-laboran Laboratorium Biologi FMIPA Biologi Universitas Mulawarman serta seluruh pihak yang telah memberikan bantuannya selama penelitian.

### Daftar Pustaka

- [1] Suseno, D. 2009. Aktivitas Antibakteri Propolis *Trigona* spp. Pada Dua Konsentrasi Berbeda Terhadap Cairan Rumen Sapi. *Skripsi*: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB, Bogor.
- [2] Abidin, S. 2010. Peran Propolis *Trigona* sp. Asal Padeklang Terhadap Tiga Bakteri Asam Laktat. *Skripsi*: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB, Bogor.
- [3] Suranto, A. 2010. *Dahsyat Propolis Untuk Menggempur Penyakit*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- [4] Adiprabowo, H. 2008. Potensi Antibakteri Campuran Propolis *Trigona* spp dan Garam Kelapa Terhadap *Streptococcus mutans*. *Skripsi*: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB, Bogor.
- [5] Gandasoebrata, R. 2008. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Dian Rakyat, Jakarta.
- [6] Tangkery, R. A. B., D. S. Paransa, and A. Rumengan. 2013. Uji Aktivitas Antikoagulan Ekstrak Mangrove (*Aegiceras corniculatum*). *Pesisir dan Laut Tropis*, 1 (1): 7-14.
- [7] Sholikhah, M. 2012. Analisa Fitokimia dan Uji Daya Antimikroba Ekstrak Produk Sarang Lebah *Trigona incisa* Terhadap *Streptococcus sobrius* dan *Candida albicans*. *Skripsi*: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Samarinda.
- [8] Tukan, G. D. 2008. Pengaruh Propolis *Trigona* spp. Asal Padeklang Terhadap Beberapa Isolat Bakteri Usus Sapi dan Penelusuran Komponen Aktifnya. *Skripsi*: IPB, Bogor.
- [9] Erniwati. 2013. Kajian Biologi Lebah Tak Bersengat (Apidae: *Trigona*) Di Indonesia. *Fauna Indonesia*, 12 (1): 29-34.
- [10] Evelyn, P. C. 2005. *Anatomi dan Fisiologi Untuk Paramedis*. PT. Gramedia, Jakarta.
- [11] Campbell, N. A., J. B. Reece, and L. G. Mitchell. 2000. *Biologi I*. Edisi kelima, Jilid III. Erlangga, Jakarta.
- [12] Sadikin, M. 2001. *Biokimia Darah*. Widya Medik, Jakarta.
- [13] Zefanya, N. 2013. Efektifitas Pemberian Bee Pollen Lebah *Trigona incisa* terhadap proses penyembuhan Luka Pada Mencit (*Mus musculus* L.). *Skripsi*: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman, Samarinda.
- [14] Soesilo. 1995. *Hewan Vetebrata*. Gajah Mada Press, Yogyakarta.
- [15] Astuti, K. W. 2011. Kombinasi Asetosal dan Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.) Dapat Memperpanjang Waktu Pendarahan Koagulasi Pada Mencit. *Skripsi*: Universitas Udayana, Denpasar.
- [16] Dewi, S. P. 2010. Perbedaan Efek Pemberian Lendir Bekicot (*Achatina fulica*) dan Bioplacenton<sup>TM</sup> Terhadap Penyembuhan Luka Bersih Pada Tikus Putih. *Skripsi*: Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- [17] Kee, J. L., and E. R. Hayes. 1996. *Farmakologi*. ECG, Jakarta.
- [18] Lessy, a., D. S. Paransa, and G. gerung. 2013. Uji Aktivitas Antikoagulan Pada Sel Darah Manusia Dari Ekstrak Alga Coklat *Turbinaria ornata*. *Pesisir dan Laut Tropis*, 2 (1): 21-27.

ISBN: xxxx-xxxx-xxxx

---

- [19] Fitriyah, L. 2011. Pengaruh Getah Pohon Pisang Ambon (*Musa acuminata* L.) Terhadap Waktu Pendarahan, Koagulasi dan Penutupan Luka Pada Mencit (*Mus musculus*). Skripsi: UIN Sunan Kalijaga, Yogyakarta.