

**PENGARUH PEMBERIAN MADU (*Mel depuratum*)
TERHADAP KADAR SOD DAN *CASPASE 9* PADA
TIKUS WISTAR JANTAN YANG DIBERI PAPARAN
ASAP ROKOK**

Tesis



Magister Ilmu Biomedik

**Ela Fentri
MBK. 2015.010.173**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2024**

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN MADU (*Mel depuratum*)
TERHADAP KADAR SOD DAN CASPASE 9**

**Studi Eksperimental Pada Tikus *Wistar* Jantan Yang Diberi
Paparan Asap Rokok**

Disusun oleh :

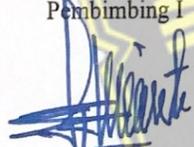
Ela Fentri

MBK. 2015.010.173

Menyetujui,
Pembimbing

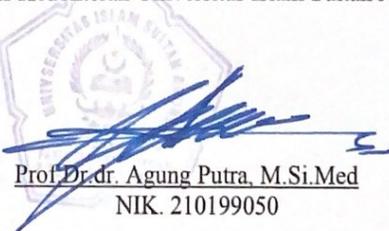
Pembimbing I

Pembimbing II


Dr. Drs. Israhnanto Isradji, M.Si
NIK. 210189027


Dr. dr. Setvo Trisnadi, SH, Sp.KF
NIK. 210199049

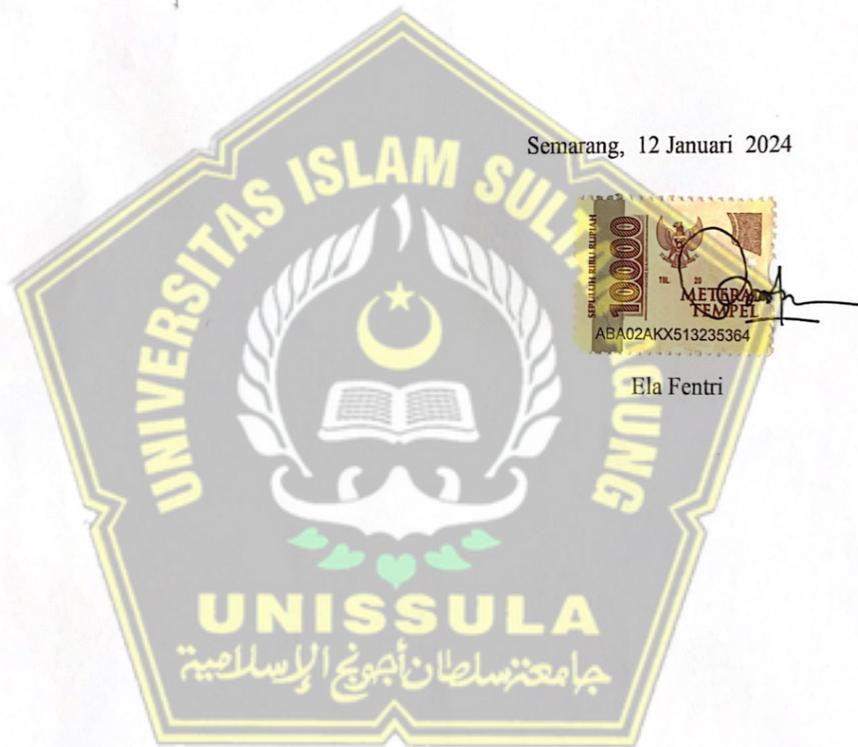
Mengetahui,
Ketua program studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung


Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med
NIK. 210199050

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di satu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 12 Januari 2024



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat, hidayah dan inayah-Nya, serta sholawat dan salam kepada junjungan kita baginda Rasulullah SAW beserta keluarga dan para sahabat-sahabatnya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “Pengaruh Pemberian Madu (*Mel depuratum*) Terhadap Kadar SOD Dan *Caspase 9* Pada Tikus Wistar Jantan Yang Diberi Paparan Asap Rokok.”

Penyusunan tesis ini merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan Magister Ilmu Biomedik, Universitas Islam Sultan Agung.

Penulis menyadari bahwa terselesaikannya tugas akhir ini tidak lepas dari bimbingan, dukungan, dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada :

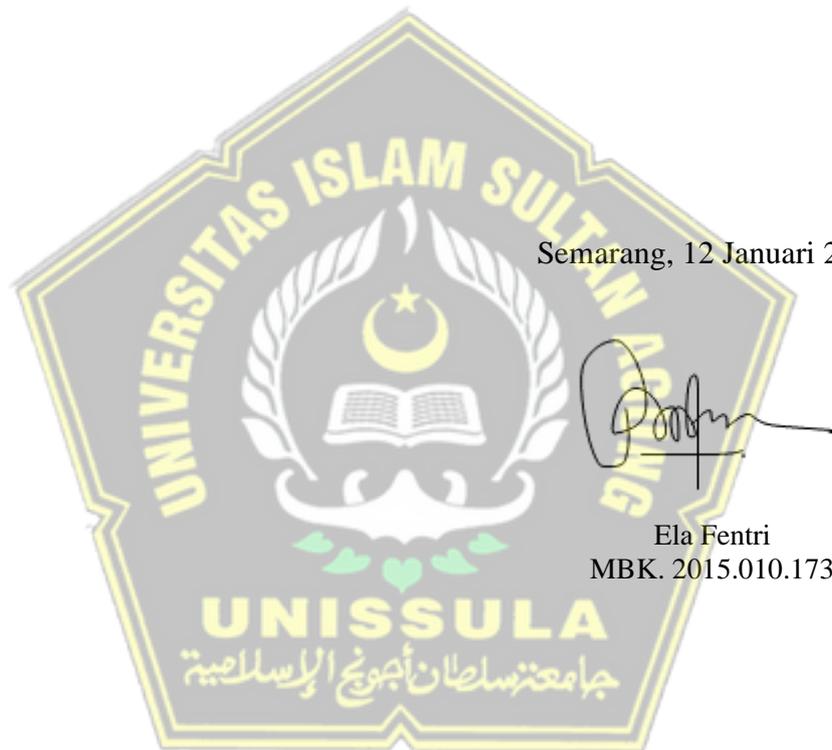
1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. Gunarto, SH, MHum
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH., Sp.KF
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof.Dr.dr. Agung Putra, M.Si. Med

4. Bapak Dr. Drs. Israhnanto Isradji, M.Si atas bimbingan, arahan dan waktu yang telah diluangkan kepada penulis untuk berdiskusi selaku dosen pembimbing pertama.
5. Bapak Dr. dr. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF selaku pembimbing kedua yang telah memberikan masukan, arahan dan saran pada saat pembimbingan tesis.
6. Bapak Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku penguji pertama yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu dan kesibukannya saat bimbingan proposal tesis.
7. Bapak Prof.Dr.dr. Agung Putra, M.Si. Med selaku penguji kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu dan kesibukannya saat bimbingan tesis.
8. Ibu Dr. Ir. Titiak Sumarwati, M.Kes selaku penguji ketiga yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu dan kesibukannya saat bimbingan tesis.
9. Seluruh Dosen Program Studi Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami Ilmu Biomedik.
10. Orang Tua dan Keluarga saya yang selalu memberi dukungan, doa, nasihat dan semangat serta selalu sabar memberi cinta kasih yang tulus.
11. Teman-teman sejawat magister Biomedik Universitas Islam Sultan Agung.
12. Serta semua pihak yang tak dapat saya sebutkan satu-persatu yang turut membantu dalam menyelesaikan penulisan tugas akhir ini.

Dengan keterbatasan pengalaman, ilmu maupun pustaka yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan dan pengembangan lanjut agar

benar-benar bermanfaat dimasa mendatang. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun agar tesis ini lebih sempurna serta sebagai masukan bagi penulis untuk penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa yang akan datang.

Akhir kata, peneliti berharap tesis ini memberikan manfaat bagi kita semua terutama untuk pengembangan ilmu pengetahuan yang ramah lingkungan.



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK/ INTISARI	xiv
ABSTRACK	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	7
1.3. Tujuan Penelitian	7
1.3.1. Tujuan Umum	7
1.3.2. Tujuan Khusus	7
1.4. Manfaat Penelitian	8
1.4.1. Manfaat Teoritis	8
1.4.2. Manfaat Praktis	8
1.5. Originilitas Penelitian	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	14

2.1. <i>Superoksida Dismutase</i>	14
2.2. Caspase – 9	20
2.3. Madu	27
2.4. Asap Rokok	33
2.5. Pengaruh Madu Terhadap Kadar SOD yang Diberi Paparan Asap Rokok	34
2.6. Pengaruh Madu Terhadap Caspase - 9 yang diberi Paparan Asap Rokok	36
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	38
3.1 Kerangka Teori	38
3.2 Kerangka Konsep	42
3.3 Hipotesis	42
BAB IV METODE PENELITIAN	43
4.1. Jenis Penelitian	43
4.2. Populasi Penelitian dan Sampel Penelitian	44
4.3. Variabel dan Definisi Operasional	45
4.3.1. Variabel	45
4.3.2. Definisi Operasional	45
4.4. Alat dan Bahan Penelitian	46
4.4.1. Alat Penelitian	46
4.4.2. Bahan Penelitian	46
4.5. Cara Penelitian	47
4.6. Alur Penelitian	53
4.7. Tempat dan Waktu Penelitian	54
4.8. Analisis Data	54
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	55
BAB VI PENUTUP	73
6.1. Kesimpulan	82
6.2 Keterbatasan dan Saran Penelitian.....	83

DAFTAR PUSTAKA75



DAFTAR SINGKATAN



<i>Asp</i>	: <i>Asam Amino Aspartat</i>
<i>ATP</i>	: <i>Adenosina Trifosfat</i>
<i>BB</i>	: <i>Berat Badan</i>
<i>Bcl-2</i>	: <i>B-cell lymphoma 2</i>
<i>BHA</i>	: <i>Butil Hidroksi Anisol</i>
<i>BHT</i>	: <i>Butil Hidroksi Toluen</i>
<i>CAD</i>	: <i>Caspase active DNase</i>
<i>Caspase</i>	: <i>Cystein Aspartate Specific Proteases</i>
<i>CAT</i>	: <i>Katalase</i>
<i>Cu</i>	: <i>Cuprum</i>
<i>DAB</i>	: <i>Diaminobenzinidine</i>
<i>DNA</i>	: <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
<i>FRET</i>	: <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
<i>GPX</i>	: <i>Glutation Peroksidase</i>
<i>H2O2</i>	: <i>Hidrogen Peroksida</i>
<i>HepG2</i>	: <i>Heptatocellular</i>
<i>KB</i>	: <i>Keluarga Berencana</i>
<i>Kg</i>	: <i>Kilogram</i>
<i>MDA</i>	: <i>Malondialdehyde</i>
<i>Mineral Cl</i>	: <i>Klorida</i>
<i>Mineral Fe</i>	: <i>Zat Besi</i>
<i>Mineral Mg</i>	: <i>Magnesium</i>
<i>Mineral P</i>	: <i>Fosfor</i>
<i>Mineral S</i>	: <i>Sulfur</i>
<i>ml</i>	: <i>Miligram</i>
<i>NADPH</i>	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
<i>nm</i>	: <i>nanometer</i>
<i>O2</i>	: <i>Oksigen</i>
<i>O2*</i>	: <i>Anion Superoksida</i>
<i>PAH</i>	: <i>Polycyclic aromatic hydrocarbon</i>
<i>PAHs</i>	: <i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
<i>PARP</i>	: <i>Poli Adenosin Difosfat-Ribosa Polimerase</i>
<i>PBS</i>	: <i>Phospate Buffer Saline</i>
<i>PHBS</i>	: <i>Perilaku Hidup Bersih dan Sehat</i>
<i>ROS</i>	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
<i>SOD</i>	: <i>Superoksida Dismutase</i>
<i>TBARS</i>	: <i>Thio Barbituric Acid Reactive Substances</i>
<i>TBC</i>	: <i>Tuberculosis</i>
<i>TBHQ</i>	: <i>TenButil Hidroksi Quinon</i>
<i>UV</i>	: <i>Ultraviolet</i>
<i>WHO</i>	: <i>World Health Organization</i>

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1.1. Originilitas Penelitian	9
Tabel 2.1. Komposisi Kimia Madu	31
Tabel 5.1. Data hasil rerata pemeriksaan kadar SOD	71



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Gambar 2.1. Letak <i>Subseluler Isoform SOD</i>	16
2. Gambar 2.2. Tempat Kerja SOD	20
3. Gambar 2.3. Peran Caspase Pada Apoptosis	23
4. Gambar 2.4. Jalur Apoptosis Intrinsik	24
5. Gambar 3.1. Skema Kerangka Teori	41
6. Gambar 3.2. Kerangka Konsep	42
7. Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian	43
8. Gambar 4.6. Alur Penelitian	46
9. Gambar 5.1. Grafik Pengaruh Pemberian Madu Terhadap Kadar SOD dan Caspase 9 pada Tikus Wistar Jantan yang Diberi Paparan Asap Rokok	57
10. Gambar 5.2 . Hasil Imunohistokimia organ paru-paru	59



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Dokumentasi Proses Penelitian	80
Lampiran 2. Sampel Penelitian	88
Lampiran 3. Dokumentasi Alat-Alat Penelitian	90
Lampiran 4. Pengolahan data pemeriksaan Kadar SOD	95
Lampiran 5. Data Interpretasi Hasil pemeriksaan imunohistokimia caspase-9	97
Lampiran 6. Gambar Interpretasi Hasil imunohistokimia caspase-9	98
Lampiran 7. Surat Izin Pemakaian Laboratorium Pangan dan Gizi UGM	102
Lampiran 8. Hasil Pemeriksaan Kadar SOD	103



PENGARUH PEMBERIAN MADU (*Mel depuratum*) TERHADAP KADAR SOD DAN CASPASE 9 PADA TIKUS WISTAR JANTAN YANG DIBERI PAPARAN ASAP ROKOK

ABSTRAK

Latar Belakang: Rokok merupakan salah satu sumber radikal bebas eksogen yang mengganggu keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh, menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh pemberian madu (*Mel depuratum*) terhadap kadar SOD dan caspase-9 pada subjek yang terpapar asap rokok.

Metode: Penelitian ini menggunakan pendekatan eksperimental laboratorium dengan desain post-test only control group. Dua puluh empat tikus Wistar dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok: K1 (tanpa paparan rokok), K2 (paparan rokok), K3 (pemberian madu dosis 0,9ml/200g BB/hari + paparan rokok), dan K4 (pemberian madu dosis 1,8ml/200g BB/hari + paparan rokok). Pada hari ke-15, diambil sampel darah dari sinus orbital mata untuk mengukur kadar SOD, dan diambil sampel jaringan paru-paru untuk pemeriksaan IHC. Data kadar SOD yang diperoleh dari penelitian ini kemudian menjalani uji normalitas dengan metode uji Shapiro-Wilk, sementara homogenitas data dinilai melalui uji Levene Test. Analisis dilakukan menggunakan uji One-Way ANOVA, diikuti dengan uji Post-Hoc LSD.

Hasil: Kadar SOD diuji untuk normalitas dan homogenitas, menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok ($p < 0,05$). Analisis IHC pada jaringan paru-paru menunjukkan hasil positif kuat pada K2 dan positif sedang pada K3, dan negatif pada K1 dan K4.

Kesimpulan: Pemberian madu dengan dosis 1,8ml/ 200g BB/hari dapat mencegah stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan kadar SOD dan serta penurunan caspase-9 pada tikus wistar setelah diberi paparan asap rokok.

Kata Kunci: Madu, Superoxide dismutase, Caspase 9, Asap Rokok

THE EFFECT OF ADMINISTRATION OF HONEY (*Mel depuratum*) ON SOD AND CASPASE 9 LEVELS IN MALE WISTAR RATS EXPOSED TO CIGARETTE SMOKE

ABSTRACT

Background: Cigarette smoke is an exogenous source of free radicals that induce oxidative stress by disrupting the balance between free radicals and antioxidants in the body. The aim of this study was to analyze the effect of honey administration (*Mel depuratum*) on the levels of Superoxide Dismutase (SOD) and caspase-9 in subjects exposed to cigarette smoke.

Method: The study utilized a laboratory experimental approach with a post-test only control group design. Twenty-four Wistar rats were randomly divided into 4 groups: K1 (no cigarette exposure), K2 (cigarette exposure), K3 (honey dosage of 0.9ml/200g BW/day + cigarette exposure), and K4 (honey dosage of 1.8ml/200g BW/day + cigarette exposure). On the 15th day, blood samples were taken from the orbital sinus of the rats to measure SOD levels, and lung tissue samples were collected for immunohistochemistry examination (IHK). The SOD data obtained from the study underwent normality testing using the Shapiro-Wilk test, while data homogeneity was assessed through the Levene Test. Analysis was performed using One-Way ANOVA, followed by Post-Hoc LSD testing.

The Results: SOD levels were tested for normality and homogeneity, showing significant differences between groups ($p < 0.05$). Immunohistochemistry analysis of lung tissue showed strong positive results in K2, moderate positive results in K3, and negative results in K1 and K4.

Conclusion: Administration of honey at a dosage of 1.8ml/200g BW/day can prevent oxidative stress, as evidenced by increased SOD levels and decreased caspase-9 in Wistar rats exposed to cigarette smoke.

Keywords: *Honey, SOD, Caspase 9, Cigarette Smoke*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Perilaku merokok sudah merupakan hal yang sering kita jumpai dalam keseharian masyarakat, baik itu di rumah-rumah, tempat-tempat umum, bahkan lingkungan sekolah. Hal ini tentunya menjadi sesuatu yang sangat disayangkan karena menunjukkan masih rendahnya kesadaran masyarakat akan pentingnya perilaku hidup bersih dan sehat (PHBS), dimana bahaya asap rokok ini pada dasarnya bukan saja berdampak bagi kesehatan para perokok itu sendiri tetapi juga berdampak bagi orang yang tidak merokok namun berada disekitar para perokok sehingga meningkatkan risiko mereka terserang berbagai macam penyakit yang sama dengan para perokok.¹ Berdasarkan fenomena tersebut maka dipandang perlu untuk mengkaji lebih lanjut terkait pencegahan yang dapat dilakukan oleh setiap individu untuk mengurangi dampak negatif asap rokok.²

Berdasarkan data Depkes RI 2015, Indonesia menempati peringkat ke-3 dalam jumlah perokok, terutama pada usia 15-19 tahun. Bahkan, angka perokok anak-anak (5-9 tahun) juga meningkat tajam. Penelitian 2013 menunjukkan bahwa 62,2% pria dan 1,3% wanita Indonesia adalah perokok aktif, dengan 12,7% di antaranya berusia 15-19 tahun. Angka kematian akibat rokok pada tahun 2004 mencapai 427.948 jiwa, setara dengan sekitar 1.172 jiwa per hari atau 22,5% total kematian di Indonesia. Data ini menyoroti bahaya merokok yang signifikan di Indonesia, terutama di kalangan

remaja.³ Kebiasaan merokok telah terbukti menjadi penyebab lebih dari 25 jenis penyakit yang dapat mengenai berbagai organ tubuh manusia. Beberapa penyakit yang terkait dengan merokok melibatkan organ-organ seperti mulut, esofagus, faring, laring, paru-paru, pankreas, dan kandung kemih. Selain itu, merokok juga dikaitkan dengan penyakit paru obstruktif kronis dan berbagai gangguan kesehatan pembuluh darah. Bagi perokok pasif, risikonya serupa dengan perokok aktif, termasuk risiko kanker karena paparan nikotin dari asap rokok, stroke, asma bronkhial, gangguan kognitif, kelahiran prematur pada wanita hamil, serangan infeksi dihidung dan tenggorokan. Bagi anak-anak yang sering terpapar asap rokok, risikonya termasuk asma, risiko kematian dini, infeksi paru-paru, alergi, dan rentan terhadap TBC paru-paru.⁴

Asap rokok merupakan salah satu radikal bebas yang memiliki molekul dengan satu atau lebih *elektron* tidak berpasangan di orbit terluarnya, yang sangat tidak stabil dan reaktif. Radikal bebas menjadi salah satu ancaman bagi kesehatan manusia. Radikal bebas yang mengancam manusia ternyata berada di mana-mana, bisa di luar atau di dalam tubuh. Radikal bebas berkontribusi terhadap berbagai penyakit kronis dan penyakit degeneratif seperti serangan jantung, *alzheimer*, *stroke* dan kanker. Namun, radikal bebas juga berguna karena mereka membantu reaksi penting dalam tubuh kita dan dapat dimanfaatkan untuk memproduksi obat-obatan, plastik yang dirancang khusus dan bahan inovatif lainnya.⁴

Solusi yang ditawarkan dari masalah di atas salah satunya adalah meningkatkan imunitas tubuh dengan cara mengonsumsi madu yang memiliki antioksidan dan

dipercaya mampu menghambat pengaruh radikal bebas yang terkandung pada asap rokok. Mengonsumsi madu adalah cara strategi yang bisa dilakukan setiap individu baik bagi perokok aktif maupun perokok pasif. Madu juga sangat mudah didapatkan dan cukup terjangkau jika harus dikonsumsi secara rutin untuk menjaga Kesehatan tubuh⁵

Alasan penelitian ini dilakukan adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian madu terhadap kadar *Superoksida dismutase* (SOD) dan caspase 9 pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok. Kajian pengaruh madu terhadap asap rokok ini dilakukan untuk mengetahui lebih lanjut efektivitas madu terhadap radikal bebas yang ada di dalam tubuh.

Radikal bebas yang ada di tubuh manusia berasal dari 2 (dua) sumber yakni endogen (dari dalam tubuh) dan eksogen (dari luar tubuh). Eksogen yang berasal dari luar tubuh seperti polusi udara, radiasi UV (*Ultra Violet*), sinar-X, pestisida dan asap rokok. Radikal bebas endogen adalah radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh sendiri seperti *autoksidasi*, *oksidasi enzimatis* dan *respiratory burst*. Radikal bebas merupakan suatu atom molekul atau senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga sangat reaktif. Radikal bebas dapat terbentuk dalam tubuh saat bernafas sebagai hasil samping proses oksidasi atau pembakaran, olahraga yang berlebihan, ketika terjadi peradangan, terpapar polusi lingkungan seperti dari asap rokok, kendaraan bermotor, radiasi, dan sebagainya. Pada saat terjadi infeksi, radikal diperlukan untuk membunuh mikroorganisme penyebab

infeksi. Namun, paparan radikal bebas yang berlebihan dan secara terus-menerus dapat menyebabkan kerusakan sel, mengurangi kemampuan sel untuk beradaptasi terhadap lingkungannya, dan pada akhirnya dapat menyebabkan kematian sel.⁶

Radikal bebas dapat berada di dalam tubuh karena adanya hasil samping dan proses oksidasi dan pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernapas, metabolisme sel, olahraga yang berlebihan, peradangan, dan terpapar polusi salah satunya asap rokok. Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sel di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron sehingga menjadi lebih stabil, tetapi molekul sel tubuh yang diambil elektronnya akan berubah menjadi radikal bebas. Reaksi ini akan berlangsung terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan stres oksidatif yang menyebabkan suatu peradangan, kerusakan DNA atau sel, dan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya.⁷

Penelitian terdahulu melakukan kajian dengan menggambarkan model hewan maupun sel yang memperlihatkan bahwa stres oksidatif menimbulkan berbagai kelainan pada pembuluh darah. Stres oksidatif adalah suatu keadaan di mana terjadi kelebihan *reactive oxygen species* (ROS), sehingga melampaui kemampuan antioksidan endogen didalam tubuh untuk menetralkan ROS.⁸ Antioksidan endogen didalam tubuh meliputi SOD, *catalase* (CAT), *glutathion peroxidase* (GPx). SOD adalah salah satu enzim antioksidan endogen utama yang penting dalam mengatasi peningkatan ROS. SOD memiliki mekanisme pertahanan sel baik secara endogen maupun eksogen. SOD juga memiliki peran penting dalam mengurangi *aterosklerosis*

akibat stres oksidatif. *Aterosklerosis* adalah keadaan mengerasnya dinding arteri sebagai akibat plak ateromatus.⁷

Stres oksidatif didalam tubuh dapat diatas salah satunya dengan menggunakan antioksidan dari luar seperti madu. Madu kelengkeng memiliki aktivitas *antiradical* bebas. Madu kelengkeng merupakan suplemen kesehatan yang berfungsi dalam menjaga stamina tubuh. Madu mengandung senyawa *flavonoid*, *beta karoten*, vitamin A, B1, B2, B3, B5, B6, C, D, E, K, *asam fenolik*, asam urat serta mineral *Fe*, *S*, *Mg*, *P*, *Cl* yang mampu berperan sebagai antioksidan. Berdasarkan penelitiannya, terdapat peningkatan kadar SOD dan CAT pada tikus dengan perlakuan madu kelengkeng dan membuktikan bahwa madu kelengkeng mampu berperan dalam meningkatkan kadar antioksidan di dalam tubuh. Suplementasi madu kelengkeng sebelum diinduksi Pb merupakan suatu tindakan preventif untuk menjaga kadar antioksidan tubuh, sehingga ketika diinduksi Pb, tubuh sudah memiliki pertahanan terhadap ROS akibat Pb. Peranan antioksidan yang terkandung dalam madu kelengkeng terjadi secara sinergis dan saling berkaitan. Mekanisme peningkatan SOD dan Cat terjadi secara tidak langsung. Kandungan antioksidan dalam madu kelengkeng berperan dalam meningkatkan antioksidan tubuh.⁹ Madu adalah cairan manis yang berasal dari nektar tumbuhan yang diproduksi oleh lebah madu. Madu memiliki kemampuan untuk mengeliminasi radikal bebas melalui reaksi reduksi dan konjugasi. Madu diketahui memiliki kandungan asam organik, mineral, vitamin, serta kaya akan zat-zat aktif yang berperan sebagai antioksidan.⁹

Madu memiliki kandungan antioksidan yang tinggi, seperti vitamin C, E, beta-karoten, dan senyawa flavonoid, yang memiliki kemampuan untuk menurunkan apoptosis sel.¹⁰ Apoptosis adalah proses kematian sel yang terjadi secara terprogram. Kelebihan ROS (Reactive Oxygen Species) dapat meningkatkan aktivitas protein Bcl-2-associated X protein (Bax) sebagai faktor pro-apoptosis dan menginaktivasi protein Bcl-2 sebagai faktor anti-apoptosis, sehingga meningkatkan proses apoptosis dalam sel saraf. Peningkatan aktivitas Bax dan penurunan Bcl-2 dapat mengaktifkan Cysteine-aspartic acid protease 3 (caspase-3) sebagai mediator utama apoptosis yang juga menyebabkan apoptosis dalam sel.¹¹

Apoptosis tidak akan terjadi tanpa aktivasi caspase. Caspase (Cysteine Aspartate Specific Proteases) memiliki substrat alami seperti Poly-ADP-ribose polymerase (PARP), gelsolin, sitokeratin, dan DNA fragmentation factor 45 kDa (DFF45). Caspase memegang peranan penting dalam apoptosis.¹² Caspases, yang merupakan protease sisteinil-aspartat spesifik, merupakan komponen kunci dari sinyal molekuler dengan berbagai fungsi tergantung pada jenisnya dan organ yang terlibat. Aktivasi caspases menjadi penanda kerusakan sel dalam kondisi penyakit seperti stroke dan infark miokard. Keterlibatan caspase sebagai indikator ini memiliki potensi untuk penelitian obat. Bentuk caspase-9 menjadi penanda penting untuk titik masuk jalur sinyal apoptosis pada sel, di mana aktivasi caspase ini menunjukkan kerusakan sel.^{13,14}

Berdasarkan manfaat positif madu dalam mengurangi stres oksidatif dengan menurunkan ROS dalam sel, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek madu, jenis

yang belum banyak diteliti sebelumnya, terhadap kadar SOD dan caspase-9. Penelitian akan dilakukan pada tikus Wistar jantan yang terpapar asap rokok. Dengan demikian, diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan pemahaman yang lebih dalam tentang potensi madu sebagai agen antioksidan dan pencegah apoptosis dalam kondisi paparan asap rokok.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas dan mempertimbangkan luasnya ruang lingkup yang terkait dengan penelitian ini, perlu dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai panduan dalam mencapai tujuan penelitian. Oleh karena itu, rumusan masalah yang diajukan adalah sebagai berikut:

- 1.2.1. Apakah pemberian dosis madu (*Mel depuratum*) berpengaruh terhadap kadar SOD pada tikus Wistar jantan yang terpapar asap rokok?
- 1.2.2. Apakah pemberian dosis madu (*Mel depuratum*) berpengaruh terhadap kadar Caspase 9 pada tikus Wistar jantan yang terpapar asap rokok?

1.3. Tujuan Penelitian

- 1.3.1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian dosis madu (*Mel depuratum*) terhadap kadar SOD pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- 1.3.2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian dosis madu (*Mel depuratum*) terhadap caspase 9 pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok dibandingkan dengan kelompok kontrol.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

1.4.1.1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada para pembaca terkait dengan pengaruh pemberian dosis madu (*Mel depuratum*) terhadap kadar *SOD* pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok.

1.4.1.2. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada para pembaca terkait dengan pengaruh pemberian dosis madu (*Mel depuratum*) terhadap *caspase 9* pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai bahan kajian dalam mendeteksi lebih dini bahaya paparan asap rokok yang diduga dapat menurunkan kadar *SOD* dan aktivasi *caspase 9* yang merupakan signal kerusakan sel. Hasil penelitian juga diharapkan dapat dijadikan bahan dalam mengembangkan penelitian lanjutan baik itu dari subjek, objek, metode penelitian, maupun variabel-variabel yang digunakan di dalam penelitian yang berkaitan dengan kadar *SOD* dan *caspase 9*.

1.5. Originilitas Penelitian

Originalitas penelitian memuat penjelasan tentang keaslian penelitian dimana penelitian ini merupakan penelitian yang baru dan masalah yang ada belum pernah dipecahkan oleh peneliti lain. Berikut disajikan originalitas penelitian dalam bentuk tabel:

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

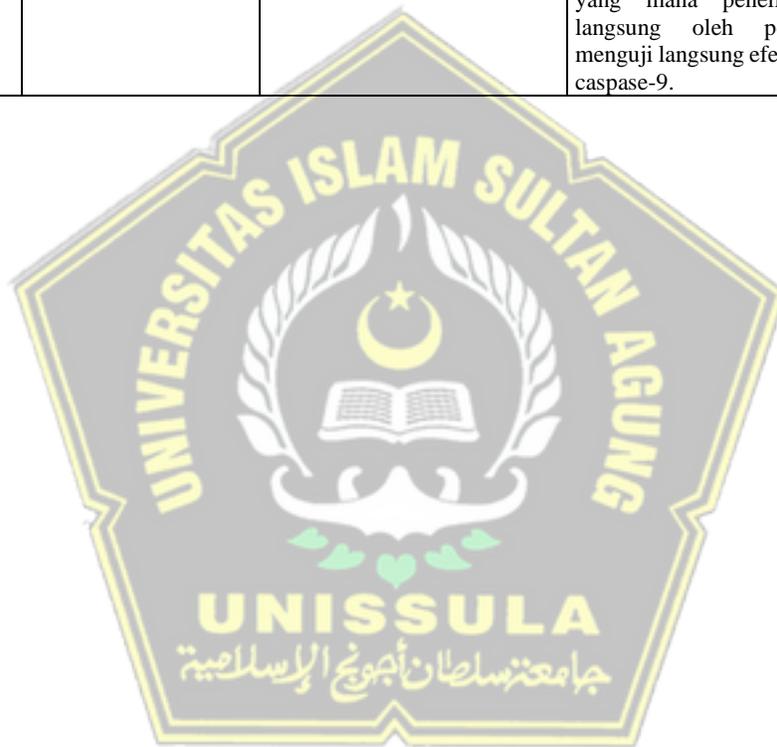
Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil Penelitian
Primayanti, et al. (2020)	<i>Effect of Kele honey (Trigona sp) in Malondyaldehyde and Superoxide Dismutase Serum and Hepatic Tissue of White Rats (Rattus norvegicus) Exposed to Cigarettes Smoke</i>	Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan desain posttest only control group design. Analisis statistik menggunakan program statistik SPSS, uji yang digunakan adalah analisis komparatif rata-rata dengan uji T-independent (<i>Mann WhitneyTest for nonparametric</i>) untuk membandingkan mean MDA dan SOD serum tikus dan jaringan hepar yang terpapar asap rokok.	Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata MDA serum pada kelompok kontrol adalah $0,2247 \pm 0,1192$, dan pada kelompok perlakuan adalah $0,2394 \pm 0,1058$, ($p > 0,05$). Rerata jaringan hati MDA pada kelompok kontrol adalah $0,5951 \pm 0,1029$, dan pada kelompok perlakuan adalah $0,6721 \pm 0,6721$ ($p > 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata SOD serum pada kelompok kontrol adalah $1,0724 \pm 0,3446$, dan pada kelompok perlakuan adalah $0,6166 \pm 0,2841$, ($p < 0,05$). Rerata SOD hepatic pada kelompok kontrol adalah $1,0174 \pm 0,3249$, dan pada kelompok perlakuan adalah $0,6721 \pm 0,0847$, ($p < 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata MDA baik serum maupun hepar pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, perbedaannya tidak signifikan. Sedangkan rerata SOD baik serum maupun hepar pada kelompok intervensi lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol, perbedaannya bermakna. Perbedaan penelitian ini dengan penelitian yang akan dikaji peneliti adalah madu yang digunakan untuk perlakuan. Pada penelitian Primayanti, et al menggunakan madu lebah tanpa ngengat, sedangkan pada penelitian yang akan dikaji peneliti adalah madu dengan kandungan flavonoid tinggi.
Widowati, Retno Dr. M.Si (2021)	Karakteristik Kimia Madu <i>stinglessbee Tetragonula sapiens</i> Sebagai Penghambat Sel kanker	Metode yang digunakan adalah eksperimental design.	Hasil penelitian menjelaskan bahwa madu stingless bee <i>Tetragonula sapiens</i> pada penelitian ini mengandung senyawa flavonoid, quersetin dan fenolik yang memiliki sifat sebagai antikanker. Antioksidan yang ada pada madu memainkan peran dalam efek kemopreventif. Mekanisme aktivitas antikanker madu dan bahan-bahannya adalah antioksidan, apoptosis, penghambat faktor nekrosis tumor, antiproliferatif, imunomodulator, antiinflamasi dan efek estrogenic.

			Perbedaan dengan penelitian yang akan diteliti peneliti adalah perbedaan variable penelitian. Widowati, Retno Dr. M.Si. (2021) hanya menggunakan dan meneliti madu saja (tanpa ada sampel lain). Sedangkan pada penelitian yang akan dilakukan peneliti adalah madu yang akan diberikan pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok.
Cabezudo, Fernandez, Maria J., et al (2013)	<i>Intravenous Administration of Manuka honey Inhibits Tumor Growth and Improves Host Survival When Used in Combination with Chemotherapy in a Melanoma Mouse Model</i>	Metode yang digunakan adalah eksperimental design.	Temuan dari penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian sistemik madu manuka tidak terkait dengan perubahan nilai kimia hematologis atau klinis dalam serum tikus yang diobati, menunjukkan profil keamanannya. Pengobatan dengan madu manuka saja menghasilkan sekitar 33% penghambatan pertumbuhan tumor, yang berkorelasi dengan peningkatan apoptosis tumor yang dapat diamati secara histologis. Meskipun kontrol pertumbuhan tumor yang lebih baik diamati pada hewan yang diobati dengan paclitaxel saja atau dalam kombinasi dengan madu manuka (penghambatan 61%), peningkatan dramatis dalam kelangsungan hidup inang terlihat pada kelompok pengobatan bersama. Ini menyoroti peran baru yang berpotensi untuk madu manuka dalam mengurangi toksisitas yang diinduksi kemoterapi. Perbedaan penelitian ini dengan penelitian yang dilakukan peneliti adalah bahwa Cabezudo, Fernandez, Maria J., et al (2013) meneliti pemberian madu terhadap sel kanker. Sementara peneliti hanya meneliti kadar SOD dan caspase 9 nya saja setelah diberikan madu .
Ahmed & Othman (2013)	<i>honey as a Potential Natural Anticancer Agent: A Review of Its Mechanisms</i>	Review Article Bertujuan untuk mengumpulkan temuan dari beberapa penelitian yang diterbitkan dalam literatur untuk memahami mekanisme kerjanya.	Hasil penelitian menunjukkan bahwa madu mungkin memiliki potensi untuk menjadi agen antikanker melalui beberapa mekanisme. Meskipun mekanisme lengkapnya belum sepenuhnya dipahami, penelitian telah menunjukkan bahwa madu memiliki efek antikanker melalui interferensinya dengan beberapa jalur pensinyalan sel, seperti menginduksi apoptosis, antiproliferatif, antiinflamasi, dan jalur antimitogenik. Madu

			<p>memodulasi sistem kekebalan tubuh. Masih banyak yang belum menjawab pertanyaan; mengapa gula pada dasarnya bersifat karsinogenik. pemahaman kita tentang efek positif madu dan kanker. Apa yang terlihat dalam kultur sel atau eksperimen hewan mungkin tidak berlaku untuk manusia. Percobaan klinis terkontrol acak prospektif diperlukan untuk memvalidasi keaslian madu baik sendiri atau sebagai terapi tambahan.</p> <p>Perbedaan penelitian ini dengan penelitian yang akan dilakukan peneliti adalah hanya sebuah <i>Review Article</i> yang bertujuan untuk mengumpulkan temuan dari beberapa penelitian yang diterbitkan dalam literatur untuk memahami mekanisme kerjanya. Sementara peneliti melakukan langsung penelitian tersebut (secara langsung di laboratorium), bukan hanya sekedar review artikel.</p>
Sibarani, <i>et al</i> (2013)	Studi Histopatologi Hepar Tikus Putih yang Diinduksi Aspirin Pasca Pemberian Madu Per Oral	Eksperimental design	<p>Data hasil pemeriksaan dianalisis dengan uji statistik non parametric Kruskal Wallis. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan lesi kongesti dan peradangan antara kontrol dengan perlakuan 1, 2 dan 3. Tidak ada perbedaan lesi yang signifikan antara perlakuan 1, 2 dan 3. Kesimpulannya adalah ada peran madu sebagai barrier pada mukosa lambung dan usus terhadap efek samping aspirin sebagai zat hepatotoksik.</p> <p>Perbedaan penelitian ini dengan penelitian yang akan dilakukan peneliti adalah terletak pada perlakuan pada sampel penelitian. Sibarni, <i>et al</i> (2013) menggunakan aspirin sebelum diberikan pemberian madu, sementara peneliti menggunakan asap rokok sebagai paparan radikal bebas sebelum diberikan madu .</p>
Sahhugi, <i>et al</i> (2014)	<i>Protective Effects of Gelam honey against Oxidative Damage in Young and Aged Rats</i>	Eksperimental design	<p>Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim antioksidan darah dan jantung ditentukan dengan spektrofotometer. Kerusakan DNA dan tingkat MDA berkurang pada kedua kelompok suplemen madu gelam. Madu gelam meningkatkan tes serum CAT dan aktivitas SOD</p>

			<p>jantung pada aktivitas CAT muda dan jantung pada kelompok muda dan tua. Kerusakan DNA meningkat pada kelompok usia d dibandingkan dengan kelompok muda, namun berkurang pada akhir penelitian. Gambaran kerusakan oksidatif pada tikus yang diberi suplementasi madu gelam diduga melalui hemodulasi aktivitas enzim antioksidan.</p> <p>Perbedaan penelitian ini dengan yang akan dikaji peneliti adalah Sahhugi, <i>et al</i> (2014) meneliti kerusakan oksidatif pada tikus yang diberi air putih. Berbeda dengan penelitian yang akan dilakukan peneliti yaitu menggunakan tikus wistar yang diberi paparan asap rokok.</p>
Hariwaluyo, (2015)	Perbedaan Ekspresi <i>Cystein Aspartate Specific Proteases – 9 (Caspase-9)</i> pada pasien Karsinoma Nasofaring WHO Tipe 3 Stadium III dan IV	Eksperimental design	<p>Hasil penelitian yang dianalisis dan dibahas dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan bermakna $p=0.039$ ekspresi pada KNF WHO tipe 3 stadium III dengan ekspresi caspase – 9 pada KNF WHO tipe 3 stadium IV.</p> <p>Perbedaan penelitian Hariwaluyo (2015) adalah terletak pada sasaran sampel penelitian. Pada penelitian yang dilakukan peneliti adalah menggunakan tikus wistar jantan dengan paparan asap rokok.</p>
Ahmed, et al, (2013)	<i>Honey as a Potential Natural Anticancer Agent: A Review of Its Mechanisms</i>	Review Article	<p>Hasil penelitian menunjukkan bahwa madu berpotensi menjadi agen antikanker melalui beberapa mekanisme. Meskipun mekanisme lengkapnya belum sepenuhnya dipahami, penelitian menunjukkan bahwa madu memiliki efek antikanker melalui interferensi dengan beberapa jalur sinyal sel, seperti menginduksi jalur apoptosis, antiproliferatif, anti-inflamasi, dan antimutagenik. Madu memodulasi sistem kekebalan tubuh. Madu yang pada dasarnya adalah gula memiliki sifat antikarsinogenik. Madu dari sumber bunga yang berbeda mungkin memberikan efek yang berbeda. Diperlukan lebih banyak penelitian untuk meningkatkan pemahaman kita tentang efek positif madu dan kanker. Apa yang terlihat pada kultur sel atau eksperimen pada hewan mungkin tidak berlaku pada manusia. Uji klinis prospektif acak</p>

			<p>terkontrol diperlukan untuk memvalidasi keaslian madu, baik sebagai terapi tunggal atau sebagai terapi tambahan.</p> <p>Perbedaan penelitian Ahmed, et al (2013) dengan penelitian ini adalah penelitiannya hanya dilakukan dengan mereview artikel-artikel hasil penelitian terdahulu mengenai efek madu terhadap mekanisme caspase, sedangkan penelitian yang dilakukan peneliti adalah penelitian eksperimen yang mana penelitian dilakukan langsung oleh peneliti dengan menguji langsung efek madu terhadap caspase-9.</p>
--	--	--	--



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Superoksida Dismutase (SOD)*

2.1.1. Definisi

Superoksida dismutase (SOD) adalah salah satu enzim antioksidan endogen potensial dalam tubuh, yang merupakan pertahanan antioksidan primer, dan yang juga memiliki peran penting dalam mengurangi aterosklerosis akibat stress oksidatif. *Stress oksidatif* terjadi karena tidak seimbangnya jumlah radikal bebas dengan jumlah antioksidan endogen yang diproduksi tubuh seperti SOD, *Glutation peroksidase (GPX)*, dan *katalase (CAT)*. Keadaan ini dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel yang dapat menimbulkan berbagai penyakit seperti: kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya. Radikal bebas dapat berada di dalam tubuh karena adanya hasil samping dari proses oksidasi, dan pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernafas, metabolisme sel, olahraga atau aktivitas fisik yang berlebih/ maksimal, peradangan, dan terpapar polusi dari luar tubuh seperti asap kendaraan, asap rokok, makanan, logam berat, industri, dan radiasi matahari.⁷

Radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh dapat dinetralisir dengan adanya suatu antioksidan endogen, yaitu salah satunya SOD. Misalnya *hiperkolesterolemia* yang disebabkan oleh peningkatan kadar kolesterol darah akan meningkatkan jumlah radikal bebas dalam tubuh. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya *stress oksidatif*, yaitu keadaan di mana tidak seimbangnya radikal bebas di dalam tubuh dengan jumlah

antioksidannya. Keadaan *stress oksidatif* dapat diketahui dengan menentukan aktivitas *SOD* darah di dalam tubuh. *SOD* merupakan salah satu antioksidan enzimatik, dan *metaloenzim* dalam tubuh; aktivitasnya tergantung pada kofaktor logam *Cu, Fe, Zn,* dan *Mn*. *Superoksida dismutase* adalah *metaloenzim* yang mengkatalisis reaksi reduksi radikal *anion superoksida (O₂^{*})* menjadi *hidrogen peroksida (H₂O₂)*, dan *oksigen (O₂)*. Enzim ini bersifat tidak stabil terhadap panas, cukup stabil pada kondisi basa (PH 6,5-7,5), dan masih mempunyai aktivitas walaupun disimpan sampai 5 tahun pada suhu 5°C. Aktivitas *SOD* tertinggi ditemukan di hati, kelenjar adrenalin, ginjal, darah, limfa, pankreas, otak, paru-paru, lambung, usus, ovarium, dan timus.¹⁵

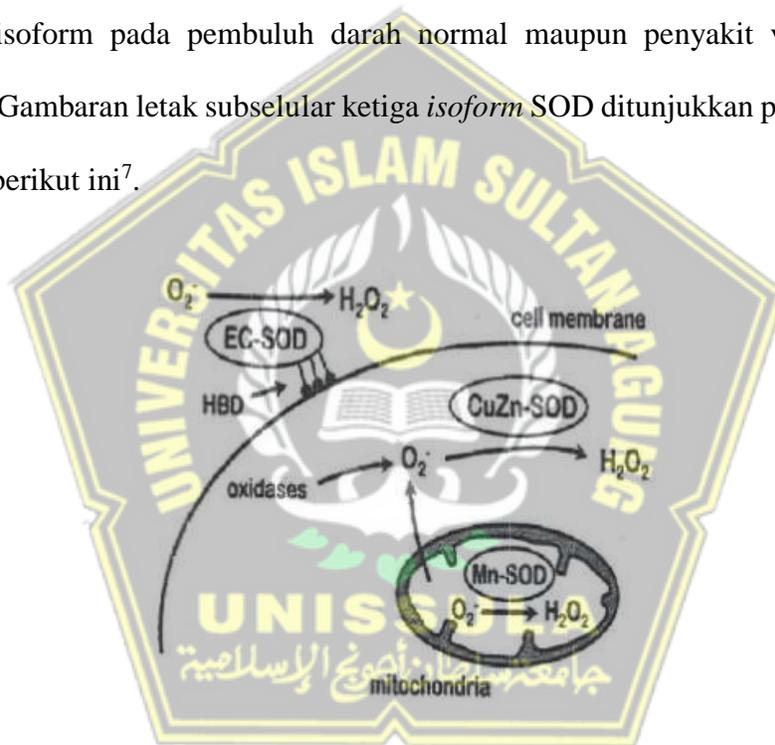
Adapun reaksinya adalah sebagai berikut:



Enzim antioksidan (*antioksidant endogenous*) adalah antioksidan yang diproduksi oleh tubuh manusia sebagai penangkal radikal bebas eksogen maupun radikal bebas endogen seperti: *SOD, CAT* dan *GPx*. Antioksidan enzimatik disebut juga antioksidan sekunder, yaitu antioksidan yang berfungsi menangkap radikal bebas dan menghentikan pembentukan radikal bebas.¹⁷ Berdasarkan hal ini, *SOD* adalah salah satu antioksidan enzim yang terdapat dalam tiga isoform di dalam tubuh yang mana masing-masing merupakan produk gen yang berbeda, tetapi mengkatalisis reaksi yang sama, yaitu mengubah *anion superoksida (O₂⁻)* menjadi *hidrogen peroksida* dan oksigen seperti ditunjukkan pada reaksi sebagai berikut:



Ketiga *isoform SOD* tersebut adalah sitosolik atau tembaga-seng SOD (CuZn-SOD atau SOD-1), mangan SOD (Mn-SOD atau SOD-2) yang terletak dalam mitokondria, dan suatu ekstraselular dari CuZn-SOD (EC-SOD atau SOD3). Walaupun letak subselular dari *tiap isoform SOD* adalah unik, fungsi dari masing-masing isoform pada pembuluh darah normal maupun penyakit vaskuler sangat penting. Gambaran letak subselular ketiga *isoform SOD* ditunjukkan pada Gambar 2.1 sebagai berikut ini⁷.



Gambar 2.1
Letak Subselular Isoform SOD⁷

Ekspresi dan aktivitas SOD memberikan pengaruh dan respon yang dalam bagi sel-sel vaskuler yang mengalami *stress oksidatif* akut maupun kronis. Selain mengkatalisis *dismutase ion superoksida* menjadi *hidrogen peroksida* dan oksigen, aktivitas enzim SOD berfungsi sebagai pelindung terhadap sitotoksitas dengan mediasi *superoksida*, melindungi NO dan *signal mediasi-NO* dalam vaskuler, mengaktifkan NO sehingga mencegah *signal mediasi-NO*, di mana reaksi NO dengan *superoksida* menghasilkan *peroksinitrit*, suatu oksidan potensial untuk menghasilkan *sitotoksitas*.¹⁶

Sistem antioksidan didalam tubuh berfungsi untuk melawan bahaya radikal bebas baik radikal bebas eksogen maupun endogen. Selain itu, antioksidan juga berfungsi menangkap radikal bebas dan menghentikan pembentukan radikal bebas adalah antioksidan primer. Antioksidan tersebut adalah SOD, GPx, dan CAT. Berdasarkan sumbernya antioksidan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia dikelompokkan menjadi tiga sebagai berikut ini:

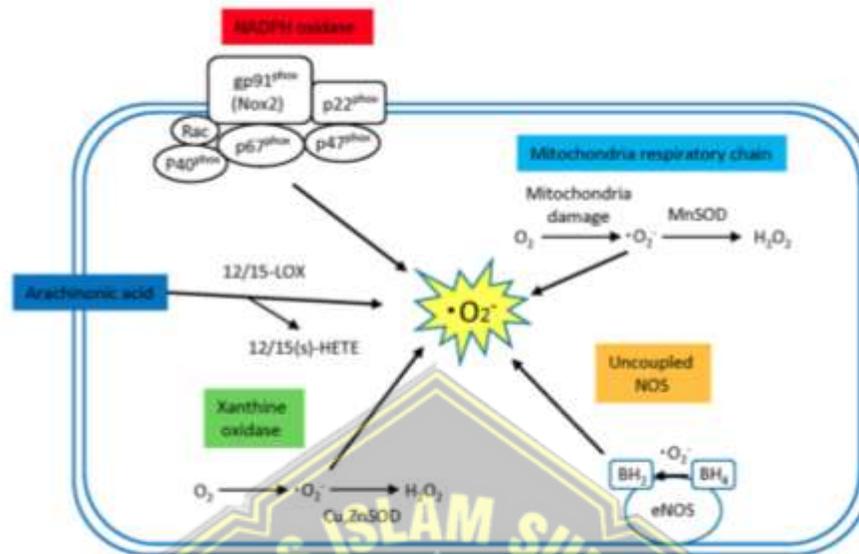
- a. Antioksidan yang sudah diproduksi di dalam tubuh manusia yang dikenal dengan antioksidan endogen atau enzim *antioksidan SOD, GPx*, dan katalase.
- b. Antioksidan sintetis yang banyak digunakan pada produk pangan seperti *Butil Hidroksi Anisol (BHA)*, *Butil Hidroksi Toluen (BHT)*, *propil galat*, dan *TenButil Hidroksi Quinon (TBHQ)*.

- c. Antioksidan alami yang diperoleh dari bagian-bagian tanaman seperti kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji dan serbuk sari seperti vitamin A, vitamin C, vitamin E, dan senyawa *fenolik (flavonoid)*.⁷

Superoksida dismutase (SOD) adalah metaloenzim yang mengubah *superoksida* menjadi *hidrogen peroksida*.⁶ Lebih lanjut SOD juga didefinisikan sebagai *metalloenzymes* yang mengandung atom tembaga, seng atau besi yang dibentuk dalam sitosol dan yang mengandung mangan dibentuk di dalam matrik mitokondria, cara kerjanya dengan mengkatalisis dismutasi pada *superoxide* menjadi *hydrogen peroxide* dan *oksigen*, *hydrogen peroxide* mudah untuk berdifusi melewati membrane plasma. Selanjutnya *hydrogen peroxide* diubah menjadi molekul air oleh enzim katalase dan *glutation peroksidase*. SOD merupakan enzim antioksidan yang berefek sangat kuat dan merupakan pertahanan tubuh pertama dalam menghadapi radikal bebas. Keberadaan SOD dapat ditemukan di otak, hati, sel darah merah, ginjal, tiroid, testis, otot jantung, mukosa lambung, kelenjar pituitari, pankreas dan paru. SOD ditemukan pada seluruh makhluk hidup yang penting bagi perlindungan sistem aerobik untuk mencegah keracunan oksigen (dan derivat radikal bebas dalam oksigen). Aktivitas SOD dapat dijadikan acuan pengukuran stress oksidatif dalam tubuh. Kadar SOD juga dipengaruhi oleh usia jika semakin tua maka kadar SOD semakin menurun, selain itu juga dikendalikan oleh faktor *genetic*.¹⁷

2.1.2. Jenis SOD

Superoxide Dismutase (SOD) terdiri dari beberapa jenis, di antaranya adalah Copper Zinc Superoxide Dismutase (Cu, Zn SOD), Manganese Superoxide Dismutase (Mn SOD), dan Iron Superoxide Dismutase (Fe SOD). Cu, Zn SOD merupakan protein dimerik dengan dua subunit identik yang terikat secara non-kovalen. Berlokasi di sitoplasma dan organel, Cu, Zn SOD memiliki ukuran sekitar 32.000 kDa. Fungsinya sangat penting sebagai bagian dari sistem pertahanan tubuh terhadap radikal bebas. Mn SOD berperan sebagai antioksidan utama dalam menghambat aksi superoxide dismutase di dalam mitokondria. Dengan ukuran sekitar 40.000 kDa, Mn SOD terdiri dari empat subunit dengan atom mangan. Tipe ini dominan dihasilkan di cairan ekstraseluler oleh beberapa sel, seperti sel endotel dan fibroblast. Fe SOD adalah enzim yang umumnya ditemukan pada prokariota, tumbuhan, dan bakteri. Strukturnya melibatkan tiga ion besi yang berikatan dengan tiga histidin, satu aspartat, dan satu molekul air. Ini merupakan elemen penting dalam pertahanan antioksidan pada berbagai organisme.¹⁸



Gambar 2.2 Tempat Kerja SOD¹⁴

2.2. Caspase - 9

2.2.1. Definisi

Caspases (*sisteinil protease-aspartat spesifik*) adalah komponen penting dari sinyal molekuler dengan berbagai tugas tergantung pada subtype dan organ yang terlibat. Aktivasi caspases ini merupakan penanda untuk kerusakan sel dalam penyakit seperti stroke dan infark miokard. Keterlibatan sebagai indikator sendiri ini potensial untuk penelitian obat.¹³ Bentuk *caspase-9* merupakan penanda penting titik masuk sel ke jalur sinyal *apoptosis*, dimana aktivasi caspases ini merupakan penanda untuk kerusakan sel.¹⁴

Kematian sel secara terprogram atau yang dikenal sebagai apoptosis sangat penting dalam patogenesis kanker, karena kegagalan untuk terjadinya apoptosis ini

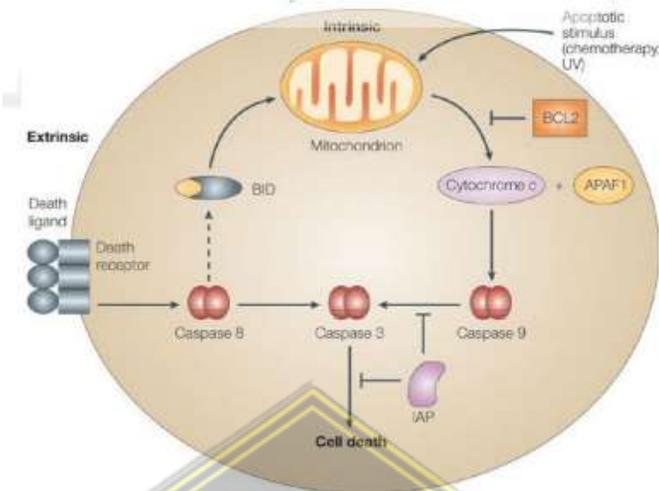
mengakibatkan peningkatan sel kanker yang tidak terkendali. Penghindaran kematian sel terprogram melibatkan mekanisme yang kompleks dengan banyak molekul dan proses, terutama yang dimediasi oleh enzim proteolitik yang disebut *caspase*, dengan mekanisme pembelahan protein spesifik dalam sitoplasma dan nukleus, hingga kematian sel. Mitokondria juga memainkan peran penting dalam pengaturan jalur apoptosis tertentu. Banyak senyawa bioaktif, termasuk polifenol dan vitamin yang ditemukan dalam madu terbukti mempengaruhi fungsi mitokondria. Menargetkan proses-proses ini sangat penting untuk menghambat pertumbuhan tumor.¹⁹

Caspase dapat secara selektif mengenali substratnya melalui rantai peptida yang spesifik berupa residu *asam amino aspartat (Asp)* pada posisi P1 (C-terminus). Selain itu, inhibitor selektif caspase-3 dilaporkan mampu menghidrolisis substrat caspase-3 dengan berikatan dengan kantung aktifnya, artinya inhibitor tersebut bersifat kompetitif terhadap substrat. Penelitian mengenai substrat dan inhibitor caspase memiliki peranan penting dalam pengembangan caspase sebagai target terapeutik.²⁰ Oleh karena itu, pengontrolan caspase belakangan menjadi target untuk terapi kanker.²¹ Peran *caspase* dalam *apoptosis* dapat dibagi menjadi caspase inisiator dan *caspase efektor*. Di antara caspase inisiator (*caspases-8, -9, dan -10*), *caspase-8* dan *caspase-9* merupakan kunci utama pada golongan caspase tersebut. Sedangkan *caspase-3* adalah *caspase* yang dominan di antara *caspase efektor* (*-3, -6, dan -7*). *Caspase-9* menginduksi *apoptosis* melalui jalur intrinsik dan *caspase-8* melalui jalur ekstrinsik. Kemudian keduanya mengaktifasi *caspase efektor* seperti *caspase-3*. Akan

tetapi, peran yang lebih jauh dari *caspase* -3, -8, dan -9 belum sepenuhnya dieksplorasi dan belum secara detail menjelaskan pengaruh lain selain mengaktivasi jalannya apoptosis secara langsung.²¹

Peran yang lebih jauh atau peran lain dari *caspase*-9 dan -3 ketika mengeksekusi terjadinya *apoptosis* pada jalur intrinsik setelah pelepasan *sitokrom c* ditemukan oleh Bretnall dkk. *Caspase*-9 dapat membelah *protein Bid* menjadi *tBid* pada asam amino 59 untuk memproduksi *ROS*, sedangkan di sisi lain *caspase*-3 juga berperan dalam sensitivitas dari *apoptosis* dan menghambat produksi *ROS* serta membuat apoptosis berjalan dengan efisien. Sedangkan pada *caspase*-8 dan *caspase*-3 yang merupakan jalur ekstrinsik penelitian dilakukan oleh Kominami dkk dengan mengembangkan metode baru menggunakan FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Besarnya sinyal ekstrinsik yang diterima sel dapat diatur dan kinetika, dinamika, serta selektivitas dari jalur apoptosis yang dimediasi *caspase*-8 didefinisikan ulang. Berdasarkan hasil tersebut dapat ditemukan konsentrasi dari *caspase*-8 yang dibutuhkan untuk menyebabkan *apoptosis* hanya kurang dari 1% dari total seluruh *caspase*-8.²²

Caspase 9 ada dalam bentuk monomer inaktif. Autokatalitik pada *caspase 9* akan terjadi apabila terjadi pemotongan antar-rantai dan *caspase 9* berikatan dengan apoptosom.²³ Situs aktif *caspase*-9 berisi residu Cys230, His224, Cys272, His237, Cys239, dan Cys287, serta merupakan tempat terikatnya ion Zn (seng).²⁴



Gambar 2.3 Peran *Caspase* Pada *Apoptosis*¹⁴

Dari gambar di atas tampak bahwa *caspase 8* mengawali proses perusakan sebagai respon terhadap ligan ekstraseluler yang mengaktivasi *death domains* pada reseptor sitoplasma. *Caspase 9* mengawali perusakan sebagai respon terhadap zat yang memacu pelepasan *sitokrom C* dari *mitokondria*, sedangkan *caspase 3* mengamplifikasi sinyal dari *caspase 8* atau *caspase 9* menuju *apoptosis*.¹⁴

Berikut dijelaskan jalur apoptosis intrinsik yang berkaitan dengan penelitian ini. Jalur apoptosis intrinsik merupakan proses alami yang mengarahkan sel menuju kematian sel terprogram. Jalur apoptosis intrinsik mengaktifkan kaskade sinyal sel yang merupakan bagian tak terpisahkan dari perkembangan dan fungsi suatu organisme. Jalur intrinsik jalur apoptosis dimulai ketika terjadi cedera di dalam sel dan stres yang diakibatkannya mengaktifkan jalur apoptosis. Baik dalam jalur apoptosis intrinsik maupun ekstrinsik, pensinyalan menghasilkan aktivasi keluarga *protease Cys*

(Sistein), bernama *caspases*, yang bertindak dalam kaskade proteolitik untuk membongkar dan menghilangkan sel yang sekarat.²⁵

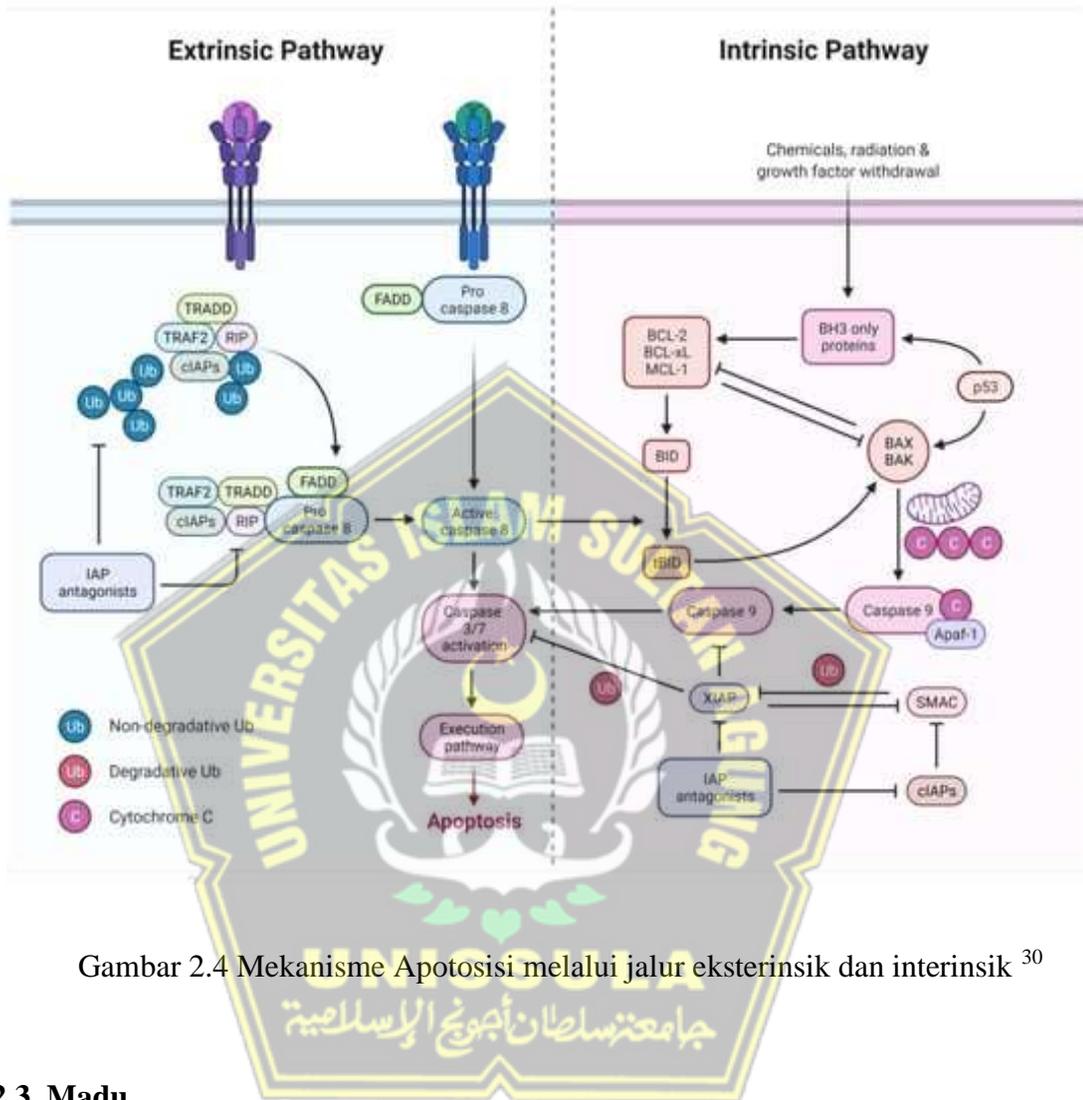
Jalur apoptosis intrinsik dimulai ketika terjadi cedera di dalam sel. Tekanan intrinsik seperti onkogen, kerusakan DNA langsung, hipoksia, dan kekurangan faktor kelangsungan hidup, dapat mengaktifkan jalur apoptosis intrinsik. p53 adalah sensor stres seluler dan merupakan penggerak penting jalur intrinsik. Protein pos pemeriksaan DNA, ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated protein*), dan *Chk2 (Checkpoints Factor-2)*, secara langsung memfosforilasi dan menstabilkan p53 serta menghambat MDM2 (*Mouse Double Minute-2 Homolog*) yang dimediasi oleh ubiquitinasi p53. MDM2 mengikat p53 dan memediasi ekspor nuklir. Ketika terikat pada MDM2, p53 tidak dapat lagi berfungsi sebagai penggerak transkripsi. p53 memulai apoptosis dengan mengaktifkan transkripsi anggota keluarga Bcl2 pro-apoptosis dan menekan protein Bcl2 anti-apoptosis dan CIAP. Target p53 lainnya termasuk BAX, Noxa, PUMA (*p53-Upregulated Modulator of Apoptosis*), dan yang paling baru diidentifikasi, BID. p53 juga mentransaktivasi gen lain yang mungkin berkontribusi terhadap apoptosis, termasuk PTEN (*Phosphatase dan Tensin Homolog Deleted On Chromosome-10*), APAF1, Perp, p53AIP1 (Protein Penginduksi Apoptosis-1 yang diatur p53), dan gen yang menyebabkan peningkatan ROS (*Spesies Oksigen Reaktif*). ROS ini menyebabkan kerusakan oksidatif umum pada semua komponen mitokondria. Kerusakan DNA mitokondria mengganggu fosforilasi oksidatif mitokondria, yang berkontribusi terhadap sejumlah penyakit manusia.²⁶

Protein lain yang dilepaskan dari mitokondria yang rusak, seperti SMAC (*Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase*), Diablo, Arts, dan Omi/HTRA2 (*High Temperature Requirement Protein-A2*), menangkalkan efek IAP (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*), yang biasanya mengikat dan mencegah aktivasi Caspase-3. Interaksi antara IAP anggota keluarga Bcl, SMAC, dan Omi/HTRA2 merupakan pusat jalur apoptosis intrinsik. Studi terbaru menunjukkan bahwa nuklease lain, EndoG (*Endonuclease-G*), secara spesifik diaktifkan oleh rangsangan apoptosis dan mampu menginduksi fragmentasi nukleosom DNA secara independen dari Caspase dan DFF (*DNA-Fragmentation Factor*)/CAD (*Caspase-Activated DNase*). EndoG adalah nuklease spesifik mitokondria yang bertranslokasi ke nukleus dan memotong DNA kromatin selama apoptosis. Protein lain, AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), juga dianggap berperan dalam apoptosis, menjadi aktif setelah translokasi dari mitokondria ke nuklei, di mana ia memulai kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA skala besar.²⁷

Dari Proses tersebut, Caspase-8 yang diaktifkan mengaktifkan Caspase-3 melalui dua jalur. Pada jalur pertama Caspase-8 memotong BID (*Bcl2 Interacting Protein*), dan bagian terminal COOH-nya bertranslokasi ke mitokondria di mana ia memicu pelepasan CytoC (*Cytochrome-C*). CytoC yang dilepaskan berikatan dengan APAF1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*) bersama dengan dATP dan Procaspase-9 dan mengaktifkan Caspase-9. Caspase-9 memotong Procaspase-3 dan mengaktifkan Caspase-3. Jalur lainnya adalah Caspase-8 memotong Procaspase-3 secara langsung dan mengaktifkannya. Caspase-3 memotong faktor fragmentasi DNA ICAD (*Inhibitor*

of Caspase-Activated DNase) dalam bentuk heterodimerik yang terdiri dari CAD dan ICAD yang dibelah. ICAD yang terpecah berdisosiasi dari CAD, menginduksi oligomerisasi CAD yang memiliki aktivitas DNase. Oligomer CAD aktif menyebabkan fragmentasi DNA internukleosom, yang merupakan tanda apoptosis yang menunjukkan kondensasi kromatin.²⁸

Apoptosis yang dipicu oleh stres terjadi melalui mekanisme yang melibatkan perubahan permeabilitas mitokondria dan pelepasan CytoC selanjutnya serta pembentukan apoptosom, platform multiprotein katalitik yang mengaktifkan Caspase-9. Caspase-9 yang diaktifkan kemudian membelah Caspase-3, mengakibatkan peristiwa hilir yang menyebabkan kematian sel. Pelepasan CytoC diatur oleh protein keluarga Bcl2. Bcl2L (Bcl2-Like), BclXL (Bcl2 Terkait Protein *Long Isoform*), dan anggota keluarga Bcl2 anti-apoptosis lainnya berada di membran luar mitokondria dan mencegah pelepasan *CytoC*. BAX (*Bcl2 Associated X-protein*), BID (*BH3 Interacting Death Domain*), dan BIM (*Bcl2-Interacting Protein*) awalnya tidak aktif dan harus bertranslokasi ke mitokondria untuk menginduksi apoptosis, baik dengan membentuk pori-pori di mitokondria secara langsung atau dengan mengikat melalui domain BH3 menjadi Bcl2, BclXL, dan Bfl1, dan memusuhi protein anti-apoptosis ini.²⁹



Gambar 2.4 Mekanisme Apoptosis melalui jalur eksterinsik dan interinsik ³⁰

2.3. Madu

2.3.1. Definisi

Madu adalah cairan alami yang umumnya mempunyai rasa manis yang dihasilkan oleh lebah madu dari sari bunga tanaman (floral nektar) atau bagian lain dari tanaman (ekstra floral nektar) atau ekskresi serangga.³¹ Madu mengandung sejumlah senyawa dan sifat antioksidan yang telah banyak diketahui. Sifat antioksidan

dari madu yang berasal dari zat-zat enzimatis (misalnya, *katalase*, *glukosa oksidase* dan *peroksidase*) dan zat-zat nonenzimatis (misalnya, *asam askorbat*, *α-tokoferol*, *karotenoid*, *asam amino*, *protein*, *produk reaksi Maillard*, *flavonoid* dan *asam fenolat*). Jumlah dan jenis antioksidan ini sangat tergantung pada sumber bunga atau varietas madu, dan telah banyak banyak penelitian yang menunjukkan bahwa adanya hubungan antara aktivitas antioksidan dengan kandungan total fenol.³²

Masyarakat Indonesia menggunakan madu sebagai campuran pada jamu tradisional untuk meningkatkan khasiat penyembuhan penyakit seperti infeksi pada saluran cerna dan pernafasan, serta meningkatkan kebugaran tubuh. Madu juga memiliki kemampuan untuk meningkatkan kecepatan pertumbuhan jaringan baru.⁴ Madu mengandung banyak mineral seperti *natrium*, *kalsium*, *magnesium*, *aluminium*, *besi*, *fosfor*, dan *kalium*. Vitamin-vitamin yang terdapat dalam madu adalah *thiamin (B1)*, *riboflavin (B2)*, *asam askorbat (C)*, *piridoksin (B6)*, *niacin*, *asam pantotenat*, *biotin*, asam folat, dan vitamin K. Sedangkan enzim yang penting dalam madu adalah *enzim diastase*, *invertase*, *glukosa oksidase*, *peroksidase*, dan *lipase*. Selain itu unsur kandungan lain madu adalah memiliki zat antibiotik atau antibakteri.³³

2.3.2. Jenis Madu

Madu berdasarkan sumber nektar bunganya dibedakan menjadi dua yaitu madu monofloral berasal dari satu jenis nektar atau didominasi oleh satu nektar, misal madu randu dan madu kelengkeng dan madu multifloral adalah madu yang berasal dari

berbagai jenis tanaman sebagai contoh madu dari lebah yang mendapatkan nektar dari berbagai jenis tanaman.³⁴

Madu berdasarkan asal nektarnya dapat digolongkan menjadi tiga, yaitu: Madu Flora, madu *Ekstraflo* dan madu Embun. Madu Flora adalah madu yang dihasilkan dari nektar bunga yang berasal dari satu jenis bunga disebut madu monoflora, yang berasal dari aneka ragam bunga disebut madu *polyfloral*. Madu *polyfloral* dihasilkan dari beberapa jenis tanaman dari nektar bunga. Madu *Ekstraflo* adalah madu yang dihasilkan dari nektar di luar bunga seperti daun, cabang atau batang tanaman. Madu Embun adalah madu yang dihasilkan dari cairan hasil suksesi serangga yang meletakkan gulanya pada tanaman, kemudian dikumpulkan oleh lebah madu dan disimpan dalam sarang madu.³⁴

2.3.3. Komposisi dan Kandungan Madu

Madu adalah cairan kental yang dihasilkan oleh lebah madu dari berbagai sumber nektar. Madu tersusun atas 17,1% air; 82,4% karbohidrat total; 0,5% protein; asam amino; vitamin dan mineral (Al fady, 2015). Madu mengandung banyak mineral seperti natrium, kalsium, magnesium, aluminium, besi, fosfor dan kalium. Vitamin-vitamin yang terdapat dalam madu adalah *thiamin* (B1), *riboflavin* (B2), asam *askorbat* (C), *piridoksin* (B6), *niacin*, asam *pantotenat*, *biotin*, asam *folat*, dan vitamin K. Enzim yang penting dalam madu adalah enzim *diastase*, *invertase*, *glukosa oksidase*, *peroksidase*, dan *lipase*. Enzim *diastase* adalah enzim yang mengubah karbohidrat kompleks (polisakarida) menjadi karbohidrat yang sederhana

(monosakarida). Enzim *invertase* adalah enzim yang memecah molekul sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Enzim *oksidase* adalah enzim yang membantu oksidasi glukosa menjadi asam *peroksida*. Enzim peroksidase melakukan proses oksidasi metabolisme. Semua zat tersebut berguna bagi proses metabolisme tubuh.

Madu merupakan suplemen kesehatan yang berfungsi dalam menjaga stamina tubuh. Madu mengandung senyawa flavonoid, beta karoten, vitamin A, B1, B2, B3, B5, B6, C, D, E, K, asam fenolik, asam urat serta mineral Fe, S, Mg, P, Cl yang mampu berperan sebagai antioksidan.³⁵ Penelitian Yuniastuti, (2015) menemukan bahwa madu mampu berperan dalam meningkatkan kadar antioksidan didalam tubuh, khususnya SOD. Peranan antioksidan yang terkandung dalam madu terjadi secara sinergis dan saling berkaitan. Mekanisme peningkatan SOD terjadi secara tidak langsung. Kandungan antioksidan dalam madu berperan dalam meningkatkan antioksidan tubuh.³⁶

Madu mengandung senyawa flavonoid yang mana kandungan flavonoid ini merupakan antioksidan eksogen yang dapat membantu menangkal radikal bebas dengan cara langsung menghambat terbentuknya senyawa oksigen reaktif melalui pemotongan reaksi oksidasi berantai atau dengan menangkap radikal bebas atau dengan mempengaruhi kerja antioksidan enzimatis salah satunya SOD.³⁷

Turunnya SOD dan antioksidan enzimatis lainnya menyebabkan menumpuknya radikal bebas yang menyebabkan kematian sel melalui proses nekrosis dan apoptosis. Proses nekrosis terjadi karena radikal bebas mampu menginisiasi

peroksidasi lipid pada fosfolipid dan asam lemak tak jenuh dalam membrane sel, sehingga terjadi penurunan integritas structural sel (membrane sel tidak lagi intak). Hal tersebut menyebabkan masuknya cairan ekstraseluler ke dalam sitoplasma kemudian sel menjadi bengkak dan pecah.⁷

Selain itu, stress oksidatif juga menyebabkan apoptosis melalui pengaktifan protein 53 oleh radikal bebas yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas membrane mitokondria sehingga sitokrom-c pada mitokondria dapat menembus membrane dan keluar ke sitoplasma. Sitokrom-c membentuk kompleks dengan *protease activating factor 1*, *pro-caspase-9* dan ATP. Kompleks tersebut mengakibatkan teraktivasi enzim kaspase yang mana kaspase tersebut dapat mengaktifasi *Caspase active DNase (CAD)* yang kemudian menyebabkan terjadinya fragmentasi DNA. Hal ini dapat diminimalisir dengan penambahan antioksidan eksogen madu.³⁸

Kandungan gula dalam madu mencapai 80% dan dari gula tersebut 85% berupa *fruktosa* dan *glukosa*. Asam utama yang terdapat dalam madu adalah asam *glutamat*. Sementara itu, asam organik yang terdapat dalam madu adalah asam *asetat*, asam *butirat*, *format*, *suksinat*, *glikolat*, *malat*, *proglutamat*, *sitrat*, dan *piruvat*. Komposisi kimia madu dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 2.1 Komposisi Madu berdasarkan SNI, 2004

No	Komposisi	Jumlah
1	Kalori	328 kal
2	Kadar Air	17,2 g
3	Protein	0,5 g

No	Komposisi	Jumlah
4	Karbohidrat	82,4 g
5	Abu	0,2 g
6	Tembaga	4,4 - 9,2 g
7	Fosfor	1,9 – 6,3 mg
8	Besi	0,06 – 1,5 mg
9	Mangan	0,02 – 0,4 mg
10	Magnesium	1,2 – 3,5 mg
11	Thiamin	0,1 mg
12	Riboflavin	0,02 mg
13	Protein	0,5 g
14	Niasin	0,20 mg
15	Lemak	0,1 g
16	pH	3,9
17	Asam Total	43,1 mg

Sumber: Data Sekunder³⁹

2.3.4. Manfaat Madu

Madu memiliki beragam manfaat yang signifikan. Pertama, madu dapat menjadi pengganti gula yang lebih sehat karena lebih menyehatkan dibandingkan gula pasar. Untuk meningkatkan rasa manisnya, madu dapat dicampur dengan susu, menciptakan kombinasi yang tidak hanya enak tetapi juga meningkatkan sistem kekebalan tubuh manusia. Selain itu, madu mudah dicerna oleh perut yang sensitif karena molekul gula pada madu dapat berubah menjadi gula lain, seperti fruktosa menjadi glukosa. Madu juga menjadi sumber vitamin dan mineral yang bervariasi tergantung pada jenis bunga yang digunakan oleh lebah. Umumnya, madu mengandung vitamin C, kalsium, dan zat besi. Madu juga memiliki peran penting dalam penyembuhan luka. Kemampuannya dalam membersihkan infeksi secara cepat, melakukan debridemen luka, menekan peradangan, meminimalkan jaringan parut, serta mendukung angiogenesis, granulasi jaringan, dan pertumbuhan epitel menjadikannya efektif dalam proses penyembuhan luka. Kelebihannya mencakup ketidakmenyebabkan iritasi, sifat

non-toksik, steril, bakterisida, dan kaya nutrisi. Sebagai antioksidan, madu mengandung berbagai senyawa fitokimia, termasuk asam organik, vitamin, dan enzim, yang berfungsi sebagai sumber antioksidan makanan. Kandungan antioksidan pada madu bervariasi tergantung pada jenis dan variasi bunga. Madu yang lebih gelap cenderung memiliki kandungan antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan madu yang lebih terang. Senyawa fitokimia seperti polifenol dan flavonoid pada madu berperan sebagai agen antioksidan, menjadikannya lebih dari sekadar pemanis alami.^{40,41}

2.4. Asap Rokok

2.4.1. Definisi

Asap yang dihasilkan oleh rokok saat dihisap atau dikonsumsi terdapat dua jenis yaitu asap arus utama dan asap arus sampingan. Asap arus utama adalah asap rokok yang dihirup langsung oleh konsumen sedangkan asap arus sampingan adalah asap yang berada pada udara bebas dan dapat dihirup oleh orang lain selain konsumen.⁴²

2.4.2. Jenis Rokok

Rokok yang dikonsumsi oleh masyarakat dapat dibedakan berdasarkan penggunaan filternya. Pertama, terdapat rokok dengan filter, yang memiliki gabus pada bagian pangkal rokok. Filter ini dirancang untuk menyaring sebagian asap dan nikotin sebelum mencapai perokok. Kedua, terdapat rokok tanpa filter, yang pada bagian pangkalnya tidak memiliki gabus. Rokok jenis ini mengizinkan asap dan

nikotin untuk langsung dihirup oleh perokok tanpa penyaringan tambahan. Pilihan antara rokok dengan filter dan tanpa filter merupakan preferensi personal perokok dan dapat memengaruhi tingkat paparan zat-zat berbahaya selama menghisap rokok.⁴²

2.4.3. Kandungan Kimia Pada Asap Rokok

Kandungan yang terdapat pada rokok (Tabel 2.2.) terutama pada asapnya bersifat racun dan juga dapat merubah sel – sel tubuh menjadi sel ganas, zat yang bersifat demikian itu kurang lebih berjumlah 4000 komponen pada asap rokok.⁴³ Beberapa komponen utama diantara 4000 komponen lainnya pada asap rokok adalah nikotin, tar dan karbon monoksida. Masing – masing komponen itu mempunyai efeknya tersendiri yakni menyebabkan ketergantungan atau adiksi, bersifat karsinogenik dan dapat berikatan kuat dengan hemoglobin yang berakibat mengurangi kadar oksigen di dalam darah. Berikut adalah agen pembawa racun yang terkandung dalam 1 batang rokok.^{42,43}

Dari tabel diatas dapat disimpulkan bahwa rokok non filter cenderung mempunyai zat yang lebih toksik diantaranya PAH, nikotin dan jumlah radikal bebas yang lebih banyak. Radikal bebas yang terkandung dalam asap rokok memiliki komponen gas yang dapat menimbulkan kerusakan pada tiga komponen molekul yaitu lipid, protein dan DNA sehingga akan menimbulkan kematian pada sel.⁴⁴

2.5. Pengaruh Madu Terhadap Kadar SOD yang Diberi Paparan Asap Rokok

Madu merupakan suplemen kesehatan yang berfungsi dalam menjaga stamina

tubuh. Madu mengandung senyawa flavonoid, beta karoten, vitamin A, B1, B2, B3, B5, B6, C, D, E, K, asam fenolik, asam urat serta mineral Fe, S, Mg, P, Cl yang mampu berperan sebagai antioksidan. Penelitian Yuniastuti, (2015) menemukan bahwa madu mampu berperan dalam meningkatkan kadar antioksidan didalam tubuh, khususnya SOD. Peranan antioksidan yang terkandung dalam madu terjadi secara sinergis dan saling berkaitan. Mekanisme peningkatan SOD terjadi secara tidak langsung. Kandungan antioksidan dalam madu berperan dalam meningkatkan antioksidan tubuh.³⁶

Selanjutnya penelitian Salampe, dkk⁴⁵ juga menyebutkan bahwa madu memiliki kandungan senyawa flavonoid yang telah diketahui memiliki aktifitas antioksidan yang tinggi. Mekanisme antioksidan flavonoid yaitu, secara langsung meredam radikal bebas (*scavenger free radical*) dengan mendonorkan atom hidrogen, membentuk ikatan khelat dengan metal seperti Fe^{2+} dan Cu^{+} sehingga mencegah metabolisme oksigen dan pembentukan radikal. Selain itu, flavonoid menghambat enzim yang menghasilkan radikal bebas seperti, *xanthine oxidase*, *lipoxigenase*, *protein kinase C*, *cyclooxygenase*, *microsomal monooxygenase*, *mitochondrial succinoxidase*, dan *NADPH oxidase*. Berdasarkan mekanisme tersebut, Kadar SOD yang rendah pada tikus yang diberi madu 4,5 ml/kgBB diasumsikan terkait dengan aktifitas antioksidan pada madu.⁴⁵

Asap rokok termasuk polutan lingkungan yang merupakan sumber radikal oksigen reaktif (ROS) dan mengandung *karbon monoksida*, *nikotin*, *tar*, serta zat

berbahaya lain. Berdasarkan responnya terhadap radikal bebas, antioksidan dapat dibedakan menjadi lini pertama, lini kedua, lini ketiga, dan lini keempat. Banyaknya radikal bebas yang ada di dalam tubuh menyebabkan ketidakseimbangan antara produksi antioksidan dan radikal bebas yang masuk. Ketidakseimbangan inilah yang disebut stress oksidatif. Stres oksidatif semakin menginsiasi keluarnya enzim antioksidan endogen, namun reaktivitas ROS yang mampu mengoksidasi DNA, protein, dan lipid penyusun sel, akan menurunkan kadar enzim antioksidan SOD, katalase (CAT), dan glutathion peroksidase (GPx) yang merupakan protein. Oleh karenanya, kadar ROS dalam tubuh yang tinggi dapat dideteksi oleh rendahnya aktivitas enzim SOD, CAT, GPx, serta antioksidan endogen lainnya.³⁸

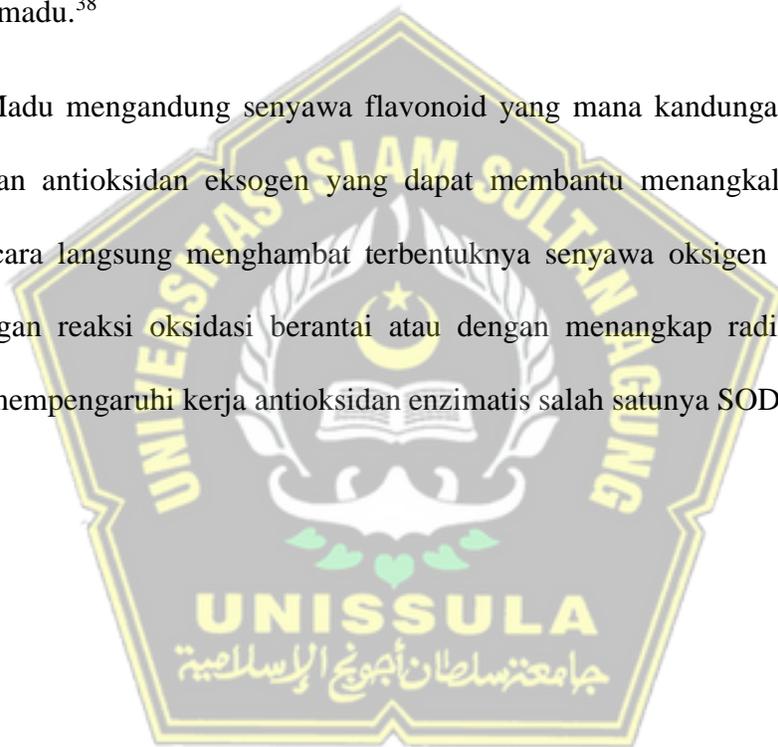
2.6. Pengaruh Madu Terhadap Caspase 9 yang Diberi Paparan Asap Rokok

Turunnya SOD dan antioksidan enzimatis lainnya menyebabkan menumpuknya radikal bebas yang menyebabkan kematian sel melalui proses nekrosis dan apoptosis. Proses nekrosis terjadi karena radikal bebas mampu menginisiasi peroksidasi lipid pada fosfolipid dan asam lemak tak jenuh dalam membrane sel, sehingga terjadi penurunan integritas structural sel (membrane sel tidak lagi intak). Hal tersebut menyebabkan masuknya cairan ekstraseluler ke dalam sitoplasma kemudian sel menjadi bengkak dan pecah.⁷

Selain itu, stress oksidatif juga menyebabkan apoptosis melalui pengaktifan protein 53 oleh radikal bebas yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas membrane mitokondria sehingga sitokrom-c pada mitokondria dapat menembus

membrane dan keluar ke sitoplasma. Sitokrom-c membentuk kompleks dengan *protease activating factor 1*, *pro-caspase-9* dan ATP. Kompleks tersebut mengakibatkan teraktivasinya enzim kaspase yang mana kaspase tersebut dapat mengaktivasi *Caspase active DNase* (CAD) yang kemudian menyebabkan terjadinya fragmentasi DNA. Hal ini dapat diminimalisir dengan penambahan antioksidan eksogen madu.³⁸

Madu mengandung senyawa flavonoid yang mana kandungan flavonoid ini merupakan antioksidan eksogen yang dapat membantu menangkal radikal bebas dengan cara langsung menghambat terbentuknya senyawa oksigen reaktif melalui pemotongan reaksi oksidasi berantai atau dengan menangkap radikal bebas atau dengan mempengaruhi kerja antioksidan enzimatis salah satunya SOD.³⁷



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA

3.1. Kerangka Teori

Merokok merupakan faktor risiko utama untuk berbagai penyakit serius seperti penyakit kardiovaskular, gangguan pernapasan, dan kanker. Asap rokok, yang mengandung lebih dari 7000 bahan kimia, adalah hasil dari pembakaran rokok dan dapat memicu peningkatan pembentukan reactive oxygen species (ROS) dalam sel. Hal ini dapat mengganggu sistem antioksidan tubuh, seperti *superoksida dismutase* (SOD), yang bekerja berlebihan dalam mengatasi ROS yang meningkat, menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Sumber ROS seluler meliputi enzim NADPH oksidase (NOX), mitokondria, dan nitric oxide synthase (NOS).⁴⁶

Radikal bebas terbentuk sebagai hasil reaksi alami dalam tubuh, terutama selama metabolisme dan respon kekebalan tubuh, dan terdiri dari berbagai jenis, termasuk hidrogen peroksida (H_2O_2), superoksida ($O_2^{\bullet-}$), oksigen singlet (O_2), dan radikal hidroksil ($\bullet OH$). Kelebihan *reactive oxygen species* (ROS) dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel dan jaringan tubuh, yang merupakan kontributor penting dalam perkembangan berbagai penyakit. Paparan radikal bebas eksogen, seperti yang terdapat dalam udara, makanan, dan air, juga dapat berasal dari faktor lingkungan dan gaya hidup, seperti merokok. Radikal bebas dapat merusak struktur dan makromolekul seluler, seperti membran sel, protein, lipid, dan asam nukleat, melalui proses oksidasi, yang dikenal sebagai kerusakan oksidatif. Stres oksidatif, yang disebabkan oleh

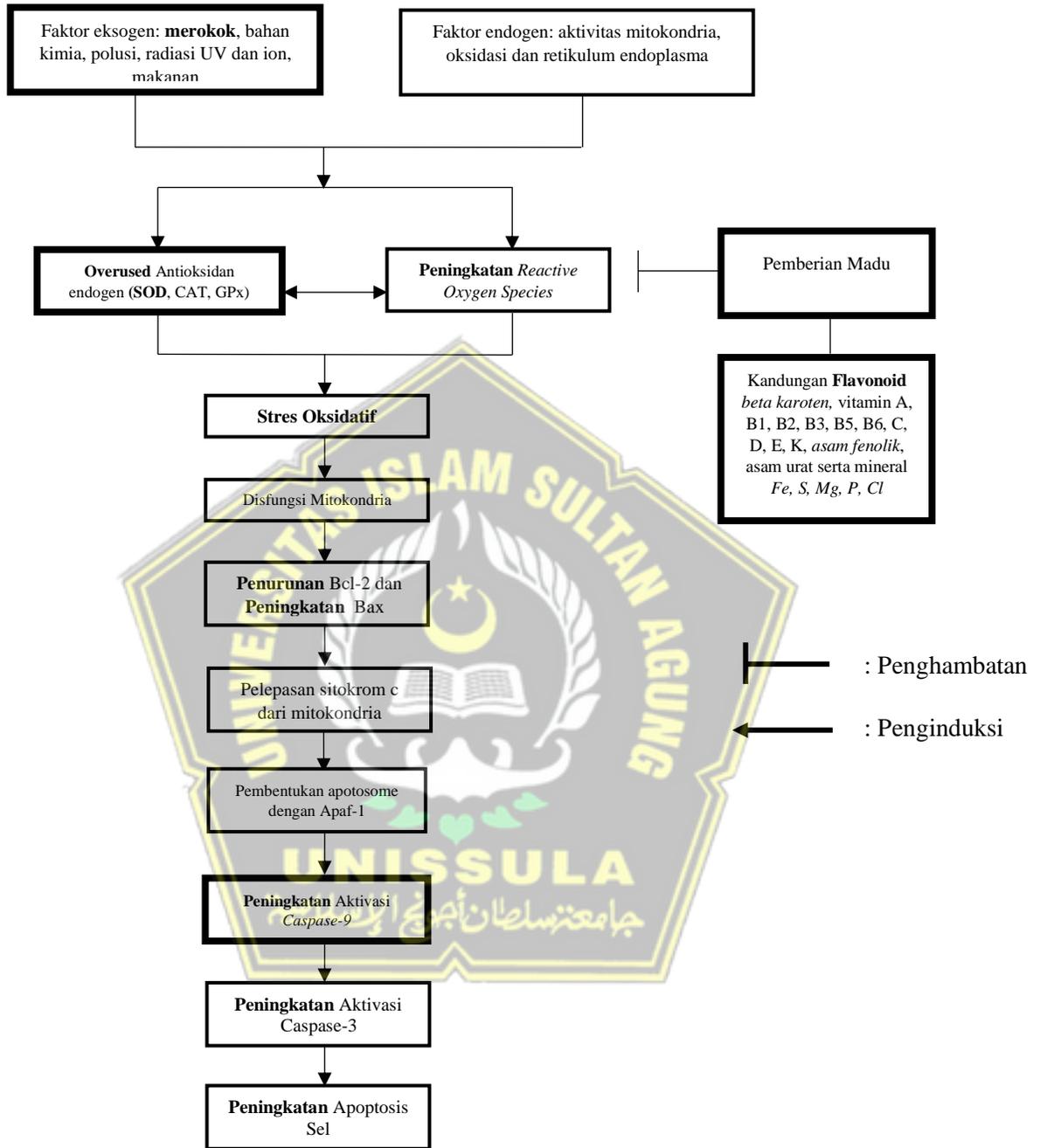
ketidakseimbangan antara produksi ROS dan sistem antioksidan tubuh, dapat menginduksi apoptosis (kematian sel terprogram) dan mempercepat proses penuaan sel.^{46,47}

Apoptosis adalah proses kematian sel yang diatur oleh regulasi gen dan aktivitas caspase. Caspases, endoprotease penting dalam regulasi sel, memainkan peran kunci dalam proses ini. Apoptosis dapat dipicu oleh dua jalur: intrinsik dan ekstrinsik. Jalur intrinsik terjadi akibat stres sel atau kerusakan DNA, mengakibatkan pelepasan sitokrom C dari mitokondria dan pembentukan apoptosom. Apoptosom kemudian mengaktifkan caspase-9, yang selanjutnya mengaktifkan caspase-3, protease utama dalam kematian sel. Stres oksidatif dapat mempengaruhi fungsi mitokondria, mengaktifkan protein pro-apoptosis seperti Bax dan menginaktivasi protein anti-apoptosis seperti Bcl-2. Bax membentuk pori-pori pada membran mitokondria, memungkinkan pelepasan sitokrom C dan faktor pro-apoptosis lainnya, memicu kaskade apoptosis. Sebaliknya, Bcl-2 mencegah pelepasan sitokrom C dan menghambat aktivitas Bax. Stres oksidatif dapat mengubah keseimbangan antara Bcl-2 dan Bax, mengaktifkan jalur apoptosis intrinsik dan menyebabkan kematian sel.^{48,49}

Kelebihan stres oksidatif dapat memicu apoptosis berlebihan, namun dapat diatasi dengan bantuan antioksidan eksogen seperti madu. Madu mengandung berbagai senyawa antioksidan, termasuk flavonoid, asam fenolik, glukosa oksidase, katalase, dan lainnya. Antioksidan bekerja dengan menghambat oksidasi substrat dan melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Madu mengandung baik antioksidan

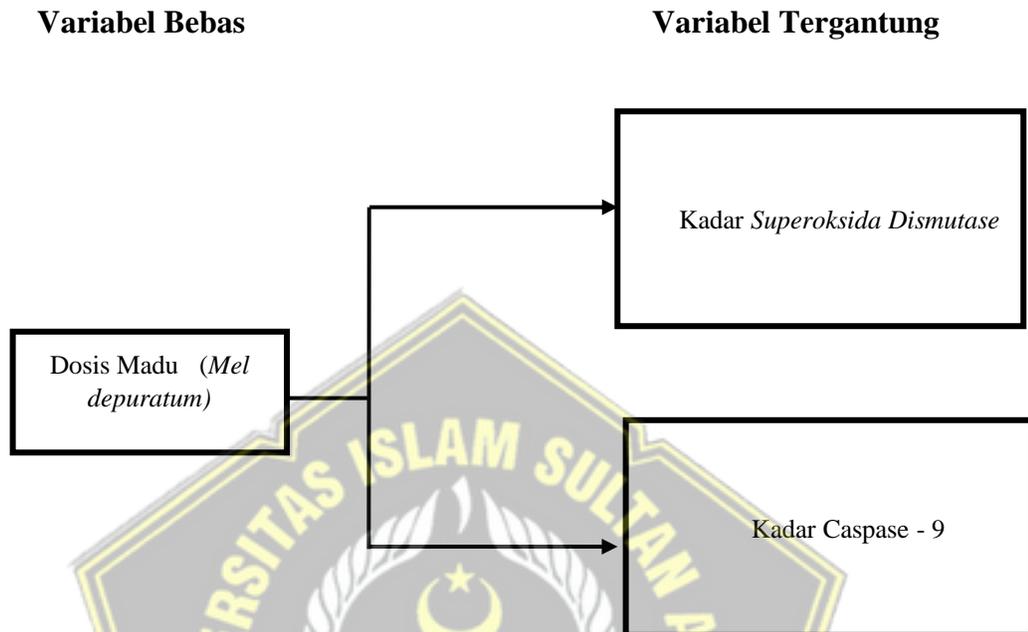
enzimatik (seperti katalase dan glukosa oksidase) maupun non-enzimatik (seperti asam askorbat dan flavonoid), yang membantu menetralkan ROS berlebihan dan meningkatkan antioksidan endogen seperti SOD.⁵⁰ Selain itu, madu memiliki potensi sebagai antipoptosis dengan menghasilkan ROS yang mengaktifkan p53, yang kemudian mengatur ekspresi protein pro dan antiapoptosis seperti Bax dan Bcl-2.^{51,52} Caspase, khususnya caspase-9, memiliki peran penting dalam jalur sinyal apoptosis, dan aktivasi caspases menjadi penanda kerusakan sel. Dengan demikian, madu memiliki potensi untuk menekan stres oksidatif dan mengatur jalur apoptosis.¹³ Ringkasan kerangka teori dijelaskan pada Gambar 3.1.





Gambar 3.1 Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

3.3. Hipotesa

Berdasarkan kerangka konsep di atas maka hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

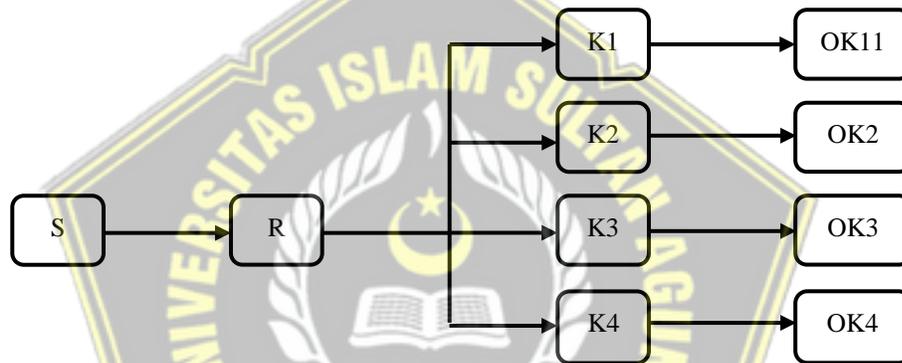
- 3.3.1. Ada pengaruh pemberian madu (*Mel depuratum*) terhadap kadar SOD pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok.
- 3.3.2. Ada pengaruh pemberian madu (*Mel depuratum*) terhadap caspase 9 pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian dalam penelitian ini adalah eksperimental. Rancangan penelitian yang sesuai dengan masalah ini adalah *post test only control group design* terhadap hewan coba tikus galur *wistar* yang diberi paparan asap rokok.



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan

- S : Subyek Penelitian
- R : Randomisasi menjadi 4 kelompok
- K1 : Kelompok kontrol dengan pemberian pakan standard selama 14 hari
- K2 : Kelompok perlakuan dengan pemberian pakan standard yang diberi paparan asap rokok selama 14 hari
- K3 : Kelompok perlakuan pemberian madu dengan dosis 0,9 ml/hari terhadap kadar SOD yang diberi paparan asap rokok selama 14 hari
- K4 : Kelompok perlakuan pemberian madu dengan dosis 1,8 ml/hari yang diberi paparan asap rokok selama 14 hari
- OK1 : Observasi pada kelompok 1
- OK2 : Observasi pada kelompok 2
- OK3 : Observasi pada kelompok 3

OK4 : Observasi pada kelompok 4

4.2. Populasi Penelitian dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian yaitu tikus jantan galur wistar berumur 10-12 minggu dengan berat 200 gram yang di dapat dari Laboratorium PA Rumah Sakit Sarjito. Tikus dipelihara dengan pakan yang terstandar comfeed AD II dan air minum berupa air putih suhu ruangan pemeliharaan berkisar 28° - 32° C dengan ventilasi dan ruangan yang cukup. Tikus kemudian dilakukan adaptasi selama 7 hari sebelum diberi perlakuan.

4.2.2. Teknik Pengambilan Sampel Penelitian

Sampel didapatkan dengan mengalokasikan kelompok berdasarkan cara random sampling *allocation*. Tikus jantan galur wistar sebanyak 24 ekor yang masuk kriteria inklusi dibagi menjadi 4 kelompok secara acak sederhana dengan satu kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan.

4.2.3. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi penelitian ini adalah tikus dalam keadaan aktif, sehat, umur 10-12 minggu, berat badan 200 g, tingkah laku dan aktivitas normal.

4.2.4. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi penelitian ini adalah jika sampel memiliki kelainan anatomis.

4.2.5. Besar Sampel

Besar sampel menurut WHO kelompok minimal 5 ekor dengan cadangan 10% (1 ekor). Sampel kemudian diambil secara acak menggunakan cara random

sampling allocation dibagi menjadi 4 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Jumlah keseluruhan sampel tikus yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 24 ekor.

4.3. Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian dosis madu (X).

b. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah:

- 1) Kadar SOD (Superoksida Dismutase) (Y_1)
- 2) Kadar Caspase – 9 (Y_2)

c. Variabel Prokondisi

Variabel prokondisi pada penelitian ini adalah paparan asap rokok.

4.3.2. Definisi Operasional

a. Dosis Madu

Pemberian dosis madu dengan dosis 0,9 ml dan 1,8 ml/hari secara sonde ke tikus jantan yang diberi paparan asap rokok 2 batang/hari selama 14 hari.¹⁵

Skala: Rasio

b. Kadar SOD

SOD adalah metaloenzim yang mengubah superoksida menjadi hidrogen peroksida. Pengukuran SOD dilakukan dengan menggunakan metode uji (TBARS) dengan alat spektrofotometer. Menggunakan serum tikus yang di ambil dari sinus orbital.¹⁵

Satuan: nmol/gram

Skala: Rasio

c. Caspase – 9

Ekspresi caspase-9 dalam preparat jaringan organ paru-paru diambil dan dilakukan pewarnaan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM Yogyakarta. Pewarnaan dilakukan menggunakan metode imunohistokimia dengan melihat imunoreaktivitas antibody anti human caspase-9 melalui mikroskop Olympus BX41 dengan perbesaran 400x. Hasil pewarnaan diinterpretasikan sebagai positif jika terjadi pewarnaan coklat pada inti dan sitoplasma preparat jaringan paru-paru, dan diinterpretasikan sebagai negatif jika tidak terjadi pewarnaan coklat pada sitoplasma dan inti.

4.4. Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah Kandang tikus dengan tempat pakan dengan ukuran P :40 cm, L :30 cm, T: 30 cm, Timbangan tikus “*Nigushi Scale*”, sarung tangan,

pipet tetes, tabung, *spektrofotometer*, mikropipet, kadar hitung, mikroskop, preparat, deckglass.

4.4.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah Madu, Rokok, *Aquadest*, Reagent *Kit* SOD dan Reagen *Kit* Caspase-9

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Cara Persiapan sebelum perlakuan

- a. Sampel penelitian yaitu hewan coba harus masuk dalam kriteria inklusi, diambil secara acak sederhana sebanyak 24 ekor dengan rincian terdapat 4 kelompok dengan jumlah masing-masing sampel tiap kelompoknya adalah 6 ekor terdiri dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, kemudian diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari.
- b. Sampel sebanyak 24 ekor tikus jantan galur wistar diaklimatasi di Laboratorium Pusat Studi pangan dan Gizi UGM Yogyakarta.
- c. Hewan coba diberikan pakan standar *comfeed* AD II terdiri dari protein 20-25%, pati 45-55%, lemak 10-12% dan serat kasar 4% serta minum air putih yang sama setiap hari.

4.5.2. Cara Pemberian dan Pembuatan Dosis Madu

Dosis yang diberikan ditentukan berdasarkan hasil konversi dari manusia ke tikus yaitu (50ml) dan (100ml) pada orang dewasa dengan berat badan 70 kg. Pada

manusia, konsumsi madu untuk pencegahan penyakit adalah 1 – 2 kali/hari 1 sendok makan.⁴²

Berdasarkan perhitungan konversi pada tikus maka didapat angka yaitu dosis 0,9 ml/200g BB tikus dan 1,8ml/200g BB tikus. Pemberian dosis madu dilakukan secara oral selama 14 hari setelah terpapar asap rokok.

Dosis Madu untuk manusia = 50, 100 ml/70 kgBB

Factor konversi pada tikus = 0,018

Berat rata-rata tikus dewasa = 200 gram

Konversi dosis pada tikus =

$$50 \text{ ml} \times 0,018 = 0,9 \text{ ml} / 200 \text{ gram BB tikus}$$

$$100 \text{ ml} \times 0,018 = 1,8 \text{ ml} / 200 \text{ gram BB tikus}$$

a. Dosis I setara dengan dosis untuk manusia yaitu 50ml

Nilai konversi dosis madu I pada tikus =

$$50 \text{ ml} \times 0,018 = 0,9 \text{ ml} / 200 \text{ gram BB tikus}$$

Maka dosis madu I yang disondekan adalah 0,9ml selama 14 hari berturut-turut.

b. Dosis II setara dengan dosis untuk manusia yaitu 100ml

Nilai konversi dosis madu II pada tikus =

$$100 \text{ ml} \times 0,018 = 1,8 \text{ ml} / 200 \text{ gram BB tikus}$$

Maka dosis madu II yang disondekan adalah 1,8ml selama 14 hari berturut-turut.

4.5.3. Cara Pemberian Paparan Asap Rokok

Cara pemberian paparan asap rokok ini berdasarkan penelitian Prayitno, dkk (2015)⁴³. Pemaparan asap rokok dilakukan setiap pagi pukul 08.00 WIB menggunakan 2 batang rokok dan dilakukan setiap 15 menit sampai rokok habis. Pemaparan asap rokok pada tikus wistar dilakukan selama 14 hari pada kotak pemaparan asap dengan ukuran P :40 cm, L :30 cm, T: 30 cm yang dilengkapi dengan lubang kecil sebagai tempat memasukan asap rokok. Cara memperoleh asap adalah dengan membakar rokok dan sambungkan dengan pipa kemudian dihisap (disedot) dengan spuit 50 mL dan dihisap 10 kali hisapan. Pemaparan asap rokok dilakukan pada semua kelompok kecuali pada kelompok (K1) selama total waktu 2 jam. Satu jam setelah pemaparan asap rokok, tikus wistar diberi madu sesuai variasi dosis (K3 dan K4). Pada penelitian ini digunakan kelompok kontrol (K2) dimana tikus wistar dipapar dengan asap rokok dan tanpa pemberian ekstrak.

4.5.4. Prosedur Pemeriksaan *Superoksida Dismutase*

Pemeriksaan kadar Superoksida Dismutase (SOD) dilakukan dengan menggunakan sampel darah yang diambil dari sinus orbital mata. Pengambilan darah mata dilakukan dengan menggunakan mikrohematokrit, dan darah tersebut ditampung dalam mikrotube. Mikrohematokrit digerakkan hingga masuk ke dalam, diputar untuk mengeluarkan darah, dan darah dikumpulkan dalam mikrotube. Selanjutnya, sampel darah di-sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit, dan serum sebanyak 100 µl diambil dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung

mikrotube. Pengukuran aktivitas SOD menggunakan metode ELISA dengan SOD kit yang mengikuti metode yang dikembangkan oleh Asti.⁴³ Aktivitas total enzim SOD dalam plasma diukur melalui larutan stok SOD yang disiapkan sebelumnya. Metode pengukuran aktivitas SOD melibatkan penentuan laju penghambatan reduksi ferisitokrom c oleh anion superoksida yang dihasilkan dari reaksi xantin/xantin oksidase. Proses ini dimulai dengan mengoksidasi xantin menjadi asam urat, sementara anion superoksida yang terbentuk kemudian mereduksi ferisitokrom c. Reduksi ferisitokrom c diamati dengan mengukur peningkatan absorban pada panjang gelombang 550 nm. Pengukuran dilakukan pada suhu 25°C, dan pastikan larutan xantin oksidase tetap dalam keadaan dingin sebelum digunakan. Medium reaksi disiapkan langsung sebelum pengukuran dengan mencampurkan larutan A (campuran xantin dan sitokrom c dalam larutan NaOH) ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, tambahkan 50 µL larutan baku (kontrol) atau sampel, aduk perlahan, dan inisiasi reaksi dengan menambahkan 50 µL larutan (xantin oksidase 2,88 mg/mL dalam buffer fosfat EDTA). Perubahan absorban diamati menggunakan spektrofotometer.

4.5.5. Pengambilan Sampel Jaringan Paru-paru

Pengambilan sampel jaringan paru-paru dilakukan pada tikus setelah 24 jam pasca pemberian perlakuan terakhir. Tikus-tikus tersebut kemudian dimatikan dengan cara servikal dislokasi dan dikenkripsi sesuai dengan prosedur standar untuk pengambilan organ paru-paru. Organ paru-paru yang telah diambil dimasukkan ke dalam pot kecil yang berisi larutan neutral buffer formalin (NBF) 10% selama 24 jam.

Setelah itu, formalin diganti dengan alkohol 70% dan jaringan paru-paru disimpan pada suhu ruangan hingga proses pembuatan preparat parafin dilakukan.

4.5.6. Proses Pembuatan Blok Parafin

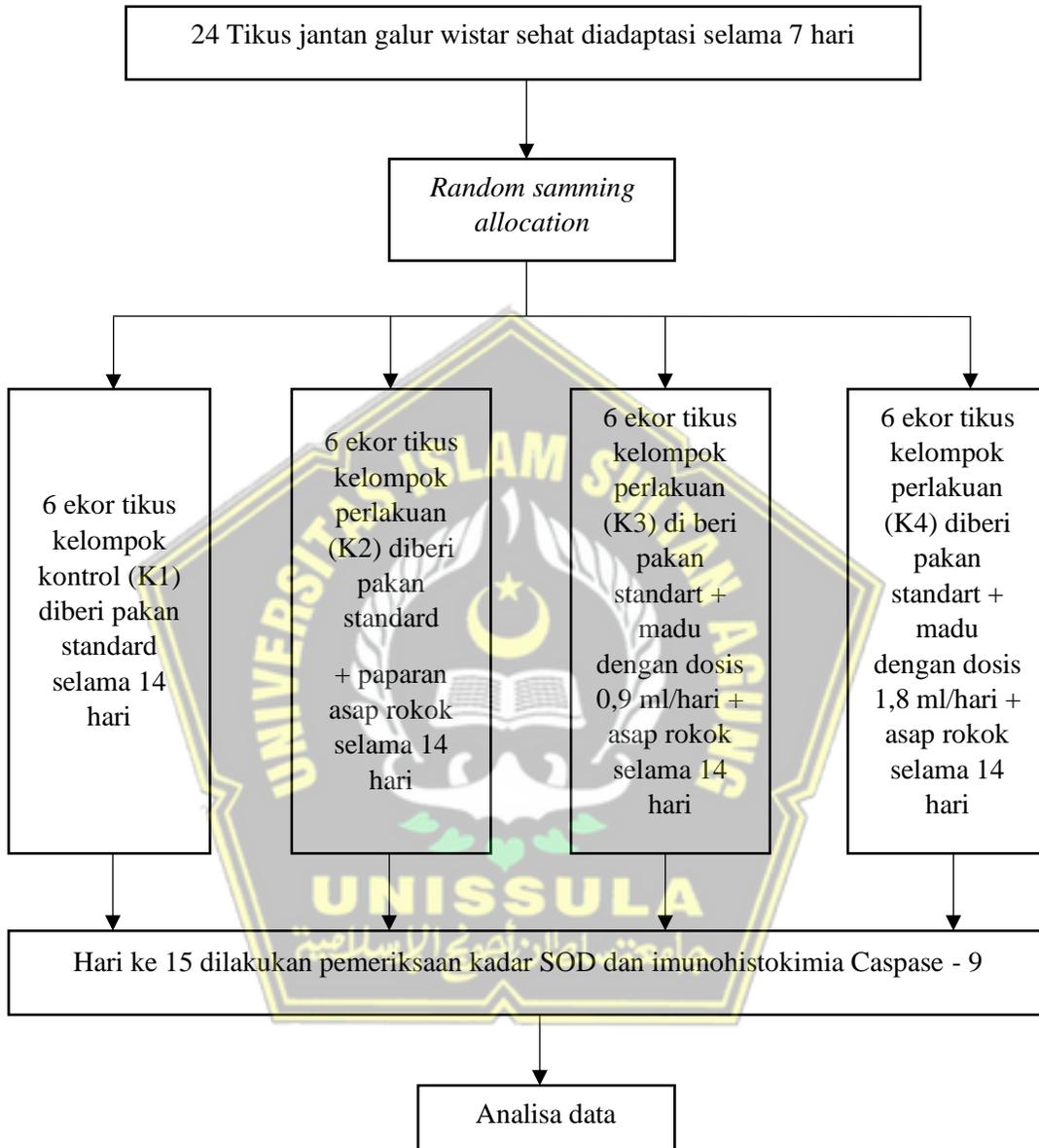
Proses pembuatan blok parafin dimulai dengan dehidrasi, di mana potongan jaringan secara bertahap direndam dalam alkohol bergradasi, mulai dari 30% hingga 96%, untuk mengeluarkan cairan dari dalam jaringan. Selanjutnya, jaringan direndam dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam, diikuti dengan perendaman dalam larutan xylol murni selama 2 kali masing-masing selama 2 jam. Setelah itu, jaringan diparafinasi dengan cara direndam dalam parafin cair selama 2 kali perendaman masing-masing selama 2 jam, dan ditunggu hingga parafin mengeras. Kemudian, jaringan dipotong dengan ketebalan 3 mikron menggunakan mikrotom. Potongan jaringan kemudian ditempel pada kaca objek yang telah dilapisi polilisin sebagai perekat. Terakhir, jaringan yang ditempel pada kaca objek dideparafinisasi dalam inkubator dengan dipanaskan pada suhu 56-58°C hingga parafin mencair.

4.5.7. Prosedur Pembuatan Preparat Imunohistokimia

Prosedur pengecatan Imunohistokimia Caspase-9 mengikuti metode standar dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. Pertama, potongan jaringan organ paru diambil dengan teknik irisan pada ketebalan 3µm. Kemudian, potongan jaringan dikeringkan pada suhu 37°C dan dipanaskan di atas slide warmer pada suhu 60°C selama 30 menit, diikuti dengan proses deparafinisasi menggunakan xilol secara bertahap. Setelah itu, potongan jaringan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan dilakukan pre-treatment dengan Tris EDTA pH 9.0 menggunakan microwave pada

suhu 95°C selama 10 menit, diikuti dengan difiksasi pada suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya, dilakukan pencucian dengan PBS pH 7.4, diikuti dengan inkubasi dengan peroxidase block. Setelah pencucian kembali dengan PBS pH 7.4, dilakukan inkubasi dengan super block, diikuti dengan inkubasi dengan antibody primer selama 30 menit. Kemudian, dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7.4 dan inkubasi dengan ultra tek anti-polyvalent selama 10 menit. Setelah pencucian dengan PBS pH 7.4, dilanjutkan dengan inkubasi dengan ultraTek HRP selama 10 menit. Selanjutnya, potongan jaringan dicuci dengan PBS pH 7.4 dan ditambahkan larutan DAB (3,3'-Diaminobenzidine) dan diinkubasi selama 5 menit. Setelah pencucian dengan air mengalir selama 5 menit, dilakukan counterstaining dengan hematoxylin selama 3 menit, diikuti dengan pencucian kembali dengan air mengalir. Proses selanjutnya meliputi rendaman dengan bluing reagen selama 5 menit dan pencucian kembali dengan air mengalir. Akhirnya, dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat dan clearing dengan xilol sebelum mounting dengan entellan dan penutup dengan cover glass. Ekspresi Caspase-9, yang ditandai dengan warna coklat, diamati pada sel menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Setiap pengamatan hasil pemeriksaan ini didokumentasikan untuk keperluan analisis dan dokumentasi lebih lanjut.

4.6. Alur Penelitian



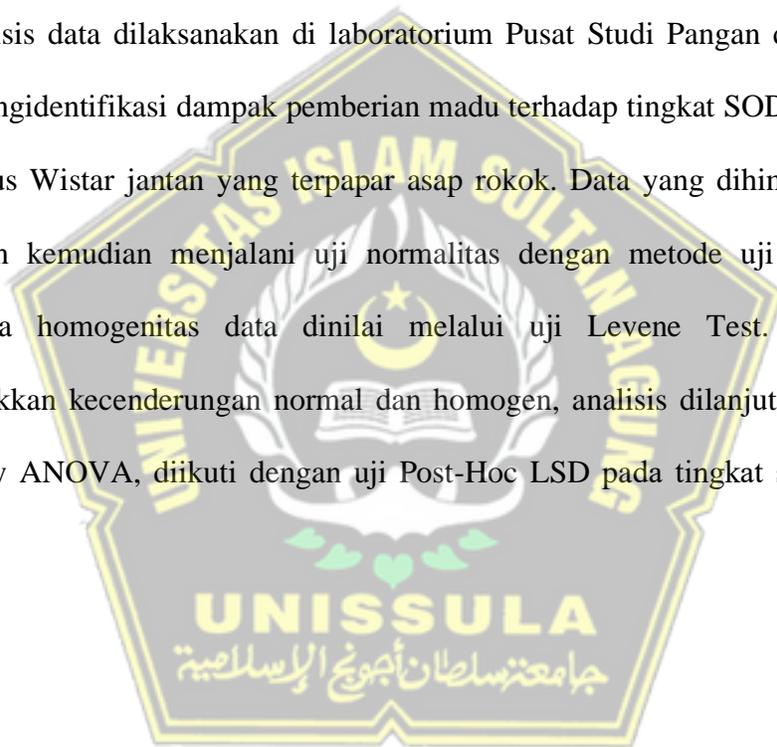
Gambar 4.6 Alur Penelitian

4.7.Tempat dan Waktu Penelitian

- a. Penelitian menggunakan hewan coba tikus dan dilaksanakan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM pada bulan September 2023.
- b. Pemeriksaan kadar SOD dan Caspase - 9 dilakukan di Laboratorium PA UGM

4.8.Analisis Data

Analisis data dilaksanakan di laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM guna mengidentifikasi dampak pemberian madu terhadap tingkat SOD dan caspase 9 pada tikus Wistar jantan yang terpapar asap rokok. Data yang dihimpun dari hasil penelitian kemudian menjalani uji normalitas dengan metode uji Shapiro-Wilk, sementara homogenitas data dinilai melalui uji Levene Test. Apabila data menunjukkan kecenderungan normal dan homogen, analisis dilanjutkan dengan uji One-Way ANOVA, diikuti dengan uji Post-Hoc LSD pada tingkat signifikansi (α) 0,05.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental ini dilakukan selama bulan september sampai desember 2023 di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM dan Laboratorium PA UGM. Subjek penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat 200 gram yang beursia 10-12 minggu dan telah dikondisikan atau diadaptasikan serta diberikan makan selama 7 hari. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok dengan 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol masing-masing berisi 6 ekor tikus. Kelompok 1 (K1) adalah kelompok kontrol dengan pemberian pakan standard selama 14 hari, kelompok 2 (K2) adalah kelompok perlakuan dengan pemberian pakan standard yang diberi paparan asap rokok selama 14 hari, kelompok 3 (K3) adalah kelompok perlakuan pemberian madu dengan dosis 0,9 ml/hari terhadap kadar SOD yang diberi paparan asap rokok selama 14 hari, dan kelompok 4 (K4) adalah Kelompok perlakuan pemberian madu dengan dosis 1,8 ml/hari yang diberi paparan asap rokok selama 14 hari.

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1. Hasil Pengukuran SOD

Pengukuran kapasitas total kadar SOD menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immune-Sorbent Assay*). Setelah darah diambil, dilakukan sentrifugasi dan serum yang dihasilkan diuji kadar SOD dengan ELISA. SOD adalah enzim antioksidan endogen yang penting untuk melawan radikal bebas.⁵³ Selanjutnya, untuk mengidentifikasi sel-sel spesifik di

sampel paru-paru tikus berdasarkan komponen antigenik atau produk selulernya, digunakan reaksi komplemen antara antigen dan antibodi, atau dengan kata lain, untuk menetapkan diagnosis dan identifikasi tipe sel berdasarkan sitomorfologi. Sampel paru-paru yang diperiksa menggunakan IHK dianggap positif jika terdapat warna kecoklatan pada daerah inti sel dan sitoplasma, sedangkan sampel negatif tidak menunjukkan kecoklatan pada daerah inti sel dan sitoplasma.⁵⁴

Tabel 5.1 Data hasil rerata pemeriksaan kadar SOD

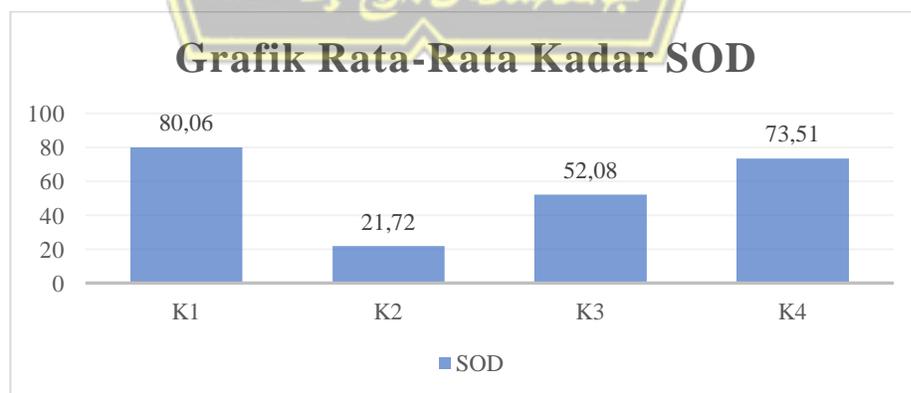
Variabel	Kelompok				Pvalue
	K 1 n = 6 Mean±SD	K 2 n = 6 Mean±SD	K 3 n = 6 Mean±SD	K 4 n = 6 Mean±SD	
Kadar SOD	80.06 ± 2.13	21.72 ± 2.23	52.08 ± 2.03	73.51 ± 1.68	
<i>Saphiro Wilk</i>	0.943	0.965	0.925	0.957	
<i>Levene Test</i>					0,0872
<i>Anova</i>					0.000
<i>Uji Post-Hoc</i>					0.000
<i>LSD</i>					

Sumber: Data Primer Diolah (2023)

Berdasarkan hasil analisis deskriptif, dapat diamati bahwa rata-rata kadar SOD pada kelompok kontrol (K1) adalah 80.06 ± 2.13 . Kelompok perlakuan tanpa pemberian madu (K2) menunjukkan rata-rata sebesar 21.72 ± 2.23 . Sementara itu, kelompok yang mendapat perlakuan dengan pemberian madu dosis 0,8 ml/hari (K3) menunjukkan rata-rata sebesar 52.08 ± 2.03 , dan kelompok yang mendapat perlakuan dengan pemberian madu dosis 1,8 ml/hari (K4) menunjukkan rata-rata sebesar 73.51 ± 1.68 . Dari tabel 5.1 diperoleh nilai dan rata-rata kadar SOD dari setiap kelompok uji.

Data tersebut kemudian diuji menggunakan uji normalitas dengan Shapiro-Wilk dan uji homogenitas dengan Levene. Hasil uji menunjukkan bahwa distribusi data SOD adalah normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$). Analisis Anova menunjukkan adanya pengaruh signifikan pada setiap kelompok yang diberi perlakuan ($p < 0,05$).

Lebih lanjut, hasil Post-Hoc LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antar kelompok dalam rerata kadar SOD ($p < 0,05$). Kelompok kontrol (K1) memiliki nilai rata-rata tertinggi, menunjukkan tidak adanya stres oksidatif pada tikus wistar jantan. Kelompok K2 menunjukkan nilai rata-rata terendah, menandakan adanya stres oksidatif yang signifikan. Kelompok K3 dan K4 menunjukkan nilai rata-rata yang berada di antara K1 dan K2, menunjukkan pengaruh perlakuan madu terhadap kadar SOD. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok-kelompok perlakuan dalam hal kadar SOD, dengan perlakuan madu mampu memengaruhi kadar SOD pada tikus wistar jantan yang terpapar asap rokok.



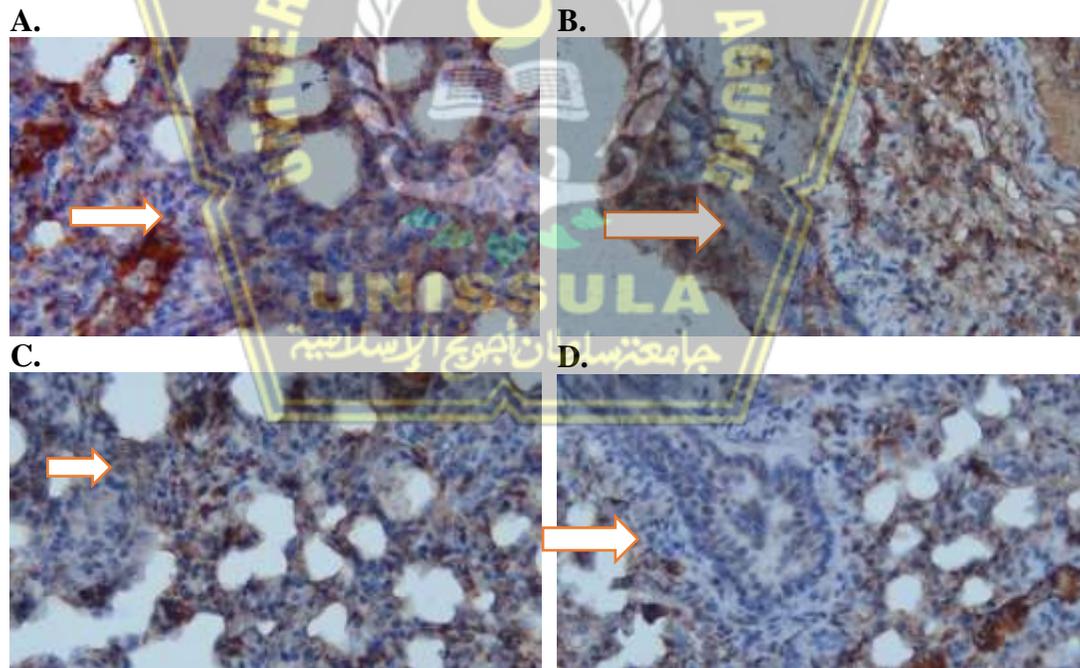
Gambar 5.1. Grafik Pengaruh Pemberian Madu (*mel depuratum*) terhadap kadar SOD pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok

Berdasarkan hasil yang ditampilkan pada Grafik 5.1, terdapat perbedaan yang signifikan dalam rata-rata kadar SOD pada tikus Wistar dari empat kelompok yang menjadi sampel penelitian. Kelompok kontrol (K1) menunjukkan rata-rata kadar SOD sebesar 80,06, sedangkan kelompok perlakuan kedua (K2) memiliki rata-rata kadar SOD yang lebih rendah, yaitu 21,72. Kelompok ketiga (K3), dengan perlakuan yang berbeda, menunjukkan rata-rata kadar SOD sebesar 52,08. Pada kelompok keempat (K4), tingkat rata-rata kadar SOD mencapai 73,51. Dari perbandingan hasil keempat kelompok tersebut, dapat disimpulkan bahwa kelompok K4 memiliki kadar SOD tertinggi (73,51), sementara kelompok K2 memiliki kadar SOD terendah (21,72). Temuan ini menunjukkan bahwa pemberian madu dapat meningkatkan kadar antioksidan, khususnya SOD, dalam tubuh. Sebaliknya, pada kelompok K2, nilai rata-rata kadar SOD yang rendah menggambarkan bahwa paparan asap rokok dapat mengurangi aktivitas enzim antioksidan SOD dalam tubuh, mengakibatkan penurunan kadar. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa madu memiliki potensi untuk meningkatkan kadar antioksidan, sementara paparan asap rokok dapat memberikan dampak negatif dengan menurunkan kadar enzim antioksidan SOD dalam tubuh.

5.1.2. Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia *Caspase-9* pada jaringan paru-paru

Hasil pengamatan terhadap hasil pemeriksaan Imunohistokimia *Caspase-9* pada jaringan paru-paru dengan fokus pada perubahan warna pada inti sel dan sitoplasma. Analisis gambar menunjukkan bahwa kelompok kontrol tanpa perlakuan (K1) menunjukkan hasil negatif. Sebaliknya, pada Kelompok perlakuan dengan

pemberian pakan standar yang mendapat paparan asap rokok selama 14 hari (K2), hasil interpretasinya adalah positif kuat. Kelompok perlakuan lainnya, yang menerima pemberian madu dengan dosis 0,9 ml/hari dan mendapat paparan asap rokok selama 14 hari (K3), menunjukkan hasil positif dengan tingkat sedang. Sedangkan pada Kelompok perlakuan yang diberikan madu dengan dosis 1,8 ml/hari dan terpapar asap rokok selama 14 hari, hasilnya menunjukkan kombinasi antara positif dengan tingkat sedang dan negatif. Hasil ini memberikan gambaran tentang dampak paparan asap rokok pada aktivitas Caspase-9 dalam jaringan paru-paru, dengan penjelasan khusus terkait dengan pengaruh pemberian madu pada berbagai dosis.



Gambar 5.2 . Hasil Imunohistokimia organ paru-paru (A) kelompok kontrol (K1), (B) Kelompok perlakuan dengan pemberian pakan standard yang diberi paparan asap rokok selama 14 hari (K2), (C) Kelompok perlakuan pemberian madu dengan dosis 0,9 ml/hari yang diberi paparan asap rokok selama

14 hari (**K3**), (**D**) Kelompok perlakuan pemberian madu dengan dosis 1,8 ml/hari yang diberi paparan asap rokok selama 14 hari (**K4**).

5.2 Pembahasan Hasil

5.2.1. Analisis Deskriptif Rata-Rata Kadar SOD pada Tikus Wistar Jantan yang Diberi Paparan Asap Rokok Berdasarkan Pemberian Madu

Hasil analisis deskriptif (uji anova) yang telah dilakukan peneliti menunjukkan bahwa pada K1 sebagai kelompok kontrol memiliki nilai rata-rata tertinggi yaitu 80.06 yang artinya jika konsentrasi kadar SOD masih tinggi maka tidak ada stress oksidatif yang terjadi pada tikus wistar jantan. Selanjutnya K2 dengan perlakuan pemberian pakan standard dan paparan asap rokok memiliki nilai rata-rata terendah yaitu 21.72 yang artinya konsentrasi kadar SOD menurun, kondisi ini menunjukkan bahwa terdapat stress oksidatif pada tikus wistar jantan. Pada K3 yaitu kelompok yang mendapat perlakuan pakan standard dan dosis madu sebanyak 0,9ml dan diberi paparan asap rokok menunjukkan bahwa terjadi kenaikan kadar SOD namun kenaikan kadar hanya sebesar 52.08, itu artinya bahwa zat flavonoid dalam madu yang diberikan sebanyak 0,9ml pada K3 mampu menangkal radikal bebas yang berasal dari paparan asap rokok dan meningkatkan kadar SOD dalam tubuh. Selanjutnya pada K4 yaitu kelompok yang mendapatkan perlakuan pakan standard dengan dosis madu 1,9ml dan diberi paparan asap rokok menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar SOD dan peningkatan tersebut melebihi dari K3 yaitu sebesar 73.51. Peningkatan ini hampir mencapai K1 yang artinya adalah zat flavonoid mampu menangkal radikal bebas dan mampu meningkatkan kadar SOD dalam tubuh.

Uji beda pengaruh pemberian madu (*mel depuratum*) terhadap kadar SOD pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok dilakukan dengan uji *post-hoc* LSD yang mana berdasarkan data di atas dapat diketahui bahwa nilai Asymp.Sig dari kadar SOD adalah 0,000; $\rho < 0,01$. Dengan demikian dapat dipahami bahwa H_0 ditolak dan H_a diterima yang artinya ada pengaruh yang signifikan pada pemberian madu terhadap kadar SOD pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok.

Berdasarkan hasil analisis data di atas dapat diketahui bahwa output dari uji statistic dalam uji *One Way Anova* yang dilanjutkan dengan uji *post-hoc* LSD pada kadar SOD bernilai 0,000; $\rho < 0,01$. Oleh karena itu, sebagaimana dasar pengambilan keputusan uji *One Way Anova* maupun *post-hoc* LSD di atas maka dapat disimpulkan bahwa **H_a diterima yang artinya ada pengaruh yang signifikan pada pemberian madu terhadap kadar SOD pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok.**

Hasil Penelitian sejalan dengan Widowati yang menunjukkan bahwa madu dengan senyawa flavonoid memiliki sifat antioksidan, sebagaimana terlihat dari peningkatan kadar SOD.⁵⁵ Hasil penelitian juga konsisten dengan penelitian Parwata, yang menyatakan bahwa madu berperan sebagai antiradikal bebas dan meningkatkan kadar SOD dalam tubuh. Parwata meneliti pengaruh madu kelengkeng terhadap SOD, sementara hasil penelitian ini menyoroti efek paparan radikal bebas terhadap kadar SOD.⁵⁶

Penelitian sejalan dengan penelitian Primayanti, yang menunjukkan bahwa paparan asap rokok mengakibatkan penurunan rerata SOD serum pada kelompok intervensi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa pemberian madu dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, termasuk CAT, SOD, GST, dan GPx, yang disebabkan oleh sifat antioksidan madu dan kandungan senyawa fenolik.⁵⁷

Penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa pemberian madu dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, seperti CAT, SOD, GST, dan GPx, secara signifikan dibandingkan dengan tikus sakit. Hal ini disebabkan oleh sifat antioksidan madu yang berasal dari senyawa fenolik. Senyawa fenolik, dengan gugus hidroksil yang terhubung ke cincin aromatik, berperan sebagai donor hidrogen dalam menangkap radikal bebas. Selain itu, senyawa fenolik dapat bertindak sebagai donor elektron dan mereduksi ion logam. Oleh karena itu, kandungan fenolik dianggap sebagai kunci sifat antioksidan pada madu.⁵⁸

Penurunan kadar SOD (Superoksida dismutase) terjadi karena adanya stress oksidatif, di mana jumlah radikal bebas tidak seimbang dengan jumlah antioksidan endogen. Radikal bebas dapat dihasilkan dari berbagai proses seperti oksidasi, pembakaran sel, aktivitas fisik berlebihan, peradangan, dan paparan polusi eksternal seperti asap rokok. Dalam keadaan stres oksidatif, aktivitas SOD sebagai antioksidan enzimatis dapat menurun, meningkatkan risiko kerusakan sel dan penyakit degeneratif. Pentingnya peran SOD sebagai enzim antioksidan juga tergambar dalam

penjelasan tentang keadaan stress oksidatif. Penelitian ini memberikan pemahaman lebih lanjut tentang keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh, khususnya dalam konteks paparan asap rokok. Adanya antioksidan endogen, seperti SOD, membantu menetralkan radikal bebas, tetapi dalam kondisi stres oksidatif, konsentrasi SOD dapat menurun, meningkatkan kerentanan tubuh terhadap kerusakan sel dan penyakit degeneratif. Radikal bebas dalam tubuh dapat diredakan oleh antioksidan endogen, seperti superoksida dismutase (SOD). Sebagai contoh, kondisi hiperkolesterolemia, yang ditandai oleh peningkatan kadar kolesterol darah, dapat meningkatkan produksi radikal bebas. Hal ini dapat memicu stress oksidatif, di mana keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan endogen menjadi tidak stabil. Tingkat stress oksidatif dapat diukur dengan menilai aktivitas SOD dalam darah. SOD, sebuah enzim antioksidan metalloenzim, bergantung pada kofaktor logam seperti Cu, Fe, Zn, dan Mn. Fungsinya mencakup katalisis reduksi radikal anion superoksida (O_2^*) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2). Meskipun enzim ini bersifat tidak stabil terhadap panas, cukup stabil pada kondisi basa (PH 6,5-7,5), dan tetap aktif saat disimpan hingga 5 tahun pada suhu $5^\circ C$. Tubuh memiliki senyawa khusus yang disebut antioksidan endogen untuk melawan radikal bebas. Salah satu antioksidan endogen utama yang melawan radikal bebas dalam tubuh adalah enzim superoksida dismutase (SOD). Pada kondisi stres oksidatif, diperkirakan konsentrasi SOD akan mengalami penurunan. ^{15,57,59}

Pada penelitian yang dilakukan oleh Almasaudi menggunakan model tikus, disimpulkan bahwa pemberian madu dapat meningkatkan kadar antioksidan endogen seperti SOD pada model tikus yang diinduksi etanol untuk menyebabkan stres oksidatif. Kadar antioksidan, seperti SOD, mengalami peningkatan yang signifikan pada kelompok tikus yang diberi madu dibandingkan dengan kelompok tikus yang diinduksi etanol untuk menciptakan stres oksidatif.⁶⁰

Kondisi stres oksidatif dapat diatasi dengan memberikan suplemen atau herbal dari luar, seperti madu. Madu telah terbukti memiliki kandungan seperti polifenol yang dapat memberikan respons antioksidan dengan mengaktifkan AMPK (5'adenosine monophosphate-activated protein kinase) dan enzim antioksidan yang dapat mengurangi kondisi stres oksidatif. Madu dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti SOD, catalase, dan GPx, sehingga stres oksidatif dalam tubuh tikus menjadi berkurang. Oleh karena itu, pemberian madu pada penelitian dapat mempengaruhi kondisi tikus yang terpapar oleh asap rokok selama 14 hari.^{57,59}

5.2.2. Analisis Deskriptif Rata-Rata Caspase-9 pada Tikus Wistar Jantan yang Diberi Paparan Asap Rokok Berdasarkan Pemberian Madu

Berdasarkan hasil uji mean rank Kruskal-Wallis, nilai P-value untuk analisis imunohistokimia caspase-9 menunjukkan signifikansi ($p < 0,05$), menandakan adanya perbedaan antar kelompok perlakuan (K1, K2, K3, K4). H_a diterima dan H_0 ditolak, mengindikasikan variasi yang bermakna dalam aktivitas Caspase-9 di antara

kelompok-kelompok tersebut. Dengan demikian, pemberian madu berdampak signifikan pada kadar caspase-9 pada tikus Wistar jantan yang terpapar asap rokok.

Selanjutnya, uji Kruskal-Wallis menunjukkan perbedaan signifikan ($p > 0,05$) antara keempat kelompok. Uji Mann-Whitney mengidentifikasi perbedaan spesifik, dengan hasil signifikan ($p < 0,05$) antara K1-K2, K1-K3, K2-K3, K3-4 dan K1-K4. Pada kelompok K1 (kelompok kontrol) dibandingkan dengan K4 (perlakuan madu dosis 1,8 ml/hari terpapar asap rokok selama 14 hari), tidak terdapat perbedaan signifikan dalam pemeriksaan imunohistokimia. Kesimpulannya, pemberian madu dengan dosis tersebut memiliki pengaruh yang berarti pada aktivitas Caspase-9.

Pada kelompok K1, yang tidak terpapar radikal bebas (dalam hal ini, asap rokok), hasil pewarnaan imunohistokimia caspase-9 menunjukkan negatif, menandakan tidak terjadi kerusakan sel. K2, yang terpapar radikal bebas tanpa dosis madu, menunjukkan caspase-9 positif kuat, mengindikasikan kerusakan sel akibat paparan radikal bebas. K3, yang terpapar radikal bebas dengan dosis madu 0,9 ml, menunjukkan hasil pewarnaan caspase-9 positif sedang, menandakan adanya kerusakan sel yang dapat ditekan oleh pemberian madu. Pada K4, hasil pewarnaan caspase-9 dari positif sedang hingga negatif membuktikan bahwa penambahan dosis madu sebesar 1,9 ml dapat menekan terjadinya kerusakan sel dalam tubuh.

Kelompok K1, yang tidak terpapar radikal bebas (asap rokok), menunjukkan hasil pewarnaan imunohistokimia caspase-9 negatif, menandakan ketiadaan kerusakan sel. K2, yang terpapar radikal bebas tanpa dosis madu, menunjukkan hasil positif kuat

caspase-9, mengindikasikan kerusakan sel akibat paparan radikal bebas. Pada K3, yang terpapar radikal bebas dengan dosis madu 0,9 ml, hasil pewarnaan caspase-9 positif kuat hingga positif sedang, menandakan adanya kerusakan sel yang masih dapat ditekan oleh pemberian madu dengan kandungan flavonoid dosis 0,9 ml. Selanjutnya, pada K4, hasil pewarnaan caspase-9 dari positif sedang hingga negatif membuktikan bahwa penambahan dosis madu sebesar 1,9 ml dapat menekan terjadinya kerusakan sel dalam tubuh.

Hasil Penelitian sejalan dengan penelitian Porcza pada model tikus yang diberikan madu secara oral menyebabkan peningkatan kadar SOD sebagai penanda penurunan stres oksidatif, selain itu pada tikus yang diberikan madu mengalami penurunan pada ekspresi protein pro-apoptosis seperti Apaf-1, caspase-9 serta peningkatan anti-apoptosis Cox-2 dan Bcl. Pemberian madu menyebabkan pertumbuhan sel-sel kanker pada tikus. Madu adalah sumber penting senyawa bioaktif yang berasal dari tanaman dan dalam beberapa tahun terakhir, telah meningkat minat terhadap sifat anti-kanker madu.¹⁹

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Ahmed menunjukkan bahwa madu memiliki kemampuan meningkatkan jumlah dan aktivitas agen antioksidan dalam tubuh serta efek antikanker melalui interferensi dengan jalur apoptosis.¹² Penelitian sebelumnya juga mengungkapkan bahwa madu mengandung polifenol, kelas utama senyawa organik alami yang ditentukan oleh kelipatan unit fenol. Sejumlah flavonoid, seperti quercetin, myricetin, kaempferol, luteolin, rutin,

naringenin, naringin, chrysin, rhamnetin, isorhamnetin, apigenin, pinocembrin, pinobanksin, galangin, tricetin, catechin, dan hesperidin, merupakan senyawa utama yang ditemukan dalam berbagai varietas madu. Kandungan ini menjadikan madu potensial sebagai agen anti-apoptosis dan antioksidan.⁶¹

Asap tembakau mengandung berbagai bahan kimia, termasuk spesies oksigen dan nitrogen reaktif (ROS dan RNS), yang dapat merusak target seluler dan subseluler seperti lipid, protein, dan asam nukleat. Semakin banyak bukti yang mendukung peran penting ROS yang dihasilkan oleh merokok dan stres oksidatif yang diakibatkannya pada peradangan dan karsinogenesis.⁴⁷ Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa stres oksidatif memainkan peran krusial dalam apoptosis pada pasien dan model penyakit paru obstruktif kronis (PPOK). Merokok, sebagai salah satu faktor risiko PPOK, menunjukkan bahwa berhenti merokok tampaknya menjadi faktor risiko terbesar.^{47,62} Apoptosis merupakan proses fisiologis yang terlibat dalam menjaga homeostasis jaringan. Ini merupakan suatu kondisi kematian sel yang terjadi secara terprogram, diatur dengan baik, dan melibatkan dua jalur utama, yakni jalur ekstrinsik atau reseptor kematian, dan jalur intrinsik atau mitokondria.⁶³

Jalur apoptosis intrinsik merupakan proses alami yang mengarahkan sel menuju kematian sel terprogram. Jalur apoptosis intrinsik mengaktifkan kaskade sinyal sel yang merupakan bagian tak terpisahkan dari perkembangan dan fungsi suatu organisme. Jalur intrinsik jalur apoptosis dimulai ketika terjadi cedera di dalam sel dan stres yang diakibatkannya mengaktifkan jalur apoptosis. Baik dalam jalur apoptosis

intrinsik maupun ekstrinsik, pensinyalan menghasilkan aktivasi keluarga *protease Cys* (Sistein), bernama *caspases*, yang bertindak dalam kaskade proteolitik untuk membongkar dan menghilangkan sel yang sekarat.²⁵

Jalur apoptosis intrinsik dimulai ketika terjadi cedera di dalam sel. Tekanan intrinsik seperti onkogen, kerusakan DNA langsung, hipoksia, dan kekurangan faktor kelangsungan hidup, dapat mengaktifkan jalur apoptosis intrinsik. p53 adalah sensor stres seluler dan merupakan penggerak penting jalur intrinsik. Protein pos pemeriksaan DNA, ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated protein*), dan Chk2 (*Checkpoints Factor-2*), secara langsung memfosforilasi dan menstabilkan p53 serta menghambat MDM2 (*Mouse Double Minute-2 Homolog*) yang dimediasi oleh ubiquitinasi p53. MDM2 mengikat p53 dan memediasi ekspor nuklir. Ketika terikat pada MDM2, p53 tidak dapat lagi berfungsi sebagai penggerak transkripsi. p53 memulai apoptosis dengan mengaktifkan transkripsi anggota keluarga Bcl2 pro-apoptosis dan menekan protein Bcl2 anti-apoptosis dan CIAP. Target p53 lainnya termasuk BAX, Noxa, PUMA (*p53-Upregulated Modulator of Apoptosis*), dan yang paling baru diidentifikasi, BID. p53 juga mentransaktivasi gen lain yang mungkin berkontribusi terhadap apoptosis, termasuk PTEN (*Phosphatase dan Tensin Homolog Deleted On Chromosome-10*), APAF1, Perp, p53AIP1 (Protein Penginduksi Apoptosis-1 yang diatur p53), dan gen yang menyebabkan peningkatan ROS (*Spesies Oksigen Reaktif*). ROS ini menyebabkan kerusakan oksidatif umum pada semua komponen

mitokondria. Kerusakan DNA mitokondria mengganggu fosforilasi oksidatif mitokondria, yang berkontribusi terhadap sejumlah penyakit manusia.²⁶

Protein lain yang dilepaskan dari mitokondria yang rusak, seperti SMAC (*Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase*), Diablo, Arts, dan Omi/HTRA2 (*High Temperature Requirement Protein-A2*), menangkal efek IAP (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*), yang biasanya mengikat dan mencegah aktivasi Caspase-3. Interaksi antara IAP anggota keluarga Bcl, SMAC, dan Omi/HTRA2 merupakan pusat jalur apoptosis intrinsik. Studi terbaru menunjukkan bahwa nuklease lain, EndoG (Endonuclease-G), secara spesifik diaktifkan oleh rangsangan apoptosis dan mampu menginduksi fragmentasi nukleosom DNA secara independen dari Caspase dan DFF (DNA-Fragmentation Factor)/CAD (Caspase-Activated DNase). EndoG adalah nuklease spesifik mitokondria yang bertranslokasi ke nukleus dan memotong DNA kromatin selama apoptosis. Protein lain, AIF (Apoptosis Inducing Factor), juga dianggap berperan dalam apoptosis, menjadi aktif setelah translokasi dari mitokondria ke nuklei, di mana ia memulai kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA skala besar.²⁷

Dari Proses tersebut, Caspase-8 yang diaktifkan mengaktifkan Caspase-3 melalui dua jalur. Pada jalur pertama Caspase-8 memotong BID (Bcl2 Interacting Protein), dan bagian terminal COOH-nya bertranslokasi ke mitokondria di mana ia memicu pelepasan CytoC (Cytochrome-C). CytoC yang dilepaskan berikatan dengan APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) bersama dengan dATP dan Procaspase-9 dan mengaktifkan Caspase-9. Caspase-9 memotong Procaspase-3 dan mengaktifkan

Caspase-3. Jalur lainnya adalah Caspase-8 memotong Procaspase-3 secara langsung dan mengaktifkannya. Caspase-3 memotong faktor fragmentasi DNA ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase) dalam bentuk heterodimerik yang terdiri dari CAD dan ICAD yang dibelah. ICAD yang terpecah berdisosiasi dari CAD, menginduksi oligomerisasi CAD yang memiliki aktivitas DNase. Oligomer CAD aktif menyebabkan fragmentasi DNA internukleosom, yang merupakan tanda apoptosis yang menunjukkan kondensasi kromatin.²⁸

Apoptosis yang dipicu oleh stres terjadi melalui mekanisme yang melibatkan perubahan permeabilitas mitokondria dan pelepasan CytoC selanjutnya serta pembentukan apoptosom, platform multiprotein katalitik yang mengaktifkan Caspase-9. Caspase-9 yang diaktifkan kemudian membelah Caspase-3, mengakibatkan peristiwa hilir yang menyebabkan kematian sel. Pelepasan CytoC diatur oleh protein keluarga Bcl2. Bcl2L (Bcl2-Like), BclXL (Bcl2 Terkait Protein *Long Isoform*), dan anggota keluarga Bcl2 anti-apoptosis lainnya berada di membran luar mitokondria dan mencegah pelepasan CytoC. BAX (*Bcl2 Associated X-protein*), BID (*BH3 Interacting Death Domain*), dan BIM (*Bcl2-Interacting Protein*) awalnya tidak aktif dan harus bertranslokasi ke mitokondria untuk menginduksi apoptosis, baik dengan membentuk pori-pori di mitokondria secara langsung atau dengan mengikat melalui domain BH3 menjadi Bcl2, BclXL, dan Bfl1, dan memusuhi protein anti-apoptosis ini.^{64,65}

Caspases adalah keluarga protease sistein-aspartik yang memediasi kematian sel dan peradangan terprogram. Sel mengekspresikan caspase sebagai zimogen tidak aktif,

yang aktif dengan cepat sebagai respons terhadap sinyal seluler. Caspases inisiator (seperti caspase-1, -2, -8, -9, -10) diaktifkan melalui dimerisasi setelah mengikat ke platform pengaktif. Setelah aktif, caspase inisiator mengaktifkan caspase efektor hilir (seperti caspase-3, -6, dan -7) melalui pembelahan proteolitik, yang pada gilirannya dapat mengaktifkan caspase inisiator tambahan.⁶⁶

Caspase-9, sebuah protease sistein-aspartik, memainkan peran krusial sebagai inisiator apoptosis intrinsik, mengatur kematian sel fisiologis dan degenerasi jaringan patologis. Selain itu, caspase-9 memiliki fungsi di luar apoptosis, seperti dalam regulasi diferensiasi/pematangan sel, sistem imun bawaan, homeostasis mitokondria, dan autophagy. Bentuk caspase-9 menjadi penanda penting pada titik masuk sel ke jalur sinyal apoptosis, dan aktivasi caspases menunjukkan kerusakan sel.⁶⁷ Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa paparan asap rokok dapat meningkatkan ekspresi gen caspase-9, menyebabkan peningkatan mekanisme apoptosis. Namun, kerusakan sel yang diakibatkan oleh apoptosis dapat dihambat atau dikurangi dengan penggunaan antioksidan eksternal. Proses apoptosis sering dikaitkan dengan stres oksidatif; oleh karena itu, memberikan antioksidan dari luar, seperti madu, diharapkan dapat mempengaruhi proses apoptosis.^{61,48}

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan, yang mendapat madu dengan dosis 0,9 ml/hari selama paparan asap rokok selama 14 hari, tidak menunjukkan perbedaan signifikan dalam imunohistokimia caspase-9 dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberi pakan standar selama periode yang sama.

Berdasarkan penelitian ini, flavonoid dalam madu diyakini memiliki kemampuan untuk menghambat proses apoptosis dengan cara menghambat aktivitas caspase-3. Flavonoid telah terbukti menjadi elemen kunci dalam jalur transduksi sinyal seperti apoptosis, dapat memicu apoptosis melalui modulasi sejumlah elemen kunci dalam jalur transduksi sinyal seluler yang terkait dengan apoptosis. Studi sebelumnya juga menunjukkan bahwa flavonoid dapat mengaktifkan aktivitas pengaturan dalam sel melalui tindakan pada berbagai jalur transduksi sinyal, termasuk caspases.⁶¹

Penelitian yang dilakukan Abedi *et. al.* menyebutkan bahwa madu memiliki potensi sebagai antipoptosis dengan memodulasi jalur sinyal seluler seperti MAPK, NF- κ B, dan Nrf2. Madu juga dapat mengurangi peradangan, menekan pelepasan sitokin, serta mengatur stres oksidatif dan apoptosis melalui modulasi berbagai jalur seperti TNF, NF- κ B, PI3K/Akt, MAPK, dan jalur apoptosis. Dalam penelitian ini pada tikus yang terpapar asap rokok, kelompok yang diberi madu menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dalam ekspresi caspase-9 dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian ini memberikan pandangan lebih luas terkait potensi madu dan komponennya, seperti polifenol dan flavonoid, dalam mengatur jalur sinyal seluler, stres oksidatif, peradangan, dan apoptosis.⁵¹

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

- 6.1.1. Terdapat pengaruh pemberian madu terhadap kadar SOD pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- 6.1.2. Terdapat pengaruh pemberian madu terhadap caspase 9 pada tikus wistar jantan yang diberi paparan asap rokok dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2. Keterbatasan dan Saran Penelitian

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terdapat keterbatasan penelitian yaitu:

6.2.1. Keterbatasan Penelitian

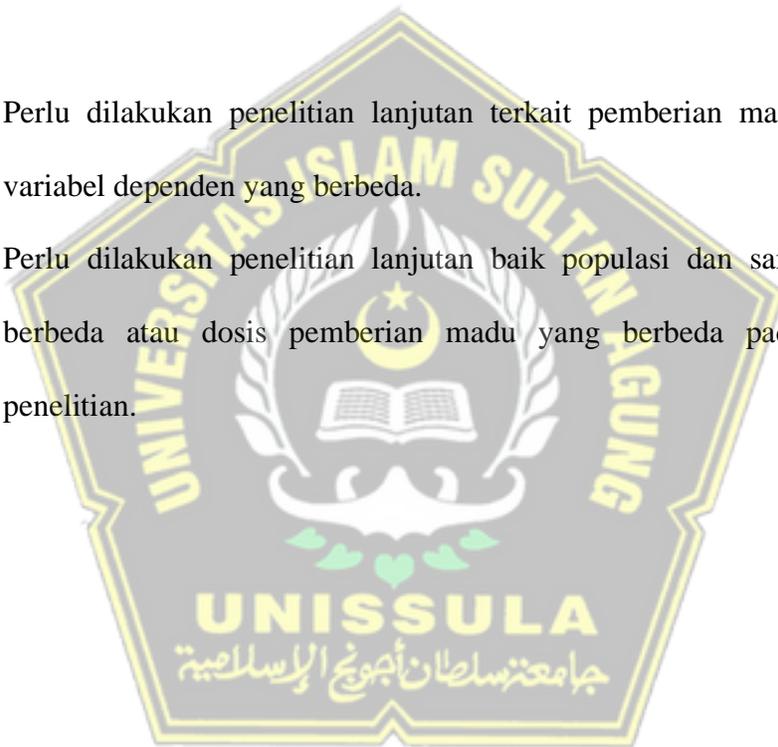
- 6.2.1.1. Penelitian ini hanya meneliti mengenai madu terhadap kada SOD dan jalur caspase-9 saja, sementara kadar yang lain serta jalur-jalur lain yang juga menyertai mekanisme dalam tubuh tidak diteliti sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

6.2.1.2. Madu yang digunakan dalam penelitian hanya satu jenis saja, tidak ada madu lain sebagai pembanding sehingga diperlukan jenis madu lain untuk intervensi sampel penelitian.

6.3.1. Saran Penelitian

Dari keterbatasan penelitian tersebut maka saran dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 6.3.1.1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan terkait pemberian madu dengan variabel dependen yang berbeda.
- 6.3.1.2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan baik populasi dan sampel yang berbeda atau dosis pemberian madu yang berbeda pada sampel penelitian.



DAFTAR PUSTAKA

1. Ivonne Ruth Situmeang, Jerry Tobing, Maestro Simanjuntak, Paul Tobing, Sanggam B. Hutagalung. Penyuluhan Perilaku Hidup Bersih Dan Sehat (Phbs). Vol. 8, Ikra-Ith Abdimas. 2024. 240–243 P.
2. Harlev A, Agarwal A, Gunes So, Shetty A, Du Plessis Ss. Smoking And Male Infertility: An Evidence-Based Review. *World J Mens Health*. 2015;33(3):143.
3. Wati Sh, Bahtiar, Anggraini D. Dampak Merokok Terhadap Kehidupan Sosial Remaja (Studi Di Desa Mabodo Kecamatan Kontunaga Kabupaten Muna). 2018;3(2):503–9.
4. Novarianto J. Hubungan Persepsi Remaja Tentang Peringatan Kesehatan Bergambar Pada Kemasan Rokok Dengan Motivasi Berhenti Merokok Pada Remaja Di Madrasah Aliyah Al-Qodiri Kecamatan Patrang Kabupaten Jember. *Indones Onesearch*. 2018;
5. Widowati R. Karakteristik Kimia Madu Stinglessbee *Tetragonula Sapiens* Sebagai Penghambat Sel Kanker. *Univ Nas [Internet]*. 2020;
6. Yan L, Liu J, Wu S, Zhang S, Ji G, Gu A. Seminal Superoxide Dismutase Activity And Its Relationship With Semen Quality And Sod Gene Polymorphism. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(5):549–54.
7. Sri Wahjuni Mk. Superoksida Dismutase (Sod) [Internet]. Denpasar: Udayana University Press; 2015. Available From: <https://erepo.unud.ac.id/id/eprint/19/1/79c4b32a65502f63e70df23dd224f476.pdf>
8. Taniyama Y, Griendling Kk. Reactive Oxygen Species In The Vasculature: Molecular And Cellular Mechanisms. *Hypertension*. 2003;42(6):1075–81.
9. Agung A, Arjana G. Studi Histopatologi Hepar Tikus Putih Yang Diinduksi Aspirin Pasca Pemberian Madu Per Oral. *Patol L, Kedokt F, Univ H, Denpasar U*. 2013;2(5):488–95.
10. Saputra Tt, Wulan Aj. Madu Sebagai Pencegah Penyakit Paru Obstruksi Kronik. *J Major [Internet]*. 2016;5(5):37–42. Available From: <https://juka.kedokteran.unila.ac.id/index.php/majority/article/view/921/735>
11. Erekat Ns. Apoptosis And Its Role In Parkinson's Disease. *Park Dis Pathog Clin Asp*. 2018;65–82.
12. Ahmed S, Othman Nh. Honey As A Potential Natural Anticancer Agent: A Review Of Its Mechanisms. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2013;2013(C).
13. Lavrik In, Golks A, Krammer Ph. Caspase: Pharmacological Manipulation Of Cell Death. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2665–72.
14. Hariwaluyo Rde. Perbedaan Ekspresi Cystein Aspartate Specific Proteases-9 (Caspase-9) Pada Pasien Karsinoma Nasofaring Who Tipe 3 Stadium Iii Dan Iv. 2015;

15. Simanjuntak Ej, Zulham Z. Superoksida Dismutase (Sod) Dan Radikal Bebas. *J Keperawatan Dan Fisioter.* 2020;2(2):124–9.
16. Mu'arif S, Widiyanto M. Adaptation To The Levels Of Mda And Sod Enzyme Activity Of Mict And Hiit Exercise On Wistar. 2019;7(Icssh 2018):160–3.
17. Harun I, Susanto H, Rosidi A. Pemberian Tempe Menurunkan Kadar Malondialdehyde (Mda) Dan Meningkatkan Aktivitas Enzim Superoxide Dismutase (Sod) Pada Tikus Dengan Aktivitas Fisik Tinggi. *J Gizi Dan Pangan.* 2017;12(3):211–6.
18. Zulaikhah St. The Role Of Antioxidant To Prevent Free Radicals In The Body. *Sains Med.* 2017;8(1):39.
19. Porcza L, Simms C, Chopra M. Honey And Cancer: Current Status And Future Directions. *Diseases.* 2016;4(4):30.
20. Schroeder T, Barandun J, Flütsch A, Briand C, Mittl Pre, Grütter Mg. Specific Inhibition Of Caspase-3 By A Competitive Darpin: Molecular Mimicry Between Native And Designed Inhibitors. *Structure.* 2013;21(2):277–89.
21. Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting Apoptotic Caspases In Cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;46(2):248–56.
22. Ishmatullah Mh, Megantara S, Levita J. Caspase:Review Of The Other Roles In Apoptosis, The Character Of The Catalytic Site, And The Tnteractions With Substrates And Their Inhibitors. *J Ilm Farm Bahari.* 2021;12(2):183–91.
23. Li Y, Zhou M, Hu Q, Bai Xc, Huang W, Scheres Shw, Et Al. Mechanistic Insights Into Caspase-9 Activation By The Structure Of The Apoptosome Holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(7):1542–7.
24. Adriani De, Lafarge T, Dardou A, Fabro A, Clément-Vidal A, Yahya S, Et Al. The Qtsn Positive Effect On Panicle And Flag Leaf Size Of Rice Is Associated With An Early Down-Regulation Of Tillering. Vol. 6, *Frontiers In Plant Science.* 2016. 1–33 P.
25. Peter Me. Apoptosis Meets Necrosis. *Nature [Internet].* 2011;(417):310–2. Available From: <https://doi.org/10.1038/471310a>
26. Cheng Q, Chen J. Mechanism Of P53 Stabilization By Atm After Dna Damage Qian. *Cell Cycle.* 2010;9(3):472–8.
27. Cagnol S, Mansour A, Van Obberghen-Schilling E, Chambard J-C. Raf-1 Activation Prevents Caspase 9 Processing Downstream Of Apoptosome Formation. *J Signal Transduct.* 2011;2011:1–12.
28. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat Gk. Caspases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol [Internet].* 2008;151(1):10–27. Available From: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18602321/>
29. Carrington Em, Zhan Y, Brady Jl, Zhang Jg, Sutherland Rm, Anstee Ns, Et Al. Anti-Apoptotic Proteins Bcl-2, Mcl-1 And A1 Summate Collectively To Maintain Survival Of Immune Cell Populations Both In Vitro And In Vivo. *Cell Death Differ.* 2017;24(5):878–88.
30. Singh V, Khurana A, Navik U, Allawadhi P, Bharani Kk, Weiskirchen R. Apoptosis And Pharmacological Therapies For Targeting Thereof For Cancer

- Therapeutics. Sci. 2022;4(2).
31. Khalil Mi, Moniruzzaman M, Boukraâ L, Benhanifia M, Islam Ma, Islam Mn, Et Al. Physicochemical And Antioxidant Properties Of Algerian Honey. *Molecules*. 2012;17(9):11199–215.
 32. Wineri E, Rasyid R, Alioes Y. Perbandingan Daya Hambat Madu Alami Dengan Madu Kemasan Secara In Vitro Terhadap Streptococcus Beta Hemoliticus Group A Sebagai Penyebab Faringitis. *J Kesehat Andalas*. 2014;3(3):376–80.
 33. Jamilah. Pengaruh Umur Pemanenan Madu Di Areal Tanaman Kaliandra Terhadap Aktivitas Enzim Diastase, Hidroximetilfurfural (Hmf) Dan Keasaman. Univ Brawijaya. 2016;
 34. Andini A. Bauran Pemasaran Madu Heterotrigona Itama Di Suhita Bee Farm. Politek Negri Lampung. 2021;
 35. Hammado N. Pengaruh Rokok Terhadap Kesehatan Manusia. *J Din [Internet]*. 2011;02(2):45–51. Available From: <https://Journal.Uncp.Ac.Id/Index.Php/Dinamika/Article/View/11>
 36. Yuniastuti A, Kamilatussainah, Sasi Fa. Pengaruh Pemberian Madu Kelengkeng Terhadap Aktivitas Enzim Superoxide Dismutase Dan Katalase Pada Tikus Yang Diinduksi Pb Asetat. *Pros Semin Nas Sains Dan Teknol 6 2015*. 2015;1(1):100–3.
 37. Cianciosi D, Forbes-Hernández Ty, Afrin S, Gasparrini M, Reboredo-Rodriguez P, Manna Pp, Et Al. Phenolic Compounds In Honey And Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*. 2018;23(9):1–20.
 38. Tazuyyun S. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum Citriodorum*) Terhadap Kadar Superoksida Dismutase (Sod) Paru Tikus Wistar Setelah Paparan Asap Rokok. *J Progr Stud Pendidik Dokter, Fak Kedokt Dan Ilmu Kesehatan, Univ Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim*. 2020;
 39. Raisa A, Srikandi S, Hutagaol Rp. Optimasi Penambahan Madu Sebagai Zat Anti Bakteri *Staphylococcus Aureus*, Pada Produk Sabun Mandi Cair. *J Sains Nat*. 2018;6(2):52.
 40. Faisal, Sakri M. Madu Dan Khasiatnya : Suplemen Sehat Tanpa Efek Samping. Diandra Kreatif Yogyakarta; 2020. 87–88 P.
 41. Haryanto. Penggunaan Madu Dalam Perawatan Luka. *Bul Inov Ppij*. 2009;15(9):1–5.
 42. Chaouachi K. Hookah (Shisha, Narghile) Smoking And Environmental Tobacco Smoke (Ets). A Critical Review Of The Relevant Literature And The Public Health Consequences. *Int J Environ Res Public Health*. 2009;6(2):798–843.
 43. I Ketut Sudiana. Patobiologi Molekuler Kanker [Internet]. Jakarta: Salemba; 2008. Available From: <https://Books.Google.Co.Id/Books?Id=NI084skundsc>
 44. Ahmed M, Hussain F. Chemical Composition And Biochemical Activity Of Aloe Vera (*Aloe Barbadensis* Miller) Leaves. *Ijcbcs*. 2013;3(June):29–33.
 45. Salampe M, Kabo P, Djabir Yy. Pengaruh Madu Trigona Terhadap Stress

- Oksidatif Pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Yang Diinduksi Statin Untuk Mencegah Miotoksisitas. *Maj Farm Dan Farmakol*. 2018;22(2):35–9.
46. Seo Ys, Park Jm, Kim Jh, Lee My. Cigarette Smoke-Induced Reactive Oxygen Species Formation: A Concise Review. *Antioxidants*. 2023;12(9).
 47. Caliri Aw, Tommasi S, Besaratinia A. Relationships Among Smoking, Oxidative Stress, Inflammation, Macromolecular Damage, And Cancer. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2021;787.
 48. Dirican E, Özcan H, Karabulut Uzunçakmak S, Takım U. Evaluation Expression Of The Caspase-3 And Caspase-9 Apoptotic Genes In Schizophrenia Patients. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2023;21(1):171–8.
 49. Susnowa N, Zhangb L, Margineantub D, Hockenberya Dm. Bcl-2 Family Proteins As Regulators Of Oxidative Stress. *Physiol Behav*. 2019;46(2):248–56.
 50. Azman Kf, Zakaria R. Honey As An Antioxidant Therapy To Reduce Cognitive Ageing. *Iran J Basic Med Sci*. 2019;22(12):1368–77.
 51. Abedi F, Ghasemi S, Farkhondeh T, Azimi-Nezhad M, Shakibaei M, Samarghandian S. Possible Potential Effects Of Honey And Its Main Components Against Covid-19 Infection. *Dose-Response*. 2021;19(1):1–13.
 52. Jaganathan S, Mandal M. Involvement Of Non-Protein Thiols, Mitochondrial Dysfunction, Reactive Oxygen Species And P53 In Honey-Induced Apoptosis. *Invest New Drugs*. 2010;28(5):624–33.
 53. Nurullita U, Susilaningih N, Suwondo A. Pengaruh Ekstrak Kayu Secang Terhadap Kadar Superoxide Dismutase Dan Malondialdehid Tikus Yang Terpapar Gas Formaldehyde Effect Of Sappan Wood Extract On Superoxide Dismutase And Malondialdehyde Levels In Rats Exposed To Formaldehyde Gas. *Medica Arter [Internet]*. 2023;5(1):1–11. Available From: <https://jurnal.unimus.ac.id/index.php/medart>
 54. Rahayu Yc, Auerkari E. Teknik Immuno Histokimia Sebagai Pendeteksi Penyakit Infeksi. Vol. 11, *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*. 2014. P. 76–82.
 55. Widowati R, Gautama Maulana R, Suci S, Atmoko U. Section A-Research Paper Inventory Of Stingless Bees Based On Nesting And Nest Trees At Tuanan Orangutan Research Station Central Kalimantan Indonesia *Eur. Chem Bull*. 2023;2023(S3):2246–56.
 56. Oka Ap, Ratnayani K, Ana L. Aktivitas Antiradikal Bebas Serta Kadar Beta Karoten Pada Madu Randu (*Ceiba Pentandra*) Dan Madu Kelengkeng (*Nephelium Longata L.*). *J Kim 4 (1)*,. 2010;4(1):54–62.
 57. Dewa Ayu Inten Dwi-Primayanti I, Purnawati S, Sukanata W. Effect Of Kele Honey (*Trigona Sp*) In Malondyaldehyde And Superoxide Dismutase Serum And Hepatic Tissue Of White Rats (*Rattus Norvegicus*) Exposed To Cigarettes Smoke. *Biomed Pharmacol J*. 2020;13(4):1885–91.
 58. Zayed Mohamed N, Aly Hf, Moneim El-Mezayen Ha, El-Salamony He. Effect Of Co-Administration Of Bee Honey And Some Chemotherapeutic Drugs On

- Dissemination Of Hepatocellular Carcinoma In Rats. *Toxicol Reports* [Internet]. 2019;6(March 2018):875–88. Available From: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.08.007>
59. Ighodaro Om, Akinloye Oa. First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (Sod), Catalase (Cat) And Glutathione Peroxidase (Gpx): Their Fundamental Role In The Entire Antioxidant Defence Grid. *Alexandria J Med* [Internet]. 2018;54(4):287–93. Available From: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
 60. Almasaudi Sb, El-Shitany Na, Abbas At, Abdel-Dayem Ua, Ali Ss, Al Jaouni Sk, Et Al. Antioxidant, Anti-Inflammatory, And Antiulcer Potential Of Manuka Honey Against Gastric Ulcer In Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
 61. Iftikhar A, Nausheen R, Muzaffar H, Naeem Ma, Farooq M, Khurshid M, Et Al. Potential Therapeutic Benefits Of Honey In Neurological Disorders: The Role Of Polyphenols. *Molecules*. 2022;27(10):1–28.
 62. Zeng H, Li T, He X, Cai S, Luo H, Chen P, Et Al. Oxidative Stress Mediates The Apoptosis And Epigenetic Modification Of The Bcl-2 Promoter Via Dnmt1 In A Cigarette Smoke-Induced Emphysema Model. *Respir Res*. 2020;21(1):1–14.
 63. Tan Bl, Norhaizan Me, Liew Wpp, Rahman Hs. Antioxidant And Oxidative Stress: A Mutual Interplay In Age-Related Diseases. *Front Pharmacol*. 2018;9(Oct):1–28.
 64. Zarneshan Sn, Fakhri S, Khan H. Targeting Akt/Creb/Bdnf Signaling Pathway By Ginsenosides In Neurodegenerative Diseases: A Mechanistic Approach. *Pharmacol Res* [Internet]. 2022;177(December 2021):106099. Available From: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106099>
 65. Franklin Jl. Redox Regulation Of The Intrinsic Pathway In Neuronal Apoptosis. *Antioxidants Redox Signal*. 2011;14(8):1437–48.
 66. McComb S, Chan Pk, Guinot A, Hartmannsdottir H, Jenni S, Dobay Mp, Et Al. Efficient Apoptosis Requires Feedback Amplification Of Upstream Apoptotic Signals By Effector Caspase-3 Or -7. *Sci Adv*. 2019;5(7):1–11.
 67. Avrutsky Mi, Troy Cm. Caspase-9: A Multimodal Therapeutic Target With Diverse Cellular Expression In Human Disease. *Front Pharmacol*. 2021;12(July):1–17.