

**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK PROPOLIS DAN
VITAMIN E TERHADAP KADAR TNF- α DAN IL-6**

**Studi Eksperimental Pada Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus
norvegicus*) Yang Mendapatkan Diet Tinggi Lemak**

TESIS

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



NOVITASARI ANGGRAINI

MBK 2424010489

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

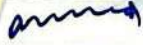
SEMARANG 2025

LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI

Laporan Thesis Dengan Judul “ PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK PROPOLIS DAN VITAMIN E TERHADAP KADAR TNF- α DAN IL-6 : Studi Eksperimental Pada Tikus Jantan Galur *Wistar (Rattus norvegicus)* Yang Mendapatkan Diet Tinggi Lemak” ini telah dipertahankan di depan Penguji Sidang Akhir pada:

Hari : Selasa

Tanggal : 20 Januari 2026

NO	NAMA	JABATAN	TANDA TANGAN
1	Dr.dr.Eko Setiawan,Sp.B,FINACS	Penguji I	
2	Dr.dr.H.Setyo Trisnadi,SH, Sp.KF	Penguji II	
3	Dr.dr.Minidian Fasitasari, MSc, Sp.GK (K)	Penguji III	
4	Dr.dr.Joko Wahyu Wibowo,M.Kes	Pembimbing I	
5	Dr.dr. Hadi Sarosa, M.Kes	Pembimbing II	

TESIS

PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK PROPOLIS DAN VITAMIN E TERHADAP KADAR TNF- α DAN INTERLEUKIN-6

Studi Eksperimental Pada Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) Yang
Diinduksi Diet Tinggi Lemak

Disusun Oleh :

NOVITASARI ANGGRAINI

MBK 2424010489

dipertahankan di depan Tim Penguji

pada 20 Januari 2026

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing 1



Dr.dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes

NIP: 210198046

Pembimbing 2



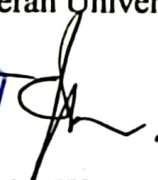
Dr.dr.Hadi Sarosa, M.Kes

NIP: 210101059

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedis

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes

NIP: 210198046

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 suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan yang belum/ tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Januari 2026



(Novitasari Anggraini)



DAFTAR RIWAYAT HIDUP

1. IDENTITAS

Nama : dr.Novitasari Anggraini
Tempat/ Tanggal lahir : Surakarta, 23 November 1984
Agama : Kristen
Jenis Kelamin : Perempuan

2. RIWAYAT PENDIDIKAN

- a. TK Kanisius Wonogiri Jawa Tengah : lulus tahun 1990
- b. SD Kanisius Wonogiri Jawa Tengah : lulus tahun 1996
- c. SMP N 1 Wonogiri Jawa Tengah : lulus tahun 1999
- d. SMA N 3 Surakarta Jawa Tengah : lulus tahun 2002
- e. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret (UNS) : lulus tahun 2008

3. RIWAYAT KELUARGA

- a. Nama Suami : dr.John Hartono, Sp.KFR, AIFO-K
- b. Nama Anak :
 - 1) Glenn Tandrio Hartono
 - 2) Evelyn Nathania Hartono

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, atas rahmat dan karunia-Nya, sehingga tesis ini yang berjudul **“Pengaruh Kombinasi Propolis dan Vitamin E terhadap kadar TNF- α dan IL-6 : Studi Eksperimental Pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar Yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak”** dapat diselesaikan sebagai salah satu syarat mencapai gelar Magister Ilmu Biomedik di Fakultas kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Penulis menyadari bahwa tesis dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis berterimakasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan tesis ini.

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Prof.DR.H.Gunarto,S.H,M.Hum,selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang beserta Wakil Rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan magister Biomedik.
2. Dr.dr.H.Setyo Trisnadi, SH Sp.KF, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr.dr.Eko Setiawan, Sp.B, FINACS, selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang telah memberikan pengarahan dan dukungan dalam penyusunan tesis ini.

4. Dr.dr.Joko Wahyu Wibowo, M.Kes, selaku Dosen Pembimbing I, yang telah memberikan banyak perhatian, waktu, kritik, saran serta motivasi yang membangun bagi penulis selama penyusunan tesis ini.
5. Dr.dr. Hadi Sarosa, M.Kes selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan masukannya yang berharga selama proses penyusunan tesis ini.
6. Dr.dr.Eko Setiawan, Sp.B, FINACS selaku Dosen Penguji I, yang telah memberikan kritik, saran, dorongan dan semangat dalam penyusunan tesis ini.
7. Dr.dr.H.Setyo Trisnadi, S.H, Sp.KF selaku Dosen Penguji II selaku Penguji II yang telah memberikan kritik, saran, semangat dan dorongan selama penyusunan tesis ini.
8. Dr.dr. Minidian Fasitasari, M.Sc, Sp.GK (K) selaku Dosen Penguji III selaku Penguji III, yang telah memberikan kritik, saran dan dorongan selama penyusunan tesis ini.
9. Seluruh dosen pengajar dan staff Prodi Magister Ilmu Biomedik, Lab IBL Unissula yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu, yang telah banyak membantu dalam memberikan doa, semangat dalam penyusunan tesis ini.
10. Keluarga tercinta atas dukungan , doa dan semangat yang selalu menyertai.
11. Rekan-rekan seperjuangan atas kerjasama, motivasi, dan kebersamaan selama proses penyusunan tesis ini.
12. Kepada seluruh pihak yang telah memberikan dukungan,bantuan serta, doa dalam penyusunan tesis ini. Mohon maaf karena tidak dapat menyebutkan satu-

persatu, namun setiap kontribusi yang diberikan sangat berarti, dan menjadi bagian penting dalam terselesaikannya karya ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kelemahan dalam penyusunan thesis ini, sehingga kritik dan saran sangat diharapkan agar thesis ini dapat menjadi lebih baik. Akhir kata penulis mengucapkan banyak terimakasih, semoga thesis ini menjadi manfaat bagi pengembangan ilmu biomedik dan penelitian terkini.

Semarang, Januari 2026



Novitasari Anggraini

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
SURAT PERNYATAAN.....	iv
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR SINGKATAN	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
ABSTRAK	xix
ABSTRACT	xx

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan Penelitian	4
1.3 Tujuan Penelitian	
1.3.1. Tujuan Teoritis.....	4
1.4.1. Tujuan Praktis	4

1.4 Originalitas Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian	
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	8
1.4.2. Manfaat praktis	8
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Tumor Necrosis Alfa	
2.1.1. Sejarah, Definisi dan Struktur	9
2.1.2. Peranan dan Fungsi TNF- α	10
2.1.3. Mekanisme Molekuler TNF- α	11
2.1.4. Faktor-faktor yang mempengaruhi kadar TNF- α	13
2.1.5. Cara Pengukuran Pemeriksaan TNF- α	15
2.2. Interleukin-6	
2.2.1. Sejarah, Definisi dan Struktur	16
2.2.2. Peranan dan Fungsi Interleukin-6 (IL-6)	17
2.2.3. Mekanisme Molekuler Interleukin-6	18
2.2.4. Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Kadar IL-6.....	19
2.2.5. Cara Pengukuran Pemeriksaan Interleukin-6.....	21
2.3. Diet Tinggi Lemak	
2.3.1. Definisi dan Bahaya Diet Tinggi Lemak	22
2.3.2. Faktor-faktor yang mempengaruhi terjadinya komplikasi akibat diet tinggi lemak	23
2.3.3. Diet Tinggi Lemak dan Inflamasi	25
2.3.4. Kuning telur Puyuh Sebagai Diet Tinggi Lemak	30

2.4. Propolis	
2.4.1 Definisi	31
2.4.2. Ekstrak Propolis dengan Metode CMCE.....	32
2.4.3. Kandungan Propolis	34
2.4.4. Mekanisme Antiinflamasi dari Propolis	35
2.5. Vitamin E	
2.5.1. Definisi, Jenis dan Struktur dari Vitamin E	39
2.5.2. Fungsi Vitamin E.....	41
2.5.3. Mekanisme anti inflamasi dari Vitamin E	43
III. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	
3.1. Kerangka teori	45
3.2 Kerangka Konsep.....	49
3.4. Hipotesis.....	49
IV. METODE PENELITIAN	
4.1. Jenis penelitian dan rancangan penelitian	50
4.2. Populasi dan teknik pengambilan sampel	
4.2.1. Populasi dan Sampel.....	51
4.2.2. Besar Sampel.....	51
4.2.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian.....	52
4.2.4. Kriteria Inklusi.....	52
4.2.5. Kriteria Eksklusi.....	52
4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	

4.3.1. Variabel.....	52
4.3.2. Definisi Operasional	53
4.4. Alat dan Bahan Penelitian	
4.4.1. Alat Penelitian	55
4.4.2. Bahan Penelitian.....	56
4.5. Prosedur Penelitian	
4.5.1. Ethical Clearance.....	56
4.5.2. Aklimatisasi	56
4.5.3. Penetapan Dosis Propolis dan Vitamin E	57
4.5.4. Komposisi Diet Tinggi Lemak.....	57
4.5.5. Pembagian kelompok Perlakuan	58
4.5.6. Penimbangan Berat Badan.....	59
4.5.7. Prosedur Pengambilan Sampel Sebagai Spesimen.....	59
4.5.8. Preparasi Spesimen.....	60
4.5.9. Pemeriksaan Kadar TNF- α dan IL-6	60
4.5.10. Pemeriksaan Profil Lipid	61
4.5.11. Alur Penelitian.....	62
4.5.12. Analisa Data	63
4.6. Tempat penelitian	63
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1. Hasil penelitian	64
5.1.1. Gambaran Hasil Penelitian	64
5.1.2. Hasil Penelitian Berat Badan Tikus.....	65

5.1.3. Hasil penelitian Profil Lipid.....	72
5.1.4. Hasil Penelitian TNF- α	79
5.1.5. Hasil penelitian IL-6.....	81
5.2. Pembahasan Penelitian.....	83
5.2.1. Pembahasan Dinamika Sitokin TNF- α pada masing-masing kelompok.....	84
5.2.2. Pembahasan Dinamika Sitokin IL-6 pada masing-masing kelompok.....	88
5.2.3. Keterbatasan Penelitian	91
VI. KESIMPULAN dan SARAN	
6.1. Kesimpulan.....	93
6.2. Saran.....	93
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR SINGKATAN



AMPK	: <i>AMP-Activated Protein Kinase</i>
Art-C	: <i>Artepin C</i>
CAPE	: <i>Caffeic Acid Phenetyl Ester</i>
CBEP- α	: <i>C Enhancer Binding Protein</i>
CMCE	: <i>Continuous Multistage Countercurrent Extraction</i>
DAG	: <i>Diacylglycerol</i>
DAMPs	: <i>Damage- Associated Molecular Pattern</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Sorbent Assay</i>
ETC	: <i>Electron transport Chain</i>
HDL	: <i>High Density Lipoprotein</i>
HFD	: <i>High Fat Diet</i>
HMG-CoA	: <i>Hidroksi-3metilglutaril-koenzim A</i>
IRS-1	: <i>Insulin Receptor Substrat-1</i>
IL-1	: <i>Interleukin 1</i>
IL-2	: <i>Interleukin 2</i>
IL-6	: <i>Intereukin-6</i>
IL-8	: <i>Interleukin-8</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
IL-12	: <i>Interleukin-12</i>
IL-15	: <i>Interleukin-15</i>
IL-17	: <i>Interleukin-17</i>
IFN- γ	: <i>Interferon γ</i>
LDL	: <i>Low Density Lipoprotein</i>
LPL	: <i>Lipoprotein Lipase</i>

LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MMP-3	: <i>Matrix Metalloproteinase-3</i>
MyD88	: <i>Myeloid Differentiation 88</i>
NADPH	: <i>Nikotinamida Adenina Dinukleotida Fosfat</i>
NFAT	: <i>Nuclear Factor T cells</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
ORAC	: <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PAF	: <i>Platelet Activating Factor</i>
PAMPs	: <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PPAR- γ	: <i>Peroxisome proliferator Activated Receptor-γ</i>
PGE-2	: <i>Prostaglandin</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SCFA	: <i>Short Chain Fatty Acids</i>
SREBP-1	: <i>Sterol Regulatory Element Binding Protein-1</i>
TG	: <i>Triglycerida</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TNFR	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
TLR	: <i>Toll Like Receptor</i>
VSMCs	: <i>Vascular Smooth Muscle cells</i>
WD	: <i>Western Diet</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian	5
Tabel 2.1. Kandungan Gizi per 100 gr Telur Puyuh.....	30
Tabel 2.2. Kandungan Asam Lemak pada Kuning Telur Puyuh Segar	31
Tabel 4.1. Komposisi Pakan Standar	58
Tabel 5.1. Rerata (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (<i>Shapiro-Wilk</i>), Uji Homogenitas (<i>Levene</i>) dan Uji Beda Lebih Dari Dua Kelompok (<i>Kruskal Wallis</i>) Berat Badan Tikus (g) pada Hari ke-0 (H_0)	66
Tabel 5.2. Rata-rata dan Simpangan Baku (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (<i>Shapiro-Wilk</i>), Uji Homogenitas Varians (<i>Levene</i>), dan Uji Perbedaan Berat Badan Tikus (g) Sebelum dan Sesudah perlakuan	68
Tabel 5.3. Rerata dan Simpangan baku (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (<i>Shapiro-Wilk</i>), Uji Homogenitas Varians (<i>Levene</i>), dan Uji Perbedaan (<i>Kruskal-Wallis</i>) Perubahan Berat Badan (gram) Sebelum dan Sesudah Perlakuan pada Berbagai Kelompok Perlakuan	71
Tabel 5.4. Rerata dan Simpangan Baku (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (<i>Shapiro-Wilk</i>), Uji homogenitas (<i>Levene</i>) dan Uji Perbedaan Profil Lipid (mg/dL) Pada Berbagai Kelompok Perlakuan.....	73
Tabel 5.5 Hasil Analisis Rerata (Mean $\pm$ SD) , Uji Normalitas (<i>Shapiro-Wilk</i>), Uji Homogenitas (<i>Levene</i>) dan Uji Beda Lebih dari 2 kelompok (One Way ANOVA) pada kadar TNF- α pada Berbagai Kelompok Perlakuan	79
Tabel 5.6. Hasil Uji Lanjut (<i>Post Hoc</i>) Kadar TNF- α Antar Kelompok	81
Tabel.5.7. Hasil Analisis Rerata (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (<i>Shapiro-Wilk</i>), Uji Homogenitas (<i>Levene</i>) dan Uji Beda lebih dari 2 kelompok perlakuan (One Way ANOVA) kadar IL-6 (ng/L) pada Berbagai Kelompok Perlakuan.....	81
Tabel 5.8. Hasil Uji Lanjut (<i>Post Hoc</i>) Kadar IL-6 Antar Kelompok	83

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. TNF- α signaling pathway	13
Gambar 2.2. IL-6 signalling pathway	19
Gambar 2.3. Metode Ekstraksi CMCE	33
Gambar 2.4. Mekanisme Antiinflamasi Propolis melalui jalur NF-K β	38
Gambar 2.5. Struktur Kimia Vitamin E	41
Gambar 2.6. Mekanisme Antiinflamasi Vitamin E	45
Gambar 3.1 Kerangka Teori	48
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	49
Gambar 4.1. Skema Rancangan penelitian	50
Gambar 4.2. Alur penelitian	62
Gambar 5.1. Hasil Analisis Uji Lanjut (<i>Post Hoc</i>) <i>Mann Whitney U</i> Yang dilakukan Untuk mengetahui Perbedaan Berat badan pada H0 (<i>Post Hoc</i> bermakna $p < 0,05$)	67
Gambar.5.2. Diagram Batang Analisis Uji Lanjut (<i>Post Hoc</i>) <i>Mann Whitney U</i> yang dilakukan untuk mengetahui Rata-rata Berat Badan Tikus (g) pada saat H0, H7, H14 Pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan	70
Gambar 5.3. Diagram Batang Analisis Uji Lanjut (<i>Post Hoc</i>) <i>Mann Whitney U</i> yang dilakukan untuk mengetahui perubahan Berat badan Tikus pada saat sebelum dan Sesudah perlakuan pada Berbagai Kelompok Perlakuan (<i>Uji Post Hoc*</i> bermakna $p < 0,05$)	72
Gambar 5.4. Hasil Analisis Uji Lanjut (<i>Post Hoc</i>) <i>Mann Whitney U</i> yang Dilakukan untuk mengetahui perbedaan kadar kolesterol Total Antar kelompok (<i>Uji Post Hoc*</i> bermakna $p < 0,05$)	75
Gambar 5.5. Diagram Batang Kadar HDL Antar Kelompok (mg/dL)	76
Gambar 5.6. Hasil Analisis Uji Lanjut (<i>Post Hoc</i>) LSD Yang Dilakukan Untuk mengetahui Perbedaan Kadar LDL Antar kelompok (<i>Uji Post Hoc*</i> bermakna jika $0 < 0,05$)	77
Gambar 5.7. Hasil Analisis Uji Lanjut (<i>Post Hoc</i>) <i>Tamhane T2</i> Yang dilakukan Untuk mengetahui perbedaan Kadar Trigliserida Antar kelompok (<i>Uji Post Hoc*</i> bermakna apabila $p < 0.05$)	78

- Gambar 5.8. Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) LSD Yang Dilakukan Untuk mengetahui Perbedaan Kadar TNF- α Antar kelompok (ng/L) (*Post Hoc* bermakna jika $p < 0,05$) 80
- Gambar 5.9. Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) LSD Yang Dilakukan untuk mengetahui Perbedaan Kadar IL-6 Antar Kelompok Perlakuan (ng/L) (Uji *Post Hoc* bermakna $p < 0,05$) 82



**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK PROPOLIS DAN VITAMIN E
TERHADAP KADAR TNF- α DAN IL-6 PADA TIKUS WISTAR JANTAN
(*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI DIET TINGGI LEMAK**

Novitasari Anggraini¹, Joko Wahyu Wibowo², Hadi Sarosa³

ABSTRAK

Latar Belakang: Diet tinggi lemak akan menyebabkan kondisi *low-grade* inflamasi dalam tubuh yang dinamakan meta-inflamasi. Kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E diharapkan memberikan hasil antiinflamasi yang baik.

Tujuan Penelitian: Membuktikan pengaruh pemberian kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus wistar jantan yang diinduksi diet tinggi lemak.

Metode: Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true post test only with control group design*. Tiga puluh ekor tikus jantan galur Wistar (*Ratus norvegicus*) dibagi menjadi 5 kelompok menjadi 5 kelompok. K1 mendapatkan pakan standar. K2 mendapat diet tinggi lemak berupa kuning telur puyuh 2mL/hari. K3 mendapat diet tinggi lemak dan vitamin E 12 mg/200 g BB tikus/hari.. K4 diet tinggi lemak dan ekstrak propolis 36mg/200 g BB tikus/hari. K5 diet tinggi lemak dan ekstrak propolis 18mg/200 g BB tikus/hari dan vitamin E 6 mg/200 g BB tikus/hari. Penelitian dilakukan selama 14 hari, diambil sampel darah untuk uji ELISA TNF- α dan IL-6, pada hari ke-15. Perbedaan kadar TNF- α dan IL-6 diuji menggunakan One Way ANOVA.

Hasil: Hasil rerata nilai TNF- α tertinggi di K2 ($90,53 \pm 10,48$ ng/L), dan terendah di K4 ($68,21 \pm 3,97$ ng/L). Rerata nilai IL-6 tertinggi di K4 ($4,16 \pm 0,42$ ng/L) dan terendah di K2 ($2,16 \pm 0,59$ ng/L).. TNF- α pada K5 $68,46 \pm 15,39$ ng/L dan nilai IL-6 pada K5 $3,89 \pm 0,57$ ng/L. Uji One Way ANOVA TNF- α $p < 0,05$ dan IL-6 $p < 0,05$.

Kesimpulan: Kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E berpengaruh terhadap kadar TNF- α dan IL-6.

=====

Kata Kunci : Ekstrak propolis ; Vitamin E; TNF- α ; Interleukin-6; Diet Tinggi Lemak

**THE EFFECT OF COMBINATION OF PROPOLIS EXTRACT AND
VITAMIN E ON TNF- α AND IL-6 LEVELS IN MALE WISTAR RATS
(*Rattus norvegicus*) INDUCED BY A HIGH FAT DIET**

Novitasari Anggraini¹, Joko Wahyu Wibowo², Hadi Sarosa³

ABSTRACT

Background : A persistent high-fat diet can lead to a low-grade inflammatory state in the body called meta-inflammation. The combination of propolis extract and vitamin E is expected to lower TNF- α and IL-6 levels on high fat diet induced rats.

Research Objective: This study aims to determine the effect of administering propolis extract and vitamin E on TNF- α and IL-6 levels in male wistar rats induced by a high fat diet.

Methods : This study was a *true experimental* study using a *post-test only with control group design* using male Wistar rats (*Rattus norvegicus*). Thirty rats were randomly divided into five groups. K1 was the control group and received a standard diet. K2 received 2 mL of quail egg yolk/day. K3 received 2 mL of quail egg yolk/day and 12 mg of vitamin E/200 grams of rat body weight/day. K4 received 2 mL of quail yolk egg/day and 36 mg of propolis extract /200 grams of rat body weight/day. K5 received 2 mL of quail egg yolk/day and 18 mg of propolis extract/200grams of rat body weight/day and 6 mg of vitamin E/200gr rat body weight/day. The study was conducted for 14 days and blood samples were taken for ELISA TNF- α and IL-6 tests on the 15th day. Difference in TNF- α and IL-6 levels were tested using One Way ANOVA.

Results : The result showed that the average levels of TNF- α in K2 (90,53 $\pm$ 10,48 ng/L) is the highest, and in K4 (68,21 $\pm$ 3,97 ng/L) is the lowest. Average levels of IL-6 in K2(2,16 $\pm$ 0,59 ng/L) is the lowest and in K4 (4,16 $\pm$ 0,42 ng/L) is the highest. One way ANOVA showed significant differentiation $p < 0.05$.

Conclusion: Combination propolis extract and vitamin E have impact on TNF- α and IL-6 levels.

Keywords: Propolis extracts, Vitamin E, TNF- α , IL-6, High Fat Diet

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Inflamasi merupakan suatu proses tubuh terkoordinasi yang muncul akibat respon tubuh terhadap infeksi, bakteri atau zat dari luar dan ditandai dengan meningkatnya sitokin-sitokin proinflamasi.¹ Diet tinggi lemak merupakan faktor risiko penyebab inflamasi yang menciptakan kondisi kebocoran usus sehingga menciptakan kondisi disbiosis intestinal.² Diet tinggi lemak mengaktifkan jalur inflamasi *Nuklear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) melalui peningkatan *Toll Like Receptor-4* (TLR4) di membran sel yang mengakibatkan kenaikan sitokin proinflamatori seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) dan *Interleukin-6* (IL-6).³ Propolis dan Vitamin E masing-masing memiliki efek antiinflamasi.⁴ Propolis sendiri secara tunggal sudah terbukti mampu berperan dalam menurunkan TNF- α dan IL-6 melalui inhibisi jalur NF- κ B, mempengaruhi diferensiasi sel lemak, meningkatkan adiponektin dan menurunkan leptin dan memiliki efek *scavenging* yang kuat dalam menangkap radikal bebas yang dihasilkan oleh konsumsi diet tinggi lemak jangka panjang.⁵ Vitamin E sebagai vitamin larut lemak berperan sangat penting dalam upayanya mencegah peroksidasi lipid akibat radikal bebas.⁶ Kombinasi dari propolis dan vitamin E ini memungkinkan efek antiinflamasi yang lebih baik dibanding dengan pemberian tunggal.⁴

Diet tinggi lemak yang diberikan secara terus-menerus menyebabkan tubuh mengalami kondisi inflamasi tingkat rendah berkelanjutan, yang dinamakan metainflamasi, yang ditandai dengan peningkatan sitokin prinflamasi seperti TNF- α , IL-6, *C-reactive protein* (CRP).² TNF- α dan IL-6 dihasilkan oleh makrofag dan adiposit, konsentrasi keduanya meningkat seiring dengan pertambahan prosentase dan distribusi jaringan lemak di tubuh.^{3,4} TNF- α akan mulai meningkat sesaat setelah terjadi kerusakan sel, memiliki peran penting dalam metabolisme lemak, dimana TNF- α mampu menghambat lipoprotein lipase (LPL) baik pada level mRNA dan level protein, juga mampu menghambat ekspresi dari regulator diferensiasi jaringan lemak.⁸ IL-6 merupakan salah satu sitokin yang mampu mempengaruhi keseimbangan hormonal dan abnormalitas endokrin.⁹ Kadar IL-6 akan sangat meningkat pada kondisi resistensi insulin dan intoleransi glukosa.¹⁰ Kondisi metainflamasi ini mengakibatkan berbagai masalah kesehatan seperti diabetes mellitus type II, *Non-alkoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD), penyakit kardiovaskuler, stroke, dan kanker apabila tidak diatasi.¹¹

Penelitian mengenai propolis dan vitamin E sudah berlangsung selama beberapa dekade.¹² Propolis dan Vitamin E merupakan dua agen antiinflamasi dan antioksidan yang sudah secara luas digunakan, memiliki efek antioksidan, antiinflamatori, anti atherogenik, dan efek imunomodulator, serta memiliki efek protektif terhadap membrane sel.^{5,6} Data menunjukkan, propolis dengan dosis 18mg/kg Bb tikus, 36 mg/kg BB tikus, and 72mg/kgBB tikus selama 14 hari mampu berfungsi sebagai antiinflamasi dengan menurunkan

kadar IL-6 pada tikus, melalui kandungan aktifnya CAPE (*Caffeic Acid Phenetyl Ester*).¹³ Propolis terbukti mengaktifkan sistem imun, menurunkan sitokin proinflamasi, menyembuhkan luka dan melindungi tubuh dari radikal bebas.¹² Vitamin E mempunyai rentang dosis yang perlu diperhatikan karena apabila diberikan dalam dosis tinggi akan berubah menjadi prooksidan.¹⁴ Dosis rekomendasi harian menurut kemenkes adalah 15 IU/hari, namun penggunaan maksimal adalah 300-400 IU/hari dengan memperhatikan efek toksisitasnya.¹⁴ Kombinasi propolis dan vitamin E dengan dosis yang lebih rendah diharapkan mampu menurunkan toksisitas dari vitamin E tersebut. Penelitian mengenai efek vitamin E sebagai antiinflamasi juga sudah banyak dilakukan.⁶ Vitamin E, dalam hal ini α -tocopherol dengan dosis 6 mg/kg BB selama 4 minggu ternyata mampu berperan sebagai menurunkan kadar sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan IL-6 pada tikus yang diinduksi steptozotzin dan nikotinamide.¹⁵ Vitamin E dalam jumlah yang tinggi akan berperan sebagai prooksidan, untuk itu penggunaan dosis vitamin E harus hati hati.¹⁴ Penelitian mengenai efek antiinflamasi dari kombinasi propolis dan vitamin E pada tikus yang diinduksi Alumunium Chlorida terhadap profil lipid dan enzim hepar, menunjukkan propolis dengan dosis 50 mg /kg BB dan vitamin E 150 mg /kg BB berpengaruh signifikan terhadap penurunan profil lipid dan enzim hepar.¹⁶ Hal ini menunjukkan adanya sinergitas pada penggunaan propolis maupun vitamin E.⁴

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis mengenai efek kombinasi propolis dan vitamin E terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak. Hasil yang didapatkan dari penelitian ini

diharapkan dapat menjadi bukti kuat dari efek antiinflamasi propolis dan vitamin E. Diharapkan, dari penelitian ini, propolis dan vitamin E dapat digunakan bersamaan dalam diet harian, terutama dalam hal ini dalam mencegah efek yang timbul akibat diet tinggi lemak. Baik propolis maupun vitamin E sama sama mempunyai efek anti inflamasi, mempunyai pengaruh terhadap metabolisme lemak, mudah didapatkan dan harganya terjangkau.¹⁶ Kombinasi dari propolis dan vitamin E dengan dosis yang lebih rendah diharapkan juga dapat mengurangi toksisitas dari vitamin E. ¹⁴

1.2 Perumusan Masalah

“Apakah terdapat pengaruh kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E terhadap kadar *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) dan *Interleukin-6 (IL-6)* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang diinduksi diet tinggi lemak?”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan pengaruh kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E terhadap kadar *Tumor Necrosis Factor (TNF- α)* dan *Interleukin-6 (IL-6)* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang diinduksi diet tinggi lemak.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1. Untuk membuktikan efek diet tinggi lemak terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diberikan diet tinggi lemak.

1.3.2.2. Untuk membuktikan pengaruh ekstrak propolis dengan dosis 36 mg/kgBB/hari terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diinduksi diet tinggi lemak.

1.3.2.3. Untuk membuktikan pengaruh vitamin E 12 mg/kgBB/hari terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diinduksi diet tinggi lemak.

1.3.2.4. Untuk membuktikan pengaruh kombinasi ekstrak propolis 18 mg/kgBB/hari dan vitamin E 6mg/kgBB/hari terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diinduksi diet tinggi lemak.

1.4 Originalitas Penelitian

Originalitas Penelitian menyajikan perbedaan dan persamaan bidang kajian yang diteliti antara peneliti dengan peneliti-peneliti sebelumnya. Untuk menghindari pengulangan kajian terhadap hal yang sama maka ditampilkan dalam tabel 1.1

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul Penelitian	Metode Penelitian	Hasil Penelitian
Trisnadi, et al. 2021	Pengaruh Diet Tinggi Kolesterol terhadap Kadar TNF- α	Penelitian Experimental dengan rancangan posttest only control group design	Terdapat peningkatan kadar TNF- α pada tikus yang diberi diet tinggi kolesterol berupa telur puyuh 3ml selama 7 hari.

Firdaus Chalid, et al. 2020	<i>CMCE Propolis Extract Improves Caspase-3 Expressions of the Hepatocytes and IL-6 levels in Rats Exposed with CCL4</i>	<i>True experimental design</i> dengan pretest dan posttest control group design.	Pemberian Propoelix™ baik dengan dosis 3,6 mg/200g, dosis 7,2 mg/200g, dan dosis 14,4 mg/200g secara oral selama 14 hari berpengaruh secara signifikan dalam menurunkan kadar caspase-3 dan IL-6 pada tikus yang diinduksi CCL4.
Hijriyani,et al. 2024	Efektivitas ekstrak daun salam (<i>Syzgium polyanthum</i>) dalam Mencegah Kenaikan Kadar Kolesterol LDL Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Diinduksi Kuning Telur Puyuh	Penelitian Eksperimental dengan rancangan posttest only control group design	Pemberian kuning telur puyuh dengan dosis 2 ml/200gr BB tikus /hari selama 14 hari dapat meningkatkan kadar LDL pada tikus.
Sajjad, et al. 2019	<i>Synergistic Propolis and Vitamin E Against Sub Acute Toxicity of AlCl3 in Albino Mice : In Vivo Study</i>	Penelitian Eksperimental dengan rancangan posttest only control group design	Pemberian propolis 50mg/kg BW dan vitamin E 150mg/kg BW selama 21 hari berpengaruh signifikan dalam penurunan level trigliserid, kolesterol total, LDL-C dan peningkatan level HDL-C serta penurunan level serum ALT, AST dan ALP pada tikus yang diinduksi AlCl3.

Hashem, et al. 2013	<i>Effect of α-vitamin E or propolis supplementation on semen quality, oxidative status and hematobiochemical changes of rabbit bucks during hot season</i>	Penelitian Eksperimental dengan rancangan posttest only control group design	Pemberian vitamin E (150 mg/kgBB) dan propolis (150mg/kgBB diet) mampu menaikkan kapasitas antioksidan, kualitas semen dan penurunan profuil lipid dan glukosa pada kelinci putih selama musim panas di New Zealand.
Ratnawati, et al. 2024	<i>Effect ofTender Coconut Water Powder Enriched with Vitamin E in Preventing Oxidative Stress of Diabetes Male Wistar Rats</i>	Penelitian Eksperimental dengan rancangan posttest only control group design	Pemberian vitamin E dengan dosis 6 mg/kgBB selama 4 minggu mampu menurunkan TNF- α dan IL-6 pada tikus wistar jantan yang diinduksi Streptozotozin dan Nicotinamide.
Amany,et al. 2023	<i>Effect of Vitamin E or propolis addition on Alleviation of heat Stress Impact on growing rabbits</i>	Penelitian Eksperimental dengan rancangan posttest only control group design	Pemberian Vitamin E dosis 100mg/kg BB dan 150 mg/kg BB serta propolis 100 mg/kgBB dan 150mg/kg BB berpengaruh signifikan terhadap kadar MDA dan profil lipid kelici yang diinduksi panas ekstrem.

Penelitian yang dilakukan ini merupakan lanjutan dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya. Dari beberapa penelitian diatas, didapatkan bahwa konsumsi diet tinggi lemak akan menyebabkan kondisi inflamasi yang ditandai dengan naiknya sitokin-sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan IL-6. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa baik propolis maupun vitamin E, dalam hal ini α -tocopherol memiliki efek antiinflamasi.

Penelitian yang akan dilakukan memiliki perbedaan dengan penelitian yang terdahulu. Pada penelitian ini, akan membandingkan efek antiinflamasi dari kombinasi propolis dan vitamin E yang disebabkan oleh diet tinggi lemak. Sitokin proinflamasi yang dipilih yaitu TNF- α dan IL-6. Keduanya dipilih karena dalam diet tinggi lemak, adiposit akan menghasilkan banyak sitokin proinflamasi terutama TNF- α dan IL-6. TNF- α dan IL-6 merupakan penanda terjadinya inflamasi akut.⁴ TNF- α akan muncul pada kondisi lebih dulu apabila dibandingkan dengan IL-6, dimana TNF- α akan meningkat saat mulai terjadi kerusakan sel dan IL-6 akan meningkat saat sudah terjadi kondisi resistensi insulin dan intoleransi glukosa.⁴

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1.. Manfaat Teoritis

1.5.1.1. Memberikan kontribusi ilmiah dalam pengembangan pengetahuan mengenai pengaruh ekstrak propolis dan Vitamin E sebagai antiinflamasi akibat diet tinggi lemak.

1.5.1.2. Memperkaya literatur dan menjadi dasar bagi penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme kerja propolis dan Vitamin E

1.5.2. Manfaat Praktis

1.5.2.1. Memberikan informasi yang dapat digunakan sebagai dasar pertimbangan dalam pengembangan produk nutrasetikal atau suplemen kesehatan yang mengandung ekstrak propolis dan Vitamin

E untuk pencegahan kondisi yang terkait dengan diet tinggi lemak dan inflamasi.

- 1.5.2.2. Menyediakan data pendukung bagi tenaga kesehatan dan masyarakat umum mengenai potensi penggunaan ekstrak propolis dan Vitamin E sebagai agen pelindung inflamasi sistemik yang diakibatkan oleh pola makan tidak sehat.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α)

2.1.1. Sejarah, Definisi dan Struktur

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) merupakan sitokin proinflamatori yang diproduksi oleh makrofag atau monosit selama proses inflamasi akut, bertanggung jawab terhadap signaling sesama sel dan menyebabkan terjadinya nekrosis dan apoptosis sel.¹⁷ Protein ini ditemukan pada abad ke-18 bersamaan dengan pasien kanker, kemudian dikembangkan penelitiannya pada abad selanjutnya. Pada tahun 1975, Carswell berhasil menemukan bahwa suatu protein dapat menekrosiskan sel tumor secara cepat, yang kemudian protein tersebut diberi nama *tumor necrosis factor*.¹⁷

TNF disebut TNF- α atas dasar historis untuk membedakannya dari TNF- β atau limfotoksin.¹⁸ Sumber utama TNF- α ialah fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen sel NK, dan sel mast.¹⁸ TNF- α mempunyai sifat pleiotropic, dimana sifat atau karakteristiknya berubah sesuai dengan kondisi.¹⁸

Struktur TNF- α ditentukan dari protein yang ditemukan sebagai trimers bentuk buah pir. Reseptor TNF yaitu TNFR-1 dan TNFR-2 memiliki berat molekul 55 kDa dan 75 kDa. TNF trimer berikatan dengan reseptor molekul, satu pada masing-masing trimernya. Gen TNF- α adalah

gen single, dari lengan pendek kromosom 6 dan kromosom 17. TNF- α selalu 3' dari TNF- β , sepanjang 3kB. Gen TNF- α terdiri dari 4 exons dan 3 introns. Regio 5' dari gen TNF- α terdiri dari beberapa *sequence* homolog dan MHC kelas II seperti "Y BOX". Sekuens ini berperan dalam aktivasi transkripsi. mRNA mentranslasi 157 asam amino pada manusia dan 156 pada sel murine.¹⁷ . TNF- α reseptor hadir dalam 2 bentuk, *membrane bound* dan *soluble bound*.¹³

TNF- α disekresi oleh makrofag dan limfosit sebagai respon adanya luka, infeksi atau kondisi malignansi, namun sel lain juga mampu mensekresi TNF- α , contohnya adiposit.⁷

2.1.2. Peranan dan Fungsi TNF- α

TNF- α terutama memiliki fungsi dalam proses inflamasi. Fungsi dari TNF- α yaitu dapat meningkatkan peran pro trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, berperan dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan cara merangsang faktor pertumbuhan dan sitokin lain. TNF- α juga berfungsi sebagai regulator dari hematopoetik serta komitogen untuk sel T dan sel B serta aktivitas sel neutrofil dan makrofag. Fungsi lain dari TNF- α dalam respon imun sebagai marker inflamasi dan pertahanan terhadap bakteri, virus, jamur, dan invasi parasite.¹⁸

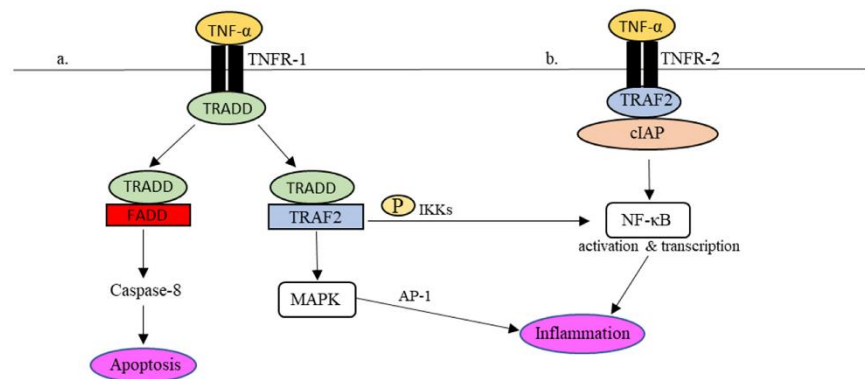
Pelepasan TNF- α diawali dengan aktivitas makrofag. Makrofag yang terinfeksi menjadi aktif dan melepaskan sitokin di antaranya TNF- α ,

interleukin 1 (IL-1), IL-6 dan *platelet activating factor* (PAF). Salah satu contoh penelitian in vitro adalah penelitian oleh Chen tahun 2000 pada makrofag/monosit yang diinfeksi dan diukur berbagai sitokin termasuk TNF- α . Pada suatu penelitian diketahui didapatkan produksi TNF- α mulai meningkat pada awal infeksi (≤ 24 jam), mencapai kadar puncak pada hari kedua post infeksi dan kemudian menurun setelah inflamasi mereda.¹⁹

Kadar TNF- α pada obesitas meningkat karena adiposit mensekresi TNF- α . TNF- α memiliki peran dalam metabolisme lemak. TNF- α mampu menghambat *lipoprotein lipase* pada level protein dan mRNA.⁷

2.1.3. Mekanisme Molekuler TNF- α

TNF- α *signaling pathway* dimediasi oleh dua reseptor, yaitu reseptor TNFR-1 dan TNFR-2. Pada aktivasi TNFR-1, maka TRADD ditarik ke TNFR-1 untuk kemudian terjadi fosforilasi, kemudian masuk ke dalam nucleus dengan agen transkripsi NF- κ B mengaktifkan MAPK untuk mengadakan inflamasi. Pada aktivasi TNFR-2, terjadi ikatan bersama dengan TRAF2-cIAP complex yang akan mengaktifkan jalur NF- κ B dan menimbulkan inflamasi. Proses lain yang bisa terjadi, pada aktivasi dengan TNFR-1, akan terjadi ikatan dengan TRADD, akan tetapi kompleks tersebut berikatan dengan *Fas-associated protein with death domain* (FADD), yang mengaktifkan caspase 8 dan menyebabkan terjadinya apoptosis sel seperti pada gambar 2.1.²⁰



Gambar 2.1. TNF- α Signalling Pathway²⁰

2.1.4. Faktor-faktor yang mempengaruhi kadar TNF- α

Kadar TNF- α dalam darah berubah-ubah tergantung dari kondisi tubuh. Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi kadar TNF- α tersebut adalah sebagai berikut:

a. Usia

Kualitas sel imun akan menurun seiring dengan meningkatnya usia. Kadar sitokin proinflamasi, dalam hal ini TNF- α akan meningkat seiring dengan usia, hal ini dinamakan fenomena *immunosence*. Pada fenomena tersebut, kemampuan sel imun menurun, sitokin inflamatori meningkat dan sitokin antiinflamatori menurun.²¹

b. Kualitas sel imun akan menurun seiring dengan meningkatnya usia.

Kadar sitokin proinflamasi, dalam hal ini TNF- α akan meningkat seiring dengan usia, hal ini dinamakan fenomena *immunosence*. Pada fenomena tersebut, kemampuan sel imun menurun, sitokin inflamatori meningkat dan sitokin antiinflamatori menurun.²¹

c. Infeksi akut maupun kronis

Kondisi infeksi, baik yang terjadi akibat bakteri atau virus pathogen dari luar, akan menyebabkan inflamasi sehingga mengakibatkan peningkatan kadar $\text{TNF-}\alpha$.¹⁸

d. Trauma.

Setiap trauma yang terjadi akan menyebabkan terjadinya perlukaan pada membrane sel yang akan menyebabkan inflamasi dan meningkatkan kadar dari $\text{TNF-}\alpha$.²²

e. Penyakit metabolik.

Penyakit metabolik biasanya didasarkan adanya inflamasi dari dalam tubuh. Akibatnya peningkatan kadar $\text{TNF-}\alpha$ dan penyakit metabolik berkaitan erat dan saling terkait dalam menyebabkan peningkatan kadar $\text{TNF-}\alpha$ dan peningkatan derajat keparahan penyakit metabolik tersebut. Peningkatan $\text{TNF-}\alpha$ juga akan terjadi pada inflamasi yang diakibatkan oleh diet tinggi lemak, dimana pemberian lemak yang terus menerus akan menyebabkan kondisi metainflamasi di dalam tubuh.²³

f. Gangguan autoimun.

Kondisi autoimun seperti psoriasis, rheumatoid arthritis, asthma, *fibroid disease*, *inflammatory bowel disease* (IBD) merupakan contoh penyakit autoimun yang berpotensi meningkatkan kondisi peningkatan $\text{TNF-}\alpha$.²²

g. Kebiasaan merokok

Paparan dari asap rokok, baik untuk perokok aktif maupun pasif akan meningkatkan resiko peningkatan kadar TNF- α .²⁴

h. BMI yang abnormal

Semakin tinggi BMI, maka kemungkinan terjadi inflamasi derajat rendah di dalam tubuh makin tinggi, hal ini akan makin meningkatkan kadar dari TNF- α .²⁵⁸

i. Genetik

Polimorfisme genetik atau kelainan genetik tertentu akan menyebabkan sensitive terhadap kenaikan dari TNF- α .²⁵

j. Kanker

TNF- α memiliki peran ganda terkait dengan kanker. TNF- α mampu memicu pertumbuhan tumor ataupun sebaliknya bisa menginduksi apoptosis dari sel kanker.²⁶

2.1.5. Cara Pengukuran Pemeriksaan TNF- α

Ada beberapa cara untuk mengukur TNF- α . Metode paling umum untuk mengukur TNF- α adalah dengan *enzyme linked immune sorbent assay* (ELISA), *radio isotop assay* (RIA) dan bioassays. Pengukuran TNF- α dengan mengukur bioaktivitasnya menggunakan bioassay, dan mengukur imunoreaktivitasnya menggunakan immunoassay. Bioassay unggul dalam sensitivitas namun jarang dipakai karena kapasitas rendah, spesifisitas rendah dan butuh biaya lebih tinggi. Metode immunoassay dipengaruhi kompleks binding-protein antara TNF- α dan plasma.

Sensitivitas TNF- α dengan ELISA secara umum lebih baik namun membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama. Variasi nilai ELISA TNF- α sangat luas bergantung pada perusahaan.⁷² Nilai TNF- α normal pada umumnya berkisar antara -1 sampai dengan 10 pg/L.²⁷

2.2. Interleukin 6 (IL-6)

2.2.1. Sejarah, Definisi dan Struktur

Interleukin-6 (IL-6) pertama kali ditemukan pada tahun 1973 sebagai protein yang disekresi oleh sel T yang membantu differensiasi sel-B menjadi sel yang memproduksi antibodi, kemudian dinamakan sebagai *B-cell stimulating factor* (BSF-2). Satu dekade kemudian pada tahun 1988, dalam suatu konferensi, nama BSF-2 digantikan menjadi Interleukin-6.²⁸

Interleukin-6 (IL-6) merupakan suatu polipeptida kecil, berukuran 19-28 kDa, disusun dari 4 α -helices. Biasanya hadir dalam bentuk monomer, terdiri dari 184 asam amino, sisi glikosilasi dan dua ikatan disulfide. Gen IL-6 terletak di kromosom 7 lengan p (7p15.3), meliputi 5 exon dan 4 intron. IL-6 diproduksi oleh sel T, sel B, makrofag, termasuk mikroglia, fibroblast, keratinosit, sel mesangial, sel endotel vaskuler, sel mast dan sel dendritik. Ekspresi IL-6 diaktifasi oleh interleukin 1 β (IL1 β) dan tumor nekrosis factor (TNF α) meskipun beberapa *pathway* lain dapat mensekresi IL-6 seperti prostaglandin, adipokin, respon stress dan *Toll-like receptor activation* (TLRs).²⁸

2.2.2. Peranan dan Fungsi Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 (IL-6) merupakan biomarker inflamasi sistemik, suatu sitokin *pleiotropik*, yang mana bisa berperan ganda baik sebagai agen antiinflamasi maupun agen proinflamasi.²⁹ Apabila jalur persinyalan IL-6 melewati jalur klasik (*classic signaling*), maka akan menyebabkan IL-6 menjadi sitokin proinflamasi. Apabila jalur *trans signaling* yang dilewati, maka IL-6 akan berubah menjadi sitokin antiinflamasi.²⁹

Interleukin 6 (IL-6) bisa muncul pada inflamasi akut maupun kronis, pada innate atau adaptive imunitas.⁹ Interleukin-6 (IL-6) diproduksi sebagai respon infeksi sekunder, kemudian masuk ke dalam aliran darah dan membuat hati memproduksi reaktan fase akut *C-reaktif protein* (CRP), serum amyloid A (SAA), dan α -1 anti chimotripsin, fibrinogen dan haptoglobin. IL-6 memblok transport besi dalam pembuluh darah, oleh karenanya peradangan dapat menyebabkan anemia. IL-6 juga mempengaruhi transport zinc di hepar, akibatnya pada peradangan bisa terjadi kekurangan zinc. IL-6 juga berpengaruh terhadap hematopoietic, ketika IL-6 mencapai *bone marrow* akan mengaktifkan megakariosit untuk meningkatkan jumlah platelet, yang menyebabkan trombositosis selama peradangan. Bersama-sama dengan TNF- α , IL-6 bersifat sebagai agen pirogenik yaitu meningkatkan suhu tubuh selama proses peradangan.²⁸

Interleukin-6 (IL-6) merupakan sitokin proinflamatori yang erat kaitannya dengan metabolisme lipid.⁹ Aktivasi IL-6 menyebabkan terjadinya disfungsi endotel, memicu berkumpulnya platelet dalam endotel

darah menyebabkan aterosklerosis. Serum IL-6 yang tinggi dikaitkan dengan penyakit-penyakit kardiovaskuler dan iskemia.⁹

Obesitas merupakan suatu kondisi yang kronis, dimana sel adiposit bertambah banyak pada obesitas. IL-6 sendiri akan muncul pada *late onset* obesitas.²⁹ IL-6 akan mempengaruhi produksi dari asam lemak bebas. Konsentrasi IL-6 akan meningkat pada kondisi abnormalitas lipid dan resistensi insulin.¹⁴ Baik IL-6 maupun TNF- α , keduanya disekresi oleh adiposit, dan persentase lemak dalam tubuh akan mempengaruhi konsentrasi dari keduanya.⁷ Lemak visceral mensekresi IL-6 lebih tinggi daripada lemak subkutan. Pada wanita, konsentrasi adiposit yang tinggi lebih mempengaruhi TNF- α dan IL-6 lebih tinggi dibandingkan laki-laki.⁷ IL-6 berpengaruh pada hormonal imbalance dan abnormalitas endokrin.⁴

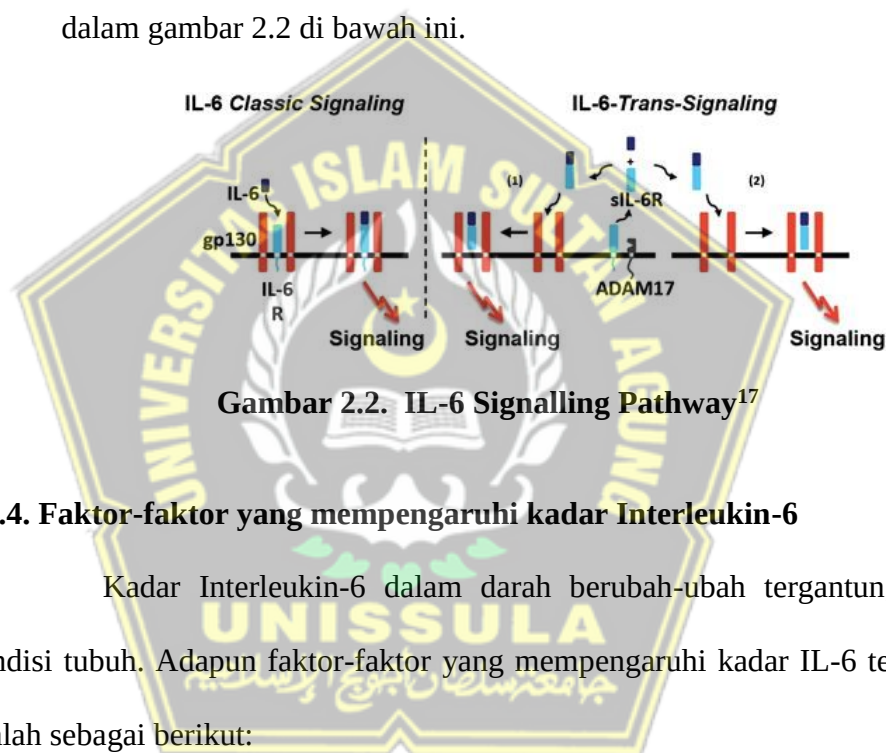
2.2.3. Mekanisme Molekuler Interleukin-6

Ada 3 jalur persinyalan dari IL-6.²⁹

- a. *Classical pathway*: Pada persinyalan ini, IL-6 berikatan dengan membrane IL-6 reseptor (mIL-6R) kemudian berikatan dengan GP130 dan mengakibatkan fosforilasi membrane.²⁹ Komplek ikatan IL6 dan mIL-6R akan menghasilkan fosforilasi di JAK, STAT, PRK dan PI3K yang berhubungan dengan area sitoplasmik GP130.²⁸
- b. *Trans-signalling pathway*: Pada persinyalan ini IL-6 berikatan dengan soluble IL-6 reseptor (sIL-6R) yang dihasilkan oleh splicing mRNA alternatif setelah pembelahan dari ADAM17 (metalloprotease)²⁸. IL-6 berikatan dengan sIL-6R kemudian berikatan lagi dengan GP130,

kemudian sel tersebut mengaktifkan sel yang tidak mengekspresikan IL-6 pada membrane.²⁹

- c. *Trans presentation pathway*: Pada persinyalan ini spesifik melibatkan sel dendritik yang mempresentasikan kompleks IL-6 dan mIL-6 kepada sel T yang mengekspresikan GP130 yang kemudian akan berubah menjadi Th17 proinflamasi.²⁸ Lebih jelasnya, persinyalan IL-6 tertuang dalam gambar 2.2 di bawah ini.



Gambar 2.2. IL-6 Signalling Pathway¹⁷

2.2.4. Faktor-faktor yang mempengaruhi kadar Interleukin-6

Kadar Interleukin-6 dalam darah berubah-ubah tergantung dari kondisi tubuh. Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi kadar IL-6 tersebut adalah sebagai berikut:

- a. Usia

Fenomena *immunosence* adalah fenomena dimana terjadi penurunan fungsi sel imun pada tubuh, peningkatan sitokin pro inflamasi dan penurunan sitokin anti inflamasi, mengakibatkan kadar IL-6 juga terpengaruh. Kadar IL-6 cenderung meningkat seiring dengan pertambahan usia.²¹

b. Peradangan dan Infeksi

Adanya peradangan dan infeksi tentu akan menaikkan kadar dari sitokin IL-6.²⁹

c. Trauma

Jejas trauma yang menyebabkan kerusakan membran sel merupakan salah satu sebab terjadinya inflamasi, yang akan menaikkan kadar dari sitokin proinflamasi diantaranya kadar IL-6.²⁹

d. Penyakit Metabolik

Interleukin-6 tidak hanya berperan dalam respon inflamasi dan infeksi, tapi berperan dalam regulasi, regenerative dan proses neural dan hormonal. Peran IL-6 sangat nyata dalam penyakit metabolik. Kadar IL-6 sangat meningkat pada kondisi dislipidemia.⁹ Signalling sgp 130Fc pada hepar berhubungan erat dengan efek IL-6 pada sensitivitas insulin dan toleransi glukosa.²⁹

e. Gangguan Autoimun

Interleukin-6 adalah sitokin penting yang berperan dalam peradangan dan respon imun. Produksi IL-6 yang berlebihan menyebabkan peradangan kronis. IL-6 dapat menyebabkan penyakit autoimun seperti rheumatoid arthritis, *systemic lupus erimatosus* (SLE), *sindrom Castleman*, penyakit inflamasi usus, psoriasis dll.²⁹

f. Polimorfisme genetik.

Polimorfisme genetik -572G>C cenderung meningkatkan kadar dari interleukin-6.

g. Stimulasi dari sitokin lain, misalnya TNF- α .

Stimulasi molekuler sel imun dapat mempengaruhi IL-6 apabila menerima sinyal spesifik dari lipopolisakarida dan stress metabolik.

2.2.5. Cara Pengukuran Pemeriksaan Interleukin-6

Metode pengukuran IL-6 ada beberapa cara. Pengukuran Interleukin-6 (IL-6) yang paling sering digunakan menggunakan *enzyme linked sorbent assay* (ELISA) dengan nilai normal dibawah 6 pg /mL.¹⁹ Pengukuran dengan ELISA menggunakan prinsip reaksi antigen dan antibody dari IL-6. Zat paling sensitif untuk diukur adalah serum atau cairan jaringan.¹⁹

Pengukuran IL-6 dapat menggunakan metode berbasis manik (*bead based assay*), yaitu dengan teknologi SIMOA (*Single Molecule Array*). Pengukuran ini akan menghasilkan sensitivitas yang tinggi dalam pengukuran IL-6. Pengukuran ini menangkap manik-manik kecil berlabel IL-6 dalam sampel. Manik-manik tersebut kemudian diukur menggunakan flowcitometer untuk mengukur berapa kadar IL-6 yang terikat.³⁰

Pengukuran menggunakan metode IFA (*Lateral Flow Immunoassay*) merupakan pengukuran IL-6 menggunakan kertas.

Metode ini menjanjikan deteksi cepat dan mudah, menggunakan fluoresensi untuk hasil kualitatif. namun angka kekeliruannya bisa tinggi. Penggunaan metode ini seperti pada trauma atau luka.³¹

Pengukuran metode otomatis (*Immunoassay Automatic Analyzers*) menjanjikan hasil cepat dan efisien.³⁰

2.3 Diet Tinggi Lemak

2.3.1. Definisi dan Bahaya Diet Tinggi Lemak

Diet tinggi lemak atau HFD (*High Fat Diet*) merupakan suatu diet dimana 35% atau lebih kalorinya didapatkan dari lemak.⁸ Pemberian diet tinggi lemak dan tinggi sucrose yang sering disebut sebagai *Western-style diet* ini banyak diikuti di seluruh dunia pada beberapa dekade ini.⁸ Komposisi makanan yang demikian menimbulkan banyak masalah bagi tubuh, dikarenakan konsumsi lemak yang tinggi, terutama lemak jenuh akan menimbulkan banyak masalah kesehatan di dalam tubuh.⁸ Pemberian diet tinggi lemak secara terus menerus juga akan menyebabkan resistensi insulin.⁸ Lemak dianggap sebagai penyebab obesitas pandemi di seluruh dunia.⁸

Lipid plasma diangkut ke dalam jaringan dalam bentuk lipoprotein.³² Komponen lipoprotein adalah kolesterol ester, kolesterol bebas, trigliserida, fosfolipid dan protein yang dinamakan apolipoprotein.³² Terdapat 6 lipoprotein utama dalam plasma, yaitu kilomikron, *Very low-density protein* (VLDL), *Intermediate –density*

lipoprotein (IDL), *Low Density Lipoprotein* (LDL) , *High Density Lipoprotein* (HDL) dan Lp(a) ³². Lipid plasma lebih banyak diangkut dalam bentuk lipoprotein mengandung ApoB (partikel ApoB) seperti kilomikron, VLDL, IDL, LDL dan Lp(a). Diantara partikel apo B, partikel VLDL mengangkut sebagian besar TG plasma dan partikel LDL mengangkut sebagian besar kolesterol plasma.³²

Diet tinggi lemak berbahaya, karena merupakan faktor risiko sindroma metabolik, terutama dalam hal ini terjadinya penyakit kardiovaskuler ³³. Diet tinggi lemak pada akhirnya akan menciptakan keadaan inflamasi dan stress oksidatif pada tubuh.³³ Mekanisme terjadinya stress oksidatif ini muncul melalui beberapa jalur, bisa melalui jalur oksidasi dari asam lemak, disfungsi mitokondria ataupun aktivitas oksidase NADPH. ¹¹

Diet tinggi lemak akan meningkatkan aktivasi NADPH oksidase, stress oksidatif dan peoksidasi lipid yang ketiganya akan menyebabkan deregulasi dari produksi faktor transkripsi NF-K β , adipocitokines (fat-derived hormones), meliputi adiponectin, *plasminogen activator inhibitor-1*, IL-6, dan *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), dan sitokin-sitokin pro inflamatori lainnya.¹¹

2.3.2. Faktor-faktor yang mempengaruhi terjadinya komplikasi akibat diet tinggi lemak

Panduan dari Perhimpunan Dokter Kardiovaskuler Indonesia menyatakan, bahwa terjadinya atherogenesis dan resiko kardiovaskuler

dipengaruhi oleh usia, jenis kelamin, berat badan dan faktor predisposisi yang dimiliki.³² Usia diatas 40 tahun masuk dalam risiko kategori menengah, sedangkan usia >75 tahun masuk ke dalam kategori resiko tinggi. Individu laki-laki memiliki insidensi yang lebih tinggi untuk terjadinya resiko kardiovaskuler dibandingkan dengan perempuan.³² Berat badan juga menjadi faktor penting resiko kardiovaskuler. Individu dengan IMT > 25 memiliki resiko lebih tinggi untuk terjadinya penyakit kardiovaskuler dibandingkan dengan individu dengan IMT normal.³²

Penyakit – penyakit penyerta seperti gagal ginjal, diabetes mellitus dan hiperkolesterolemia merupakan faktor risiko tinggi terjadinya penyakit kardiovaskuler.³²

Secara epigenetik, diet tinggi lemak memicu terjadinya perubahan epigenetik yang membuat munculnya banyak penyakit metabolik. Diet tinggi lemak akan membuat perubahan metilasi DNA pada jaringan lemak putih, yang nantinya akan mempengaruhi penguasaan dan regulasi energi, signaling, sekresi hormon dan inflamasi. Perubahan epigenetik dipengaruhi oleh paparan palmitate, vitamin B12, B6, kolin, metionin dan folat. Diet tinggi lemak juga mempengaruhi ekspresi dan regulasi epigenetik gen. Diet tinggi lemak juga mengakibatkan modifikasi histon, selubung pembungkus DNA, mengakibatkan kromatin lebih padat dan menambah resiko atherosklerosis.³³

2.3.3. Diet Tinggi Lemak dan Inflamasi

Diet tinggi lemak akan meningkatkan jumlah kilomikron di dalam usus. Kilomikron tersebut akan berubah menjadi asam lemak bebas yang diambil oleh liver. Asam lemak bebas dari hepar akan masuk ke dalam proses β -oksidasi di mitokondria dan terjadi esterifikasi membentuk trigliserid (TG). Kumpulan trigliserid di hati ini akan membentuk VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), yang nantinya akan dikonversi menjadi LDL (*Low density Lipoprotein*). Terlalu banyak LDL akan membentuk Foam cells ketika berjumpa dengan makrofag. Hal ini yang akan membahayakan endotel dan membentuk plak.³²

Massa kolesterol per partikel ApoB bervariasi sehingga ukuran partikel ApoB juga bervariasi. Partikel ApoB yang berdiameter <70 nm dapat menembus penghalang endotelium dan melekat di dalam dinding pembuluh arteri kemudian berinteraksi dengan struktur ekstraselular seperti proteoglikan dan menumpuk di matrik ekstraselular. Partikel ApoB berdiameter kecil, yang miskin kolesterol, lebih mungkin terperangkap dalam dinding arteri dibandingkan partikel besar yang kaya kolesterol karena berikatan lebih kuat dengan proteoglikan di intima. Paparan terus menerus dengan partikel ApoB menyebabkan penumpukan massa kolesterol di dinding pembuluh darah dan terbentuknya atheroma dan selanjutnya terjadi progresi plak aterosklerotik. Beban plak aterosklerotik ditentukan oleh jumlah partikel ApoB serta lamanya paparan terhadap lipoprotein tersebut.

Peningkatan beban dan perubahan komposisi plak aterosklerotik dapat mencapai titik kritis berupa ruptur plak yang diikuti oleh terbentuknya trombus yang secara akut membuat obstruksi aliran koroner. Keadaan klinis yang diakibatkan oleh ruptur plak adalah sindrom koroner akut yang berhubungan dengan angka kematian tinggi.³²

Pemberian diet tinggi lemak secara terus menerus terbukti meningkatkan inflamasi sistemik. Pada aterosklerosis tahap awal, sistem imun innate dan adaptive seperti monosit, makrofag, sel T dan sel B memegang peranan penting. Mereka berpartisipasi dalam proses terbentuknya plak aterosklerosis. Kemudian, mediator-mediator inflamasi yang lain akan berperan dalam progresi terbentuknya plak aterosklerosis, menyebabkan disfungsi endothelial, infiltrasi monosit ke dalam endothelial, terjadi molekul adhesi dan gangguan pada bioavailabilitas Nitric oxide (NO).³⁴

Sel lemak atau adiposit mensekresikan *Toll Like Receptor* (TLRs) yang mana kadarnya meningkat dalam keadaan obesitas dan inflamasi. *TLRs mediated signaling pathway* juga memodulasi metabolisme glukosa dan lipid. Low grade inflammation pada obesitas dikaitkan dengan aktivasi dari TLRs.³⁵ TLR akan mengeluarkan sitokin-sitokin proinflamasi melalui mediasi dari NF- κ B dan aktivasi myeloid differentiation 88 (MyD88).³⁵

Disfungsi endothel akan menyebabkan infiltrasi monosit ke dalam endothelial. Saat monosit berdeferensiasi menjadi makrofag dan

bertemu dengan oxidized LDL maka akan terbentuk foam cells. *Foam cells* bersama dengan VSMCs (*Vascular Smooth Muscle Cells*) akan mengeluarkan mediator proinflammatory seperti *Matrix Metalloproteinase* (MMPs), $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 dan *C-Reactive protein* (CRP) sebagai respon inflamasi.³⁴

Peningkatan asam lemak bebas juga akan meningkatkan *Diacyl – Glyceride* (DAG).³⁶ DAG akan meningkatkan translokasi dari *Protein Kinase C* (PKC) di dalam hati ke membrane plasma serta menghambat aktifitas tirosin kinase dan memfosforilasisnya.³⁶ Akumulasi DAG intramyocellular akan mengganggu aktifitas insulin dan penyerapan glukosa otot. Keadaan ini akan menyebabkan translokasi GLUT4 dan menginduksi terjadinya resistensi insulin.³⁶ Kondisi peningkatan asam lemak bebas juga akan meningkatkan gluconeogenesis pada hepar, yang nantinya akan meningkatkan kadar gula darah sehingga kondisi resistensi insulin juga terjadi.³⁶ Pada kondisi resistensi insulin, kadar IL-6 akan meningkat, dimana peningkatan IL-6 dianggap sebagai parameter resistensi insulin.⁴

Banyak penelitian juga meneliti masalah pengaruh diet tinggi lemak terhadap mikrobioma usus. Mikrobioma usus pada umumnya akan memproduksi *Short Chain Fatty Acids* (SCFA), dimana SCFA akan memerankan peranan penting dalam menurunkan level oksigen dalam intestinal lumen, dan memelihara normal *imunometabolik pathways*. Pada diet tinggi lemak, permeabilitas usus meningkat, sehingga bakteri

dari usus bisa keluar melalui kapiler ke jaringan lain, menyebabkan kondisi disbiosis dan inflamasi sistemik.³

Penelitian mengenai pemberian diet tinggi lemak selama 6 minggu pada tikus, terbukti bahwa kelompok tikus yang memiliki diet tinggi lemak memiliki profil bakteri pathogen lebih banyak dibandingkan dengan kelompok lainnya. Bakteri-bakteri tersebut seperti *Parasutterella*, *Defluviitaleaceae* UCG 011, *Erysipelatoclostridium*, *Escherichia Shigella*, Family XIII AD3011 group, *Eubacterium nodatum* group, *Parabacteroides*, *Akkermansia*, *Candidatus Soleaferrea*, *Flavonifractor*, *Alloprevotella*, *Negativibacillus*, *Ruminococcaceae* UCG 004, *Tyzzarella*, *Bacteroides*, and *Ruminococcaceae*. Pada kelompok diet tinggi lemak, SCFA menurun drastis dan sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan IL-6 meningkat dibandingkan dengan kelompok lainnya.³

Diet tinggi lemak juga akan menyebabkan terjadinya hiperplasia (jumlah adiposit yang berdeferensiasi menjadi adiposit precursor meningkat) dan hipertrofi (jumlah adiposit bertambah) dari sel lemak. Adiposit sendiri merupakan suatu organ hormonal, yang mengeluarkan hormone. Dalam hal ini akan mengeluarkan adiponektin, leptin, dan sitokin lainnya. Penumpukan adiposit akan merangsang terjadinya ROS. Leptin, hormon dari sel lemak putih, merupakan hormon yang bertanggung jawab dalam penumpukan ROS, dimana stimulasinya terjadi melalui aktivasi protein C-kinase dependent oleh NADPH pada

sel otot polos vaskuler. Leptin juga merangsang MCP-1 untuk menjadikannya disfungsi endotel, merangsang sitokin proinflamatori yang nantinya akan menyebabkan atherosklerosis.³²

Sistem *AMP-activated protein kinase* (AMPK) adalah suatu sistem di mana merupakan regulator kunci homeostasis yang terjadi pada tingkat sel maupun seluruh tubuh. Aktivasi AMPK akan menghasilkan ATP (Adenosine Tri Phospat) melalui pathway seperti glikolisis dan β -oksidasi. Karena pentingnya system AMPK ini terhadap keseimbangan energi, modifikasi AMPK sering digunakan sebagai cara mengatasi obesitas. AMPK akan mengurangi stress oksidatif dengan cara menghambat respon inflamasi dengan mempengaruhi jalur NF- κ B. Dengan menghambat inflamasi makan energi yang dihasilkan sel akan bertambah.²

2.3.4. Kuning Telur Puyuh Sebagai Diet Tinggi Lemak

Telur puyuh terdiri atas putih telur (albumen) 47, 4 %, kuning telur (yolk) 31,9% dan kerabang serta membran kerabang 20,7%. Kuning telur puyuh mengandung 15, 7%-16, 6% protein, 31,8%-35,5% lemak, 0,2%-1,0% karbohidrat dan 1,1% abu.³⁷

Tabel 2.1. Tabel Kandungan Gizi per 100 gr Telur Puyuh

Zat Gizi	Telur Puyuh
Energi (Kkal)	158,00
Protein (gr)	13,05
Total lemak (gr)	11,09
Karbohidrat (gr)	0,41
Kalsium / Ca (mg)	64,00
Besi / Fe (mg)	3,65
Magnesium/Mg (mg)	13,00
Fosfor/P (mg)	226,00
Kalium/K (mg)	132,00
Natrium /Na (mg)	141,00
Seng/Zn (mg)	1,47
Tembaga/Cu (mg)	0,06
Mangan /Mn (mg)	0,04
Tiamin (mg)	0,07
Riboflavin (mg)	0,48
Niasin (mg)	0,07
Asam Panthothenat (mg)	1,44
Vitamin B6 (mg)	0,14
Vitamin E (mg)	1,08
Kolesterol (mg)	844,00
Vitamin B12 (mkg)	1,58
Selenium/ Se (mkg)	32,00
Vit K (mkg)	0,30
Vit A (IU)	543

Sumber : USDA 2007

Kandungan protein telur puyuh sekitar 13,1%, kandungan lemaknya 11,1%, kadar kolesterol telur puyuh 844 mg/100 gram telur puyuh dan pada kuning telur puyuh sebesar 2138,17 mg/100 g, sedangkan kandungan kolesterol kuning telur ayam ras hanya 1274,5 mg/100 g, hal ini menunjukkan kandungan lemak kuning telur puyuh cukup tinggi sebagai diet tinggi lemak.³⁸ Makanan dengan kadar kolesterol yang tinggi akan menyebabkan terjadinya penurunan transkripsi gen reseptor LDL,

sehingga mengakibatkan sintesis reseptor LDL menurun dan meningkatnya kadar LDL³⁹

Tabel 2.2. Kandungan Asam Lemak pada Kuning Telur Puyuh Segar⁴⁰

Asam lemak	Telur Puyuh
Hexadecanoic (16:0)	23,16 ^{bc}
Palmitoleic (16:1)	5,19 ^c
Stearic (18:0)	6,86 ^b
Oleic (18:1)	34,19 ^a
Linoleic (18:2) n-6	7,82 ^b
A-linoleic (18:3) n-3	0,34 ^a
Arachidonic (20:4) n-6	1,15 ^b
Docosahexanoic (22:6) n-3	1,27 ^c

Penelitian yang dilakukan Hijriyani tahun 2023 mengungkapkan pemberian kuning telur puyuh sebesar 2 mL/hari selama 14 hari mampu meningkatkan kadar LDL pada tikus.³⁹

2.4 Propolis

2.4.1. Definisi

Propolis merupakan substansi natural larut air yang dikumpulkan oleh lebah dari resin dan eksudat dari tumbuhan untuk menyediakan proteksi mekanis dan biokimia ke sarangnya.¹ Propolis bersifat seperti lilin dan kental, lebah-lebah tersebut menggunakannya untuk membuat rumah.¹² Propolis yang banyak digunakan berasal dari Brazil dan China.⁴¹ Propolis lainnya yang berasal dari Eropa seperti (*Apis mellifera*) dan lebah penyengat lainnya seperti *Trigona*, *Melipona*, *Geniotrigona*, *Heterotrigona*, and *Tetragonula*.¹ Propolis

memiliki kandungan lebih dari 300 komponen, meliputi resin (50%), wax (30%), essential oils (10%), pollen (5%), dan kandungan organik lainnya.¹² Aktivitas biologinya meliputi antibakterial, antifungal, antiparasitik, antioksidan serta antiinflamasi.¹

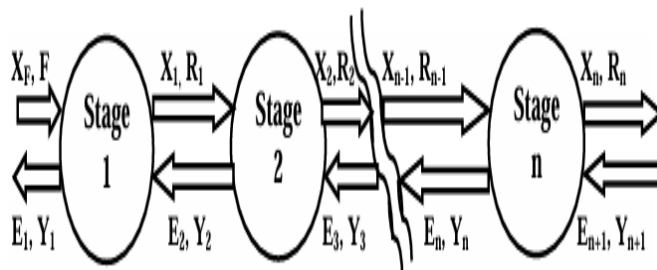
2.4.2. Ekstrak propolis dengan metode CMCE²¹

Propolis yang digunakan dalam penelitian ini merupakan propolis dari PT HDI dengan merk dagang propoelixTM. Propolis ini merupakan propolis tipe poplar yang diekstrak dengan metode CMCE (*Continuous Multistage Countercurrent Extraction*).⁴²

Metode ekstraksi dengan menggunakan CMCE ini merupakan metode ekstraksi modern, dengan menghilangkan semua zat lilin dan resin dalam propolis, sehingga menghasilkan ekstrak dengan zat bioaktif saja. Bahan aktif yang dihasilkan seperti flavonoid, flavones, polifenol, dan ester asam fenolat. Teknik ini memungkinkan menggunakan zat yang berguna saja dan membuang zat-zat yang dirasa tidak diperlukan. Dengan teknik ini, ekstrak zat aktif 15% lebih banyak dibandingkan dengan teknik lain.²¹

Ekstraksi cair-cair (*liquid-liquid extraction*), atau ekstraksi pelarut, merupakan proses untuk memisahkan komponen dari campuran cair menggunakan pelarut. Sistem *counter-current multistage* (Gambar 2.3) melibatkan kontak berulang antara dua cairan yang tidak bercampur (campuran awal dan pelarut) yang mengalir berlawanan arah melalui beberapa tahapan, dengan tujuan

memaksimalkan perpindahan zat yang diinginkan dari campuran awal ke dalam pelarut.⁴³



Gambar 2.3 Metode CMCE⁴³

Prinsip utama dari ekstraksi cair-cair melibatkan sistem dua fase yang tidak bercampur, di mana larutan dan pelarut pengeksrak harus tetap tidak bercampur di seluruh rentang konsentrasi zat terlarut selama proses berlangsung. Setiap tahapan ekstraksi dianggap sebagai tahap kesetimbangan ideal (teoretis), artinya *rafinat* (yang telah diekstraksi) dan *ekstrak* (fase pelarut yang mengandung zat terlarut) yang meninggalkan tahap tersebut berada dalam kondisi seimbang. Proses yang terjadi bergantung pada transfer massa zat HDI PropoelixTM memiliki kadar ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) 21.921 sementara dengan teknik biasa hanya mencapai kadar 9674.⁴⁴ ORAC adalah nilai antioksidan dari suatu produk makanan atau suplemen yang dapat mengurangi reaksi oksidasi di dalam tubuh. Ekstrak propolis memanfaatkan proses CMCE yang telah dipatenkan.⁴⁴ Proses ini memurnikan dan menghilangkan 99.95% kotoran (seperti logam berat dan pestisida) tanpa perubahan kimia, mempertahankan jumlah awal mikro-nutrisi dari propolis

mentah yang biasanya diencerkan dengan destilasi uap tradisional atau proses ekstraksi padat-cair.⁴⁴ Teknologi CMCE mampu membuang semua zat yang tidak dibutuhkan tubuh dan mempertahankan secara optimal zat yang berguna pada propolis yaitu bioflavonoid, polifenol, asam fenolat ester, dan flavon. Semua zat yang di hasilkan itu larut dalam air. Selain itu CMCE juga ramah lingkungan karena tidak membutuhkan konsumsi energi yang tinggi.⁴⁴

2.4.3. Kandungan propolis

Penelitian Cracco, (2024) meneliti mengenai kandungan dari propolis yang ditemukan di Uruguay. Kandungan utama propolis sebagian besar terdiri dari flavonoid, asam fenolik, vitamin dan mineral.⁴⁵

Kandungan polyphenol diuji dalam HPLC dan kandungan mineralnya diuji dalam *atomic absorption spectroscopy*. Kandungan polifenolnya antara lain apigenin, umbelliferone, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), *p-coumaric acid*, *trans-ferulic acid*, boldine, boldus molina, chrysin, galangin, kaempferol, morin, pinocembrin, rutin hydrate, quercetin dan vanillin.⁴⁵

Propolis juga memiliki kandungan mineral yang cukup banyak. Kandungan mineral propolis diantaranya Cupper (Cu), Iron (Fe), Manganese (Mn), dan Zinc (Zn). Dalam jumlah yang lebih kecil juga ditemukan kandungan magnesium (Mg), Calcium (Ca), sodium (Na), dan potassium (K).⁴⁵

Komponen bioelemen lain yang ada di propolis seperti vitamin B1, B2 dan B6, vitamin C dan vitamin E sebesar kurang lebih 0,6 % dari keseluruhan komponen.⁴⁶ Pada propolis poplar, dimana propolis yang kami pakai penelitian ini, kandungan CAPE merupakan komponen dengan kandungan terbanyak, yang memiliki sifat dan *bioactivity* yang luas seperti inhibisi NF-K β , inhibisi proliferasi sel dan menginduksi apoptosis, dalam hal ini efek-efek tersebut berkaitan dengan antiinflamasi.⁴⁶

Komponen bioaktif yang telah diidentifikasi yang terdapat dalam HDI PropoelixTM oleh Interfek Food Service GmbH Jerman yaitu CAPE, Narigenin, Chrysin, Galangin, Cinnamic Acid, Pinocembrin, dan Apigenin.⁴⁴

2.4.4. Mekanisme antiinflamasi dari propolis

Efek anti inflamasi dari propolis sudah banyak diteliti. Berbagai jalur anti inflamasi dari propolis terbukti menurunkan sitokin-sitokin pro inflamatori.¹ Efek antiinflamatori dari propolis terutama disebabkan oleh kandungan flavonoid dan polifenolnya.¹ Kandungan flavonoid, terutama CAPE memiliki efek anti inflamasi yang menurunkan produksi sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, TNF- α dan TGF- β ¹² melalui jalur NF-K β .⁴¹ Aktivitas scavenger atau penangkapan radikal bebas dimediasi oleh penurunan reduksi asam arakidonat melalui penghambatan enzim lipooksigenase dan cyclooksigenase.⁴¹ Sisi aktif CAPE (OH) akan mendonorkan

elektronnya untuk berikatan dengan radikal bebas sehingga akan mencegah proses ikatan radikal bebas dengan membran sel.⁴⁷ Apabila CAPE mampu berikatan dengan radikal bebas secara maksimal, maka kadar antioksidan dalam sel mampu dipertahankan sehingga tidak akan terjadi kondisi stress oksidatif dan menghambat kerusakan sel yang dipicu peningkatan radikal bebas.⁴⁷

Propolis juga berperan dalam mengatasi hiperlipidemia. Studi oleh Ichi pada tahun 2009 menyatakan bahwa pemberian propolis pada tikus selama 8 minggu mengurangi akumulasi lemak dan penurunan kadar kolesterol dan trigliserida pada tikus yang diberikan diet tinggi lemak.⁵ Beberapa penelitian menemukan bahwa CAPE menghambat differensiasi adiposit. CAPE secara signifikan menghambat ekspresi protein yang terkait dalam metabolisme lipid dalam adiposit, seperti PPAR- γ , protein pengikat spesifik asam lemak adiposit (aP2), C/EBP- α dan sintase asam lemak sehingga mengurangi pengendapan trigliserida dalam sel 3T3-L1 setelah stimulasi MDI. CAPE juga memblokir fosforilasi ERK dan Akt pada sel 3T3-L1 sehingga menghambat ekspresi siklin D1 di hilir.⁵

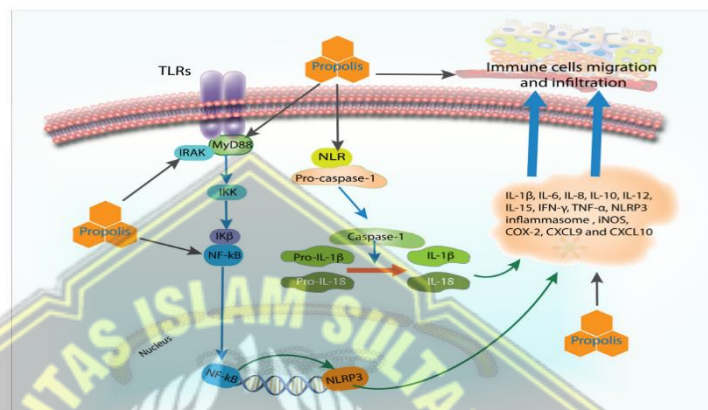
Adiposit mempunyai fungsi sekresi dan dapat mengeluarkan zat aktif adipositokin. Adipositokin yang keluar dapat berupa leptin, adiponektin, IL-6 dan TNF- α . Leptin merupakan enzim yang bekerja pada pusat pengaturan berat badan di hipotalamus. CAPE menghambat ekspresi leptin dan penurunan

regulasi pada *Insulin Reseptor Substrat* (IRS-1). CAPE meningkatkan sekresi adiponektin, suatu adipokin yang bermanfaat untuk mengatur homeostasis energi, metabolisme glukosa dan metabolisme lemak. CAPE juga bermanfaat dalam menghambat TNF- α , IL-6, IL-1 β .⁵

Mekanisme antiinflamasi lain dari propolis berkaitan dengan kerusakan jaringan, yang bisa disebabkan oleh infeksi ataupun luka. Adanya kerusakan jaringan akan menyebabkan pengeluaran sinyal *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) dan *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) yang dikenali oleh reseptor TLRs. TLRs akan mengaktifkan jalur myD88 dengan menginduksi fosforilasi dari protein inhibitor I κ B oleh IKK. Pelepasan protein I κ B akan mengaktifkan jalur NF- κ B di dalam nucleus, yang kemudian NF- κ B ini akan mengaktifkan sitokin-sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- γ , dan TNF- α . Sitokin-sitokin ini akan mempromosikan migrasi dari neutrophil dan monosit ke jaringan yang luka. Migrasi dari sel-sel tersebut akan mengeluarkan prostaglandin, leukotriene, dan histamine. Neutrofil akan mengeluarkan *reactif oxygen species* (ROS) dan protease yang akan menimbulkan kerusakan pada jaringan luka. Makrofag dan sel dendritik kemudian akan memfagositosis antigen. Pada akhirnya,

ekspresi fas ligand akan menyebabkan apoptosis dari neutrophil, yang nantinya akan dimakan oleh makrofag.¹

Mekanisme antiinflamasi dari propolis bisa dilihat pada gambar 2.4 di bawah ini.



Gambar 2.4. Mekanisme antiinflamasi jalur NF- κ B dari Propolis¹

Propolis juga mempunyai peranan sebagai prebiotik dalam menjaga mikrobioma usus. Flavonoid pada propolis memiliki sifat antibakteri yang akan menghambat sintesis asam nukleat dan DNA dari bakteri, merusak dinding membrane bakteri serta melindungi usus dari bakteri pathogen. Kandungan propolis flavonoid tersebut, 5-10% nya diserap di usus kecil, dan 90-95% lainnya akan dikirim ke usus besar untuk mempengaruhi flora disana. Banyak studi menyatakan bahwa polifenol mempengaruhi koloni bakteri melalui proses enzimatik (deflikosolasi, dehidroxilasi, dan demetilasi) yang menghasilkan metabolit seperti benzoic, phenilacetic, dan asam phenilpropionik yang mempunyai efek bioaktif terhadap mikroorganisme dan menghambat inflamasi. Sifat antioksidan dari propolis juga mampu

membuat membran sel usus tetap intak dan mengurangi kebocoran usus, sehingga komposisi dari mikrobioma usus terjaga dengan baik.⁴⁸

2.5. Vitamin E

2.5.1. Definisi, Jenis dan Struktur dari Vitamin E

Vitamin E ditemukan pertama kali tahun 1922 pada sayuran hijau, dan dianggap penting dalam kesuburan. Vitamin E adalah vitamin larut lemak, yang terbagi menjadi dua bagian besar, tocopherol dan tokotrienols. Masing-masing group terbagi menjadi empat golongan isomer, alfa, beta, gamma dan delta, tergantung dari posisi methyl group di rantai yang mana. Vitamin E tersusun dari cincin chromanol dan rantai isoprenoid atau phytol disisinya.⁴⁹

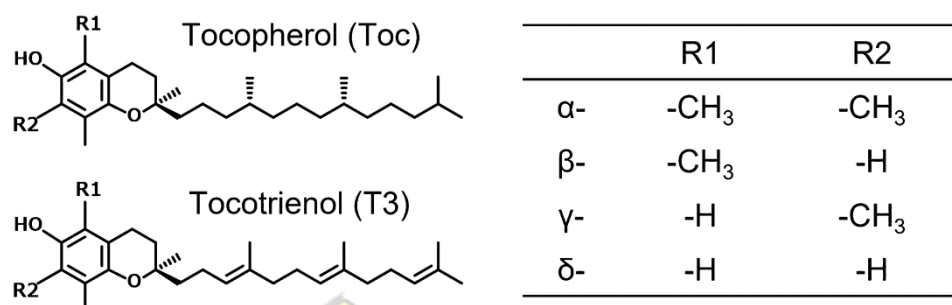
Tocopherols mempunyai rantai yang panjang dan jenuh, sedangkan tokotrienols disusun oleh rantai double tidak jenuh pada sisinya. Gambar 2.5 dibawah menjelaskan struktur kimia dari vitamin E.⁴⁹ Hal ini menjelaskan afinitas terhadap lipid lebih tinggi pada tokotrienols daripada tocopherol.⁴⁹

Vitamin E jenis α -tocopherols merupakan vitamin E yang paling lazim digunakan secara luas. Vitamin E jenis ini gampang didapatkan dan harganya terjangkau. Sumber vitamin E α -tocopherols ini bisa didapatkan di minyak sayur, minyak palem, rice bran, gandum, olive, barley, kacang kedelai, kacang-kacangan, dan grains, pada minyak gandum kandungan vitamin E relatif lebih besar

kurang lebih 50mg vitamin E dalam 100 ml minyak.⁶ Vitamin E jenis α -tocopherol merupakan vitamin E yang paling memenuhi kebutuhan tubuh akan vitamin E dan paling banyak didapatkan dalam sirkulasi, karena paling mudah disimpan di dalam tubuh.⁵⁰ Alfa-tocopherol mengekspresikan α -TTP yang diekspresikan di hati manusia, yang berfungsi menjaga erat konsentrasi dari α -tocopherols yang beredar.⁵⁰ Protein TTP ini tidak mengenali 7 jenis vitamin E lainnya.⁵⁰

Recommended Dietary Allowance (RDA) dari vitamin E ekuivalen dengan 35 μmol /hari (15 mg/hari) untuk laki-laki dan perempuan.⁵¹ Satu mg α -tocopherol ekuivalen dengan 1,49 International Unit (IU), dan 1 IU ekuivalen dengan 0,67 mg vitamin E.⁵² Kadar inadekuat dari vitamin E (plasma $\alpha\text{TF level}$ $<12 \mu\text{mol/L}$) pada manusia biasanya berhubungan dengan beberapa komplikasi kesehatan seperti peningkatan infeksi, anemia, keterlambatan pertumbuhan pada infant dan ibu hamil.⁵¹ Vitamin E memiliki efek prooksidan jika dikonsumsi dalam dosis tinggi.¹⁴ Studi metaanalisis menunjukkan bahwa Vitamin E akan menimbulkan efek toksisitas pada manusia dengan meningkatkan resiko perdarahan dan kematian pada tubuh apabila digunakan dalam dosis yang tinggi, yaitu diatas 400IU per hari.⁵³ Penggunaan Selain itu vitamin E merupakan inhibitor bagi vitamin larut lemak lainnya (A,D,K). Untuk itu

penggunaan dosis vitamin E harus cermat agar mempunyai efek farmakologis yang baik.¹⁴



Gambar 2.5. Struktur Kimia Vitamin E⁴⁹

2.5.2. Fungsi Vitamin E

Vitamin E sudah terkenal akan efeknya sebagai antioksidan. Baik tocopherols maupun tocotrienols keduanya mampu berperan sebagai antioksidan. Vitamin E memiliki efek scavenging terhadap *reactive oxygen species* (ROS) dan radikal bebas.⁵⁴

Vitamin E juga memiliki efek sebagai anti inflamasi. Vitamin E dapat menghambat molekul mediator inflamasi seperti eicosanoids dan enzim cyclooxygenase-2 (COX-2).⁵⁴ Pada penelitian dengan tikus, banyak studi menunjukkan bahwa vitamin E meningkatkan mediasi respon imun selular dan humoral, meningkatkan proliferasi limfosit, peningkatan immunoglobulin, meningkatkan aktifitas sel *Natural Killer* (NK) dan produksi IL-2.⁶ Studi pada manusia menunjukkan efek vitamin E dalam imunomodulator dan antiinflamasi, seperti peningkatan limfosit,

menghambat hipersensitifitas type lambat (type IV), peningkatan produksi IL-2 dan penurunan produksi IL-6 sebagai respon antiinflamasi.⁶ Vitamin E juga mensupresi jalur inflamasi seperti *nuclear factor kappa beta* (NF- κ B) dan jalur aktivasi transkripsi-3 (STAT-3).⁴⁹ Perbedaan dosis dari vitamin E tersebut juga menunjukkan perbedaan efek yang ditimbulkan.⁶

Vitamin E juga berperan sebagai agen anti obesitas. Suplementasi harian dari vitamin E mampu menstabilkan pembuluh darah dan meningkatkan kualitas dinding pembuluh darah.⁴⁹ Efek penting lainnya dari vitamin E adalah sebagai pencegahan penyakit kardiovaskuler, karena sifat vitamin E yang menghambat agregasi trombosit.¹⁸ Vitamin E juga berperan dalam sindroma metabolik. Kemampuannya dalam sindroma metabolik didukung dari kemampuan vitamin E sebagai antioksidan dan antiinflamasi, serta inhibisi enzim HMG Co-A reductase.⁵¹ Suplementasi α -tocopherols 150 mg/kg BB 2 kali sehari selama 28 minggu meningkatkan sensitivitas insulin dan hipertrigliseridemia melalui pegurangan ROS dan respon inflamasi.⁵¹ Efek terapeutik lain dari vitamin E adalah neuroprotektif.⁵⁴ Suplementasi harian vitamin E sebesar 200mg/kg menyebabkan penurunan kerusakan DNA.⁵¹

2.5.3. Mekanisme anti inflamasi dari Vitamin E

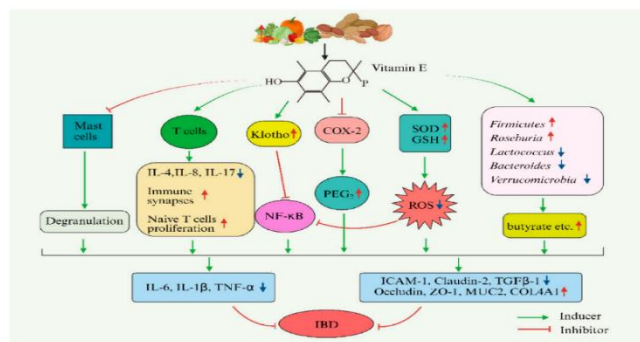
Vitamin E merupakan antioksidan kuat yang menghambat oksidasi dari membrane lipid, memelihara keutuhan membrane dan

memiliki efek protektif terhadap sel imun. Sel inflamasi akan menginfiltrasi membrane sel seperti sel T, makrofag dan neutrophil.¹⁴ Vitamin E juga menghambat pembentukan sitokin pro inflamasi yang dihasilkan oleh sel mast. Vitamin E dapat mengurangi degranulasi sel mast dengan efek scavengernya dalam menangkap radikal bebas, sehingga mempunyai efek positif dalam mengurangi reaksi inflamasi dan alergi.¹⁴

Beberapa penelitian mengemukakan bahwa vitamin E mampu meregulasi aktivitas imun dari sel T, seperti naïve sel T. Vitamin E diketahui meningkatkan proliferasi dari sel T primitif, meningkatkan level IL-2 pada darah, menurunkan produksi IL-4 pada darah perifer, Pada suatu penelitian di penyakit *inflammatory bowel disease* (IBD), pemberian vitamin E bermanfaat menurunkan level IL-17.⁵⁵

Jalur lain vitamin E sebagai antiinflamasi adalah dengan menghambat prostaglandin (PGE-2). PGE-2 merupakan suatu sitokin proinflamasi yang sekresinya dipengaruhi oleh enzim cyclooxygenase (COX-1 dan COX-2). COX-1 mengatur kestabilan prostaglandin, sedangkan COX-2 diaktifkan oleh sitokin proinflamatori. Vitamin E dan metabolitnya mampu menghambat terbentuknya PGE-2 dan menghambat munculnya sitokin proinflamatori seperti IL-6, TNF- α dan IL-1 β .⁵⁵

Dalam sebuah studi invitro, vitamin E dapat meningkatkan ekspresi klotho dan menghambat aktivitas transkripsi nuclear factor kappa- β (NF- $\kappa\beta$), dengan menghambat maturase dari sel dendritik. Klotho adalah protein anti-aging yang berperan dalam melindungi dari kerusakan sel.¹⁴ Proses mekanisme antiinflamasi dari vitamin E dapat lebih jelas diamati pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Mekanisme Antiinflamasi dari Vitamin E⁵⁵

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

Diet tinggi lemak akan menyebabkan terjadinya inflamasi, dan disbiosis usus.²³ Diet tinggi lemak berarti kalori yang masuk lebih tinggi dimana kelebihan kalori akan disimpan ke dalam jaringan adiposa menyebabkan hipertrofi dan hiperplasia adiposit, terjadi adipotoksik kronis yang akan memicu munculnya sitokin inflamasi kronis seperti TNF- α dan IL-6.⁴² Jaringan adiposit merupakan organ metabolik aktif yang mampu memproduksi beberapa substansi bioaktif seperti endokrin dan proses imunologi. Jumlah *body fat* yang menumpuk dalam tubuh akan mengakibatkan sitokin proinflamatori meningkat.²⁵

Pemberian diet tinggi lemak akan meningkatkan asam lemak bebas dalam darah.²³ Peningkatan asam lemak bebas tersebut akan mengaktifkan sinyalasi faktor *nuclear kappa beta* (NF-K β) melalui peningkatan TLR di permukaan sel dan melalui penginduksian sitokin-sitokin proinflamasi.²⁵

Peningkatan asam lemak bebas akan meningkatkan jumlah sel adiposit pada jaringan adiposa. Jaringan adiposa merupakan jaringan parakrin yang berfungsi mengeluarkan hormone adipokin. Kadar leptin akan bertambah seiring dengan peningkatan jaringan adipose. Leptin merupakan hormon yang berhubungan erat dengan nafsu makan,

merangsang tubuh untuk menaikkan nafsu makan dan menambah volume jaringan adiposa. Jaringan adiposa yang bertambah cepat, menyebabkan hipoksia pada jaringan adiposa dan memicu terjadinya angiogenesis. Kondisi ini akan menyebabkan radikal bebas terbentuk dan menyebabkan stress oksidatif, yang lama-kelamaan akan meningkatkan sitokin proinflamasi.²³

Diet tinggi lemak akan meningkatkan aktivasi NADPH oksidase, stress oksidatif dan peroksidasi lipid yang ketiganya akan menyebabkan deregulasi dari produksi faktor transkripsi NF-K β , adipocitokines (fat-derived hormones), meliputi adiponektin, *plasminogen activator inhibitor-1*, IL-6, dan *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), dan sitokin-sitokin pro inflamatori lainnya.¹¹

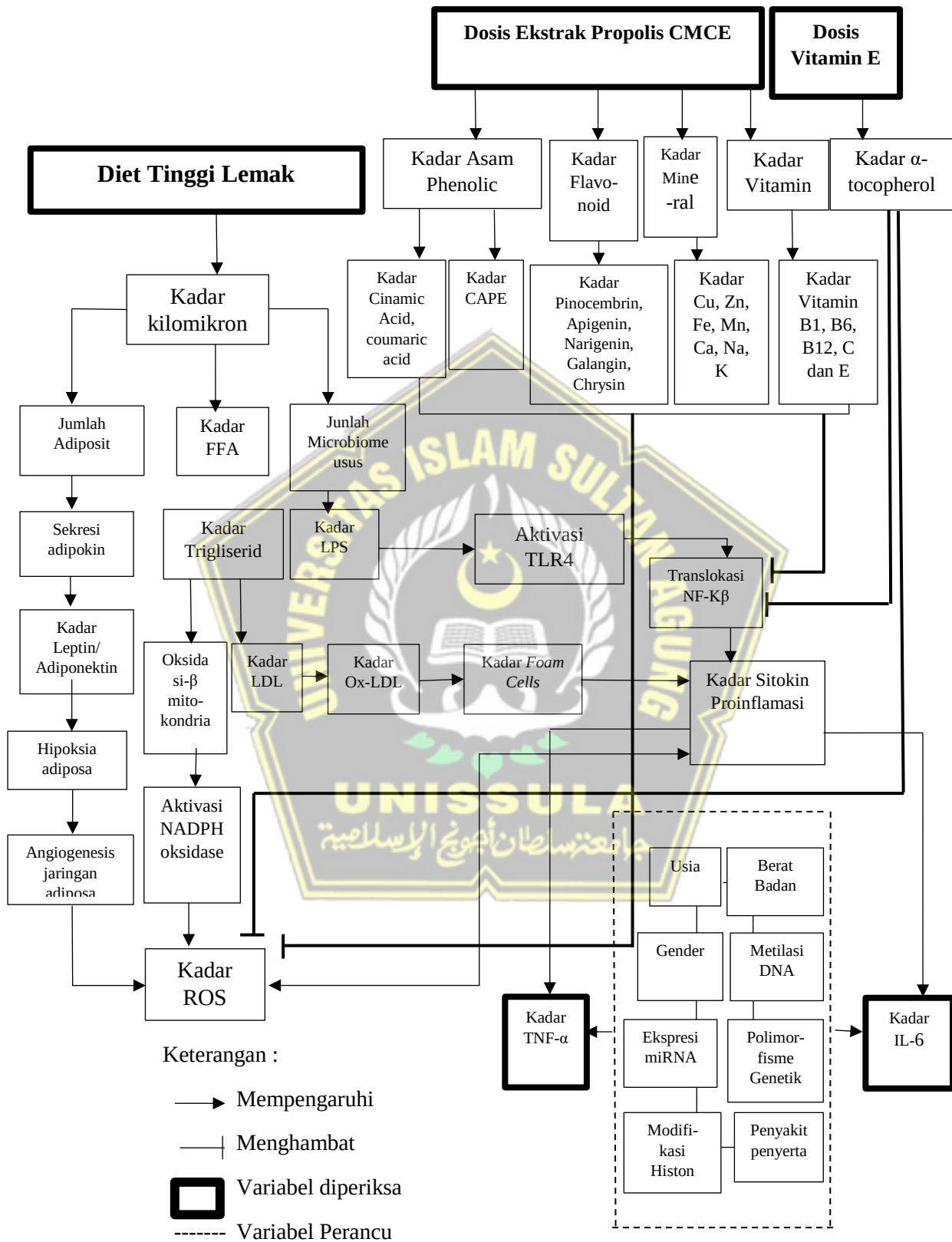
Propolis, melalui bahan aktifnya seperti flavonoid dan asam fenolik, akan menghambat inflamasi melalui inhibisi sekresi adiponectin, menghambat hipertrofi dan hiperplasia adiposit dan menghambat aktivitas leptin.²⁸ Sifat antiinflamasi propolis bisa dilakukan oleh bahan aktifnya baik flavonoid, asam fenolik, vitamin-vitamin dan mineral dari propolis seperti Zinc, dengan cara inhibisi jalur NF-k β .¹ Dengan inhibisi NF-K β diharapkan sitokin proinflamatori tidak terbentuk, dan inflamasi yang akan terjadi dihambat atau tidak timbul.¹ Dengan adanya penghambatan jalur NF-K β tersebut, akan mengurangi produksi dari radikal bebas, mengurangi disfungsi endotel dan lipid peroksidasi membrane sel.¹ Propolis terbukti mempertahankan mikrobiota usus

intestinal, memperkuat membrane sel usus dan mengurangi kebocoran membrane yang berakibat ketidakseimbangan mikrobiota usus.²⁹ Dalam hal ini, propolis mengatasi peradangan melalui jalur mikrobiota usus.³⁰

Sifat antiinflamasi dari vitamin E terhadap diet tinggi lemak ini terlihat melalui beberapa jalur. Vitamin E melindungi membran sel dari lipid peroksidasi dan berperan dalam antiinflamasi dalam hubungannya dengan inhibisi jalur NF- κ B.²⁶ Dengan inhibisi jalur tersebut maka vitamin E akan mencegah terbentuknya sitokin proinflamasi, seperti TNF- α dan IL-6. Vitamin E juga menghambat pembentukan sitokin pro inflamasi meningkatkan lipoperoksidase, sehingga peroksidase lipid membrane bisa dihambat.²⁹ Vitamin E juga merubakan prebiotik baik yang melindungi mikrobiota usus. Suplementasi vitamin E akan meningkatkan SCFA dan produksi butirir yang berperan dalam antiinflamasi intestinal.³¹

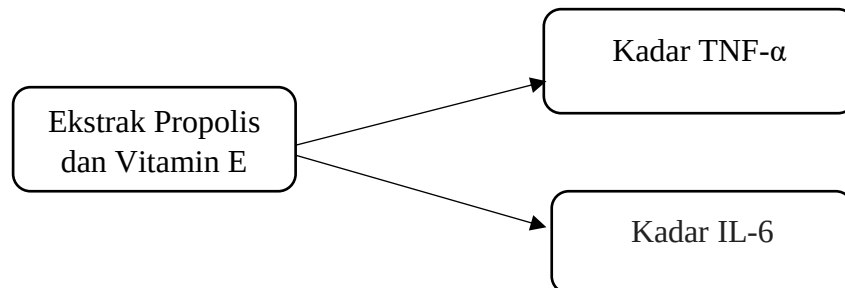
Propolis maupun vitamin E sama-sama memiliki efek scavenging untuk menangkap ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) yang timbul akibat infeksi atau trauma.⁴³ Hal ini menunjukkan keduanya mampu mengatasi radikal bebas yang timbul dari suatu proses inflamasi.⁴³

Keseluruhan proses tersebut tertuang dalam gambar 3.1 Kerangka Teori.



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

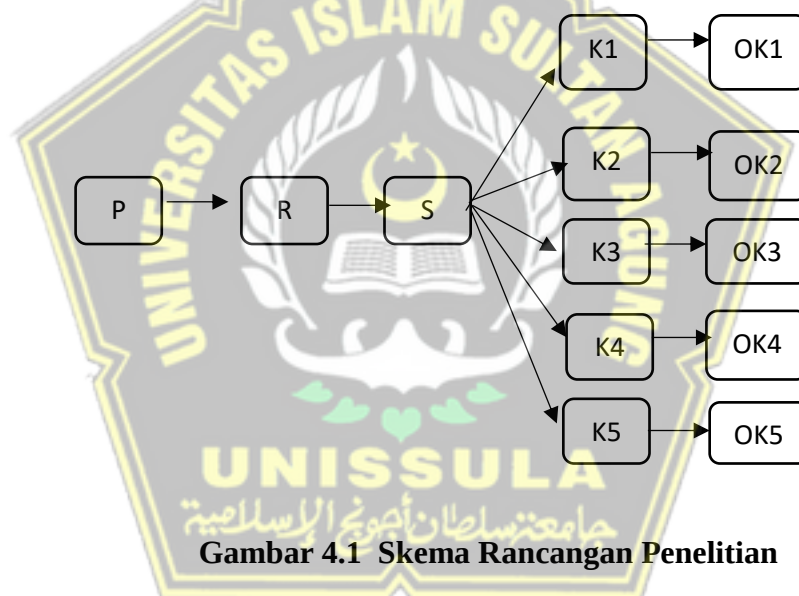
Pemberian kombinasi Propolis dan Vitamin E berpengaruh terhadap kadar TNF- α dan IL-6 tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diinduksi diet tinggi lemak.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian “*post test only control group design*”. Subjek penelitian dibagi secara acak menjadi lima kelompok, yaitu dua kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Skema rancangan penelitian dapat dilihat pada gambar 4.1



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

- P : Populasi penelitian
R : Randomisasi
S : Subjek penelitian
K1 : Kelompok sehat yang mendapatkan pakan standar tanpa diet tinggi lemak
K2 : Kelompok kontrol negatif yang mendapatkan pakan standar yang diberi induksi diet tinggi lemak telur puyuh 2 mL
K3 : Kelompok perlakuan yang diberikan induksi diet tinggi lemak telur puyuh 2 mL dan vitamin E dosis 12 mg/KgBB/ selama 14 hari
K4 : Kelompok perlakuan yang diberikan induksi diet tinggi lemak telur puyuh 2 mL dan ekstrak propolis dosis 36 mg/KgBB/ hari hari selama 14 hari

- K5 : Kelompok perlakuan yang diberikan induksi diet tinggi lemak telur puyuh 2 mL, kombinasi propolis dosis 18 mg/ KgBB/ hari dan vitamin E dosis 6 mg/ KgBB/ hari selama 14 hari.
- OK1 : Observasi pada kelompok 1
- OK2 : Observasi pada kelompok 2
- OK3 : Observasi pada kelompok 3
- OK4 : Observasi pada kelompok 4
- OK5 : Observasi pada kelompok 5

4.2 Populasi dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian diambil dari hewan pengerat Wistar jantan berumur 10-12 minggu dengan berat 200-250 gram yang diperoleh dari Laboratorium IBL FK Unisulla. Mencit dipelihara dengan pakan pellet ternormalisasi dan air minum jenis air biasa, suhu ruang pemeliharaan berkisar 18 – 23 derajat Celsius, dengan ventilasi dan ruangan yang memuaskan. Selain itu tikus menjalani adaptasi tujuh hari sebelum mendapat perlakuan.⁵⁶

4.2.2. Besar Sampel

Berdasarkan rumus Federer (1963) untuk uji eksperimental, sampel penelitian didapatkan dari perhitungan berikut:

$$(p-1) (n-1) \geq 15$$

$$(5-1) (n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$n \geq 4,75 \cong 5$$

Keterangan:

p = Jumlah kelompok perlakuan

n = Jumlah sampel tiap kelompok

Berdasarkan hasil perhitungan, jumlah sampel untuk setiap kelompok adalah 5 ekor tikus. Antisipasi *drop out* sebesar 10% perlu diperhitungkan dengan rumus koreksi berikut:

$$n_{do} = \frac{n}{1 - do} = \frac{5}{1 - 0,1} = 5,6 \cong 6$$

Sehingga jumlah sampel pada penelitian ini berjumlah 30 ekor tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*).

4.2.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Teknik pengambilan sampel ini dengan cara *simple random sampling*. Tikus jantan galur wistar berjumlah 30 ekor yang telah masuk ke dalam kriteria inklusi dibagi menjadi 5 kelompok secara acak dan sederhana dengan 1 kelompok kontrol sehat, 1 kelompok kontrol negatif, dan 3 kelompok perlakuan.

4.2.4. Kriteria Inklusi

1. Tikus dalam keadaan aktif dan sehat, tidak ada kelainan anatomis
2. Umur 2,5 – 3 bulan
3. Berat badan 200-220 gram

4.2.5. Kriteria Eksklusi

1. Tikus sakit, tidak aktif dan cacat

4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.3.1. Variabel

- a. Variabel bebas : Ekstrak Propolis dan dosis Vitamin-E

- b. Variabel terikat : Kadar TNF- α dan IL-6
- c. Variabel prakondisi : Diet tinggi lemak

4.3.2 Definisi Operasional

1. Ekstrak Propolis

Propolis yang digunakan merupakan ekstrak propolis yang didapatkan dengan merk dagang. HDI PropoelixTM dengan sediaan 200 mg. Ekstrak propolis ini merupakan tipe propolis yang diekstraksi menggunakan metode CMCE. Ekstrak propolis ini mempunyai 4 kandungan aktif yaitu flavonoid, asam fenolik, mineral dan vitamin. Komponen bioaktif terbanyak dalam kandungan propoelixTM sebagai berikut: CAPE, Narigenin, Chrysin, Galangin, Cinnamic Acid, Pinocembrin, dan Apigenin yang mempunyai aktifitas antioksidan dan antiinflamasi yang tinggi.⁴⁴

Dosis yang diberikan kepada tikus adalah 18 mg/ KgBB/ hari dan 36 mg/ KgBB/ hari, yang diperoleh melalui konversi dosis manusia (200 mg dan 400 mg) ke dosis tikus dengan berat badan sekitar 200 g. Dosis ini didapatkan dengan dasar penelitian sebelumnya, dimana propolis metode CMCE berperan sebagai antiinflamasi pada tikus yang terpapar CCL4 terhadap kadar IL-6.¹⁰ Pemberian ekstrak propolis diencerkan dulu dengan aquades, kemudian diberikan secara oral melalui sonde setiap hari selama 14 hari.

Satuan yang digunakan :miligram

Skala : nominal.

2. Vitamin E

Vitamin E yang digunakan adalah vitamin E dalam bentuk alami yaitu alfa-tokoferol. Merk yang dipakai adalah Natur-E Daily Skin Start produksi PT. Darya-Varia Laboratoria Tbk dengan sediaan 100 IU per kapsul. Dosis yang diberikan kepada tikus adalah 6 mg/ KgBB/ hari dan 12 mg/ KgBB/ hari, yang diperoleh melalui perhitungan konversi dosis manusia (100 IU dan 200 IU) ke dosis tikus dengan berat badan sekitar 200 g (1 IU = 0,67 mg). Dosis yang dipakai berdasarkan penelitian sebelumnya, dimana vitamin E dosis 6 mg mampu memberikan efek antiinflamasi.¹⁵ Pemberian suplemen vitamin E diberikan secara oral setiap hari melalui sonde selama 14 hari.

Satuan yang digunakan : miligram

Skala : nominal.

3. Kadar Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

Kadar TNF- α diperiksa dari sampel darah yang diambil dari vena orbita tikus pada hari ke-15 setelah perlakuan. Spesimen yang digunakan adalah serum. Kadar TNF- α diperiksa menggunakan *Enzyme Linked Immuno Assay* (ELISA).

Satuan yang digunakan : nanogram/milliliter (ng/ml)

Skala :Ratio

4. Kadar Interleukin 6 (IL-6)

Kadar Interleukin-6 diperiksa dari sampel darah dari vena orbita tikus pada hari ke-15 setelah perlakuan. Spesimen yang digunakan adalah serum. Kadar IL-6 yang digunakan diperiksa menggunakan *Enzyme Linked Immuno Assay* (ELISA).

Satuan yang digunakan : nanogram/milliliter (ng/ml)

Skala : Ratio

4.4. Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1. Alat

Alat yang digunakan:

1. Kandang tikus beserta tempat pakan dengan ukuran P: 40 cm, L: 30 cm, T: 30 cm
2. Alat sonde
3. Kloroform (CHCl_3)
4. Pipa hematokrit
5. Mikropipet
6. Mikropipet tip ukuran 100 μL dan 10 μL
7. *Vial tube* ukuran 1,5 mL
8. *Sentrifuge*
9. Inkubator
10. *ELISA reader*

4.4.2. Bahan

1. Tikus jantan 30 ekor
2. Pakan tikus standar
3. Ekstrak propolis
4. Vitamin E alfa tocopherol
5. Kuning telur puyuh
6. Aquadest
7. Minyak biji bunga matahari
8. Rat TNF- α ELISA kit
9. Rat IL-6 ELISA kit

4.5. Prosedur Penelitian

4.5.1 Ethical Clearance

Ethical Clearance untuk penggunaan hewan coba diperoleh dari Komisi Etik Penelitian FK UNISSULA Semarang dengan nomor No. 554/XI/2025/Komisi Bioetik sebelum penelitian dimulai, sebagai persetujuan resmi yang menjamin penelitian dilakukan sesuai dengan standar etika penelitian.

4.5.2 Aklimatisasi

Sebelum perlakuan, sebanyak 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan diaklimatisasi selama 7 hari di laboratorium *Intregrated Biomedical Laboratory* (IBL) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang untuk beradaptasi dengan lingkungan baru. Selama periode aklimatisasi, seluruh tikus

diberikan pakan dan minum standar. Setelah aklimatisasi, tikus dibagi ke dalam lima kelompok secara acak (terdiri dari dua kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan).

4.5.3 Penetapan Dosis Propolis dan Vitamin E

1. Dosis Ekstrak Propolis

Penentuan dosis ekstrak propolis didasarkan pada penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa dosis 18 mg/ KgBB/ hari dan 36 mg/ KgBB/ hari terbukti efektif dalam menurunkan sitokin proinflamasi pada tikus.¹³

2. Dosis Vitamin E

Dosis vitamin E (alfa-tokoferol) yang digunakan didasarkan pada penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa dosis 6 mg/ KgBB/ hari dan 12 mg/ KgBB/ hari terbukti efektif dalam menurunkan kadar sitokin proinflamasi pada tikus.¹⁵

4.5.4 Komposisi Diet Tinggi Lemak

Diet tinggi lemak terdiri dari kombinasi pakan standar dan kuning telur puyuh mentah. Kuning telur puyuh digunakan karena memiliki kandungan kolesterol yang tinggi (mencapai 844 mg per 100 g).⁵⁷ Pakan standar diberikan bersamaan dengan kuning telur puyuh 2 mL/ ekor/ hari.⁵⁸

Pakan standar berupa pemberian pelet tikus merk HI-PRO-VITE (volume 40 g/ hari/ tikus) dan *aquadest* (volume 50 mL/ hari/ tikus) secara *ad libitum*.

Tabel 4.1 Komposisi Pakan Standar

Komposisi	Kadar
Air	13,1% (max)
Protein kasar	14,0% (min)
Lemak kasar	3,0% (min)
Serat kasar	9,0 (max)
Abu	8,0% (max)
Kalsium	0,7 – 1,2%
Fosfor	0,5% (min)
Urea	N/D
Aflatoksin	60 μ / kg (max)
Lisin	0,63% (min)
Metionin	0,25% (min)

Kuning telur puyuh digunakan sebagai model induksi diet tinggi lemak karena kaya kandungan kolesterol 844mb/100gr telur puyuh yang bersifat pro-inflamasi.⁵⁹ Kuning telur puyuh diberikan melalui sonde oral dengan dosis 2 mL/ 200 gBB/ hari.³⁹

4.5.5 Pembagian Kelompok Perlakuan

Setelah menjalani aklimatisasi selama 7 hari, 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan dibagi secara acak ke dalam lima kelompok (K1, K2, K3, K4, K5), masing-masing ditempatkan dalam kandang terpisah, dan diberikan perlakuan selama 14 hari sebagai berikut:

1. **Kelompok Sehat (K1):** Diberikan pakan standar dan larutan aquades setiap hari.
2. **Kelompok Kontrol Negatif (K2):** Diberikan pakan standar dan diinduksi dengan diet tinggi lemak kuning telur puyuh 2 mL.

3. **Kelompok Perlakuan 1 (K3):** Diberikan pakan standar dan diinduksi dengan diet tinggi lemak kuning telur puyuh 2 mL, serta diberikan vitamin E (alfa tokoferol) dengan dosis 12 mg/ KgBB/ hari secara sonde peroral.
4. **Kelompok Perlakuan 2 (K4):** Diberikan pakan standar dan diinduksi dengan diet tinggi lemak kuning telur puyuh 2 mL, serta diberikan ekstrak propolis dengan dosis 36 mg/ KgBB/ hari secara sonde peroral.
5. **Kelompok Perlakuan 3 (K5):** Diberikan pakan standar dan diinduksi dengan diet tinggi lemak kuning telur puyuh 2 mL, serta diberikan ekstrak propolis dengan dosis 18 mg/ KgBB/ hari dan vitamin E (alfa tokoferol) dengan dosis 6 mg/ KgBB/ hari secara sonde peroral.

4.5.6 Penimbangan Berat Badan

Penimbangan berat badan tikus dilakukan pada semua kelompok sebelum dilakukan perlakuan, setelah 7 hari, dan setelah 14 hari untuk menyesuaikan dosis ekstrak propolis dan vitamin E dengan penambahan berat badan pada hewan coba.

4.5.7 Prosedur Pengambilan Sampel Sebagai Spesimen

1. Setelah tikus selesai mendapatkan perlakuan yang telah ditentukan, maka tikus dipuasakan 12 jam.
2. Tikus yang telah dipasakan dianastesi menggunakan kloroform.

3. Pengambilan darah dilakukan melalui plexus vena retro-orbital dengan pipa kapiler sebanyak 1,5 ml.
4. Darah tersebut disimpan dalam tabung reaksi bersih tanpa koagulan, untuk selanjutnya dilakukan preparasi spesimen.

4.5.8 Preparasi Spesimen

1. Sampel darah tikus yang diambil melalui plexus vena retro-orbital tersebut selanjutnya ditampung ke dalam tube.
2. Darah yang telah ditampung disiapkan ke dalam suhu ruangan 10-20 menit.
3. Sampel darah dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000-3000 RPM selama 20 menit.
4. Serum darah tikus tersebut untuk selanjutnya disimpan dalam suhu -20°C untuk dianalisis

4.5.9 Pemeriksaan Kadar TNF- α dan IL-6

1. Seluruh reagen, larutan standar dan sampel disiapkan sesuai intruksi, kemudian dibawa dan dikondisikan pada suhu ruangan sebelum digunakan.
2. Tentukan jumlah strip yang akan digunakan untuk pengujian kadar.
3. Tambahkan 50 μL specimen ke well tube standard.
4. Tambahkan 40 μL sampel ke dalam 10 μL antibodi anti TNF- α dan antibodi anti IL-6 ke dalam sumur sampel, kemudian tambahkan 50 μL streptavidin-HRP ke dalam well tube sampel

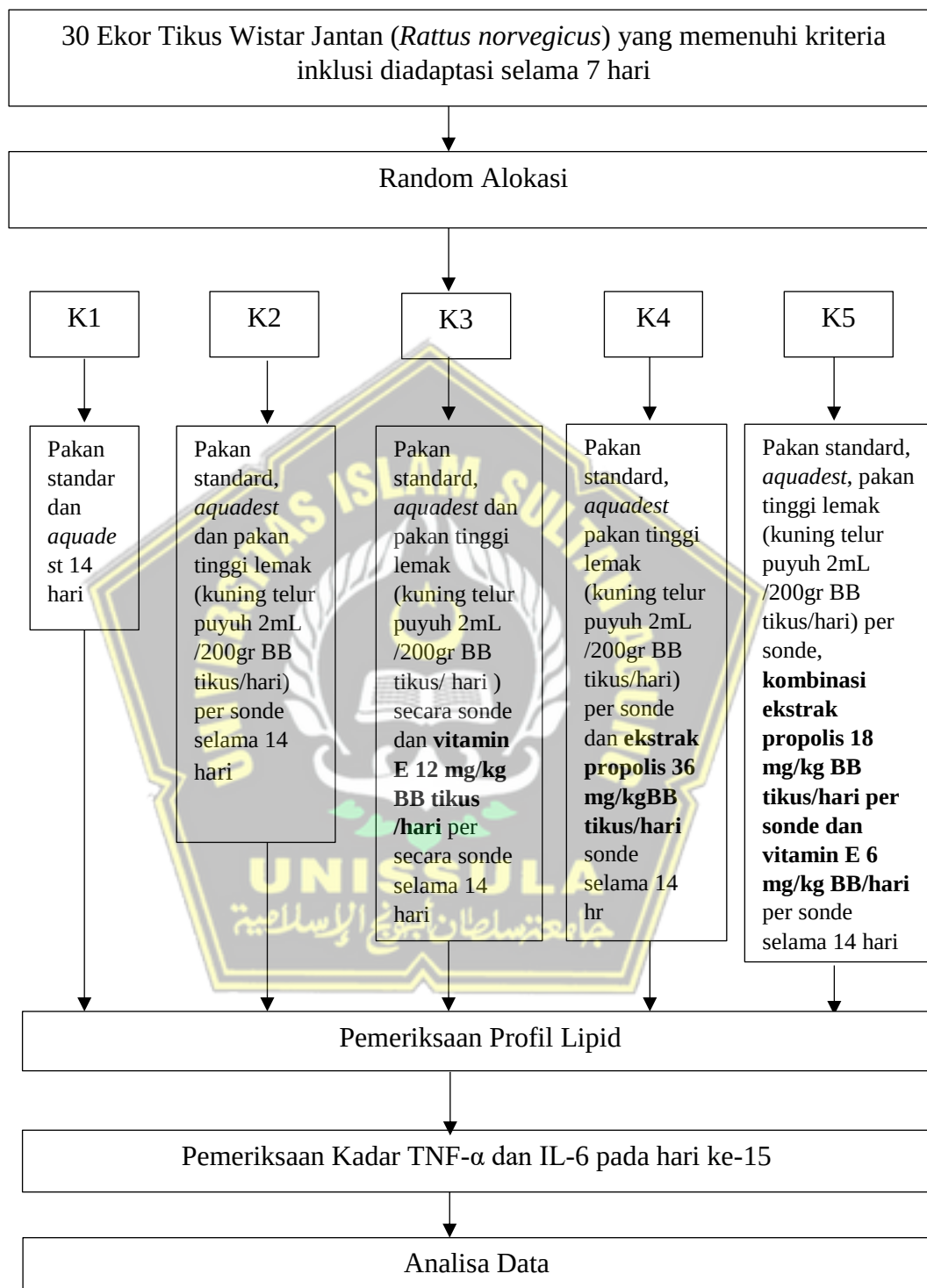
dan well tube standar. Campur kedua larutan, tutup dengan sealer, kemudian inkubasi selama 60 menit pada suhu 37° C.

5. Lepaskan sealer dan cuci plate sebanyak 5x dengan larutan buffer pencuci, kemudian rendam sumur dengan larutan pencuci sebanyak 300µL selama 30-60 detik setiap kali pencucian.
6. Tambahkan 50µL larutan substrat A ke dalam tiap lubang well tube, kemudian tambahkan 50 µL larutan substrat B ke dalam tiap lubang well tube. Kemudian lakukan inkubasi plate dengan ditutup sealer selama 10 menit dengan suhu 37° C di ruangan yang gelap.
7. Perlu ditambahkan 50µL stop solution ke tiap sumur, akan terjadi perubahan warna larutan dari biru menjadi kuning.
8. Nilai densitas optik (nilai OD) tiap sumur ditentukan dengan menggunakan pembaca plate mikro yang disetel ke 450 nm, selama kurun waktu 10 menit setelah ditambahkan larutan penghenti.

4.5.10 Pemeriksaan Profil Lipid

Pemeriksaan profil lipid dilakukan sebagai langkah awal sebelum pemeriksaan kadar TNF- α dan IL-6 untuk mengevaluasi pengaruh diet tinggi lemak terhadap perubahan kondisi lemak dalam darah.

4.5.11 Alur Penelitian



Gambar 4. 2. Alur penelitian

4.5.3 Analisa Data

Data yang sudah didapat dari pengujian kadar TNF- α dan IL-6 kemudian dilakukan pengujian dengan menggunakan SPSS. Data yang didapatkan dilakukan uji deskriptif dulu, untuk kemudian dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji variasi data dengan uji *Levene*.

Hasil uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) TNF- α dan IL-6 normal $p > 0,05$ dan hasil uji homogenitas (*Levene*) TNF- α dan IL-6 homogen dengan nilai $p > 0,05$. Hasil uji variasi data TNF- α dan IL-6 didapatkan normal dengan variasi homogen, maka dilakukan uji *One Way ANOVA*, yang mana hasilnya $p < 0,05$, maka terdapat perbedaan signifikan antara sebelum dan sesudah perlakuan. Hasil tersebut kemudian dilakukan uji lanjut *Post Hoc* LSD untuk mengetahui kelompok mana saja yang memberikan perbedaan bermakna. Uji *Post Hoc* LSD yang dilakukan memberikan hasil terdapat perbedaan bermakna antara kelompok diet tinggi lemak dan kelompok yang mendapat perlakuan.⁶⁰

4.5.11 Tempat Penelitian

Tempat penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium IBL Fakultas Kedokteran Unissula Semarang.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 HASIL PENELITIAN

5.1.1. Gambaran Umum tentang penelitian

Hewan coba menggunakan 30 ekor tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) berumur 10-12 minggu, berat badan awal 180-220 g, diperoleh dari kemining beserta *Certificate of Strains Wistar Rat*. Seluruh hewan dinyatakan sehat berdasarkan Surat keterangan Kesehatan Hewan No.008/SKKH/XI/2025 dari Dinas pertanian, pangan dan perikanan Kabupaten Karanganyar. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium IBL FK UNISSULA Semarang dengan suhu ruangan $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, dengan kondisi terang gelap selama 12 jam. Tikus diletakkan secara berkelompok dalam kandang plastic berjeruji logam. Aklimatisasi berjalan selama 7 hari. Pemberian makan dan minum tikus selama penelitian secara *ad libitum*.

Hewan coba dikelompokkan menjadi 5 kelompok, yang masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus Wistar jantan. Kelompok I (K1) merupakan kelompok tanpa induksi diet lemak dan hanya mendapatkan pakan standar. Kelompok II (K2) merupakan kelompok yang mendapatkan pakan standard dan induksi diet tinggi lemak berupa kuning telur puyuh 2mL /hari. Kelompok III (K3) merupakan kelompok yang mendapatkan induksi kuning telur puyuh 2mL/hari dan vitamin E 12 mg/200 g BB tikus/hari. Kelompok IV (K4) merupakan kelompok yang mendapatkan induksi kuning telur puyuh

2 mL/hari dan propolis 36mg/200g BB tikus/hari. Kelompok V (K5) mendapatkan induksi diet tinggi lemak 2mL/hari, propolis 18mg/200 g BB tikus/hari dan vitamin E 6 mg/200 g BB tikus/hari. Penelitian dilakukan selama 14 hari. Berat badan tikus ditimbang pada H0, H7 dan H14 penelitian. Pada hari ke-15 dilakukan pengukuran profil lipid dan analisa kadar TNF- α dan IL-6 menggunakan ELISA. Seluruh hewan coba dapat menyelesaikan penelitian hingga akhir, tidak ada yang *drop out* (mati), sehingga jumlah akhir tetap 30 tikus penelitian.

5.1.2. Hasil Penelitian Berat Badan Tikus

Penelitian mengenai pengaruh kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak telah berhasil dilakukan di IBL selama 14 hari. Pada penelitian tersebut dilakukan penimbangan berat badan 3x yaitu pada awal penelitian (H0), penelitian hari ke-7 (H7) dan hari ke-14 (H14). Berikut pada Tabel 5.1 adalah tabel rata-rata dan simpangan baku berat badan tikus pada H0 penelitian.

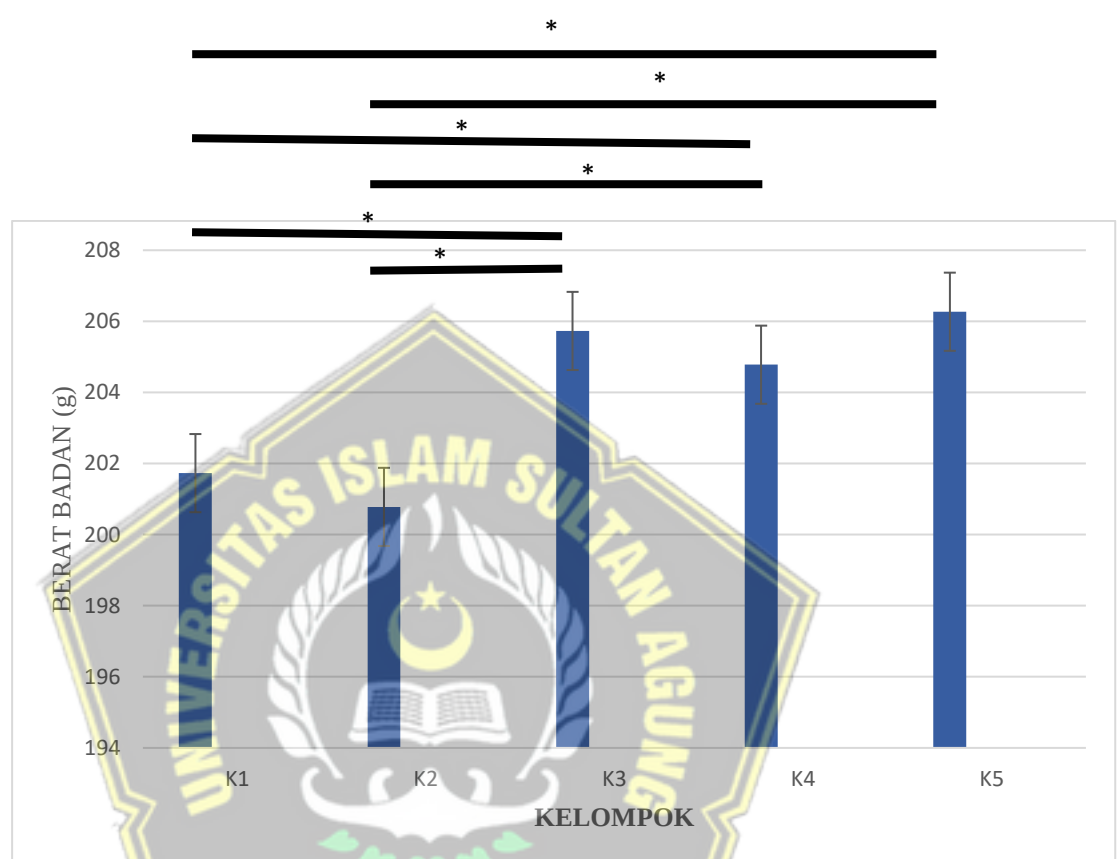
Tabel 5.1. Rerata (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (*Shapiro-Wilk*), Uji Homogenitas (*Levene*) dan Uji Beda Lebih Dari Dua Kelompok (*Kruskal Wallis*) Berat Badan Tikus (g) pada Hari ke-0 (H0)

Kelompok	K1	K2	K3	K4	K5	Sig (p)
<i>Mean</i>	201,43	200,78	205,73	204,78	206,27	
<i>Standar Deviasi</i>	2,144	0,075	4,278	4,575	4,524	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,001	0,212	0,255	0,042	0,040	
<i>Levene</i>						0,001
<i>Kruskal-Wallis</i>						0,006*

Uji *Kruskal-Wallis**** bermakna $p < 0,05$

Nilai rerata berat badan H0 tertinggi didapatkan pada K5 sebesar 206,27 $\pm$ 4,524 g, dan nilai rerata berat badan H0 terendah terdapat pada K2 sebesar 200,78 $\pm$ 0,075 g. Pada Tabel 5.1 didapatkan hasil bahwa pada H0, variasi berat badan pada uji normalitas (*Shapiro-Wilk Test*) tidak normal ($p > 0,05$) dan uji homogenitas (*Levene Test*) menunjukkan data terdistribusi tidak normal. Untuk menilai perbedaan antara lebih dari 2 kelompok dilakukan uji *Kruskal-Wallis* yang didapatkan hasil bermakna $p < 0,01$ ($p = 0,006$). Untuk melihat apakah terdapat perbedaan bermakna antara 2 kelompok perlakuan maka dilakukan uji lanjutan pada Gambar 5.1.

Gambar 5.1. Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) Mann Whitney U Yang dilakukan Untuk mengetahui Perbedaan Berat badan pada H0 (*Post Hoc* bermakna $p < 0,05$)



Uji analisis lanjutan pada Gambar 5.1 menyatakan terdapat perbedaan bermakna dari K1 dan K3 ($p=0,015$), K1 dan K4 ($p= 0,041$), K1 dan K5 ($p=0,026$), K2 dan K3 ($p=0,004$), K2 dan K4 ($p=0,015$) serta K2 dan K5 ($p=0,015$).

Berikut rerata dan simpangan baku masing-masing kelompok perlakuan selama penelitian pada Tabel 5.2

Tabel 5.2. Rerata dan Simpangan baku (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (Shapiro-Wilk), Uji Homogenitas Varians (Levene) dan Uji perbedaan Berat Badan (BB) tikus (g) Sebelum dan Sesudah Perlakuan

Kelompok	Statistik	BB H0	BB H7	BB H14
K1	Mean $\pm$ SD	200,60 $\pm$ 0,32	213,68 $\pm$ 10,04	213,91 $\pm$ 10,14
	Shapiro-Wilk	0,001	0,536	0,562
	Levene		0,056	
	Kruskal-Wallis		0,011*	
K2	Mean $\pm$ SD	200,78 $\pm$ 0,07	216,98 $\pm$ 14,80	228,30 $\pm$ 11,80
	Shapiro-Wilk	0,212	0,202	0,124
	Levene		0,002	
	ANOVA Robust		0,004*	
K3	Mean $\pm$ SD	205,73 $\pm$ 4,27	203,21 $\pm$ 5,31	203,46 $\pm$ 5,13
	Shapiro-Wilk	0,255	0,010	0,002
	Levene		0,469	
	Kruskal-Wallis		0,208	
K4	Mean $\pm$ SD	204,78 $\pm$ 4,57	204,48 $\pm$ 4,66	199,48 $\pm$ 0,99
	Shapiro-Wilk	0,042	0,067	0,027
	Levene		0,002	
	Kruskal-Wallis		0,003*	
K5	Mean $\pm$ SD	206,26 $\pm$ 4,52	205,45 $\pm$ 5,05	200,08 $\pm$ 0,16
	Shapiro-Wilk	0,040	0,005	0,070
	Levene		0,000	
	Kruskal-Wallis		0,003*	

Uji Anova Robust/Kruskal Wallis* bermakna $p < 0,05$

Hasil rerata dan simpangan baku berat tikus selama 14 hari penelitian dirangkum pada Tabel 5.2. Simpangan baku yang rendah menunjukkan bahwa variasi dan homogenitas berat badan tikus antar kelompok baik. Setelah perlakuan selama 14 hari didapatkan hasil bahwa kenaikan berat badan tikus tertinggi di K2, dari 200,78 $\pm$ 0,07 g menjadi 228,30 $\pm$ 11,80 g. K2 merupakan kelompok yang

hanya mendapatkan induksi diet tinggi lemak, sehingga mendapatkan kenaikan berat badan yang terbanyak. Kelompok yang mengalami perubahan berat badan paling sedikit adalah K5, yaitu kelompok yang mendapatkan kombinasi propolis dan vitamin E. Pada H14, kelompok K5 memiliki rerata $200,08 \pm 0,16$ g, mengalami perubahan berat badan paling sedikit diantara kelompok lainnya.

Hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* menunjukkan data perubahan berat badan pada K1 dan K2 terdistribusi normal ($p > 0,05$), namun pada K3, K4 dan K5 data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$). Kelompok K1, K4 dan K5 dilakukan uji *Kruskal-Wallis*, didapatkan hasil $p < 0,05$ artinya terdapat perbedaan berat badan bermakna sebelum dan sesudah penelitian. K3 dilakukan uji *Kruskal-Wallis* juga namun $p > 0,05$ yang berarti tidak terdapat perbedaan berat badan bermakna pada K3 sebelum dan sesudah penelitian. K2 memiliki data terdistribusi normal dan tidak homogen maka dilanjutkan uji *One Way ANOVA Robust* didapatkan hasil $p < 0,05$, yang berarti terdapat perbedaan bermakna berat badan sebelum dan sesudah penelitian.

Pola perubahan berat badan pada berbagai kelompok sesuai dengan jenis perlakuan yang diberikan Uji *Post Hoc Mann Whitney U* dapat dilihat pada Gambar 5.2.

Gambar 5.2. Diagram Batang Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) Mann Whitney U yang dilakukan untuk mengetahui Rata-rata Berat Badan Tikus (g) pada saat H0, H7, H14 Pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan

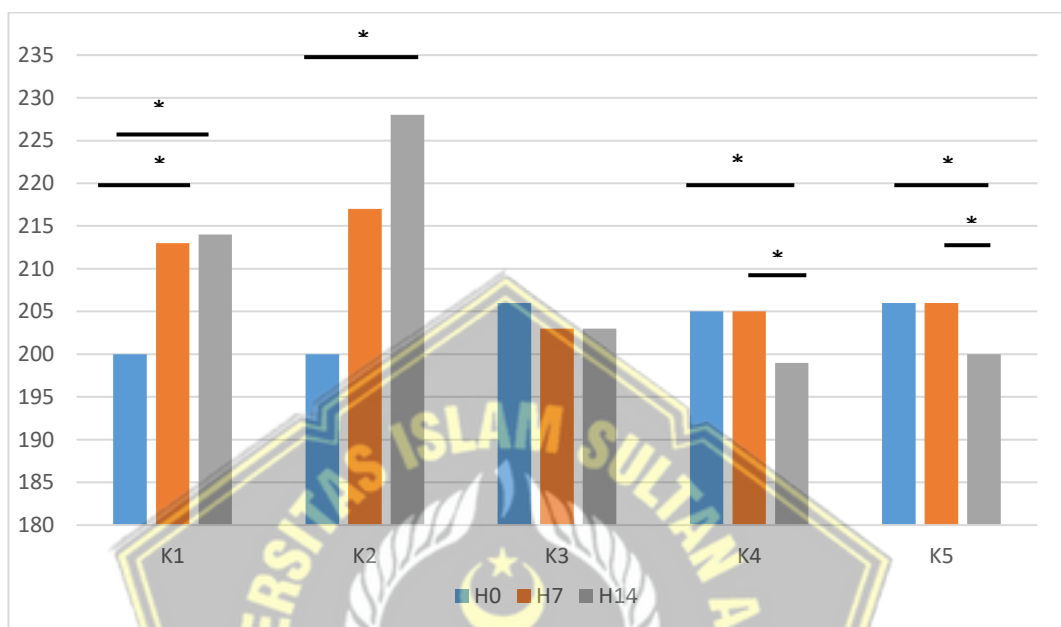


Diagram batang pada Gambar 5.2 menunjukkan adanya variasi yang timbul pada berat badan tikus akibat perlakuan selama 14 hari. Kenaikan berat badan tikus pada Gambar 5.1 tertinggi pada K2 dengan rerata sebesar 24.51 ± 12.43 g. K5 mengalami penurunan berat badan paling besar dengan rerata -6.18 ± 4.37 g.

Tabel 5.3. Rerata dan Simpangan baku (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*, Uji Homogenitas Varians (*Levene*), dan Uji Perbedaan (*Kruskal-Wallis*) Perubahan Berat Badan (g) Sebelum dan Sesudah Perlakuan pada Berbagai Kelompok Perlakuan

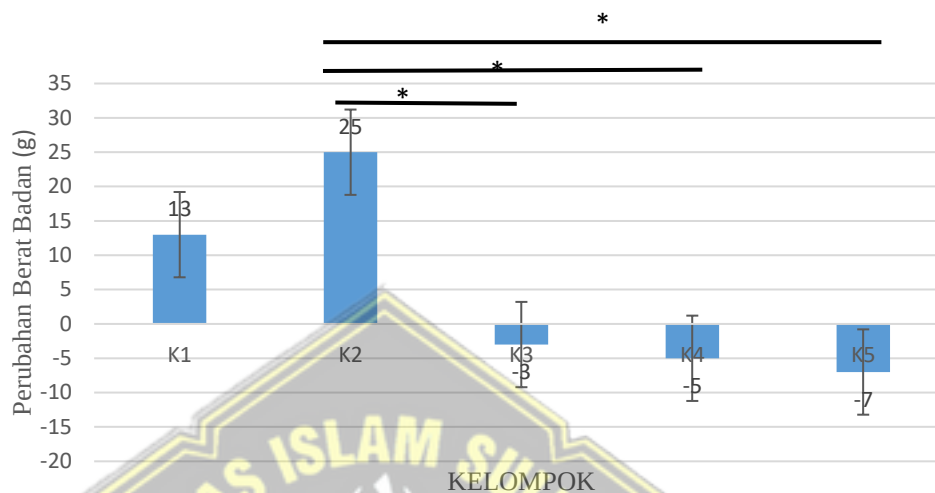
Statistik	K1	K2	K3	K4	K5
Mean	12,51	24,51	-2,26	-5,30	-6,18
Standar Deviasi	10,73	12,43	2,60	4,30	4,37
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,770	0,123	0,021	0,213	0,046
<i>Levene</i>	0,004				
<i>Kruskal Wallis</i>	0,000*				

Uji *Kruskal Wallis**** bermakna apabila $p < 0,05$

Hasil analisis perubahan berat badan tikus pada Tabel 5.3 menunjukkan peningkatan berat badan terbesar pada K2 sebesar $24,51 \pm 12,43$ g. K5 menunjukkan perubahan berat badan terkecil sebesar $-6,18 \pm 4,37$ g. Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal pada K1, K2 dan K4 ($p > 0,05$) dan pada K3 dan K5 data tidak terdistribusi normal.

Hasil uji *Kruskal Wallis* pada perubahan berat badan tikus sebelum dan sesudah perlakuan diatas menunjukkan hasil bermakna ($p < 0,05$). Untuk membedakan perubahan berat badan pada berbagai kelompok penelitian, digunakan Uji *Post Hoc Mann Whitney U* yang dapat dilihat pada Gambar 5.3.

Gambar 5.3. Diagram Batang Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) Mann Whitney U Yang Dilakukan Untuk Mengetahui Perubahan Berat Badan Tikus Pada Saat Sebelum dan Sesudah Perlakuan pada Berbagai Kelompok Perlakuan (Uji *Post Hoc bermakna $p < 0,05$)**



5.1.3. Hasil Pemeriksaan Profil Lipid

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan lipid berupa kolesterol total, HDL, LDL maupun Triglisericid pada hari ke-15. Data-data rerata, simpangan baku dan uji statistik dari pemeriksaan profil lipid tertuang dalam Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Rerata dan Simpangan Baku (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (*Shapiro-Wilk*), Uji Homogenitas (*Levene*) dan Uji Perbedaan Profil Lipid (mg/dL) pada Berbagai Kelompok perlakuan

PROFIL LIPID	K1	K2	K3	K4	K5	Sig (p)
Kolesterol Total						
Mean	82	91,50	67,50	64,33	64	
Std.Deviasi	14,71	23,18	10,19	11,20	18,24	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,545	0,174	0,001	0,081	0,614	
<i>Levene</i>						0,33
<i>Kruskal-Wallis</i>						0,023*
HDL						
Mean	51,33	42,67	39,83	40,50	40,00	
Std.Deviasi	12,44	9,14	6,46	6,16	13,04	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,907	0,863	0,006	0,198	0,619	
<i>Levene</i>						0,169
<i>Kruskal-Wallis</i>						0,431
LDL						
Mean	13,00	21,00	10,67	9,83	8,83	
Std.Deviasi	3,35	6,78	2,34	3,49	3,31	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,252	0,108	0,421	0,817	0,093	
<i>Levene</i>						0,084
<i>One way ANOVA</i>						0,000*
Trigliserid (TG)						
Mean	85,83	196,50	106,83	66,83	79,00	
Std.Deviasi	16,70	75,88	28,63	13,67	35,15	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,500	0,495	0,848	0,798	0,437	
<i>Levene</i>						0,036
<i>One way Anova Robust</i>						0,010*

Uji *Kruskal Wallis*/*ANOVA*/*ANOVA Robust** bermakna $p < 0,05$

Hasil rerata simpangan baku, uji normalitas, uji homogenitas dan uji perbedaan pada Tabel 5.4 disimpulkan terdapat perbedaan bermakna

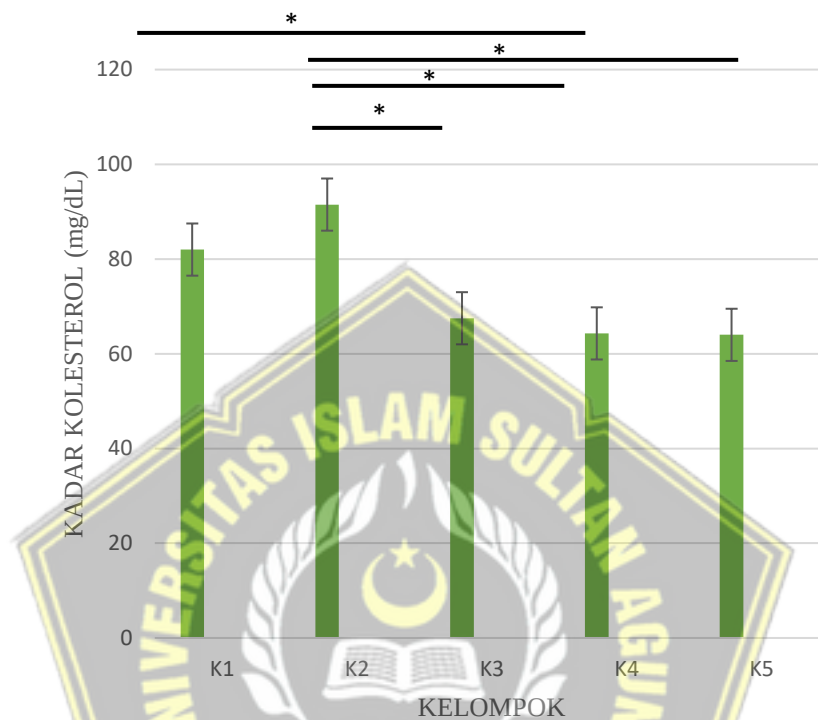
($p < 0,05$). kolesterol total ($p = 0,023$), LDL ($p = 0,000$) dan TG ($p = 0,010$) antar berbagai kelompok perlakuan. dan tidak terdapat perbedaan yang signifikan kadar HDL antar berbagai kelompok perlakuan ($p = 0,431$). Hal ini menunjukkan adanya pengaruh dari propolis dan vitamin E terhadap kadar kolesterol total, LDL dan TG pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak.

A. Kadar Kolesterol Total

Kadar Kolesterol total memiliki rerata tertinggi pada K2 dengan nilai $91,50 \pm 23,18$ mg/dL dan terendah pada K5 dengan nilai mean $64 \pm 18,24$ mg/dL. Uji normalitas data menunjukkan data terdistribusi normal pada semua kelompok kecuali K3. Uji homogenitas menunjukkan $p = 0,331$ ($p > 0,05$) sehingga data homogen. Uji statistik dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* dan didapatkan hasil $p = 0,023$ ($p < 0,05$) yang berarti ada perbedaan bermakna pada hipotesis.

Uji beda antara 2 kelompok menunjukkan adanya perbedaan kadar kolesterol yang bermakna pada beberapa kelompok perlakuan, bisa dilihat pada Gambar 5.4.

Gambar 5.4. Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) Mann Whitney U yang dilakukan untuk mengetahui perbedaan kadar kolesterol Total Antar kelompok (Uji *Post Hoc bermakna $p < 0,05$)**



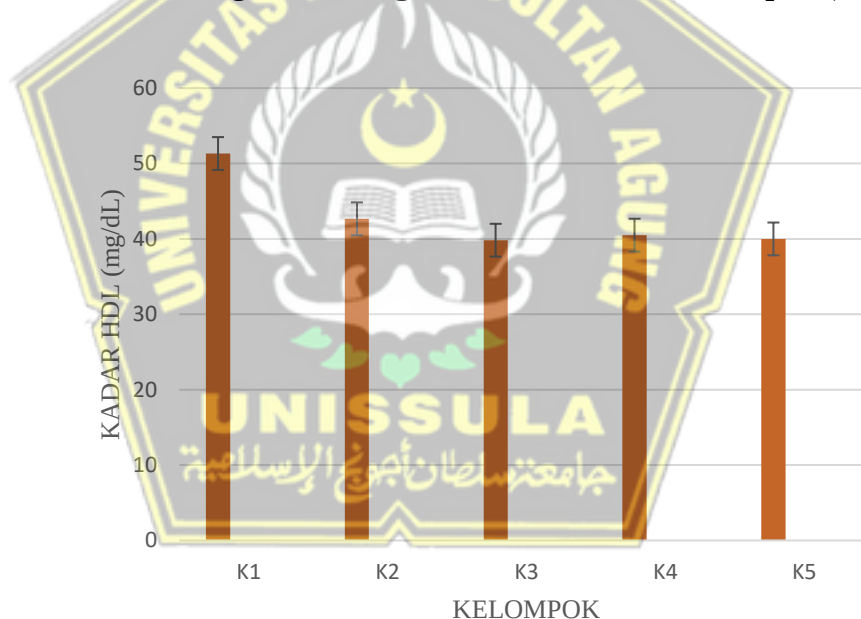
Uji beda antara 2 kelompok pada kadar kolesterol total menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada kelompok K1 dan K2, K2 dan K3 ($p=0,036$), kelompok K2 dan K4 ($p=0,016$) dan kelompok K2 dan K5 ($p=0,037$).

B. Kadar HDL

Rerata Kadar HDL pada Tabel 5.3 menunjukkan kadar HDL tertinggi pada K1 sebesar $51,33 \pm 12,43$ mg/dL dan terendah pada K3 sebesar $39,83 \pm 6,46$ mg/dL. Uji *Kruskal-Wallis* pada K3 menunjukkan $p > 0,05$, sehingga diambil kesimpulan tidak ada perbedaan bermakna kadar HDL

sebelum dan sesudah perlakuan. Hasil uji statistik kadar HDL memiliki rerata tertinggi pada K1 $51,33 \pm 12,44$ mg/dL dan terendah pada K3 dengan nilai $39,83 \pm 6,46$ md/dL. Pada uji *Shapiro-Wilk* untuk menunjukkan data tidak terdistribusi normal pada kelompok K3 ($p=0,006$), dilanjutkan uji *Levene* untuk mengetahui homogenitasnya, yang menunjukkan data homogen ($p=0,69$). Data tersebut dilanjutkan ke uji *Kruskal-Wallis* dimana didapatkan $p=0,431$ yang berarti tidak bermakna. ($p>0,05$). Diagram yang menunjukkan nilai rata-rata HDL masing-masing kelompok dapat dilihat pada Gambar 5.5.

Gambar 5.5. Diagram Batang Kadar HDL Antar kelompok (mg/dL)

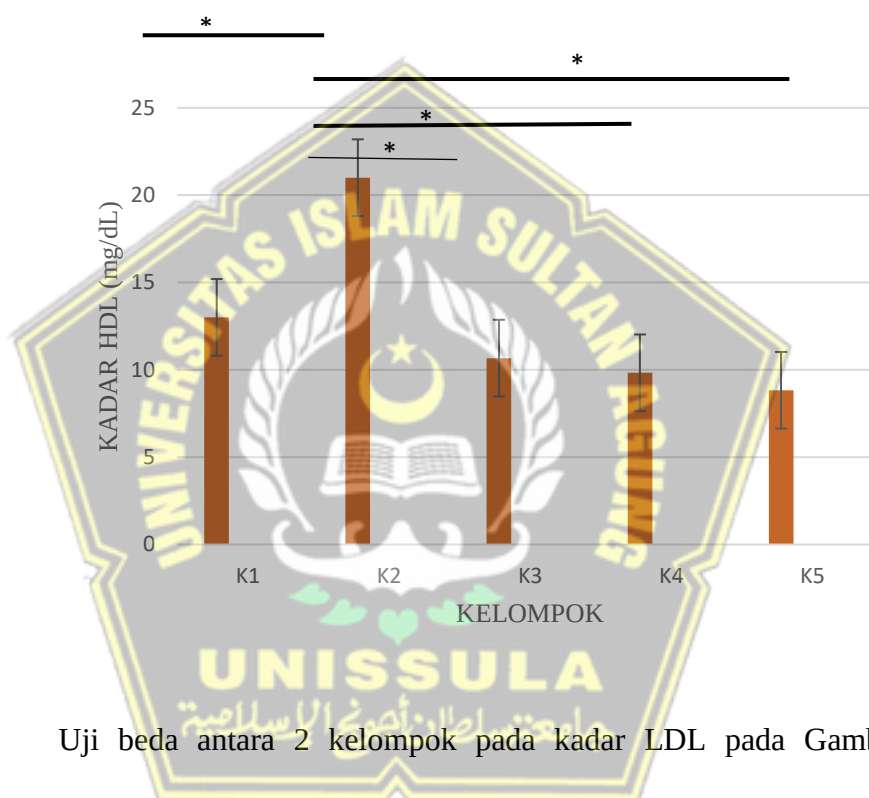


C. Kadar LDL

Kadar LDL pada Tabel 5.4 memiliki rerata tertinggi pada K2 dengan nilai $21 \pm 6,78$ mg/dL dan nilai terendah pada K5 dengan nilai $8,83 \pm 3,31$ mg/dL. Uji normalitas data menunjukkan semua data terdistribusi normal pada semua kelompok. Uji homogenitas data menunjukkan $p=0,084$

($p > 0,05$), yang berarti data homogen. Uji statistik dilanjutkan dengan uji *One way ANOVA* dengan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan bermakna.

Gambar 5.6. Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) LSD Yang Dilakukan Untuk mengetahui Perbedaan Kadar LDL Antar kelompok (Uji *Post Hoc bermakna jika $0 < 0,05$)**



Uji beda antara 2 kelompok pada kadar LDL pada Gambar 5.6 menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada kelompok K1 dan K2 ($p = 0,03$), kelompok K2 dan K3 ($p = 0,003$), kelompok K2 dan K4 ($p = 0,000$) dan kelompok K2 dan K5 ($p = 0,000$).

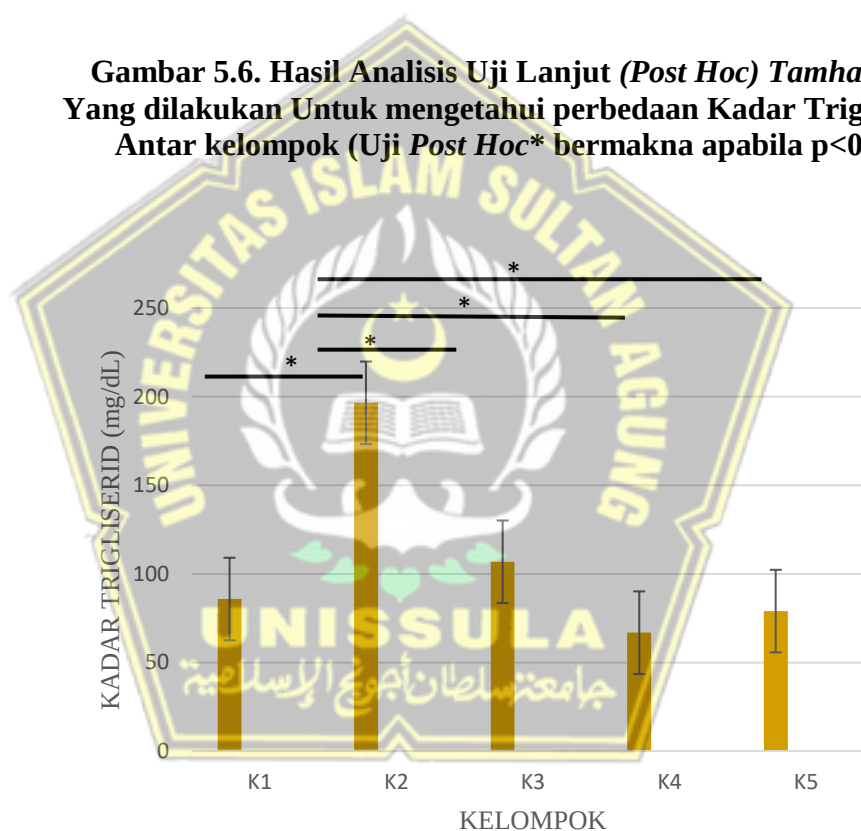
D. Kadar Triglisericid

Kadar TG pada Tabel 5.4. memiliki rerata tertinggi pada K2 dengan nilai $196,50 \pm 75,79$ mg/dL dan nilai terendah pada K4 dengan nilai $66,83 \pm 13,67$ mg/dL. Uji normalitas data menunjukkan semua data

terdistribusi normal pada semua kelompok. Uji homogenitas data menunjukkan $p=0,036$ ($p<0,05$), yang berarti data tidak homogen. Uji statistik dilanjutkan dengan uji *One way ANOVA Robust* didapatkan hasil $p=0,010$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan bermakna.

Hasil Uji Lanjut *Post Hoc* untuk kadar TG dapat dilihat pada Gambar 5.6.

Gambar 5.6. Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) *Tamhane T2* Yang dilakukan Untuk mengetahui perbedaan Kadar Trigliserida Antar kelompok (Uji *Post Hoc bermakna apabila $p<0,05$)**



Uji beda antara 2 kelompok terhadap kadar Trigliserid pada gambar 6.6 menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok K1 dan K2 ($p=0,000$), kelompok K2 dan K3 ($p=0,001$), kelompok K2 dan k4 ($p=0,000$) dan kelompok K2 dan K5 ($p=0,000$).

5.1.4. Hasil Pemeriksaan Kadar TNF- α

Hasil penelitian pengaruh kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E terhadap kadar TNF- α pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak tertuang dalam Tabel 5.4.

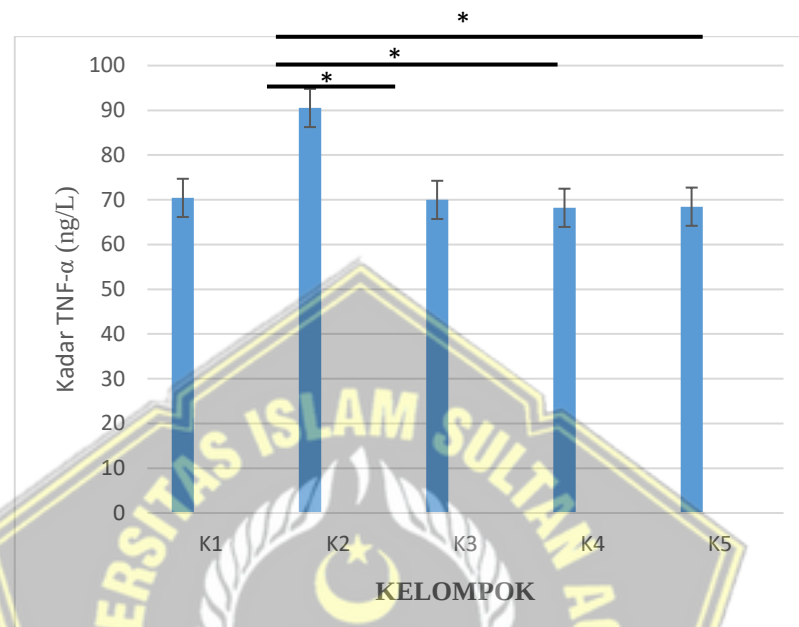
Tabel 5.5. Hasil Analisis Rerata (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (*Shapiro-Wilk*), Uji Homogenitas (*Levene*) dan Uji Beda Antar Lebih dari 2 Kelompok perlakuan pada kadar TNF- α (ng/L) pada Berbagai Kelompok Perlakuan

Variabel	Kelompok					Sig. (p)
	K1	K2	K3	K4	K5	
Kadar TNF-α (ng/L)						
Mean	70,43	90,53	69,98	68,21	68,46	
Std.Deviasi	9,46	10,48	9,47	3,97	15,39	
Shapiro-Wilk	0,481	0,234	0,332	0,812	0,107	
Levene						0,370
One way ANOVA						0,012*

Uji *One Way ANOVA**** bermakna apabila $p < 0,05$.

Berdasarkan hasil uji analisis statistik, rerata kadar TNF- α menunjukkan perbedaan diantara kelompok penelitian. Kadar TNF- α tertinggi didapatkan pada kelompok 2 dengan nilai $90,53 \pm 10,48$. Kadar TNF- α terendah didapatkan pada kelompok 4 dengan nilai $68,21 \pm 3,97$. Perbedaan rerata kadar TNF α menunjukkan variasi data yang cukup homogen antar kelompok penelitian. Diagram rerata kadar TNF- α dapat dilihat pada Gambar 5.8 berikut.

Gambar 5.8 Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) LSD Yang Dilakukan Untuk mengetahui Perbedaan Kadar TNF- α Antar kelompok (ng/L) (*Post Hoc bermakna jika $p < 0,05$)**



Hasil Uji Normalitas *Shapiro-Wilk* menunjukkan data kadar TNF- α pada K1 hingga K5 memiliki $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan data kadar TNF- α pada kelompok tersebut terdistribusi normal. Hasil uji homogenitas varians menggunakan uji *Levene* didapatkan $p = 0,370$ ($0 > 0,05$). Hal ini berarti varians data pada kelompok TNF- α bersifat homogen. Hasil uji beda lebih dari 2 kelompok perlakuan (*One Way ANOVA*) menunjukkan perbedaan bermakna kadar TNF- α $p = 0,012$ ($p < 0,05$). Uji untuk membedakan 2 kelompok perlakuan dengan *Post Hoc* terdapat perbedaan bermakna antara kelompok K2 dengan K3, K4 dan K5 (Tabel 5.5). Kadar TNF- α tidak berbeda bermakna antara K3 dengan K4 dan K5, demikian juga antara kelompok K4 dan K5 tidak berbeda bermakna.

Tabel 5.6. Hasil Uji Lanjut (*Post Hoc*) Kadar TNF- α Antar Kelompok

Kelompok	K2	K3	K4	K5
K1	0,006*	0,946	0,740	0,768
K2		0,005*	0,003*	0,003*
K3			0,791	0,820
K4				0,970

Uji *Post Hoc** bermakna apabila $p < 0,05$

5.1.5. Hasil Pemeriksaan Kadar Interleukin-6

Hasil penelitian pengaruh kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E terhadap kadar IL-6 pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak tertuang dalam Tabel 5.7.

Tabel 5.7. Hasil Analisis Rerata (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (*Shapiro-Wilk*), Uji Homogenitas (*Levene*) dan Uji Beda Antara Kelompok Perlakuan (*One Way ANOVA*) kadar IL-6 (ng/L) pada Berbagai Kelompok Perlakuan

Variabel	Kelompok					Sig. (p)
	K1	K2	K3	K4	K5	
Kadar IL-6 (ng/L)						
Mean	4,10	2,30	3,54	4,16	3,89	
Std.Deviasi	0,73	0,59	0,16	0,42	0,57	
Shapiro-Wilk	0,765	0,300	0,669	0,581	0,973	
Levene						0,332
One Way ANOVA						0,000*

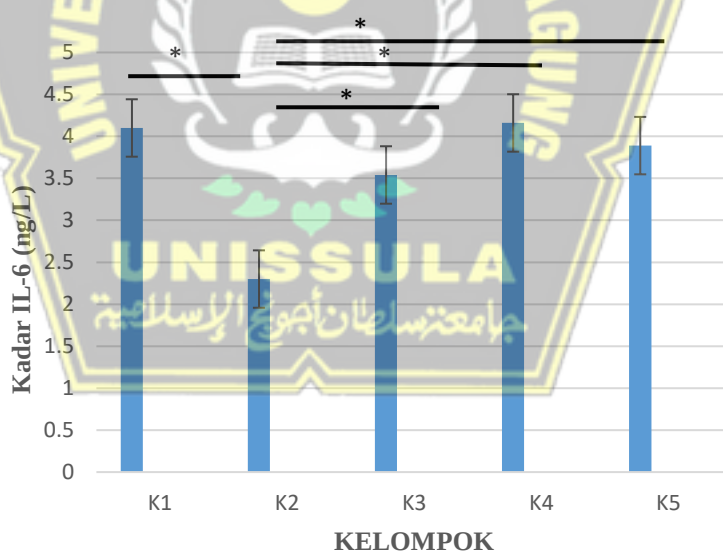
. Uji *One Way ANOVA**** bermakna apabila $p < 0,05$

Hasil uji analisis statistik kadar IL-6 menunjukkan perbedaan diantara kelompok penelitian. Kadar IL-6 tertinggi didapatkan pada kelompok 4 dengan nilai $4,16 \pm 0,42$ ng/L. Kadar IL-6 terendah didapatkan pada kelompok 2 dengan nilai $2,30 \pm 0,59$ ng/L. Uji normalitas *Shapiro-Wilk*

menunjukkan data terdistribusi normal pada semua kelompok ($p > 0,05$). Uji homogenitas (*Levene*) didapatkan hasil $p = 0,332$ ($p > 0,05$). Tabel 5.7 menunjukkan, data kadar IL-6 seluruh kelompok terdistribusi normal dan homogen, sehingga dilakukan analisis uji statistik parametrik. Hasil uji beda lebih dari 2 kelompok perlakuan (*One Way ANOVA*) menunjukkan perbedaan bermakna kadar IL-6 yaitu $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

Diagram rerata kadar IL-6 dan uji beda antara 2 kelompok penelitian IL-6 dapat dilihat pada Gambar 5.9.

Gambar 5.9. Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) LSD Yang Dilakukan Untuk Mengetahui Perbedaan Kadar IL-6 Antar Kelompok Perlakuan (ng/L) (Uji *Post Hoc bermakna $p < 0,05$)**



Analisis uji beda antara 2 kelompok IL-6 pada Tabel 5.8 untuk mengetahui kelompok mana yang menunjukkan perbedaan bermakna. Uji untuk membedakan 2 kelompok perlakuan dengan *Post Hoc* terdapat perbedaan bermakna antara kelompok K1 dan K2, K2 dengan K3, K4 dan K5

(Tabel 5.6). Kadar IL-6 tidak berbeda bermakna antara K3 dengan K4 dan K5, demikian juga antara kelompok K4 dan K5 tidak berbeda bermakna.

Tabel 5.8. Hasil Uji Lanjutan (*Post Hoc*) Kadar IL-6 Antar Kelompok

Kelompok	K2	K3	K4	K5
K1	0,000*	0,112	0,846	0,547
K2		0,002*	0,000*	0,000*
K3			0,078	0,305
K4				0,428

Uji *Post Hoc** bermakna apabila $p < 0,05$

5.2. PEMBAHASAN

Pola makan yang baik seharusnya mengandung nutrisi yang sehat dan seimbang dengan komposisi : 50% karbohidrat dengan indeks glikemik rendah, 30% lemak (60% berupa monounsaturated fatty acids (MUFA) dan 10% polyunsaturated fatty acids (PUFA) dan 20% protein).⁸ Pemberian diet tinggi lemak secara terus-menerus akan berkaitan erat dengan obesitas, inflamasi dan penyakit kronis lainnya.⁶¹ Peningkatan massa jaringan lemak dapat menyebabkan hiperplasia dan hipertrofi dari adiposit.⁸ Jaringan lemak menyimpan kelebihan kalori, disimpan sebagai cadangan energi dalam bentuk trigliserid. Jaringan lemak tersusun dari banyak tipe sel seperti adiposit, preadiposit, sel endothelial dan sel imun. Pemberian diet tinggi lemak terus-menerus akan menghasilkan asam lemak bebas yang tinggi dalam sirkulasi.¹¹ Adiposit dan jaringan adiposa menyimpan sejumlah sel lemak termasuk trigliserida dan kolesterol, serta berfungsi sebagai organ endokrin aktif dan sel imun (*Immune stand point*).⁸ Asam lemak bebas yang

tinggi akan mengaktifkan *toll-like receptor complex 4* (TLR4) dan menstimulasi munculnya sitokin proinflamasi seperti TNF- α .⁶² Kuning telur puyuh sebagai diet tinggi lemak memiliki keunggulan kandungan kolesterol yang tinggi (844mg/100gr), rasio PUFA/SFA rendah dan rasio ω -6/ ω -3 lebih tinggi sehingga bersifat proinflamasi.⁴⁸

A. Dinamika Sitokin TNF- α pada masing-masing kelompok

Kelompok K2 memiliki nilai rerata TNF- α tertinggi sebesar $90,53 \pm 10,48$ ng/L. K3, K4 dan K5 memiliki nilai rerata TNF- α sebesar $69 \pm 9,47$ ng/L, $68,21 \pm 3,97$ ng/L dan $68,46 \pm 15,39$ ng/L. Secara statistik, kadar TNF- α sebelum dan sesudah perlakuan mengalami perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Uji lanjutan menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok pada K2 dan K3, K2 dan K4 dan K2 dan K5.

Hal ini menunjukkan diet tinggi lemak menimbulkan inflamasi, dan ekstrak propolis dan vitamin E mampu meredam inflamasi tersebut baik secara tunggal maupun kombinasi.

Inflamasi pada diet tinggi lemak juga merupakan manifestasi dari peningkatan stress oksidatif yang diakibatkan oleh terbentuknya ROS selama pertumbuhan jaringan hipoksia.⁵¹ Mekanisme inflamasinya terkait dengan adanya jaringan adiposa yang memproduksi adipokin dan protein fase akut yang dipicu selama hipoksia.⁵² Penurunan aliran darah ke jaringan adiposa menyebabkan hipoksia jaringan, sehingga meningkatkan proses angiogenesis dalam rangka meningkatkan suplai oksigen ke jaringan.²³ Proses ini juga akan

meningkatkan sitokin proinflamasi. Jaringan adiposa bersifat parakrin dan menghasilkan sitokin dan mediator bioaktif dalam jumlah besar seperti leptin, adiponektin dan sitokin proinflamasi seperti TNF- α .⁶³ Pemberian diet tinggi lemak juga mempengaruhi mikrobiota usus, dengan mengubah interaksi mikrobiota usus, mengubah komposisi, meningkatkan bakteri patogen yang meningkatkan lipopolisakarida (LPS).⁶³ Diet tinggi lemak akan meningkatkan kilomikron, yang mana kilomikron akan meningkatkan lipopolisakarida yang akan mempenetrasi epitel intestinal dan memasuki sirkulasi darah, menyebabkan endotoxinemia dan inflamasi.²³ Komplek kilomikron-LPS juga meningkatkan tekanan intraseluler dan menurunkan integritas *tight junction* sehingga mudah terjadi ruptur membran basal. Hal ini juga menyebabkan peningkatan permeabilitas membran, endotoxinemia dan meningkatkan sitokin proinflamasi seperti TNF- α .²³

Penyebab inflamasi lainnya adalah disfungsi dari mitokondria. Penggunaan energi yang besar akan meningkatkan metabolisme mitokondria dan mengaktifkan *electron transport chain* (ETC) yang akan mengganggu metabolisme lipid.²³ Penambahan jumlah jaringan adiposa juga meningkatkan stress oksidatif.²³ Peningkatan ROS yang diakibatkan diet tinggi lemak diaktifkan melalui jalur seperti NADPH oksidase (NOX) dan protein kinase C (PKC). Peningkatan ROS mengakibatkan peroksidasi lipid, karbonilasi protein dan penurunan antioksidan endogen seperti glutathione (GSH).²³

Vitamin E (α -tocopherol) merupakan vitamin larut lemak, bersifat antioksidan, mempunyai efek protektif terhadap membran sel, mampu mencegah peroksidasi lipid dan juga memiliki efek antiinflamasi.⁶⁴ Vitamin E memiliki efek *scavenger* yang tinggi, mampu menangkap radikal bebas dan menurunkan ROS dalam tubuh.⁶⁵ Vitamin E berperan dalam menekan inflamasi dengan menjaga membran intestinal, sehingga tidak terjadi endotoxemia dan menyebabkan inflamasi sistemik.⁵⁵ Vitamin E berperan dalam menghambat jalur NF- κ B yang nantinya akan memproduksi sitokin proinflamasi, sehingga inflamasi tidak terjadi.⁵⁵ Penelitian mengenai vitamin E mengemukakan perannya sebagai antihiperkolesterolemia, anti obesitas, anti diabetes dan anti hipertensi dengan dosis 10-50mg/kgBB selama 4 minggu.⁵¹ Vitamin E dengan dosis 1,8 IU/200 g BB tikus selama 4 minggu terbukti mampu menahan stress oksidatif dan mengurangi inflamasi.¹⁵ Beberapa studi metaanalisis sudah membuktikan pengaruh vitamin E dalam mengurangi sindroma metabolik.⁵¹ Peran Vitamin E dalam metabolisme lipid erat hubungannya dengan kemampuannya mempengaruhi HMG Co A reductase, suatu enzim yang membentuk kolesterol.⁵¹ Pada penelitian ini, kelompok yang mendapatkan vitamin E saja (K3), memiliki nilai TNF- α yang rendah (69.98 ± 9.47 ng/L) yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang hanya diberi diet tinggi lemak (K2). Secara statistik, pengaruh vitamin E terhadap berat badan dan sitokin proinflamasi TNF- α adalah $p < 0.05$, yang artinya vitamin E memiliki pengaruh signifikan terhadap kadar sitokin proinflamasi seperti TNF- α pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak.

Ekstrak propolis merupakan kompleks resinous natural yang dihasilkan lebah, yang memiliki kandungan bioaktif flavonoid seperti chrysin, luteolin, apigenin dan kampferol, asam fenolik seperti CAPE, *coumaric acid*, serta mineral dan vitamin. Aktivitas biologisnya bersifat antiinflamasi, antioksidan, antibakterial, imunomodulator, antivirus, anti caries dan anti cancer.⁵ Ekstrak propolis juga berperan dalam mempengaruhi metabolisme lipid dengan menghambat adipogenesis, menghambat differensiasi adiposit, dan menghambat ekspresi protein yang mempengaruhi metabolisme lipid. CAPE menghambat differensiasi dari adiposit seperti PPAR γ , adiposit spesifik *fatty acid binding protein* (aP2), C/EBP- α dan *synthase* FFA.⁵ Peran ekstrak propolis dalam metabolisme lipid mengakibatkan propolis berperan dalam menurunkan sitokin proinflamasi seperti TNF- α .⁵ Ekstrak propolis menghambat jalur TLR4 dan NF-K β sehingga sitokin proinflamasi tidak terbentuk.¹ K4 memiliki nilai kadar TNF- α lebih rendah daripada kelompok lainnya yaitu sebesar 68,21 $\pm$ 3,97 ng/L. Secara statistik, pengaruh ekstrak propolis terhadap TNF- α bermakna ($p < 0.05$). Hal ini membuktikan bahwa ekstrak propolis mampu bekerja dengan baik dalam hal menekan produksi sitokin proinflamasi akut, seperti TNF- α pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak.

Kombinasi vitamin E dan ekstrak propolis pada K5 juga menunjukkan sinergitas. Nilai TNF- α pada K5 salah satu yang mengalami penurunan terbanyak sebesar (68,46 $\pm$ 15,39 ng/L) dibandingkan dengan K2 yang memiliki nilai sebesar (90,53 $\pm$ 10,48 ng/L). Uji statistik menunjukkan adanya

perbedaan bermakna $p < 0,05$, kemudian uji lanjutan menunjukkan adanya perbedaan bermakna K2 dan K5. Hal ini menunjukkan adanya sinergitas efek antiinflamasi pada pemberian ekstrak propolis dan vitamin E dibandingkan yang hanya mendapatkan diet tinggi lemak saja. Pemberian dosis pada K5 yang sebesar separuh dari K3 dan K4 disini dimaksudkan untuk mengurangi toksisitas vitamin E, yang mana apabila diberikan dalam jumlah besar akan menjadi prooksidan.⁵² Kombinasi ini juga diberikan karena pemberian keduanya secara bersamaan akan meningkatkan efektivitas dari masing-masing zat aktif.⁴ Melihat hasil dari K5, maka boleh disimpulkan bahwa kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E yang diberikan dalam dosis sedang juga memiliki pengaruh dalam menurunkan sitokin proinflamasi dan meredakan peradangan.

B. Dinamika Sitokin IL-6 pada masing-masing kelompok

Kadar IL-6 tertinggi terdapat pada K4 sebesar $4,16 \pm 0,42$ ng/L dan kadar IL-6 terendah terdapat pada K2 sebesar $2,30 \pm 0,59$ ng/L. Nilai kadar IL-6 pada K3 dan K5 adalah sebesar $3,54 \pm 0,16$ ng/L dan $3,89 \pm 0,57$ ng/L. Nilai pada kelompok control K1 adalah sebesar $4,10 \pm 0,73$ ng/L. Hasil statistik menunjukkan adanya perbedaan bermakna kadar IL-6 sebelum dan sesudah perlakuan ($p < 0,05$) dan uji lanjutan antar kelompok menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok K2 dan K3, K2 dan K4 serta K2 dan K5.

IL-6 merupakan sitokin *pleiotropic*, mempunyai peran ganda baik sebagai sitokin proinflamatori maupun sitokin anti-inflamatori.²³ Pada K4, ekstrak propolis berhasil paling menekan munculnya sitokin TNF- α , namun angka IL-6 merupakan yang tertinggi diantara kelompok lainnya. Hal ini memunculkan kontradiktif dimana biasanya, kenaikan TNF- α muncul seiring dengan kenaikan IL-6. Kondisi ini mungkin erat kaitannya dengan sifat imunomodulator dari propolis. Propolis memiliki fungsi sebagai imunomodulator, bekerja untuk meningkatkan sistem imun untuk menghambat inflamasi yang sedang terjadi⁵. Aktivitas imunomodulator dari ekstrak propolis erat kaitannya dengan zat aktifnya seperti CAPE, *cinnamic acid*, dan kandungan flavonoid yang mana akan mengaktifkan sel imun, termasuk sel limfoid dan monosit, dimediasi oleh jalur MAPK dan inhibisi NF- κ B.⁶⁶ Sifat imunomodulator dari ekstrak propolis memungkinkan sel imun seperti makrofag, untuk menghalau inflamasi yang terjadi akibat kenaikan TNF- α . Faktor transkripsi eukariotik mengaktifkan *nuclear factors* dari sel T (NFAT) dan NF- κ B.⁶⁶ Faktor utama dari sifat imunomodulator ini sebenarnya adalah IL-2 dan IL-2R yang penting dalam aktivasi dan proliferasi sel T. kandungan propolis seperti *cinnamic acid*, menginduksi pelepasan sitokin seperti IL-1, IL-6 dan IL-8 untuk mengaktifasi makrofag memproduksi antibodi limfosit B.⁶⁶ K4 merupakan kelompok yang mendapatkan propolis dosis tinggi, sebesar 36 mg/200gr Bb tikus/ hari. Dosis ini memungkinkan untuk mengaktifkan sifat imunomodulator maupun antiinflamasi dari ekstrak propolis.⁶⁶

IL-6 juga memiliki peran sebagai sitokin *pleiotropic*. Jalur IL-6 yang melewati jalur *trans signaling*, melalui sIL-6 dan ADAM17 maka IL-6 bisa berfungsi sebagai antiinflamatori karena akan menginduksi sel Th 2 dan IL4.. Jalur IL-6 yang melalui STAT 3 (*classic signaling*) akan menghasilkan sel Th17 yang merupakan proinflamatori. Mekanisme ini mampu menjelaskan mengapa kadar IL-6 pada K4 merupakan yang paling tinggi diantara lainnya, meskipun kadar TNF- α paling rendah. Hal ini disebabkan ekstrak propolis mampu menginhibisi inflamasi ditandai dengan menurunnya kadar TNF- α dan menjadi agen imunomodulator dengan naiknya IL-6 sebagai sitokin *pleiotropic*.

Pada kelompok dengan vitamin E (K3 dan K5), kadar IL-6 lebih rendah daripada K1 dan K4 tapi lebih tinggi dari K2. Peran vitamin E sebagai antiinflamasi disini membantu peran ekstrak propolis sebagai imunomodulator. Vitamin E mampu menangkap ROS, menjaga membran sel dari peroksidasi lipid, dan menghambat inflamasi dari inhibisi NF- κ B⁵⁵, sehingga kebutuhan tubuh untuk menaikkan IL-6 setinggi K4 berkurang karena beban antiinflamasinya sudah diredam oleh vitamin E. Secara statistik, pemberian ekstrak propolis dan vitamin E memberikan hasil bermakna ($p < 0,05$). Hal ini membuktikan, adanya pengaruh ekstrak propolis dan vitamin E terhadap kadar IL-6 pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak, dalam hal ini sebagai imunomodulator dan sebagai sitokin *pleiotropic*.

Pada saat inflamasi, TNF- α merupakan *first responder*, sitokin yang pertama kali keluar. TNF alfa dideteksi terjadi peningkatan kadar dalam

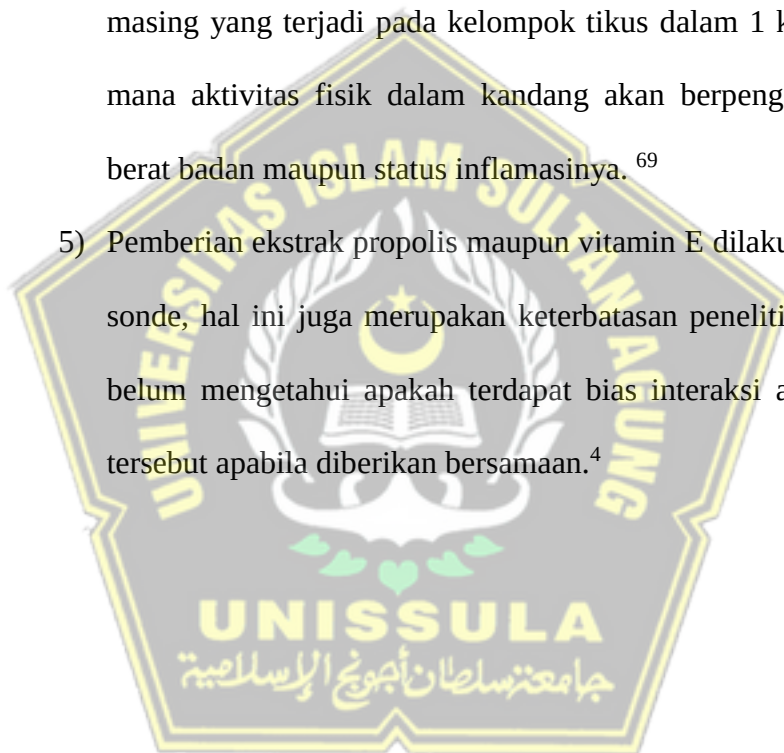
waktu 2 jam setelah adanya stimulasi. Kadar IL-6 baru muncul setelah 4-6 jam setelah stimulasi.⁶⁷ Pada diet tinggi lemak, stimulasi berlangsung secara pelan dan lama. Untuk mencapai inflamasi, dibutuhkan waktu yang lebih lama daripada infeksi. Beberapa penelitian mengemukakan bahwa TNF- α sudah meningkat sejak 1 minggu setelah pemberian kuning telur puyuh.⁸ Hal ini berarti inflamasi yang terjadi memicu peningkatan sitokin proinflamasi TNF- α . Kadar IL-6 normal dalam darah adalah 1-5pg/mL.⁶⁸ Kelima kelompok menunjukkan kadar IL-6 dibawah 6 ng/mL. Hal ini menunjukkan, meskipun perbedaan kadar masing-masing kelompok terjadi, kadar semua kelompok dari K1 sampai K5 masih dalam batas normal. Kadar IL-6 yang demikian menunjukkan inflamasi pada tikus tersebut sudah mulai mengarah ke pemulihan, ditandai dengan IL-6 yang muncul sebagai *pleiotropic* sitokin.

C. Keterbatasan Penelitian

Kami menyadari adanya keterbatasan dari penelitian ini.

- 1) Penelitian ini menempatkan 1 kelompok tikus ke dalam 1 kandang menyebabkan sisa pakan masing-masing kurang dapat diukur. Hal ini menyebabkan masing-masing tikus mungkin mendapat jumlah pakan yang berbeda antara satu dan lainnya, sehingga berpengaruh terhadap status gizi masing-masing tikus.⁶⁹
- 2) Pengambilan sampel dalam penelitian ini hanya di akhir (*post-test only*). Hal ini menyebabkan kondisi tikus sebelum perlakuan tidak diketahui.

- 3) Kelompok kontrol (K1) hanya mendapatkan pakan standar dan tidak mendapatkan perlakuan apapun. Hal ini menyebabkan bias kondisi inflamasi yang mungkin berbeda dengan kelompok lain yang mendapatkan sonde untuk pemberian kuning telur puyuh, ekstrak propolis dan vitamin E.⁷⁰
- 4) Penelitian ini juga tidak memperhitungkan aktivitas fisik masing-masing yang terjadi pada kelompok tikus dalam 1 kandang, yang mana aktivitas fisik dalam kandang akan berpengaruh terhadap berat badan maupun status inflamasinya.⁶⁹
- 5) Pemberian ekstrak propolis maupun vitamin E dilakukan dalam 1x sonde, hal ini juga merupakan keterbatasan penelitian kami yang belum mengetahui apakah terdapat bias interaksi antara dua zat tersebut apabila diberikan bersamaan.⁴



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

6.1.1. Pemberian diet tinggi lemak berupa kuning telur puyuh 2mL/ekor/hari berpengaruh terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.

6.1.2. Pemberian ekstrak propolis 36 mg/200 g BB tikus/hari berpengaruh terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.

6.1.3. Pemberian vitamin E 12 mg/200 g BB tikus/hari berpengaruh terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.

6.1.4. Pemberian kombinasi ekstrak propolis 18 mg/200 g BB tikus/hari dan vitamin E 6mg/200 g BB tikus/hari berpengaruh terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diinduksi diet tinggi lemak.

6.2 Saran

6.2.1. Perlu adanya pemeriksaan kadar TNF- α dan IL-6 sebelum penelitian (*pre dan post experimental design*).

6.2.2. Perlu adanya pemberian kandang untuk masing-masing tikus untuk mengeliminasi faktor perancu yang mungkin timbul.

6.2.3. Perlu dipertimbangkan pemberian masing-masing obat, baik ekstrak propolis maupun vitamin E secara sonde terpisah untuk menghindari bias interaksi obat.





DAFTAR PUSTAKA

1. Zulhendri F, Lesmana R, Tandean S, Christoper A, Chandrasekaran K, Irsyam I, Suwantika AA, Abdulah R, Wathoni R. Recent Update on the Anti-Inflammatory Activities of Propolis. *Molecules* vol. 27 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules27238473> (2022).
2. Malesza IJ, Malsza M, Walkowiak J, Mussin N, Walkowiak D, Aringazina R, Bartkowiak-Wieczorec B, Madry E. High-fat, western-style diet, systemic inflammation, and gut microbiota: A narrative review. *Cells* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells10113164> (2021).
3. Xu F, Yu Z, Liu TF, Chen WY, Du T, Yu L, Zhai Q. A High-Fat, High-Cholesterol Diet Promotes Intestinal Inflammation by Exacerbating Gut Microbiome Dysbiosis and Bile Acid Disorders in Cholecystectomy. *Nutrients* 15, (2023).
4. Sajjad S, Malik H, Manzoor F. Synergistic potential of propolis and vitamin E against sub-acute toxicity of AlCl₃ in albino mice : in vivo study. *Physiologic Research*. (2019). 68 (1) 67-74.
5. Zhu L, Zhang J, Yang H, Li G, Deng Z, Zhang B. Propolis polyphenols: A review on the composition and anti-obesity mechanism of different types of propolis polyphenols. *Frontiers in Nutrition* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1066789> (2023).
6. Lee GY , Han SN. The role of vitamin E in immunity. *Nutrients* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nu10111614> (2018).
7. Popko K, Popko E, Gorska A, Stelmaszczyk-Emmel R, Plywaczewski, A, Stoklosa D, Gorecka B, Pyrak U. Demkow. Proinflammatory Citokines IL-6 dan TNF- α in the development of obese patients. *European Journal of medical research*. (2010) 15 (Suppl II) : 120-122
8. Trisnadi RA, Wibowo JW, Thomas S. Pengaruh Diet Tinggi lemak terhadap kadar TNF- α . *Penelitian suara Forikes* Vol 1. <https://doi.org/10.33846/sf12205> (2021) doi:10.33846/sf12205.
9. Toader M, Taranu, T, Constantine MM, Olinici D, Mocanu, M, Costan VV, Toader S . High serum level of interleukin-6 is linked with dyslipidemia in oral lichen planus. *Exp Ther Med* 22, (2021).
10. Ahmed B, Sultana R. & Greene MW. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 137 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111315> (2021).
11. Kesh SB, Sarkar D, Manna K. High-Fat Diet-Induced Oxidative Stress and Its Impact on Metabolic Syndrome: A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical research*. Vol 9 Issue 1 (2019).
12. Parandin R. & Daroogari S. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities of the Ethanolic Extract of Propolis in Male Mice and Rats. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* In Press, (2019).
13. Firdaus C, Chodijah, Nasihun.T. CMCE Propolis Extract Improve Caspase 3 Expressions of The Hepatocytes and IL-6 Levels in Rats Exposed with

CC14. *Sains Medika Journal of Medicine and Health*. Vol. 10, No. 2, July - December 2020 : 67-73

14. Subagio WH, Widyastiti SN. Pengaruh suplementasi vitamin E (α -tokoferol) terhadap kadar gamma glutamil transferase (ggt) dan kadar nitric oxide (no) pada tikus (Studi pada tikus rattus novergicus strain wistar jantan terpapar inhalasi uap benzene). *Jurnal Gizi Indonesia*. ISSN : (1858-4942). (2015).
15. Ratnawati R, Zulaikhah ST, Hussaana A & Pratama, AA. Effect of Tender Coconut Water Powder Enriched with Vitamin E in Preventing Oxidative Stress of Diabetes Male Wistar Rats. *Pharmacognosy Journal* 16, 1062–1068 (2024).
16. Tazeoğlu D, Akyuz C, Gokceimam M, Kamali GH, Ozsoy A, Karahan SR. Effect of alpha-tocopherol and dose sensitivity on pancreatitis formation in rats with experimental pancreatitis. *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi* 27, 605–612 (2021).
17. Idriss HT & Naismith JH. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50, 184–195 (2000).
18. Supit IA., Pangemanan, D. H. C. & Marunduh, S. R. Profil Tumor Necrosis Faktor (TNF- α) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (IMT) Pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran UNSRAT Angkatan 2014. *Jurnal e-Biomedik (eBm)* vol. 3 (2015).
19. Alia M, Iriani Y & Anwar Z. Kadar Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Sebagai Prediktor Demam Berdarah Dengue Pada Hari Ketiga. *Majalah Kedokteran Sriwijaya* Vol. 46 (2014).
20. Melenotte C, Silvin A, Goubet AG, Lahmar I, Dubuinson A, Zumla A, Raoult D, Merad M, Gachot B, Henon C, Solary E, Fontenay M, Andre F, maeurer M, Ippolito G, Piacentini M, Wang FS, Ginhoux F, marabelle A, Koremer G, Derosa L, Zityogel L. Immune Response During Covid-19 Infection. *Oncoimmunology*. 2020 Aug 25; 9 (1): 1807836. Doi: 10.1080/2162402X.2020.1807836. PMID : 32939324. PMCID : PMC74808012.
21. Hammami S, Ghzaïel I, Hammouda S, Sakly N, Hammami M, Zarrouk A. Evaluation of pro-inflammatory cytokines in frail Tunisian older adults. *PLoS One* 15, (2020).
22. Suprpto N, Novianto E, Sofiati A, Hoemardani D. Penggunaan Anti TNF- α dibidang Dermatologi. *J Indon Med Assoc*, Volum: 72, Nomor: 5, Oktober - November 2022
23. Indriaputri, C. Effect of High Fat Diet on Serum TNF- α levels, a marker of low Grade Inflammation. *Jurnal Biosains Pascasarjana* 26, 38-51 (2024).
24. Wang H, Chen H, Liu M, Zhang J, Tian Y, Hou H, Hu Q. Effects of Smoking on Inflammatory-Related Cytokine Levels in Human Serum. *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 27,12 3715. 9 Jun. 2022, doi:10.3390/molecules2712371
25. Palhares C, Silva AP, Tome JM, da Silva MP, Rodriguez-Junior V, Ribeiro FA, Oliveira MM, Fonseca ECR, Valle IA, Borges MF. Alterations in the

- inflammatory markers of the TNF- α system in overweight and obese children and adolescents. *PLos one* 20,(2025).
26. Montfort A, Colacios C, Andrieu-Abadie N, Meyer N, Segui B. The TNF Paradox in cancer progression and immunotherapy. *Frontiers in Immunology* vol 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01818> (2019).
 27. Quarta S, Massaro M, Carluccio MA, Calabriso N, Bravo L, Sarria B, García-Conesa M-T. An Exploratory Critical Review on TNF- α as a Potential Inflammatory Biomarker Responsive to Dietary Intervention with Bioactive Foods and Derived Products. *Foods*, 2022, 11. 2524. <https://doi.org/10.3390/foods11162524>
 28. Grebenciucova E , VanHaerents S. Interleukin 6: at the interface of human health and disease. *Frontiers in Immunology* vol. 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1255533> (2023).
 29. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1813 878–888 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034> (2011).
 30. Thompson DK, Huffmann,K.M, Kraus WE, Kraus VB. Critical Appraisal of Four IL-6 Immunoassays. *PLos One*, Feb (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030659>
 31. Choi YJ, Roh J, Kim S, Lee KA, Park Y. Comparison of IL-6 Measurement methods with a Special Emphasis on COVID-19 Patients According to Equipment and Sample Type. *J Clinical Laboratory Analysis*. 2022 Jan 36 (1) : e24182. Doi : 10.1002/jcla.24182
 32. Erwinanto, Sunanto Ng, Santoso A, Rian D, Erika D, Renan S, Sony HW, Pintaningrum Y. Panduan Tata laksana Dislipidemia: Perhimpunan Dokter Spesialis Kardiovaskular Indonesia (2022).
 33. Rai V. High-Fat Diet, Epigenetics, and Atherosclerosis: A Narrative Review. *Nutrients* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nu17010127> (2025).
 34. Attiq A, Afzal S, Ahmad W & Kandeel M. Hegemony of inflammation in atherosclerosis and coronary artery disease. *European Journal of Pharmacology* vol. 966 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176338> (2024).
 35. Campos-Bayardo TI. The Role of TLRs in Obesity and Its Related Metabolic Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 26 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms26052229> (2025).
 36. Lee SH, Park SY, Choi CS. Insulin Resistance : From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes Metab J* 2022;46:15-37 *Diabetes & Metabolism Journal* 2022 ; 46 (1) : 15 – 37 . doi: <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280>
 37. Duan Y, Zeng L, Song B, Li F, Kong X, Xu K.. Inflammatory links between high fat diets and diseases. *Front Immunol* 9, (2018).
 38. AJ Maurer. Egg science and technology. 2024. *Poultry Science* 66(7):1244-1245. DOI:[10.3382/ps.0661244b](https://doi.org/10.3382/ps.0661244b)

39. Yulianto AB, Suprianondo K, Purnamasari K. Cholesterol, LDL and HDL Content in Quail Egg Yolk with probiotics and Acidifier Feeding, media kedokteran hewan 36, 137-148 (2025).
40. Hijriyani BI, Atfal B, Kodariah L, Hadiatun N, Ismatullah NK. Efektivitas ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dalam Mencegah Kenaikan Kadar Kolesterol LDL Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diinduksi Kuning Telur Puyuh. *Jurnal Kesehatan Rajawali* Vol XIII Nomor 2 (2023) 1-4.
41. Kazmierska M, Jarosz B, Korzeniowska M, Trziszka T, Dobrzanski Z. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences Comparative Analysis of Fatty Acid Profile and Cholesterol Content of Egg Yolks of Different Bird species. *J.Food Nutritions Science* vol 14 (2005).
42. Nurhayati W, Yunivita V, Dewi K & Djajakusumah TM. Anti-Inflammatory Effect of Trigona Spp. Propolis in Restricting Edema Volume. *Althea Medical Journal* vol. 2 <http://www.apidologie>. (2015).
43. Ahmed BY, Jasim SA, Mustafa YF, Huseen B, Diwan TM, Singh M. The Effect of propolis supplementation on lipid profiles in adults with metabolic syndrome and related disorders : a systematic review and meta-analisis of randomized controlled trials. *Human Nutrition and Metabolism* Vol 37, September 2024,200276.
44. Warade A, Galkward R, Sapkal V. Simulation of Multistage Countercurrent Liquid-liquid Extraction. *Leonardo Journal of Science*. January-June (2011). ISSN : 1583 -0233. P: 79-94
45. Tombakan VD, Moleong MML & Pratiwi AI. Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis (HDI PropoelixTM) terhadap Rasio Albumin Kreatinin Urin Pasien DM Tipe II. *Jurnal Biomedik:JBM* 14, 1 (2022).
46. Cracco P, Cabrera MC, Galiotta G. & Saadoun A. Polyphenols and minerals in propolis from different agricultural regions of Uruguay. *Agrociencia Uruguay* 28, (2024).
47. Miłek M.. The Study of Chemical Profile and Antioxidant Properties of Poplar-Type Polish Propolis Considering Local Flora Diversity in Relation to Antibacterial and Anticancer Activities in Human Breast Cancer Cells. *Molecules* 27, (2022).
48. Rahmah WN. Borneo Journal Of Medical Laboratory Technology Review: The Effect Of Propoelix Extract On Motility Morphology And The number Of Spermatozoa Cells Of Wistar Rat Induced By Monosodium Glutamate. *Borneo Journal of Medical Laboratory Tecnology*. 3, (2020).
49. Miłek M, Franke G, Tomzyk M, Gorecki M, Chikova O, Jarosova A, Dzigan M. The Influence of Geographical Origin on Poplar Propolis Composition and the Impact of Human Microbiota. *Pharmaceuticals* 17, (2024).
50. Mohd Zaffarin, Hassan, H, Alias E. Pharmacology and pharmacokinetics of Vitamin E: Nanoformulations to enhance bioavailability. *International Journal of Nanomedicine* vol. 15 9961–9974 Preprint at <https://doi.org/10.2147/IJN.S276355> (2020).

51. Xiong Z, Liu L, Jian Z, Ma Y, Li H, Liao B, Wang K. Vitamin E and Multiple Health Outcomes: An Umbrella Review of Meta-Analyses. *Nutrients* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nu15153301> (2023).
52. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F & Ima-Nirwana S. Vitamin E as a potential interventional treatment for metabolic syndrome: Evidence from animal and human studies. *Frontiers in Pharmacology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00444> (2017).
53. Valk EEJ & Hornstra G. Relationship Between Vitamin E Requirement and Polyunsaturated Fatty Acid Intake in Man: A Review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res* vol. 70 (2000).
54. Traber G. Maret. Mechanism of the prevention of vitamin E excess. Thematic series: Fat soluble vitamins : Vitamin E. *Journal of Lipid Research*, Volume 54, (2015).
55. Xiong Z, Liu L, Jian Z, Ma Y, Li H, Jin X, Liao B, Wang K. Vitamin E and Multiple Health Outcomes: An Umbrella Review of Meta-Analyses. *Nutrients* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nu15153301> (2023).
56. Wu Q, Luo Y, Lu H, Xie T, Hu Z, Chu Z, Luo F. The Potential Role of Vitamin E and the Mechanism in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Foods* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/foods13060898> (2024).
57. Ghasemi A, Jeddi S & Kashfi K. The laboratory Rat: Age and Body Weight Matter. *EXCLI Journal* vol. 20 1431–1445 Preprint at <https://doi.org/10.17179/excli2021-4072> (2021).
58. Aviati V, Mardiaty SM, Saraswati TR. Kadar Kolesterol Telur Puyuh Setelah Pemberian Tepung Kunyit Dalam Pakan. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* No XXII. Nomer 1. Maret (2014).
59. Adnan ML, Pramaningtyas MD, Islamiana D, Sudarto HA. Hyperlipidemia Diet Reduces Superoxide Dismutase Inhibition Rate in the Brain Organ of *Rattus norvegicus*. *Mutiara Medika* Vol 22, 14–19 (2022).
60. Aminoto T. Statistik Penelitian Kuantitatif. *MINHAJ Pustaka*. 2024. Bab 3: 27-36.
61. Sentosa M, Saraswati TR, Tana S, Soedarto J. Kadar Low density Lipoprotein (LDL) Kuning telur Puyuh jepang (*Coturnix Japonica L*) Setelah pemberian tepung kunyit (*Curcuma Longa L*) pada Pakan. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* vol 2 no 1 Februari 2017.
62. Kesh BS, Sarkar D, Manna K. High Fat Diet Induced Oxidative Stress and Its Impact on Metabolic Syndrome : A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. Vol 9. Issue 1. (2016).
63. Susantingsih T, Musthofa S. Ekspresi IL-6 dan TNF- α pada Obesitas. *Jurnal kedokteran UNILA* vol 2 No 2 Juli (2018). P: 174-180.
64. Lewis E, Meydani S, Wu D. regulatory role of Vitamin E in the immune system and inflammation. *IUBMB Life* (2019) 71(4) 487-494.
65. Lestari M, Rita RS, Koerniati I. Vitamin E Prevents Oxidative Stress and Inflammation Conditions in periodontitis Wistar Rats. *Biomedika* 14: 54-62 (2022).

66. Wolska.K. Immunomodulatory Effects of propolis and Its Components on Basic immune cell Functions. *Indian J Pharm Sci* 2019;81(4):575-588
67. Minouge AM, Barret JP, Lynch, MA. LPS-induced release of IL-6 from glia modulates production of IL-1 β in a JAK2-dependent manner. *Journal of Neuroinflammation* 2012, 9:126. [http:// www.jneuroinflammation.com/content/9/1/126](http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/126)
68. Abbasi E, Khodadadi I. High fat diet may increase the risk of insulin resistance by inducing dysbiosis. *Metabolic Open* 27, 100381 (2025).
69. Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver : from physiopathology to therapy. *Journal of Hepatology* Vol 64 1403-1415 <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.004>(2016)
70. Townsend LL, Medak KD, Peppler WT, Meers GM, Rector RS, LeBlanc PJ, Wright DC. High saturated fat diet-induced obesity causes hepatic IL-6 resistance via endoplasmic reticulum stress. *Journal Lipid Research* 60, 1236-1249 (2019).
71. Synder B, Duong P, tenkorang M, Wilson EN, Cunningham RJ. Rat Strain and Housing Conditions Alter Oxidative Stress and Hormone responses to Chronic Intermittent Hypoxia. *Fron Physiol* 2018 : Nov 6-9:1554 doi : 10.3389/fphys.2018.01554.
72. Moser,P. Out of Control? Managing Baseline Variability in Experimental Studies with Control Groups. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2019. https://doi.org/10.1007/164_2019_280
73. Petrovas, C, Daskas,SM, Lianidou ES. Determination of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum by a highly sensitive enzyme amplified lanthanide luminescence immunoassay, *Clinical Biochemistry*, Volume 32, Issue 4, 1999, Pages 241-247, ISSN 0009-9120, [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(99\)00004-1](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(99)00004-1).

