

**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK PROPOLIS DAN  
VITAMIN E TERHADAP KADAR SOD DAN MDA**  
**Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus  
norvegicus*) yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak**

**Tesis**

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister  
(S2)



Magister Ilmu Biomedis

Eria Sartika

MBK.24.24.010507

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIS

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG 2026

**TESIS**  
**PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK PROPOLIS DAN**  
**VITAMIN E TERHADAP KADAR SOD DAN MDA**  
**(Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*)**  
**yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak)**


disusun oleh  
Eria Sartika  
MBK. 24.24.010507

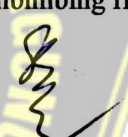
akan dipertahankan di depan Tim Penguji  
pada tanggal 20 Januari 2026  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II

  
Dr. dr. Joko Wahyu W. M.Kes


  
Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes

NIP. 210 198 046

NIP. 210 101 059

Mengetahui

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik  
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung

  
Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes

NIP. 210 198 046

Laporan Tesis Dengan Judul “PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK PROPOLIS DAN VITAMIN E TERHADAP KADAR SOD DAN MDA (Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) yang Diinduksi 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, Sp.KF, SH, MH	Penguji II	
3	Dr. dr. Minidian Fasitasari, M.Sc, Sp.GK (K)	Penguji III	
4	Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes	Pembimbing I	
5	Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes	Pembimbing II	



## 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 maupun yang belum/ tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 20 Januari 2026



## RIWAYAT HIDUP

### A. Identitas

Nama : Eria Sartika  
Tempat/ tanggal lahir : Tanjung, 28 Juli 1995  
Agama : Islam  
Jenis Kelamin : Perempuan

### B. Riwayat Pendidikan

1. TK Raudhatul Athfal Tanjung : Lulus tahun 2001
2. SDN 2 Tanjung : Lulus tahun 2007
3. SMP Plus Murung Pudak : Lulus tahun 2010
4. SMAN 1 Tanjung : Lulus tahun 2012
5. S1 FK UNLAM Banjarmasin : Lulus tahun 2016
6. Profesi Dokter UNLAM Banjarmasin : Lulus tahun 2018
7. Magister Ilmu Biomedis FK UNISSULA : (2024 – sekarang)

### C. Riwayat Keluarga

1. Nama Suami : dr. Sujudynaraja Mu'minin
2. Nama Anak : Suri Fatima Haniyah

Syam Ali Muminin

## KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis dengan judul “**Pengaruh Kombinasi Ekstrak Propolis dan Vitamin E terhadap Kadar SOD dan MDA** (Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak)”. Tesis ditulis dalam rangka memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister (S2) Ilmu Biomedis di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA) Semarang.

Penulis menyadari bahwa tesis ini dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis berterima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam proses pembuatan tesis ini. Penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH., M.Hum selaku rektor UNISSULA beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Ilmu Biomedis.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp.KF., SH, MH selaku dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedis.

3. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedis yang telah memberikan kesempatan dan memfasilitasi penulis untuk mengikuti pendidikan di program Magister Ilmu Biomedis.
4. Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku pembimbing I dalam penelitian yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikiran, memberikan dorongan, semangat, dan bimbingan serta masukan kepada penulis selama proses penyusunan tesis.
5. Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes selaku pembimbing II dalam penelitian yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikiran, memberikan dorongan, semangat, dan bimbingan serta masukan kepada penulis selama proses penyusunan tesis.
6. Dr. dr. Eko Setiawan, Sp.B., FINACS selaku penguji I dalam penelitian yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikiran, memberikan dorongan, semangat, dan bimbingan serta masukan kepada penulis selama proses penyusunan tesis.
7. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp.KF., SH, MH selaku penguji II dalam penelitian yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikiran, memberikan dorongan, semangat, dan bimbingan serta masukan kepada penulis selama proses penyusunan tesis.
8. Dr. dr. Minidian Fasitasari, MSc., Sp.GK (K) selaku penguji III dalam penelitian yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikiran, memberikan dorongan, semangat, dan bimbingan serta masukan kepada penulis selama proses penyusunan tesis.

9. Seluruh dosen pengajar beserta seluruh staf di Magister Ilmu Biomedis Fakultas Kedokteran UNISSULA Semarang yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan bantuan kepada penulis selama proses penyusunan tesis.
10. Keluarga, terutama suami saya dr. Sujudynaraja Mu'minin, putri saya Suri Fatima Haniyah, putra saya Syam Ali Muminin, ibunda tercinta Hj. Sri Poernama, dan ayahanda tercinta alm. H. Muhammad Arsyad, S.Sos yang selalu memberikan dorongan, dukungan, dan doa untuk penulis.
11. Seluruh pihak yang tidak bisa disebutkan satu per satu yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan tesis.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan tesis ini, oleh karena itu saran-saran yang membangun dari pihak mana pun akan diterima dengan terbuka. Penulis berharap semoga penelitian ini memberikan manfaat untuk berbagai pihak. Akhir kata, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan hidayah-Nya untuk kita semua. Aamiin ya rabbal alaamiin.

Semarang, 20 Januari 2026

(Eria Sartika)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	I
HALAMAN PENGESAHAN .....	II
PERNYATAAN .....	IV
RIWAYAT HIDUP .....	V
KATA PENGANTAR.....	VI
DAFTAR ISI .....	IX
DAFTAR SINGKATAN .....	XIII
DAFTAR TABEL .....	XVI
DAFTAR GAMBAR .....	XVII
DAFTAR LAMPIRAN.....	XIX
ABSTRAK .....	XX
<i>ABSTRACT</i> .....	XXI
PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Penelitian.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Umum .....	3
1.3.2 Khusus.....	4
1.4 Orisinalitas Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	8
1.5.1 Teoritis .....	8
1.5.2 Praktis .....	9
TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1 <i>Superoxide Dismutase (SOD)</i> .....	10
2.1.1 Definisi, Fungsi, dan Mekanisme Kerja .....	10
2.1.2 Klasifikasi dan Lokalisasi .....	11
2.1.3 Regulasi Ekspresi .....	13
2.1.4 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim SOD .....	14

2.1.5	Konsekuensi Penurunan Aktivitas Enzim SOD .....	17
2.1.6	Metode Analisis .....	17
2.2	<i>Malondialdehyde</i> (MDA) .....	18
2.2.1	Definisi.....	18
2.2.2	Mekanisme Peroksidasi Lipid dan Pembentukan MDA .....	19
2.2.3	Interaksi MDA dan Molekul Lain .....	21
2.2.4	Faktor yang Mempengaruhi Kadar MDA .....	22
2.2.5	Metode Analisis .....	25
2.3	Diet Tinggi Lemak .....	25
2.3.1	Definisi dan Karakteristik .....	25
2.3.2	Metabolisme Lipid pada Diet Tinggi Lemak .....	26
2.3.3	Diet Tinggi Lemak sebagai Pemicu Stres Oksidatif Sistemik.....	28
2.3.4	Faktor yang Mempengaruhi Respon Metabolik .....	30
2.3.5	Model Induksi Diet Tinggi Lemak .....	32
2.4	Propolis.....	34
2.4.1	Definisi dan Komposisi.....	34
2.4.2	Metode Ekstraksi <i>Continous Multistage Counter-Current Extraction</i> (CMCE).....	35
2.4.3	Senyawa Aktif Propolis dalam Modulasi Stres Oksidatif dan Inflamasi	36
2.4.4	Propolis sebagai Antioksidan, Antiinflamasi, Imunomodulator dan Prebiotik.....	39
2.4.5	Efektivitas Propolis.....	41
2.5	Vitamin E .....	43
2.5.1	Definisi, Struktur, dan Klasifikasi .....	43
2.5.2	Farmakokinetik Vitamin E .....	44
2.5.3	Farmakodinamik Vitamin E .....	45
2.5.4	Efektivitas Vitamin E .....	47
	KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS .....	50
3.1	Kerangka Teori.....	50
3.2	Kerangka Konsep .....	56
3.3	Hipotesis .....	56

METODE PENELITIAN .....	57
4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	57
4.2 Populasi dan Teknik Pengambilan Sampel.....	58
4.2.1 Populasi dan Sampel.....	58
4.2.2 Besar Sampel.....	58
4.2.3 Cara Pengambilan Sampel Penelitian .....	59
4.2.4 Kriteria Inklusi.....	59
4.2.5 Kriteria Eksklusi.....	59
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	59
4.3.1 Variabel .....	59
4.3.2 Definisi Operasional .....	60
4.4 Alat dan Bahan Penelitian .....	61
4.4.1 Alat.....	61
4.4.2 Bahan .....	62
4.5 Prosedur Penelitian.....	62
4.5.1 <i>Ethical Clearance</i> .....	62
4.5.2 Aklimatisasi.....	63
4.5.3 Penetapan Dosis Ekstrak Propolis dan Vitamin E .....	63
4.5.4 Komposisi Diet Tinggi Lemak .....	63
4.5.5 Pembagian Kelompok Perlakuan.....	64
4.5.6 Penimbangan Berat Badan .....	65
4.5.7 Prosedur Pengambilan Sampel sebagai Spesimen.....	65
4.5.8 Preparasi Spesimen .....	66
4.5.9 Pemeriksaan Profil Lipid .....	66
4.5.10 Prosedur Pemeriksaan Kadar SOD dan MDA.....	66
4.6 Alur Penelitian .....	68
4.7 Analisis Hasil.....	69
HASIL DAN PEMBAHASAN .....	70
5.1 Hasil Penelitian .....	70
5.1.1 Gambaran Umum Hewan Coba.....	70
5.1.2 Hasil Pemeriksaan Kadar <i>Superoxide dismutase</i> (SOD) .....	71

5.1.3 Hasil Pemeriksaan Kadar <i>Malondialdehyde</i> (MDA).....	72
5.1.4 Hasil Pemeriksaan Berat Badan .....	74
5.1.5 Hasil Pemeriksaan Profil Lipid .....	79
5.2 Pembahasan .....	83
5.2.1 Dinamika <i>Superoxide Dismutase</i> dan <i>Malondialdehyde</i> .....	83
5.2.2 Perubahan Berat Badan antar Kelompok .....	85
5.2.3 Analisis Profil Lipid Lengkap .....	87
5.2.4 Keterbatasan Penelitian.....	89
KESIMPULAN DAN SARAN .....	90
6.1 Kesimpulan .....	90
6.2 Saran.....	91
DAFTAR PUSTAKA.....	92



## DAFTAR SINGKATAN

·OH	: radikal hidroksil
α-TO•	: radikal <i>α-tocopherol</i>
α-TQ	: <i>α-tocopherol quinone</i>
α-TTP	: <i>α-tocopherol transfer protein</i>
ACC	: <i>acetyl-coa carboxylase</i>
ALA	: <i>fatty acid synthase</i>
AlCl <sub>3</sub>	: <i>aluminum chloride</i>
ALDH	: <i>aldehyde dehydrogenase</i>
ALE	: <i>advanced lipoxidation end-product</i>
AMPK	: <i>AMP_activated protein kinase</i>
Apaf-1	: <i>apoptotic protease activating factor 1</i>
ARE	: <i>antioxidant response element</i>
CAPE	: <i>caffeic acid phenethyl ester</i>
CAT	: <i>catalase</i>
CCl <sub>4</sub>	: <i>carbon tetrachloride</i>
CEHC	: <i>carboxy-ethyl-hydroxychroman</i>
CHOP	: <i>C/EBP homologous protein</i>
CMCE	: <i>continous multistage counter-current extraction</i>
CO <sub>2</sub>	: karbon dioksida
COX	: siklooksigenase
CPT-1	: <i>carnitine palmitoyltransferase 1</i>
CRP	: <i>C-reactive protein</i>
CTX	: <i>cyclophosphamide</i>
DAG	: <i>diacylglycerol</i>
DAMPs	: <i>damage-associated molecular patterns</i>
DHA	: <i>docosahexaenoic acid</i>
DNA	: <i>deoxyribonucleic acid</i>
Drp-1	: <i>dynammin-related protein 1</i>
ELISA	: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPA	: <i>eicosapentaenoic acid</i>
FAS	: <i>fatty acid synthase</i>
FFA	: <i>free fatty acids</i>
FOXO	: <i>forkhead box O</i>
GPx	: <i>gluthatione peroxidase</i>
GRP-78	: <i>glucose-regulated protein 78</i>
GSH	: <i>gluthatione</i>
H <sub>2</sub> O	: air
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: hidrogen peroksida
HDL	: <i>high-density lipoprotein</i>
HIF-1α	: <i>hypoxia-inducible factor 1-α</i>
HMGR	: <i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase</i>

HO-1 : *heme oxygenase-1*  
 ICAM-1 : *intercellular adhesion molecule 1*  
 IDL : *intermediate-density lipoprotein*  
 IKK $\beta$  : *inhibitor of  $\kappa$ B kinase subunit  $\beta$*   
 IL-1 : *interleukin-1*  
 IL-1 $\beta$  : *interleukin-1 $\beta$*   
 IL-6 : *interleukin-6*  
 IRS : *insulin receptor substrate*  
 JNK : *jun N-terminal kinase 1*  
 Keap-1 : *kelch-like ECH-associated protein 1*  
 L• : *radikal alkil*  
 LCFA : *long-chain fatty acid*  
 LDL : *low-density lipoprotein*  
 LOO• : *radikal peroksil lipid*  
 LOOH : *lipid oxidation product*  
 LOX : *lipooksigenase*  
 LPL : *lipoprotein lipase*  
 LPS : *lipopolisakarida*  
 MAPK : *p38 mitogen-activated protein kinase*  
 MCFA : *medium-chain fatty acid*  
 MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein-1*  
 MDA : *malondialdehyde*  
 mTORC1 : *mammalian target of rapamycin complex 1*  
 NF- $\kappa$ B : *nuclear factor-kappa B*  
 NLRP-3 : *nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing 3*  
 NOX : *NADPH oksidase*  
 NQO-1 : *NAD(P)H quinone oxidoreductase 1*  
 Nrf2 : *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*  
 O<sub>2</sub> : *oksigen*  
 O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : *radikal superoksida*  
 Ox-LDL : *oxidized low-density lipoprotein*  
 PERK : *protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*  
 PGC-1 $\alpha$  : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$*   
 PI3k/Akt : *Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase b*  
 PKC : *protein kinase C*  
 PRx : *peroxiredoxin*  
 PUFA : *polyunsaturated fatty acids*  
 RNS : *reactive nitrogen species*  
 ROS : *reactive oxygen species*  
 SFA : *saturated fatty acids*  
 SIRT-1 : *sirtuin 1*  
 SNP : *single nucleotide polymorphism*  
 SOD : *superoxide dismutase*  
 SREBP-1 : *sterol regulatory element-binding protein 1c*  
 TAC : *total antioxidant capacity*

TBARS : *thiobarbituric acid reactive substance assay*  
TF : *tokoferol*  
TG : *triglyceride*  
TLR-2 : *toll-like receptor 2*  
TLR-4 : *toll-like receptor 4*  
TMAO : *trimethylamine N-oxide*  
TMP : *tocopherol-mediated peroxidation*  
TNF- $\alpha$  : *tumor necrosis factor- $\alpha$*   
TT : *tokotrienol*  
UCP-2 : *uncoupling protein 2*  
UPR : *unfolded protein response*  
UV : *ultraviolet*  
VCAM-1 : *vascular adhesion molecule 1*  
VLDL : *very low-density lipoprotein*



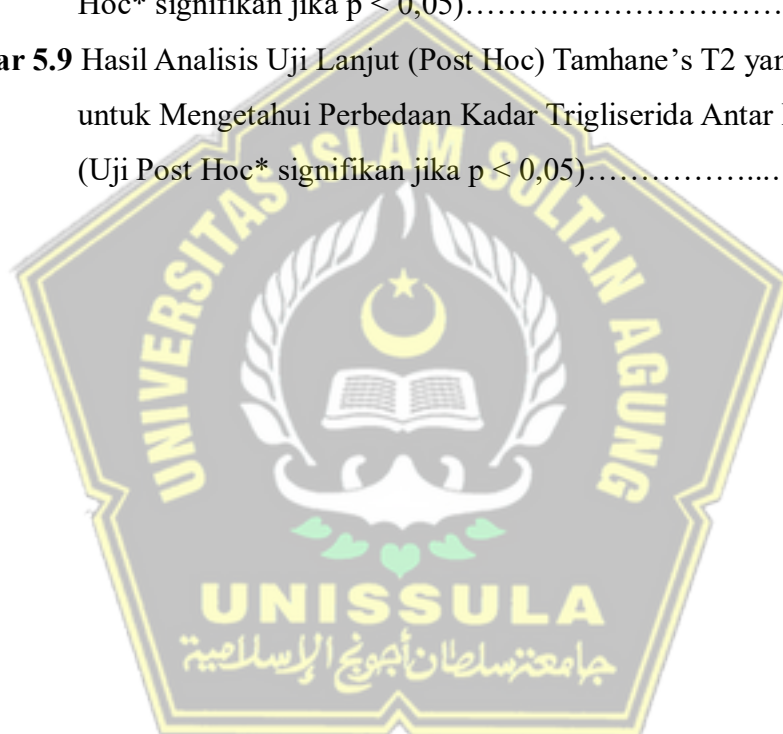
## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Orisinalitas Penelitian.....	5
Tabel 2.1 Komposisi Kimia Kuning Telur Puyuh Mentah.....	33
Tabel 2.2 Penelitian in vivo Efektivitas Propolis.....	41
Tabel 2.3 Penelitian in vivo Efektivitas Vitamin E.....	48
Tabel 4.1 Komposisi Pakan Standar merk HI-PRO-VITE.....	64
Tabel 5.1 Rerata dan Simpangan Baku (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (Shapiro-Wilk), Uji Homogenitas Varians (Levene), dan Uji Perbedaan Kadar SOD (ng/mL) pada Berbagai Kelompok Perlakuan.....	72
Tabel 5.2 Rerata dan Simpangan Baku (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (Shapiro-Wilk), Uji Homogenitas Varians (Levene), dan Uji Perbedaan Kadar MDA (mmol/mL) pada Berbagai Kelompok Perlakuan.....	73
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 Berat Badan (BB) Tikus (g) Sebelum Perlakuan.....	74
Tabel 5.4 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 Selama Perlakuan.....	75
Tabel 5.5 Rerata dan Simpangan Baku (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (Shapiro-Wilk), Uji Homogenitas Varians (Levene), dan Uji Perbedaan Perubahan Bera Badan (g) Sebelum dan Setelah Perlakuan pada Berbagai Kelompok Perlakuan.....	78
Tabel 5.6 Rerata dan Simpangan Baku (Mean $\pm$ SD), Uji Normalitas (Shapiro-Wilk), Uji Homogenitas Varians (Levene), dan Uji Perbedaan Profil Lipid (mg/dL) pada Berbagai Kelompok Perlakuan.....	79

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b> Mekanisme Pertahanan Antioksidan Seluler .....	11
<b>Gambar 2.2</b> Tipe dan Distribusi Enzim SOD dalam Sel .....	12
<b>Gambar 2.3</b> Struktur <i>Malondialdehyde</i> (MDA).....	19
<b>Gambar 2.4</b> Metode CMCE .....	36
<b>Gambar 2.5</b> Struktur Tokoferol (TF) (a) dan Tokotrienol (TT) (b).....	43
<b>Gambar 3.1</b> Kerangka Teori.....	55
<b>Gambar 3.2</b> Kerangka Konsep .....	56
<b>Gambar 4.1</b> Skema Rancangan Penelitian.....	57
<b>Gambar 4.2</b> Alur Penelitian .....	68
<b>Gambar 5.1</b> Hasil Analisis Uji Lanjut (Post Hoc) Tamhane's T2 yang Dilakukan untuk Mengetahui Perbedaan Kadar SOD Antar Kelompok (Uji Post Hoc* signifikan jika $p < 0,05$ ).....	72
<b>Gambar 5.2</b> Hasil Analisis Uji Lanjut (Post Hoc) LSD yang Dilakukan untuk Mengetahui Perbedaan Kadar MDA Antar Kelompok (Uji Post Hoc* signifikan jika $p < 0,05$ ).....	74
<b>Gambar 5.3</b> Diagram Batang Analisis Uji Lanjut ( <i>Post Hoc</i> ) <i>Mann Whitney U</i> yang Dilakukan untuk Mengetahui Rata-rata Berat Badan Tikus pada Saat Sebelum Perlakuan pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan (Uji <i>Post Hoc</i> * signifikan jika $p < 0,05$ ).....	75
<b>Gambar 5.4</b> Diagram Batang Analisis Uji Lanjut (Post Hoc) <i>Mann Whitney U</i> yang Dilakukan untuk Mengetahui Rata-rata Berat Badan Tikus pada Saat Sebelum Perlakuan, Hari ke-7, dan Hari ke-14 pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan (Uji Post Hoc* signifikan jika $p < 0,05$ ).....	77
<b>Gambar 5.5</b> Diagram Batang Analisis Uji Lanjut (Post Hoc) <i>Mann Whitney U</i> yang Dilakukan untuk Mengetahui Perubahan Berat Badan Tikus	

	pada Saat Sebelum dan Setelah Perlakuan pada Berbagai Kelompok Perlakuan (Uji Post Hoc* signifikan jika $p < 0,05$ ).....	78
<b>Gambar 5.6</b>	Hasil Analisis Uji Lanjut (Post Hoc) Mann Whitney U yang Dilakukan untuk Mengetahui Perbedaan Kadar Kolesterol Total Antar Kelompok (Uji Post Hoc* signifikan jika $p < 0,05$ ).....	80
<b>Gambar 5.7</b>	Diagram Batang Kadar HDL Antar Kelompok.....	81
<b>Gambar 5.8</b>	Hasil Analisis Uji Lanjut (Post Hoc) LSD yang Dilakukan untuk Mengetahui Perbedaan Kadar LDL Antar Kelompok (Uji Post Hoc* signifikan jika $p < 0,05$ ).....	82
<b>Gambar 5.9</b>	Hasil Analisis Uji Lanjut (Post Hoc) Tamhane's T2 yang Dilakukan untuk Mengetahui Perbedaan Kadar Triglicerida Antar Kelompok (Uji Post Hoc* signifikan jika $p < 0,05$ ).....	83



## DAFTAR LAMPIRAN

1. Surat Pernyataan Kelayakan Etika (*Ethical Clearance*)
2. Sertifikat Tikus Jantan Galur Wistar
3. Surat Keterangan Kesehatan Hewan
4. Data Hasil Pengukuran Penanda Stres Oksidatif (SOD dan MDA)
5. Data Pemantauan Berat Badan (g) Hewan Coba
6. Data Hasil Pengukuran Kadar Profil Lipid
7. Hasil Analisis Statistik Kadar SOD
8. Hasil Analisis Statistik Kadar MDA
9. Dokumentasi Pelaksanaan Penelitian



## ABSTRAK

**Latar Belakang:** Diet tinggi lemak memperburuk stres oksidatif, yang menyebabkan kerusakan seluler dan memicu berbagai penyakit. Pemberian propolis tunggal dapat memicu reaksi alergi dan vitamin E dosis tinggi dapat berisiko pro-oksidan. Kombinasi propolis dan vitamin E dianggap memiliki potensi sinergis untuk mengatasi stres oksidatif. **Tujuan:** Membuktikan pengaruh kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E terhadap kadar *superoxide dismutase* (SOD) dan *malondialdehyda* (MDA).

**Metode:** Penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design* pada 30 ekor tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*). Lima kelompok, termasuk kelompok kontrol sehat (K1), kelompok kontrol negatif yang menerima induksi diet tinggi lemak (K2), kelompok diet tinggi lemak dan vitamin E dosis 12 mg/kgBB/hari (K3), kelompok diet tinggi lemak dan ekstrak propolis dosis 36 mg/kgBB/hari (K4), dan kelompok diet tinggi lemak beserta kombinasi dosis ekstrak propolis 18 mg/kgBB/hari dan vitamin E 6 mg/kgBB/hari (K5) yang diberikan setiap hari selama 14 hari. Sampel darah diambil pada hari ke-15 untuk mengukur kadar SOD dan MDA menggunakan metode ELISA.

**Hasil:** Rerata kadar SOD terendah ditemukan pada kelompok K2 ( $1,334 \pm 0,187$  ng/mL) dan tertinggi pada K3 ( $1,954 \pm 0,156$  ng/mL). Uji *One-Way ANOVA (Robust)* yang dilanjutkan dengan uji *post hoc Tamhane's T2* menunjukkan perbedaan signifikan antara K2 dan K3 ( $p = 0,005$ ). Rerata kadar MDA terendah ditemukan pada K2 ( $0,250 \pm 0,068$  mmol/mL) dan tertinggi pada K3 ( $0,442 \pm 0,077$  mmol/mL). Uji *One-Way ANOVA* dan uji *post hoc LSD* menunjukkan perbedaan MDA yang signifikan antar kelompok ( $p < 0,05$ ), khususnya antara K2 dengan seluruh kelompok lainnya.

**Kesimpulan:** Kadar SOD ditemukan lebih tinggi pada kelompok yang diberikan vitamin E dosis 12 mg/kgBB/hari.

**Kata Kunci:** Diet Tinggi Lemak, Ekstrak Propolis, Vitamin E, SOD, MDA

## ABSTRACT

**Background:** High fat diet (HFD) exacerbates oxidative stress, leading to cellular damage and triggering various diseases. The administration of a single propolis or high dose vitamin E risks triggering allergic reactions or pro-oxidant effects. Therefore, the combination of propolis and vitamin E is considered to have synergistic potential in mitigating oxidative stress. **Objective:** To prove the effect of combining propolis extract and vitamin E on superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels.

**Method:** This experimental research used a post-test only control group design on 30 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*). The subjects were divided into five groups for 14 days treatment period. Group K1 served as the healthy control, while group K2 acted as the negative control receiving a high-fat diet. Group K3 received a high-fat diet and vitamin E at a dose of 12 mg/kgBW/day. Group K4 received a high-fat diet and propolis extract at a dose of 36 mg/kgBW/day. Group K5 received a high-fat diet combined with propolis extract at 18 mg/kgBW/day and vitamin E at 6 mg/kgBW/day. The researchers collected blood samples on day 15 to measure SOD and MDA levels using the ELISA method.

**Results:** The lowest mean SOD level was observed in group K2 ( $1.334 \pm 0.187$ ) and the highest in K3 ( $1.954 \pm 0.156$ ). One-Way ANOVA (Robust) followed by Tamhane's T2 post hoc test revealed a significant difference between K2 and K3 ( $p = 0.005$ ). The lowest mean MDA level was found in K2 ( $0.250 \pm 0.068$ ) and the highest in K3 ( $0.442 \pm 0.077$ ). One-Way ANOVA and LSD post hoc tests showed significant MDA differences between groups ( $p < 0.05$ ), specifically between K2 and all other groups.

**Conclusion:** The researchers found higher SOD levels in the group receiving vitamin E at a dose of 12 mg/kgBW/day.

**Keywords:** High Fat Diet, Propolis Extract, Vitamin E, SOD, MDA

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diet tinggi lemak memicu stres oksidatif melalui mekanisme akumulasi lipid yang membebani oksidasi mitokondria, sehingga menyebabkan kebocoran elektron yang memicu produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) berlebih. Kondisi stres oksidatif dapat menurunkan ekspresi enzim antioksidan endogen seperti *superoxide dismutase* (SOD) dan memicu peroksidasi lipid yang menghasilkan *malondialdehyde* (MDA) sebagai produk toksik penyebab kerusakan sel.<sup>1-5</sup> Vitamin E dengan dosis 6 mg/kgBB/hari terbukti efektif meningkatkan kadar SOD dan menurunkan kadar MDA dengan melindungi membran sel melalui pemutusan rantai peroksidasi lipid.<sup>6-9</sup> Propolis dapat mengurangi radikal bebas, mengikat logam, dan dengan dosis 18 mg/kgBB/hari dan 36 mg/kgBB/hari terbukti efektif meningkatkan kadar SOD.<sup>6,7,10,11</sup> Penggunaan antioksidan eksogen harus dilakukan secara hati-hati karena pemberian propolis tunggal atau vitamin E dosis tinggi (vitamin E 27 mg/kgBB/hari telah dikategorikan toksik) dapat memicu efek pro-oksidan, reaksi alergi, gangguan neurologis, serta meningkatkan risiko stroke hemoragik.<sup>12-16</sup>

Ketidakseimbangan antara aktivitas enzim SOD dan produksi MDA memicu stres oksidatif berkelanjutan yang menyebabkan kerusakan sel.<sup>3-5</sup> Kegagalan dalam mengelola stres oksidatif akibat konsumsi diet tinggi lemak

memicu disfungsi metabolik dan berkontribusi pada perkembangan berbagai penyakit.<sup>1,17</sup> Jaringan seluler menjadi rentan terhadap inflamasi kronis, merusak membran sel, serta berbagai kondisi patologis, termasuk penyakit kardiovaskular (aterosklerosis), gangguan metabolik, dan penyakit neurodegeneratif.<sup>4,18-21</sup>

Penelitian membuktikan bahwa kandungan flavonoid, asam fenolat, serta terpenoid dalam propolis secara efektif melindungi konsentrasi vitamin C di dalam jaringan.<sup>22</sup> Senyawa fenolik tersebut juga meningkatkan waktu hambatan oksidasi (*lag time*) dalam darah melalui mekanisme penangkapan radikal bebas maupun pengikatan ion logam.<sup>10</sup> Vitamin E bertindak sebagai antioksidan larut lemak primer yang mendonorkan atom hidrogen untuk mencegah peroksidasi lipid serta menurunkan kadar MDA secara signifikan.<sup>10,22</sup> Propolis menunjukkan aktivitas menyerupai enzim SOD (*SOD-like action*) yang menjaga ketersediaan gugus sulfhidril seperti *gluthation* (GSH), sementara vitamin C dan GSH bekerja meregenerasi vitamin E dari bentuk radikal bebasnya agar dapat kembali melindungi integritas membran sel.<sup>6</sup> Kombinasi propolis dan vitamin E memberikan efek sinergis dalam menurunkan kadar kolesterol darah serta *low-density lipoprotein* (LDL) lebih baik dibandingkan pemberian tunggal, serta meningkatkan kadar *high-density lipoprotein* (HDL) secara signifikan.<sup>10,23</sup>

Mekanisme kerja propolis dan vitamin E yang saling melengkapi menjadi dasar dalam urgensi penelitian ini, karena kombinasi propolis dan vitamin E memberikan efek sinergis, berfungsi sebagai agen antioksidan dan pelindung

terhadap berbagai kondisi stres oksidatif.<sup>7,10,23</sup> Kombinasi propolis dan vitamin E mampu mengoptimalkan pemulihan status antioksidan seluler melalui regenerasi vitamin E dan penguatan aktivitas enzim SOD, dan memberikan perlindungan lebih komprehensif terhadap peroksidasi lipid pada membran sel dibandingkan pemberian tunggal.<sup>12,14,15</sup> Kombinasi polifenol dan vitamin E dosis sedang secara signifikan lebih baik dalam meningkatkan aktivitas enzim SOD, kapasitas antioksidan, dan memberi manfaat imunomodulator tambahan dibandingkan pemberian vitamin E tunggal dosis rendah atau dosis tinggi.<sup>24</sup> Pemilihan strategi kombinasi propolis dan vitamin E dapat menjadi pendekatan yang paling efektif untuk memulihkan ketidakseimbangan SOD dan MDA serta mencegah konsekuensi patologis dari stress oksidatif akibat diet tinggi lemak.

## 1.2 Rumusan Penelitian

“Apakah terdapat pengaruh kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E terhadap kadar *superoxide dismutase* (SOD) dan *malondialdehyda* (MDA) pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak?”

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Umum

Membuktikan pengaruh kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E terhadap kadar *superoxide dismutase* (SOD) dan *malondialdehyda*

(MDA) pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.

### 1.3.2 Khusus

1. Membuktikan efek diet tinggi lemak terhadap kadar *superoxide dismutase* (SOD) dan *malondialdehyda* (MDA).
2. Membuktikan pengaruh vitamin E dengan dosis 12 mg/ KgBB/ hari terhadap kadar *superoxide dismutase* (SOD) dan *malondialdehyda* (MDA) pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.
3. Membuktikan pengaruh ekstrak propolis dengan dosis 36 mg/ KgBB/ hari terhadap kadar *superoxide dismutase* (SOD) dan *malondialdehyda* (MDA) pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.
4. Membuktikan pengaruh kombinasi ekstrak propolis dengan dosis 18 mg/ KgBB/ hari dan vitamin E dengan dosis 6 mg/ KgBB/ hari terhadap kadar *superoxide dismutase* (SOD) dan *malondialdehyda* (MDA) pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.

#### 1.4 Orisinalitas Penelitian

Tabel 1.1 Orisinalitas Penelitian

No	Peneliti, tahun	Judul	Metode	Hasil
1.	Hashem, N.M., et al., 2013 <sup>25</sup>	<i>Effect of Vitamin E or Propolis Supplementation on Semen Quality, Oxidative Status and Hematobiochemical Changes of Rabbit Bucks during Hot Season</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studi <i>in vivo</i> pada kelinci jantan New Zealand White</li> <li>• <i>Post-test only control group design</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propolis dengan dosis 150 mg/kg pakan atau vitamin E dengan dosis 150 mg/ kg pakan secara signifikan meningkatkan kualitas semen, aktivitas seksual, dan kadar hormon reproduksi pada kelinci jantan.</li> <li>• Propolis atau vitamin E memperbaiki profil lipid dengan menurunkan kolesterol dan trigliserida serta meningkatkan <i>high density lipoprotein</i> (HDL).</li> <li>• Propolis secara spesifik lebih unggul dalam meningkatkan <i>total antioxidant capacity</i> (TAC) dan konsentrasi testosteron.</li> </ul>
2.	Santos, N.W., et al., 2016 <sup>10</sup>	<i>Antioxidant Effects of a Propolis Extract and Vitamin E in Blood and Milk of Dairy Cows Fed Diet Containing Flaxseed Oil</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studi <i>in vivo</i> pada sapi Holstein perah</li> <li>• <i>Post-test only control group design</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suplementasi propolis dengan dosis 1.200 mg/kg bahan kering dan vitamin E dengan dosis 375 IU/ kg bahan kering pakan sapi perah meningkatkan kualitas lemak dan sifat antioksidan susu, meskipun tidak berhasil mencegah oksidasi lemak susu.</li> </ul>

3. Almaeen, A.H., Ibrahim, M.A.E., 2018 <sup>6</sup>	<i>The Protective Effect of Propolis Compared to Vitamins C and E Antioxidant Mixture in Cyclophosphamide (CTX) -Induced Lung Toxicity In Mice</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studi <i>in vivo</i> pada tikus jantan Swiss albino</li> <li>• <i>Post-test only control group design</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kombinasi vitamin E-C dengan masing-masing dosis 50 mg/ kgBB menunjukkan efek perlindungan pada jaringan paru yang lebih baik dibandingkan propolis dengan dosis 90 mg/ kg/ hari pada tikus yang diinduksi CTX</li> </ul>
4. Sajjad, S., et al., 2019 <sup>23</sup>	<i>Synergistic Potential of Propolis and Vitamin E Against Sub-Acute Toxicity of Aluminum Chloride (AlCl<sub>3</sub>) in Albino Mice: In Vivo Study</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studi <i>in vivo</i> pada tikus albino</li> <li>• <i>Post-test only control group design</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kombinasi propolis dengan dosis 50 mg/ kgBB dan vitamin E dengan dosis 150 mg/ kgBB secara signifikan memperbaiki profil lipid dan fungsi hati, serta mengembalikan struktur histologis hati normal</li> </ul>
5. Sajjad, S., et al., 2020 <sup>7</sup>	<i>Ethanollic Extract of Propolis and Vitamin E Attenuates Metal-Induced Testicular Necrosis: Time-Related Study on Male Reproductive System in Albino Mice</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studi <i>in vivo</i> pada tikus albino</li> <li>• <i>Post-test only control group design</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kombinasi propolis dengan dosis 50 mg/ kgBB dan vitamin E dengan dosis 150 mg/ kgBB menunjukkan efek sinergis dalam memulihkan berat organ, jumlah, dan motilitas sperma.</li> <li>• Perbaikan yang lebih signifikan pada pengobatan jangka panjang menunjukkan efektivitas antioksidan alami ini dalam mengatasi kerusakan reproduksi.</li> </ul>

6.	Wani, E., <i>et al.</i> , 2020 <sup>11</sup>	<i>The Influence of Continuous Multi Stage Countercurrent Extraction Process (CMCE) Propolis Extract Administration on Superoxide Dismutase Activity and Hepatocytes Fibrosis Degree (An Experimental Study on Male Wistar Rats Induced with Carbon Tetrachloride (CCl<sub>4</sub>))</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studi <i>in vivo</i> pada tikus Wistar jantan</li> <li>• <i>Post-test only control group design</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propolis dengan dosis 3,6 mg/ 200 gBB, 7,2 mg/ 200 gBB, dan 14,4 mg/200 gBB menunjukkan peningkatan aktivitas enzim SOD secara signifikan</li> <li>• Propolis dengan dosis 3,6 mg/ 200 gBB, dan 14,4 mg/200 gBB secara signifikan menurunkan tingkat fibrosis hati</li> </ul>
7	Ratna-wati, R., <i>et al.</i> , 2024 <sup>9</sup>	<i>Effect of Tender Coconut Water Powder Enriched with Vitamin E in Preventing Oxidative Stress of Diabetes Male Wistar Rats</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studi <i>in vivo</i> pada tikus Wistar jantan</li> <li>• <i>Post-test only control group design</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kombinasi serbuk air kelapa muda dengan dosis 0.4 g/ 200 gBB dan vitamin E dengan dosis 1.8 IU/ 200 gBB secara efektif mencegah stres oksidatif, yang ditunjukkan oleh peningkatan SOD dan GPx, serta penurunan MDA, IL-1, IL-6, TNF <math>\alpha</math>, dan CRP.</li> </ul>

Orisinalitas penelitian "Pengaruh Kombinasi Ekstrak Propolis dan Vitamin E terhadap Kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) dan *Malondialdehyde* (MDA) pada Tikus yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak" terletak pada potensi sinergis dari kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E, memungkinkan perbandingan efektivitas pemberian kombinasi dan pemberian tunggal, serta memberikan wawasan baru tentang efek perlindungan ekstrak propolis dan vitamin E.

Penelitian ini berfokus pada kadar SOD (enzim antioksidan endogen) dan MDA (penanda peroksidasi lipid) sebagai indikator utama stres oksidatif, yang memungkinkan analisis tentang bagaimana ekstrak propolis dan vitamin E mempengaruhi pertahanan antioksidan dan kerusakan seluler. Penelitian ini juga berfokus pada model stres oksidatif yang disebabkan diet tinggi lemak, yang berbeda dari penelitian sebelumnya yang disebabkan oleh paparan logam berat, toksisitas obat, atau stres panas. Model stres oksidatif tersebut memungkinkan pemahaman tentang mekanisme kerja ekstrak propolis dan vitamin E dalam kondisi patofisiologis yang berbeda. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber ilmiah yang baru, dan spesifik dalam membahas peran ekstrak propolis dan vitamin E sebagai agen antioksidan dalam mencegah stres oksidatif yang disebabkan oleh diet tinggi lemak.

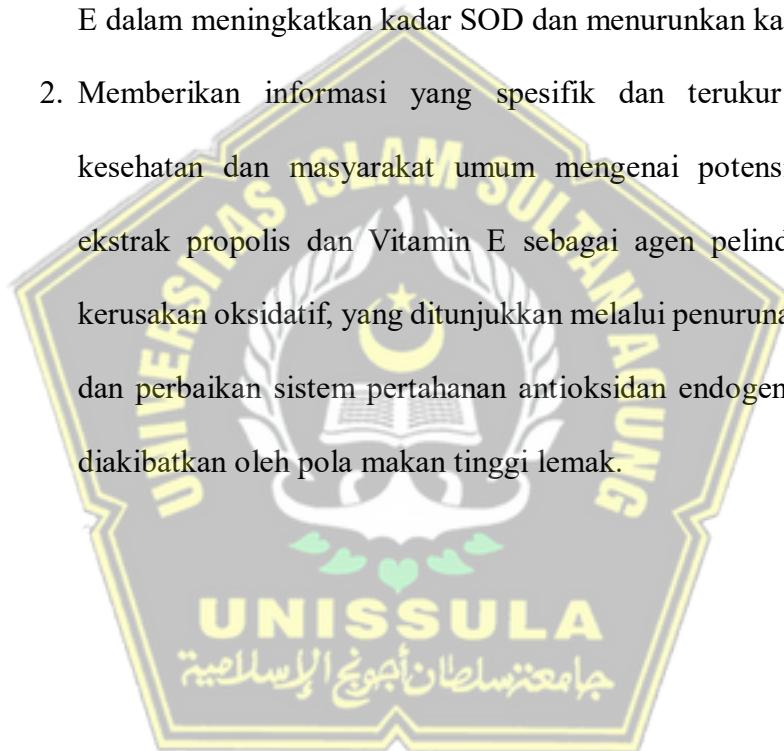
## **1.5 Manfaat Penelitian**

### **1.5.1 Teoritis**

1. Memberikan kontribusi ilmiah yang spesifik dalam pengembangan pengetahuan mengenai pengaruh ekstrak propolis dan Vitamin E sebagai antioksidan sinergis dalam menangkal stres oksidatif akibat diet tinggi lemak.
2. Memperkaya literatur dan menjadi dasar bagi penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme kerja ekstrak propolis dan Vitamin E dalam mempengaruhi jalur peroksidasi lipid (MDA) dan sistem pertahanan antioksidan endogen (SOD).

### 1.5.2 Praktis

1. Menyediakan data 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 stres oksidatif, dengan fokus pada efektivitas kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E dalam meningkatkan kadar SOD dan menurunkan kadar MDA.
2. Memberikan informasi yang spesifik dan terukur bagi tenaga kesehatan dan masyarakat umum mengenai potensi penggunaan ekstrak propolis dan Vitamin E sebagai agen pelindung terhadap kerusakan oksidatif, yang ditunjukkan melalui penurunan kadar MDA dan perbaikan sistem pertahanan antioksidan endogen (SOD), yang diakibatkan oleh pola makan tinggi lemak.



## BAB II

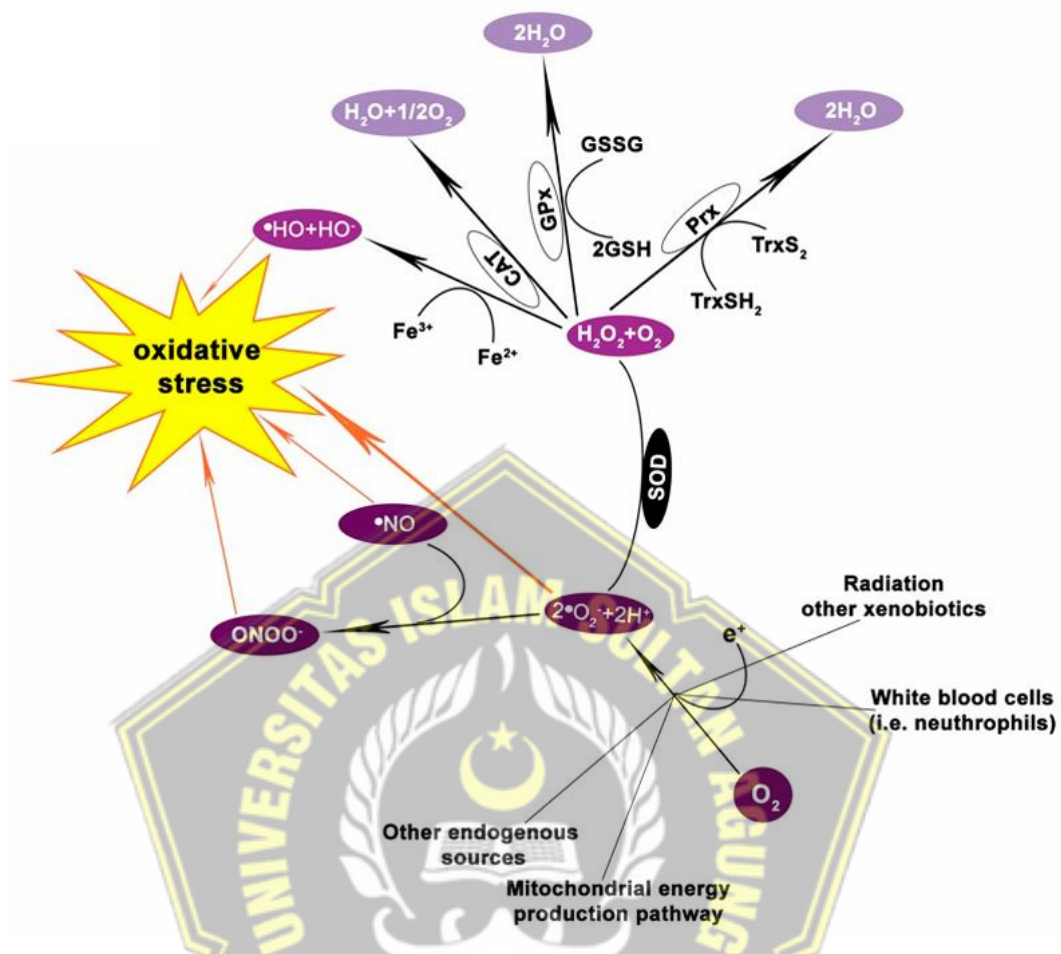
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Superoxide Dismutase (SOD)

##### 2.1.1 Definisi, Fungsi, dan Mekanisme Kerja

*Superoxide dismutase* (SOD) adalah enzim antioksidan endogen yang berperan sebagai pertahanan utama tubuh terhadap stres oksidatif. Enzim SOD secara spesifik melibatkan katalisis dismutasi atau disproporsionasi radikal anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ), yang merupakan hasil sampingan metabolisme oksigen yang tidak stabil, menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan oksigen molekuler ( $O_2$ ), sehingga menjaga keseimbangan dinamis antara produksi dan eliminasi oksidan biologis, serta mencegah efek toksik radikal bebas.<sup>18,20,26-28</sup>

Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang dihasilkan didegradasi lebih lanjut menjadi air ( $H_2O$ ) melalui kerjasama dengan enzim lain seperti *catalase* (CAT), *glutathione peroxidase* (GPx), atau *peroxiredoxin* (PRx) guna menghindari akumulasi toksik, seperti yang digambarkan dalam Gambar 2.1.<sup>18,29</sup> Aktivitas SOD dapat berubah menjadi pro-oksidan jika  $H_2O_2$  yang dihasilkan menumpuk berlebihan, menyebabkan produksi ROS dan toksisitas pada sel.<sup>29</sup>



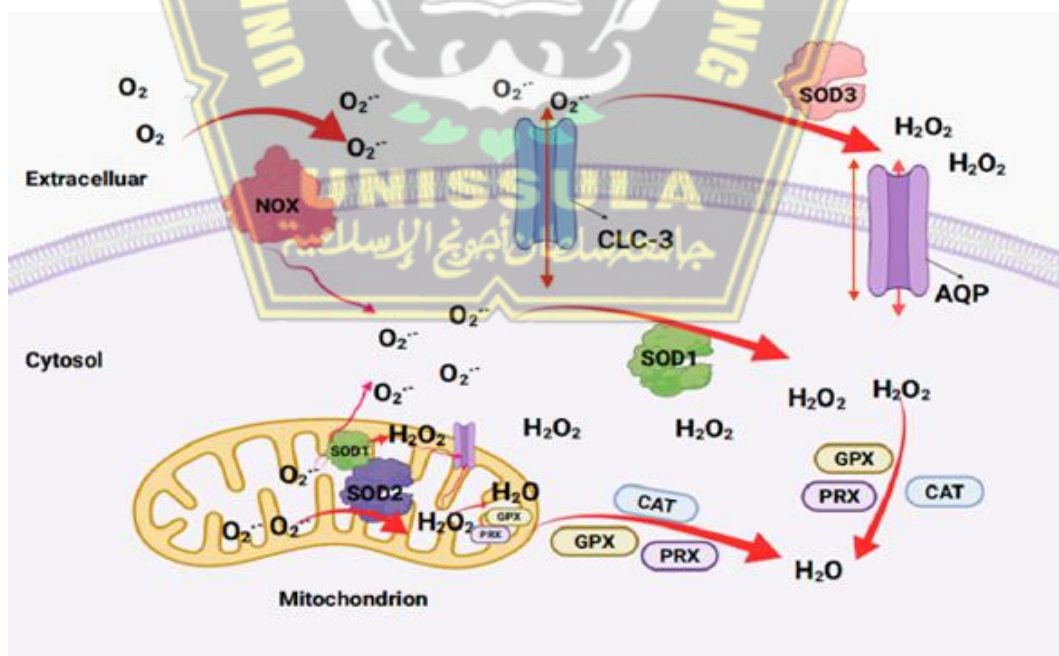
Gambar 2.1 Mekanisme Pertahanan Antioksidan Seluler<sup>29</sup>

### 2.1.2 Klasifikasi dan Lokalisasi

Enzim SOD bertindak sebagai enzim oksidoreduktase yang memanfaatkan ion logam transisi (seperti Cu, Zn, Mn) pada situs aktifnya untuk menjalankan siklus oksidasi dan reduksi secara bergantian.<sup>18,20,30,31</sup> Berdasarkan kofaktor logam dan lokalisasi selulernya, SOD diklasifikasikan menjadi tiga jenis utama (Gambar 2.2), antara lain:

1. Cu/ZnSOD atau  $\text{SOD}_1$  adalah bentuk SOD intraseluler yang menyumbang sekitar 80% dari total protein SOD. Enzim  $\text{SOD}_1$  bertanggung jawab untuk mengatur tingkat dasar stres oksidatif yang

- berasal dari produksi  $O_2^{\bullet-}$  di mitokondria dan sitosol. Enzim SOD<sub>1</sub> sering ditemukan di sitoplasma, inti sel, dan ruang antar-membran mitokondria.<sup>4,18,29</sup> Aktivitas enzim SOD<sub>1</sub> bergantung pada tembaga (Cu) sebagai katalis dan seng (Zn) untuk menjaga stabilitas serta struktur molekuler.<sup>18</sup>
- Mn-SOD atau SOD<sub>2</sub> disintesis di sitoplasma dan kemudian terlokalisasi di matriks mitokondria. Aktivitas katalitik enzim SOD<sub>2</sub> berkaitan dengan kofaktor Mangan (Mn).<sup>18</sup>
  - EC-SOD atau *extracellular superoxide dismutase* (SOD<sub>3</sub>) didistribusikan dalam darah, getah bening, cairan sinovial, dan jaringan ekstraseluler. Enzim SOD<sub>3</sub> juga menggunakan Cu/Zn sebagai kofaktor.<sup>18</sup>



rGambar 2.2 Tipe dan Distribusi Enzim SOD dalam Sel<sup>18</sup>

### 2.1.3 Regulasi Ekspresi

Ekspresi SOD diatur oleh beberapa faktor transkripsi dan jalur pensinyalan, antara lain:

1. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) dianggap sebagai pengatur utama ekspresi gen antioksidan setelah berpisah dari protein *kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1). *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) bermigrasi ke nukleus, mengikat *antioxidant response element* (ARE) pada promotor gen SOD, meningkatkan ekspresi SOD endogen.<sup>18,29</sup>
2. *Phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/ *protein kinase b* (Akt)/ *nuclear factor-kappa B* (NF-κB)/ *forkhead box O* (FOXO) dilaporkan meningkatkan ekspresi SOD dengan memindahkan NF-κB ke dalam nukleus dan mengeluarkan FOXO ke sitoplasma.<sup>29</sup>
3. Regulasi SOD melibatkan modifikasi epigenetik, seperti metilasi DNA, asetilasi histon dan ekspresi mRNA.<sup>4,18,29</sup> Metilasi DNA pada wilayah promotor gen berfungsi sebagai pengatur utama yang dapat menekan ekspresi gen, khususnya pada SOD<sub>3</sub>. Asetilasi histon berperan melalui penataan ulang kromatin untuk meningkatkan atau menurunkan aksesibilitas gen SOD agar dapat ditranskripsi, terutama pada SOD<sub>2</sub>.<sup>18</sup> Jumlah mRNA SOD<sub>1</sub> dikendalikan setelah proses pembentukan (pasca-transkripsi) oleh mikroRNA khusus, yaitu miR-377 dan miR-206, yang bertugas menghentikan pembuatan protein SOD.<sup>4</sup>

### 2.1.4 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim SOD

Aktivitas SOD sebagai enzim antioksidan utama dipengaruhi oleh berbagai faktor yang secara langsung memodulasi produksi, fungsi, atau stabilitasnya, antara lain:

1. **Genetik.** Mutasi genetik, khususnya pada gen SOD<sub>1</sub> kromosom 21q22.11, dapat mengubah fungsi enzim dari antioksidan protektif menjadi neurotoksik. Mutasi genetik memicu *misfolding* dan agregasi protein yang terkait dengan penyakit neurodegeneratif.<sup>4</sup> Genetik menentukan ketersediaan kofaktor logam yang dibutuhkan untuk stabilitas struktur enzim SOD.<sup>ay29</sup>
2. **Jenis Kelamin.** Penelitian menemukan bahwa aktivitas enzim SOD memiliki sifat dimorfik secara seksual. Rata-rata aktivitas enzim SOD ditemukan jauh lebih tinggi pada wanita dibandingkan pada laki-laki. Perbedaan pengaruh kadar SOD berdasarkan jenis kelamin kemungkinan dipengaruhi oleh variasi laju metabolisme, perbedaan sistem hormon (endokrinologi), serta interaksi genetik dengan kromosom seks.<sup>32</sup>
3. **Usia.** Usia merupakan faktor paling berpengaruh karena ekspresi SOD (terutama SOD<sub>3</sub>) menurun secara signifikan seiring bertambahnya usia.<sup>u18-20</sup> Seiring bertambahnya usia, terjadi penurunan fungsi proteasome dan gangguan mitokondria yang memicu agregasi protein SOD<sub>1</sub> yang beracun.<sup>4</sup>

**4. Metabolisme.** Kondisi metabolik sel sangat memengaruhi aktivitas enzim SOD1 melalui mekanisme pengaturan jalur *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) sebagai respons terhadap ketersediaan nutrisi.<sup>30</sup> Mutasi pada gen SOD1 dapat memicu kondisi hipermetabolisme pada jaringan otot rangka manusia.<sup>29</sup> Proses respirasi sel dan rantai pernapasan mitokondria menjadi sumber utama produksi radikal superoksida di dalam tubuh. Akumulasi superoksida tersebut secara langsung menentukan tingkat kebutuhan aktivitas enzim SOD seluler untuk menjaga keseimbangan redoks.<sup>0</sup>

**5. Berat Badan dan Nutrisi.** Konsumsi lemak yang berlebihan, terutama yang kaya asam lemak jenuh, dapat menyebabkan kelebihan nutrisi, membebani rantai transpor elektron mitokondria dan menstimulasi  $\beta$ -oksidasi asam lemak bebas, sehingga meningkatkan produksi ROS, khususnya radikal  $O_2^{\bullet-}$ .<sup>33,34</sup> Peningkatan produksi ROS yang berkelanjutan mengakibatkan peningkatan aktivitas enzim SOD sebagai reaksi kompensasi, yang pada akhirnya menyebabkan deplesi karena tubuh kesulitan meregenerasi enzim SOD secepat laju penggunaannya.<sup>35-38</sup> Penurunan aktivitas enzim SOD merupakan awal kegagalan dalam sistem pertahanan antioksidan, yang secara langsung memicu akumulasi radikal  $O_2^{\bullet-}$  dan kerusakan pada lipid sel.<sup>1,39</sup> Aktivitas SOD juga sangat bergantung pada keberadaan kofaktor logam Cu, Zn, atau Mn. Gangguan pada struktur enzim yang

menyebabkan pelepasan kofaktor logam akan mengarah pada inaktivasi enzim SOD.<sup>29</sup>

6. **Aktivitas Fisik.** Olahraga, terutama pada ibu hamil, dilaporkan dapat meningkatkan sekresi SOD<sub>3</sub>, termasuk dari plasenta ke janin untuk kesehatan metabolisme pada anak.<sup>18</sup>
7. **Lingkungan.** Paparan radiasi *ultraviolet B* (UVB) dan polutan lingkungan memicu produksi radikal bebas secara berlebihan. Beban radikal bebas tersebut memaksa sistem enzim SOD bekerja lebih keras atau mengganggu keseimbangan aktivitasnya di dalam tubuh.<sup>4,18,19,29</sup> Peningkatan kadar ROS dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> di lingkungan seluler memicu perubahan fungsi SOD dari enzim menjadi faktor transkripsi di dalam nukleus.<sup>5</sup> Paparan zat berbahaya seperti gas mustard dan asap rokok dapat menghancurkan cadangan SOD endogen secara signifikan. Zat kimia beracun seperti CTX juga merusak pertahanan enzim SOD melalui mekanisme stres oksidatif yang ekstrem.<sup>19,20,26</sup>
8. **Stres Oksidatif.** Tingkat produksi ROS dan *reactive nitrogen species* (RNS) yang tidak terkontrol memicu kebutuhan mendesak akan aktivitas enzim SOD untuk mencegah kerusakan oksidatif pada komponen protein, lipid, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA).<sup>27,28,31</sup> Kadar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang berlebih dapat merusak stabilitas struktur dimer SOD<sub>1</sub> melalui mekanisme modifikasi oksidatif pada residu histidin.<sup>4</sup> Kondisi stres oksidatif kronis pada penderita diabetes menyebabkan kadar SOD menjadi tidak normal di dalam tubuh. Stres oksidatif yang

berkepanjangan mempercepat proses glikasi yang merusak fungsi esensial enzim SOD.<sup>18,20</sup> Hasil peroksidasi lipid juga dapat bertindak sebagai perusak fungsi enzimatik SOD secara signifikan.<sup>20</sup>

### 2.1.5 Konsekuensi Penurunan Aktivitas Enzim SOD

Penurunan aktivitas enzim SOD dapat menyebabkan berbagai konsekuensi patologis, terutama berhubungan dengan peningkatan stres oksidatif dan akumulasi ROS. Ketika aktivitas SOD menurun, terjadi penumpukan  $O_2^{\bullet-}$  yang meningkatkan stres oksidatif, mengoksidasi makromolekul vital seperti DNA, protein dan lipid.<sup>4,5,18-20</sup> Kondisi tersebut memicu mutasi, kerusakan organel seluler, bahkan kematian sel melalui apoptosis.<sup>4,5</sup> Delesi gen SOD<sub>2</sub> menginduksi produksi berlebih molekul beracun seperti MDA.<sup>29</sup>

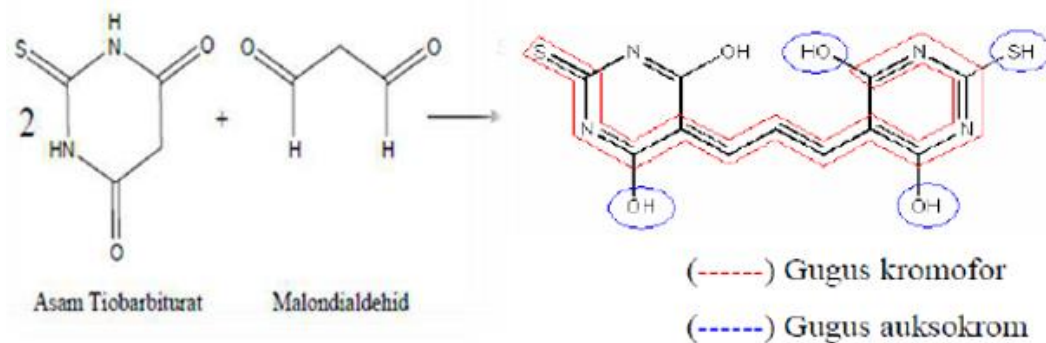
### 2.1.6 Metode Analisis

*Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) kompetitif adalah metode analisis yang sensitif untuk mengukur kadar SOD. Prinsip ELISA adalah menilai kompetisi antara SOD dalam sampel dan standar SOD untuk berikatan dengan antibodi spesifik. Penambahan substrat akan menghasilkan perubahan warna setelah terjadi inkubasi. Konsentrasi SOD dalam sampel ditentukan dengan mengukur densitas optik pada 450 nm dan membandingkannya dengan kurva standar yang tersedia.<sup>40</sup>

## 2.2 *Malondialdehyde* (MDA)

### 2.2.1 Definisi

*Malondialdehid* (MDA) merupakan senyawa dialdehid dengan rumus molekul  $C_3H_4O_2$  (struktur MDA dapat dilihat pada Gambar 2.3) yang berperan sebagai spesies elektrofil reaktif dengan tingkat reaktivitas tinggi, sehingga memungkinkan terjadinya berbagai reaksi silang dengan bahan biokimia lainnya.<sup>41-43</sup> *Malondialdehid* (MDA) berfungsi sebagai biomarker atau penanda biologis yang paling luas digunakan untuk menilai tingkat stres oksidatif.<sup>3,44-47</sup> Konsentrasi MDA di dalam tubuh mencerminkan derajat kerusakan oksidatif pada membran sel, jaringan, dan organ akibat proses metabolisme maupun paparan kontaminan.<sup>3,41,42,48,49</sup> Penggunaan MDA sebagai parameter laboratorium sangat penting untuk mengukur jumlah radikal bebas secara tidak langsung, karena radikal bebas sulit diukur secara langsung akibat waktu paruhnya yang sangat pendek.<sup>21,50</sup> *Malondialdehyde* (MDA) memiliki dampak biologis yang signifikan karena sifatnya yang toksik bagi sel dan memiliki efek mutagenik yang berpotensi merusak materi genetik.<sup>21,45,46,51</sup> *Malondialdehyde* (MDA) dapat merusak integritas struktur sel dan sering kali ditemukan pada kondisi patologis tertentu, seperti pada dinding arteri yang mengalami aterosklerosis.<sup>3,50</sup> Tubuh manusia umumnya mempertahankan nilai normal MDA pada rentang 2,02 hingga 4,65  $\mu\text{mol/L}$  untuk menjaga keseimbangan fisiologis.<sup>52</sup>



**Gambar 2.3** Struktur Malondialdehyde (MDA)<sup>21</sup>

### 2.2.2 Mekanisme Peroksidasi Lipid dan Pembentukan MDA

Peroksidasi lipid merupakan proses kerusakan oksidatif yang menyerang lipid dengan ikatan rangkap karbon-karbon, terutama asam lemak tak jenuh ganda/ *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) pada fosfolipid membran sel dan lipoprotein plasma, yang dapat terjadi baik secara enzimatik melalui peran lipoksigenase (LOX) dan siklooksigenase (COX-2) maupun secara non-enzimatik yang dimediasi oleh radikal bebas.<sup>3,41,42,46,53</sup> Mekanisme ini berlangsung melalui tiga tahapan utama yang berkesinambungan, dimulai dari fase inisiasi di mana ROS seperti radikal hidroksil ( $\bullet\text{OH}$ ) menarik atom hidrogen dari karbon lipid sehingga terbentuk radikal lipid ( $\text{L}\bullet$ ) yang tidak stabil.<sup>46,49,51</sup> Fase selanjutnya adalah propagasi atau reaksi berantai, di mana radikal lipid bereaksi dengan  $\text{O}_2$  membentuk radikal lipid peroksil ( $\text{LOO}\bullet$ ) yang kemudian menyerang molekul lipid disekitarnya, menghasilkan lipid hidroperoksida ( $\text{LOOH}$ ) serta radikal lipid baru yang menciptakan kaskade kerusakan berulang.<sup>21,49,51</sup> Rangkaian proses peroksidasi lipid berakhir pada fase terminasi saat struktur  $\text{LOOH}$  yang tidak stabil

mengalami dekomposisi, siklisasi, dan pemecahan rantai asam lemak menjadi senyawa aldehida rantai pendek, MDA sebagai produk akhir utama yang paling sering diukur.<sup>21,44,51-53</sup>

Pembentukan MDA dipicu oleh ketidakseimbangan antara prooksidan dan antioksidan yang bersumber dari faktor endogen seperti respirasi mitokondria, fagositosis, dan biosintesis tromboksan A<sub>2</sub>, maupun faktor eksogen seperti paparan asap rokok, polutan, radiasi UV, serta kondisi patologis layaknya iskemia dan disfungsi mitokondria.<sup>3,41,45,53,54</sup> *Malondialdehyde* (MDA) tidak hanya menetap sebagai biomarker tetapi juga mengalami metabolisme aktif di dalam tubuh, terutama melalui peran enzim aldehida dehidrogenase (ALDH), khususnya isoform ALDH<sub>2</sub> di tingkat mitokondria, yang bertugas mengoksidasi MDA.<sup>51,54</sup>

Proses pembersihan MDA dari sistem biologis diakhiri melalui jalur eliminasi dan ekskresi yang sistematis. Tubuh memanfaatkan sistem pertahanan antioksidan kompleks, seperti CAT, SOD, dan GPx, untuk menetralkan ROS atau menguraikan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebelum pecah menjadi MDA.<sup>3,41,48,55</sup> *Malondialdehyde* (MDA) juga dapat dikonversi menjadi karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) dalam waktu singkat, sementara sebagian lainnya diekskresikan melalui urin.<sup>41,51,56</sup> MDA juga diketahui dapat disekresikan dari membran liver ke dalam aliran darah sebagai bagian dari proses distribusinya sebelum akhirnya dibuang dari tubuh.<sup>57</sup>

### 2.2.3 Interaksi MDA dan Molekul Lain

*Malondialdehyde* (MDA) memiliki reaktivitas yang sangat tinggi namun stabilitas yang rendah sebagai sampel biologis, memicu MDA untuk berikatan dengan senyawa di sekitarnya secara ireversibel maupun reversible.<sup>3,43,58</sup> Secara kimiawi, sebagai spesies karbonil reaktif, MDA membentuk ikatan kovalen melalui adisi protein pada gugus amino- $\epsilon$  residu lisin dan arginin lewat reaksi basa Schiff, serta membentuk ikatan langsung dengan kelompok sulfhidril pada asam lemak.<sup>21,41,54</sup> Modifikasi protein non-enzimatik atau karbonilasi ini bersifat permanen dan mengakibatkan inaktivasi protein seluler secara luas.<sup>58</sup>

Kecenderungan MDA untuk bereaksi cepat dengan protein, asam amino, dan senyawa biokimia lainnya menimbulkan fenomena yang dikenal sebagai "*masking effect*", yang secara signifikan dapat mengganggu validitas data analisis di laboratorium. Reaktivitas yang ekstrem ini menyebabkan MDA cepat menghilang dari bentuk bebasnya karena terikat pada molekul lain, sehingga memicu reaksi silang (*cross-reaction*) yang mempersulit pengukuran kadar MDA secara akurat karena sebagian besar molekul telah berubah menjadi senyawa adisi.<sup>43</sup>

Interaksi ini mencakup berbagai modifikasi pada biomolekul target yang vital, mulai dari pembentukan *advance lipoxidation end products* (ALE) pada protein dan modifikasi apoprotein LDL, hingga menghambat enzim mitokondria esensial serta kerusakan enzim  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$  pada membran plasma.<sup>21,42,45</sup> Pada tingkat genetik, MDA bereaksi dengan

nukleosida seperti deoksiganosin membentuk substansi *1-methylguanine* yang bersifat mutagenik dan genotoksik, sementara pada komponen lipid, MDA mengubah sifat biomembran endoteliosit dan memodifikasi LDL-kolesterol menjadi bentuk LDL teroksidasi.<sup>41,42,44,45</sup>

Dampak patofisiologis dari modifikasi kovalen ini tidak hanya merusak struktur, tetapi juga mengubah identitas biologis molekul autologus menjadi *neo-self antigens* atau neoepitop yang imunogenik.<sup>41,53,54</sup> Pembentukan ikatan silang (*cross-linking*) pada kolagen mengakibatkan kekakuan vaskular, sementara hilangnya integritas membran sel dan denaturasi protein membran berujung pada kaskade apoptosis yang memicu gangguan fungsi sel hingga kegagalan organ individu.<sup>3,21,41,55,59</sup>

#### 2.2.4 Faktor yang Mempengaruhi Kadar MDA

Kadar MDA dapat meningkat akibat berbagai faktor yang memicu stres oksidatif.<sup>21,45,51</sup> Peningkatan kadar MDA dipicu oleh produksi berlebihan dari spesies radikal bebas seperti ROS dan RNS, atau oleh penurunan jumlah antioksidan.<sup>21,45</sup> Faktor-faktor yang berkontribusi pada peningkatan kadar MDA antara lain:

1. **Genetik dan Epigenetik.** Faktor genetik merupakan penyebab dasar penuaan dan ketidakseimbangan oksidatif.<sup>21</sup> Mutasi atau ekspresi gen transgenik seperti ALDH2 dapat menurunkan aktivitas pembersihan aldehida, sehingga meningkatkan kadar MDA.<sup>54</sup> Adanya *single nucleotide polymorphism* (SNP) pada Faktor Komplemen H (varian

H402Y) dapat mengganggu kemampuan tubuh menetralkan efek pro-inflamasi dari MDA.<sup>41</sup> Cacat genetik pada reseptor LDL, baik heterozigot maupun homozigot, secara langsung meningkatkan risiko oksidasi lipid.<sup>58</sup>

2. **Jenis Kelamin.** Wanita cenderung lebih tahan terhadap stres oksidatif karena hormon estrogen memiliki sifat antioksidan kardioprotektif, namun, titer antibodi IgM spesifik MDA ditemukan lebih tinggi pada perempuan.<sup>3,41</sup>
3. **Usia.** Bertambahnya usia meningkatkan akumulasi radikal bebas endogen dan kerusakan mitokondria.<sup>21,45</sup> Seiring penuaan, terjadi penurunan pertahanan antioksidan.<sup>3,54</sup> Kadar MDA plasma meningkat signifikan pada lansia, dengan kecenderungan terus meningkat hingga usia 69 tahun.<sup>50,54,55</sup>
4. **Berat Badan dan Indeks Massa Tubuh (IMT).** Peningkatan IMT (obesitas) berbanding lurus dengan peningkatan MDA karena beban metabolik dan mekanik pada miokardium.<sup>3</sup> Jaringan adiposa (lemak perut) meningkatkan produksi ROS yang memicu peroksidasi lipid.<sup>47</sup> Obesitas sarkopenik secara spesifik meningkatkan produk aldehida.<sup>54</sup>
5. **Nutrisi dan Diet.** Konsumsi makanan berlemak, lemak berlebih, minyak jelantah, dan kolesterol tinggi meningkatkan peroksidasi lipid dan titer antibodi terhadap MDA.<sup>3,41,44,45</sup> Konsumsi alkohol berlebihan secara signifikan meningkatkan kadar MDA.<sup>21,45</sup> Asupan

protein, vitamin C (asam askorbat), vitamin E, dan polifenol dapat menurunkan kerusakan sel dan menyeimbangkan status redoks.<sup>3,54</sup>

6. **Aktivitas Fisik.** Olahraga berlebihan atau melelahkan (*overtraining syndrome*) meningkatkan aktivitas mitokondria dan konsumsi oksigen secara cepat, yang secara signifikan meningkatkan kadar MDA.<sup>3,21,45</sup>

Latihan fisik yang teratur dan berkepanjangan justru dapat memodulasi kadar MDA dan meningkatkan status antioksidan endogen.<sup>3,41</sup>

7. **Gaya Hidup.** Kebiasaan merokok (aktif maupun pasif) adalah faktor utama yang meningkatkan kadar MDA karena radikal bebas dalam asap rokok memicu peroksidasi lipid secara langsung.<sup>3,21,45,49</sup> Tekanan mental dan stres kronis juga memicu ketidakseimbangan oksidan dalam tubuh.<sup>3,45,51</sup>

8. **Lingkungan.** Polutan dan bahan kimia menjadi sumber eksternal yang dominan dan berdampak pada peningkatan kadar MDA, mencakup asap kendaraan bermotor yang mengandung senyawa berbahaya seperti *benzene*, dan *toluene*, serta materi partikulat 2.5, asap kebakaran hutan, dan limbah industri.<sup>3,51,52</sup> Kontaminasi air oleh logam berat seperti kadmium (Cd), seng (Zn), mangan (Mn), merkuri (Hg), timbal (Pb), zat besi (Fe), dan arsenik (As), serta penggunaan pestisida dan kontaminan organik seperti *bentazone* dan klorpirifos, terbukti secara signifikan memengaruhi derajat oksidasi dalam tubuh.<sup>45,48</sup> Radiasi juga berperan penting dalam menginduksi stres

oksidatif melalui paparan sinar matahari atau UV, radiasi ionisasi, serta pengaruh suhu panas.<sup>3,21,49</sup> Kondisi lingkungan yang bersifat fluktuatif seperti faktor musim, perubahan suhu lingkungan, serta kadar oksigen terlarut dalam air turut berperan dalam menentukan luasnya kerusakan membran sel akibat serangan oksidan.<sup>41,48</sup>

### 2.2.5 Metode Analisis

Kadar MDA dapat diukur menggunakan metode lain seperti ELISA, karna memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang lebih baik dibandingkan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS).<sup>46,47,51</sup> Beberapa penelitian memilih metode ELISA karena prosesnya yang relatif lebih mudah dan cepat, meskipun biayanya lebih mahal dan memerlukan pengerjaan oleh ahli di laboratorium.<sup>46</sup>

## 2.3 Diet Tinggi Lemak

### 2.3.1 Definisi dan Karakteristik

Diet tinggi lemak didefinisikan secara klinis sebagai pola makan padat kalori dan energi yang melampaui kebutuhan metabolik tubuh, sehingga menjadi faktor risiko utama bagi berbagai penyakit kronis tidak menular seperti sindrom metabolik, dislipidemia, penyakit kardiovaskular, diabetes melitus tipe 2, hingga gagal ginjal kronis.<sup>2,60-62</sup> Diet tinggi lemak dicirikan oleh kepadatan energi yang ekstrem, di mana 40–60% total kalori bersumber dari lemak.<sup>17,39</sup> Diet tinggi lemak tidak hanya meningkatkan porsi lemak tetapi juga sering kali memodifikasi

makronutrien lain dengan menurunkan proporsi karbohidrat dan protein hingga sekitar 20% kkal dan menciptakan ketidakseimbangan energi yang signifikan.<sup>39</sup>

Dampak kronis dari diet tinggi lemak memicu perubahan luas yang mencakup gangguan profil lipid darah, ketidakseimbangan sistem redoks, dan stres metabolik pada adiposit yang ditandai dengan radikal bebas.<sup>1,34,60</sup> Diet tinggi lemak juga merusak integritas sistem pencernaan dengan mengubah komposisi mikrobiota usus dan meningkatkan permeabilitas epitel usus.<sup>63-65</sup> Kerusakan ini meluas hingga ke sistem saraf pusat, di mana konsumsi kalori berlebih sering kali gagal dideteksi oleh hipotalamus akibat respons inflamasi lokal, yang pada akhirnya memicu kelesuan perilaku dan kegagalan regulasi nafsu makan secara permanen.<sup>60,63,64</sup>

### 2.3.2 Metabolisme Lipid pada Diet Tinggi Lemak

Metabolisme lipid diawali di usus halus melalui proses mekanis dan kimiawi, ketika lemak makanan dipecah oleh empedu dan dihidrolisis oleh enzim lipase pankreas menjadi asam lemak bebas/ *free fatty acids* (FFA) dan monogliserida.<sup>66,67</sup> Dalam tahap penyerapan ini, asam lemak rantai pendek dan sedang/ *medium chain fatty acids* (MCFA) ditransportasikan langsung ke hati untuk dioksidasi di mitokondria tanpa bergantung pada enzim *carnitine palmitoyltransferase 1* (CPT-1), sehingga meminimalkan risiko penambahan massa lemak.<sup>68</sup> Monogliserida dan asam lemak rantai panjang/ *long chain fatty acids*

(LCFA) dirakit kembali menjadi trigliserida (TG) di dalam sel usus dan dikombinasikan dengan protein serta kolesterol membentuk kilomikron sebagai transporter primer yang memasuki sistem limfatik sebelum menuju aliran darah.<sup>38,66,68</sup> Di dalam sirkulasi, TG dalam kilomikron dihidrolisis oleh enzim lipoprotein lipase (LPL) menjadi FFA untuk diserap oleh jaringan adiposa sebagai cadangan energi atau oleh hati, sementara sisa kilomikron dibawa kembali ke hati.<sup>2,38</sup>

Jalur endogen kemudian dikelola oleh hati yang mensintesis TG dan kolesterol untuk disekresikan sebagai *very low density lipoprotein* (VLDL), melalui aktivitas LPL bertransformasi menjadi *intermediate density lipoprotein* (IDL) dan akhirnya menjadi LDL. *Low density lipoprotein* (LDL) memiliki peran utama mendistribusikan kolesterol ke jaringan perifer dan steroidogenik melalui reseptor LDL (Apo B-100, Apo E), sementara HDL mengelola jalur *reverse cholesterol transport* untuk membawa kelebihan kolesterol kembali ke hati.<sup>34,38,66</sup>

Metabolisme pada jaringan adiposa diatur secara ketat oleh keseimbangan jalur lipogenik yang dikendalikan insulin melalui aktivasi faktor transkripsi *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c) (meningkatkan gen *acetyl-coa carboxylase* (ACC) dan *fatty acid synthase* (FAS)), serta jalur lipolitik yang bergantung pada perilipin A dan lipase sensitif-hormon di bawah kontrol sistem saraf simpatis melalui norepinefrin.<sup>17,39</sup> Paparan diet tinggi lemak mengganggu homeostatis ini dengan meningkatkan fluks FFA ke hati dan memicu biosintesis

kolesterol berlebih melalui enzim *HMG-CoA reductase* (HMGR).<sup>1,69</sup> Akumulasi lipid yang gagal teroksidasi kemudian disimpan secara ektopik, memicu lipotoksisitas melalui pembentukan metabolit berbahaya seperti diasilgliserol (DAG) yang menghambat pensinyalan insulin melalui aktivasi protein kinase C (PKC), serta *ceramide* yang menginduksi stres retikulum endoplasma dan kerusakan neuronal di hipotalamus.<sup>17,62,63</sup>

### 2.3.3 Diet Tinggi Lemak sebagai Pemicu Stres Oksidatif Sistemik

Konsumsi lemak berlebih, terutama *saturated fatty acids* (SFA), memicu stres oksidatif melalui peningkatan  $\beta$ -oksidasi di mitokondria yang menyebabkan aliran elektron pada sitokrom-c oksidase melampaui batas normal, sehingga menghasilkan radikal anion superoksida dan ROS.<sup>2,34,70</sup> Radikal bebas ini kemudian mengoksidasi LDL dalam sirkulasi menjadi *oxidized* LDL (Ox-LDL), yang ditangkap oleh makrofag melalui reseptor *scavenger* (CD36 atau SRA), memicu pembentukan sel busa (*foam cells*), inflamasi vaskular, dan ateroma.<sup>2,34,38,61</sup> *Saturated fatty acids* (SFA) seperti palmitat, secara bersamaan, bertindak sebagai ligan bagi *toll like receptor* (TLR-2 dan TLR-4) yang mengaktifkan jalur pro-inflamasi NF- $\kappa$ B, *c-jun n-terminal kinase* (JNK), dan p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK).<sup>34,61,68</sup> Diet tinggi lemak juga meningkatkan aktivitas enzim NADPH Oksidase (NOX) sebagai sumber utama ROS non-mitokondria serta memicu akumulasi metabolit lipotoksik seperti DAG yang mengaktifkan PKC

untuk memblokir pensinyalan insulin pada *insulin receptor substrate 1* (IRS1), dan biosintesis *ceramide* yang mengganggu fungsi dan memicu fragmentasi mitokondria.<sup>2,17,71</sup>

Stres oksidatif yang berkelanjutan akhirnya mengganggu homeostasis retikulum endoplasma, menyebabkan salah lipat protein dan memicu *unfolded protein response* (UPR) serta meningkatkan penanda pro-apoptosis seperti *C/EBP homologous protein* (CHOP) dan *glucose-regulated protein 78* (GRP78).<sup>61</sup> Kondisi ini diperburuk oleh fisi mitokondria berlebih melalui *dynamin-related protein 1* (Drp1) yang melepaskan sitokrom c ke sitosol untuk membentuk apoptosom bersama *apoptosis protease activating factor 1* (Apaf-1), yang kemudian mengaktifkan kaspase 3 dan menyebabkan kematian sel masif.<sup>62</sup> Kematian adiposit melepaskan *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) yang mengaktifkan inflamasom *NOD*-, *LRR*-, and *pyrin domain-containing protein 3* (NLRP3) melalui kaspase-1, memicu sekresi *interleukin-1 beta* (IL-1 $\beta$ ) serta infiltrasi makrofag lintas jaringan.<sup>60</sup> Diet tinggi lemak, di saat yang sama, menyebabkan kegagalan kontrol redoks dengan menurunkan aktivitas sistem antioksidan endogen seperti SOD, CAT, dan GSH-GPx.<sup>1,34,39</sup> Penurunan aktivitas *AMP-activated protein kinase* (AMPK) juga melumpuhkan jalur perlindungan *sirtuin 1* (SIRT1) dan *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 $\alpha$ ), yang berakibat pada hilangnya kontrol

terhadap mTOR dan SREBP-1c serta melemahnya fungsi Nrf2 dalam meregulasi gen antioksidan.<sup>2,17,61,69</sup>

Asupan PUFA yang tidak seimbang tetap menjadi sasaran radikal bebas melalui proses peroksidasi lipid yang menghasilkan produk sitotoksik seperti MDA.<sup>1,33,34,68</sup> Di tingkat sistemik, diet tinggi lemak mengubah profil mikrobiota usus dan memicu endotoksemia metabolik melalui peningkatan pelepasan lipopolisakarida (LPS) ke sirkulasi yang berikatan dengan kompleks TLR4/CD14 pada sel imun.<sup>60,63</sup> Aktivasi jalur NF- $\kappa$ B oleh LPS ini memicu pelepasan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6, dan *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) yang merusak protein *tight junction* usus (*Occludin*, *ZO-1*, *Claudin-1*), sehingga memperparah kondisi "usus bocor".<sup>60,61,71</sup>

#### 2.3.4 Faktor yang Mempengaruhi Respon Metabolik

Dampak diet tinggi lemak dapat bervariasi antar individu atau penelitian karena respons metabolik tubuh dipengaruhi oleh interaksi kompleks berbagai faktor, antara lain:

1. Komposisi diet tinggi lemak yang kaya asam lemak jenuh cenderung lebih berbahaya, asam linoleat (C18:2)/ omega-6 dapat memicu inflamasi, sedangkan PUFA dan MCFA memiliki efek protektif.<sup>17,65,68</sup>
2. Kandungan makanan tambahan (seperti fruktosa, sukrosa) dapat merangsang lipogenesis de novo di hati, yang memperburuk obesitas dan resistensi insulin.<sup>17,72</sup> Kandungan MDA dalam makanan juga

bersifat sitotoksik dan mutagenik, merusak struktur sel, protein, dan DNA.<sup>1</sup>

3. Diet tinggi lemak juga dapat mempengaruhi kelangsungan hidup beberapa strain bakteri dan mengubah komposisi mikrobiota usus (disbiosis), mempengaruhi ekstraksi energi dari makanan, serta berkontribusi pada obesitas.<sup>73</sup>
4. Faktor genetik berperan sangat penting karena beberapa strain hewan, seperti tikus C57BL/6J dengan mutasi pada gen Nnt, lebih rentan terhadap gangguan metabolik yang diinduksi diet tinggi lemak.<sup>17,65</sup> Tikus jantan juga lebih rentan terhadap resistensi insulin yang diinduksi diet tinggi lemak dibandingkan tikus betina.<sup>17,65,71</sup>
5. Diet tinggi lemak mempengaruhi ekspresi gen di hati dan jaringan adiposa, menurunkan kemampuan tubuh untuk melakukan kompensasi dan menyebabkan kerusakan sel.<sup>1,2,33,72</sup>
6. Diet tinggi lemak dapat memicu peradangan pada tingkat adiposit, yang kemudian mengaktifkan TLR-2 dan TLR-4, *hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ), dan NF- $\kappa$ B, yang mempengaruhi ekspresi gen.<sup>60</sup> Peradangan dapat berinteraksi dengan stres oksidatif dalam sebuah lingkaran setan, di mana peningkatan satu faktor akan memperburuk yang lainnya.<sup>34</sup>
7. Kombinasi hiperglikemia, hiperlipidemia, dan peradangan kronis (terutama TNF- $\alpha$ ) pada ginjal secara sinergis menginduksi stres oksidatif.<sup>62</sup> Saraf pada jaringan adiposa memainkan peran penting

dalam regulasi jalur metabolisme. Penelitian menunjukkan bahwa denervasi dapat mengubah respons metabolik dan memperburuk stres oksidatif.<sup>39</sup>

### 2.3.5 Model Induksi Diet Tinggi Lemak

Hewan pengerat, terutama mencit strain C57BL/6, tikus strain Wistar dan strain Sprague-Dawley, sering digunakan sebagai model untuk induksi obesitas dan sindrom metabolik yang disebabkan oleh diet tinggi lemak.<sup>1,2,39</sup> Tikus jantan umumnya dipilih karena kerentanannya terhadap resistensi insulin yang diinduksi diet tinggi lemak lebih tinggi.<sup>17,65,71</sup> Diet tinggi lemak biasanya mengandung 40-60% kalori total dari lemak, sementara diet kontrol/ diet rendah lemak mengandung  $\leq 10\%$  lemak.<sup>17,62,63,68,71,73</sup> Sumber lemak yang digunakan bervariasi, seperti lemak babi, lemak sapi, minyak nabati, kuning telur puyuh, atau minyak kedelai terhidrogenasi.<sup>1,17,64,72</sup>

Karakteristik nutrisi dalam diet tinggi lemak sangat dipengaruhi oleh sumber lemak yang digunakan, seperti kuning telur puyuh.<sup>1,74</sup> Pemberian kuning telur puyuh (*Coturnix coturnix japonica L.*) dengan dosis 5 mL/200 gBB selama dua minggu pada tikus jantan galur Wistar secara signifikan menginduksi kondisi hiperlipidemia dan stres oksidatif, yang ditunjukkan dengan penurunan laju inhibisi SOD pada organ otak, dan menegaskan bahwa asupan kuning telur puyuh yang tinggi lemak dan tinggi kolesterol dapat merusak mekanisme pertahanan antioksidan endogen.<sup>1</sup>

Dominansi SFA tetap dianggap sebagai komponen paling berbahaya. *Saturated Fatty Acids* (SFA) yang bersumber dari lemak babi, lemak sapi, maupun minyak kelapa memiliki sifat lebih obesogenik dibandingkan lemak tak jenuh karena kurang efisien dioksidasi, sehingga lebih mudah disimpan dalam jaringan adiposa.<sup>17,38,68</sup> Konsumsi SFA, khususnya palmitat, secara spesifik memicu resistensi insulin melalui jalur *ceramide* serta mengaktifkan jalur pro-inflamasi NF- $\kappa$ B, JNK, dan p38 MAPK melalui ligan TLR-2/4.<sup>17,34,61</sup>

**Tabel 2.1** Komposisi Kimia Kuning Telur Puyuh Mentah<sup>74-76</sup>

Komponen	Nilai	Satuan
Air	49,37	%
Protein	16,32	%
Lemak total	30,56	%
Abu	1,1 – 1,3	%
SFA	30,84 ± 0,50	g/ 100g total FA
MUFA	47,07 ± 0,63	g/ 100g total FA
PUFA	19,98 ± 0,66	g/ 100g total FA
Fosfor (P)	4.880	mg/ kg
Kalsium (Ca)	1.490	mg/ kg
Zat besi (Fe)	39,39	mg/ kg
Magnesium (Mg)	111,41	mg/ kg
Seng (Zn)	18,98	mg/ kg
Tembaga (Cu)	0,62	mg/ kg
Kolesterol	13,61 ± 0,87	mg/ g
Rasio PUFA : SFA	0.26 : 1	
Rasio $\omega$ -6 : $\omega$ -3	64,46 : 1	

Peran PUFA dalam diet tinggi lemak sangat bergantung pada jenis dan rasionya terhadap kesehatan sel. Omega-3 (*alpha-linolenic acid* (ALA), *eicosapentaenoic acid* (EPA), *docosahexaenoic acid* (DHA)) dikenal bersifat anti-inflamasi dan mampu mengurangi risiko kematian

kardiovaskular dengan cara menghambat pensinyalan TLR4 dan TNF- $\alpha$ .<sup>17,34</sup> Omega-6 (asam linoleat) yang berlebihan justru dapat meningkatkan inflamasi sistemik.<sup>68</sup> Keseimbangan rasio omega-6 terhadap omega-3 sangat penting, dengan rasio ideal berkisar antara 1:1 hingga 4:1 untuk mencegah hambatan konversi omega-3 menjadi rantai panjang yang menguntungkan.<sup>77</sup>

Model induksi diet tinggi lemak pada hewan berhasil menginduksi berbagai kondisi, termasuk kenaikan berat badan, hiperglikemia, hiperinsulinemia, dislipidemia, dan perlemakan hati.<sup>17,62,64,65,68,71</sup> Diet tinggi lemak juga menyebabkan peradangan kronis pada jaringan adiposa dan hipotalamus yang berkontribusi pada resistensi insulin.<sup>60,63,68,70</sup> Penelitian juga menunjukkan adanya kerusakan pada organ seperti ginjal, hati, dan usus, serta disfungsi pankreas.<sup>62,71,78</sup> Pada tingkat molekuler, diet tinggi lemak menginduksi stres oksidatif, ditandai dengan peningkatan MDA dan penurunan aktivitas enzim antioksidan seperti SOD.<sup>1,39</sup> Variabilitas hasil antar studi seringkali disebabkan oleh perbedaan genetik, komposisi diet, dan durasi perlakuan.<sup>33,63,68</sup>

## 2.4 Propolis

### 2.4.1 Definisi dan Komposisi

Propolis, yang secara umum dikenal sebagai "lem lebah", berasal dari bahasa Yunani *pro* (di depan/pertahanan) dan *polis* (kota/komunitas), yang mencerminkan perannya sebagai pelindung koloni lebah.<sup>35,79,80</sup> Propolis didefinisikan sebagai campuran kompleks resin alami yang

dikumpulkan oleh lebah madu (terutama *Apis mellifera*) dari eksudat tanaman, tunas daun, bunga, batang, dan retakan kulit kayu.<sup>35-38</sup>

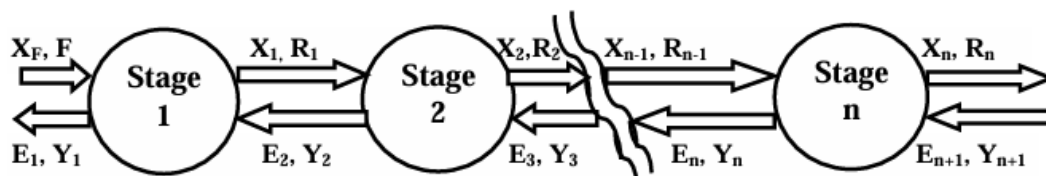
Propolis mengandung lebih dari 300 hingga 500 senyawa aktif yang komposisinya dipengaruhi oleh asal geografis, musim, dan vegetasi.<sup>35,81,82</sup> Secara umum, komponen utama propolis terdiri dari:

1. Resin dan balsam (50%–60%) yang mengandung flavonoid, asam fenolik, dan ester.<sup>35,83</sup>
2. Lilin lebah/ *Beeswax* (30%–40%).<sup>79,83</sup>
3. Minyak esensial dan volatil (5%–10%).<sup>35,83</sup>
4. Serbuk sari/ *Pollen* (5%).<sup>35,79</sup>
5. Senyawa organik & nutrisi yang mencakup vitamin (A, B1, B2, B3, B6, C, E), mineral (kalsium, magnesium, besi, seng, mangan), asam amino (valin, leusin, glisin), gula, serta enzim.<sup>35,38,79</sup>

#### 2.4.2 Metode Ekstraksi *Continous Multistage Counter-Current Extraction* (CMCE)

Ekstraksi cair-cair (*liquid-liquid extraction*), atau ekstraksi pelarut, adalah proses penting dalam industri kimia untuk memisahkan komponen dari campuran cair menggunakan pelarut. Sistem *counter-current multistage* (Gambar 2.4) 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.<sup>84</sup>



Gambar 2.4 Metode CMCE<sup>84</sup>

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 setimbang. Proses yang terjadi bergantung pada transfer massa zat terlarut, di mana komponen yang ingin dipisahkan berpindah dari fase rafinat ke fase pelarut berdasarkan perbedaan kelarutan.<sup>84</sup>

### 2.4.3 Senyawa Aktif Propolis dalam Modulasi Stres Oksidatif dan

#### Inflamasi

Propolis mengandung berbagai senyawa bioaktif yang bekerja secara sinergis, di mana *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE) merupakan komponen utama dan polifenol khas yang ada pada propolis.<sup>37,83</sup> *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE) memiliki efektivitas yang luas, mulai dari regulasi metabolisme dan obesitas melalui

pengaturan *cyclin D1*, menghambat diferensiasi preadiposit, serta penekanan ekspresi protein adipogenik seperti *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*  (PPAR- $\gamma$ ), *adipocyte p2 protein* (aP2), dan *CCAAT/enhancer-binding protein alpha* (C/EBP- $\alpha$ ), hingga kemampuannya menekan kadar leptin serta sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-6.<sup>36,81,83</sup> *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE) juga menunjukkan peran vital sebagai agen anti-inflamasi dan imunomodulator dengan menghambat jalur pensinyalan NF- $\kappa$ B dan *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), menghambat aktivasi sel T, serta memodulasi jalur asam arakidonat melalui penghambatan enzim LOX dan COX.<sup>80,82,85</sup> Efek perlindungan organ yang ditawarkan CAPE mencakup sifat neuroprotektif, hepatoprotektif, anti-platelet, dan anti-nefropati diabetik, yang didukung oleh fungsinya sebagai penangkap radikal bebas atau ROS yang sangat kuat.<sup>35,80-82,86</sup> Senyawa asam sinamat/ *cinnamic acid* berfungsi sebagai agen antibakteri yang mampu menghambat enzim *glycosyltransferase* bakteri serta memengaruhi aktivitas neutrofil dan monosit untuk meningkatkan kekebalan nonspesifik, sementara turunannya seperti *cinnamyl caffeate* memberikan perlindungan sitoprotektif pada jantung.<sup>38,80,86</sup>

Galangin yang merupakan flavonoid golongan flavonol memiliki spektrum aktivitas biologis yang luas, mulai dari antibakteri, antijamur, hingga antivirus.<sup>15,79</sup> Galangin juga berperan penting dalam memperbaiki metabolisme dengan mengatasi resistensi insulin melalui jalur

Akt/mTOR, sekaligus bertindak sebagai agen antikanker yang menginduksi apoptosis pada sel melanoma serta memperbaiki fungsi hati.<sup>80,81,85,86</sup> Flavonoid lain seperti rutin telah diidentifikasi secara molekuler memiliki kapasitas untuk menghambat target kunci virus.<sup>80</sup>

Komponen flavonoid penting lainnya adalah *chrysin* yang terbukti efektif memperbaiki enzim hati, melindungi jantung dari kerusakan oksidatif, serta menurunkan profil lipid seperti TG, LDL, dan kolesterol.<sup>35,81,83,85,86</sup> *Chrysin* juga menunjukkan potensi besar dalam mencegah nefropati diabetik, menurunkan kadar ROS intraseluler, serta memiliki aktivitas anti-tumor yang luas di berbagai organ.<sup>15,79,81,86</sup>

Apigenin berfungsi sebagai agen antibakteri dan jika dikombinasikan dengan naringin, senyawa ini mampu meningkatkan penyerapan glukosa oleh sel otot serta menghambat glikogen fosforilase.<sup>38,80,83</sup> Naringenin dalam bentuk Naringin, yang bekerja bersama galangin dan krisin, secara efektif berkontribusi dalam meningkatkan kesehatan hati serta mengoptimalkan metabolisme glukosa dalam tubuh.<sup>80,85</sup>

*Pinocembrin* hadir sebagai flavonoid yang melimpah dengan manfaat neuroproteksi yang kuat melalui aktivasi jalur Nrf2/ARE untuk melindungi otak dari stres oksidatif dan apoptosis.<sup>35,80,81</sup> *Pinocembrin* juga memiliki efek nefroprotektif dengan menghambat akumulasi matriks ekstraseluler di ginjal serta menjaga kardiomyosit dari cedera, di samping aktivitas antimikrobanya yang komprehensif.<sup>79-81,86</sup>

#### 2.4.4 Propolis sebagai Antioksidan, Antiinflamasi, Imunomodulator dan Prebiotik

Propolis menunjukkan kapasitas antioksidan yang sangat besar melalui berbagai mekanisme molekuler, di mana komponen polifenol dan flavonoid seperti *chrysin*, galangin, dan CAPE bertindak sebagai pereduksi serta penampung radikal hidroksil dan superoksida,<sup>15,38</sup> Propolis secara langsung melakukan *scavenging* terhadap radikal bebas, menghelat ion logam transisi untuk mencegah oksidasi LDL, serta menghambat enzim penghasil ROS seperti xantin oksidase dan NOX.<sup>38,82,86,87</sup> Propolis melindungi PUFA pada membran sel dari peroksidasi lipid yang ditandai dengan penurunan signifikan kadar MDA.<sup>35,38,85</sup> Pada tingkat seluler, propolis menginduksi translokasi faktor transkripsi Nrf2 ke nukleus untuk memicu ekspresi gen SOD, CAT, GPx, *heme oxygenase-1* (HO-1), dan *NAD(P)H quinone oxidoreductase 1* (NQO1).<sup>15,35,81,82</sup> Dalam regulasi metabolik, propolis menghambat aktivitas enzim lipase pankreas yang menghidrolisis lipid serta menurunkan jalur PPAR $\gamma$  dan C/EBP $\alpha$  melalui komponen CAPE untuk menghambat diferensiasi adiposit.<sup>67,81,83</sup>

Efek antiinflamasi propolis berperan dalam menghambat aktivasi, translokasi, serta pembentukan kompleks DNA NF- $\kappa$ B yang merupakan regulator utama ekspresi gen inflamasi.<sup>15,35,37</sup> Propolis juga memodulasi bakteri yang mengaktifkan jalur tersebut dan secara spesifik melalui CAPE mengganggu aktivasi TLR4 dengan memutus interaksi ligan

(LPS) pada kompleks reseptor TLR4/ *myeloid differentiation factor 2* (MD2) serta menurunkan produksi protein TLR4 di otot.<sup>37,80–82,88</sup> Propolis menurunkan konsentrasi dan ekspresi gen sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ .<sup>36,83,86,88</sup>

Sebagai imunomodulator, propolis memodulasi sistem kekebalan bawaan dan adaptif dengan meningkatkan aktivitas fagositosis, motilitas neutrofil dan monosit, serta mengaktifkan makrofag peritoneal, yang juga dimediasi melalui modulasi kaskade gen FOXO dalam resistensi apoptosis sel leukosit.<sup>35,79,87</sup> Suplementasi propolis terbukti menurunkan ekspresi protein TLR4 dan menurunkan rasio makrofag M1/M2, sehingga jumlah makrofag M1 yang pro-inflamasi berkurang.<sup>80,81</sup> Propolis merangsang kelenjar timus, meningkatkan produksi antibodi (IgG dan IgA).<sup>79,81</sup>

Propolis bertindak sebagai agen modulator mikrobiota usus yang menyerupai fungsi prebiotik dengan menurunkan kadar LPS (endotoksin) plasma melalui penekanan bakteri produsen LPS seperti *Alistipes* atau *Bacteroides* dan menormalisasi flora usus.<sup>36,81,88</sup> Propolis menghalangi interaksi ligan LPS dengan reseptornya, membantu memperkuat *tight junction* dan sawar mukosa usus guna mencegah gangguan epitel atau *leaky gut* serta menghambat bakteri proteolitik.<sup>79,80,82</sup> Propolis juga memberikan dukungan terhadap mikrobiota baik dengan meningkatkan kelimpahan bakteri penghasil

butirat seperti *Roseburia* serta bakteri yang terlibat dalam metabolisme asam empedu.<sup>88</sup>

#### 2.4.5 Efektivitas Propolis

Sebagian besar penelitian mengenai efektivitas propolis dilakukan pada tingkat praklinis, yaitu pada hewan dan sel, meskipun ada beberapa studi klinis terbatas pada manusia.<sup>15,35,82,88</sup>

**Tabel 2.2** Penelitian *in vivo* Efektivitas Propolis

Referensi	Model Hewan	Dosis	Durasi Perlakuan	Parameter yang Diukur	Kesimpulan
Roquette, AR., <i>et al</i> (2015) <sup>89</sup>	Mencit jantan galur C57BL/6 diinduksi diet tinggi lemak	Propolis mentah 0,2% dalam diet tinggi lemak	2 minggu dan 5 minggu	Komposisi mikrobiota, LPS, TLR4, GD, TG	Propolis mengembalikan profil mikrobiota usus normal, menurunkan kadar LPS, menurunkan regulasi jalur TLR4, penurunan kadar GD dan TG
Babatunde, IR., <i>et al</i> (2015) <sup>90</sup>	Tikus Wistar diinduksi Alloxan	Nigerian Propolis = 200-300 mg/kgBB/hari	28 hari	BB, asupan pakan, GD, AST/ALT, TG, Kolesterol, MDA, SOD, perubahan histopatologi hati dan pankreas	Propolis menurunkan kadar glukosa darah puasa, meningkatkan kadar SOD serum, serta memperbaiki histologi pada pankreas dan hati

Tsuchiya, Y., <i>et al</i> (2018) <sup>91</sup>	Tikus jantan galur Wistar diinduksi Asetaminofen	Propolis 0,3% dalam diet (291 mg/kgBB)	7 hari	ALT/AST, SOD <sub>1</sub> , SOD <sub>2</sub> , CAT, GPx <sub>1</sub> , GPx <sub>4</sub> , PRDx <sub>1</sub> , GSR, IL1 $\beta$ , IL6, IL10, TNF $\alpha$ , CCL <sub>2</sub> , CCL <sub>3</sub> , CXCL <sub>2</sub> , NOS <sub>2</sub> , nekrosis sel hati sentrilobular	Ekstrak etanol propolis hijau Brasil mengurangi luas area nekrosis pada hati, menurunkan ekspresi mRNA IL10 dan IL1 $\beta$
Rahmah, WN., <i>et al</i> (2019) <sup>92</sup>	Tikus jantan galur Wistar diinduksi MSG	Ekstrak propolis = 8,3 – 10,8 mg/kgBB	21 hari	MDA, 8-OH-dG, ketebalan tubulus seminiferus	Ekstrak propolis CMCE menurunkan kadar MDA dan 8-OH-dG serta meningkatkan ketebalan tubulus seminiferus
Wani, E., <i>et al</i> (2020) <sup>11</sup>	Tikus jantan galur Wistar diinduksi CCl <sub>4</sub>	Ekstrak propolis = 3,6 – 7,2 – 14,4 mg/ 200 gBB	14 hari	SOD, fibrosis hepatosit	Ekstrak propolis CMCE meningkatkan aktivitas SOD dan mengurangi derajat fibrosis pada sel hati

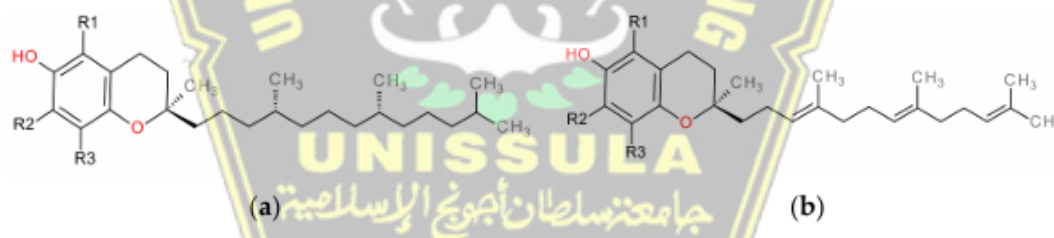
Propolis umumnya dianggap memiliki toksisitas rendah dan efek samping minimal pada manusia, dengan dosis aman yang disarankan adalah sekitar 70 mg/hari.<sup>13</sup> Ada beberapa laporan efek samping seperti iritasi mulut, dermatitis, dan reaksi alergi kontak pada individu yang sensitif terhadap salah satu dari lebih dari 26 zat alergenik yang diidentifikasi dalam propolis.<sup>13</sup> Penggunaan dosis sangat tinggi (> 75  $\mu$ M

pada sel) dapat menunjukkan efek pro-oksidan yang berpotensi merugikan.<sup>13,15,93</sup>

## 2.5 Vitamin E

### 2.5.1 Definisi, Struktur, dan Klasifikasi

Vitamin E merupakan mikronutrien esensial yang tidak dapat disintesis oleh tubuh manusia dan ditemukan sebagai faktor pendukung fungsi reproduksi.<sup>14,94</sup> Sifat lipofilik vitamin E menjadikannya sebagai antioksidan larut lemak yang paling melimpah dalam tubuh manusia yang berfungsi dalam rantai detoksifikasi radikal beracun dari fase larut lemak ke fase larut air.<sup>14,95</sup> Peran tersebut menjadikan vitamin E sebagai bagian penting dari sistem antioksidan seluler yang bertugas mencegah stres oksidatif dan peroksidasi lipid (Gambar 2.5).<sup>12,94</sup>



**Gambar 2.5** Struktur Tocoferol (TF) (a) dan Tokotrienol (TT) (b)<sup>14</sup>

Terdapat delapan bentuk alami vitamin E, yang terbagi menjadi dua subkelompok utama:<sup>12,14,96</sup>

1. Tocoferol (TF): Memiliki rantai samping isoprenoid atau fitil yang jenuh.
2. Tokotrienol (TT): Memiliki rantai samping isoprenoid atau farnesil yang tidak jenuh dengan tiga ikatan rangkap.

Masing-masing subkelompok tersebut memiliki empat homolog, yaitu alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ), dan delta ( $\delta$ ).<sup>12,14,40,97</sup> Perbedaan antar homolog terletak pada jumlah dan posisi gugus metil pada cincin fenol.<sup>14,40</sup> Vitamin E merupakan bagian dari kelompok antioksidan eksogen atau non-enzimatik, bersama dengan vitamin C, karoten, flavonoid, asam urat, bilirubin, dan albumin.<sup>40</sup>

### 2.5.2 Farmakokinetik Vitamin E

Penyerapan vitamin E terjadi di saluran pencernaan bagian atas, khususnya di usus halus.<sup>16,94</sup> Proses ini sangat bergantung pada keberadaan lipid makanan untuk proses emulsifikasi dengan bantuan garam empedu guna membentuk misel.<sup>12,14,16</sup> Efisiensi penyerapan dari diet biasa diperkirakan sekitar 75%, namun bioavailabilitasnya sangat bergantung pada jumlah lemak dalam makanan.<sup>14,16</sup> Penyerapan ini dapat berkurang signifikan pada penderita sindroma malabsorpsi lemak, seperti *cholestatic liver disease*.<sup>16,98</sup> Setelah diserap di usus, vitamin E masuk ke dalam kilomikron dan diangkut melalui sistem limfatik menuju hati.<sup>16,94,98</sup> Keberadaan tokoferol dilaporkan dapat meningkatkan penyerapan tokotrienol hingga lebih dari dua kali lipat.<sup>94</sup>

Hati menunjukkan proses stereoselektivitas yang sangat kuat terhadap vitamin E.<sup>12,16</sup> Protein Transfer  $\alpha$ -Tokoferol ( $\alpha$ -TTP) mengikat enantiomer RRR- $\alpha$ -tokoferol secara spesifik di dalam hati.<sup>12,16</sup> LDL berperan sebagai *major vehicle* untuk pengiriman vitamin E ke jaringan perifer.<sup>99</sup> Vitamin E didistribusikan ke berbagai jaringan termasuk hati,

otot, ginjal, sel darah merah, serum, serta membran mitokondria dan retikulum endoplasma.<sup>12,95,97</sup> Sekitar 90% hingga 99% simpanan vitamin E dalam tubuh berada di jaringan adiposa (lemak), dan proses *turnover* di jaringan ini berlangsung sangat lambat.<sup>16,98</sup>

Metabolisme utama terjadi di hati dan melibatkan retikulum endoplasma, peroksisom, dan mitokondria.<sup>16,95</sup> Hati mengatur konsentrasi sirkulasi melalui omega-hidroksilasi oleh enzim sitokrom P450 (CYP4F2). Isoform yang tidak terikat oleh  $\alpha$ -TTP dikatabolisme lebih cepat menjadi metabolit larut air melalui  $\beta$ -oksidasi.<sup>12,16</sup> Proses ini menghasilkan metabolit yang dikenal sebagai CEHC (misalnya  $\alpha$ -CEHC: 2,5,7,8-tetrametil-2-(2'-karboksietil)-6-hidroksikroman).<sup>14,16</sup> Vitamin E juga dapat dioksidasi membentuk *hydroquinone* yang dikonjugasikan dengan glukoronat, atau membentuk  $\alpha$ -tokoferil quinone ( $\alpha$ -TQ) dan *epoxytocopherones* melalui reaksi radikal.<sup>98,99</sup>

Tubuh menentukan rute eliminasi berdasarkan jenis isoform vitamin E. Empedu mensekresikan vitamin E yang tidak terserap menuju feses. Feses menjadi jalur utama untuk eliminasi vitamin E dari sistem pencernaan.<sup>12,16,94,98</sup> Urin mengeluarkan metabolit larut air seperti  $\alpha$ -CEHC dari ginjal.<sup>12,16,98</sup> Ekskresi  $\alpha$ -CEHC dalam urin dianggap sebagai penanda saturasi kapasitas pengikatan  $\alpha$ -TTP di hati.<sup>16</sup>

### 2.5.3 Farmakodinamik Vitamin E

Farmakodinamik vitamin E mencakup aktivitas antioksidan lipofilik dan perannya sebagai modulator fungsi seluler melalui berbagai

mekanisme biokimia yang kompleks. Vitamin E bekerja sebagai *chain-breaking antioxidant* dengan mendonorkan hidrogen fenolik dari posisi 6 cincin kromanol kepada radikal LOO•, sehingga bertransformasi menjadi radikal  $\alpha$ -tokoferoksil ( $\alpha$ -TO•) yang bersifat stabil dan kurang reaktif.<sup>16,99</sup> Agar vitamin E tetap efektif dan tidak menjadi pro-oksidan, radikal  $\alpha$ -TO• harus direduksi kembali menjadi bentuk aktif melalui sistem regenerasi yang didukung oleh ko-antioksidan lain, seperti vitamin C (askorbat), ubikuinol, GSH, selenium, asam lipolat, dan NAD(P)H.<sup>12,16,95,97</sup>

Vitamin E meregulasi kaskade sinyal seluler seperti NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt/mTOR, dan MAPK, yang secara langsung mengontrol proliferasi sel serta ekspresi gen tertentu.<sup>14,94</sup> Vitamin E juga berperan aktif dalam menghambat enzim seperti PKC, COX-2, dan LOX, sekaligus menurunkan regulasi molekul adhesi seluler seperti *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) dan *vascular adhesion molecule 1* (VCAM-1).<sup>12,14,99</sup> Vitamin E mampu mengaktifkan jalur Nrf2 yang memicu sintesis enzim antioksidan endogen seperti SOD, CAT, dan GPx, serta meningkatkan regulasi protein SIRT1.<sup>96</sup> Perlu diperhatikan adanya potensi interaksi obat pada tingkat farmakodinamik-farmakokinetik, di mana konsumsi vitamin E dosis tinggi dapat meningkatkan ekspresi protein CYP3A4 di hati yang mempercepat metabolisme obat-obatan tertentu sehingga berpotensi menurunkan efektivitas terapinya.<sup>14,95</sup>

### 2.5.4 Efektivitas Vitamin E

Vitamin E memiliki peran multidimensi dalam menjaga integritas struktural sistem biologis, termasuk melindungi membran sel eritrosit dan konduktivitas saraf dari kerusakan oksidatif guna mencegah anemia hemolitik.<sup>16,100</sup> Di organ ginjal, vitamin E bermanfaat memperbaiki profil lipid serta kelainan hemodinamik pada pasien diabetes.<sup>95</sup> Pada sistem kardiovaskular, nutrisi ini melindungi LDL dari oksidasi yang memicu aterosklerosis, mengatur proses vasodilatasi, dan menghambat agregasi trombosit.<sup>12,100</sup> Vitamin E berkontribusi dalam perbaikan sel beta pankreas dari kerusakan stres oksidatif, misalnya akibat induksi *Streptozocin*, yang berdampak pada peningkatan sekresi insulin.<sup>98</sup>

Terkait aktivitas enzimatik, vitamin E menunjukkan regulasi bifasik terhadap SOD; pada tahap awal, vitamin E memberikan *sparing effect* dengan bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas yang mengeliminasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (inhibitor SOD) sehingga aktivitas SOD meningkat, namun akumulasi dosis tinggi dalam jangka panjang justru dapat menurunkan aktivitasnya.<sup>96,101</sup> Manfaat klinis lainnya terlihat dari penurunan kadar MDA sebagai penanda peroksidasi lipid, sementara fraksi tokotrienol secara spesifik membantu menurunkan kolesterol dan memiliki potensi anti-kanker melalui induksi penahanan siklus sel.<sup>94,96,98</sup>

Tabel 2.3 Penelitian *in vivo* Efektivitas Vitamin E

Referensi	Model Hewan	Dosis	Durasi Perlakuan	Parameter yang Diukur	Kesimpulan
Das Gupta, S., <i>et al</i> (2014) <sup>102</sup>	Tikus betina ACI	Campuran kaya $\gamma$ -TF 0,3% dalam diet (56,1% $\gamma$ -TF, 22,3% $\delta$ -TF, 11,5% $\alpha$ -TF, dan 1,2% $\beta$ -TF)	14 hari	8-OH-dG, <i>nitrotyrosine</i> , Nrf2, SOD, CAT, GPx, 8-isoprostane	Campuran kaya $\gamma$ -TF menunjukkan efek sitoprotektif dan mencegah hiperplasia payudara yang diinduksi estrogen
Shin J., <i>et al</i> (2017) <sup>103</sup>	Tikus jantan ICR	$\gamma$ -TF = 35 mg/kgBB per-oral 5x per minggu	2 minggu	NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Nrf2, NQO1, HO-1, MnSOD, CAT, GPx, SIRT-1, PGC1- $\alpha$ , p53	$\gamma$ -TF mencegah keterlambatan penyembuhan luka dengan menghambat NF- $\kappa$ B dan menurunkan stress oksidatif
Vasei, FM., <i>et al</i> (2024) <sup>96</sup>	Tikus jantan NMR	Vitamin E = 100, 200, 400 mg/kgBB	28 hari	Fungsi kognitif, perubahan histopatologi otak dan jantung, MDA, SOD, GPx, konsentrasi mRNA	Vitamin E meningkatkan fungsi kognitif, mengurangi stress oksidatif di jaringan otak dan jantung, mempengaruhi penanda genetik <i>aging</i>
Ratnawati, R., <i>et al</i> (2024) <sup>9</sup>	Tikus jantan galur Wistar	Fortifikasi bubuk air kelapa muda dengan vitamin E = 1,8 IU/200 gBB	28 hari	SOD, GPx, MDA, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP	Fortifikasi bubuk air kelapa muda dengan vitamin E efektif mencegah stress oksidatif dan inflamasi

Untuk penggunaan yang aman, asupan adekuat pada dewasa sehat berkisar antara 11-15 mg/hari, sedangkan batas atas toksik ditetapkan bervariasi antara 300 mg hingga 1.000 mg/hari.<sup>14,16,95</sup> Dosis yang sangat tinggi harus dihindari karena berisiko menurunkan status vitamin K dan dapat memicu *tocopherol-mediated peroxidation* (TMP) yang justru mempercepat oksidasi LDL jika konsentrasi vitamin E terlalu tinggi tanpa pendamping ko-antioksidan yang cukup.<sup>12,16,95,99,101</sup>



## BAB III

### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka Teori

Diet tinggi lemak dapat mempengaruhi keseimbangan metabolik dan homeostasis seluler, memicu serangkaian proses patologis yang mengakibatkan stres oksidatif sistemik.<sup>104,105</sup> Konsumsi diet tinggi lemak memicu peningkatan penyerapan lipid di usus halus melalui pembentukan kilomikron.<sup>2,106</sup> Kilomikron yang bersirkulasi mengangkut TG ke jaringan perifer dan hati, sehingga meningkatkan kadar TG plasma.<sup>106</sup> Kelebihan TG di sirkulasi berperan dalam pembentukan LDL dan, selanjutnya, OxLDL.<sup>2</sup> OxLDL berfungsi sebagai ligan proinflamasi bagi makrofag, memicu polarisasi makrofag M1 serta meningkatkan pelepasan sitokin inflamasi dan ROS.<sup>61,68</sup> Proses oksidasi LDL dapat memperburuk stres oksidatif di jaringan hati dan vaskular, sehingga memperburuk siklus inflamasi sistemik.<sup>64,70</sup>

Asam Lemak Jenuh (SFA), sebagai komponen utama TG, menginduksi serangkaian jalur patologis lipotoksisitas, yang ditandai dengan peningkatan  $\beta$  oksidasi berlebihan di mitokondria, sehingga secara langsung menghasilkan ROS dalam jumlah tinggi.<sup>17,107</sup> Asam Lemak Jenuh (SFA) juga berperan dalam pembentukan metabolit bioaktif Ceramide dan DAG.<sup>108</sup> *Diacylglycerol* (DAG) mengaktivasi PKC, yang memicu fosforilasi IRS-1 pada serin, menghambat jalur PI3K/Akt, dan menyebabkan resistensi insulin.<sup>17,68</sup> Resistensi insulin

yang mengganggu jalur PI3K/Akt dapat menstimulasi mTOR. Aktivasi mTOR, yang berinteraksi dengan SREBP-1C, dapat meningkatkan lipogenesis sekaligus meningkatkan ROS.<sup>109</sup> Gangguan pada jalur PI3K/Akt selanjutnya dapat menurunkan aktivitas AMPK, yang melemahkan kapasitas antioksidan seluler melalui inaktivasi SIRT1 dan Nrf2.<sup>2,110</sup> Asam Lemak Jenuh (SFA) dan ceramide menginduksi stress reticulum endoplasma dengan mengaktifkan jalur *protein kinase R-like ER kinase* (PERK)/MAPK, meningkatkan ekspresi CHOP.<sup>61,111,112</sup> *C/EBP Homologous Protein* (CHOP) memicu jalur proapoptosis melalui pelepasan sitokrom-C dan aktivasi kaspase-3, yang pada akhirnya meningkatkan pembentukan ROS dan memperburuk stres oksidatif sistemik.<sup>62,108</sup> Asam Lemak Tak Jenuh Ganda (PUFA) memiliki peran ganda yang kontradiktif. Asam Lemak Tak Jenuh Ganda (PUFA) berfungsi protektif karena mengaktifasi PPAR- $\gamma$ , yang menekan ekspresi NF- $\kappa$ B; namun, PUFA juga rentan terhadap oksidasi oleh LOX dan COX, menghasilkan eikosanoid pro-oksidatif yang meningkatkan produksi ROS.<sup>113–115</sup>

Jalur inflamasi akibat diet tinggi lemak juga melibatkan gangguan pada homeostasis usus.<sup>2,68</sup> Diet tinggi lemak menyebabkan disbiosis dan merusak *gut barrier*, meningkatkan translokasi LPS serta *trimethylamine n-oxide* (TMAO) ke sirkulasi sistemik.<sup>71,73,116</sup> Lipopolisakarida (LPS) berikatan dengan TLR 2/4, memicu kaskade *I-kappa-B kinase  $\beta$*  (IKK $\beta$ ) dan menginduksi aktivasi faktor transkripsi sentral, NF- $\kappa$ B.<sup>60,61</sup> Aktivasi NF- $\kappa$ B meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi, seperti TNF- $\alpha$  dan IL-6.<sup>2,60,61,68</sup> Sitokin proinflamasi tersebut menstimulasi NOX dan *uncoupling protein 2* (UCP2),

memicu polarisasi makrofag M1 pro-inflamasi, dan melepaskan lebih banyak ROS.<sup>17,117,118</sup>

Peningkatan produksi ROS yang berlebihan memicu respons kompensasi seluler dengan menginduksi disosiasi Nrf2 dari Keap1.<sup>1,29</sup> Translokasi Nrf2 ke nukleus berfungsi meningkatkan ekspresi enzim antioksidan endogen; namun, ROS yang berlebihan menghambat transkripsi gen antioksidan dan menyebabkan penurunan aktivitas SOD.<sup>29</sup> *Radical oxygen species* (ROS) yang berlebihan juga memicu peroksidasi lipid, menghasilkan produk toksik stabil MDA, yang merupakan penanda kerusakan oksidatif.<sup>33,65,72</sup>

Faktor perancu biologis seperti berat badan, status nutrisi, jenis kelamin, usia, faktor genetik, serta aktivitas fisik dan gaya hidup memodulasi respons stres oksidatif dengan memengaruhi kadar SOD dan MDA.<sup>3,4,29,51</sup> Kondisi berat badan berlebih atau obesitas berkorelasi signifikan dengan kenaikan kadar MDA akibat tingginya beban metabolik dan akumulasi lemak yang memicu laju pembentukan radikal bebas.<sup>3,47,51</sup> Nutrisi memainkan peran yang sangat penting; diet tinggi lemak, kolesterol, serta konsumsi daging asap dan alkohol dapat menghancurkan cadangan SOD endogen dan meningkatkan peroksidasi lipid, sementara asupan fitokimia, sayuran, buah-buahan, dan kofaktor logam (Fe, Mn, Cu, Zn) sangat dibutuhkan untuk mendukung aktivitas katalitik enzim SOD.<sup>19,26,27,30,45</sup> Jenis kelamin juga mempengaruhi keseimbangan redoks, karena wanita memiliki hormon estrogen yang berperan kardioprotektif sehingga cenderung memiliki pertahanan antioksidan yang

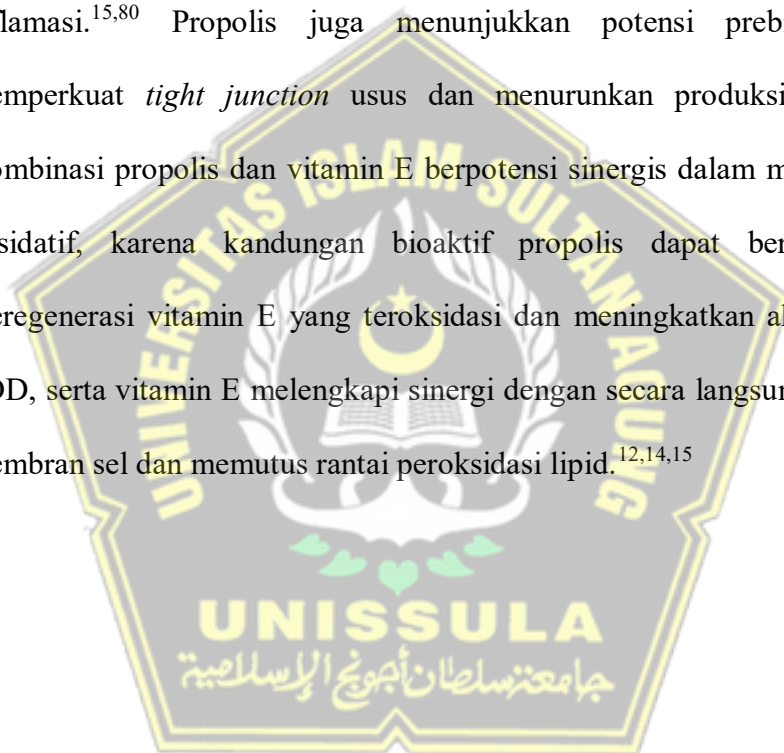
lebih kuat dibandingkan laki-laki yang seringkali menunjukkan kadar MDA yang lebih tinggi.<sup>3,44</sup>

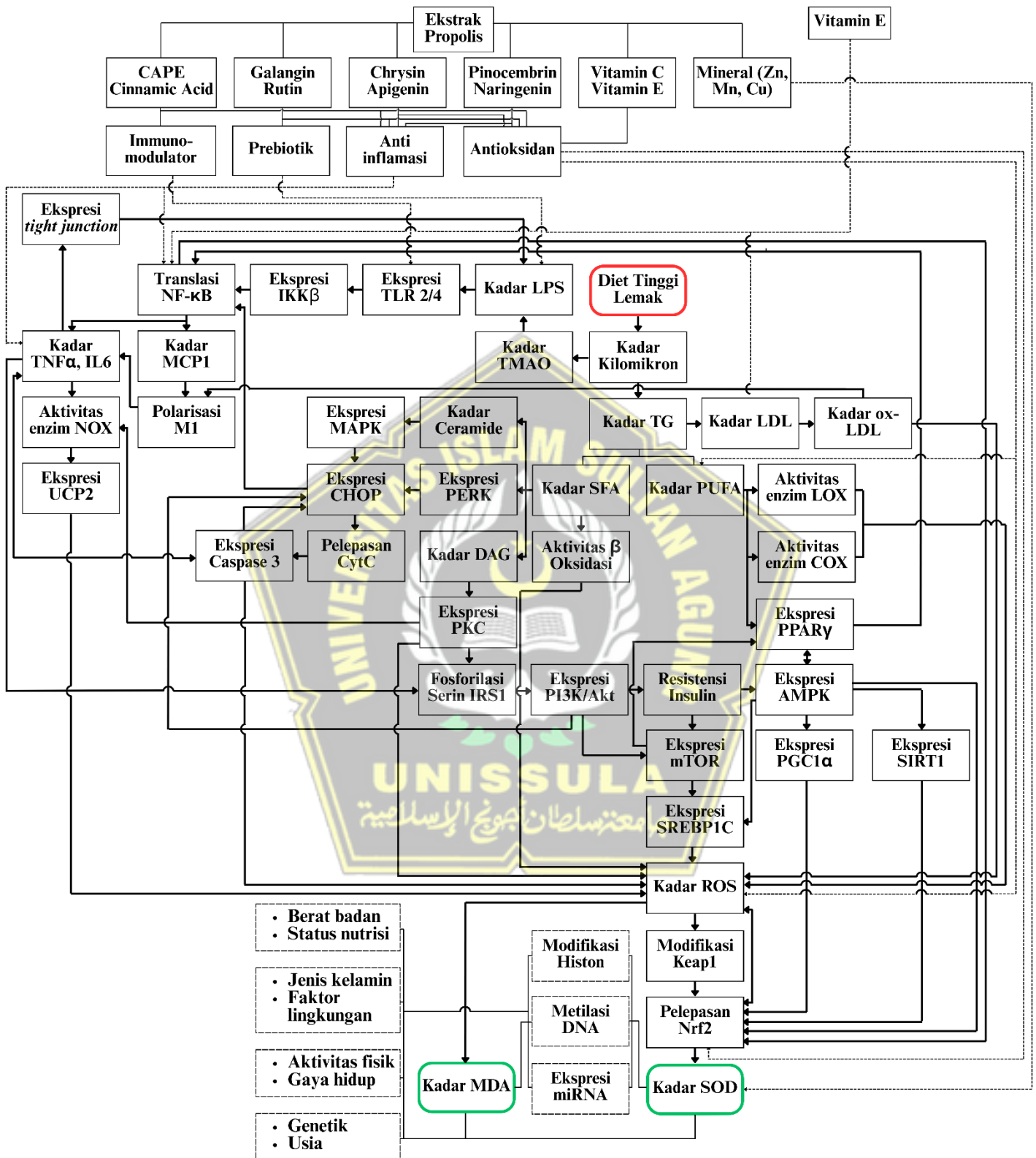
Proses penuaan merupakan faktor paling dominan yang mengakibatkan penurunan ekspresi SOD (terutama SOD<sub>3</sub>) dan gangguan fungsi mitokondria, yang berujung pada akumulasi radikal bebas serta peningkatan MDA secara signifikan.<sup>4,18,50,54</sup> Paparan lingkungan seperti polusi udara, radiasi ultraviolet, asap rokok, dan logam berat (Cd, Hg, Pb) memperburuk stres oksidatif yang memaksa sistem SOD bekerja melampaui kapasitasnya.<sup>28,29,49,52</sup> Faktor genetik melalui mutasi pada gen SOD<sub>1</sub>, SOD<sub>2</sub>, atau SOD<sub>3</sub> serta adanya polimorfisme dapat menentukan kerentanan individu terhadap penyakit degeneratif dan kemampuan tubuh dalam menetralkan efek pro-inflamasi dari MDA.<sup>2,28,29,41</sup>

Faktor epigenetik (metilasi DNA, modifikasi histon, dan regulasi miRNA) memainkan peran penting dalam mengatur keseimbangan antioksidan dan stres oksidatif, yang secara langsung memengaruhi kadar SOD dan pembentukan MDA. Metilasi DNA pada promotor (terutama SOD<sub>3</sub>) dan asetilasi histon pada daerah *enhancer* (SOD<sub>2</sub>) menjadi pengatur utama yang dapat menekan atau meningkatkan transkripsi gen tersebut.<sup>18</sup> Regulasi pasca-transkripsi melibatkan mikroRNA, seperti miR-377 dan miR-206 yang menghambat SOD<sub>1</sub>, serta miR-21 yang menargetkan SOD<sub>3</sub>.<sup>4,28</sup>

Propolis dan vitamin E menawarkan pendekatan yang efektif untuk memulihkan ketidakseimbangan antara antioksidan dan stres oksidatif.<sup>7,10,23</sup> Propolis dan vitamin E berfungsi sebagai antioksidan kuat dengan meningkatkan ekspresi Nrf2 dan kapasitas SOD serta menekan pembentukan

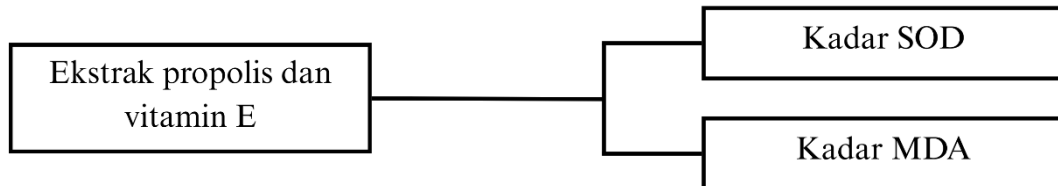
ROS, sehingga menurunkan kadar MDA dan meningkatkan aktivitas SOD.<sup>14,15,35,80,82</sup> Propolis menginduksi pembentukan SOD karena kandungan mineral seperti seng (Zn), tembaga (Cu), dan mangan (Mn) yang penting sebagai kofaktor penting untuk SOD.<sup>6,7,10</sup> Propolis memiliki peran imunomodulator dan antiinflamasi komprehensif dengan menghambat aktivasi TLR4/IKK $\beta$ , menekan jalur NF- $\kappa$ B, dan menurunkan ekspresi sitokin pro-inflamasi.<sup>15,80</sup> Propolis juga menunjukkan potensi prebiotik dengan memperkuat *tight junction* usus dan menurunkan produksi LPS.<sup>88,119,120</sup> Kombinasi propolis dan vitamin E berpotensi sinergis dalam mengatasi stres oksidatif, karena kandungan bioaktif propolis dapat berperan dalam meregenerasi vitamin E yang teroksidasi dan meningkatkan aktivitas enzim SOD, serta vitamin E melengkapi sinergi dengan secara langsung melindungi membran sel dan memutus rantai peroksidasi lipid.<sup>12,14,15</sup>





Gambar 3.1 Kerangka Teori

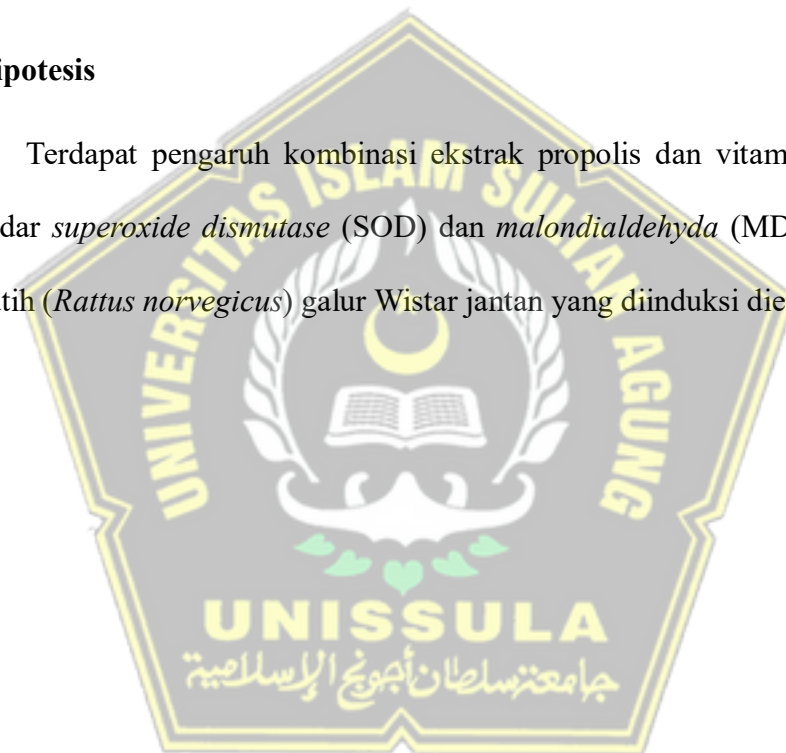
### 3.2 Kerangka Konsep



**Gambar 3.2** Kerangka Konsep

### 3.3 Hipotesis

Terdapat pengaruh kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E terhadap kadar *superoxide dismutase* (SOD) dan *malondialdehyda* (MDA) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang diinduksi diet tinggi lemak.

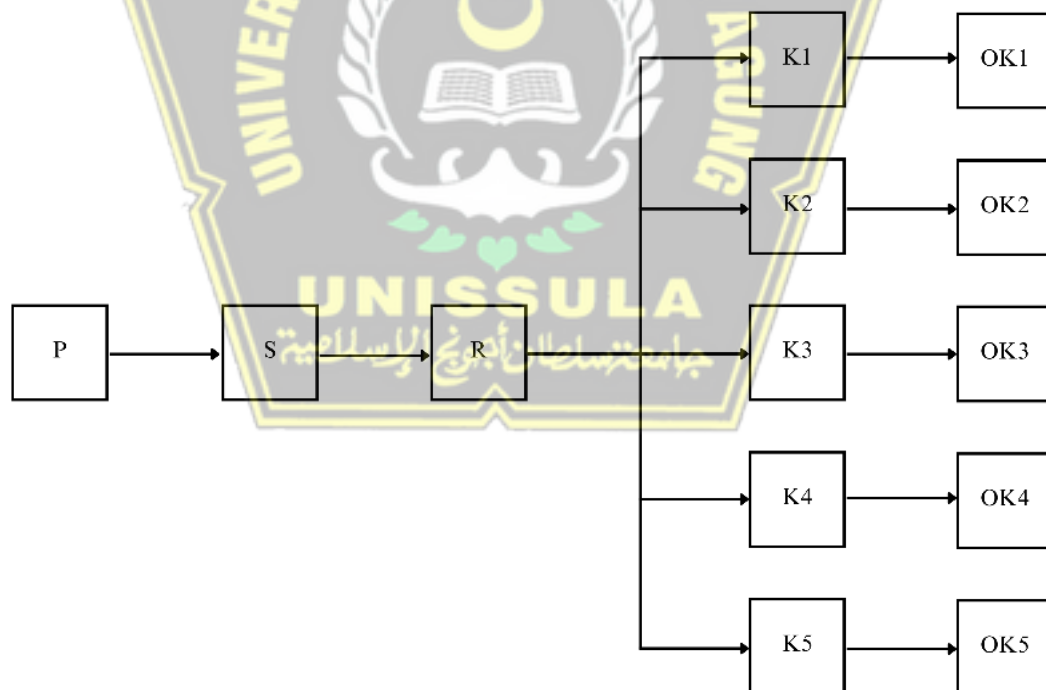


## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan hewan coba tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*). Rancangan penelitian yang digunakan adalah *post-test only control group design*. Hewan coba dibagi secara acak ke dalam 5 kelompok, yang terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan dan dapat dilihat pada gambar 4.1.



**Gambar 4.1** Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

- P = Populasi penelitian
- S = Subjek penelitian
- R = Random alokasi

- K1 = Kelompok kontrol sehat (tanpa diinduksi diet tinggi lemak)  
 K2 = Kelompok kontrol negatif (diinduksi diet tinggi lemak)  
 K3 = Kelompok perlakuan 1 (diinduksi diet tinggi lemak dan diberi vitamin E dengan dosis 12 mg/ KgBB/ hari selama 14 hari)  
 K4 = Kelompok perlakuan 2 (diinduksi diet tinggi lemak dan diberi ekstrak propolis dengan dosis 36 mg/ KgBB/ hari selama 14 hari)  
 K5 = Kelompok perlakuan 3 (diinduksi diet tinggi lemak, diberi vitamin E dengan dosis 6 mg/ KgBB/ hari dan ekstrak propolis dengan dosis 18 mg/ KgBB/ hari dan selama 14 hari)  
 OK1 = Observasi kadar SOD dan MDA kelompok kontrol sehat (K1)  
 OK2 = Observasi kadar SOD dan MDA kelompok kontrol negatif (K2)  
 OK3 = Observasi kadar SOD dan MDA kelompok perlakuan 1 (K3)  
 OK4 = Observasi kadar SOD dan MDA kelompok perlakuan 2 (K4)  
 OK5 = Observasi kadar SOD dan MDA kelompok perlakuan 3 (K5)

## 4.2 Populasi dan Teknik Pengambilan Sampel

### 4.2.1 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini berupa sejumlah tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang memenuhi kriteria inklusi dan sudah diaklimatisasi pada kondisi lingkungan laboratorium, di Laboratorium *Intregrated Biomedical Laboratory* (IBL) Fakultas Kedokteran (FK) Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA) Semarang.

### 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

Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan dengan metode *simple random sampling*.

#### 4.2.4 Kriteria Inklusi

1. Usia 10-12 minggu
2. Berat 200-220 g
3. Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomis

#### 4.2.5 Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang sakit/ mati selama penelitian

### 4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

#### 4.3.1 Variabel

1. Variabel bebas : Ekstrak propolis dan vitamin E
2. Variabel terikat : Kadar SOD dan MDA
3. Variabel prakondisi : Diet tinggi lemak

### 4.3.2 Definisi Operasional

#### 1. Ekstrak Propolis

Ekstrak propolis yang digunakan merupakan produk HDI PROPOELIX™ produksi PT. Harmoni Dinamik Indonesia dengan sediaan 200 mg per kapsul. 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.<sup>11</sup> Pemberian ekstrak propolis dilakukan melalui sonde oral setiap hari selama 14 hari.

Skala : Nominal

#### 2. Vitamin E

Vitamin E yang digunakan adalah vitamin E dalam bentuk alami yaitu d- $\alpha$  tokoferol, produk Natur-E 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 satuan IU ke mg (1 IU = 0,67 mg) dan konversi dosis manusia (100 IU dan 200 IU) ke dosis tikus dengan berat badan sekitar 200 g.<sup>9,14</sup> Pemberian suplemen vitamin E dilakukan melalui sonde oral setiap hari selama 14 hari.

Skala : Nominal

### 3. Kadar *Superoxide Dismutase* (SOD)

Kadar SOD merupakan hasil pengukuran kadar SOD dari sampel serum yang diambil dari pleksus sinus orbital pada hari ke-15 setelah diberikan perlakuan dan dianalisis menggunakan metode ELISA dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm dengan satuan nanogram/mililiter (ng/ mL).<sup>40</sup>

Skala : Rasio

### 4. Kadar *Malondialdehyde* (MDA)

Kadar MDA merupakan hasil pengukuran kadar MDA sampel serum yang diambil dari pleksus sinus orbital pada hari ke-15 setelah diberikan perlakuan dan dianalisis menggunakan metode ELISA dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm dengan satuan nanogram/mililiter (ng/ mL).<sup>46,47,51</sup>

Skala : Rasio

## 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: 20 cm
2. Timbangan
3. Alat sonde
4. Mikropipet
5. Mikropipet tip ukuran 100  $\mu$ L dan 10  $\mu$ L

6. Pipa hematokrit
7. *Vial tube* ukuran 1,5 mL
8. *Sentrifuge*
9. Inkubator
10. ELISA *reader*

#### 4.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan:

1. Tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*)
2. Pakan tikus standar
3. *Aquadest*
4. Kuning telur puyuh mentah
5. Ekstrak propolis
6. Vitamin E (d- $\alpha$  tokoferol)
7. Reagen SOD ELISA kit
8. Reagen MDA 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. 567/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 jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) diaklimatisasi selama 7 hari di laboratorium IBL FK UNISSULA Semarang. Selama periode aklimatisasi, seluruh tikus diberikan pakan dan minum standar. Setelah aklimatisasi, tikus dibagi ke dalam 5 kelompok secara acak (terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan).

#### 4.5.3 Penetapan Dosis Ekstrak Propolis dan Vitamin E

##### 1. Dosis Ekstrak Propolis

Penentuan dosis ekstrak propolis yang digunakan berdasarkan pada penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa dosis 18 mg/ KgBB/ hari dan 36 mg/ KgBB/ hari terbukti efektif dalam meningkatkan aktivitas enzim antioksidan SOD pada tikus.<sup>11</sup>

##### 2. Dosis Vitamin E

Penentuan dosis vitamin E (d- $\alpha$  tokoferol) yang digunakan berdasarkan pada penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa vitamin E dengan dosis 6 mg/ KgBB/ hari terbukti efektif dalam meningkatkan kadar SOD dan menurunkan kadar MDA pada tikus.<sup>9</sup>

#### 4.5.4 Komposisi Diet Tinggi Lemak

Diet tinggi lemak terdiri dari kombinasi pakan standar dan kuning telur puyuh mentah. Pakan standar berupa pemberian pelet tikus merk HI-PRO-VITE dan *aquadest* secara *ad libitum* yang diganti sisanya setiap pagi.

**Tabel 4.1** Komposisi Pakan Standar merk HI-PRO-VITE

<b>Komposisi</b>	<b>Kadar</b>
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 $\mu$ / kg (max)
Lisin	0,63% (min)
Metionin	0,25% (min)

Kuning telur puyuh digunakan sebagai model induksi diet tinggi lemak karena kaya lemak, rasio PUFA/SFA lebih rendah, dan rasio  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 lebih tinggi (standar rasio 1-4 : 1) sehingga bersifat pro-inflamasi.<sup>75</sup> Kuning telur puyuh diberikan melalui sonde oral dengan dosis 2 mL/ 200 gBB/hari.<sup>121,122</sup>

#### 4.5.5 Pembagian Kelompok Perlakuan

Setelah menjalani aklimatisasi selama 7 hari, 30 ekor tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) dibagi secara acak ke dalam 5 kelompok (K1, K2, K3, K4, K5), dan diberikan perlakuan selama 14 hari sebagai berikut:

1. **Kelompok Sehat (K1):** Diberikan pakan standar dan *aquadest* setiap hari.
2. **Kelompok Kontrol Negatif (K2):** Diberikan pakan standar, *aquadest* dan diinduksi dengan diet tinggi lemak.
3. **Kelompok Perlakuan 1 (K3):** Diberikan pakan standar, *aquadest* dan diinduksi dengan diet tinggi lemak, serta diberikan suplemen

vitamin E (d- $\alpha$  tokoferol) dengan dosis 12 mg/ KgBB/ hari melalui sonde oral.

4. **Kelompok Perlakuan 2 (K4):** Diberikan pakan standar, *aquadest* dan diinduksi dengan diet tinggi lemak, serta diberikan ekstrak propolis dengan dosis 36 mg/ KgBB/ hari melalui sonde oral.
5. **Kelompok Perlakuan 3 (K5):** Diberikan pakan standar, *aquadest* dan diinduksi dengan diet tinggi lemak, serta diberikan kombinasi ekstrak propolis dengan dosis 18 mg/ KgBB/ hari dan vitamin E (d- $\alpha$  tokoferol) dengan dosis 6 mg/ KgBB/ hari melalui sonde oral.

#### 4.5.6 Penimbangan Berat Badan

Penimbangan berat badan tikus dilakukan secara berkala pada semua kelompok sebelum dilakukan aklimatisasi, setelah aklimatisasi, setelah 7 hari perlakuan, dan setelah 14 hari perlakuan.

#### 4.5.7 Prosedur Pengambilan Sampel sebagai Spesimen

1. Setelah tikus selesai mendapatkan perlakuan sesuai dengan protokol penelitian, tikus dipuasakan selama 12 jam.
2. Pengambilan sampel darah dilakukan dari area pleksus retro-orbital menggunakan pipa hematokrit, dengan volume  $\pm 1,5$  mL.
3. Darah yang telah diambil disimpan dalam *vial tube* bersih tanpa antikoagulan (*red top*) untuk selanjutnya dilakukan preparasi spesimen.

#### 4.5.8 Preparasi Spesimen

1. Darah yang telah ditampung didiamkan pada suhu ruang selama 10-20 menit.
2. Sampel darah kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2000-3000 rpm selama 15 menit.
3. Serum darah tikus dipisahkan dan dapat disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk selanjutnya dianalisis.

#### 4.5.9 Pemeriksaan Profil Lipid

Pemeriksaan profil lipid dilakukan sebagai langkah awal sebelum pemeriksaan kadar SOD dan MDA untuk mengevaluasi pengaruh diet tinggi lemak terhadap perubahan kondisi lemak dalam darah.

#### 4.5.10 Prosedur Pemeriksaan Kadar SOD dan MDA

Sampel serum yang telah diperoleh kemudian dianalisis kadar SOD dan MDA menggunakan metode ELISA. Analisis ELISA untuk kadar SOD dan MDA dilakukan sesuai dengan prosedur yang tertera dalam petunjuk reagensia, menggunakan alat *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm. Tahapan pemeriksaan kadar SOD dan MDA adalah sebagai berikut:

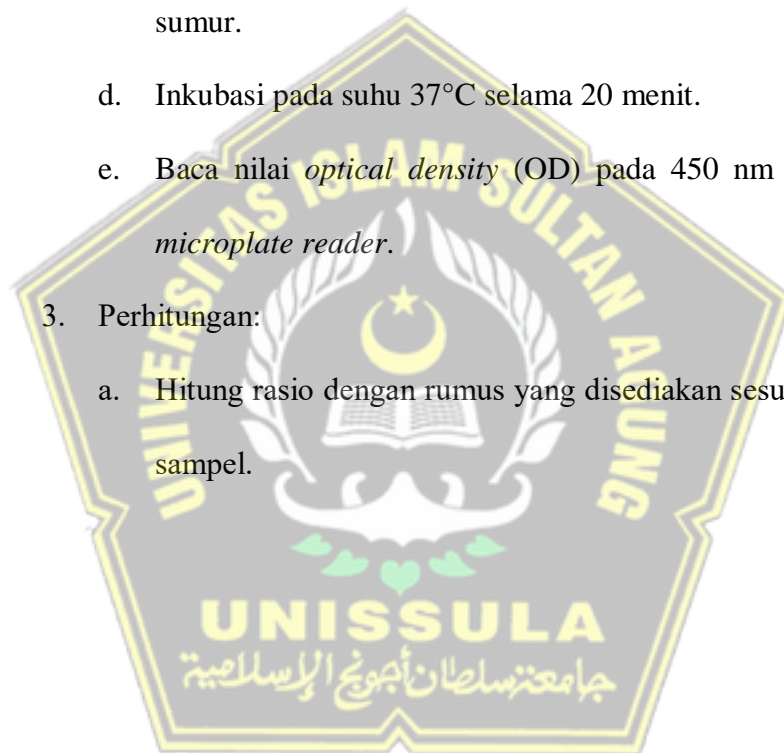
1. Persiapan Reagen:
  - a. Larutkan *enzyme stock solution* dengan *enzyme diluent* di atas es.
  - b. Siapkan *substrate application solution* dan *enzyme working solution* sesaat sebelum digunakan.

2. Langkah Pengujian:

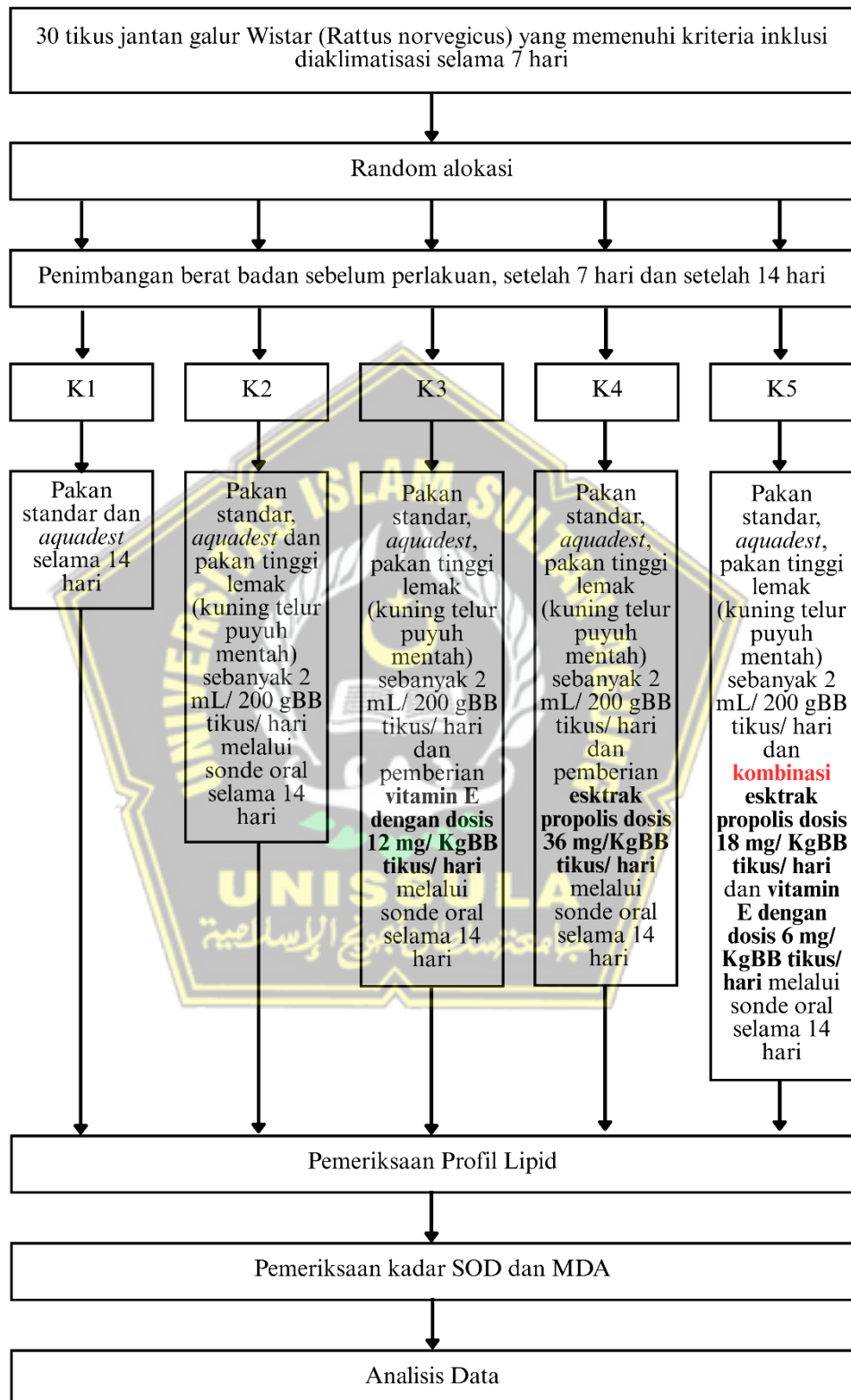
- a. Tambahkan 20  $\mu\text{L}$  *aquadest* dan 20  $\mu\text{L}$  *enzyme working solution* ke sumur kontrol.
- b. Tambahkan 20  $\mu\text{L}$  sampel dan 20  $\mu\text{L}$  *enzyme working solution* ke sumur sampel.
- c. Tambahkan 200  $\mu\text{L}$  *substrate application solution* ke semua sumur.
- d. Inkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit.
- e. Baca nilai *optical density* (OD) pada 450 nm menggunakan *microplate reader*.

3. Perhitungan:

- a. Hitung rasio dengan rumus yang disediakan sesuai dengan tipe sampel.



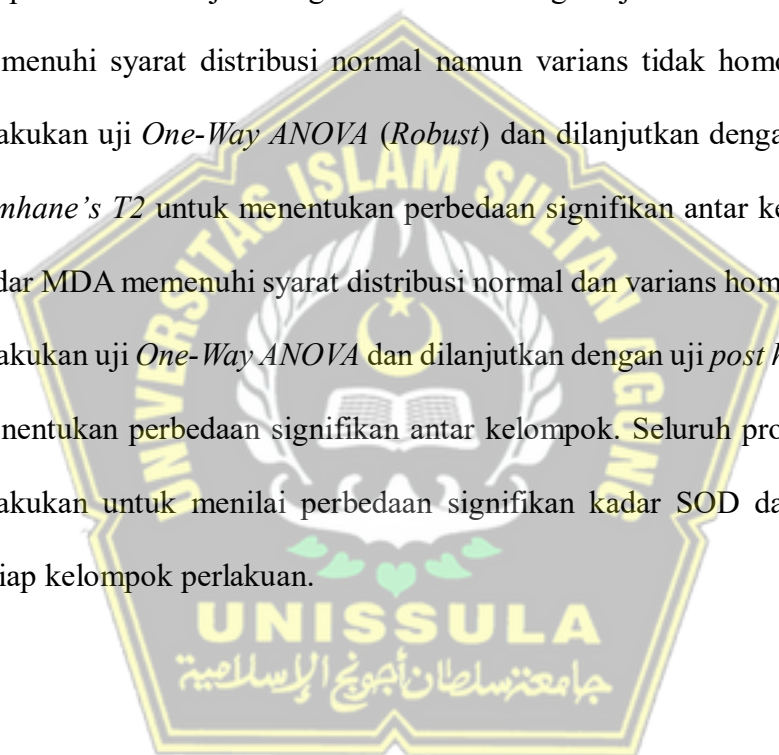
#### 4.6 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

#### 4.7 Analisis Hasil

Data yang diperoleh dari pengujian kadar SOD dan MDA selanjutnya dianalisis menggunakan program SPSS. Tahap awal meliputi uji statistik deskriptif untuk mendapatkan gambaran umum data. Penelitian ini melakukan uji asumsi klasik, yang terdiri dari uji normalitas data menggunakan uji Shapiro-Wilk dan uji homogenitas varians dengan uji Levene. Data kadar SOD memenuhi syarat distribusi normal namun varians tidak homogen sehingga dilakukan uji *One-Way ANOVA (Robust)* dan dilanjutkan dengan uji *post hoc Tamhane's T2* untuk menentukan perbedaan signifikan antar kelompok. Data kadar MDA memenuhi syarat distribusi normal dan varians homogen sehingga dilakukan uji *One-Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *post hoc LSD* untuk menentukan perbedaan signifikan antar kelompok. Seluruh prosedur statistik dilakukan untuk menilai perbedaan signifikan kadar SOD dan MDA pada setiap kelompok perlakuan.



## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Hasil Penelitian

##### 5.1.1 Gambaran Umum Hewan Coba

Hewan coba berupa 30 ekor tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) berumur 10–12 minggu dengan berat badan awal berkisar antara 180–200 g yang diperoleh dari Kemuning 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 kondisi ruangan terjaga pada suhu  $25 \pm 2$  °C dan siklus terang–gelap selama 12 jam. Tikus ditempatkan dalam kandang plastik berjeruji logam dengan ventilasi yang baik. Sebelum diberikan perlakuan, seluruh hewan coba menjalani masa aklimatisasi selama 7 hari untuk beradaptasi dengan lingkungan laboratorium. Selama masa penelitian, tikus diberikan pakan standar dan air minum secara *ad libitum*.

Hewan coba dibagi ke dalam 5 kelompok perlakuan, yang terdiri dari kelompok sehat yang diberikan pakan standar dan *aquadest* secara *ad libitum* (K1), kelompok kontrol negatif yang diberi pakan standar, *aquadest* dan diinduksi dengan diet tinggi lemak berupa kuning telur puyuh mentah sebanyak 2 mL/ 20 gBB tikus/ hari melalui sonde oral

(K2), kelompok yang diberi pakan standar, *aquadest*, diinduksi dengan diet tinggi lemak berupa kuning telur puyuh mentah sebanyak 2 mL/ 20 gBB tikus/ hari, dan vitamin E dengan dosis 12 mg/ kgBB/ hari melalui sonde oral (K3), kelompok yang diberi pakan standar, *aquadest*, diinduksi dengan diet tinggi lemak berupa kuning telur puyuh mentah sebanyak 2 mL/ 20 gBB tikus/ hari, dan ekstrak propolis dengan dosis 36 mg/ kgBB/ hari melalui sonde oral (K4), serta kelompok yang diberi pakan standar, *aquadest*, diinduksi dengan diet tinggi lemak berupa kuning telur puyuh mentah sebanyak 2 mL/ 20 gBB tikus/ hari, dan ekstrak propolis dengan dosis 18 mg/ kgBB/ hari serta vitamin E dengan dosis 6 mg/ kgBB/ hari melalui sonde oral (K5) yang diberikan selama 14 hari. Seluruh hewan coba dapat menyelesaikan penelitian hingga akhir (tidak ada yang mati) sehingga jumlah hewan coba pada masing-masing kelompok tetap sama hingga akhir perlakuan.

### 5.1.2 Hasil Pemeriksaan Kadar *Superoxide dismutase* (SOD)

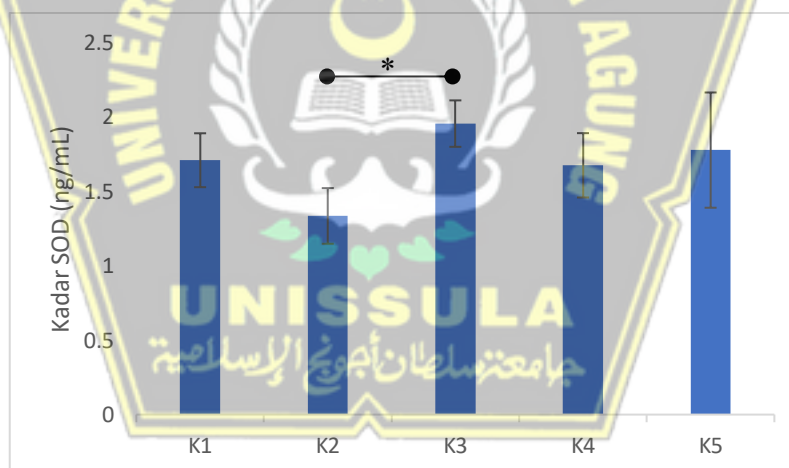
Hasil pemeriksaan kadar SOD yang dianalisis secara deskriptif dapat dilihat pada Tabel 5.1. Kelompok K2 menunjukkan rerata kadar SOD yang paling rendah yaitu  $1,334 \pm 0,187$  ng/mL. Kelompok K3 menunjukkan rerata kadar SOD yang paling tinggi yaitu  $1,954 \pm 0,156$  ng/mL. Berdasarkan data pada Tabel 5.1, diperoleh nilai  $p < 0,05$  pada hasil uji *One-Way ANOVA Robust*, yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar SOD yang signifikan secara statistik pada berbagai kelompok penelitian.

**Tabel 5.1** Rerata dan Simpangan Baku (Mean  $\pm$  SD), Uji Normalitas (*Shapiro-Wilk*), Uji Homogenitas Varians (*Levene*), dan Uji Perbedaan Kadar SOD (ng/mL) pada Berbagai Kelompok Perlakuan

Statistik	K1 n=5	K2 n=5	K3 n=5	K4 n=5	K5 n=5
Mean	1,708	1,334	1,954	1,674	1,776
Std. Deviation	0,181	0,187	0,156	0,216	0,387
Saphiro-Wilk	0,155	0,110	0,634	0,227	0,051
Levene			0,016		
One-Way ANOVA Robust			0,007*		

Uji *One-Way ANOVA Robust*\* signifikan jika  $p < 0,05$

Analisis dilanjutkan dengan uji *post hoc Tamhane's T2*, yang dapat dilihat pada Gambar 5.1, untuk mengetahui kelompok yang menunjukkan perbedaan signifikan.



**Gambar 5.1** Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) *Tamhane's T2* yang Dilakukan untuk Mengetahui Perbedaan Kadar SOD Antar Kelompok (Uji *Post Hoc*\* signifikan jika  $p < 0,05$ )

### 5.1.3 Hasil Pemeriksaan Kadar *Malondialdehyde* (MDA)

Hasil pemeriksaan kadar MDA yang dianalisis secara deskriptif dapat dilihat pada Tabel 5.2. Kelompok K2 menunjukkan rerata kadar

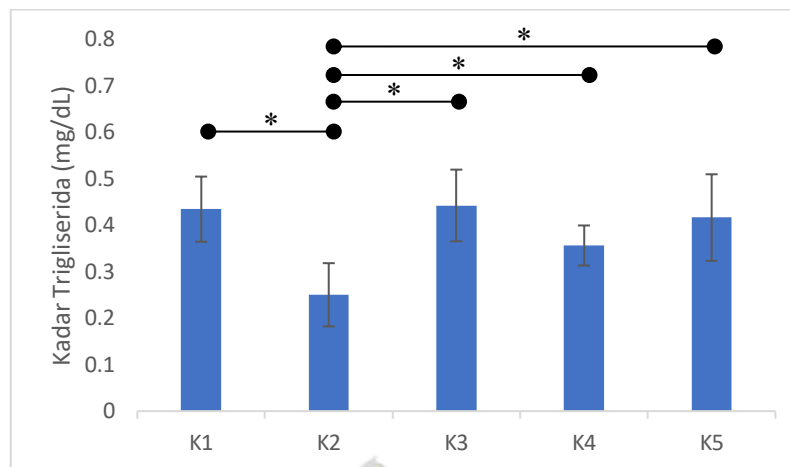
MDA yang paling rendah yaitu  $0,250 \pm 0,068$ . Kelompok K3 menunjukkan rerata kadar MDA yang paling tinggi yaitu  $0,442 \pm 0,077$ .

**Tabel 5.2** Rerata dan Simpangan Baku (Mean  $\pm$  SD), Uji Normalitas (*Shapiro-Wilk*), Uji Homogenitas Varians (*Levene*), dan Uji Perbedaan Kadar MDA (mmol/mL) pada Berbagai Kelompok Perlakuan

Statistik	K1 n=5	K2 n=5	K3 n=5	K4 n=5	K5 n=5
<i>Mean</i>	0,434	0,250	0,442	0,356	0,416
<i>Std. Deviation</i>	0,070	0,068	0,077	0,043	0,093
<i>Saphiro-Wilk</i>	0,703	0,281	0,222	0,665	0,982
<i>Levene</i>	0,577				
<i>One-Way ANOVA</i>	0,002*				

Uji *One-Way ANOVA*\* signifikan jika  $p < 0,05$

Berdasarkan hasil analisis statistik deskriptif, Kelompok K2 menunjukkan rerata kadar MDA yang paling rendah yaitu  $0,250 \pm 0,068$  mmol/mL. Kelompok K3 menunjukkan rerata kadar MDA yang paling tinggi yaitu  $0,442 \pm 0,077$  mmol/mL. Berdasarkan hasil uji *One Way ANOVA*, diperoleh nilai  $p < 0,05$ , yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar MDA yang signifikan secara statistik antar kelompok penelitian. Analisis dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD, yang dapat dilihat pada Gambar 5.2, untuk mengetahui kelompok yang menunjukkan perbedaan signifikan. Berdasarkan hasil uji lanjut menggunakan metode *Post Hoc* LSD, diperoleh bahwa terdapat perbedaan kadar MDA yang signifikan secara statistik pada beberapa kelompok penelitian ( $p < 0,05$ ).



**Gambar 5.2** Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) *LSD* yang Dilakukan untuk Mengetahui Perbedaan Kadar MDA Antar Kelompok (Uji *Post Hoc*\* signifikan jika  $p < 0,05$ )

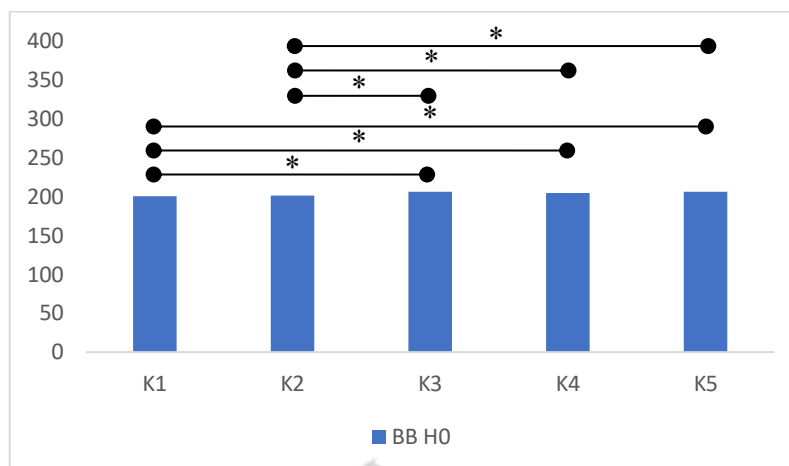
#### 5.1.4 Hasil Pemeriksaan Berat Badan

Berat badan diukur pada 3 waktu pengamatan, yaitu sebelum perlakuan (H0), hari ke-7 (H7), dan hari ke-14 (H14). Rerata berat badan awal tikus pada seluruh kelompok berada pada kisaran  $200,78 \pm 0,07$  g hingga  $206,26 \pm 4,52$  g.

**Tabel 5.3** Rerata dan Simpangan Baku (Mean  $\pm$  SD), Uji Normalitas (*Shapiro-Wilk*), Uji Homogenitas Varians (*Levene*), dan Uji Perbedaan Berat Badan (BB) Tikus (g) Sebelum Perlakuan

BB	Statistik	K1	K2	K3	K4	K5
	<i>Mean</i>	201,43	200,78	205,73	204,78	206,26
	<i>Std. Deviation</i>	2,11	0,07	4,27	4,57	4,52
H0	<i>Saphiro-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*\* signifikan jika  $p < 0,05$



**Gambar 5.3** Diagram Batang Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) *Mann Whitney U* yang Dilakukan untuk Mengetahui Rata-rata Berat Badan Tikus pada Saat Sebelum Perlakuan pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan (Uji *Post Hoc*\* signifikan jika  $p < 0,05$ )

Pola perubahan berat badan pada berbagai kelompok sebelum diberikan perlakuan dan hasil uji *post hoc* *Mann Whitney U* dapat dilihat pada Gambar 5.3.

**Tabel 5.4** 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 Selama Perlakuan Antar Kelompok

Kelompok	Statistik	BB H0	BB H7	BB H14
K1	<i>Mean <math>\pm</math> SD</i>	200,60 $\pm$ 0,32	213,68 $\pm$ 10,04	213,91 $\pm$ 10,14
	<i>Saphiro-Wilk</i>	0,001	0,536	0,562
	<i>Levene</i>		0,056	
	<i>Kruskal-Wallis</i>		0,011*	
K2	<i>Mean <math>\pm</math> SD</i>	200,78 $\pm$ 0,07	216,98 $\pm$ 14,80	228,30 $\pm$ 11,80
	<i>Saphiro-Wilk</i>	0,212	0,202	0,124
	<i>Levene</i>		0,002	
	<i>One-Way ANOVA Robust</i>		0,004*	
K3	<i>Mean <math>\pm</math> SD</i>	205,73 $\pm$ 4,27	203,21 $\pm$ 5,31	203,46 $\pm$ 5,13
	<i>Saphiro-Wilk</i>	0,255	0,010	0,002
	<i>Levene</i>		0,469	
	<i>Kruskal-Wallis</i>		0,208	

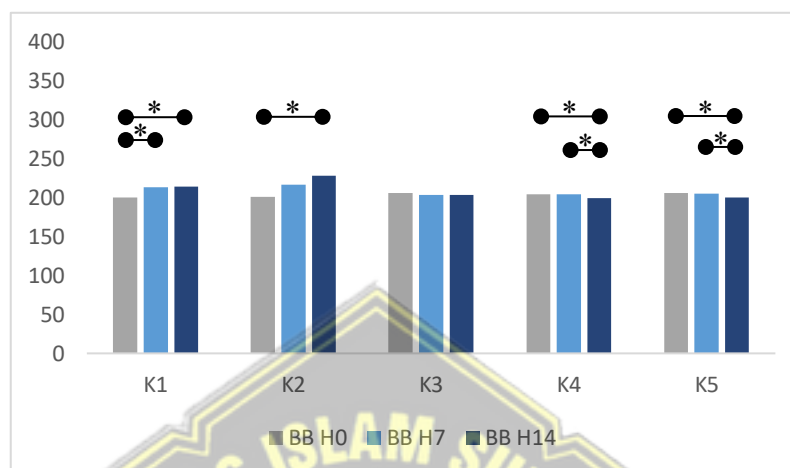
K4	<i>Mean ± SD</i>	204,78 ± 4,57	204,48 ± 4,66	199,48 ± 0,99
	<i>Saphiro-Wilk</i>	0,042	0,067	0,027
	<i>Levene</i>		0,002	
	<i>Kruskal-Wallis</i>		0,003*	
K5	<i>Mean ± SD</i>	206,26 ± 4,52	205,45 ± 5,05	200,08 ± 0,16
	<i>Saphiro-Wilk</i>	0,040	0,005	0,070
	<i>Levene</i>		0,000	
	<i>Kruskal-Wallis</i>		0,003*	

H0 = sebelum perlakuan, H7 = hari ke-7 perlakuan, H14 = hari ke-14 perlakuan

Uji *One-Way Anova Robust/ Kruskal-Wallis*\* signifikan jika  $p < 0,05$

Pada hari ke-7, kelompok K2 menunjukkan peningkatan berat badan paling tinggi mencapai  $216,98 \pm 14,80$  g dan kelompok K3 menunjukkan rerata berat badan paling rendah yaitu  $203,21 \pm 5,31$  g. Pada hari ke-14, kelompok K2 menunjukkan peningkatan berat badan paling tinggi, mencapai  $228,30 \pm 11,80$  g dan kelompok K5 menunjukkan rerata berat badan  $200,08 \pm 0,16$  g, serta menunjukkan penurunan laju peningkatan berat badan yang paling rendah dibanding kelompok lain yang mendapat diet tinggi lemak. Hasil analisis statistik (Tabel 5.4) menunjukkan bahwa kelompok K1, K4, dan K5 yang dilakukan uji perbedaan *Kruskal-Wallis* menunjukkan adanya perbedaan berat badan yang signifikan selama penelitian ( $p < 0,05$ ). Kelompok K3 juga dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, namun hasil menunjukkan tidak ada perbedaan berat badan yang signifikan secara statistik ( $p = 0,208$ ). Kelompok K2 memiliki data yang terdistribusi normal namun tidak homogen sehingga dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA Robust* dan ditemukan perbedaan berat badan yang signifikan selama penelitian ( $p = 0,004$ ). Pola perubahan berat badan pada berbagai kelompok sesuai dengan jenis

perlakuan yang diberikan dan hasil uji *post hoc* Mann Whitney U dapat dilihat pada Gambar 5.4.



**Gambar 5.4** Diagram Batang Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) Mann Whitney U yang Dilakukan untuk Mengetahui Rata-rata Berat Badan Tikus pada Saat Sebelum Perlakuan, Hari ke-7, dan Hari ke-14 pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan (Uji *Post Hoc*\* signifikan jika  $p < 0,05$ )

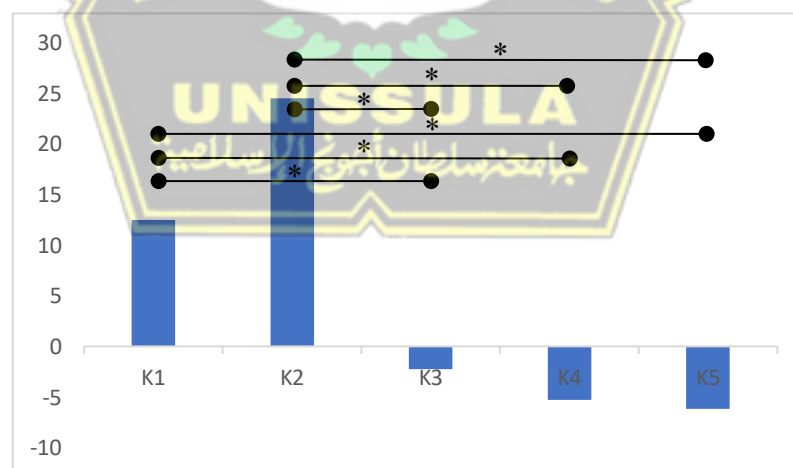
Perubahan berat badan tikus pada masing-masing kelompok menunjukkan variasi yang berbeda. Hasil analisis statistik perubahan berat badan tikus dapat dilihat pada Tabel 5.5. Kelompok K2 menunjukkan peningkatan berat badan yang lebih besar dengan rerata sebesar  $24,51 \pm 12,43$  g. Kelompok K5 menunjukkan penurunan berat badan paling besar dengan rerata  $-6,18 \pm 4,37$  g. Hasil uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) menunjukkan bahwa data perubahan berat badan pada kelompok K1, K2, dan K4 berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ), sedangkan pada kelompok K3 dan K5 data tidak berdistribusi normal ( $p < 0,05$ ).

**Tabel 5.5** Rerata dan Simpangan Baku (Mean  $\pm$  SD), Uji Normalitas (*Shapiro-Wilk*), Uji Homogenitas Varians (*Levene*), dan Uji Perbedaan Perubahan Berat Badan (g) Sebelum dan Setelah Perlakuan pada Berbagai Kelompok Perlakuan

Statistik	K1	K2	K3	K4	K5
Mean	12,48	24,51	-2,26	-5,30	-6,18
Std. Deviation	10,73	12,43	2,60	4,30	4,37
Saphiro-Wilk	0,770	0,123	0,021	0,213	0,046
Levene			0,004		
Kruskal-Wallis			0,000*		

Uji *Kruskal-Wallis*\* signifikan jika  $p < 0,05$

Analisis perbedaan antar kelompok dilanjutkan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* yang menunjukkan terdapat perbedaan perubahan berat badan yang signifikan secara statistik antar kelompok penelitian ( $p = 0,000$ ). Untuk membedakan perubahan berat badan pada berbagai kelompok penelitian, digunakan uji *post hoc Mann Whitney U* yang dapat dilihat pada Gambar 5.5.



**Gambar 5.5** Diagram Batang Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) *Mann Whitney U* yang Dilakukan untuk Mengetahui Perubahan Berat Badan Tikus pada Saat Sebelum dan Setelah Perlakuan pada Berbagai Kelompok Perlakuan (Uji *Post Hoc*\* signifikan jika  $p < 0,05$ )

### 5.1.5 Hasil Pemeriksaan Profil Lipid

Berdasarkan hasil analisis uji statistik, profil lipid (kadar kolesterol total, HDL, LDL, dan trigliserida) menunjukkan variasi nilai rerata antar kelompok perlakuan dan dapat dilihat pada Tabel 5.6. Rerata kadar kolesterol total tertinggi ditemukan pada kelompok K2 sebesar  $91,50 \pm 23,18$  mg/dL. Rerata kadar kolesterol total paling rendah pada kelompok K5 sebesar  $64,00 \pm 18,24$  mg/dL. Hasil uji *Kruskal–Wallis* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar kolesterol total yang signifikan secara statistik antar kelompok perlakuan ( $p = 0,023$ ).

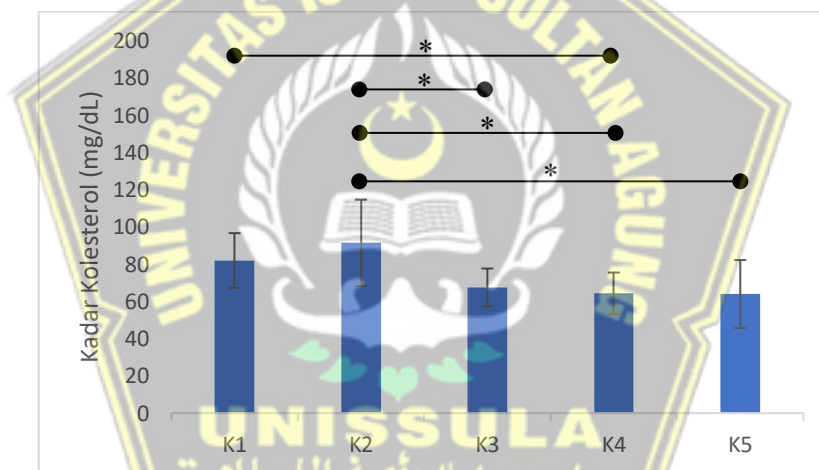
**Tabel 5.6 Rerata dan Simpangan Baku (Mean  $\pm$  SD), Uji Normalitas (*Shapiro-Wilk*), Uji Homogenitas Varians (*Levene*), dan Uji Perbedaan Profil Lipid (mg/dL) pada Berbagai Kelompok Perlakuan**

Profil Lipid	Statistik	K1	K2	K3	K4	K5
<b>Kolesterol</b>	<i>Mean</i>	82,00	91,50	67,50	64,33	64,00
	<i>Std. Deviation</i>	14,71	23,18	10,19	11,20	18,24
	<i>Saphiro-Wilk</i>	0,545	0,174	0,001	0,081	0,614
	<i>Levene</i>			0,333*		
	<i>Kruskal-Wallis</i>			0,023*		
<b>HDL</b>	<i>Mean</i>	51,33	42,67	39,83	40,50	40,00
	<i>Std. Deviation</i>	12,43	9,13	6,46	6,15	13,03
	<i>Saphiro-Wilk</i>	0,907	0,863	0,006	0,198	0,619
	<i>Levene</i>			0,169		
	<i>Kruskal-Wallis</i>			0,431		
<b>LDL</b>	<i>Mean</i>	13,00	21,00	10,67	9,83	8,83
	<i>Std. Deviation</i>	3,34	6,78	2,33	3,48	3,31
	<i>Saphiro-Wilk</i>	0,252	0,108	0,421	0,817	0,093
	<i>Levene</i>			0,084*		
	<i>One-Way ANOVA</i>			0,000*		

<b>Trigliserida</b>	<i>Mean</i>	85,83	196,50	106,83	66,83	79,00
	<i>Std. Deviation</i>	16,70	75,87	28,63	13,67	35,15
	<i>Saphiro-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*		

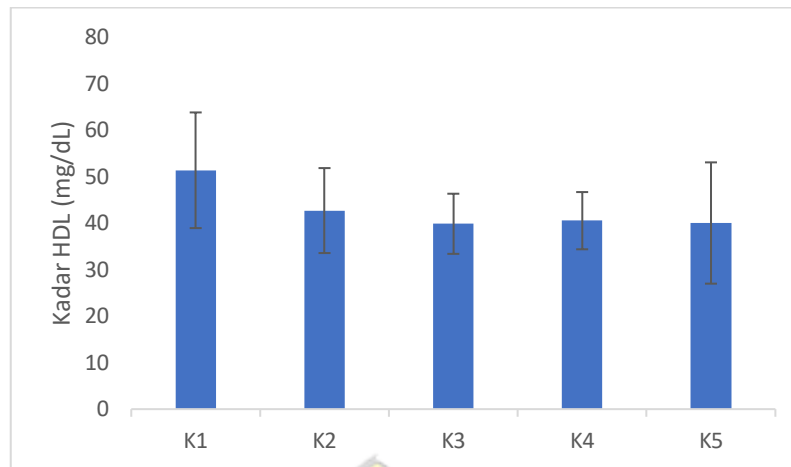
Uji *One-Way Anova/ Robust/ Kruskal-Wallis*\* signifikan jika  $p < 0,05$

Untuk membedakan kadar kolesterol total (Gambar 5.6) antara 2 kelompok perlakuan, digunakan uji *post hoc Mann Whitney U* yang menunjukkan adanya perbedaan kadar kolesterol yang signifikan pada beberapa kelompok perlakuan.



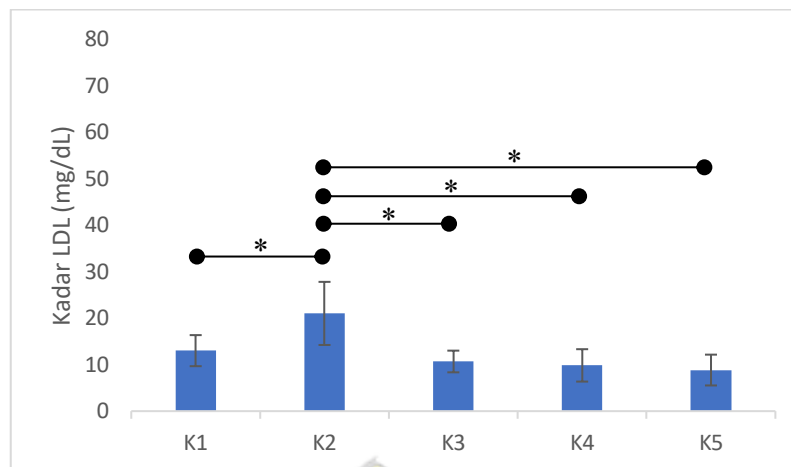
**Gambar 5.6** Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) *Mann Whitney U* yang Dilakukan untuk Mengetahui Perbedaan Kadar Kolesterol Total Antar Kelompok (Uji *Post Hoc*\* signifikan jika  $p < 0,05$ )

Rerata kadar HDL (Tabel 5.6) tertinggi terdapat pada kelompok K1 sebesar  $51,33 \pm 12,43$  mg/dL, dan terendah pada kelompok K3 sebesar  $39,83 \pm 6,46$  mg/dL. Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan kadar HDL yang signifikan secara statistik antar kelompok perlakuan ( $p = 0,431$ ).



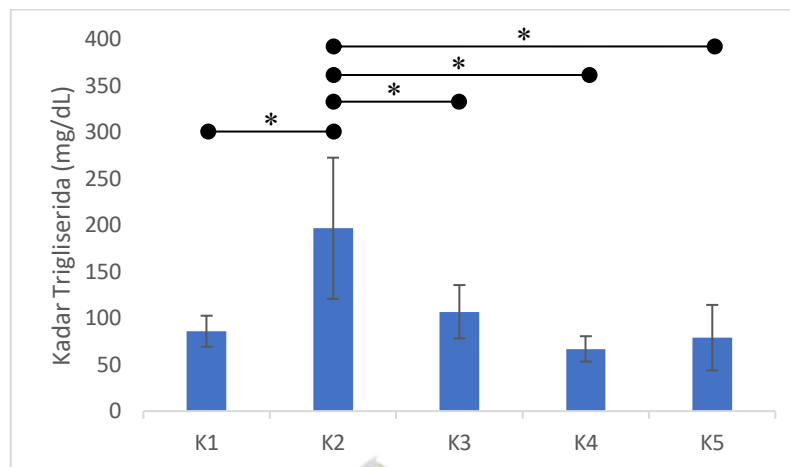
**Gambar 5.7** Diagram Batang Kadar HDL Antar Kelompok

Rerata kadar LDL (Tabel 5.6) tertinggi ditemukan pada kelompok K2 sebesar  $21,00 \pm 6,78$  mg/dL, dan rerata paling rendah pada kelompok K5 sebesar  $8,83 \pm 3,31$  mg/dL. Analisis perbedaan antar kelompok dilakukan menggunakan uji *One-Way ANOVA* yang menunjukkan terdapat perbedaan kadar LDL yang signifikan secara statistik antar kelompok perlakuan ( $p = 0,000$ ). Hasil uji *post hoc LSD* untuk kadar LDL (Gambar 5.8) menunjukkan adanya perbedaan kadar LDL yang signifikan pada beberapa kelompok perlakuan.



**Gambar 5.8** Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) *LSD* yang Dilakukan untuk Mengetahui Perbedaan Kadar LDL Antar Kelompok (Uji *Post Hoc*\* signifikan jika  $p < 0,05$ )

Rerata kadar trigliserida (Tabel 5.6) tertinggi ditemukan pada kelompok K2 sebesar  $196,50 \pm 75,87$  mg/dL, dan rerata paling rendah pada kelompok K4 sebesar  $66,83 \pm 13,67$  mg/dL. Analisis perbedaan dilakukan menggunakan uji *One-Way ANOVA Robust* yang menunjukkan terdapat perbedaan kadar trigliserida yang signifikan secara statistik antar kelompok perlakuan ( $p = 0,010$ ). Hasil uji lanjut (*Post Hoc*) untuk kadar trigliserida (Gambar 5.9) menunjukkan adanya perbedaan kadar trigliserida yang signifikan pada beberapa kelompok perlakuan.



**Gambar 5.9** Hasil Analisis Uji Lanjut (*Post Hoc*) *Tamhane's T2* yang Dilakukan untuk Mengetahui Perbedaan Kadar Trigliserida Antar Kelompok (Uji *Post Hoc*\* signifikan jika  $p < 0,05$ )

## 5.2 Pembahasan

### 5.2.1 Dinamika *Superoxide Dismutase* dan *Malondialdehyde*

Penanda stres oksidatif dalam penelitian ini menunjukkan pola yang tidak sederhana antar kelompok perlakuan. Kadar SOD paling rendah ditemukan pada kelompok K2, yang menjelaskan bahwa produksi ROS yang berlebihan mengakibatkan penggunaan intensif enzim antioksidan endogen untuk menetralsir radikal bebas. Kondisi ini mencerminkan adanya penipisan cadangan pertahanan primer seluler akibat stres oksidatif kronik.<sup>1,3,34,55</sup> Pada model tikus, kondisi ini juga dipengaruhi oleh karakteristik jaringan lemak, khususnya *white adipose tissue*, yang dapat berperan sebagai sumber utama ROS sekaligus lokasi aktivasi respons adaptif antioksidan.<sup>123,124</sup> Perbedaan kapasitas ekspansi dan distribusi jaringan lemak antar tikus dapat bertindak sebagai faktor perancu yang menyebabkan respons SOD sistemik tidak selalu

sebanding dengan beban oksidatif aktual.<sup>125</sup> Hasil temuan pada penelitian ini didukung oleh sebuah penelitian yang mencatat adanya penurunan SOD secara sistemik pada kondisi stress oksidatif kronis.<sup>39,78,87</sup> Stres oksidatif yang berlangsung lama juga dapat memicu perubahan epigenetik pada gen antioksidan, termasuk gen SOD, sehingga terjadi supresi ekspresi SOD meskipun ROS tetap tinggi, terutama pada jaringan yang mengalami inflamasi metabolik.<sup>4,18,28</sup>

Pemeriksaan kadar MDA menunjukkan hasil yang tampak bertentangan dengan teori, karena kadar MDA paling rendah justru ditemukan pada kelompok kontrol negatif (K2) dengan pemberian diet tinggi lemak. Fenomena ini terjadi karena fase adaptasi seluler melalui aktivasi jalur Nrf2 yang meningkatkan kapasitas pertahanan endogen untuk menetralkan ROS sebelum menyerang lipid membran.<sup>4,20,27,29,50</sup> Aktivasi jalur eliminasi sekunder seperti enzim ALDH berperan dalam mendetoksifikasi MDA secara aktif, sehingga kadar MDA dalam sirkulasi tampak rendah.<sup>51,54</sup> Regulasi epigenetik terhadap enzim ALDH2 dapat meningkatkan kapasitas eliminasi MDA, mengonfirmasi fenomena rendahnya kadar MDA yang terdeteksi.<sup>51,54</sup> Mekanisme lain yang berkontribusi berupa pembentukan ikatan kovalen antara MDA dan protein plasma yang menghasilkan adducts, sehingga epitop MDA tidak terdeteksi secara optimal saat pemeriksaan laboratorium.<sup>43,51</sup>

Peningkatan kadar SOD pada kelompok K3 menunjukkan adanya upaya optimalisasi sistem pertahanan primer seluler yang diperkuat

dengan pemberian vitamin E.<sup>96,97</sup> Vitamin E bekerja efektif sebagai *scavenger* yang menetralkan ROS dan menyingkirkan akumulasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebagai inhibitor alami SOD, sehingga memulihkan bioaktivitas enzim SOD untuk bekerja maksimal.<sup>12,101</sup> Peningkatan aktivitas SOD yang tidak diimbangi oleh aktivitas CAT dan GPx dapat menyebabkan akumulasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, yang dalam kondisi tertentu justru berpotensi menghasilkan radikal hidroksil melalui reaksi Fenton, sehingga SOD dapat berperan sebagai pemicu stres oksidatif sekunder.<sup>29</sup>

Peningkatan kapasitas antioksidan enzim SOD berbanding terbalik dengan profil peroksidasi lipid, di mana kelompok K3 justru menghasilkan kadar MDA yang paling tinggi akibat fenomena TMP.<sup>99</sup> Meskipun dikenal sebagai antioksidan kuat yang melindungi membran sel dan menekan pembentukan ox-LDL, vitamin E memiliki sisi paradoks saat berinteraksi dengan LDL. Sebuah penelitian menyebutkan bahwa vitamin E dosis 100, 300, dan 600 mg/kgBB yang diberikan tanpa ko-antioksidan yang memadai dapat berubah menjadi pro-oksidan.<sup>99,101</sup> Kondisi ini terjadi ketika konsentrasi vitamin E di dalam struktur lipid meningkat melampaui ambang batas atau kapasitas pengikatan protein pengangkutnya, sehingga teroksidasi menjadi radikal tokoferil yang justru melanjutkan rantai peroksidasi lipid.<sup>95,101</sup>

### **5.2.2 Perubahan Berat Badan antar Kelompok**

Hasil penelitian menunjukkan adanya perubahan berat badan antara kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan. Paparan diet tinggi

lemak berupa kuning telur puyuh mentah terbukti meningkatkan massa tubuh hewan coba secara signifikan, dengan rerata tertinggi pada kelompok K2 sebagai kontrol negatif ( $24,51 \pm 12,43$  g). Diet tinggi lemak meningkatkan asupan lemak jenuh dan kolesterol yang secara fisiologis mengaktifkan proses lipogenesis hepatic melalui jalur SREBP-1C dan FAS, sehingga mengakibatkan akumulasi trigliserida dan ekspansi jaringan adiposa melalui mekanisme adipogenesis.<sup>61,65,85,86</sup> Peningkatan berat badan pada kelompok yang diberi diet tinggi lemak (K2) selaras dengan penelitian yang menyatakan bahwa pemberian diet tinggi lemak dalam waktu beberapa hari - 1 minggu sudah cukup untuk memicu ketidakseimbangan metabolisme energi dan signifikan meningkatkan massa tubuh.<sup>17,63</sup>

Pemberian perlakuan berupa vitamin E (K3), ekstrak propolis (K4), ataupun kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E (K5) menunjukkan tren penurunan berat badan dibandingkan dengan berat awal, dan penurunan berat badan paling besar ditemukan pada kelompok K5 ( $-6,18 \pm 4,37$  g). Hal ini mencerminkan adanya kontrol massa tubuh yang lebih baik pada kelompok yang diberikan kombinasi propolis dan vitamin E dibandingkan pemberian antioksidan tunggal, sehingga menunjukkan efek sinergis dari propolis dan vitamin E dalam memperbaiki metabolisme energi.<sup>10,23</sup> Penurunan berat badan pada kelompok K5 dipengaruhi oleh kandungan flavonoid dan asam fenolik dalam ekstrak propolis yang dapat menghambat adipogenesis melalui supresi ekspresi

protein PPAR $\gamma$  dan C/EBP $\alpha$ .<sup>81,83</sup> Senyawa aktif propolis mengaktivasi AMPK, sehingga menekan ekspresi gen lipogenik dan meningkatkan pemanfaatan asam lemak melalui  $\beta$ -oksidasi mitokondria.<sup>69,86</sup> Vitamin E berperan dengan menurunkan stress oksidatif, memperbaiki sensitivitas insulin, menstabilkan metabolisme lipid dan regulasi energi.<sup>14,95,98</sup> Hal ini didukung oleh penelitian yang menyatakan bahwa pemberian propolis dan vitamin E dapat memperbaiki status metabolik.<sup>23,25</sup> Interpretasi hasil tetap perlu mempertimbangkan faktor lain, seperti variasi aktivitas fisik antarhewan dan potensi stres fisiologis akibat prosedur sonde oral harian yang dapat memengaruhi nafsu makan dan keseimbangan energi.<sup>126,127</sup> Kondisi ini menjadi penting untuk diperhatikan karena kelompok kontrol sehat tidak mendapatkan perlakuan sonde, sehingga peran stres akibat prosedur *handling* terhadap perubahan berat badan masih mungkin terjadi.<sup>126</sup>

### 5.2.3 Analisis Profil Lipid Lengkap

Diet tinggi lemak pada kelompok K2 menyebabkan peningkatan signifikan kadar kolesterol total, LDL, dan trigliserida.<sup>1,64,81</sup> Asupan kolesterol dan lemak jenuh yang tinggi memicu peningkatan pembentukan kilomikron di usus sebagai sarana transportasi lipid menuju sirkulasi serta merangsang peningkatan produksi VLDL di hati.<sup>1,2,34,70</sup> kondisi ini terjadi melalui peningkatan aktivitas enzim HMGCR dan ekspresi apolipoprotein B-100, yang berperan penting dalam sintesis dan sekresi lipoprotein aterogenik.<sup>17,106</sup>

Kelompok K5 yang diberikan kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E secara signifikan menurunkan kadar kolesterol dan LDL. Kandungan flavonoid dalam propolis berperan dalam menghambat aktivitas HMGR serta meningkatkan ekspresi dan aktivitas reseptor LDL di hati, sehingga mempercepat pembersihan LDL dari sirkulasi.<sup>38,85</sup> Vitamin E bekerja sebagai antioksidan dengan melindungi PUFA di dalam fosfolipid membran dan lipoprotein plasma dari kerusakan oksidatif, sehingga efektif mencegah peroksidasi lipid dan menekan pembentukan Ox-LDL.<sup>16,94,95</sup> Pencegahan oksidasi LDL mempertahankan kemampuan LDL untuk dikenali oleh reseptor fisiologis dan mencegah ditangkap oleh *scavenger receptor* pada makrofag, sehingga menghambat pembentukan sel busa dan proses aterosklerosis.<sup>38,100</sup> Hal ini didukung oleh sebuah penelitian yang menyatakan bahwa kombinasi propolis dan vitamin E menunjukkan penurunan kadar LDL yang lebih besar dibandingkan jika diberikan secara tunggal.<sup>23</sup>

Kelompok K4 yang diberikan ekstrak propolis secara signifikan menurunkan kadar trigliserida. Senyawa bioaktif dalam propolis mampu menghambat aktivitas enzim lipase pankreas, sehingga menurunkan hidrolisis trigliserida dan mengurangi penyerapan asam lemak di usus. Mekanisme ini berkontribusi langsung terhadap penurunan kadar trigliserida sirkulasi tanpa harus melalui jalur oksidatif yang kompleks,

sehingga efek penurunan trigliserida pada kelompok K4 menjadi lebih menonjol dibandingkan kelompok perlakuan lainnya.<sup>66,67</sup>

#### 5.2.4 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini didapatkan beberapa faktor yang membatasi generalisasi hasil penelitian secara luas. Jumlah konsumsi pakan dan aktivitas fisik hewan coba tidak diukur secara teliti setiap hari sehingga menyebabkan variasi proses metabolisme energi antar tikus menjadi sulit untuk dikendalikan sepenuhnya. Pengambilan sampel darah hanya dilakukan satu kali pada akhir masa perlakuan (hari ke-15). Prosedur tunggal ini mengakibatkan perubahan kadar stres seluler tidak dapat dipantau secara berkala selama masa pemberian perlakuan. Variabel penelitian ini dibatasi pada kadar SOD dan MDA melalui uji laboratorium tanpa mencakup pengukuran sistem antioksidan endogen lainnya sehingga hasil penelitian kadar MDA yang tidak linier tetap menjadi dugaan ilmiah.

Proses pemberian perlakuan melalui sonde oral setiap hari berisiko menimbulkan rasa sakit atau luka ringan pada tenggorokan hewan coba. Tindakan medis tersebut dapat memengaruhi hasil pengukuran kadar MDA di luar pengaruh pemberian diet tinggi lemak. Semua keterbatasan ini mempengaruhi kepastian bahwa seluruh pemberian perlakuan pada hewan coba masuk ke dalam sistem metabolisme tubuh secara sempurna.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

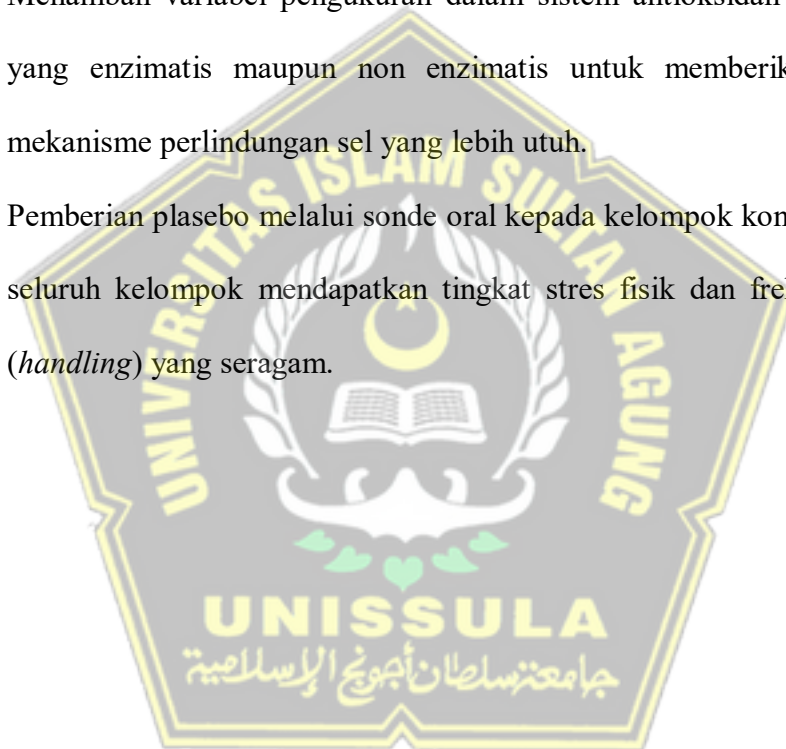
#### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan mengenai pengaruh kombinasi ekstrak propolis dan vitamin E terhadap kadar SOD dan MDA pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak dapat ditarik kesimpulan yang menjawab tujuan penelitian, yaitu:

1. Induksi diet tinggi lemak menggunakan kuning telur puyuh mentah dengan dosis 2 mL/ 200 gBB/ hari terbukti mempengaruhi status stres oksidatif, yang ditandai dengan perubahan kadar SOD dan MDA secara signifikan pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*).
2. Pemberian vitamin E dengan dosis 12 mg/kgBB/hari berpengaruh signifikan terhadap perubahan kadar SOD dan MDA pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.
3. Pemberian ekstrak propolis dengan dosis 36 mg/kgBB/hari berpengaruh signifikan terhadap perubahan kadar SOD dan MDA pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.
4. Pemberian kombinasi ekstrak propolis dengan dosis 18 mg/kgBB/hari dan vitamin E dengan dosis 6 mg/kgBB/hari berpengaruh signifikan terhadap perubahan kadar SOD dan MDA pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diet tinggi lemak.

## 6.2 Saran

1. Penelitian selanjutnya sebaiknya mengukur berat sisa pakan harian secara akurat dan menggunakan kandang aktivitas (*activity cage*) untuk memantau pergerakan fisik tikus guna meminimalkan variabel perancu.
2. Pengambilan sampel darah secara berkala agar perubahan kadar stres oksidatif dan dapat terpantau secara dinamis selama masa perlakuan.
3. Menambah variabel pengukuran dalam sistem antioksidan endogen baik yang enzimatis maupun non enzimatis untuk memberikan gambaran mekanisme perlindungan sel yang lebih utuh.
4. Pemberian plasebo melalui sonde oral kepada kelompok kontrol sehat agar seluruh kelompok mendapatkan tingkat stres fisik dan frekuensi kontak (*handling*) yang seragam.



## DAFTAR PUSTAKA

1. Adnan ML, Pramaningtyas MD, Islamiana D, Sudarto HA. Hyperlipidemia diet reduces superoxide dismutase inhibition rate in the brain organ of *Rattus norvegicus*. *Mutiara Medika*. 2022;22(1): 14–9. doi:10.18196/mmjkk.v21i2.8167
2. 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*. 2016; 9(1): 47-52.
3. Meiyanti, Yohana, Margo E, Chudri J, Pusparini, Faradilla MA. Factors associated with plasma malondialdehyde levels in people over 40 years. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2023; 13(7): 52–6. doi:10.22270/jddt.v13i7.6142
4. Trist BG, Hilton JB, Hare DJ, Crouch PJ, Double KL. Superoxide dismutase 1 in health and disease: How a frontline antioxidant becomes neurotoxic. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2021: 9215–46. doi:10.1002/anie.202000451
5. Che M, Wang R, Li X, Wang HY, Zheng XFS. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discovery Today*. 2016; 21(1): 143–9. doi:10.1016/j.drudis.2015.10.001
6. Almaeen AH, Ibrahim MAE. The protective effect of propolis compared to vitamins C and E antioxidant mixture in cyclophosphamide-induced lung toxicity in mice. *Medical Journal of Cairo University*. 2018; 86(8): 4585-93.
7. Sajjad S, Saeed L, Malik H, Farooq U, Akhtar S. Ethanolic extract of propolis and vitamin E attenuates metal-induced testicular necrosis: Time-related study on male reproductive system in albino mice. *The European Zoological Journal*. 2020; 87(1): 138–47. doi:10.1080/24750263.2020.1732486
8. Dhiaa S, Fadhil N, Thanoon IA, Fadhil NN. Vitamin E versus propolis as an add-on therapy to sitagliptin/metformin on uric acid level and renal function in type 2 diabetic patients. *Azerbaijan Medical Journal*. 2022; 62(4): 1337-46.
9. Ratnawati R, Zulaikhah ST, Husaana A, Pratama AA. Effect of tender coconut water powder enriched with vitamin E in preventing oxidative stress of diabetes male Wistar rats. *Pharmacognosy Journal*. 2024; 16(5): 1062–8. doi:10.5530/pj.2024.16.172
10. Santos NW, Yoshimura EH, Machado E, Matumoto-Pintro PT, Montanher PF, Visentainer J V., *et al*. Antioxidant effects of a propolis extract and

vitamin E in blood and milk of dairy cows fed diet containing flaxseed oil. *Livestock Science*. 2016: 1-23. doi:10.1016/j.livsci.2016.07.012

11. Wani E, Nasihun T, Husaana A. The influence of continuous multi stage countercurrent extraction process (CMCE) propolis extract administration on superoxide dismutase activity and hepatocytes fibrosis degree (an experimental study on male Wistar rats induced with carbon tetrachloride (CCL<sub>4</sub>)). *Sains Medika*. 2020; 11(1): 42-7.
12. Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F. The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. 2014; 14(2): 157-65.
13. Sevim Y, Uygunoz D, Alacam S, Yucel F, Turan GN, Ozdogan ON. What we know about propolis, and its potential role in obesity and diabetes. *Series of Endocrinology, Diabetes and Metabolism*. 2023; 5(1): 25-35.
14. Ungurianu A, Zanfirescu A, Nițulescu G, Margină D. Vitamin E beyond its antioxidant label. *Antioxidants*. 2021: 1-37. doi:10.3390/antiox10050634
15. Xu W, Lu H, Yuan Y, Deng Z, Zheng L, Li H. The antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids from propolis via Nrf2 and NF-κB pathways. *Foods*. 2022: 1-36. doi:10.3390/foods11162439
16. EFSA. Scientific opinion on dietary reference values for vitamin E as α-tocopherol. *EFSA Journal*. 2015; 13(7): 1-72. doi:10.2903/j.efsa.2015.4149
17. Wali JA, Jarzebska N, Raubenheimer D, Simpson SJ, Rodionov RN, O'sullivan JF. Cardio-metabolic effects of high-fat diets and their underlying mechanisms— A narrative review. *Nutrients*. 2020: 1-18. doi:10.3390/nu12051505
18. Zheng M, Liu Y, Zhang G, Yang Z, Xu W, Chen Q. The applications and mechanisms of superoxide dismutase in medicine, food, and cosmetics. *Antioxidants*. 2023: 1-20. doi:10.3390/antiox12091675
19. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International Journal of Health Sciences*. 2018; 12(3): 88-93.
20. Khan MA, Younus H. Superoxide dismutase glycation: A contributor to disease and target for prevention. *Catalysts*. 2025: 1-20. doi:10.3390/catal15030247
21. Situmorang N, Zulham Z. Malondialdehyde (MDA). *Jurnal keperawatan dan Fisioterapi*. 2020; 2(2): 117–23. doi:10.35451/jkf.v2i2.338
22. Keleştemur GT, Seven I. Effects of dietary propolis and vitamin E on growth performance and antioxidant status in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under different flow rate. *Aquac Res*. 2013;44(7):1120-1131. doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03122.x
23. Sajjad S, Malik H, Saeed L, Hashim I, Farooq U, Manzoor F. Synergistic potential of propolis and vitamin E against sub-acute toxicity of AlCl<sub>3</sub> in albino mice: In vivo study. *Physiological Research*. 2019; 68(1): 67–74. doi:10.33549/physiolres.933863

24. Pastorelli G, Benamri R, Faustini M, De Bellis R, Serra V, Turin L, *et al.* Partial Replacement of Synthetic Vitamin E by Polyphenols in Post-Weaning Piglets. *Antioxidants*. 2023;12(9). doi:10.3390/antiox12091752
25. Hashem NM, El-Hady AA, Hassan O. Effect of vitamin E or propolis supplementation on semen quality, oxidative status and hemato-biochemical changes of rabbit bucks during hot season. *Livestock Science*. 2013: 520–6. doi:10.1016/j.livsci.2013.09.003
26. Chen L, Liu Y, Zhang Y, Zhang Y, Wang W, Han H, *et al.* Superoxide dismutase ameliorates oxidative stress and regulates liver transcriptomics to provide therapeutic benefits in hepatic inflammation. *PeerJ*. 2023;11. doi:10.7717/peerj.15829
27. Sarkar A, Ghosh U. Natural Antioxidants-The Key to Safe and Sustainable Life. *IJLTET*. 2016; 6.
28. Simanjuntak EJ, Zulham. Superoksida dismutase (SOD) dan radikal bebas. *Jurnal Keperawatan dan Fisioterapi (JKF)*. 2020;2(2):124-129. doi:10.35451/jkf.v2i2.342
29. Rosa AC, Corsi D, Cavi N, Bruni N, Dosio F. Superoxide dismutase administration: A review of proposed human uses. *Molecules*. 2021: 1–40. doi:10.3390/molecules26071844
30. Maurya R, Namdeo M. Superoxide dismutase: A key enzyme for the survival of intracellular pathogens in host. In: Reactive Oxygen Species. *Intech Open*.
31. Rani AS, Maria DML. Superoxide dismutase (SOD): A promising enzyme in the area of biopharmaceuticals in its native and immobilized form: A review. *Int J Res Appl Sci Eng Technol*. 2022;(8):1472-1478. doi:10.22214/ijraset.2022.46437
32. Mao C, Yuan JQ, Lv YB, Gao X, Yin ZX, Kraus VB, *et al.* Associations between superoxide dismutase, malondialdehyde and all-cause mortality in older adults: A community-based cohort study. *BMC Geriatr*. 2019;19(1). doi:10.1186/s12877-019-1109-z
33. Moraes-Souza RQ, Vesentini G, Paula VG, Sinzato YK, Soares TS, Gelaleti RB, *et al.* Oxidative stress profile of mothers and their offspring after maternal consumption of high-fat diet in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021: 1-18. doi:10.1155/2021/9073859
34. Jiang S, Liu H, Li C. Dietary regulation of oxidative stress in chronic metabolic diseases. *Foods*. 2021: 1-18. doi:10.3390/foods10081854
35. Kahraman C, Alver A, Akca II, Rendi TA, Sağlam N. The effects of high-fat diets on the oxidative stress in adipose tissue in rats, whose retroperitoneal adipose tissues are denervated. *SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2018;85–9. doi:10.22312/sdusbed.407365
36. Ismyati A. Pengaruh kombinasi vitamin C dan E terhadap kadar malondialdehid dan superoksida dismutase pada ovarium Rattus novergicus

wistar yang dipapar depo medroksi progesterone asetat. Tesis. Indonesia: Universitas Brawijaya; 2015.

37. Milicevic NP, Busch CJL, Binder CJ. Malondialdehyde epitopes as targets of immunity and the implications for atherosclerosis. *Advances in Immunology*. 2016;131:1-59. doi:10.1016/bs.ai.2016.02.001
38. Mulianto N. Malondialdehid Sebagai Penanda Stres Oksidatif Pada Berbagai Penyakit Kulit. *CDK-282*. 2020;47(1): 39-44.
39. Khoubnasabjafari M, Ansarin K, Jouyban A. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts*. 2015; 5(3): 123–7. doi:10.15171/bi.2015.20
40. de Paz NM, Carrillo-Palau M, Hernández-Camba A, Abreu-González P, de Vera-González A, González-Delgado A, *et al.* Association of serum malondialdehyde levels with lipid profile and liver function in patients with inflammatory bowel disease. *Antioxidants*. 2024: 1-15. doi:10.3390/antiox13101171
41. Sulaiman AG, Sangging PRA. Malondialdehyde (MDA) sebagai marker stres oksidatif berbagai penyakit. *Medula*. 2024; 14(2): 321-5.
42. Anggraeni S, Setyaningrum T, Listiawan MY. Perbedaan kadar malondialdehid (MDA) sebagai petanda stres oksidatif pada berbagai derajat akne vulgaris. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin*. 2017; 29(1): 36-43.
43. Widiastuti IAE, Zubaidi FF, Rahmat B, Buanayuda GW. Analysis of malondialdehyde (MDA) levels based on body mass index, waist circumstances, and body fat percentage in students of medicine program faculty of medicine Mataram university. *Jurnal Biologi Tropis*. 2022; 22(4): 1455–61. doi:10.29303/jbt.v22i4.4513
44. Dragun Z, Marijić VF, Krasnići N, Ramani S, Valić D, Rebok K, *et al.* Malondialdehyde concentrations in the intestine and gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as indicator of lipid peroxidation. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017. doi:10.1007/s11356-017-9305-x
45. Chandimali N, Bak SG, Park EH, Lim HJ, Won YS, Kim EK, *et al.* Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: A review. *Cell Death Discov*. 2025;11(1):1-17. doi:10.1038/s41420-024-02278-8
46. Zahra N, Johan A, Ngestiningsih D. Hubungan antara kadar vitamin d dengan kadar malondialdehid (MDA) plasma pada lansia. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*. 2019;8(1).
47. Cordiano R, Di Gioacchino M, Mangifesta R, Panzera C, Gangemi S, Minciullo PL. Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: An update. *Molecules*. 2023: 1–22. doi:10.3390/molecules28165979
48. Khafisah N. Literature review: Gambaran kadar malondialdehid (MDA) dengan tingkat pencemaran polutan udara sebagai petanda stres oksidatif

berdasarkan variasi profesi dan masa kerja. Indonesia: Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta; 2022.

49. Tugasworo D, Prasetyo A, Kurnianto A, Retnaningsih R, Andhitara Y, Ardhini R, *et al.* Malondialdehyde (MDA) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in ischemic stroke: A systematic review. *Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*. 2023;59(1). doi:10.1186/s41983-023-00688-6
50. Barrera G, Pizzimenti S, Daga M, Dianzani C, Arcaro A, Cetrangolo GP, *et al.* Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. *Antioxidants*. 2018;7(8). doi:10.3390/antiox7080102
51. Hardiany NS, Sucitra, Paramita R. Profile of malondialdehyde (MDA) and catalase specific activity in plasma of elderly woman. *Health Science Journal of Indonesia*. 2019;10(2):132-138. doi:10.22435/hsji.v10i2.2239
52. Dasgupta A, Klein K. Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements. *Elsevier*. 2014:1-18. doi:10.1016/b978-0-12-405872-9.00001-x
53. Yusan LY, Budiman K, Effendi C. Effect of glutathione on MDA (malondyaldehyde) plasma and SOD (superoxyde dysmutase) erythrocyte on white rat ( *Rattus norvegicus* ) induced by paracetamol. *Journal Of Pharmacy Science And Technology*. 2018; 1(1): 13-9.
54. Pirinccioglu AG, Gökalp D, Pirinccioglu M, Kizil G, Kizil M. Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia. *Clin Biochem*. 2010;43(15):1220-1224. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.07.022
55. Emam NM, Ahmed DA, Mesbah A, Mansour M, Hamed SS. Malondialdehyde and total antioxidant capacity as predictors biomarkers of mortality in acute aluminium phosphide poisoning. *ESCTJ*. 2021; 9(1): 34-46.
56. Griffin MJ. On the immunometabolic role of NF-κB in adipocytes. *Immunometabolism*. 2022; 4(1): 1-38. doi:10.20900/immunometab20220003
57. Makassy D, Williams K, Karwi QG. The evolving role of macrophage metabolic reprogramming in obesity. *Canadian Journal of Cardiology*. 2025: 1-17. doi:10.1016/j.cjca.2025.04.017
58. Sun Y, Ge X, Li X, He J, Wei X, Du J, *et al.* High-fat diet promotes renal injury by inducing oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Cell Death & Disease*. 2020:1-14. doi:10.1038/s41419-020-03122-4
59. Dalby MJ, Aviello G, Ross AW, Walker AW, Barrett P, Morgan PJ. Diet induced obesity is independent of metabolic endotoxemia and TLR4 signalling, but markedly increases hypothalamic expression of the acute phase protein, SerpinA3N. *Scientific Reports*. 2018: 1-15. doi:10.1038/s41598-018-33928-4

60. Chen J, Ye C, Yang Z, Wang T, Xu B, Li P, *et al.* Study on the effect of macrophages on vascular endothelium in mice with different TCM syndromes of dyslipidemia and its biological basis based on RNA-seq technology. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12: 1-14. doi:10.3389/fphar.2021.665635
61. Wang X, Song R, Clinchamps M, Dutheil F. New insights into high-fat diet with chronic diseases. *Nutrients*. 2023: 1-4. doi:10.3390/nu15184031
62. Subramaniyan V, Hanim YU. Role of pancreatic lipase inhibition in obesity treatment: mechanisms and challenges towards current insights and future directions. *Int J Obes*. 2025;49(3):492-506. doi:10.1038/s41366-025-01729-1
63. Martinez-Gonzalez AI, Alvarez-Parrilla E, Díaz-Sánchez ÁG, de la Rosa LA, Nunez-Gastelum JA, Vazquez-Flores AA, *et al.* In vitro inhibition of pancreatic lipase by polyphenols: A kinetic, fluorescence spectroscopy and molecular docking study. *Food Technol Biotechnol*. 2017;55(4):519-530. doi:10.17113/ftb.55.04.17.5138
64. Enos RT, Davis JM, Velázquez KT, McClellan JL, Day SD, Carnevale KA, *et al.* Influence of dietary saturated fat content on adiposity, macrophage behavior, inflammation, and metabolism: Composition matters. *Journal of Lipid Research*. 2013; 54(1): 152–63. doi:10.1194/jlr.M030700
65. Pratita R. Pengaruh ekstrak propolis terhadap kadar low density lipoprotein pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar dengan diet tinggi lemak. Indonesia: Universitas Brawijaya; 2012.
66. Ichsan N. Gambaran kolesterol total dan daya tahan otot perempuan di pusat kebugaran. *ILLEA: Journal of Health Sciences*. 2025; 1(3).
67. Tan BL, Norhaizan ME. Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. *Nutrients*. 2019: 1–22. doi:10.3390/nu11112579
68. Wu S, Pan L, Liao H, Yao W, Shen N, Chen C, *et al.* High-fat diet increased NADPH-oxidase-related oxidative stress and aggravated LPS-induced intestine injury. *Life Sciences*. 2020: 1-8. doi:10.1016/j.lfs.2020.117539
69. Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson C, Chatuphonprasert W. A high-fat, high-fructose diet induces antioxidant imbalance and increases the risk and progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Scientifica*. 2016: 1-10. doi:10.1155/2016/5029414
70. Lee JY, Bae E, Kim HY, Lee KM, Yoon SS, Lee DC. High-fat-diet-induced oxidative stress linked to the increased colonization of *Lactobacillus sakei* in an obese population. *Microbiology Spectrum*. 2021: 1-13. doi:10.1128/spectrum.00074-21
71. Tolik D, Poławska E, Charuta A, Nowaczewski S, Cooper R. Characteristics of egg parts, chemical composition and nutritive value of japanese quail eggs - A review. *Folia Biologica (Poland)*. 2014;62(4):287-292. doi:10.3409/fb62\_4.287

72. Bondoc OL, Ramos AR, Ebron AO. Fat content, fatty acid composition, and fatty acid-based nutritional indices/ratios of egg yolks from different poultry species and breeds. *Philipp J Sci.* 2023;152(2):605-619. doi:10.56899/152.02.07
73. Sinanoglou VJ, Strati IF, Miniadis-Meimaroglou S. Lipid, fatty acid and carotenoid content of edible egg yolks from avian species: A comparative study. *Food Chem.* 2011;124(3):971-977. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.037
74. Kaźmierska M, Jarosz B, Korzeniowska M, Trziszka T, Dobrzański Z. Comparative analysis of fatty acid profile and cholesterol content of egg yolks of different bird species. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences.* 2005; 14(55): 69-73.
75. Zhao Y, Wang QY, Zeng LT, Wang JJ, Liu Z, Fan GQ, et al. Long-term high-fat high-fructose diet induces type 2 diabetes in rats through oxidative stress. *Nutrients.* 2022: 1-21. doi:10.3390/nu14112181
76. Abu-Seida AM. Potential benefits of propolis in large and small animal practices: A narrative review of the literature. *World's Veterinary Journal.* 2023; 13(3): 441–51. doi:10.54203/SCIL.2023.WVJ48
77. Bhatti N, Hajam YA, Mushtaq S, Kaur L, Kumar R, Rai S. A review on dynamic pharmacological potency and multifaceted biological activities of propolis. *Discover Sustainability.* 2024. doi:10.1007/s43621-024-00375-3
78. Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. Vol. 2018, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2018: 1-29. doi:10.1155/2018/7074209
79. Zheng Y, Wu Y, Tao L, Chen X, Jones TJ, Wang K, et al. Chinese propolis prevents obesity and metabolism syndromes induced by a high fat diet and accompanied by an altered gut microbiota structure in mice. *Nutrients.* 2020: 1-23. doi:10.3390/nu12040959
80. Pahlavani N, Malekahmadi M, Firouzi S, Rostami D, Sedaghat A, Moghaddam AB, et al. Molecular and cellular mechanisms of the effects of Propolis in inflammation, oxidative stress and glycemic control in chronic diseases. *Nutrition and Metabolism.* 2020: 1-12. doi:10.1186/s12986-020-00485-5
81. Kitamura H. Effects of propolis extract and propolis-derived compounds on obesity and diabetes: Knowledge from cellular and animal models. *Molecules.* 2019: 1-53. doi:10.3390/molecules24234394
82. Bahari H, Jazinaki MS, Aliakbarian M, Rashidmayvan M, Golafrouz H, Rahnama I, et al. Propolis supplementation on inflammatory and oxidative stress biomarkers in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Frontiers in Nutrition.* 2025: 1-21. doi:10.3389/fnut.2025.1542184

83. Zhu L, Zhang J, Yang H, Li G, Li H, Deng Z, *et al.* Propolis polyphenols: A review on the composition and anti-obesity mechanism of different types of propolis polyphenols. *Frontiers in Nutrition*. 2023: 1-14. doi:10.3389/fnut.2023.1066789
84. Warade A, Gaikwad R, Sapkal R, Sapkal V. Simulation of multistage countercurrent liquid-liquid extraction. *Leonardo Journal of Sciences*. 2011; (20): 79-94.
85. Aliakbarian M, Jazinaki MS, Bahari H, Rashidmayvan M, Golafrouz H, Khodashahi R, *et al.* Effects of Propolis Consumption on Liver Enzymes and Obesity Indices in Adults: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *Curr Dev Nutr*. 2024;8(9). doi:10.1016/j.cdnut.2024.104438
86. Alam A, Jahan I, Sarnakar P, Alimullah M, Dash PR, Subhan N. Health Benefit of Propolis in Obesity and Cardiovascular Complications. 2024. doi:10.13140/RG.2.2.28621.65763
87. Alrashada YN, Hassanien HA, Abbas AO, Alkhamis SA, Alkobaby AI. Dietary propolis improves the growth performance, redox status, and immune response of Nile tilapia upon a cold-stress challenge. *PLoS ONE*. 2023;18. doi:10.1371/journal.pone.0293727
88. Cai W, Xu J, Li G, Liu T, Guo X, Wang H, *et al.* Ethanol extract of propolis prevents high-fat diet-induced insulin resistance and obesity in association with modulation of gut microbiota in mice. *Food Research International*. 2020: 1-14. doi:10.1016/j.foodres.2019.108939
89. Roquette AR, Monteiro NES, Moura CS, Toreti VC, de Pace F, dos Santos A, *et al.* Green propolis modulates gut microbiota, reduces endotoxemia and expression of TLR4 pathway in mice fed a high-fat diet. *Food Research International*. 2015;76:796-803. doi:10.1016/j.foodres.2015.07.026
90. Babatunde IR, Abdulbasit A, Oladayo MI, Olasile OI, Olamide FR, Gbolahan BW. Hepatoprotective and Pancreatoprotective Properties of the Ethanolic Extract of Nigerian Propolis. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2015;4(2):102. doi:10.5455/jice.20150202023615
91. Tsuchiya Y, Abd-Ellatieff HA, Rawash AAA, Yanai T. Evaluation of Preventive Effects of Brazilian Green Propolis on Equine Herpes Virus 9-Induced Acute Encephalitis. *J Vet Sci Med Diagn*. 2018;07(02). doi:10.4172/2325-9590.1000252
92. Rahmah WN. Pengaruh pemberian ekstrak continous multi-stage countercurrent extraction (CMCE) propolis terhadap kadar malondialdehyde (MDA) 8-hydroxy guanosine (8-OHdG) dan ketebalan tubulus seminiferus (Uji preklinik pada tikus jantan Wistar yang diinduksi MSG). Tesis. Indonesia: Universitas Islam Sultan Agung; 2019.
93. Shin SK, Kwon EY. Kaempferol ameliorates metabolic syndrome by inhibiting inflammation and oxidative stress in high-fat diet-induced obese

- mice. *Nutrition Research Practice*. 2024; 18(3): 325–44. doi:10.4162/nrp.2024.18.3.325
94. Aprilisa Martha S, Karwur FF, Rondonuwu FS. Mekanisme Kerja Dan Fungsi Hayati Vitamin E Pada Tumbuhan Dan Mamalia.
  95. Baltusnikiene A, Staneviciene I, Jansen E. Beneficial and adverse effects of vitamin E on the kidney. *Frontiers in Physiology*. 2023: 1-15. doi:10.3389/fphys.2023.1145216
  96. Vasei FM, Zamanian MY, Golmohammadi M, Mahmoodi M, Khademalhosseini M, Tavakoli T, *et al*. The impact of vitamin E supplementation on oxidative stress, cognitive functions, and aging-related gene expression in aged mice. *Food Science & Nutrition*. 2024;12:9834–45. doi:10.1002/fsn3.4548
  97. Huang CH, Huang SL. Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, fed oxidized oil. *Aquaculture*. 2004; 237(1–4): 381–9. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.04.002
  98. Willyanto NA. Efek antioksidan vitamin E terhadap kadar glukosa darah dan MDA (malondialdehyde) pada tikus diabetes mellitus tipe I hasil induksi MLD-STZ (multiple low dose streptozotocin). Indonesia: Universitas Brawijaya; 2012.
  99. Upston JM, Terentis AC, Stocker R. Tocopherol-Mediated Peroxidation of Lipoproteins: Implications for Vitamin E as a Potential Antiatherogenic Supplement. *The FASEB Journal*. 1999;13.
  100. Mulyono, Susiloningsih W. Pengaruh pemberian vitamin E terhadap kadar MDA plasma darah pasca latihan fisik submaksimal. *Jurnal Olahraga Prestasi*. 2017; 13(2): 152-160.
  101. Golestani A, Rastegar R, Sharifabrizi A, Khaghani S, Payabvash SM, Salmasi AH, *et al*. Paradoxical dose- and time-dependent regulation of superoxide dismutase and antioxidant capacity by vitamin E in rat. *Clinica Chimica Acta*. 2006;365(1-2):153-159. doi:10.1016/j.cca.2005.08.008
  102. Gupta SD, Sae-Tan S, Wahler J, So JY, Bak MJ, Cheng LC, *et al*. Dietary  $\gamma$ -tocopherol-rich mixture inhibits estrogen-induced mammary tumorigenesis by modulating estrogen metabolism, antioxidant response, and PPAR $\gamma$ . *Cancer Prevention Research*. 2015;8(9):807-816. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0154
  103. Shin J, Yang SJ, Lim Y. Gamma-tocopherol supplementation ameliorated hyper-inflammatory response during the early cutaneous wound healing in alloxan-induced diabetic mice. *Exp Biol Med*. 2017;242(5):505-515. doi:10.1177/1535370216683836
  104. Ullah R, Rauf N, Nabi G, Yi S, Yu-Dong Z, Fu J. Mechanistic insight into high-fat diet-induced metabolic inflammation in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021;142. doi:10.1016/j.biopha.2021.112012

105. Wypych A, Ożgo M, Bernaciak M, Barszcz M, Gawin K, Ciecchanowicz AK, *et al.* Effect of feeding high fat diets differing in fatty acid composition on oxidative stress markers and protein expression profiles in mouse kidney. *J Anim Feed Sci.* 2024;33(2):170-184. doi:10.22358/jafs/175920/2024
106. Hall JE, Hall ME. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology 15th Edition. *Elsevier.* doi:10.1016/B978-0-443-11101-3.00108-6
107. Adeva-Andany MM, Carneiro-Freire N, Sico-Filgueira M, Fernandez-Fernandez C, Mourino-Bayolo D. Mitochondrial  $\beta$ -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion.* 2019;46:73-90.
108. Reginato A, Veras ACC, Baqueiro M da N, Panzarin C, Siqueira BP, Milanski M, *et al.* The role of fatty acids in ceramide pathways and their influence on hypothalamic regulation of energy balance: A systematic review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(10). doi:10.3390/ijms22105357
109. Santoleri D, Titchenell PM. Resolving the paradox of hepatic insulin resistance. *CMGH.* 2019;7(2):447-456. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.10.016
110. Almalki RS, Gazzaz M, Miski SF, Fayed HM, Mohamed BMSA, Hessin AF, *et al.* Repositioning gemigliptin for the alleviation of thioacetamide-induced liver fibrosis in rats: Targeting TLR4/MAPK, SIRT1/AMPK/Nrf2, PI3K/AKT/mTOR axis and apoptosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2025;212. doi:10.1016/j.ejps.2025.107192
111. Hidayati PH. Hubungan kadar spexin, FGF21, rasio FGF21/spexin, HOMA-IR dengan Faktor Risiko Kardiometabolik pada Subyek Obesitas. Disertasi. Indonesia: Universitas Hasanuddin; 2024.
112. Mohammadpour-Asl S, Roshan-Milani B, Roshan-Milani S, Saboory E, Ghobadian B, Chodari L. Endoplasmic reticulum stress PERK-ATF4-CHOP pathway is involved in non-alcoholic fatty liver disease in type 1 diabetic rats: The rescue effect of treatment exercise and insulin-like growth factor I. *Heliyon.* 2024;10(5). doi:10.1016/j.heliyon.2024.e27225
113. Gabbs M, Leng S, Devassy JG, Monirujjaman M, Aukema HM. Advances in our understanding of oxylipins derived from dietary PUFAs. *Advances in Nutrition.* 2015;6(5):513-540. doi:10.3945/an.114.007732
114. Babaeenezhad E, Khosravi P, Sarabi MM. Dietary polyunsaturated fatty acids affect PPAR $\gamma$  promoter methylation status and regulate the PPAR $\gamma$ /COX2 pathway in some colorectal cancer cell lines. *Genes Nutr.* 2025;20(1). doi:10.1186/s12263-025-00764-x
115. Ramadhani CW. Hubungan antara asupan polyunsaturated fatty acids (PUFA) dan kejadian endometriosis dengan overweight (Studi analitik observasional di RSI Sultan Agung Semarang). Skripsi. Indonesia: Universitas Islam Sultan Agung; 2022
116. Szudzik M, Zajdel M, Samborowska E, Perlejewski K, Radkowski M, Ufnal M. High-fat diet with normal caloric intake elevates TMA and TMAO production and reduces microbial diversity in rats. *Nutrients.* 2025;17(13). doi:10.3390/nu17132230

117. Imai Y, Dobrian AD, Weaver JR, Butcher MJ, Cole BK, Galkina EV, *et al.* Interaction between cytokines and inflammatory cells in islet dysfunction, insulin resistance and vascular disease. *Diabetes Obes Metab.* 2013;15(S3):117-129. doi:10.1111/dom.12161
118. Mao S. Emerging role and the signaling pathways of uncoupling protein 2 in kidney diseases. *Ren Fail.* 2024;46(2). doi:10.1080/0886022X.2024.2381604
119. Deng Y, Liu D, Dissanayake I, Jaye K, Bhuyan DJ, Low M, *et al.* Propolis as a functional food ingredient: Modulation of gut microbiota and implications for chronic disease management. *Food Research International.* 2025;218. doi:10.1016/j.foodres.2025.116836
120. Aabed K, Bhat RS, Moubayed N, Al-Mutiri M, Al-Marshoud M, Al-Qahtani A, *et al.* Ameliorative effect of probiotics (*Lactobacillus paracasei* and Protexin®) and prebiotics (propolis and bee pollen) on clindamycin and propionic acid-induced oxidative stress and altered gut microbiota in a rodent model of autism. *Cell Mol Biol.* 2019;65(1):1-7. doi:10.14715/cmb/2019.65.1.1
121. Kusuma AM, Asarina Y, Rahmawati YI, Susanti. Effect of dayak garlic (*Eleutheria palmifolia* (L.) Merr) extract and sweet purple potato (*Ipomoea batatas* L) extract on lowering cholesterol and triglyceride blood levels in male rats. *Jurnal Kefarmasian Indonesia.* 2016: 108-16.
122. Hijriani 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.* 2023;13(2):1-4. doi:10.54350/jkr.v13i1.156
123. Rahmawati A., Mekanisme Terjadinya Inflamasi dan Stres Oksidatif pada Obesitas. *El-Hayah.* 2014; 5(1): 1-8.
124. Zulfahmidah, Fajriansyah, Makmun A, Rasfahyana. Hubungan Obesitas dan Stress Oksidatif. *UMI Medical Journal.* 2021;6(1).
125. Vasconcelos RP, Peixoto MS, De Oliveira KA, Ferreira ACV, de Souzaa ANC, Carvalho DP, *et al.* Sex Differences in Subcutaneous Adipose Tissue Redox Homeostasis and Inflammation Markers in Control and High Fat Diet Fed Rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2018: 1-28.
126. Koert A, Ploeger A, Bockting CLH, Schmidt MV, Lucassen PJ, Schranter A, *et al.* The social instability stress paradigm in rat and mouse: A systematic review of protocols, limitations, and recommendations. *Neurobiol Stress.* 2021;15. doi:10.1016/j.ynstr.2021.100410
127. Atrooz F, Alkadhi KA, Salim S. Understanding stress: Insights from rodent models. *Current Research in Neurobiology.* 2021;2. doi:10.1016/j.crneur.2021.100013