

[Undangan Sidang Promosi Program Doktor Mahasiswa SPs IPB]

Retno Mardhiati Adiwiryo



I162130031



Senin, 29 Juni 2020



13.00-15.00WIB



Judul Disertasi : Pengaruh Campuran Minyak Zaitun Extra Virgin dan Madu Terhadap Status Imun dan Kesehatan Pencernaan pada Tikus (*Rattus Novergicus*) Jantan Galur Sprague Dawley

Komisi Pembimbing :

1. Prof. Dr. Ir. Sri Anna Marliyati M.S. (Ketua)
2. Dr. Ir. Drajat Martianto [M.Si](#). (Anggota)
3. Prof. Dr. Ir. Siti Madanijah M.S. (Anggota)
4. Prof. Dr. drh. I Wayan Teguh Wibawan M.S. (Anggota)

Penguji Luar Komisi :

1. Drh. Adi Winarto, Ph.D
2. **Dr. Hadi Sunaryo, [M.Si](#), Apt**

Pimpinan Sidang : [Prof.Dr.Ir. Ujang Sumarwan, M.Sc](#)

Ketua PS. Ilmu Gizi : [Prof.Dr.Ir. Ujang Sumarwan, M.Sc](#)

**PENGARUH CAMPURAN MINYAK ZAITUN *EXTRA VIRGIN*
DAN MADU TERHADAP STATUS IMUN DAN KESEHATAN
PENCERNAAN (VILI DAN KRIPTA)**

RETNO MARDHIATI A



**PROGRAM STUDI ILMU GIZI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2021**

PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi dengan judul “Pengaruh Campuran Minyak Zaitun *Extra Virgin* dan Madu terhadap Status Imun dan Kesehatan Pencernaan (Vili dan Kripta)” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus Tahun 2021

Retno Mardhiati A
NIM. I162130031

RINGKASAN

RETNO MARDHIATI A. Pengaruh Campuran Minyak Zaitun *Extra Virgin* dan Madu terhadap Status Imun dan Kesehatan Pencernaan (Vili dan Kripta). Dibimbing oleh SRI ANNA MARLIYATI, DRAJAT MARTIANTO, SITI MADANIJAH, dan I WAYAN T. WIBAWAN.

Extra Virgin Olive Oil (EVOO) dan madu sering digunakan masyarakat untuk meningkatkan kesehatan. EVOO memiliki kandungan mayor yakni asam lemak, dimana asam lemak tertinggi yakni (*Monounsaturated Fatty Acids*/MUFA). Kandungan mayor lainnya dalam EVOO antara lain asam lemak tak jenuh ganda (*Polyunsaturated Fatty Acids*/PUFA) dan vitamin E. Kandungan madu terbanyak adalah karbohidrat, dimana komposisi lebih banyak fruktosa daripada glukosa. Kandungan minor EVOO dan madu antara lain senyawa polifenol, beberapa vitamin, dan mineral. Beberapa manfaat EVOO dan madu dalam kesehatan adalah sebagai imunomodulator dan meningkatkan kesehatan pencernaan.

Penelitian ini memiliki beberapa tujuan yaitu untuk (1) mengidentifikasi sifat kimia EVOO dan kandungan zat gizi pada sampel produk EVOO, (2) mengidentifikasi sifat kimia dan kandungan zat gizi sampel produk madu, (3) menganalisis pengaruh pemberian EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu terhadap aktifitas dan kapasitas makrofag pada tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague Dawley*, (4) menganalisis pengaruh pemberian EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu terhadap sitokin (IL-12, IL-2, IFN- γ) pada tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague Dawley*, (5) menganalisis pengaruh pemberian EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu terhadap kesehatan pencernaan (panjang vili dan kedalaman kripta) pada tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague Dawley*.

Alur penelitian terdiri dari (1) pemilihan bahan sampel produk EVOO dan madu, (2) pemilihan hewan coba secara acak, (3) pemberian bahan perlakuan selama 28 hari, (4) pelaksanaan bedah, pengambilan cairan peritoneal, darah, dan organ usus halus, (5) pemeriksaan aktivitas dan kapasitas makrofag, sitokin, dan jaringan usus halus.

Bahan sampel produk EVOO dan madu diperoleh dari supermarket besar di wilayah DKI Jakarta. Jumlah sampel EVOO dan madu, masing-masing satu merek produk. Analisis sifat kimia dan kandungan zat pada EVOO dan madu dilakukan di Laboratorium Balai Besar Industri Agro (BBIA) Kementerian Perindustrian Bogor dan Laboratorium Biofarmaka IPB Bogor pada tahun 2018-2019. Bahan perlakuan pada penelitian ini terdiri dari EVOO, madu, campuran EVOO+madu, stimuno, dan aquades. Pelaksanaan penelitian studi hewan coba menggunakan desain faktorial. Jumlah hewan coba yang digunakan ada 80 ekor tikus (*Rattus novergicus* galur *Sprague Dawley*), berjenis kelamin jantan, berumur 2-3 bulan, memiliki berat badan 150-200 g. Tikus dibagi pada 3 kelompok eksperimen dan 2 kelompok kontrol (E_{EVOO} , E_{madu} , $E_{EVOO+madu}$, $K_{positif}$, $K_{negatif}$). Jumlah tikus 16 ekor tiap kelompok. Pengamatan dilakukan pada hari ke 7, 14, 21, 28. Pemberian bahan perlakuan, dan pengambilan cairan makrofag, darah dan organ pada hewan coba dilakukan di Rumah Sakit Hewan dan Laboratorium Bakteriologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Pemeriksaan darah dan jaringan usus tikus, dilaksanakan di Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) Lembaga Penelitian dan

Pengabdian Masyarakat IPB. Analisis statistik menggunakan *One Way of Anova* dan *Duncan* sebagai uji *Post Hoc Test*.

Hasil penelitian menunjukkan sampel produk EVOO memenuhi standar kimia EVOO. Hasil pemeriksaan beberapa asam lemak tidak jenuh pada sampel EVOO menunjukkan kandungan asam oleat 74,7%, kandungan asam linoleat 7,65%, dan kandungan asam linolenat pada sampel EVOO 1,63%. Hasil kandungan asam lemak jenuh pada sampel EVOO menunjukkan kandungan asam palmitat sesuai standar 10,4%. Kandungan asam stearat sampel EVOO berada dibawah 5% yaitu 4,31. Kandungan beberapa zat gizi lainnya, menunjukkan kandungan vitamin E pada sampel sebesar 20,6 mg/kg, kandungan zat besi sebesar 1,2 mg/kg, kandungan total flavonoid tertinggi pada sampel sebesar 0,36 % (b/b), dan kandungan total karotenoid tertinggi pada sampel sebesar 25,2 mg/kg.

Penelitian pada sampel madu menunjukkan pH sebesar 4,04, kadar air berkisar 19,2%, kadar abu 0,37% b/b, keasaman 16,4 ml NAOH 1 N/ kg, aktifitas enzim diastase 10,2 DN. Kandungan fruktosa dan glukosa pada sampel besar 22,4 g/100 g dan 27,6 g/100g. Kandungan gula pereduksi 60,6% pada sampel. Kandungan energi dan karbohidrat pada sampel sebesar 322 kal/100 g dan 80,3%. Kandungan mineral Cu dan Zn pada sampel sebesar 0,05 mg/kg dan 0,86 mg/kg. Kandungan zat besi pada sampel sebesar 20,1 mg/kg. Kandungan total flavonoid dan karotenoid pada sampel sebesar 0,07 % b/b dan 0,64 mg/kg.

Hasil penelitian menunjukkan ada pengaruh pemberian campuran EVOO dan madu terhadap aktivitas dan kapasitas makrofag tikus secara signifikan ($p < 0,05$). Aktivitas makrofag tertinggi pada kelompok tikus yang diberi campuran EVOO+madu terjadi pada hari ke 28 yaitu sebesar $72,12 \pm 2,06$ %. Kapasitas makrofag tertinggi pada kelompok tikus yang diberi campuran EVOO+madu pada hari ke 28, sebesar $3539,4 \pm 59,5$ bakteri per 50 makrofag aktif.

Hasil penelitian menunjukkan tidak ada pengaruh pemberian campuran EVOO+madu terhadap kerja interleukin 2 (IL-2), IL-12, dan IFN- γ ($p \geq 0,05$). Kadar IL-12, pada kelompok tikus yang diberi campuran EVOO+madu, mengalami penurunan secara signifikan, dari hari ke 7 sampai ke 28. Hal ini menunjukkan faktor lamanya pemberian perlakuan berpengaruh signifikan pada penurunan kadar IL-12. Interaksi antara pemberian bahan perlakuan dengan lama pemberian perlakuan memberikan pengaruh terhadap kerja IL-2 ($p < 0,05$) pada semua kelompok perlakuan, namun tidak mempengaruhi kadar IL-12 dan IFN- γ .

Hasil analisis panjang vili dan kedalaman kriptas usus halus pada kelompok tikus yang diberi campuran EVOO+madu menunjukkan ukuran panjang vili tertinggi $685,31 \pm 37,91$ μ m dan kedalaman kriptas tertinggi $332,80 \pm 19,6$ μ m pada hari ke 14. Ukuran kedalaman kriptas memiliki perbedaan secara signifikan berdasarkan waktu perlakuan dan bahan perlakuan.

Penelitian ini, memberikan informasi tentang pemberian campuran EVOO+madu dapat meningkatkan kerja sistem imun non spesifik makrofag dan kesehatan pencernaan (panjang vili dan kedalaman kriptas usus halus), namun tidak pada sitokin dalam sistem imun spesifik. Rekomendasi dari penelitian ini, mengonsumsi campuran EVOO+madu akan mendapatkan sinergi daripada mengonsumsi sendiri-sendiri.

Kata kunci: kriptas, madu, makrofag, minyak zaitun, sitokin, vili

SUMMARY

RETNO MARDHIATI A. The Effect of Extra Virgin Olive Oil and Honey Mixture on Immune Status and Digestive Health (Villi and Crypts). Advised by SRI ANNA MARLIYATI, DRAJAT MARTIANTO, SITI MADANIJAH, and I WAYAN T. WIBAWAN.

Extra Virgin Olive Oil (EVOO) and honey are often used by the society to improve health. EVOO possesses major content, namely, fatty acid with monounsaturated fatty acids (MUFA) as the highest fatty acid contained in EVOO. Some other major contents are including polyunsaturated fatty acids (PUFA) and vitamin E. Meanwhile in honey, the highest content is carbohydrate, mostly monosaccharides with more fructose than glucose in their composition. The minor content of EVOO and honey comprises polyphenols, and couples of vitamin and mineral. Some benefits of EVOO and honey in health are as immunomodulator and to improve digestive health.

This study has several objectives, namely, (1) to identify chemical properties and nutrient content of EVOO product samples, and (2) to identify chemical properties and nutrient content of honey product samples, (3) to analyze the effect of EVOO, honey, and the mixture of EVOO and honey administration on macrophage activity and capacity of white male rats (*Rattus norvegicus*) *Sprague Dawley* strain, (4) to analyze the effect of EVOO, honey, and the mixture of EVOO and honey administration on cytokines of white male rats (*Rattus norvegicus*) *Sprague Dawley* strain, and (5) to analyze the effect of EVOO, honey, and the mixture of EVOO and honey administration on digestive health (villi length and crypt depth) of white male rats (*Rattus norvegicus*) *Sprague Dawley* strain.

The procedure of this research comprised (1) the selection of treatment ingredients from EVOO and honey samples containing the highest total flavonoid and carotenoid, (2) the random selection of trial animal, (3) the treatment for 28 days, (4) dissection process, peritoneal fluid, blood, and small intestine collection, and (5) the examination of macrophage activity and capacity, cytokine, and small intestinal tissue.

EVOO and Honey samples were obtained from wholesale supermarkets located in Great Jakarta district. The respective total sample of EVOO and honey, was one product brand. The chemical properties and nutrient content analyses of EVOO and honey were performed in BBIA (Center of Agro Based Industry) Laboratory of Ministry of Industry and Biofarmaka laboratory of IPB (Bogor Agricultural University) in 2018-2019. EVOO and honey used in animal study were those with the highest flavonoid and carotenoid content of all EVOO and honey samples. The treatment ingredients in this study were EVOO, honey, the mixture of EVOO and honey, *Stimuno*, and *Aquades*. The animal study was performed using factorial design. The trial animal used in the study was 80 male rats (*Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley*), aged 2 months, and weighted between 150-200 g. They were divided into three experimental groups and 2 control groups (E_{EVOO} , E_{honey} , $E_{EVOO+honey}$, $K_{positive}$, $K_{negative}$) with 16 rats in each group. The observation was performed on day 7, 14, 21, and day 28. The administration of treatment ingredients was done in Animal Hospital and Bacteriology and Immunology of Veterinary Medicine Faculty (FKH) IPB University. Meanwhile,

rats blood and intestinal tissues were observed in The Center of Primate Study of IPB Institute for Research and Community Service. Statistical analyses were performed using One Way Anova and Duncan as Post Hoc Test.

The study showed that the product sample of EVOO complied the chemical standard of EVOO. The examination of several unsaturated fatty acids in EVOO sample showed 74,7% oleate acid content, 7,65% linoleate acid content, and 1,63% linolenate acid content. Moreover, the examination of saturated fatty acids in EVOO product sample revealed around 10,4% palmitate acid content, which complied the standard. It was also seen that the stearate acid content of EVOO sample was below 5%, or 4,31 to be exact. The other nutrient contents showed in the sample were 20,6 mg/kg Vitamin E, 1,2 mg/kg Fe, 0,36%(b/b) of the highest total flavonoid and 25,2 mg/kg of the highest total carotenoid.

The examination on honey sample revealed pH of 4,04, 19,2 % of water content, 0,37% b/b of ash content, acid level of 16,4 ml NAOH 1 N/ kg, and diastase enzyme activity of 10,2 DN. Additionally, the fructose and glucose content was high, namely 22,4 g/100g and 27,6 g/100g (respectively). The reducing sugar content found in the sample was 60,6%. The energy and carbohydrate content was, respectively, 322 cal/100g and 80,3%. Further, the sample contained 0,05 mg/kg Cu and 0,86 mg/kg Zn. Its Fe content was 20,1 mg/kg. Finally, the sample's total flavonoid and carotenoid content was 0,07 % b/b and 0,64 mg/kg.

The result showed that there was a significant effect of EVOO and honey mixture administration on rats' macrophage activity and capacity ($p < 0,05$). The highest macrophage activity of rat group administered with EVOO and honey mixture was occurred on day 28 by $72,12 \pm 2,06$ %. Meanwhile, the highest macrophage capacity was seen in rats group administered with EVOO and honey mixture on day 28, that was $3539,4 \pm 59,5$ bacteria per 50 active macrophages.

The result revealed that there was no effect of EVOO and honey mixture administration on the working of interleukin 12 (IL-12), IL-2, and IF- γ ($p \geq 0,05$). IL-12 level on the same group of rat experienced significant decrease from day 7 trough day 28. It indicates that the length of the treatment factor had significant effect on the decrease of IL-12 level. The interaction between treatment ingredient administration with the length of the treatment put an effect on the work of IL-2 ($p < 0,05$) of all rat groups. Nevertheless, it did not have effect on the level of IL-12, and IFN- γ .

The analysis of small intestinal villi length and crypt depth on rat group administered EVOO and honey mixture resulted that the longest villi was $685,31 \pm 37,91$ μ m and the deepest crypt was $332,80 \pm 19,6$ μ m on day 14. There was a significant difference of crypt depth based on the length of treatment time and the ingredient.

This study suggests that the administration of EVOO and honey mixture can improve the work of non spesific immune system macrophage and the health of small intesine (villi length and crypts depth), but not the work of cytokine in specific immune systeme. It is advised, from the result of this study, to consume the combination of EVOO and honey to obtain its synergy rather than consuning them separately.

Key words: cytokines, crypts, honey, macrophages, olive oil, villi

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2021
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.

**PENGARUH CAMPURAN MINYAK ZAITUN *EXTRA VIRGIN*
DAN MADU TERHADAP STATUS IMUN DAN KESEHATAN
PENCERNAAN (VILI DAN KRIPTA)**

RETNO MARDHIATI A

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor pada
Program Studi Ilmu Gizi

**PROGRAM STUDI ILMU GIZI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2021**

Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Ujian Tertutup Disertasi:

- 1 Prof. Dr. Ir. Hardinsyah, M.S.
- 2 drh. Adi Winarto, PhD, PAVet

Promotor Luar Komisi Pembimbing pada Sidang Promosi Terbuka Disertasi:

- 1 drh. Adi Winarto, PhD, PAVet
- 2 Dr. Hadi Sunaryo, M.Si, Apt

Judul Disertasi : Pengaruh Campuran Minyak Zaitun *Extra Virgin* dan Madu terhadap Status Imun dan Kesehatan Pencernaan (Vili dan Kripta)
Nama : Retno Mardhiati Adiwiryo
NIM : I162130031

Disetujui oleh
Komisi Pembimbing

Prof Dr Ir Sri Anna Marliyati, MS
Ketua

Dr Ir Drajat Martianto, MS
Anggota

Prof Dr Ir Siti Madanijah, MS
Anggota

Prof Dr drh I Wayan T. Wibawan, MS
Anggota

Diketahui oleh

Ketua Program Studi Ilmu Gizi

Dekan Sekolah Pascasarjana



Dr Rimbawan



Digitally signed by:
Anas Miftah Fauzi
(3FE49AA95DD0C4F)
Date: 21 Agt 2021 13:14:50 WIB
Verify at disign.lpb.ac.id

Prof Dr Ir Anas Miftah Fauzi, MEng

Tanggal Sidang Tertutup : 13 Maret 2020

Tanggal Lulus :

Tanggal Sidang Promosi : 29 Juni 2020

29 JUN 2020

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanaahu wa ta'ala* atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Juni 2019 sampai bulan Juli 2020 ini ialah status imun dan kesehatan pencernaan, dengan judul “Pengaruh Campuran Minyak Zaitun *Extra Virgin* dan Madu terhadap Status Imun dan Kesehatan Pencernaan (Vili dan Kripta)”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Ir. Sri Anna Marliyati, M.Si., Dr. Ir. Drajat Martianto, M.S., Prof. Dr. Ir. Siti Madanijah, M.S., dan Prof. Dr. drh. I Wayan T. Wibawan, M.S. yang telah membimbing dan banyak memberi saran. Ucapan terima kasih juga penulis ucapkan kepada Dr. Rimbawan sebagai Ketua Program Studi S3 Ilmu Gizi dan dr. Mira Dewi, M.S., PhD selaku Sekretaris Program Studi Ilmu Gizi, dan semua dosen Program Studi S3 Ilmu Gizi. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada moderator seminar dan penguji luar komisi pembimbing. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada seluruh staf sekretariat Pascasarjana IPB dan staf sekretariat Program Studi S3 Ilmu Gizi IPB. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada seluruh aktivitas akademika Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka (UHAMKA), terutama Rektor, Dekan Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan, Ketua dan Sekretaris Program Studi Kesehatan Masyarakat UHAMKA, yang telah memberi izin pendidikan dan penelitian. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Kepala Rumah Sakit Hewan Fakultas Kedokteran IPB beserta jajarannya dan staf tenaga medis yang telah membantu selama penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan untuk tenaga laboratorium pada laboratorium Balai Besar Industri Agro (BBIA), laboratorium Biofarmaka LPPM IPB, laboratorium Bakteriologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB, dan laboratorium Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) IPB, yang telah membantu selama pengumpulan data.

Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada Papa tersayang Werku Nirhawa Adiwiryo (alm), Mama tersayang Husnal Hayati, Papa tersayang Ali Asikin, Mama tersayang Nety, suami tercinta Rikza Maulan, anak-anak tersayang Nadiyah Robbaniyah dan Azka Nabila, Kakak tersayang Dianita Adiwiryo, Adik tersayang Desy Kurniawati Adiwiryo, serta seluruh keluarga Adiwiryo dan keluarga Ali Asikin yang telah memberikan doa dan dukungan selama penulis melaksanakan studi dan penelitian.

Terima kasih pada rekan rekan seperjuangan program Doktor Ilmu Gizi 2013, Mahani, Ade Chandra Iwansyah, Sudikno, Nurfi Afriansyah, Nurbani Kalsum, Ketut Sutiari, dan Renan Prasta Jenie, serta semua adik kelas Program Studi S3 Ilmu Gizi, yang telah memberikan dukungan dan semangat. Penulis mengucapkan terima kasih kepada *Marisa Foundation* dan Yayasan Autoimun Indonesia, yang telah memberikan dukungan dan informasi cara hidup sebagai penyintas *hepatic autoimun*, memberikan dampak pada kesehatan penulis.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2021

Retno Mardhiati A

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xxiii
DAFTAR GAMBAR	xxiv
DAFTAR LAMPIRAN	xxiv
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	4
1.5 Ruang lingkup	4
1.6 Kebaruan (<i>Novelty</i>)	4
1.7 Hipotesis	4
II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 EVOO	5
2.1.1 EVOO dan Sifat Fisikokimia	5
2.1.2 Kandungan EVOO Beserta Fungsinya	5
2.2 Madu	11
2.2.1 Madu dan Sifat Fisikokimia	11
2.2.2 Kandungan Madu Beserta Fungsinya	12
2.3 Sistem Imun	17
2.3.1 Sistem Imun Non Spesifik	18
2.3.2 Sistem Imun Spesifik	20
2.3.2.1 Sistem Imun Spesifik Humoral	21
2.3.2.2 Sistem Imun Spesifik Seluler	22
2.4 Sitokin	23
2.4.1 Sitokin pada Sistem Imun Nonspesifik	24
2.4.1.1 IL-6	25
2.4.1.2 IL-12	25
2.4.1.3 TNF- α	26
2.4.2 Sitokin pada Sistem Imun Spesifik	27
2.4.2.1 IL-2	27
2.4.2.2 IFN- γ	27
2.5 Makrofag	29
2.6 Usus Halus	32
2.7 Mekanisme EVOO dan Madu dalam Status Imun dan Kesehatan Pencernaan	37
2.8 Campuran EVOO dan Senyawa Lainnya serta Dosis dan Lamanya Perlakuan	43
2.9 <i>Rattus norvegicus</i>	45
2.10 <i>Staphylococcus aureus</i>	47
2.11 Kerangka Pemikiran	48
III METODE	51
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	51
3.2 Alat dan Bahan	51
3.3 Prosedur Kerja	51

3.4	Hewan Coba	54
3.5	Bahan Perlakuan : Dosis EVOO, Madu, dan Campuran EVOO+Madu	55
3.6	Analisis Data	55
3.7	Etik Penelitian	56
IV	IDENTIFIKASI SIFAT KIMIAWI DAN ZAT GIZI PADA SAMPEL PRODUK EVOO	57
4.1	Pendahuluan	57
4.2	Metode	58
4.2.1	Tempat dan Waktu Penelitian	58
4.2.2	Bahan dan Alat	58
4.2.3	Pemeriksaan Kadar Air	59
4.2.4	Pemeriksaan Kadar Abu	59
4.2.5	Pemeriksaan Bilangan IOD	59
4.2.6	Pemeriksaan Bilangan Penyabunan	60
4.2.7	Pemeriksaan Bilangan Asam	60
4.2.8	Pemeriksaan Kadar Asam Lemak	60
4.2.9	Pemeriksaan Total Flavonoid dan Total Karotenoid	60
4.2.10	Pemeriksaan Vitamin E	61
4.2.11	Pemeriksaan Zat Besi (Fe)	61
4.2.12	Analisis Data	61
4.3	Hasil dan Pembahasan	61
4.4	Simpulan	66
V	IDENTIFIKASI SIFAT KIMIAWI DAN ZAT GIZI PADA SAMPEL PRODUK MADU	67
5.1	Pendahuluan	67
5.2	Metode	68
5.2.1	Tempat dan Waktu Penelitian	68
5.2.2	Bahan dan Alat	68
5.2.3	Pemeriksaan pH	69
5.2.4	Pemeriksaan Kadar Air	69
5.2.5	Pemeriksaan Kadar Abu	69
5.2.6	Pemeriksaan Keasaman	69
5.2.7	Pemeriksaan Aktivitas Enzim Diatase	70
5.2.8	Pemeriksaan Pemeriksaan Fruktosa, Glukosa, Sukrosa, dan Gula Pereduksi	70
5.2.9	Pemeriksaan Protein	70
5.2.10	Pemeriksaan Lemak	70
5.2.11	Pemeriksaan Total Flavonoid dan Total Karotenoid	71
5.2.12	Pemeriksaan Vitamin E	71
5.2.13	Pemeriksaan Zat Besi (Fe)	71
5.2.14	Analisis Data	71
5.3	Hasil dan Pembahasan	72
5.4	Simpulan	75
VI	PENGARUH PEMBERIAN EVOO, MADU, DAN EVOO+MADU TERHADAP AKTIFITAS DAN KAPASITAS MAKROFAG	76
6.1	Pendahuluan	76
6.2	Metode	78

	6.2.1	Desain, Tempat, dan Waktu Penelitian	78
	6.2.2	Bahan dan Alat	78
	6.2.3	Sampel	78
	6.2.4	Hewan Coba	78
	6.2.5	Bakteri	79
	6.2.6	Dosis Bahan Perlakuan	79
	6.2.7	Uji Aktivitas dan Kapasitas Makrofag	79
	6.2.8	Analisis Data	80
	6.3	Hasil dan Pembahasan	80
	6.3.1	Uji Aktivitas Makrofag	80
	6.3.2	Uji Kapasitas Makrofag	82
	6.4	Simpulan	83
VII		PENGARUH PEMBERIAN EVOO, MADU, DAN EVOO+MADU TERHADAP IL-2, IL-12, DAN IFN- γ PADA TIKUS	84
	7.1	Pendahuluan	84
	7.2	Metode	86
	7.2.1	Waktu dan Lokasi	86
	7.2.2	Bahan dan Alat	86
	7.2.3	Desain Penelitian	87
	7.2.4	Dosis dan Pembuatan Campuran Bahan Perlakuan	87
	7.2.5	Hewan Coba	87
	7.2.6	Bakteri	88
	7.2.7	Pengambilan Darah Tikus	88
	7.2.8	Penentuan Kadar Interleukin (IL-12, IL-2, dan IFN- γ)	88
	7.2.9	Analisis Data	89
	7.3	Hasil dan Pembahasan	89
	7.3.1	Interleukin 12 (IL-12)	89
	7.3.2	Interleukin 2 (IL-2)	90
	7.3.3	Interferon Gamma (IFN- γ)	92
	7.4	Simpulan	93
VIII		PENGARUH PEMBERIAN EVOO, MADU, DAN EVOO+MADU TERHADAP PANJANG VILI DAN KEDALAMAN KRIPTA PADA TIKUS	94
	8.1	Pendahuluan	94
	8.2	Metode	95
	8.2.1	Waktu dan Lokasi Penelitian	95
	8.2.2	Bahan dan Alat	95
	8.2.3	Bahan Perlakuan	95
	8.2.4	Hewan Coba dan Penanganannya	95
	8.2.5	Desain Penelitian	96
	8.2.6	Pembuatan Preparat Histologi Usus Halus	96
	8.2.7	Pemeriksaan Mikroskopis	96
	8.2.8	Analisis Data	97
	8.3	Hasil dan Pembahasan	97
	8.4	Simpulan	100
IX		PEMBAHASAN UMUM	101
	9.1	Generalisasi	101
	9.2	Kekuatan dan Keterbatasan Penelitian	105

9.3	Implikasi Hasil Penelitian	106
X	SIMPULAN DAN SARAN	107
10.1	Simpulan	107
10.2	Saran	107
	DAFTAR PUSTAKA	109
	LAMPIRAN	131
	RIWAYAT HIDUP	134

DAFTAR TABEL

1	Standar jumlah asam lemak dalam EVOO	6
2	Standar madu berdasarkan SNI 01-3543-2013	12
3	Rerata komposisi madu di Indonesia	13
4	Kandungan mineral dan madu (mg/100 g)	14
5	Identifikasi sifat kimia pada sampel produk EVOO	61
6	Karakteristik kimia EVOO pada beberapa penelitian	62
7	Kandungan asam lemak (satuan %) pada sampel produk EVOO	62
8	Kandungan asam lemak pada beberapa minyak nabati (satuan %)	63
9	Kandungan vitamin E (tokoferol- α), zat besi, total flavonoid, dan total karotenoid pada sampel produk EVOO	64
10	Identifikasi sifat kimia sampel produk madu	72
11	Kandungan fruktosa, glukosa, dan sukrosa pada sampel produk madu	73
12	Kandungan zat gizi makro pada sampel produk madu	73
13	Kandungan mineral (Cu, Zn, Fe, Se) pada sampel produk madu	74
14	Kandungan total flavonoid dan total karotenoid pada sampel produk madu	74
15	Jumlah sampel tiap pengamatan makrofag	79
16	Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap aktivitas makrofag pada tikus	81
17	Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap kapasitas makrofag pada tikus	82
18	Jumlah sampel tiap pengamatan sitokin	87
19	Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap sitokin IL-12 pada tikus	90
20	Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap sitokin IL-2 pada tikus	91
21	Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap sitokin IFN- γ pada tikus	92
22	Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap panjang vili pada usus halus tikus	97
23	Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap kedalaman kriptas pada usus halus tikus	99

DAFTAR GAMBAR

1	Struktur asam oleat	7
2	Struktur Beberapa senyawa fenolik dalam EVOO	8
3	Manfaat EVOO untuk kesehatan	9
4	Manfaat EVOO berdasarkan kandungan zat gizinya	10
5	Struktur asam fenolik pada madu	14
6	Struktur flavonoid dalam madu	15

7	Hubungan zat bioaktif pada madu dan manfaat madu	16
8	Respon imun spesifik	21
9	Pengenalan antigen pada sel B dan sel T	22
10	Sitokin pada sistem imun nonspesifik dan spesifik	24
11	Efek biologis interleukin 6 (IL-6)	25
12	Interleukin 12 (IL-12)	26
13	Interleukin 2 (IL-2)	27
14	Interferon gamma (IFN- γ)	28
15	Alur perjalanan makrofag	29
16	Proses fagositosis	30
17	Aktivasi makrofag	31
18	Presentasi antigen sel	32
19	Bagian-bagian saluran pencernaan	33
20	Sel absorpsi, sel goblet, dan kriptus lieberkhun	36
21	Mekanisme asam lemak dalam sistem imun pembentukan eocosonoid	39
22	Perhitungan konversi dosis manusia dan dosis hewan coba	44
23	Posis hewan coba (mencit) pada saat penyuntikan intraperitoneal	46
24	Dinding membran sel pada bakteri gram positif	47
25	Kerangka pemikiran	49
26	Alur penelitian	53
27	Rumus perhitungan sampel hewan coba	55

DAFTAR LAMPIRAN

1	Lampiran 1 Dokumentasi penelitian	132
2	Lampiran 2 Surat persetujuan etik penelitian	133

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Minyak zaitun ekstrak virgin (*Extra Virgin Olive Oil*) atau EVOO, salah satu makanan fungsional yang memberikan dampak pada kesehatan manusia (Salazar *et al.* 2017). Jenis minyak zaitun yang memiliki kandungan zat gizi yang terbaik untuk dikonsumsi dan memiliki fungsi kuat pada kesehatan adalah EVOO. EVOO merupakan jenis minyak zaitun yang diperoleh secara mekanik dari perasan pertama, tanpa melalui penyulingan dan pengolahan kimia. Rasa EVOO tiap merek dagang berbeda (*International Olive Council/IOC* 2017).

Diet mediterania memiliki ciri kebiasaan mengonsumsi banyak asam lemak tak jenuh, sedikit asam lemak jenuh, kacang-kacangan, buah-buahan, dan beberapa sumber alami asam lemak tak jenuh tunggal seperti zaitun dan alpukat. Kebiasaan mengonsumsi EVOO juga menjadi salah satu kebiasaan dalam diet mediterania. EVOO sering digunakan sebagai campuran dalam makanan olahan (Campos *et al.* 2013). Harvey *et al.* (2010) menyatakan mengonsumsi asam oleat dalam diet mediterania, dapat menetralkan dampak negatif asam lemak jenuh pada sel endotel. Sameh *et al.* (2018) menyatakan EVOO bagian dari diet mediterania yang memberikan manfaat untuk kesehatan jantung, pencegahan kanker, modifikasi respon imun, dan inflamasi.

Cicerale *et al.* (2010) menyatakan EVOO bersifat kardioprotektif, hipotensi, antihiperlipidemia, antimikroba, dan antiinflamasi. EVOO, sebagai minyak nabati yang mengandung asam lemak tak jenuh tunggal yang tinggi, terutama asam oleat, dimana asam oleat pada EVOO, memiliki peran penting pada kesehatan (Pravst 2014). Agrawal *et al.* (2017) menyatakan bahwa reaksi oksigen dan asam lemak membentuk senyawa baru, bernama *oxylipins*. *Oxylipins* merupakan hasil dari oksidasi asam lemak dari turunan asam palmitat (C16), asam stearat (C18), asam arakidonat (C20), asam behenat (C22), dan memiliki kemampuan imunitas.

Selain asam lemak, kandungan EVOO yang juga berkaitan dengan kesehatan yaitu senyawa fenolik (Caro *et al.* 2006; Dinnella *et al.* 2012; Borges *et al.* 2017; Agrawal *et al.* 2017). Menurut Borges *et al.* (2017) bahwa kandungan senyawa utama fenolik di EVOO yang teridentifikasi terdiri dari flavonoid (apigenin, luteolin), asam fenolik (naringenin, asam p-koumarat, asam vanilla) dan alkohol fenolik (*hydroxytyrosol*). Fenolik dalam EVOO memiliki kemampuan perlindungan mukosa/lendir pada lambung, perlindungan pada hati, anti-inflamasi dan anti-neoplasma, aktivitas antimikroba dan efek biokimia pada peningkatan kerja enzim dan hormon (Narayana *et al.* 2001). Agrawal *et al.* (2017) menyatakan EVOO memiliki kandungan *oleocanthal* dan *tyrosol*, dimana *oleocanthal* merupakan antioksidan yang terkandung dalam EVOO, yang juga bersifat antiinflamasi. Borges *et al.* (2017) dan Sameh *et al.* (2018) menyatakan kandungan minor zat gizi lainnya pada EVOO seperti *tocopherol*, *squalene*, dan *Coenzyme Q10* (CoQ10) juga berkaitan dengan kesehatan.

EVOO juga memiliki peran pada kesehatan pencernaan antara lain sebagai antimikroba, meningkatkan penyerapan sari makanan, dan metabolisme dalam organ pencernaan. Medina *et al.* (2007) menyatakan EVOO memiliki kemampuan antibakteri yang kuat pada spektrum yang mikroorganisme yang luas. Senyawa fenolik dalam EVOO mampu menghambat kerja bakteri di usus seperti *Clostridium*

dan *E.Coli*. Dinnela *et al.* (2012) menyatakan penelitian *in vitro*, aktivitas antioksidan fenol EVOO, mereproduksi cairan lambung selama proses pencernaan, sehingga terjadi perubahan fisikokimia di lambung dan usus halus. Menurut Bintari dan Nugraheni (2012) adanya kenaikan berat badan pada tikus setelah diberi perlakuan EVOO, dimana pemberian EVOO 0,5 g (naik 8,86 g), pemberian 0,7 g (naik 8,43 g), pemberian 0,9 g (naik 7,85 g) dibandingkan sebelum diberi perlakuan. Hal ini menunjukkan kemungkinan besar disebabkan adanya peningkatan metabolisme dalam pencernaan setelah diberi perlakuan EVOO.

Madu sering digunakan oleh masyarakat sebagai suplemen untuk mencegah penyakit, meningkatkan daya tahan tubuh, meningkatkan kesehatan pencernaan, memelihara dan memulihkan kesehatan (Samarghandian *et al.* 2017). Selain itu, madu juga merupakan produk alam dengan nilai gizi yang sangat tinggi yang berkontribusi pada status gizi manusia (Manyi-Loh *et al.* 2011). Oskouei *et al.* (2012) menyatakan selain sebagai suplemen makanan bergizi, madu juga digunakan dalam pengobatan tradisional maupun modern.

Madu memiliki kandungan karbohidrat tinggi. Madu mengandung karbohidrat 80% dalam bentuk fruktosa dan dekstrosa, sisanya dalam bentuk disakarida, polisakarida, oligasakarida. Beberapa enzim seperti enzim bersifat protektif, fosfatase, glikosa oksidase, amilase, katalase, diastase, invertase, dan peroksidase, ditemukan pada madu, dimana enzim-enzim tersebut berkaitan dengan peningkatan status imun dan kesehatan pencernaan (O'sullivan *et al.* 2013; Kivrak *et al.* 2017). Cortez *et al.* (2013) menyatakan madu memiliki kandungan gula yang tinggi, asam organik, asam amino, vitamin dan mineral yang berguna untuk kesehatan tubuh.

Ustadi *et al.* (2017) menyatakan rerata kadar fenolik madu Kaliandra (557,93 mg GAE/100 g), madu Karet (385,63 mg GAE/100 mg), madu Randu (309,12 mg GAE/100 mg). Rerata kadar flavonoid madu Kaliandra (156,27 mg QE/100 g), madu Karet (63,4 mg QE/100 g), madu Randu (47,25 mg QE/100 g). Rerata aktivitas antioksidan (IC₅₀) madu Kaliandra (3.36 mg/mL), madu Karet (15,08 mg/mL), madu Randu (16,83 mg/mL). Sumarlin *et al.* (2014) menyatakan bahwa madu lokal memiliki potensi sebagai antioksidan. Madu memiliki senyawa asam kafeat, ester fenil asam kafeat, krisin, galangin, kuersetin, kaempferol, akasetin, pinosembrian, pinobanksin, dan apigenin yang berfungsi sebagai antioksidan. Uji antioksidan menemukan madu dari Bali dan dari Papua memiliki antioksidan lebih tinggi.

Sistem imun terbagi menjadi sistem imun non spesifik dan spesifik. Peningkatan status imun non spesifik akan terlihat adanya peningkatan aktivitas dan kapasitas fagosit makrofag. Beberapa sitokin merupakan bagian dari sistem imun spesifik (Guyton 2012; Harti 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014). Beberapa penelitian menyatakan kandungan zat dalam EVOO dan madu memiliki kemampuan antiinflamasi dan antibakteri serta mampu mengaktifkan komponen status imun baik non spesifik maupun spesifik. Hasil beberapa penelitian juga sudah membuktikan kemampuan EVOO dan madu dalam meningkatkan kesehatan pencernaan dan penyerapan zat gizi.

Penelitian sinergi EVOO dan madu masih sedikit dilakukan. Penelitian Suminar *et al.* (2014) merupakan penelitian yang membuktikan adanya sinergi pemberian EVOO dengan madu dalam menurunkan kadar *Low-density lipoprotein* (LDL) darah tikus dibandingkan pemberian tunggal EVOO atau madu. Hendrasyah

et al. (2014) membuktikan dalam penelitiannya, campuran EVOO dan madu lebih tinggi meningkatkan kadar HDL dalam darah daripada pemberian tunggal EVOO atau madu.

Penelitian yang memberikan bukti ilmiah kemampuan EVOO dan madu pada peningkatan sistem imun dan kesehatan pencernaan belum pernah dilakukan terutama pada kemampuan makrofag, sitokin dan kesehatan usus halus. Penelitian ini akan membuktikan dan menganalisis pengaruh Campuran EVOO+madu terhadap sistem imun dan kesehatan pencernaan. Pembuktian ilmiah perlu dilakukan untuk memberikan informasi dan bukti bahwa produk EVOO dan madu di supermarket masih memiliki kemampuan meningkatkan sistem imun dan mendukung kesehatan pencernaan, serta adanya daya ungkit yang sinergi terhadap status imun dan kesehatan pencernaan, jika pemberian EVOO dicampur dengan madu.

1.2 Rumusan Masalah

Sistem imun dan kesehatan pencernaan merupakan bagian penting yang berkaitan dengan kesehatan secara keseluruhan. EVOO dan madu sudah menjadi salah satu suplemen atau makanan fungsional yang sering dikonsumsi masyarakat. Khasiat EVOO dan Madu dalam meningkatkan 3ebara imun dan pencernaan sudah dibuktikan oleh 3 eberapa penelitian terdahulu, namun pengaruh campuran EVOO+madu terhadap 3 ebara imun dan kesehatan pencernaan masih perlu pembuktian secara ilmiah. Berdasarkan hal diatas, maka pertanyaan penelitian sebagai berikut :

1. Bagaimana sifat kimiawi dan kandungan zat gizi serta zat bioaktif pada sampel produk EVOO dan madu.
2. Apakah ada pengaruh pemberian EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu terhadap 3eberapa sitokin seperti interleukin 12 (IL-12), interleukin 2 (IL-2), interferon gamma (IFN- γ) pada tikus.
3. Apakah ada pengaruh pemberian EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu terhadap aktivitas dan kapasitas makrofag pada tikus.
4. Apakah ada pengaruh pemberian EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu terhadap panjang vili dan kedalaman kript pada tikus.

1.3 Tujuan

Tujuan umum penelitian ini adalah mempelajari pengaruh campuran EVOO+madu terhadap status imun dan kesehatan pencernaan. Penelitian ini memiliki 3eberapa tujuan khusus, yaitu :

1. Mengidentifikasi sifat kimiawi, kandungan zat gizi, dan zat bioaktif pada sampel produk EVOO.
2. Mengidentifikasi sifat kimiawi, kandungan zat gizi, dan zat bioaktif pada sampel produk madu.
3. Menganalisis pengaruh bahan perlakuan (EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu) terhadap aktivitas dan kapasitas makrofag pada tikus.
4. Menganalisis pengaruh bahan perlakuan (EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu) terhadap IL-12, IL-2, dan IFN- γ pada tikus.

5. Menganalisis pengaruh bahan perlakuan (EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu) terhadap panjang vili dan kedalaman kriptas (usus halus) pada tikus.

1.4 Manfaat

Manfaat utama yakni memberikan bukti ilmiah bahwa campuran EVOO+madu dapat meningkatkan status imun dan kesehatan pencernaan. Penelitian ini memberikan informasi tentang pengaruh campuran EVOO+madu dalam meningkatkan aktivitas dan kapasitas makrofag serta kerja beberapa sitokin, hal ini merupakan gambaran status imun. Penelitian ini juga memberikan informasi tentang kesehatan pencernaan yang dilihat dari panjang vili dan kedalaman kriptas setelah pemberian campuran EVOO+madu. Campuran EVOO+madu daya tahan tubuh dan kesehatan pencernaan. Pemanfaatan campuran EVOO+madu dalam kesehatan akan berdampak penurunan penyakit menular dan tidak menular di masyarakat terutama kesehatan pencernaan. Penelitian ini juga diharapkan akan memberikan gambaran adanya sinergis dalam campuran EVOO+madu untuk peningkatan imun dan kesehatan pencernaan.

1.5 Ruang Lingkup

Perlakuan yang diberikan pada hewan coba (tikus) adalah pemberian EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu. Penelitian ini menganalisis status imun melalui kerja makrofag dan sitokin setelah pemberian EVOO, madu dan campuran EVOO+madu, sedangkan analisis kesehatan pencernaan melalui gambaran panjang vili dan kedalaman kriptas. Variabel yang diamati adalah aktivitas makrofag, kapasitas makrofag, IL-12, IL-2, IFN- γ , panjang vili, dan kedalaman kriptas.

1.6 Kebaruan (*novelty*)

Penelitian ini merupakan penelitian yang memiliki *novelty* pada pembuktian dampak positif yang dihasilkan dari pemberian campuran EVOO+madu terhadap kerja fagosit oleh makrofag (aktivitas dan kapasitas makrofag), kerja sistem sitokin IL-12, IL-2, IFN- γ , daripada pemberian tunggal EVOO atau madu saja. Penelitian ini juga membuktikan campuran EVOO+madu dapat meningkatkan kesehatan pencernaan, yang dilihat dari panjang vili dan kedalaman kriptas usus halus. Keterbaruan yang lain, penelitian ini membuktikan dampak positif dari pemberian campuran EVOO+madu atau EVOO atau madu, dipengaruhi juga oleh lamanya waktu pemberian perlakuan. Dampak positif pemberian campuran EVOO+madu daripada pemberian tunggal EVOO atau madu, membuktikan adanya sinergi kandungan EVOO dan madu pada sistem imun dan kesehatan pencernaan.

1.7 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini sebagai berikut :

1. Ada perbedaan aktivitas dan kapasitas makrofag pada tikus yang diberikan EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu.
2. Ada perbedaan kadar sitokin (IL-12, IL-2, IFN- γ) pada tikus yang diberikan EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu.
3. Ada perbedaan panjang vili dan kedalaman kriptas pada tikus yang diberikan EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu.

II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 EVOO

2.1.1 EVOO dan Sifat Fisikokimia

EVOO menurut *Internasional Olive Council* dan *International Food Standar* adalah minyak yang diperoleh dari proses penggilingan buah zaitun pertama atau perasan pertama cara mekanis atau fisik lainnya dalam kondisi termal, dengan keasaman tidak lebih dari 0.8 gram per 100 gram, tidak mengalami perlakuan kimiawi. EVOO diperoleh dari buah zaitun yang sehat, dan diproses sesaat setelah panen, memiliki nilai keasaman bebas yang sangat rendah. Keasaman bebas dengan cepat meningkat dengan adanya jamur dan mikroorganisme (Peri 2014). Cara mekanis yang tidak menyebabkan perubahan pada EVOO, dimana belum menjalani perlakuan selain pencucian, penuangan, sentrifugasi dan filtrasi (WHO and FAO 2015). Wilayah yang paling banyak memproduksi EVOO adalah Spanyol (40%), kemudian Itali (21%), Yunani (13%), Tunisia (5,9%), Syria (4,8%), Turki (4,6%), Morocco (3,2%), Portugis (1,6%), dan lainnya 5,9 % (Aparicio dan Harwood 2013).

Vossen (2007) menyatakan produk EVOO yang memiliki kandungan polifenol terbanyak antara lain berasal dari Bosana (Itali), Coratina (Itali), Cornicabra (Spanyol), Chemlali (Tunisia), Manzanillo (Spanyol), Maurino (Itali), Mission (USA), Moraiolo (Itali), Picual (Spanyol), Picholine (Perancis). Ketaren (2012) menyatakan EVOO termasuk klasifikasi minyak *non drying oil*. Hammad (2010) menyatakan jenis minyak zaitun menurut *Internasional Council of Olive Oil* terdiri dari EVOO, minyak zaitun *virgin* (*virgin olive oil*), minyak zaitun sulingan (*refined olive oil*), minyak zaitun murni (*pure olive oil*) dan minyak ampas zaitun (*pomace olive oil*).

Roiaini *et al.* (2015) menyatakan salah satu produk EVOO Malaysia memiliki bilangan iod 94,01 $\text{gI}_2/100\text{g}$, bilangan peroksida 10,62 meq O_2/kg sampel, bilangan asam lemak bebas 0.42%. Menurut WHO dan FAO (2015), angka peroksida 20 meq O_2/kg minyak, penyerapan dalam sinar ultra violet $\text{K}270 \leq 0,22$ untuk EVOO dan penyerapan dalam sinar ultra violet $\text{K}232 \leq 0,25$ untuk EVOO, pelarut halogenasi maksimal 0,1 mg/kg, jumlah seluruh pelarut halogenasi maksimal 0,2 mg/kg, kelembaban dan bahan mudah menguap maksimal 0,2 %, kotoran yang tidak larut maksimal 0,1 %; bahan metal Fe maksimal 3 mg/kg, bahan metal tembaga/Cu maksimal 0,1 mg/kg, senyawa terpenoid/sterol dalam fraksi n-heksana/ stigmastadiena maksimal 0,15 mg/kg, jumlah asam palmitat dan asam stearat maksimal 1,5 %, masa jenis relative 0,910-0,916, indeks refraktif 1,4677-1,4705, bilangan saponifikasi(mg KOH/g minyak) 1,84-196, bilangan iod 75-94 $\text{gI}_2/100\text{g}$, *unsaponifiable* maksimal 15 g/kg. Peri (2014) menyatakan ambang jenuh air EVOO adalah 300-400 mg per kg minyak, namun jumlahnya sering mencapai jumlah yang lebih tinggi, berkisar antara 300 sampai 1200 mg per kg EVOO.

2.1.2 Kandungan EVOO beserta Fungsinya

Kandungan EVOO terbanyak adalah asam lemak. Radzikowska *et al.* (2019) menyatakan asam lemak terbagi 2 yakni asam lemak jenuh dan asam

lemak tak jenuh. Beberapa asam lemak jenuh yang berkaitan dengan respon imun yakni asam stearat, asam palmitat, asam mirastat, asam laurat. Asam stearat banyak terdapat di daging dan lemak. Asam palmitat banyak terdapat di minyak palm dan mentega. Minyak miristat banyak terdapat di kelapa dan mentega. Asam laurat banyak terdapat di inti palm dan kelapa. Asam strearat Asam lemak tak jenuh terdiri dari *monounsaturated* (MUFAs) dan *polyunsaturated* (PUFAs). Asam oleat/C18:1 banyak terdapat di zaitun dan kemiri. PUFAs terbagi 2 yakni omega 3 dan omega 6. Omega 3 terdiri dari asam linolenat- α (ALA)/C18:3, asam *eicosapentaenoic* (EPA)/C20:5, dan *docosahexaenoic* (DHA)/C22:6. Omega 6 terdiri dari asam linoleat (LA)/C18:2, asam *linolenic*- γ (GLA)/C18:3, dan asam arakidonat (AA)/C20:4. ALA banyak terdapat di kedelai dan canola. EPA banyak terdapat di ikan salmon dan minyak hati ikan kod. DHA banyak terdapat di ikan salmon, tuna, dan kerang. LA banyak terdapat di minyak *safflower* dan daging. GLA banyak di minyak nabati. AA banyak terdapat di telur dan unggas.

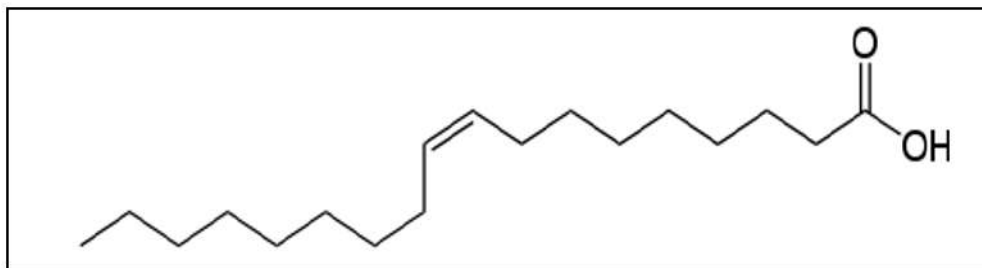
Ghanbari *et al.* (2012) menyatakan kandungan EVOO yang teridentifikasi dalam beberapa penelitian antara lain asam lemak, senyawa fenol, tokoferol, pitosterol, pigmen, senyawa aromatik, squalen, dan triterpen dialkohol. Kandungan zat gizi EVOO terbagi 2 yakni kandungan mayor dan kandungan minor. Kandungan mayor pada EVOO adalah asam lemak. Asam oleat merupakan kandungan asam lemak tak jenuh tunggal yang terbanyak pada EVOO. Dalam EVOO juga terdapat beberapa asam lemak tak jenuh ganda dan asam lemak jenuh. Kandungan senyawa minor pada EVOO terdiri dari senyawa fenol, vitamin, dan mineral. Moulodi *et al.* (2015) menyatakan kandungan mayor dan minor EVOO dipengaruhi sumber daerah, jumlah produksinya, waktu memanen, dan tingkat teknologi yang digunakan dalam memprosesnya.

WHO dan FAO (2015) menyatakan standar beberapa jumlah asam lemak dalam EVOO. EVOO mengandung asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh. Asam lemak tak jenuh tunggal terbanyak dalam EVOO adalah asam oleat (asam 9-oktadekanoat) (Tabel 1).

Tabel 1 Standar jumlah asam lemak dalam EVOO

Asam Lemak	%	Asam Lemak	%
C14:0 asam miristat	0,0-0,05	C18:1 asam oleat	55,0-83,0
C16:0 asam palmitate	7,5-20,0	C18:2 asam linoleate	3,5-21,0
C16:1 asam palmitoleat	0,3-3,5	C20:0 asam arakidat	0,0-0,6
C17:0 asam heptadekanoat	0,0-0,3	C20:1 asam cis-11-eikosenoat	0,0-0,4
C17:1 cis-10-heptadekanoat	0,0-0,3	C22:0 asam behenat	0,0-0,2
C18:0 asam stearate	0,5-5,0	C24:0 asam lignoserat	0,0-0,2

Asam oleat dalam EVOO sebanyak 65-85 % (Peri 2014). Asam oleat (C_{18:1}) merupakan asam lemak tidak jenuh memiliki satu ikatan rangkap (Winarno 2008). Asam lemak oleat memiliki bentuk rantai L, sehingga asam oleat termasuk asam dengan ikatan rangkap *cis* (Murray *et al.* 2009; Mark *et al.* 2014). (Gambar 1)



Gambar 1 Struktur asam oleat

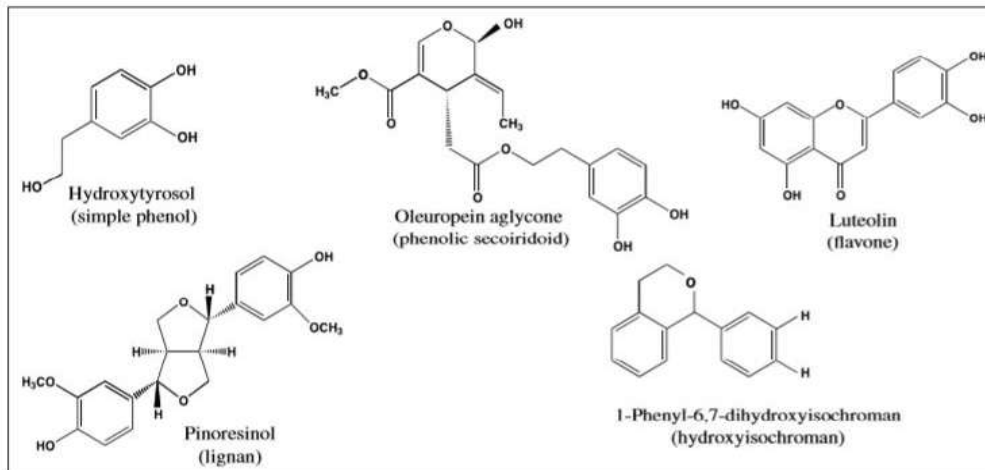
Ikatan rangkap dari asam lemak tak jenuh secara alami, sering memiliki konfigurasi *cis*. Konfigurasi *cis* berarti bahwa atom hidrogen yang terikat pada ikatan rangkap berada di sisi yang sama (FAO 2010). Adanya ikatan *cis* membatasi kemampuan asam lemak untuk dipadatkan dan dapat mempengaruhi titik lebur lemak. Mark *et al.* (2014) menemukan titik leleh yang dimiliki asam oleat, lebih rendah daripada suhu tubuh. Asam oleat juga memiliki ketahanan oksidasi dibandingkan asam lemak lainnya. Fungsi biologis asam oleat diantaranya mencegah pencetus asma, antikanker dengan memperbaiki sel dan jaringan rusak, melindungi integritas sel membran, meningkatkan kolesterol baik, menurunkan kolesterol buruk, dan menurunkan tekanan darah (Champe *et al.* 2011; Peri 2014; Mark *et al.* 2014).

de-Moraes *et al.* (2018) menyatakan asam oleat dapat meningkatkan proliferasi peroksisom yang diaktifkan reseptor (PPAR). PPAR memodulasi metabolisme, peradangan, dan Infeksi. PPAR- γ dapat meningkatkan eliminasi bakteri melalui pembentukan aktivitas neutrofil ekstraseluler. Asam oleat meningkatkan metabolisme lipid yang bekerja pada target PPAR. Harvey *et al.* (2010) menyatakan asam oleat mampu mengurangi dan menetralkan dampak negatif asam lemak jenuh yang proinflamasi dan bersifat sitotoksitas. Asupan asam oleat dalam diet mediterania dapat menghambat aktivasi endotel dengan menekan upregulasi molekul adhesi.

Dalam 100 g EVOO terdiri dari 13,8-20% lemak jenuh, 55-83 % lemak tak jenuh tunggal, omega-6 sebesar 9,7-16,4 %, omega 3 sebesar 0,76-1 % dan trigliserida 97-99% (Cicerale *et al.* 2009; Amiot 2014; Peri 2014; Sarolic *et al.* 2014; Orsavova *et al.* 2015). Pravast (2014) menyatakan dalam tubuh, asam stearat dapat dikonversikan menjadi asam oleat oleh enzim desaturase, hal ini yang menyebabkan asam oleat tidak masuk sebagai minyak esensial bagi tubuh. Asam oleat dan *oleocanthal* memiliki kemampuan menurunkan peradangan (Cicerale *et al.* 2009). Pravast (2014) menyatakan molekul asam oleat berinteraksi dengan membran plasma dan berkontribusi dalam aktivasi jalur intraseluler.

Peri (2014) menyatakan EVOO mengandung 1-3 % komponen minor yang terdiri dari campuran kompleks zat polar (*soluble*), nonpolar (*unsaponifiable*) dan amphiphilik: hidrokarbon, tokopherol, senyawa fenolik, sterol, klorofil, karotenoid, monogliserida dan digliserida, asam lemak bebas, ester dan lainnya. Jumlah senyawa fenolik dalam EVOO rerata 230 mg per-kg EVOO dengan kisaran 50-800 mg per-kg EVOO. Radzikowska *et al.* (2019) menyatakan kandungan zat bioaktif pada EVOO yakni *hydroxytyrosol*, *protocatechuic acid*, *elenolic acid*, *gallic acid*, *syringic acid*, *p-coumeric acid*,

4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, ferulic acid, cinamic acid, tyrosol, vanilic acid, homovanillic acid, oleuropein, apigenin, o-coumaric acid, demethyleuropein, ligstroside, cyanidin-3-rutinosida, rutin, apigenin-7-glucoside, luteolin, luteolin-4-glucoside, luteolin-7-glucoside, hesperidin, luteolin-7-rutinoside, quercetin, sinapic acid, 3,4 dehidroxyphenylethanololenic acid, chlorogenetic acid, deacetoxyoleuropein, nuzhenide, dan verbascoside. Dapat dilihat pada Gambar 2.



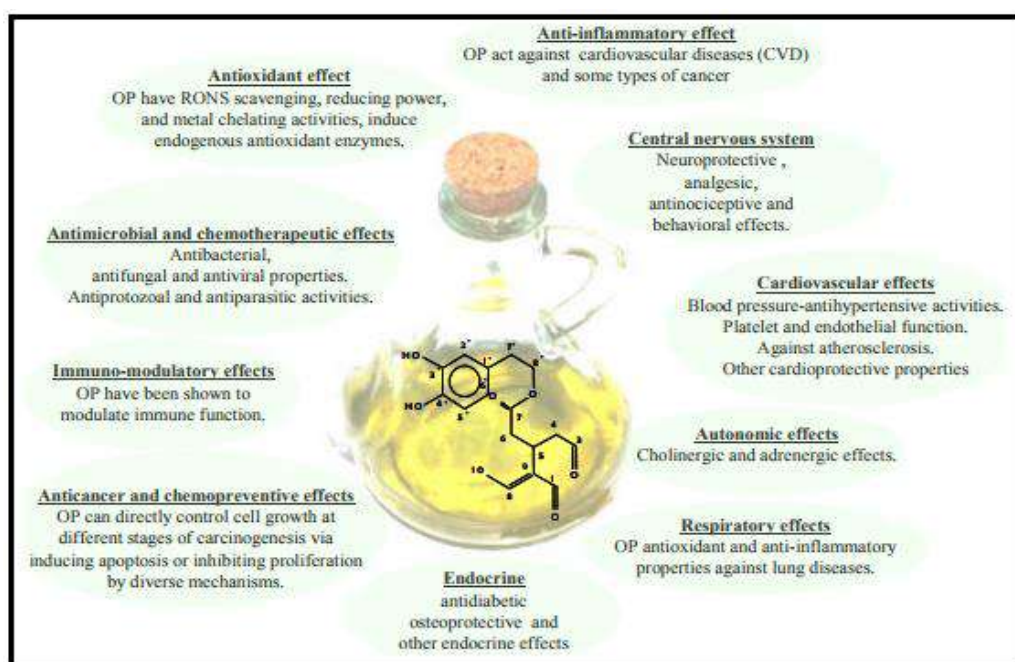
Gambar 2 Struktur beberapa senyawa fenolik dalam EVOO

Peri (2014) menyatakan EVOO mengandung 1-3 % komponen minor yang terdiri dari campuran kompleks zat polar (*soluble*), nonpolar (*unsaponifiable*) dan amphiphilik: hidrokarbon, tokopherol, senyawa fenolik, sterol, klorofil, karotenoid, monogliserida dan digliserida, asam lemak bebas, ester dan lainnya. Jumlah senyawa fenolik dalam EVOO rerata 230 mg per-kg EVOO dengan kisaran 50-800 mg per-kg EVOO. Radzikowska *et al.* (2019) menyatakan kandungan zat bioaktif pada EVOO yakni *hydroxytyrosol*, *protocatechuic acid*, *elenolic acid*, *gallic acid*, *syringic acid*, *p-coumeric acid*, *4-hydroxybenzoic acid*, *caffeic acid*, *ferulic acid*, *cinamic acid*, *tyrosol*, *vanilic acid*, *homovanillic acid*, *oleuropein*, *apigenin*, *o-coumaric acid*, *demethyleuropein*, *ligstroside*, *cyanidin-3-rutinosida*, *rutin*, *apigenin-7-glucoside*, *luteolin*, *luteolin-4-glucoside*, *luteolin-7-glucoside*, *hesperidin*, *luteolin-7-rutinoside*, *quercetin*, *sinapic acid*, *3,4 dehidroxyphenylethanololenic acid*, *chlorogenetic acid*, *deacetoxyoleuropein*, *nuzhenide*, dan *verbascoside*. Dapat dilihat pada Gambar 2.

Manfaat flavonoid dalam EVOO antara lain untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektifitas vitamin C, dan antiinflamasi. Dalam EVOO, ada senyawa organik bernama *squalene* yang berkaitan dengan sistem imun walaupun dalam bentuk minor berkisar 0,7%. *Squalene* merupakan hidrokarbon utama dalam EVOO. *Squalene* juga diduga memiliki kemampuan anti neoplasia pada usus besar, payudara dan prostat, perlindungan kanker kulit, sebagai *scavenger*, dan menghambat lipoperoksida. Kandungan tokoferol dalam EVOO berfungsi sebagai antioksidan alami. Jenis tokoferol dalam

EVOO sangat lengkap (α , β , γ , δ). Salah satu mineral dalam EVOO yakni potassium, yang berkontribusi menjaga kenormalan tekanan darah, terlibat proses pengolahan energi tubuh, dan mendukung pengeluaran sodium. Nidhi *et al.* (2013) menyatakan manfaat EVOO untuk pencernaan salah satunya dengan meningkatkan penyerapan sari-sari makanan. Hasil penelitiannya menemukan penyerapan lutein di usus lebih tinggi setelah pemberian EVOO dibandingkan minyak yang lain.

Kandungan antioksidan dalam EVOO mengurangi dampak radikal bebas yang merusak DNA dan protein pada sel. yang memiliki kemampuan meningkatkan kekebalan tubuh, *antineoplastic* pada kanker usus, payudara dan prostat. EVOO mengandung 200 - 700 mg *squalene* per 100 g minyak. Ada hidrokarbon lainnya seperti β -karoten dalam jumlah kecil. Kandungan tokoferol dalam EVOO, bekerja sebagai antioksidan, dengan mencegah radikal bebas dan mencegah reaksi peningkatan LDL akibat oksidasi. EVOO mengandung 150 sampai 250 mg / kg *α -tocopherol*. Serolic *et al.* (2014) menemukan EVOO mengandung tokoperol jenis α -T, β -T, δ -T, γ -T, α -T3, dan γ -T3. Total tokopherol dan tokotrienol berkisar 100 s/d 270 mg/kg. Dimana wilayah memberikan perbedaan kandungan tokoferol. Cunha *et al.* (2006) Kandungan fitosterol EVOO bervariasi dari 100 sampai 250 mg / 100 g minyak, dimana 90- 95% adalah β -sitosterol. Adanya 75% vitamin K dan 72% vitamin E dalam 100 gram EVOO.



Gambar 3 Manfaat EVOO untuk kesehatan

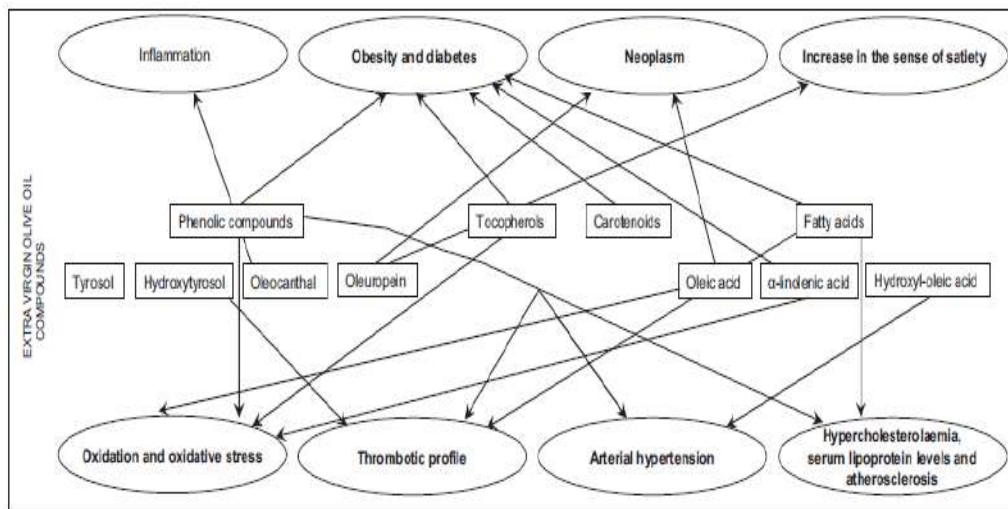
Servili *et al.* (2014) menyatakan senyawa fenolik yang paling penting adalah 5-hydroxytyrosol dan esternya *oleuropein*. Adanya rasa pahit dan getir menjadi ciri dari *oleuropein* yang mengandung antioksidan tinggi. *Oleuropein* dan *hydroxytyrosol*, memiliki aktivitas antioksidan yang kuat yang terkait dengan antiinflamasi. Beberapa senyawa fenolik juga terkandung dalam EVOO dalam jumlah yang rendah, seperti asam *caffeic*, *vanillic acid*, dan *ferulic acid*. Senyawa fenolik EVOO berfungsi antara lain sebagai

antiinflamasi, antioksidan, antimikroba, antikanker, meningkatkan kerja sistem saraf pusat, sistem kardiovaskular, sistem endokrin, sistem pernafasan, dan memodulasi imun, seperti terlihat pada gambar 3.

Virruso *et al.* (2014) menyatakan zat nutrasetikal utama EVOO yakni berbagai senyawa fenolik, seperti *oleocanthal*, *oleuropein*, *hydroxytyrosol*, dan *tyrosol*. Mekanisme EVOO sebagai zat nutrasetikal diwakili oleh kerja *hydroxytyrosol* dan *oleocanthal* menghambat siklooksigenase (COX-1 & COX-2) yang bertanggung jawab untuk produksi prostaglandin. *Oleuropein* adalah pemulung radikal yang menghambat oksidasi lipoprotein densitas rendah.

Servili *et al.* (2014) menyatakan polifenol EVOO memiliki kemampuan untuk memodulasi fungsi imun. Peran *hydroxytyrosol* dalam kandungan EVOO sebagai bioaktif dalam kemampuan meningkatkan daya kekebalan tubuh. Adanya sifat anti-inflamasi pada EVOO telah dikaitkan sebagian untuk senyawa minor seperti tirosol, *squalene* atau β -sitosterol. Peradangan merupakan respon biologis yang kompleks yaitu diatur oleh sejumlah besar mediator inflamasi dilepaskan dari sel-sel seperti makrofag, limfosit, leukosit, dan sel mast.

Pencegahan dan pengobatan beberapa penyakit dikaitkan dengan kandungan beberapa zat gizi dalam EVOO. Hal ini yang menjadi alasan EVOO termasuk makanan fungsional. Zat gizi dalam EVOO berbentuk antioksidan, asam lemak essensial, asam lemak jenuh yang rendah, asam lemak tak jenuh tunggal yang tinggi (Sarolic *et al.* 2014).



Gambar 4 Manfaat EVOO berdasarkan kandungan zat gizinya.

Caramia *et al.* (2012) menyatakan beberapa zat bioaktif pada EVOO seperti senyawa phenol, berkaitan dengan penurunan oksidasi dan stress oksidasi, antiinflamasi, dan profil trombosit. EVOO memiliki kemampuan antiinflamasi, yang didukung zat bioaktif EVOO *oleocanthal*. Asam oleat berkaitan menurunkan oksidasi dan stres oksidatif. EVOO mengurangi produksi radikal bebas dan mencegah kerusakan pada membran sel, mitokondria, dan DNA. (Gambar 4)

2.2 Madu

2.2.1 Madu dan Sifat Fisikokimia

Rababah *et al.* (2014) menyatakan madu adalah produk alami yang dihasilkan dari nektar tanaman berbunga yang dikumpulkan dan diproses oleh kumpulan lebah madu. Suranto (2007) menyatakan proses terbentuknya madu berasal dari cairan nektar dari bagian selain bunga atau cairan nektar, mengalami peragian. Kelenjar nektarifer menghasilkan nektar, sebagai larutan gula, namun konsentrasi yang dihasilkan beragam. Konsentrasi nektar dipengaruhi oleh kelembaban udara, tanah, jenis tanaman. Proses invertase terjadi dimana cairan manis nektar dirubah menjadi gula. Proses invertase menggunakan enzim sukrase dan enzim sakharase. Dalam nektar, terdapat enzim sakharase dan sukrase, kedua enzim ini juga ada di air liur lebah. Enzim tersebut mengubah nektar menjadi madu. Proses selanjutnya, dengan pengurangan kadar air dalam nektar yang telah mengalami invertase. Pengurangan kadar air dengan penguapan alami dan pengipasan sayap lebah, setelah kadar air berkurang, lebah menutup dengan lapisan malam. Chakir *et al.* (2016) menyatakan beberapa madu asal Maroko memiliki rerata, kadar air berkisar (17,14%), pH (4,13), kadar asam bebas (19,69 meq/kg), lakton (8,07 meq/kg), total asam (27,64 meq/kg), HMF (13,4 mg/kg), diastase (11,91 °Gothé), fruktosa (40,32%), glukosa (30,77), dan sukrosa (1,05%).

Di Indonesia, madu lebih banyak berasal dari jenis lebah *Apis dorsata* (Sumatera, Jawa, Kalimantan, Sulawesi, Nusa Tenggara), *Apis cerana* (dataran tinggi Sumatera Tengah), *Apis cerana* (perkebunan kelapa Jawa), *Apis andreniformis* (Sumatera, Jawa, Kalimantan, Nusa Tenggara), *Apis koschevnikovi* (Kalimantan dan Sumatera), *Apis nuluensis* (Dataran tinggi Sarawak, Kalimantan), *Apis nigrocincta* (Sulawesi, Kalimantan, Mindanao), dan Lebah genus *Meliponini* di hutan Indonesia, serta lebah genus *Trigona* yang bersifat asam dan memiliki kelebihan tahan fregmentasi. *Apis mellifera* dikenal dengan lebah eropa, sering digunakan sebagai lebah ternak. Lebah hutan yang dikenal *Apis dorsata* (Hadisoesilo 2001).

Pemeriksaan sifat fisikokimia madu antara lain warna, pH, aktivitas air (a_w), nilai konduktivitas listrik, rotasi optik, dan viskositas, kepadatan (densitas), higroskopis, tegangan permukaan, suhu, warna, aroma, rasa, kristalisasi, dan memutar optik. Rata-rata madu yang memiliki nilai konduktivitas listrik diatas 0,024 mS/cm, nilai pH berkisar 3,42-6,01, nilai a_w berkisar 0,55-0,75, Rotasi optik memberi gambaran konsentrasi jenis gula dalam madu. Angka viskositas madu menurut SNI 10 poise (Apriani *et al.* 2013).

Warna madu ditentukan oleh jenis tanaman penghasil nektar, usia madu, kandungan mineral, dan lama penyimpanan (Apriani *et al.* 2013; Wibowo *et al.* 2016; Adalina 2017; Kivrak *et al.* 2017). Warna madu diukur dengan satuan nilai intensitas yaitu mm *pfund*. Adalina (2017) menyatakan warna madu tidak menentukan kualitas madu. Madu hutan asal kabupaten Bima memiliki nilai intensitas warna 39 mmpfund.

Nilai pH madu menunjukkan tingkat keasaman. Semakin tinggi tingkat keasaman madu maka pH semakin kecil. Nilai pH ditentukan juga oleh asam organik (asam format, asam asetat, asam sitrat, asam laktat, asam butirat, asam

oksalat, dan asam suksinat) yang ada pada madu. Kivrak *et al.* (2017) menyatakan pH madu dipengaruhi oleh proses, tekstur, stabilitas, dan umur simpan. Ditemukan jamur dan ragi pada madu asal Turki, ketika pH asam. Madu asal Turki memiliki pH berkisar 3,33-5,54, tidak berbeda jauh dengan madu asal Maroko dengan pH berkisar 3,52-5,13 (Chakir *et al.* 2011). Adalina (2017) menyatakan madu hutan asal kabupaten Bima memiliki nilai pH 4,2. Jika pH madu yang rendah akan mencegah adanya pertumbuhan bakteri. Tingkat keasaman madu hutan asal kabupaten Bima 6,73 meq/kg, dan Apriani *et al.* (2013) menyatakan pH madu Sumatera Barat berkisar 3,42—6,01.

Hydroxymethylfurfural (HMF) memiliki satuan mg/kg. HMF merupakan parameter kesegaran madu. HMF juga merupakan indikator kerusakan madu saat proses penyaringan. Kandungan HMF pada madu Turki berkisar 0,58 – 4,25 mg/kg, sedangkan madu Meksiko berkisar 9,39-18,35 mg/kg dan madu Maroko berkisar 0,09-53,38 mg/kg (Chakir *et al.* 2011; Cortez *et al.* 2013; Kivrak *et al.* 2017). Semakin kecil angka HMF semakin baik. Asosiasi madu di Eropa menetapkan standar HMF dibawah 40 mg/kg.

Kadar air madu dipengaruhi oleh iklim, dan penanganan paska panen (Gairola *et al.* 2013). Kadar air madu hutan asal kabupaten Bima 26%. Kandungan air pada madu diukur dengan alat *hydrometer* yang dibantu dengan *thermometer*. Alat lain untuk pengukuran air pada madu yaitu *refractometer*

Kandungan senyawa dalam madu dipengaruhi oleh asal nektar, iklim, dan cara pengolahan madu. Standar madu berdasarkan SNI tahun 2013 memiliki perubahan pada kandungan gula pereduksi menjadi minimal 65%b/b, sedangkan standar lainnya masih sama dengan SNI 2004 (Tabel 2).

Tabel 2 Standar Madu Berdasarkan SNI 01-3543-2013

Jenis Uji	Satuan	Persyaratan
Aktivitas enzim diastase, min.	DN	3
Hidroksimetilfurfural (HMF), maks.	mg/kg	50
Air, maks.	% b/b	22
Gula pereduksi, min.	% b/b	65
Sukrosa, maks.	% b/b	5
Keasaman, maks.	ml NaOH 1 N/kg	50
Padatan yang tak larut dalam air, maks.	% b/b	0,5
Abu, maks.	% b/b	0,5
Cemaran logam		
Timbal (Pb), maks.	mg/kg	1,0
Tembaga (Cu), maks.	mg/kg	5,0
Cemaran arsen (As), maks.	mg/kg	0,5

2.2.2 Kandungan Madu beserta Fungsinya

Madu adalah larutan kental yang mengandung berbagai molekul, termasuk fruktosa dan glukosa (80-85%), air (15-17%), abu (0,2%), protein dan asam amino (0,1-0,4%), dan jumlah enzim, vitamin, dan zat lainnya, seperti senyawa fenolik (Rao *et al.* 2016). Komposisi madu paling dominan adalah karbohidrat. Glukosa dan fruktosa merupakan komponen utama madu.

Kedua monosakarida tersebut dikenal dengan gula pereduksi. Monosakarida yang paling dominan adalah fruktosa dan glukosa. Monosakarida sekitar 75 % pada madu (da Silva *et al.* 2016; Miguel *et al.* 2017). Kandungan disakarida dan trisakarida berkisar 10-15 % dari karbohidrat madu. Madu juga mengandung maltose dan sukrosa (Ratnayani *et al.* 2008). Kandungan gula pada madu akan mengalami perubahan jika disimpan terlalu lama. Adalina (2017) menyatakan komposisi kimia madu hutan kabupaten Bima mengandung glukosa 27,11%, fruktosa 40,73%, sukrosa 0,61% dengan total gula 68,45%. Selain itu madu juga mengandung asam amino, protein, enzim, asam organik, vitamin, mineral, zat volatil, dan polifenol. Proline merupakan jenis protein paling banyak pada madu. Protein lain berbentuk enzim (diastase atau amilase, invertase atau sukrase atau α -glukosidase). Glukonat merupakan asam organik terbanyak di madu.

Tabel 3 Rerata komposisi madu di Indonesia

Kandungan	Rerata	Kisaran	SD
Fruktosa/Glukosa	1,23	0,76-1,86	0,128
Fruktosa, %	38,38	30,91-44,26	1,77
Glukosa, %	30,31	22,89-44,26	3,04
Maltosa, % (sakarida tereduksi)	7,30	2,7-16,0	2,1
Sukrosa, %	1,31	0,25-7,57	0,87
Gula, %	83,72		
Mineral (abu), %	0,17	0,020-1,028	0,15
Asam bebas (asam glukonat)	0,43	0,13-0,92	0,16
Nitrogen	0,041	0,000-0,133	0,026
Air, %	17,2	13,4-22,9	1,5
pH	3,91	3,42-6,01	-
Total Keasaman, ,eq/kg	29,12	8,68-59,49	10,33
Protein, mg/100g	168,6	157,7-256,7	70,9

Berdasarkan SNI 2013 kandungan dalam madu berisi gula pereduksi >65% dan sukrosa < 5%). Suranto (2007) menyatakan beberapa hasil penelitian menunjukkan rerata komposisi madu di Indonesia, Kandungan tertinggi pada kadar gula sebesar 83,72 % (dapat dilihat pada Tabel 3). Oskouei *et al.* (2011) menyatakan kandungan karbohidrat sebesar 82,4 g/100g, fruktosa 38,5 g/100g, glukosa 31 g/100g, dan sukrosa 1 g/100g.

Adalina (2017) menyatakan madu mengandung vitamin: tiamin (B1), riboflavin (B2), asam nikotinat (B3), asam pantotenat (B5), piridoksin (B6), biotin (B8), asam folat (B9), dan vitamin C. Kandungan mineral dalam madu antara lain kalium, magnesium, kalsium, besi, fosfor, natrium, mangan, yodium, seng, lithium, kobalt, nikel, kadmium, tembaga, barium, kromium, selenium, arsenik, dan perak (Ajibola 2015; da Silva *et al.* 2016; Miguel *et al.* 2017). (Tabel 4).

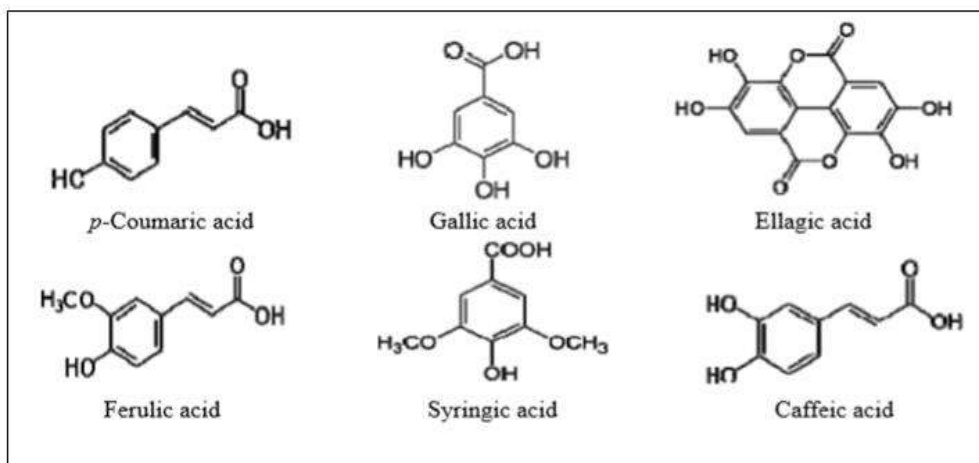
Tabel 4 Kandungan mineral pada madu (mg/100g)

Mineral	Kandungan	Mineral	Kandungan
Aluminium (Al)	0,01-2,4	Magnesium (Mg)	0,7-13
Arsenik (Ar)	0,014-0,026	Mangan (Mn)	0,02-2
Barium (Ba)	0,01-0,08	Molibdenum (Mo)	0-0,004

Tabel 4 Kandungan mineral pada madu (mg/100g)
(lanjutan)

Mineral	Kandungan	Mineral	Kandungan
Boron (B)	0,05-0,3	Nikel (Ni)	0-0,051
Bromin (Br)	0,4-1,3	Pospor (P)	2,15
Kadmium (Cd)	0-0,001	Potassium (K)	40,3500
Aluminium (Al)	0,01-2,4	Magnesium (Mg)	0,7-13
Arsenik (Ar)	0,014-0,026	Mangan (Mn)	0,02-2
Barium (Ba)	0,01-0,08	Molibdenum (Mo)	0-0,004
Boron (B)	0,05-0,3	Nikel (Ni)	0-0,051
Bromin (Br)	0,4-1,3	Pospor (P)	2,15
Kadmium (Cd)	0-0,001	Potassium (K)	40,3500
Kalsium (Ca)	3-31	Rubidium (Rb)	0,040-3,5
Klorin (Cl)	0,4-56	Selenium (Se)	0,002-0,01
Kromium (Cr)	0,01-0,3	Sodium (Na)	1,6-17
Kobal (Co)	0,1-0,35	Silikon (Si)	0,05-24
Tembaga (Cu)	0,02-0,6	Strontium (Sr)	0,04-0,35
Flour (F)	0,4-1,34	Belerang (S)	0,7-26
Iodium (I)	10-100	Vanadium (V)	0-0,013
Besi (Fe)	0,03-4	Seng (Zn)	0,5-2
Timbal (Pb)	0,001-0,03	Zirkonium (Zr)	0,05-0,8
Litium (Li)	0,225-1,56		

Madu juga mengandung polifenol dalam bentuk asam fenolat dan flavonoid. Madu memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi untuk menangkal radikal bebas (da Silva *et al.* 2016; Miguel *et al.* 2017). Uthurry *et al.* (2011) menyatakan polifenol terbagi menjadi polifenol berat molekul rendah dan polifenol berat molekul tinggi.

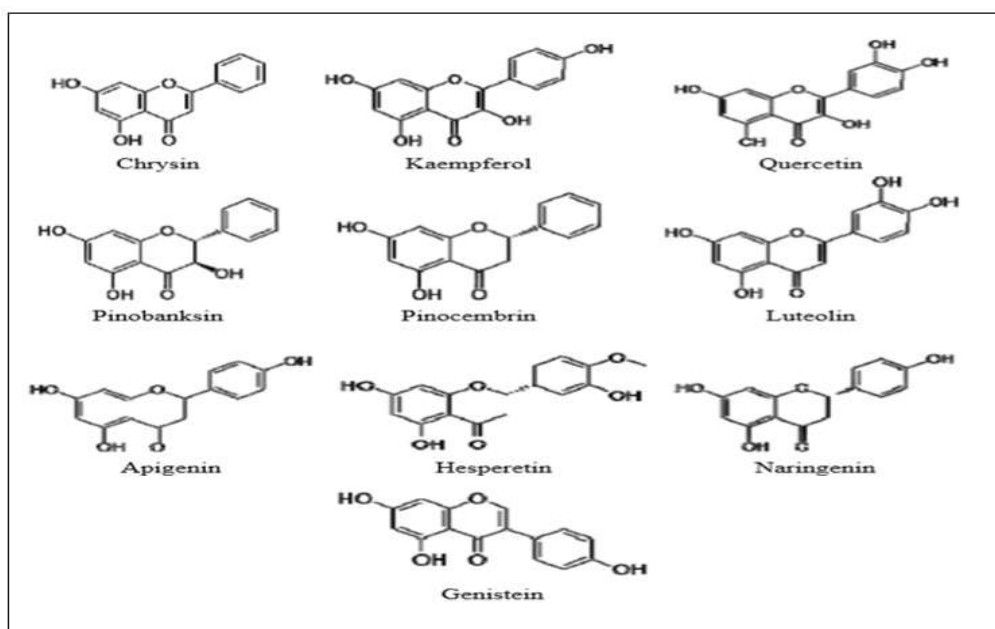


Gambar 5 Struktur asam fenolik pada madu

Afrin *et al.* (2018) menyatakan madu mampu mencegah kanker kolon dengan mengurangi proliferasi sel dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan (SOD, katalase, glutathione peroksidase dan *glutathione reductase*). Niat *et al.* (2017) menyatakan madu memiliki kemampuan regenerasi sel epitel dan regenerasi jaringan oleh komponen

imunomodulatornya. Cianciosi *et al.* (2020) menyatakan mekanisme kerja senyawa fenol mencegah kanker kolonrektal, dengan menginduksi produksi ROS intraseluler, dan menginduksi apoptosis.

Polifenol dengan berat molekul rendah yang terdiri dari fenol sederhana dan flavonoid, dan polifenol dengan berat molekul tinggi yang diwakili oleh tanin. Khasiat madu lebih banyak dipengaruhi flavonoid. Flavonoid dapat meningkatkan produksi enzim, menghambat radikal bebas, dan menstimulasi hormon. Flavonoid sebagai salah satu polifenol, yang memberikan sumbangan atom hidrogen, dimana minimal ada satu gugus hidroksil terikat ke cincin aromatik dalam molekul. Flavonoid diklasifikasikan berdasarkan tingkat oksidasi cincin C menjadi *flavon* (seperti *apigenin*, *luteolin* dan *diosmetin*), *flavonol*, (seperti *quercetin*, *myricetin* dan *kaempferol*), *flavanon* (seperti *naringenin* dan *hesperidin*), flavan-3-ols, (seperti katekin dan epikatekin), antosianidin dan glikosida (seperti malvidin, sianida dan pelargonidin).



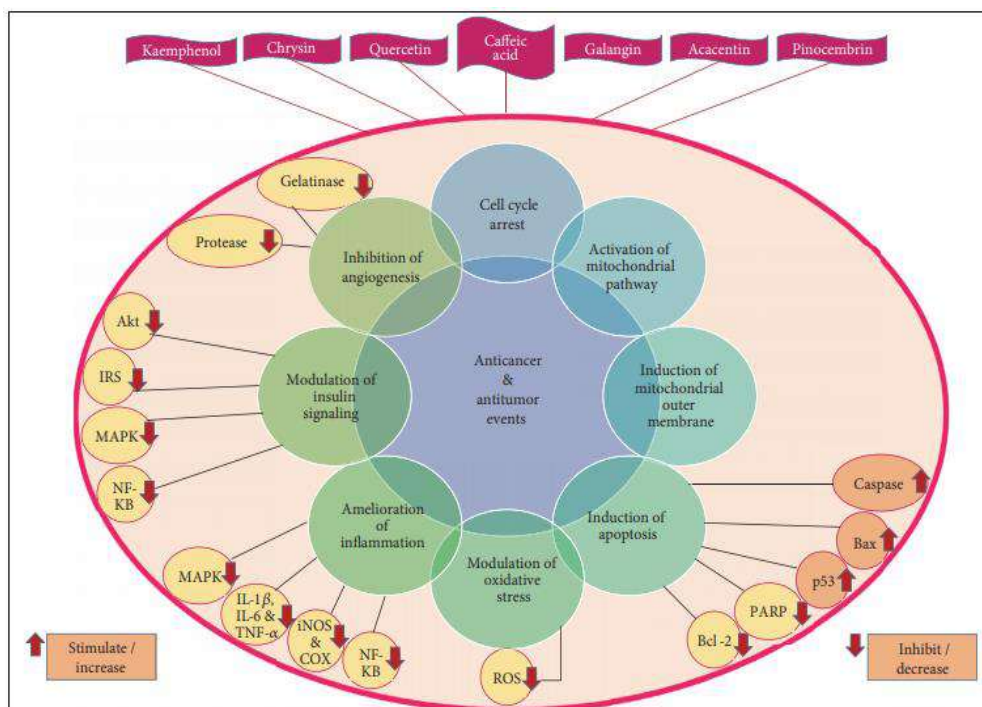
Gambar 6 Struktur flavonoid dalam madu

Erejuwa *et al.* (2014) menyatakan kandungan asam fenolik pada madu terdiri dari *p-Coumaric acid*, *gallic acid*, *ellagic acid*, *ferulic acid*, *syringic acid*, dan *caffeic acid* (Gambar 5). Kandungan flavonoid dalam madu terdiri dari *chrysin*, *kaempferol*, *quercetin*, *pinobanksin*, *pinocembrin*, *luteolin*, *apigenin*, *hesperetin*, *naringenin*, dan *genistein*. (Gambar 6)

Pasupuleti *et al.* (2017) menyatakan beberapa flavonoid seperti *kaempferol*, *chrysin*, *galangin*, *quercetin*, *caffeic acid*, *acacetin*, dan *pinocembrin* pada madu, berhubungan dengan proses induksi membran mitokondria, proses induksi apoptosis, proses mengaktifkan jalur mitokondria, dan perbaikan inflamasi. Jaganathan dan Mandal (2009) menyatakan beberapa polifenol sederhana dalam madu, yaitu, asam *caffeic*, *phenyl ester asam caffeic*, *chrysin*, *galangin*, *quercetin*, *kaempferol*, *acacetin*, *pinocembrin*, *pinobanksin*, dan *apigenin* bersifat antiproliferasi sehingga dapat mencegah kanker.

Rababah *et al.* (2014) menyatakan aktivitas kandungan flavonoid, antosianin dan antioksidan pada madu tergantung tanaman sumber nektar, dan

senyawa tersebut dapat rusak karena proses oksidasi. Madu mengandung senyawa fenolat yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Cahyati (2008) menyatakan flavonoid dalam madu dibagi menjadi 3 kelas dengan struktur yang mirip yaitu flavono, flavon, dan flavanon. Kandungan kadar fenolat total paling tinggi pada madu randu dibandingkan madu kopi, sawit, dan rambutan. Ratnayani *et al.* (2012) menyatakan madu randu dan kelengkeng yang beredar dipasaran, memiliki kandungan total senyawa fenolat 1375,89 mg GAE/kg dan 1136,49 mg GAE/kg. GAE (*gallic acid equivalent*) yaitu jumlah kesetaraan mg asam galat dalam 1 g sampel. Beberapa senyawa fenolat yang terdapat pada madu antara lain asam galat, asam sinamat, pinocembrin, krisin, dan kumarin. Machado *et al.* (2020) menyatakan senyawa volatil pada madu dapat digunakan untuk menilai kualitas madu tersebut. Madu memiliki sifat imunomodulator, salah satunya dengan menekan produksi TNF- α dan aktivasi NF-kB sehingga madu menjadi suplemen mempercepat pemulihan kesehatan. (Gambar 7)



Gambar 7 Hubungan zat bioaktif pada madu dan manfaat madu

Madu berperan penting untuk kesehatan pencernaan. Adanya enzim yang terkandung pada madu dapat meningkatkan penyerapan molekul. Kemampuan madu sebagai bakterisidal dan memiliki kandungan prebiotik yang tinggi (inulin, oligofruktosa, dan oligosakarida). Adanya peningkatan pertumbuhan *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* setelah mengonsumsi madu sebagai suplemen makanan. Adanya penurunan kejadian konstipasi dan kembung setelah mengonsumsi madu. Cholid *et al.* (2011) menyatakan madu memiliki manfaat menurunkan demam, meningkatkan nafsu makan, meningkatkan porsi dan frekuensi makan. Adanya pemendekan lama hari rawat dan menurunkan frekuensi diare hari ke 4 dan 5, pada balita yang diare dengan pemberian suplemen madu dibandingkan dengan kelompok tanpa

suplemen madu. Madu memiliki kemampuan memperbaiki kerusakan permukaan kriptas usus dan dapat menumbuhkan kuman komensal dalam usus dengan kemampuan melekat pada enterosit mukosa usus sehingga dapat menghambat kolonisasi sejumlah kuman dalam usus.

Madu bermanfaat sebagai antibakterial atau antimikroba pada kasus gastroenteritis pada balita (Cholid *et al.* 2011). Madu memiliki manfaat sebagai prebiotik, dimana adanya peningkatan bakteri baik dalam pencernaan setelah pemberian madu (Kajiwaru *et al.* 2002). Terjadi penurunan atau daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *streptococcus pyogenes*, berbanding lurus dengan meningkatnya konsentrasi madu. Konsentrasi minimal madu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri adalah 95 % (Erwiyatno *et al.* 2012).

Ajibola (2015) menyatakan madu dapat meningkatkan fungsi gastrointestinal seperti pencernaan dan penyerapan. Hal ini dibuktikan dengan adanya peningkatan berat badan dan pertumbuhan makroskopik organ pada mencit. Adanya peningkatan produksi enzimatis oleh pankreas dan fungsi pencernaan oleh mikroflora pada usus. Pada mikroskopis dibuktikan adanya peningkatan pertumbuhan vili usus. Madu juga meningkatkan populasi Bifidobakteria dan laktobasilus dalam usus, yang merupakan efek dari kandungan oligosakarida. Adanya sifat sinergi pada madu di saluran cerna. Vallianou *et al.* (2014) menyatakan adanya perkembangan morfologi usus dan mikroskopis serta pertumbuhan sel di gastrointestinal. Kekuatan sinergi ini antara fruktosa dan oligosakarida dalam madu yang meningkatkan fungsi pencernaan, sehingga meningkatkan penyerapan zat gizi dan merangsang stimulasi insulin. Adanya asam *kynurenin*, asam glukonat dalam madu dan hidrogen peroksida (hasil produksi enzim *glucose oxidase*), berkontribusi terhadap sifat antimikroba. Adanya pH yang rendah, kadar gula yang tinggi, dan kadar air yang rendah, mendukung sifat antibakteri. Madu memiliki efek penghambatan 60 macam bakteri. Beberapa hasil penelitian juga menunjukkan madu mampu memperbaiki stres oksidatif pada ginjal hewan percobaan, dengan turunnya malondialdehid.

2.3 Sistem Imun

Tubuh manusia dilengkapi dengan sederetan mekanisme pertahanan yang bekerja untuk mencegah masuk dan menyebarnya agen infeksi yang disebut sebagai sistem imun. Sistem imun diperlukan tubuh untuk mempertahankan keutuhannya terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Keberadaan dan kerja sistem imun, merupakan mekanisme yang sangat penting bagi tubuh makhluk hidup. Sistem imun merupakan pertahanan yang bekerja saat tubuh merespon benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Harti (2013) menyatakan dasar sistem imun, pengenalan tubuh terhadap benda asing (non self) atau bukan benda asing (*self*), dimana tubuh akan melakukan upaya mengeluarkan benda asing tersebut.

Optimalisasi kerja sistem imun tergantung pada beberapa faktor seperti spesies, genetik, usia, hormon, suhu, zat gizi, dan flora bakteri normal. Salah satu faktor yaitu zat gizi, asupan makanan yang masuk ke dalam tubuh akan mempengaruhi kerja sistem imun. Beberapa zat gizi dapat meningkatkan atau menurunkan sistem imun dalam tubuh. Penerimaan zat gizi pada sistem imun dalam

tubuh tiap individu tidak selalu sama dikarenakan adanya faktor genetik yang juga mempengaruhi sistem imun (Baratawidjaja dan Rengganis 2014). Sistem imun merupakan kumpulan mekanisme yang melindungi tubuh terhadap infeksi dengan cara mengidentifikasi dan membunuh substansi patogen (Sudiono 2014).

Sistem imun dapat dibagi menjadi sistem imun non spesifik dan spesifik. Respon imun diperantarai oleh berbagai sel dan molekul larut yang disekresi oleh beberapa sel dalam sistem imun. Sel-sel utama yang terlibat dalam reaksi imun adalah limfosit (sel B, sel T, dan sel NK), fagosit (neutrofil, eosinofil, monosit, dan makrofag), sel asesori (basofil, sel mast, dan trombosit), sel-sel jaringan, dan lain-lain. Bahan larut yang disekresi dapat berupa antibodi, komplemen, mediator radang, dan sitokin (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Playfair dan Chain 2015).

Respon sistem imun ketika mikroba masuk ke tubuh, sistem imun bekerja dengan 3 lapisan pertahanan. Pertahanan pertama yang akan bekerja adalah pertahanan fisik, biokimia dan humoral pada sistem imun nonspesifik. Pertahanan kedua yang akan bekerja adalah sistem imun seluler pada sistem imun non spesifik. Pertahanan ketiga yang akan bekerja adalah sistem imun spesifik (Hasdianah *et al.* 2013).

Sistem imun non spesifik, yang melindungi tubuh pertama kali dari invasi mikroorganisme melalui aktivitas makrofag atau sel imun lainnya, sedangkan imunitas spesifik yang berperan dalam pembentukan antibodi yang bersifat antiinflamasi yang berkembang lebih lambat namun lebih efektif. Sistem imun nonspesifik memiliki ciri-ciri respon cepat, tidak membutuhkan paparan sebelumnya (tidak berubah oleh infeksi), selalu siap, dan tidak ada respon memori. Sistem imun spesifik memiliki ciri-ciri respon lambat, membaik jika infeksi berulang, membutuhkan memori, membutuhkan paparan sebelumnya (Weir 1990; Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).

Cara kerja sistem imun non spesifik dan spesifik sangat berbeda, namun kedua sistem ini saling bekerjasama. Contoh adanya kerjasama antara sistem imun non spesifik dan sistem imun spesifik, dapat dilihat pada kerjasama komplemen dengan fagosit dan antibodi atau makrofag dengan sel T (Weir 1990; Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).

2.3.1 Sistem Imun Non Spesifik

Sistem imun yang nonspesifik merupakan pertahanan pertama dalam menghadapi mikroba baik yang pernah terpapar sebelumnya ataupun belum pernah. Sistem imun nonspesifik terdiri dari pertahanan fisik (kulit, selaput lendir, silia, batuk, dan bersin), pertahanan larut terdiri dari biokimia dan humoral, dan pertahanan seluler. Pertahanan biokimia terdiri dari lisozim, sekresi sebaseus, laktoferin, dan asam neuraminik. Pertahanan humoral terdiri dari komplemen, *Acute Phase Protein* (APP), mediator asal lipid, dan sitokin IL-1, IL-6, TNF- α . Pertahanan seluler meliputi fagosit mononuklear dan polimorfonuklear, sel NK, sel mast, basophil, eosinophil, dan sel dendritik (Weir 1990; Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely

2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).

Pertahanan fisik diantaranya kemampuan *barrier* epitel, pergerakan silia dan peristaltik. *Barrier* epitel merupakan *barrier* fisik yang dapat menghambat masuknya mikroba dan membantu dalam pelepasan mikroba yang menempel di permukaan epitel. Asam lemak yang dilepas kulit mempunyai efek denaturasi terhadap protein membran sel. Pergerakan silia dan peristaltik juga menjaga saluran nafas dan saluran pencernaan dari mikroba (Baratawidjaja dan Rengganis 2014). Kulit dan selaput lendir menghalangi tempat masuknya mikroba dan mengeluarkan peptida antimikroba dan enzim (Louise 2011). Pergerakan epitel paru-paru dan peristaltik saluran cerna, mendorong mikroba melintasi permukaan selaput lendir dan keluar dari tubuh (Parmely 2013).

Pertahanan biokimia, terjadi saat beberapa mikroba masuk melalui kelenjar sebaceous dan folikel rambut dihalangi oleh pH asam keringat dan sekresi sebaceous. Lisozim dan fosfolipase dalam keringat, ludah, air mata, air susu ibu dapat melindungi mikroba, dimana lisozim dapat menghancurkan lapisan peptidoglikan dinding bakteri (Baratawidjaja dan Rengganis 2014). Pertahanan biokimia lainnya antara lain cairan lambung dan mukus cairan hidung (Weir 1990; Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).

Pertahanan humoral dalam sistem imun nonspesifik menggunakan molekul larut yang diproduksi pada lokalisasi infeksi atau jauh dari tempat infeksi, Molekul yang diproduksi berbentuk peptida antimikroba (Baratawidjaja dan Rengganis 2014). Faktor humoral berperan penting dalam inflamasi dimana terjadi pengumpulan sel-sel fagosit dan terjadinya edema. Pertahanan humoral juga menggambarkan mikroba yang dapat menembus epitel dan masuk jaringan atau sirkulasi darah akan mendatangkan sel fagosit seperti protein plasma dan sistem komplemen akan menyerang mikroba yang masuk tersebut. Pertahanan humoral terdiri dari komplemen, protein fase akut, mediator asal fosfolipid, dan sitokin IL-1, IL-6, TNF- α (Weir 1990; Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).

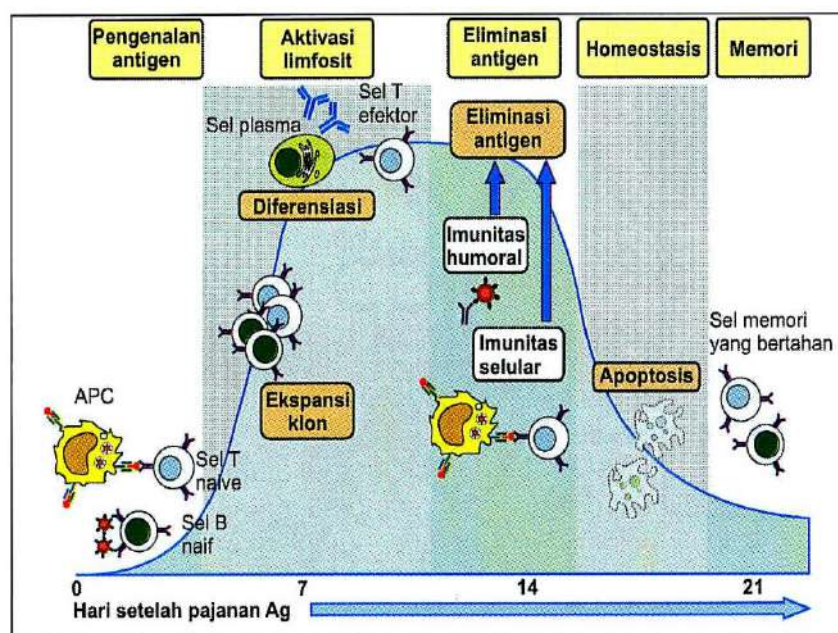
Pertahanan humoral yang bekerja dalam protein fase akut terdiri dari *C-reactive Protein (CRP)*, lektin, protein lainnya seperti haptoglobin. CRP akan mengikat mikro-organisme, protein C pneumokok menjadi kompleks, dan mengaktifkan komplemen. Sintesis CRP yang akan meningkat meningkatkan viskositas plasma dan laju endap darah. Lektin berperan mengikat manosa dalam polisakarida, mengaktifkan komplemen dan sebagai opsonin, serta Serum *amyloid* protein mengikat lipopolisakarida dinding bakteri dan berfungsi sebagai reseptor untuk fagosit. Protein fase akut bekerja dalam peningkatan laju endap darah akibat infeksi. Protein fase akut juga bekerja dengan meningkatkan resistensi pejamu, mengurangi cedera jaringan dan memperbaiki cedera inflamasi (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015). Pertahanan humoral yang bekerja dalam mediator asal fosfolipid dengan

meningkatkan respon inflamasi, Sitokin yang berada dalam pertahanan humoral merupakan sitokin proinflamasi, dimana sitokin tersebut menstimulus hati untuk bersintesis dan melepas sejumlah protein plasma (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015). Sistem imun nonspesifik juga memiliki pertahanan seluler, Pertahanan seluler melibatkan beberapa sel yaitu sel fagosit, sel *Natural Killer* (NK), sel mast, sel neutrophil, eosinophil, basophil, sel darah merah, dan trombosit. Fagositosis merupakan mekanisme pertahanan yang dilakukan oleh sel –sel fagosit, dengan jalan mencerna mikroorganisme/partikel asing. Sel fagosit dibagi menjadi 2 jenis yaitu fagosit mononuklear dan polimorfonuklear. Fagosit mononuklear yaitu monosit yang bermigrasi ke jaringan menjadi makrofag, sedangkan polimorfonuklear adalah granulosit yaitu *netrofil*, *eusofil*, *basophil*, dan *cel mast* (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).

2.3.2 Sistem Imun Spesifik

Sistem imun spesifik memiliki memori sehingga mampu memberikan perlindungan saat infeksi terjadi berulang. Sistem imun spesifik bekerja lambat, tergantung pada pajanan, dan memiliki memori yang mempengaruhi respon sistem imun spesifik. Sistem imun spesifik merupakan sistem pertahanan tubuh yang bertindak sebagai respon yang ditimbulkan karena adanya antigen tertentu yang belum pernah terpapar zat asing tersebut (Kresno 2001). Sistem imun spesifik bekerja dalam pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraselular, virus, jamur, parasit dan keganasan (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015). Sistem imun spesifik terdiri dari sistem imun spesifik humoral dan sistem imun spesifik selular. Sistem imun spesifik diperankan oleh sel limfosit yang dapat mengenali substansi asing yang masuk ke dalam tubuh. Limfosit terdiri dari limfosit B dan sel limfosit T (Somprayrac 2015). Sel T dan Sel B diproduksi di sumsum tulang. Sel T berproliferasi dan berdiferensiasi dalam kelenjar timus, sedangkan sel B di sumsum tulang (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).

Respon imun spesifik bekerja dalam beberapa tahapan yaitu pengenalan antigen, aktivasi limfosit, eliminasi antigen, homeostasis, dan memiliki memori. Setelah sel T_{native} terpajan dengan antigen yang dipresentasikan APC, sel T_{native} juga menstimulus sel B, Sel T_{native} dan sel B mengalami ekspansi dan berdiferensiasi. Sel T_{native} menjadi sel T_{efektor} . Setelah aktivasi limfosit, terjadi eliminasi mikroba melalui imunitas selular dan imunitas humoral. Kondisi homeostasis mendukung terjadinya apoptosis. Setelah selesai proses apoptosis, sistem imun spesifik menyimpan memori terhadap antigen tersebut (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015). Hal ini dapat dijelaskan pada gambar 8.



Gambar 8 Respon imun spesifik

2.3.2.1 Sistem Imun Spesifik Humoral

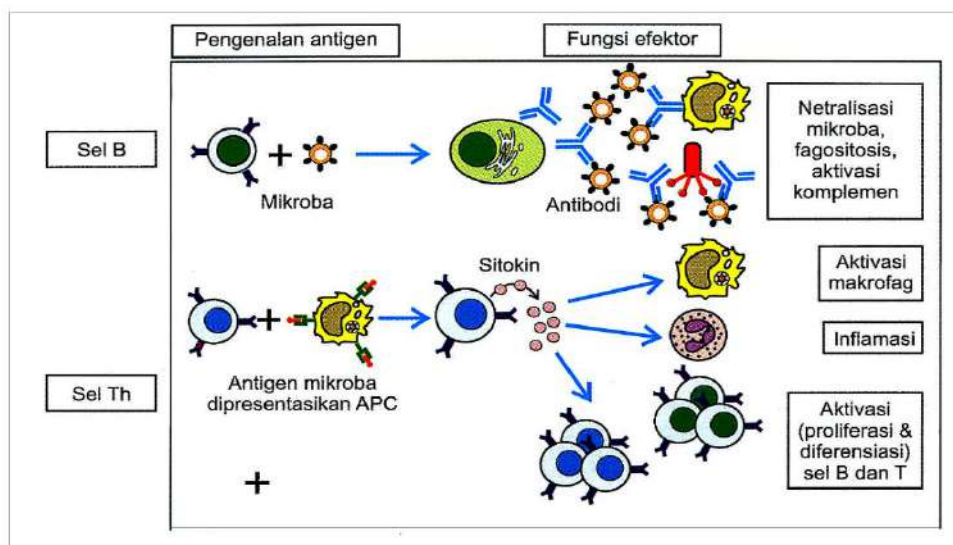
Peran limfosit B dalam sistem imun spesifik humoral. Limfosit B akan berproliferasi dan berdiferensiasi dan berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi, yang berfungsi sebagai pertahanan terhadap infeksi ekstraseluler, virus, dan bakteri serta menetralkan toksinnya. Antibodi merupakan protein yang diproduksi oleh sel-sel plasma sumsum tulang belakang sebagai bagian dari respon imun dari sel B. Sel B yang dirangsang oleh mikroba akan berproliferasi, berdiferensiasi, dan berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi antibody. Sistem imun spesifik humoral menstimulus sel B untuk memproduksi IgG, IgA, IgM, IgE, dan IgD. Kekurangan atau ketiadaan antibodi atau imunoglobulin dapat disebabkan oleh infeksi, abnormalitas genetik atau efek terapi. Hasil pengukuran imunoglobulin dapat memberikan informasi tentang imunodefisiensi dan respon terhadap infeksi (Gaw *et al.* 2011). Sel B akan berproliferasi dan berdiferensia, dengan adanya stimulus dari mikroba ekstraseluler. Sistem imun spesifik humoral juga mengeluarkan beberapa sitokin antara lain IL-12, IL-15, dan IL-10 (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).

2.3.2.2 Sistem Imun Spesifik Seluler

Sistem imun spesifik seluler, bekerja pada diferensia sel T. Sel T berdiferensia menjadi sel Th, Treg, Tdth, CTL/Tc, dan NKT. Sel T memiliki subset sel yang fungsinya berlainan yaitu $CD4^+$ (Th1, Th2) dan $CD8^+$. Bratawidjaja dan Rengganis (2014) menyatakan $CD8^+$ memiliki hubungan seluler utama pada sel T sitotoksik, pada komponen membran reseptor MHC

kelas 1. $CD8^+$ memusnahkan sel yang terinfeksi (Murray *et al.* 2009; Harti 2013; Baratawidjaja & Rengganis 2014).

Sel $CD4^+$ dalam sistem imun spesifik seluler, dapat mengaktifkan makrofag untuk menghancurkan mikroba (Murray *et al.* 2009; Harti 2013; Baratawidjaja & Rengganis, 2014). Suseptibilitas dan resistensi hewan terhadap infeksi mikroba sangat tergantung pada aktivasi dari sel $CD4^+$ yang berdiferensiasi menjadi 2 kelompok berdasarkan pola sekresi sitokin yakni pola respon Th1 dan pola respon Th2 (Pediatrician 2012). Wiedosari (2007) menyatakan aktivasi sel limfosit T-helper (Th) $CD4^+$ mempengaruhi suseptibilitas dan resistensi hewan terhadap infeksi mikroba. Berdasarkan sekresi sitokin, sel Th $CD4^+$ berdiferensiasi menjadi 2 kelompok yaitu pola respon Th1 dan pola respon Th2. $CD4^+$ merupakan petanda sel Th yang meningkatkan aktivasi dan maturase sel B dan sel T sitotoksik, juga mengatur reaksi peradangan menahun yang spesifik terhadap antigen melalui stimulasi makrofag. Subset limfosit Th-1 memproduksi IFN- γ , IL-2, dan IL-12. Sedangkan subset Th-2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, dan IL-10. Sitokin yang menghasilkan sel Th1 menghambat kerja sel Th2, dan sebaliknya. Respon imun cenderung memilih pola respon Th1 atau pola respon Th2 (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).



Gambar 9 Pengenalan antigen pada Sel B dan sel Th

Sel B dan sel T yang terpapar oleh mikroba akan teraktivasi, Sel B mendapatkan stimulus untuk membentuk antibody. Sel Th terpapar oleh antigen mikroba yang dipresentasikan oleh APC, sehingga sel Th mendapatkan stimulus untuk mengeluarkan sitokin. Sitokin yang diproduksi akan mengaktifkan makrofag, terlibat inflamasi, dan terjadi aktivasi sel T dan sel B dalam bentuk proliferasi dan diferensiasi Th2 (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015). Hal ini dapat dilihat pada Gambar 9.

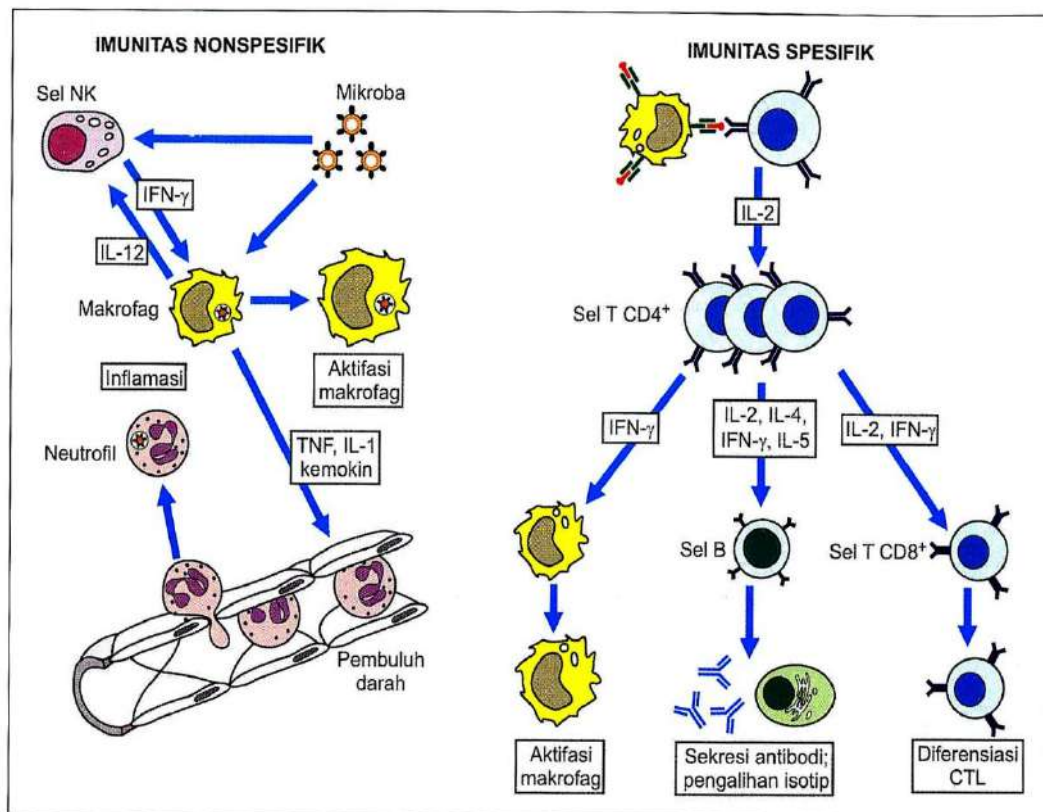
Harti (2013) menyatakan kemampuan tubuh mengenal benda asing ditentukan oleh *Major Histocompatibility Complex* (MHC). MHC merupakan gen yang akan menyandi molekul yang akan mengikat peptida antigen yang dikenali sel T. MHC mengikat peptida pada permukaan sel. Hasdianah *et al.* (2013) menyatakan MHC merupakan molekul yang melekat pada permukaan membran sel, Glikoprotein MHC bersifat polimorfisme. MHC dibagi menjadi MHC I dan MHC II. Molekul CD4⁺ membentuk ikatan tambahan dengan MHC kelas II pada sel penyaji antigen (Baratawidjaja & Rengganis 2014).

2.4 Sitokin

Bratawidjaja dan Rengganis (2014) menyatakan sitokin merupakan protein pembawa pesan kimiawi atau mediator interseluler berperan mengendalikan respon imun seluler dan humoral. Sitokin merupakan protein polipeptida pada sistem imun. Fungsi sitokin mengatur interaksi antar sel dan memacu reaktivitas antar sel pada sistem imun nonspesifik dan sistem imun spesifik. Sitokin diproduksi sangat cepat dan tidak disimpan sebagai molekul dalam tubuh. Efek sitokin dapat secara lokal atau sistemik. Efek sitokin terjadi melalui ikatan dengan reseptornya pada membran sel. Sitokin berpengaruh terhadap sintesis dan efek sitokin lainnya. Sitokin berperan dalam aktivasi sel T, sel B, monosit, makrofag, inflamasi dan induksi sitotoksitas. Sitokin dapat menunjukkan reaksi yang tumpang tindih Th2 (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).

Sitokin IFN- γ dan IL-12 terlibat dalam aktivasi makrofag dalam sistem imun nonspesifik. Makrofag memproduksi TNF- α yang bekerja pada sel epitel pembuluh darah. Sistem imun spesifik diawali dengan makrofag mengaktifkan sel TCD4⁺ setelah memproduksi IL-2. Sel CD4⁺ mengaktifkan beberapa sitokin seperti IFN- γ , IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-5, IFN- γ mengaktifkan makrofag, sel B memproduksi antibodi, dan IL-2 serta IFN- γ mengaktifkan sel CD8⁺ untuk proses diferensiasi CTL (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).

Shaikh (2011) menyatakan sitokin yang bekerja pada inflamasi dibagi menjadi 2 kelompok. Peradangan akut melibatkan IL-1, TNF- α , IL-6, IL-11, IL-8 dan kemokin lainnya, Sedangkan untuk peradangan kronis terbagi dua yaitu sitokin pada respon humoral (IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, dan IL-13) dan sitokin seluler (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 dan interferon), mengubah faktor pertumbuhan- β , dan faktor nekrosis tumor α dan β). Dapat terlihat pada Gambar 10.



Gambar 10 Sitokin pada sistem imun nonspesifik dan spesifik

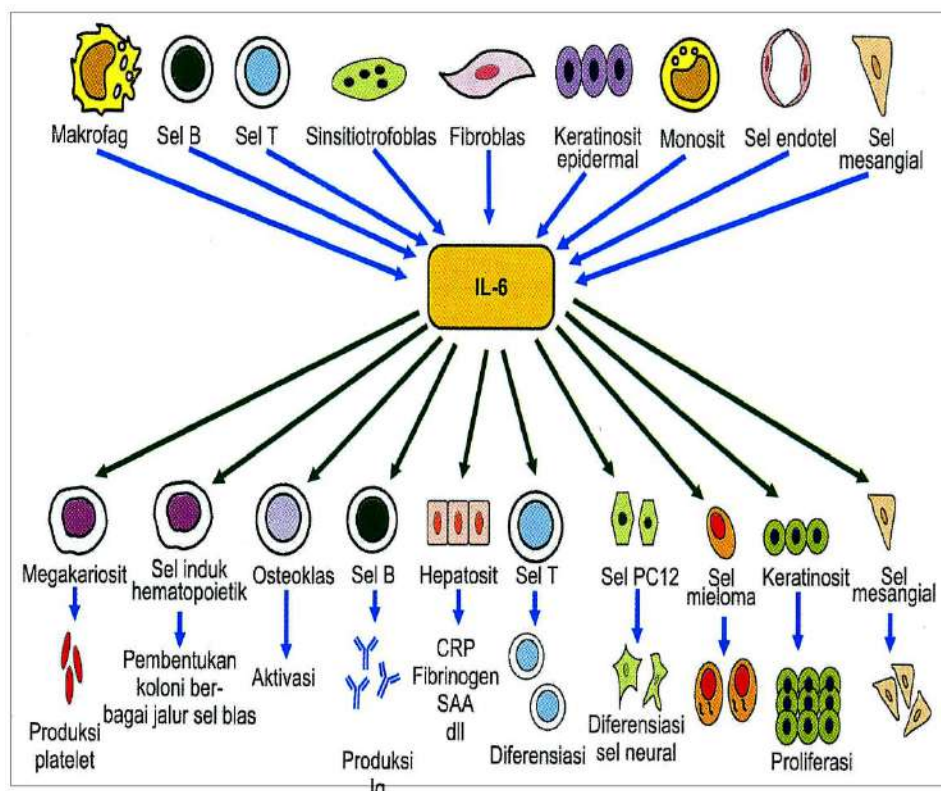
2.4.1 Sitokin pada Sistem Imun Nonspesifik

Sistem imun nonspesifik, sitokin diproduksi makrofag dan sel NK. Sitokin berperan dalam inflamasi dini, merangsang proliferasi, diferensiasi, dan aktivasi sel efektor seperti makrofag. Sitokin yang terlibat dalam sistem imun nonspesifik antara lain IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , dan kemokin. Sitokin IL-1, TNF- α , dan IL-6 merupakan sitokin proinflamasi yang merangsang hati mensintesis dan melepaskan protein plasma seperti CRP, *Manna Binding Lektin* (MBL), dan serum amyloid protein (SAP), serta beberapa sitokin. Sitokin IL-1, IL-6, dan TNF- α merupakan bagian dari pertahanan humoral pada sistem imun non spesifik. Komponen pertahanan seluler sistem imun non spesifik meliputi fagosit, makrofag, sel NK dan sel mast (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).

Pada sistem imun non spesifik, ada beberapa reseptor yang berfungsi menemukan mikroba penyebab infeksi. Reseptor berbentuk molekul larut dan reseptor tidak larut. Reseptor berbentuk molekul larut seperti komplemen, MBL, *Lipopolysaccharide Binding Protein* (LBP) dan CRP. Reseptor yang tidak larut seperti *toll-like receptor* (TLR), *scavenger receptor*, *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD), dan *fragmen crystallizable* (FcR). Baratawidjaja dan Rengganis (2014) menyatakan kerja beberapa sitokin dalam sistem imun nonspesifik, sebagai berikut :

2.4.1.1 IL-6

IL-6 berasal dari makrofag, sel endotel, dan sel T, IL-6 merupakan sitokin proinflamasi, IL-6 bekerja dalam sistem imun nonspesifik dan sistem imun spesifik. Bony *et al.* (2012) menyatakan IL-6 dikenal sebagai sitokin multifungsi itu mengatur respon imun, haematopoiesis, fase akut respon, dan peradangan.



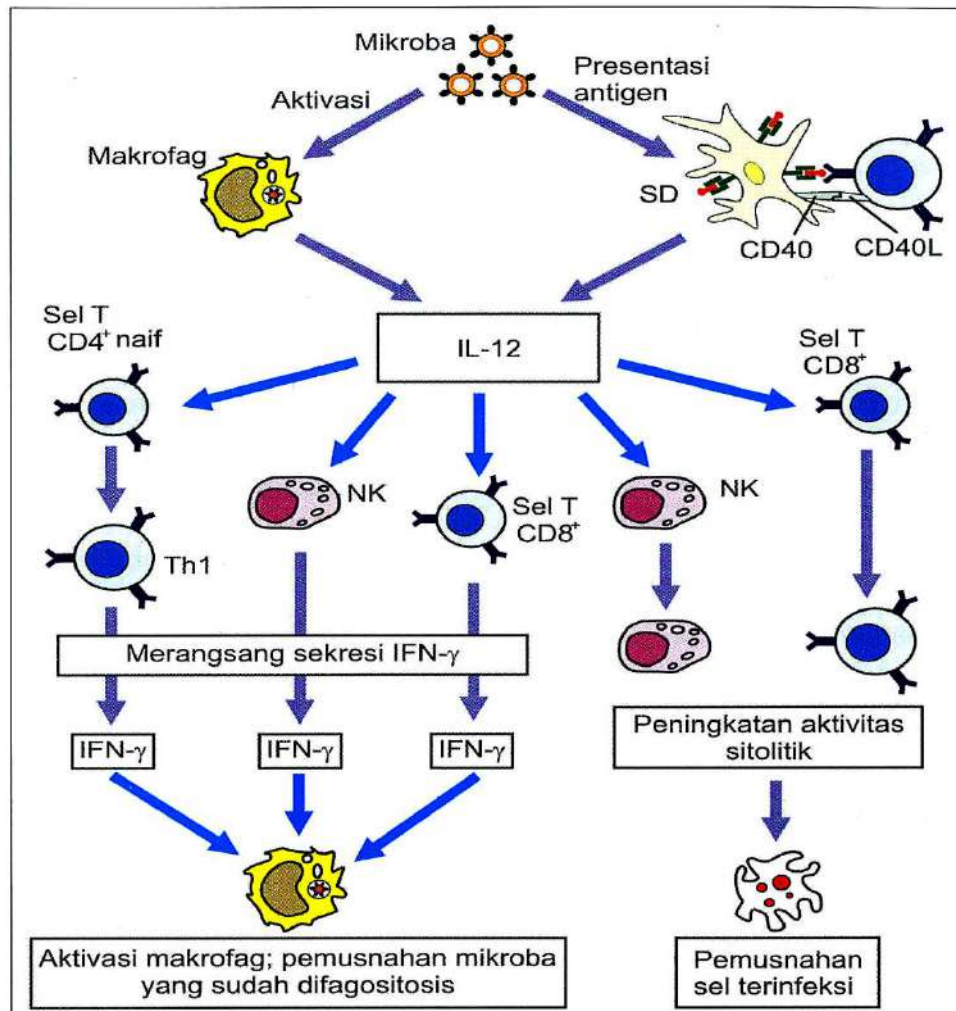
Gambar 11 Efek biologis interleukin 6 (IL-6)

Sasaran dari IL-6 dalam sistem imun nonspesifik pada sintesis APP di hati, dan proliferasi sel plasma. Setelah sintesis APP dihati, kemudian melepas protein plasma seperti CRP, *Manna Binding Lektin* (MBL), dan serum *Amyloid Protein* (SAP), dan sitokin. IL-6 diproduksi oleh makrofag, sel B, sel T, dan beberapa sel lainnya. IL-6 terlibat dalam produksi platelet, pembentukan koloni berbagai jalur sel, aktivasi osteoklas, produksi Ig oleh sel B, produksi CRP, diferensiasi sel T dan lainnya (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015). Hal ini dapat dilihat pada gambar 11.

2.4.1.2 IL-12

Sitokin IL-12 terlibat dalam sistem imun nonspesifik. IL-12 sebagai mediator terhadap mikroba intraseluler. IL-12 juga sebagai kunci pada imunitas spesifik seluler. IL-12 diproduksi oleh fagosit mononuklear dan sel dendritik yang diaktifkan oleh APC mikroba. Tugas IL-2 adalah menstimulus produk IFN- γ oleh sel NK dan sel T, diferensiasi sel T CD4⁺

menjadi sel Th1. IL-12 adalah sitokin utama yang menginduksi ke subset Th1. Sel Th1 mengaktifkan IFN- γ untuk mengaktifasi makrofag, IL-12 juga meningkatkan fungsi sitolitik sel NK dan sel T CD8⁺. Dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12 Interleukin 12 (IL-12)

2.4.1.3 TNF- α

Infeksi yang berat sapat memicu produk TNF- α . TNF- α berasal dari fagosit *mononuclear* dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK, dan sel mast. IFN- γ yang diproduksi sel T dan sel NK juga merangsang makrofag antara lain mensintesis TNF- α . Kadar TNF- α yang rendah bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. Kadar TNF- α yang sedang, terlibat dalam inflamasi sistemik. Kadar TNF- α -tinggi dapat menimbulkan kelainan patologik syok. Bony *et al.* (2012) menyatakan TNF- α memainkan peran penting dalam peradangan proses dan diproduksi pada tahap awal oleh makrofag aktif.

TNF- α memiliki efek biologis dengan mengaktifkan dan mengarahkan neutrophil dan monosit ke tempat infeksi. Meningkatkan

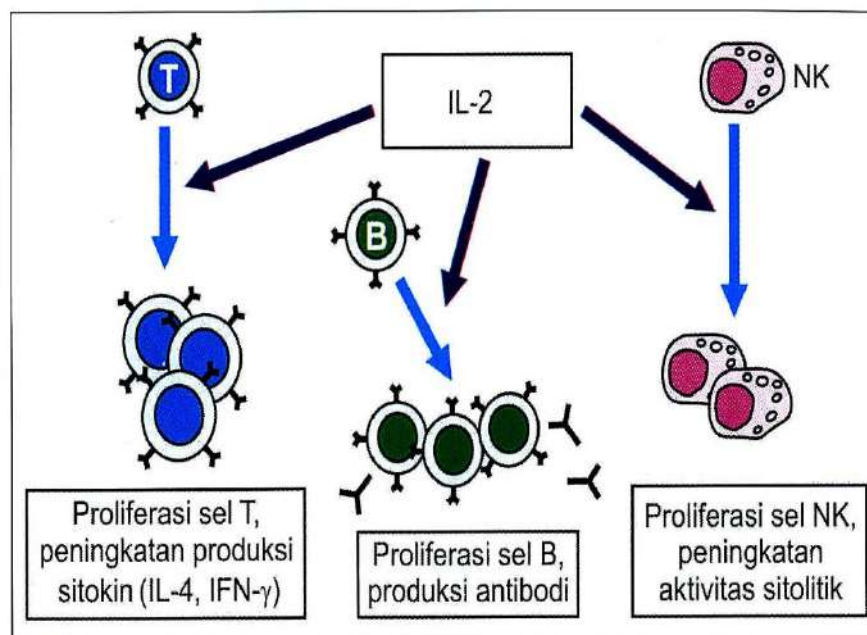
ekspresi molekul adhesi sel endotel vaskuler untuk leukosit. $\text{TNF-}\alpha$ merangsang sel fagosit *mononuclear* untuk mensekresi IL-1.

2.4.2 Sitokin pada Sistem Imun Spesifik

Sitokin yang bekerja pada sistem imun spesifik, diproduksi oleh sel T, yang juga mengaktifkan sel-sel imun spesifik. Sitokin yang bekerja pada sistem imun spesifik antara lain IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-16, IL-17, IL-23, IL-25, IL-31, *Tumor Growth Factor* (TGF) γ , dan limfotoksin (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).

2.4.2.1 IL-2

IL-2 salah satu sitokin yang bekerja pada sistem imun spesifik. IL-2 menjadi faktor pertumbuhan untuk sel T yang dirangsang oleh antigen. Ekspresi reseptor IL-2 ditingkatkan oleh ransangan antigen. IL-2 juga meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel imun pada sistem imun spesifik. IL-2 diproduksi oleh sel T, dimana efek biologis meningkatkan proliferasi sel T, sel NK, dan sel B, serta sintesis antibody. Dapat dilihat pada gambar 13.

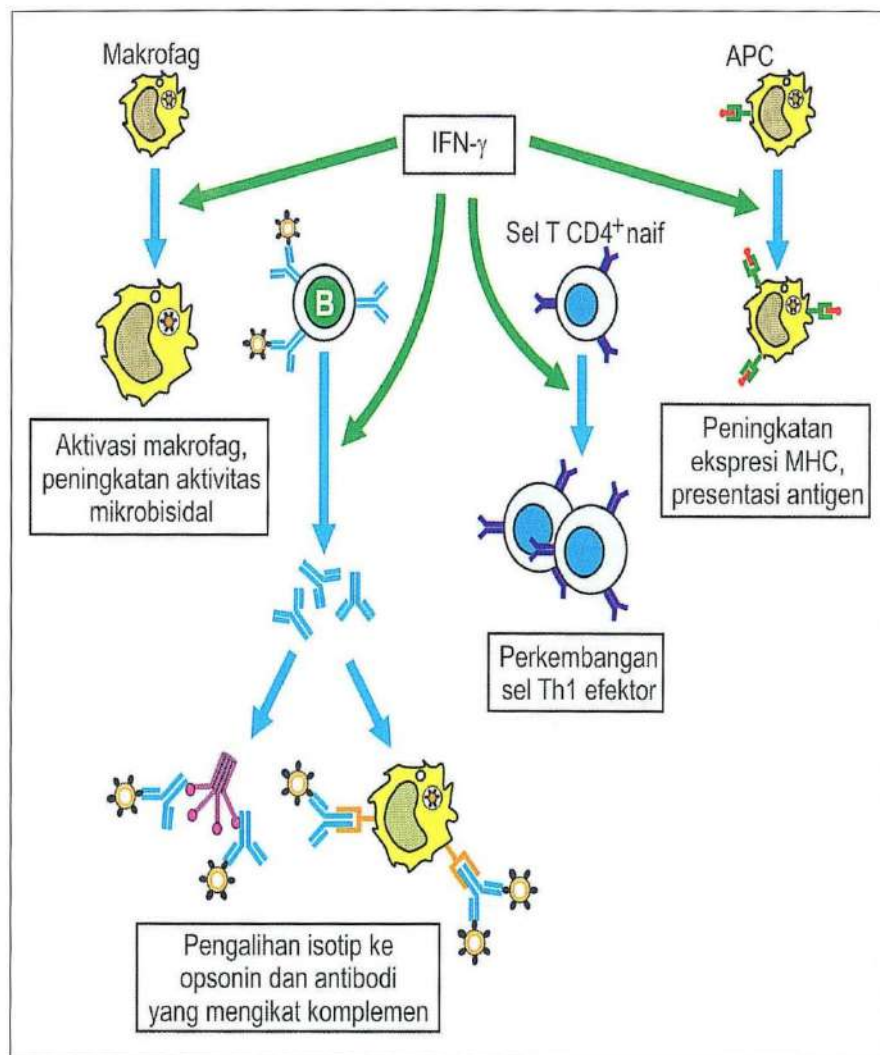


Gambar 13 Interleukin 2 (IL-2)

2.4.2.2 IFN- γ

IFN- γ termasuk jenis IFN tipe 2. Beberapa referensi menyatakan IFN- γ juga berperan pada sistem imun nonspesifik. IFN- γ berperan dalam imunitas spesifik seluler. IFN- γ merupakan aktivator utama makrofag. IFN- γ berperan dalam aktivasi imunitas seluler sel makrofag. IFN- γ juga merangsang ekspresi MHC-I dan MHC-II. IFN- γ meningkatkan aktivitas sel T yang akan menginduksi imunitas humoral.

Meningkatkan diferensiasi sel $CD4^+$ naif ke subset sel Th1 dan mencegah proliferasi sel Th2. $IFN-\gamma$ bekerja pada sel B untuk meningkatkan mikroba yang diopsonisasi. $IFN-\gamma$ juga mampu mengaktifkan neutrofil dan merangsang efek sitolitik sel NK. Efek biologis $IFN-\gamma$ terhadap aktivasi makrofag dan meningkatkan aktivitas mikrobisidal. Efek biologis $IFN-\gamma$ terhadap kerja sel B untuk mengikat antibody dengan komplemen. Efek biologis $IFN-\gamma$ pada sel T $CD4^+$, mendukung perkembangan sel Th1. $IFN-\gamma$ bekerja pada APC makrofag untuk meningkatkan ekspresi MHC dan presenting antigen. Hal ini dapat diperjelas dengan Gambar 14.

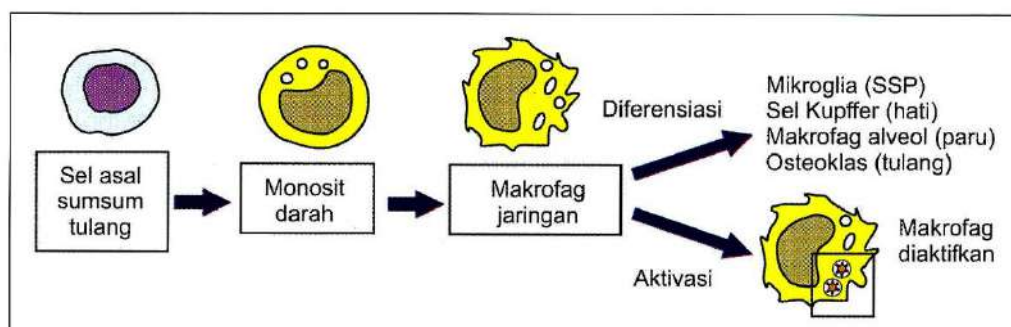


Gambar 14 Interferon (IFN) $-\gamma$

2.5 Makrofag

Sacher dan McPherson (2012) menyatakan monosit membentuk 5-8% dari leukosit di dalam darah. Monosit matang beredar secara singkat di dalam darah perifer dan kemudian masuk ke jaringan menjadi makrofag. Makrofag juga termasuk *transient cells* yang berasal dari sumsum tulang belakang dan beredar di

dalam aliran darah, yang kemudian adanya sinyal atau stimulus, sel makrofag masuk ke jaringan. Makrofag memiliki diameter 10-30 m dan berbentuk tidak beraturan. Makrofag merupakan sel efektor dalam sirkulasi di tubuh. Makrofag berfungsi sebagai sel fagosit, mediator inflamasi, presentasi antigen, terlibat pada proses spesies reaktif oksigen, memproduksi beberapa sitokin, dan memproduksi protein komplemen (Roitt 2003; Louise 2011; Guyton 2012; Harti 2013; Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Soedarto 2014; Hasdianah *et al.* 2014; Sudiono 2014; Playfair dan Chain 2015; Radji 2015).



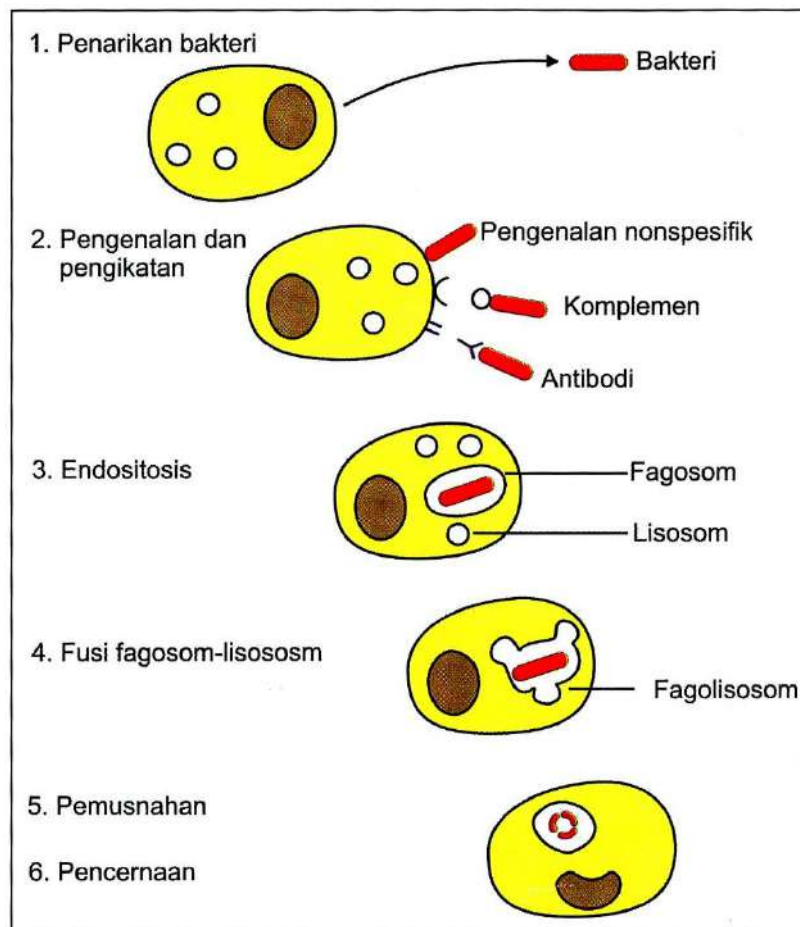
Gambar 15 Alur perjalanan makrofag

Baratawidjaja dan Rengganis (2014) menyatakan sel utama fagositik adalah makrofag dan leukosit polimorfonukleus. Makrofag merupakan sel monosit yang berasal dari sumsum tulang memasuki jaringan. Makrofag berasal dari sel induk pluripotent. Awal perjalanan makrofag dari sumsum tulang belakang sebagai monosit darah. Ketika monosit masuk ke jaringan, berubah menjadi makrofag. Setelah berada di jaringan, makrofag membentuk organel dan enzim yang membantu proses kerja fagositosis. Salah satu makrofag adalah makrofag peritoneum. Monosit darah dan makrofag jaringan merupakan sel yang sama yang berada di lokasi yang berbeda. Makrofag adalah sel yang merupakan bagian dari jaringan sel darah putih yang memiliki kemampuan fagosit. Makrofag melakukan fagositosis paling efisien. Makrofag memegang peranan utama sebagai sel-sel pengembara yang mengambil antigen asing dan menghancurkannya dengan enzim-enzim lisosom yang berada di dalam granulanya (Gambar 15).

Makrofag memiliki kemampuan menangkap ransangan, memakan, dan mencerna antigen. Aktivasi makrofag didukung oleh sitokin yang dilepaskan oleh sel Th dan oleh mediator respon inflamasi. Makrofag peritoneal bebas dalam cairan peritoneum. Beberapa antigen dikeluarkan dan sisanya dipaparkan kembali ke permukaan makrofag.

Gartner *et al.* (2014) menyatakan makrofag termasuk sel yang stabil dan berumur panjang. Waktu hidup sel makrofag sekitar 2 bulan. Bentuk makrofag menjadi 2 sel yaitu fagosit dan *antigen presenting cells* (APC). Permukaan sel makrofag tidak merata, dan makrofag yang lebih aktif akan memiliki lipatan dan lekuk pada membran plasma dikarenakan pergerakan sel dan fagositosis. Fungsi makrofag diantaranya memfagosit sel tua/rusak/mati, respon imun, dimana limfosit akan mengaktifasi makrofag dan meningkatkan aktivitas fagositnya. Makrofag mampu membunuh mikroba dan mengeluarkan sekresi sitokin yang proinflamasi. Makrofag juga bisa diaktivasi oleh sel NK. Makrofag yang teraktivasi akan bergerak lebih aktif dibandingkan yang tidak teraktivasi.

Baratawidjaja dan Rengganis (2014) menyatakan proses fagositosis berjalan secara bertahap dan berurutan. Sel fagosit mengenal mikroorganisme/partikel asing (*recognition*), tahap kedua sel fagosit bergerak menuju mikroorganisme tersebut (*chemotaxis*), tahap ke 3 sel fagosit melekat dengan mikroorganisme (*adhesion*), tahap ke 4 sel fagosit akan menelan mikroorganisme (*ingestion*), tahap ke 5 sel fagosit menstimulus lisosom yang berisi enzim penghancur mikroorganisme tersebut (*Digestion*), tahap ke 6 sel fagosit mengeluarkan produk sisa mikroorganisme (*releasing*). Setiap tahap fagositosis, akan terjadi proses biokimia (Guyton 2012; Harti 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014). Dapat dilihat pada Gambar 16.

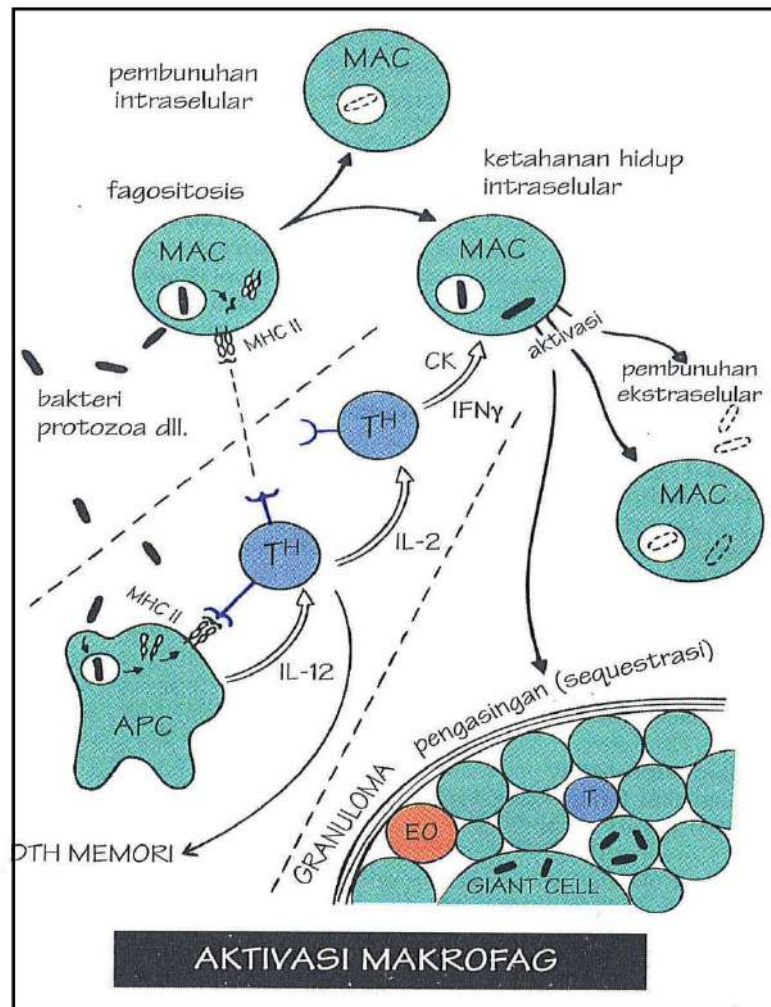


Gambar 16 Proses fagositosis

Menurut Radji (2015) menyatakan sistem imun nonspesifik menjadikan sel-sel makrofag dan neutrofil sebagai sel pertahanan tubuh yang mampu menelan dan memusnahkan organisme asing yang masuk ke dalam tubuh tanpa adanya antibodi. Bony *et al.* (2012) menyatakan peradangan merupakan respon biologis yang kompleks yaitu diatur oleh beberapa mediator inflamasi seperti makrofag, limfosit, leukosit, dan sel mast. Ward *et al.* (2017) menyatakan saat terjadi peradangan, leukosit, sel darah putih (neutrophil dan monosit) akan ditarik ke tempat peradangan oleh molekul sinyal yaitu kemokin. Monosit menjadi makrofag jaringan yang akan melakukan fagositosis organisme penyebab peradangan,,

Playfair dan Chain (2015) menyatakan monosit merupakan prekursor makrofag jaringan yang bertugas membuang jaringan yang rusak akibat

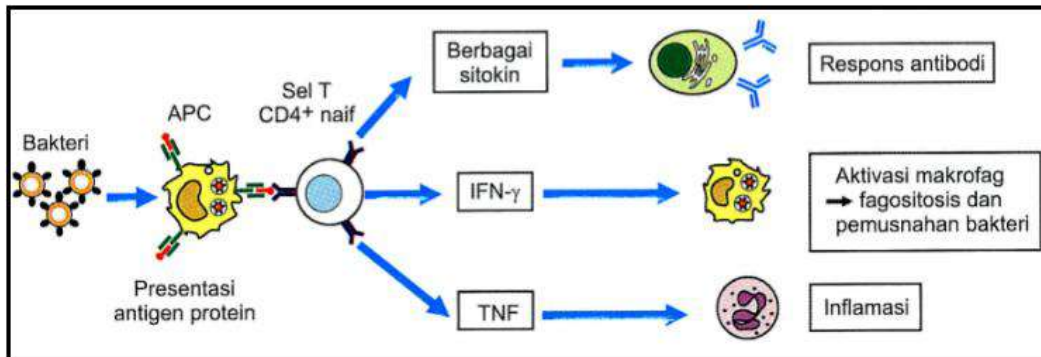
mikroorganisme. Makrofag jaringan juga merupakan sumber penting sitokin inflamasi $\text{TNF-}\gamma$, IL-1, dan IL-6. Lisosom polimorfonuklear, monosit dan makrofag melepas enzim pembunuh bakteri (bakterisidal).



Gambar 17 Aktivasi makrofag

Makrofag memulai kerja fagositosisnya, setelah ada infeksi dan peradangan, yang berdampak pada pembengkakan tiap sel-sel ini dengan cepat. Banyak makrofag yang bergerak membentuk pertahanan. Makrofag dapat memfagositosis jauh lebih banyak daripada neutrophil dan juga memakan banyak jaringan nekrotik (Guyton dan Hall 2007). Proses inflamasi merangsang polimorfinuklear mengalami apoptosis dan berkurang jumlahnya pada hari 3-5 digantikan fungsinya oleh makrofag (Putu *et al.* 2007). Ketika ada infeksi atau radang, makrofag teraktivasi, melakukan endositosis, degradasi enzimatik, dan melepaskan sitokin. Makrofag bekerja pada imunitas seluler. Fagositosis oleh makrofag mengaktifkan respon limfosit. Limfosit mengaktifkan makrofag dan membantu memusnahkan mikroba yang difagosit. Sitokin yang berperan sebagai aktivator makrofag adalah IFN-gama (Champe *et al.* 2011). Makrofag juga diatur aktivasinya oleh sel T (limfosit T) sebagai *Cell-Mediated Immunity* (Harti 2013). Pada beberapa keadaan, monosit berubah menjadi makrofag yang lebih aktif. Makrofag terstimulasi sehingga bermigrasi dan melakukan aktivitas fagosit (Sacher dan McPherson 2012). Mark

et al. (2014) menyatakan makrofag memiliki reseptor *scavenger* golongan A (SR-A) yang dapat berikatan dengan berbagai jenis molekul. Adanya reseptor ini, melakukan tugasnya dekat membran sel. Aktivasi makrofag dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 18 Presentasi antigen sel

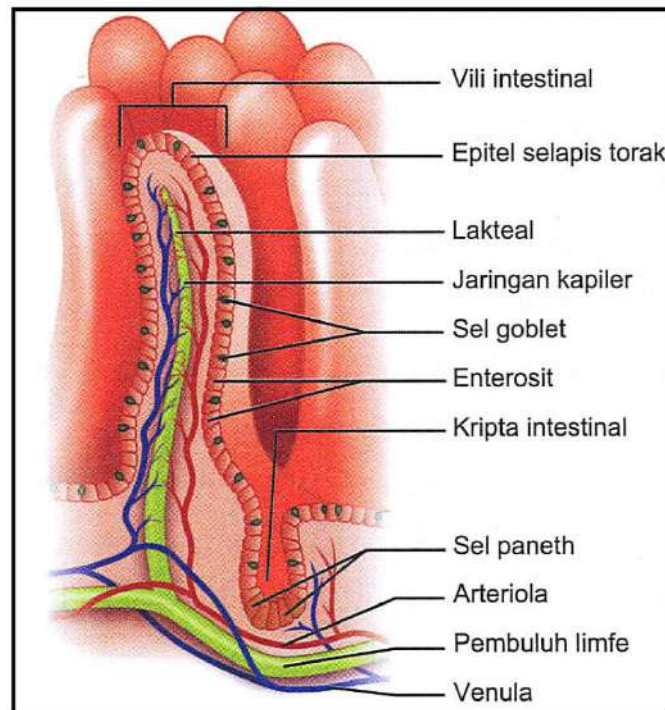
Bakteri memiliki kemampuan mengaktivasi makrofag. Makrofag yang teraktivasi mengirimkan info ke sel T dengan $CD4^+$ sebagai sel mediasi imunitas. Sel T mengaktifkan berbagai sitokin $IFN-\gamma$. Adanya sitokin $IFN-\gamma$, mengaktivasi makrofag, sehingga terjadi proses fagositosis oleh makrofag dan pemusnahan bakteri. $IFN-\gamma$ meningkatkan ekspresi reseptor dengan cepat. Dapat dilihat pada Gambar 18.

2.6 Usus Halus

Saluran pencernaan terdiri dari mulut, esophagus, lambung, usus halus dan usus besar. Beberapa cairan yang disekresikan oleh beberapa organ, masuk ke saluran pencernaan untuk membantu cerna makanan dan penyerapan zat gizi. Sekresi mukosa saluran pencernaan mengandung peptida antimikroba yang dapat memusnahkan mikroba yang pathogen. Beberapa gangguan kesehatan yang dapat terjadi di usus. Emmanuel dan Inns (2017) menyatakan malabsorpsi dapat disebabkan gangguan struktur usus halus, gangguan mukosa usus halus. Malabsorpsi berdampak defisiensi kombinasi makronutrien (karbohidrat, lemak, protein) dan mikronutrien (vitamin dan mineral). Akibat kegagalan intestinal (sindrom usus halus) dimana fungsi usus halus untuk melakukan pencernaan dan absorpsi tidak berjalan normal. Hal ini menunjukkan pentingnya mengonsumsi makanan bergizi untuk mencegah terjadinya gangguan pada usus halus.

Usus halus terdiri atas 3 bagian yaitu duodenum, jejunum, dan ileum. Duodenum adalah bagian sesudah lambung. Jejunum merupakan tempat penyerapan glukosa, asam amino, dan asam lemak. Saluran pencernaan terdiri dari lapisan serosa, otot longitudinal, pleksus meinterikus, otot sirkular, pleksus sub mukosa, kelenjar, sub mukosa, mukosa muskularis, lapisan mukosa, lamina propria, kelenjar getah bening, epitel, dan vilus. Vili terdiri dari sel epitel silindris sebaris yang berjejer dan jaringan ikat longgar lamina propria. Ward *et al.* (2017) menyatakan serosa merupakan lapisan terluar, yang merupakan lapisan jaringan ikat. Muskularis eksternal merupakan wilayah antara serosa dengan batas akhir otot sirkular. Pleksus submukosa dan pleksus meinterikus merupakan jaringan sel saraf. Sel saraf ini yang bekerjasama dengan jaringan otot untuk melakukan gerakan cerna

dan berkontraksi. Jaringan longitudinal ketika berkontraksi akan memendekkan saluran pencernaan.



Gambar 19 Bagian-bagian saluran pencernaan

Duodenum bagian terpendek yang hanya sebagian terbungkus selaput peritoneum. Duodenum memiliki vili yang banyak, tinggi, dan terbentuk seperti lembaran daun. Duodenum memiliki kriptas dan kelenjar Brunner dengan jumlah dan keadaan normal, dan ada kelenjar sub mukosa (*Brunner*). Kelenjar Brunner berfungsi menghasilkan *mucus* dan bikarbonat. Usus halus memiliki enzim pencernaan, peptide antimikrobal, dan ada aliran cairan ke usus besar.

Ward *et al.* (2017) menyatakan jejunum memiliki vili lebih kecil dan sedikit daripada duodenum. Kelenjar submukosa (*Brunner*) tidak jelas terlihat di jejunum. Sel goblet pada permukaan vili terlihat banyak di jejunum. Sel goblet mengeluarkan lendir di permukaan mukosa. Lendir tersebut akan mencegah patogen infeksi sel epitel. Bagian mukosa terdapat vili, kriptas, dan kelenjar Brunner. Kriptas bergerak setiap 10-14 jam untuk mengganti sel epitel yang lepas. Waktu yang dibutuhkan oleh sel epitel untuk berpindah dari kriptas hingga ujung vili sekitar 48 jam. Sel epitel vili mengandung filamen aktin dan myosin yang berfungsi untuk pergerakan mikrovili. Mikrovili berperan menyerap zat gizi (Gambar 19). Proses penyerapan makanan pada tikus terjadi di bagian jejunum dan ileum. Ileum memiliki bentuk vili nya seperti ibu jari, sedikit kelenjar Brunner, dan sedikit sel goblet, dan terdapat jaringan limfatik. Kelenjar Brunner terdiri atas stem sel, sel goblet, dan lainnya. Sel goblet penghasil mukus dan sel Paneth penghasil lisozim (Bratawidjaja & Rengganis 2014; Ward *et al.* 2017).

Gartner dan Hiatt (2014) menyatakan lamina propria bersifat sangat vaskular, dimana mengandung kelenjar, pembuluh limfe dan sistem jaringan limfoid terkait mukosa atau *mucous-associated lymphoid tissue/MALT*. Bratawidjaja dan Rengganis (2014) menyatakan MALT pada saluran cerna merupakan jaringan

limfoid tanpa kapsul. MALT mendukung sel limfosit dan *antigen presenting cell* (APC) yang mengawali respon imun spesifik.

Usus halus tempat utama, makanan dicerna dan tempat penyerapan hasil cerna. Usus halus berbentuk seperti selang, yang tersusun dari duodenum, jejunum, dan ileum. Proses makanan di usus halus, diawali di duodenum, dimana hasil pemecahan lemak menghasilkan asam lemak di duodenum tersebut, yang merangsang pelepasan 2 hormon polipeptida yaitu peptide penghambat ester dan kolesistokinin yang akan menghambat pelepasan gastrin maupun asam. Kolesistokinin juga menstimulasi pelepasan pepsinogen untuk pencernaan protein, Sifat keasaman dinetralkan dengan sekresi dari pankreas dan empedu (Ward *et al.* 2017).

Dinding usus halus berlipat lipatan dengan banyak tonjolan-tonjolan kecil seperti jari yang disebut vili. Diantara vili-vili terdapat sejumlah kelenjar kecil yang dikenal dengan nama kripda. Kripda mensekresi 3 liter cairan hipotonik setiap harinya. Permukaan vili dilapisi oleh lapisan sel epitel yang juga berbentuk tonjolan kecil yang disebut mikrovili atau dikenal dengan *brush border*, yang posisinya mengarah ke lumen. Adanya pergantian sel epitel setiap 6 hari sekali (Ward *et al.* 2017). Musinogen, bahan terbentuknya mukus yang melapisi lumen. Sel DNES yang berfungsi menghasilkan hormon parakrin dan endokrin, hanya ada 1 % sel DNES di antar vili pada usus kecil.

Usus halus memiliki permukaan yang luas untuk menyerap makanan. Usus halus menyerap air, elektrolit, karbohidrat, asam amino, mineral, lemak dan vitamin. Mekanisme pergerakan dari lumen ke sirkulasi bervariasi. Karbohidrat diabsorpsi sebagian besar dalam bentuk monosakarida (glukosa, fruktosa, dan galaktosa). Karbohidrat dipecah menjadi monosakarida oleh enzim yang dilepas *brush border* (maltase, isomaltase, sukrase, dan laktase). Transportasi monosakarida yang terjadi di usus halus berdasarkan prinsip difusi dan pergerakan ion-ion. Polipeptida yang masuk ke usus halus, berubah menjadi oligopeptida dengan enzim protease dari pankreas. Enzim protease yang dilepas oleh pankreas adalah tripsin dan kimotripsin. Oligopeptida dipecah lagi menjadi asam-asam amino oleh enzim pankreas yang bernama karboksipeptidase dan enzim pada sel epitel lumen yaitu aminopeptidase. Asam amino bebas akan masuk ke sel epitel berdasarkan prinsip transport aktif dan pergerakan ion (Gartner dan Hiatt 2014; Ward *et al.* 2017).

Pencernaan lemak paling banyak terjadi di usus halus. Enzim yang bekerja adalah lipase, dimana lemak dipecah menjadi monogliserida dan asam lemak bebas. Proses pemecahan lemak diawali oleh emulsifikasi, dimana droplet lipid besar dipecah menjadi droplet lipid kecil. Zat emulsi di usus halus yaitu asam empedu, asam kolat, dan asam kenodeoksikolat. Asam lemak bebas dan monogliserida dengan zat emulsi asam empedu membentuk misel. Bagian luar misel bersifat hidrofilik dan bagian dalam misel bersifat hidrofobik. Misel dapat memasuki lapisan aqueous yang mengelilingi mikrovili, dimana monogliserida, asam lemak bebas, kolesterol, dan vitamin larut lemak bergerak dengan prinsip difusi aktif. Vitamin larut lemak (vitamin A, D, E, dan K) mengikuti absorpsi lemak, sedangkan vitamin larut air diabsorpsi melalui difusi, kecuali vitamin B12 yang harus berikatan dengan faktor intrinsik (Gartner dan Hiatt 2014; Ward *et al.* 2017).

Gartner dan Hiatt (2014) menyatakan permukaan luminal usus halus bermodifikasi agar meningkat permukaannya. Modifikasi pertama adalah plika

sirkularis, dimana adanya lipatan transversal tinggi mencapai 8 mm dan panjang 5 cm, plika ini tidak hanya memperluas permukaan usus kecil sebanyak 2-3 tetapi juga mengurangi kecepatan gerakan. Modifikasi kedua adalah vilus, terdapat pada tonjolan lamina propria yang berbentuk mirip jari dan diliputi epitel. Vili adalah bangunan tetap yang berjumlah 10-40 per mm². Jumlah paling banyak di duodenum. Tinggi vili berkisar 0,5 – 1,5 mm. Vili menyebabkan permukaan usus halus seperti beledu dan meningkatkan luas permukaan usus kecil menjadi 10 kali lipat. Modifikasi ketiga adalah mikrovilus, yaitu modifikasi plasmalema berupa tonjolan pada permukaan *apical* sel epitel yang melapisi vili intestinal, dan meningkatkan luas permukaan usus halus sebanyak 20 kali. Ward *et al*, (2017) menyatakan mikrovilli merupakan bagian dari sitoplasma yang berbentuk tonjolan seperti jari dan berukuran kecil dari permukaan sel pada lumen (rongga usus). Pada histologi, gambar mikrovili seperti batas bergurat pada sel absorptif usus. Mikrovili sel epitel usus halus dapat berbentuk pendek dan jarang pada sel yang kurang aktif. Mikrovili merupakan bagian dari sel yang berfungsi menambah luas permukaan sel, sekresi, penyerapan. Setiap villus terdiri mikrovilus.

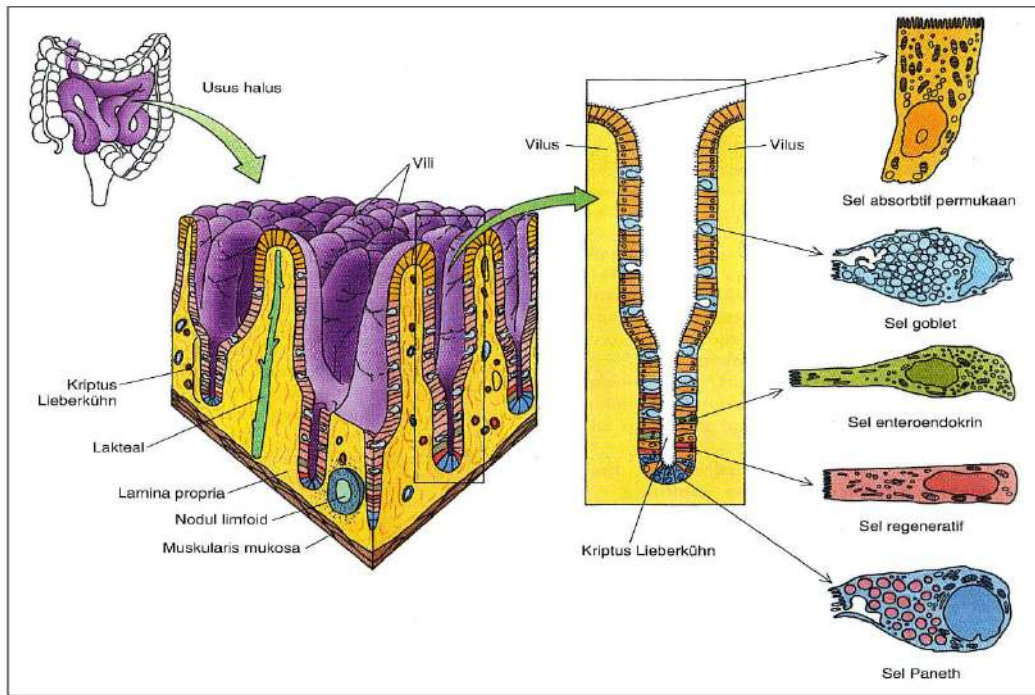
Adanya modifikasi ini meningkatkan permukaan absorpsi zat gizi sebanyak 400-600 kali. Pada epitel yang melapisi vili dan permukaan antavili terdiri dari sel absorpsi permukaan, sel goblet dan sel DNES. Sel absorpsi juga melakukan re-esterifikasi asam lemak, mengandung enzimmatik. Sel goblet adalah kelenjar uniselular, terbanyak pada ileum, berfungsi membuat musinogen, bahan terbentuknya *mucus* yang melapisi lumen. Sel DNES yang berfungsi menghasilkan hormon parakrin dan endokrin, hanya ada 1 % sel DNES di antar vili pada usus halus. Usus halus memiliki permukaan yang luas untuk menyerap makanan. Usus halus menyerap air, elektrolit, karbohidrat, asam amino, mineral, lemak dan vitamin. Mekanisme pergerakan dari lumen ke sirkulasi bervariasi. Karbohidrat diabsorpsi sebagian besar dalam bentuk monosakarida (glukosa, fruktosa, dan galaktosa). Karbohidrat dipecah menjadi monosakarida oleh enzim yang dilepas *brush border* (maltase, isomaltase, sukrase, dan laktase). Transportasi monosakarida yang terjadi di usus halus berdasarkan prinsip difusi dan pergerakan ion-ion (Gartner dan Hiatt 2014; Ward *et al*. 2017).

Poliipeptida yang masuk ke usus halus, berubah menjadi oligopeptida dengan enzim protease dari pankreas. Enzim protease yang dilepas oleh pankreas adalah tripsin dan kimotripsin. Oligopeptida dipecah lagi menjadi asam-asam amino oleh enzim pankreas yang bernama karboksipeptidase dan enzim pada sel epitel lumen yaitu aminopeptidase. Asam amino bebas akan masuk ke sel epitel berdasarkan prinsip transport aktif dan pergerakan ion (Gartner dan Hiatt 2014; Ward *et al*. 2017).

Usus halus memiliki permukaan yang luas untuk menyerap makanan. Usus halus menyerap air, elektrolit, karbohidrat, asam amino, mineral, lemak dan vitamin. Mekanisme pergerakan dari lumen ke sirkulasi bervariasi. Karbohidrat diabsorpsi sebagian besar dalam bentuk monosakarida (glukosa, fruktosa, dan galaktosa). Karbohidrat dipecah menjadi monosakarida oleh enzim yang dilepas *brush border* (maltase, isomaltase, sukrase, dan laktase). Transportasi monosakarida yang terjadi di usus halus berdasarkan prinsip difusi dan pergerakan ion-ion (Gartner dan Hiatt 2014; Ward *et al*. 2017).

Poliipeptida yang masuk ke usus halus, berubah menjadi oligopeptida dengan enzim protease dari pankreas. Enzim protease yang dilepas oleh pankreas

adalah tripsin dan kimotripsin. Oligopeptida dipecah lagi menjadi asam-asam amino oleh enzim pankreas yang bernama karboksipeptidase dan enzim pada sel epitel lumen yaitu aminopeptidase. Asam amino bebas akan masuk ke sel epitel berdasarkan prinsip transport aktif dan pergerakan ion (Gartner dan Hiatt 2014; Ward *et al.* 2017).



Gambar 20 Sel absorpsi, sel goblet, dan kriptus lieberkuhn

Pencernaan lemak paling banyak terjadi diusus halus. Enzim yang bekerja adalah lipase, dimana lemak dipecah menjadi monogliserida dan asam lemak bebas. Proses pemecahan lemak diawlin oleh emulsifikasi, dimana droplet lipid besar dipecah menjadi droplet lipid kecil. Zat emulsi diusus halus yaitu asam empedu, asam kolat, dan asam kenodeoksikolat. Asam lemak bebas dan monogliserida dengan zat emulsi asam empedu membentuk misel. Bagian luar misel bersifat hidrofilik dan bagian dalam misel bersifat hidrofobik. Misel dapat memasuki lapisan aqueous yang mengelilingi mikrovili, dimana monogliserida, asam lemak bebas, kolesterol, dan vitamin larut lemak bergerak dengan prinsip difusi aktif. Vitamin larut lemak (vitamin A, D, E, dan K) mengikuti absorpsi lemak, sedangkan vitamin larut air diabsorpsi melalui difusi, kecuali vitamin B12 yang harus berikatan dengan faktor intrinsik (Gartner dan Hiatt 2014; Ward *et al.* 2017).

Kesehatan usus dapat digambarkan dari pH usus, viskositas digesta usus, aktivitas enzim proteolitik usus, jumlah, dan tinggi villi. Adanya enzim protease yang terhidrolisis dalam usus akan meningkatkan ion H^+ sebagai akibat pemecahan protein menjadi asam-asam amino penyusunnya. Waktu ikatan peptide dipecah, gugus karboksil dan gugus amino akan terionisasi. Adanya peningkatan H^+ akan menurunkan pH larutan. Proses hidrolisis ikatan peptida pada protein menyebabkan kandungan NH_3^+ dan COO^- dari protein akan meningkat yang akan meningkatkan kelarutannya, berat molekul dari protein dan polipeptida menurun, dan bersifat hidrofobik. Viskositas yang rendah akan menyebabkan jumlah usus halus lebih banyak dan merangsang tinggi villi yang lebih tinggi. Aktivitas proteolitik usus

berkaitan dengan enzim protease, dimana konsentrasi enzim protease berhubungan dengan aktivitas proteolitik. Enzim protease membantu menetralkan kelebihan komponen nitrogen di dalam usus halus dan mendukung terjadinya dekomposisi sejumlah molekul komponen nitrogen menjadi lebih kecil sehingga mudah diserap. Peningkatan kedalaman kriptas akan menurunkan aktivitas enzim yang disekresikan oleh ujung vili. Kerusakan ileum dapat dilihat dari pelebaran lamina propria, atrofi vili, hiperplasia, penumpukan epitel, penyatuan vili, penumpukan limfosit, dan peradangan pembuluh kapiler (Fitasari 2012).

Tao dan Kendall (2014) menyatakan fungsi utama usus halus ada 2 yaitu proses pencernaan dan penyerapan makanan. Winarno dan Winarno (2017) menyatakan bagian usus halus mengandung bakteri *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*, yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri negatif dan dapat mengurangi penyerapan lemak darah. Bakteri positif dalam saluran pencernaan dapat dimasukkan dalam tubuh dengan minuman probiotik, dimana probiotik akan meningkatkan keseimbangan *microflora* usus. Sedangkan *prebiotic* dapat dikonsumsi dalam bentuk makanan, Salah satu karbohidrat yang termasuk prebiotik yaitu oligosakarida. Oligosakarida dapat terbentuk dari fruktosa dan glukosa serta bahan lain seperti laktosa, selulosa, oligosakarida kedelai, palatinosa, *isomaltose*, glukooligosakarida, dan *xilooligosakarida*. Bakteri di usus halus dapat mengalami pertumbuhan yang berlebihan sehingga tidak ada keseimbangan bakteri baik dan bakteri jahat.

2.7 Mekanisme EVOO dan Madu pada Status Imun dan Kesehatan Pencernaan

EVOO dan madu memiliki kandungan zat gizi yang terlibat dalam mekanisme status imun dan kesehatan pencernaan. Kandungan EVOO yang memiliki kandungan asam lemak, vitamin E, dan senyawa fenol, ditemukan memiliki peran dalam status imun dan kesehatan pencernaan. Kandungan madu yang juga ditemukan beberapa peneliti, memiliki peran terhadap status imun dan kesehatan pencernaan, terutama senyawa fenol. Santangelo *et al.*, (2018) menyatakan EVOO telah dikaitkan, selain kandungan lemak tak jenuh tunggal, dengan adanya senyawa fenolik yang memiliki sifat antioksidan, anti-inflamasi dan imunomodulator. Penelitian *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa EVOO dengan kandungan polifenolnya dapat memperbaiki gejala penyakit pada penyakit inflamasi kronik seperti radang usus, dengan memodulasi beberapa jalur molekuler,

Kandungan zat gizi EVOO dibagi menjadi senyawa mayor dan senyawa minor. Senyawa mayor EVOO yakni asam lemak, sedangkan senyawa minor terdiri dari vitamin, mineral, dan zat bioaktif. Gambino *et al.* (2018) menyatakan EVOO memiliki kemampuan antiinflamasi. Kemampuan antiinflamasi ini, didukung kandungan MUFA (*Monounsaturated Fatty Acids*) yang tinggi. EVOO memiliki kemampuan antiinflamasi dan memodulasi fungsi imun, juga dikarenakan kandungan senyawa minor yang terdiri dari senyawa fenolik, sitosterol, tokoferol dan pigmen. Beberapa senyawa minor ini yang diduga memiliki kemampuan antiinflamasi yakni *hydroxytyrosol*, *tyrosol*, oleuropein, oleokantal, squalen atau sitosterol, menjaga efek antioksidan. Campos *et al.* (2013) menyatakan pakan tikus dicampur dengan EVOO 35,6-71,6% membuktikan hambatan proliferasi limfosit.

EVOO memiliki kandungan asam oleat yang tinggi, Asam oleat berkaitan dengan oksidasi dan stress oksidatif. EVOO juga memiliki kandungan vitamin E

dan senyawa phenol. Kemampuan antiinflamasi EVOO didukung oleh adanya senyawa bioaktif oleokantal (Caramia *et al.* 2012; Ward *et al.* 2017). Kandungan zat dalam EVOO merupakan zat stimulan dalam status imun. Zat stimulan ini dapat dapat menstimulasi makrofag, menyebabkan peningkatan produksi sitokin IL-6 dan TNF- α , dan melepaskan nitrit oksida. Zat stimulan secara in vitro ke dalam suspensi sel peritoneal tikus dapat meningkatkan respiratori, fagositosis, aktivitas killing terhadap sel target. Zat stimulan melalui reseptor mannose yang terdapat di permukaan sel makrofag.

Zat stimulan pada EVOO dapat meningkatkan produksi IL-12 dan maturase dari sel dendritik sehingga sel dendritik sebagai *antigen presenting cell* (APC) dapat meningkatkan ekspresi molekul *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II yang mendukung fungsi limfosit ThCD4⁺ menjadi optimal. ThCD4⁺ berdiferensiasi menjadi 2 subset berdasarkan pola sekresi sitokin setelah distimulasi oleh antigen.

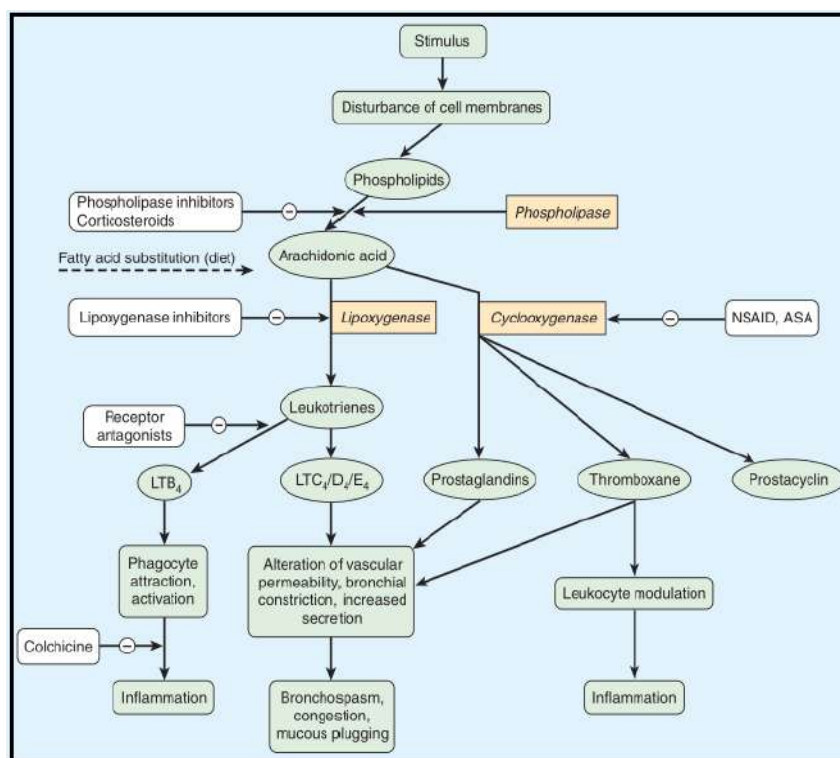
Asam lemak tak jenuh tunggal yang terdapat dalam EVOO terlibat dalam mekanisme perubahan fluiditas membran sel plasma, produksi eikosanoid, mengurangi stres oksidatif, dan mengurangi kematian sel. Perubahan fluiditas membran sel dapat memodifikasi pengikatan sitokin dan memperkuat reseptor. Kondisi ini, menyebabkan juga terekspresi molekul MHC II dan adhesi interselular-1 (ICAM-1). Eikosanoids merupakan mediator lemak yang terlibat dalam inflamasi. Asam lemak tak jenuh dalam EVOO terlibat pada proliferasi limfosit, produksi sitokin, aktivitas sel NK, dan molekul perekat. Asam lemak EVOO terlibat dalam menurunkan proliferasi limfosit. Produksi sitokin berkurang setelah pemberian EVOO. IL-2 merupakan sitokin yang bertanggungjawab untuk proliferasi limfosit T. Sintesis IL-12 berkurang setelah mengonsumsi EVOO. Asam oleat dalam EVOO mengurangi aktivitas sel NK. ICAM-1 merupakan molekul adhesi pada sel leukosit dan sel endotelosit. Asam oleat EVOO juga meningkatkan kapabilitas makrofag untuk menghancurkan patogen (Campos *et al.* 2013).

Calder *et al.* (2002) menyatakan proses asam lemak pada sistem imun melalui peningkatan sintesis membran. Komposisi asam lemak mengubah fluiditas membran sel. Fluiditas membran merupakan regulator dari fagositosis. Fluiditas membran plasma mempengaruhi interaksi antar sel dan fungsi sel. Fluiditas membran sel meningkatkan kerja enzim. Perubahan karakteristik struktur membran plasma mampu meningkatkan kerja eikosanoid dan mengubah aktivitas protein yang berfungsi sebagai transduser sinyal. Pengikatan sitokin dengan reseptornya semakin meningkat.

Katzung *et al.* (2012) menyatakan asam lemak EVOO mempengaruhi fosfolipid pada membran sel. Asam arakidonat dengan enzim siklogenase, menghambat pembentukan eikosanoid, prostaglandin, dan tromboksan, Asam arakidonat menjadi leukotrienes. Leukotrienes merupakan mediator yang menggerakkan aktivasi fagosit sel leukosit. Ada penurunan leukotriene B4 (LTB4) dan IL-6 setelah mengonsumsi EVOO. Asam arakidonat menghasilkan tromboksan yang memodulasi leukosit dalam proses inflamasi (Gambar 21).

Wiedosari (2007) menyatakan efek modulator berasal zat bioaktif dalam EVOO yang meningkatkan aktivitas sel-sel efektor seperti limfosit dan makrofag sehingga memproduksi dan melepaskan sitokin, interleukin (IL)-1, IL-6, IL-12, dan tumor *necrosis factor alpha* (TNF- α). Zat bioaktif meningkatkan maturase sel limfosit T-helper CD4⁺ menjadi Th1 dan imunitas non spesifik dengan meningkatkan sintesis sitokin.

Gambino *et al.* (2018) menyatakan EVOO memiliki kemampuan antiinflamasi dan memodulasi fungsi imun, juga dikarenakan kandungan senyawa minor yang terdiri dari senyawa fenolik, pitosterol, tokoferol dan pigmen. Beberapa senyawa minor ini yang diduga memiliki kemampuan antiinflamasi yakni *hydroxytyrosol*, *tyrosol*, oleuropein, oleokantal, squalen atau sitosterol, menjaga efek antioksidan. Amiot (2014) menyatakan EVOO memiliki peran dalam menurunkan peradangan, dimana CRP dan sitokin IL-6 menurun setelah konsumsi EVOO. Aydar *et al.* (2017) menyatakan *hydroxytyrosol* dalam EVOO menghambat pembengkakan inflamasi dan penekanan sitokin proinflamasi. Larussa *et al.* (2017) menyatakan asupan oleuropein menunjukkan menunjukkan perbaikan kerusakan inflamasi penurunan kadar CD3, CD4, dan CD20 dan peningkatan CD68 pada 14 pasien menderita *ulcerative colitis*.



Gambar 21 Mekanisme asam lemak dalam sistem imun pembentukan eicosonoid

Amiot (2014) menyatakan senyawa fenolik EVOO seperti oleokantal dan estertirosol bekerja dengan menurunkan aktifitas COX-1 dan COX-2. Penghambatan enzim COX menghasilkan pengurangan arakidonat menjadi eicosanoid, prostaglandin, dan thrombosan pada jalur inflamasi. Senyawa fenol seperti oleokantal dan estertirosol juga menghambat COX 1 dan COX-2. Kandungan fenolik EVOO menurunkan ekspresi gen yang terkait dengan inflamasi NF-kB dan COX-2. Hydrositirosol melindungi sel terhadap stress oksidatif. Virruso *et al.* (2014) dan Martin *et al.* (2012) menyatakan mekanisme EVOO melibatkan kerja *hydroxytyrosol* dan *oleocanthal* menghambat siklooksigenase (COX-1 dan COX-2) yang bertanggung jawab untuk produksi prostaglandin, oleuropein sebagai pemulung radikal yang menghambat oksidasi lipoprotein densitas rendah.

Siswanto *et al.* (2013) menyatakan EVOO juga mengandung zat gizi mikro, salah satunya adalah vitamin E. Bersama dengan vitamin E dan karotenoid, semuanya berperan penting untuk status imun dan kesehatan pencernaan sebagai antiinflamasi dan antibakteri. Kandungan vitamin E dalam EVOO juga terlibat dalam sistem imun. Vitamin E sebagai antioksidan juga melindungi membran sel dan menjaga permeabilitas membran. Integritas membran sel mempengaruhi kerja sel Th dalam berinteraksi dengan APC. Peningkatan komunikasi sel juga didukung oleh integritas membran sel yang juga mempengaruhi produksi sitokin. Vitamin E meningkatkan proliferasi sel T (Siswanto 2013). Peningkatan aktivitas dan kapasitas makrofag didukung kerja metabolisme vitamin E yang terdapat dalam EVOO (Lee *et al.* 2018). Ozden *et al.* (2012) menyatakan kandungan vitamin E 100 mg/kg bb, dapat meningkatkan peroksida lipid.

Vitamin E merupakan antioksidan yang berperan pada membran eritrosit dan lipoprotein plasma, dengan mempertahankan integritas membran sel. Vitamin E banyak terdapat di membran sel sehingga vitamin E mampu melindungi membran sel dari radikal bebas. Vitamin E juga memiliki kemampuan menjaga permeabilitas membran sel. Kemampuan membran sel mempengaruhi fungsi imunitas, dimana sel-sel imun pada membran sel akan berinteraksi dengan *antigen presenting cell* (APC). Kemampuan membran sel juga mempengaruhi kemampuan komunikasi sel dan produksi sitokin serta meningkatkan proliferasi sel T. Vitamin E meningkatkan fungsi imun juga melalui peningkatan produksi interferon yang berperan antar komunikasi sel. Produksi sitokin sangat ditentukan oleh reseptor yang terdapat dalam membran sel (Siswanto *et al.* 2013).

Zat besi juga terdapat dalam kandungan EVOO. Zat besi merupakan zat yang terlibat dalam reaksi oksidasi dan reduksi. Keberadaan besi dalam bentuk ion Fe^{3+} dan Fe^{2+} , akan terlibat dalam respirasi sel, dimana besi sebagai kofaktor bagi enzim-enzim dalam reaksi oksidasi reduksi. Respirasi sel sangat mempengaruhi kemampuan sel. Keterlibatan zat besi terbesar dalam imunitas, yaitu saat pembentukan sel-sel limfosit, aktivitas neutrophil, diferensiasi dan proliferasi sel NK serta aktivitas superoksida dismutase (SOD).

Zampa *et al.* (2006) menyatakan mekanisme EVOO dalam kesehatan pencernaan, dengan memodulasi efek dari koloni mikroflora yang dilakukan oleh senyawa phenol. EVOO dapat meningkatkan kesehatan melalui efek positif pada mikrobiota usus. EVOO mempengaruhi permeabilitas usus dan memodifikasi komposisi mikrobiota. De Pablo *et al.* (2014) menyatakan zaitun dapat menjadi media pembawa bakteri probiotik untuk manusia. Adanya peningkatan bakteri positif pada usus dapat meningkatkan fungsi usus dengan adanya pengasaman di epitel usus dan menurunkan permeabilitas usus. Adanya bakteri positif mendukung kondisi homeostatis, produksi dan kerja sitokin oleh makrofag.

Madu memiliki banyak zat yang bermanfaat untuk tubuh. Kandungan madu terdiri dari karbohidrat, protein, asam amino, enzim, vitamin dan mineral, serta senyawa bioaktif (Hosseinzade *et al.* 2019). Kandungan glukosa dalam madu berkaitan dengan metabolisme tubuh yang menghasilkan ATP, survival ukuran dan aktivasi sel, dan produksi sitokin. Glukosa juga memberikan energi bagi limfosit. Madu dapat memunculkan ledakan oksidatif dan meningkatkan kerja makrofag. Adanya akumulasi fagosit, produksi ROS, dan aktivasi thrombin pada kerusakan endotel. Madu juga terlibat dalam memperkuat pensinyalan sel, Erjewa *et al.* (2014) menyatakan madu memiliki potensi sebagai imunostimulan. Madu kaya flavonoid

akan mengaktifkan jalur mitokondria dan melepas protein seperti sitokrom C yang dianggap sebagai agen sitotoksik potensial.

Cortes *et al.* (2011) menyatakan madu meningkatkan kerja sel T dan sel B, serta aktivasi neutrophil. Madu merangsang pelepasan sitokin dan memodulasi proses fagositosis. Efek ini terkait dengan unsur gula dan senyawa bioaktif yang ada pada madu. Gula pada madu lebih mudah dicerna oleh tubuh. Vitamin dan mineral pada madu juga berkaitan dengan sistem imun dan kesehatan pencernaan. Beberapa mineral dalam madu diantaranya zink, potasium, kalsium, zat besi, magnesium, fosfor, selenium, dan kromium. Madu juga mengandung vitamin B1 dan B2, serta beberapa enzim.

Al Waili dan Boni (2003) menyatakan madu terlibat dalam kondisi inflamasi melalui jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan mengaktifkan faktor nuklir kappa B (NF- κ B), menurunkan COX-2, LOX-2, CRP, IL-1, IL-6, IL-10, dan TNF- α . Senyawa fenol pada madu juga berperan dalam aktivitas antiinflamasi. Kandungan senyawa fenol seperti *chrysin*, *quercetin*, asam *ferulic*, asam *ellagic*, hesperetin menurunkan sitokin proinflamasi (TNF- α , IL-1 β dan IL-10) dan NO. *Chrysin* ditemukan mengurangi aktivitas COX-2. Luteolin mengurangi molekul adhesi dan TNF- α , dan mengurangi infiltrasi leukosit dalam jaringan. Quercetin mengurangi CRP dan serum amyloid A serta fibrinogen.

Penelitian tentang madu berkaitan dengan sistem imun dan kesehatan pencernaan sudah pernah dilakukan dan terbukti bahwa madu memiliki potensi sebagai immunostimulan. Erejuwa *et al.* (2014) menyatakan madu memiliki kemampuan menurunkan proliferasi, menurunkan IL-1 dan IL-6. Tonks *et al.* (2003) menyatakan studi in vitro pada supernatant kultur sel 3 madu (manuka, pasture, jelly bush) dengan sel MM6 dengan konsentrasi 1 % (b/v) selama 0-24 jam menunjukkan semua madu signifikan melepas TNF- α , IL-1 β , dan IL-6 dari sel MM6. Owoyele *et al.* (2011) menemukan bahwa tikus Wistar diberi madu dengan dosis 2,61 g/kg untuk studi anti-inflamasi. Pemberian madu secara signifikan mengobati kondisi peradangan akut dan kronis, sebagian disebabkan oleh penghambatan pelepasan NO.

Ebrahimi *et al.* (2016) menyatakan tidak ada efek samping madu selama dan pasca perlakuan. Kelompok perlakuan mengalami penurunan jumlah sel darah putih, sampai batas normal, sedangkan kelompok yang tidak diberi perlakuan tetap memiliki jumlah sel darah putih diatas normal. Kelompok perlakuan mengalami penurunan komplikasi gastrointestinal, secara signifikan. González-Gil *et al.* (2016) menyatakan ada hubungan antara kebiasaan konsumsi selai madu dengan kadar CRP, dimana anak yang kebiasaan mengkonsumsi selai madu memiliki penurunan kadar CRP dalam darah.

Vallianou *et al.* (2014) menyatakan madu memiliki kemampuan merangsang monosit, menjadi prekursor makrofag, untuk mensekresikan TNF- α . Adanya protein glikosilasi dalam madu dapat menginduksi sekresi TNF- α oleh makrofag, dan sitokin ini berperan dalam mekanisme peradangan. Madu juga menstimulasi aktivitas limfosit dan fagosit. Limfosit yakni pembentukan sel darah putih yang berperan penting dalam fungsi kekebalan tubuh, sedangkan fagosit yakni pembentukan sel fagosit.

Pasupuleti *et al.* (2017) dan Al Waili dan Boni (2003) menyatakan flavonoid yang ditemukan dalam madu telah terbukti menginduksi apoptosis dan mencegah pelepasan IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS, dan COX-2. *Mitogen-activated protein*

kinase (MAPK) dan *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) adalah dua jalur utama yang bertanggung jawab untuk respon inflamasi dalam sel. MAPK adalah jalur sinyal utama dalam regulasi proliferasi sel, kelangsungan hidup, dan diferensiasi. NF- κ B adalah faktor transkripsi yang vital dalam pengaturan respon imun dan peradangan. Aktivasi MAPK dan NF- κ B mengaktifkan gen proinflamasi dan menghasilkan protein inflamasi atau sitokin. Ini termasuk *cyclooxygenase-2* (COX-2), *protein C-reaktif* (CRP), *lipoxigenase-2* (LOX-2), interleukin (IL-1 β , IL-6), dan TNF- α . Hal ini disebabkan adanya, *quercetin* dan *kaempferol* (flavonoid dalam madu) dan beberapa protein madu. Madu dapat menurunkan konsentrasi sitokin peradangan seperti TNF- α , IL-1 β , dan IL-6. Nguyen *et al.* (2019) menyatakan mekanisme zat gizi dalam madu pada sistem imun melalui jalur lipoxigenase asam arakidonat. Madu menghambat aktivasi NF κ B oleh TNF- α . Madu juga menghambat produksi ROS. Haynes *et al.* (2011) menyatakan madu memiliki zat bioaktif yang bersifat antiinflamasi. Madu memiliki kemampuan untuk penyembuhan luka dan merangsang pertumbuhan epitel dan jaringan baru.

Li *et al.* (2018) menyatakan madu meningkatkan enzim melalui mediasi *nuclear factor erythroid 2 related factor 2* (Nrf2), mengurangi peradangan dengan inaktivasi *mitogen activated protein kinase* (MAPK), menurunkan regulasi jalur NF- κ B, dan mengurangi apoptosis melalui pengaturan *B-cell lymphoma* (Bcl-2). Madu dapat menghambat aktivasi *toll like receptor* (TLR)2 dan TLR4, dan fosforilasi MAPK, serta mengurangi produksi sitokin proinflamasi (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Jalur pensinyalan intraseluler berkaitan menekan aktivasi jalur NF- κ B, meningkatkan oksidasi asam lemak dengan meningkatkan regulasi PPAR- α , menghambat lipogenesis melalui penurunan regulasi SREBP-1c dengan mengaktifkan MAPK, dengan pengaktifan transkripsi STAT, reseptor diaktifkan PPAR dan TLR. Ibnu (2019) menyatakan proses inflamasi dapat dihambat oleh madu, dengan mempengaruhi pelepasan sitokin jalur sel monosit. Madu menginduksi TNF- α melalui *Toll-Like Receptor* (TLR) 4.

Madu juga memiliki kemampuan prebiotik. Madu memiliki kandungan oligosakarida, sebuah senyawa karbohidrat rantai pendek yang memiliki efek prebiotik pada saluran gastrointestinal. Oligosakarida merangsang pertumbuhan populasi bifidobakteri dan laktobasilli di usus besar, yang difermentasi secara selektif oleh bakteri tersebut. Kejadian ini meningkatkan produksi asam lemak rantai pendek, menurunkan pH, dan mengurangi penyerapan lemak. Bogdanov (2016) menyatakan madu memiliki efek prebiotik dan probiotik. Efek prebiotik pada madu, terkait dengan kandungan senyawa oligosakarida yang meningkatkan jumlah bifidobakterial dan laktobasilli dalam usus. Efek probiotik pada madu, terkait adanya bakteri positif, salah satunya *Gluconobacter oxydans* dalam madu segar India yang berusia 2-3 bulan setelah dipanen. Kandungan madu yang bersifat antibakteri disebabkan adanya *methyglyoxal* (MGO) yang memiliki sifat antibiotik alami, dalam bentuk senyawa *dihydroxyacetone*. Kandungan madu yang bersifat antibakteri disebabkan adanya *methyglyoxal* (MGO) yang memiliki sifat antibiotik alami, dalam bentuk senyawa *dihydroxyacetone*.

Cholid *et al.* (2011) menyatakan pemberian madu menurunkan frekuensi diare dan memperpendek lama hari rawat pada pasien diare akut yang berusia 1-5 tahun. Li *et al.* (2018) menyatakan madu memiliki kandungan quercetin dapat mengembalikan ketidakseimbangan mikrobiota usus dan induksi jalur TLR-4, yang mengakibatkan penyumbatan deregulasi gen metabolisme lipid. Ibnu (2019)

menyatakan madu memiliki sifat antibakteri dengan spektrum luas, tanpa risiko resisten. Sifat antibakteri madu memodulasi imunitas dan inflamasi.

Quercetin menurunkan sitokin proinflamasi TNF- α dan IL-6 serta meningkatkan sitokin antiinflamasi IL-10. Pengaturan makrofag M2 antiinflamasi dan menurunkan makrofag M1 proinflamasi. Li *et al.* (2016) menyatakan quercetin mencegah TNF- α , meningkatkan aktivitas PPAR γ , dan menurunkan NF-kB. Manfaat polifenol memediasi mikrobiota usus.

2.8 Campuran EVOO dengan Senyawa Lainnya beserta Dosis dan Lamanya Perlakuan

Penelitian yang terkait dengan pembuatan campuran EVOO dan madu merupakan kebaruan dari penelitian ini. Penelitian yang sudah ada adalah campuran madu, bee pollen dan EVOO dengan perbandingan 1:1:1, dimana campuran ini dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *Candida albicans* pada penelitian *in vitro* (Al-Waili 2005). Banyaknya dosis zat imunomodulator tidak menunjukkan besarnya efektifitas, namun menunjukkan modulasi yang lebih cepat (Sasmito 2017).

Oswan *et al.* (2017) menyatakan adanya sinergis terapi ibuprofen dengan EVOO dalam mengendalikan peradangan akut. Dosis EVOO dosis 8 mL/kg berat badan pada tikus albino dan dosis ibuprofen 100 mg/kg. Bintari dan Nugraheni (2012) menemukan adanya kenaikan berat badan pada tikus setelah perlakuan EVOO, dimana pemberian 0,5 g (naik berat badan 8,86 g), pemberian 0,7 g (naik berat badan 8,43 g), pemberian 0,9 g (naik berat badan 7,85 g), dengan kendali berat badan sebelum diberi perlakuan. Shobirin *et al.* (2014) melakukan eksperimen untuk mengetahui kadar kolesterol tikus setelah pemberian EVOO 1 ml dan madu 1,35 ml setiap hari, selama 15 hari. Syamsu (2017) menyatakan menggunakan dosis minyak pada penelitian eksperimen yang terkait dengan profile lipid sebesar 0,36 ml/ 200 g berat badan tikus/tiap hari, selama 14 hari, temuan hasil signifikan adanya pengaruh EVOO terhadap penurunan kadar kolesterol total dan LDL. Penelitian terkait hormon fertilitas pada *Rattus novergicus* dengan dosis EVOO 1,5 ml/kgBB, 3 ml/kgBB, 4,5 ml/kgBB, selama 36 hari menunjukkan dosis terbaik 4,5 ml/kgBB (Setiyaningsih *et al.* 2018). Hassanzadeh-Taheeri *et al.* (2019) menyatakan pemberian selama 5 bulan dengan dosis 10 % dan 20 % EVOO pada pakan tikus, tidak memberikan gambaran patologis kelainan ginjal. Hendrasyah *et al.* (2014) menyatakan penelitian kadar HDL pada tikus dengan lama pemberian 15 hari dengan dosis campuran EVOO 1 ml dan madu 1,35 ml. Situmorang *et al.* (2019) menyatakan campuran herbal Andaliman tradisional suku Batak di Indonesia dan EVOO (0,45 g EVOO / 200 g BB) pada tikus, dapat menurunkan tekanan darah secara signifikan. Shobirin *et al.* (2014) menyatakan penggunaan dosis campuran madu 1,35 ml dan EVOO 1 ml selama 15 hari, memberikan pengaruh pada penurunan kadar trigliserida. Djaelani (2015) menyatakan dosis EVOO 10 ml/kg pakan tikus, berpengaruh menurunkan kadar kolesterol.

Veni (2012) menyatakan menggunakan dosis EVOO 4,8 g/hari pada perempuan hiperkolesterolemia selama 6 minggu. Alonso *et al.* (2005) menyatakan lama perlakuan pemberian EVOO pada studi manusia berkisar 3-8 minggu. Ghanbari *et al.* (2012) menyatakan Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat mengizinkan adanya klaim manfaat EVOO pada kesehatan kardiovaskuler

dengan dosis konsumsi 2 sendok makan per-hari. Martin-Peláez *et al.* (2015) menyatakan mengonsumsi EVOO 25 ml/hari selama 3 minggu.

Suplementasi madu sebanyak 20 g dengan penambahan aquadest steril 10 cc per-hari, diberikan secara oral pada balita yang mengalami diare, diberikan dalam waktu 3 kali sehari. Adanya pengurangan frekuensi diare menjadi kurang dari 3 kali sehari. Efek madu terhadap kesehatan manusia dirasakan setelah mengonsumsi selama 2-3 minggu dengan dosis madu 50-80 g per-hari atau 0,8 – 1,2 mg per-berat badan (Cholid *et al.* 2011).

Chepulis dan Starkey (2008) menyatakan 45 tikus *Sprague Dawley* yang mendapatkan makanan ditambah 7,9% sukrosa dan 10 % madu selama 52 minggu mengalami kenaikan berat badan. Vallianou *et al.* (2014) menyatakan madu dapat mengobati tukak lambung dan gastritis, dengan memperbaiki mukosa usus yang rusak, merangsang pertumbuhan jaringan baru, bekerja sebagai agen antiinflamasi, dan meningkatkan penyerapan makanan sehingga mempercepat pertumbuhan. Pemberian madu 0,32 g/100 g berat badan selama 52 minggu menambah berat badan mencit yang berusia 8 minggu. Gollu *et al.* (2008) menyatakan dosis 10 g/kg madu pada tikus dalam penelitian histologi ileum usus halus. Ariefdjohan *et al.* (2008) menyatakan pemberian madu 200, 500, atau 800 mg madu selama 8 minggu diberikan pada tikus untuk mengamati penyerapan kalsium.

Reagen-Shaw *et al.* (2007) menyatakan perhitungan dosis pemberian bahan perlakuan atau dosis ke hewan coba menggunakan metode *The Body Surface Area* (BSA). Metode BSA merupakan konversi dosis menggunakan metode normalisasi luas permukaan tubuh. Metode BSA dikeluarkan dari *Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research, USA*. Metode konversi BSA sudah mempertimbangkan beberapa faktor seperti pengeluaran kalori, metabolisme basal, volume darah, protein plasma, dan fungsi ginjal. BSA menggunakan faktor K_m dalam perhitungan. Faktor K_m manusia dewasa adalah 37, faktor K_m hewan coba tikus yaitu 6, sedangkan mencit faktor K_m nya adalah 3, faktor K_m kelinci yaitu 12. Rumus perhitungan dosis berdasarkan metode BSA.

$$\text{Dosis Manusia (mg/kg)} = \text{Dosis Hewan (mg/kg)} \times \frac{\text{Hewan } K_m}{\text{Manusia } K_m}$$

Gambar 22 Perhitungan konversi dosis manusia dan dosis hewan coba

2.9 *Rattus norvegicus*

Penelitian eksperimen menggunakan hewan percobaan merupakan penelitian yang memiliki waktu relative singkat dengan hasil akhir yang bervariasi. Penelitian imunologi sering menggunakan hewan percobaan karena objek penelitiannya dapat dikontrol. Keberhasilan penelitian ditentukan juga dengan keberhasilan menjaga stabilitas kondisi hewan percobaan. Menjaga kestabilan hewan percobaan dengan memperhatikan pakan yang mengandung komposisi zat gizi seimbang seimbang, adanya kestabilan suhu, kelembaban, intensitas cahaya, dan kenyamanan hewan percobaan sehingga tidak mengalami stress.

Jenis hewan percobaan yang sering digunakan untuk studi imunologi antara lain tikus, mencit, marmot, rat dan ayam. Mikroba akan menekan proses pembentukan antibodi atau bersifat imun supresif. Penelitian imunologi

membutuhkan hewan percobaan yang bebas mikroba sehingga hewan percobaan perlu dipelihara dalam tempat dengan lingkungan yang steril. Studi fungsi makrofag menggunakan hewan percobaan, dengan pengambilan makrofag dari peritoneum hewan percobaan, yang kemudian diletakkan pada cawan petri, setelah itu diberikan stimulan. Pengamatan yang dilakukan adalah peristiwa fagositosis yang terjadi disertai keluarnya berbagai macam bahan sekret. Fungsi makrofag dinilai dari derajat kecepatan fagositosis dan tinjauan kimia pada sekret yang dihasilkan. Makrofag dari *peritoneum* diperoleh dengan cara menginfeksi hewan percobaan dengan mikroba secara parenteral, umum atau lokal secara *intraperitoneal* (Malole dan Pramono, 1989).

Kementerian Pertanian (2017) menyatakan hewan percobaan tikus terdiri dari tikus hitam (*Rattus rattus*) dan tikus putih (*Rattus norvegicus*). Penentuan *Rattus norvegicus* sebagai hewan percobaan dikarenakan ada kemudahan untuk kontrol pakan, kontrol kesehatan, kontrol umur, bobot badan, jenis kelamin, dan kontrol silsilah genetik.

Rattus norvegicus, salah satu hewan coba yang sering digunakan dalam penelitian status imun dan kesehatan pencernaan, Umur *Rattus norvegicus* 4-5 bulan dengan bobot badan tikus putih jantan 267-500 g sedangkan tikus putih betina 225-325 g. *Rattus norvegicus* mempunyai 3 galur yaitu *Sprague Dawley*, *Wistar*, dan *Long Evans*. Galur *Sprague Dawley* memiliki tubuh yang ramping, kepala kecil, telinga tebal, dan rambut halus dan pendek, ekor lebih panjang daripada badan. Kelebihan *Rattus norvegicus* memiliki pola makan omnivora, saluran pencernaan dengan tipe *monogastric*, mudah dicekok, tidak mengalami muntah, dan tidak memiliki kantung empedu (Kementerian Pertanian 2017).

Persiapan penelitian dimulai dari persiapan kandang tikus putih. Kandang, ukuran 45 x 30 x 15 cm yang terbuat dari plastik dan kawat, dengan sekam padi sebagai alas kandang. Kandang mencit dibuat sesuai standar antara lain kelembaban kandang berkisar 40-70 %, dengan suhu 21-24°C dan ventilasi udara 15 ACH (*air change per hour*) serta kadar ammonia dibawah 22 ppm. Tiap kandang terdapat tempat pakan dan minum. Pakan *Rattus norvegicus* sesuai standar dan air minum *ad libitum*. Kebutuhan air minum *Rattus norvegicus* adalah 15 ml/100 g/hari (sekitar 5-8 ml/ekor/hari) sedangkan kebutuhan berat pakan kering sekitar 48 g/ekor/hari (Maulan dan Syahrudi (2017).

Rattus norvegicus diletakkan pada bidang permukaan yang kasar, kemudian dipegang tengkuknya dengan ibu jari dan jari telunjuk dan ekor tetap dipegang. Sarung tangan atau *forcep* harus dibersihkan dengan desinfektan seperti *vircon* setiap kali memindahkan *Rattus norvegicus* dari kelompok lainnya. Perlakuan jika pengambilan darah dilakukan beberapa kali maka pengambilan darah *Rattus norvegicus*, direkomendasikan volume darah 1,5 % dari total berat badan *Rattus norvegicus*, dan bisa diambil kembali setelah 2 minggu. Jika pengambilan darah interval mingguan maka volume darah 0,5 % dari berat badan *Rattus norvegicus*. *Rattus norvegicus* dewasa ukuran 78-80 ml/kg, dapat diambil sekitar 10 % dari berat badan. Setiap melakukan injeksi pada *Rattus norvegicus* perlu digunakan jarum suntik baru dan steril, serta selalu menyuntikkan dengan bevel jarum menghadap ke atas. Kementerian Pertanian (2017) menyatakan suntikan *intraperitoneal* dapat dilakukan pada bagian kuadran *posterior abdomen* (Gambar 23). Tikus dipegang pada bagian punggungnya, jarum diinjeksikan di posisi bawah lekukan lutut, kiri atau kanan dari garis tengah. Saat penelitian, menghindari

injeksi pada garis tengah untuk mencegah penetrasi ke dalam kantung kemih. Sudut kemiringan jarum sekitar 45° ke tubuh.



Gambar 23 Posisi hewan coba (mencit) pada saat penyuntikan intraperitoneal

Saat anestesi pada tikus, dibutuhkan pertimbangan strain, umur, berat badan, mikroba yang diinduksi, dan jenis prosedur eksperimental. Pengaruh anestesi berjalan cepat karena ukuran tubuh *Rattus norvegicus* yang kecil. Obat anestesi yang digunakan *Ketamine* sebanyak 40-75 mg/kg BB tikus dan *Xylazine* 5-12 mg/kg BB tikus.

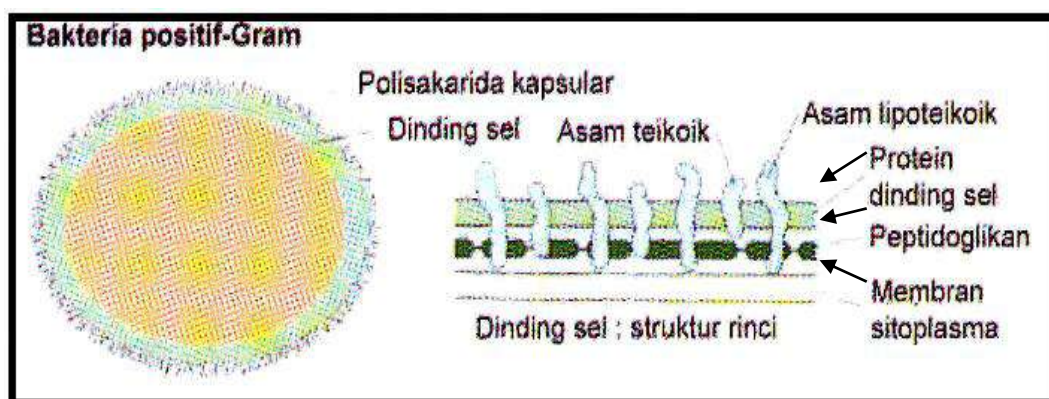
Penelitian ini menggunakan *Ketamine* 75 mg/kg BB tikus dan *Xylazine* 12 mg/kg BB tikus. Jika bobot badan tikus 200 g maka *Ketamine* yang diberikan 0,15 ml dan *Xylazine* 0,12 ml. Tikus tidak puasa sebelum dianestesi karena tikus tidak memiliki reflek muntah. Pre-anestesi *transquilizer* dan analgesika dapat diberikan pada tikus untuk mengurangi ketakutan, stress dan mempercepat fase pemulihan. Anestesi pada tikus dilakukan secara injeksi atau inhalasi,

Penanganan hewan coba memenuhi prinsip 3 R (*Replacement, Reduse, Refinement*) dan 5 F (*Freedom from hungry and thirsty, freedom from discomfort, freedom from pain, injury, and disease, freedom from fear and distress, freedom to express natural behavior*). *Replacement* dilakukan dengan memilih hewan coba strata bawah. *Reduse* dilakukan dengan meminimalkan jumlah hewan coba yang digunakan. *Refinement* dilakukan dengan memberikan kesejahteraan pada hewan coba. Hewan coba harus bebas dari lapar dan haus, memperhatikan ketersediaan makanan dan minuman. Hewan coba bebas dari ketidaknyamanan (*discomfort*), memberikan perlakuan yang menyenangkan hewan coba dengan memberikan kenyamanan (*inconvenience*). Hewan coba bebas dari luka dan penyakit. Hewan coba bebas untuk mengekspresikan kebebasannya, misalnya dengan memberikan kandang tempat tikus dipelihara harus menjamin keleluasan gerak tingkah laku tikus, keleluasan penglihatan, dan keleluasan penciuman.

2.10 *Staphylococcus aureus*

Beberapa penelitian *in vivo* atau *in vitro*, yang terkait manfaat madu dan EVOO untuk kesehatan, menggunakan bakteri *S. aureus*. Triana (2014) menyatakan *S. aureus* sering berada di saluran pencernaan atau selaput mukosa. Bakteri *S. aureus* ini merupakan bakteri aerob dan berjenis gram positif yang

tumbuh pada suhu optimum 37°C. *S. aureus* merupakan salah satu bakteri yang bersifat resisten terhadap antibiotik ampicillin. Karimela *et al.* (2017) menyatakan *S. aureus* memiliki karakteristik fisik berbentuk bulat, bergerombol, berdiameter 0,5 µm - 1 µm. Harris *et al.* (2002) menyatakan *S. Aureus* mlebih banyak ditemukan di lingkungan rumah sakit, yang menginfeksi pasien dengan menurunkan kekebalan tubuh pasien. *S. aureus* dapat menginfeksi sampai ke pembuluh darah dan jaringan limfatik. Kemudahan melihat *S. aureus* dikarenakan bakteri *S. aureus* berbentuk kokus (bulat). Bakteri gram positif hanya memiliki membran.



Gambar 24 Dinding membran sel pada bakteri gram positif

Barata Dinding bakteri gram positif terdiri dari asam lipoteikoik, asam teikoik, protein dinding sel, peptidoglikan, dan membran sitoplasma. Ewnetu *et al.* (2014) menyatakan pada penelitian *in vitro*. *S. aureus* ATCC 25923 memiliki penghambatan pada test isolasi bakteri sebesar 22,5 mm pada medium yang berisi madu. Noori dan Waili (2005) menyatakan *S. aureus* dapat dihambat pada konsentrasi minimum madu pada media sebesar 50%. Uthurry *et al.* (2011) menyatakan *S. aureus* tidak tumbuh di madu, aktivitas anti-mikroba berkaitan dengan senyawa fenolik yang terkandung di madu. Madu lebih sensitive pada bakteri gram positif daripada gram negatif. Komposisi fenolik madu dan keberadaan hidrogen peroksida berkaitan dengan kemampuan antimikroba madu.

Medina *et al.* 2006 menyatakan *S. aureus* tidak bertahan setelah 1 jam kontak dengan EVOO. *Oleuropein*, *hydroxytyrosol* dan *tyrosol* merupakan senyawa fenolik yang secara statistik berkorelasi dengan kelangsungan hidup bakteri, Estevinho *et al.* (2008) menyatakan madu warna hitam lebih memiliki aktivitas antimikroba dibandingkan madu terang. Bakteri *S. aureus* merupakan mikroorganisme yang paling sensitif untuk uji antimikroba pada madu dibandingkan *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus lentus*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Escherichia coli*.

Nešović *et al.* (2020) menyatakan lebih efektif dengan penggunaan bakteri gram positif dalam penelitian madu. Bakteri gram positif tidak memiliki membran luar tetapi memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal di dinding sel bakteri gram positif yang melindungi membran sel. Membran sel dari bilayer fosfolipid memiliki karakter amfifilik. Dinding bakteri *S. aureus* terdiri dari asam lipoteikoik, asam teikoik, protein dinding sel memiliki asam lipoteikoik.

2.11 Kerangka Pemikiran

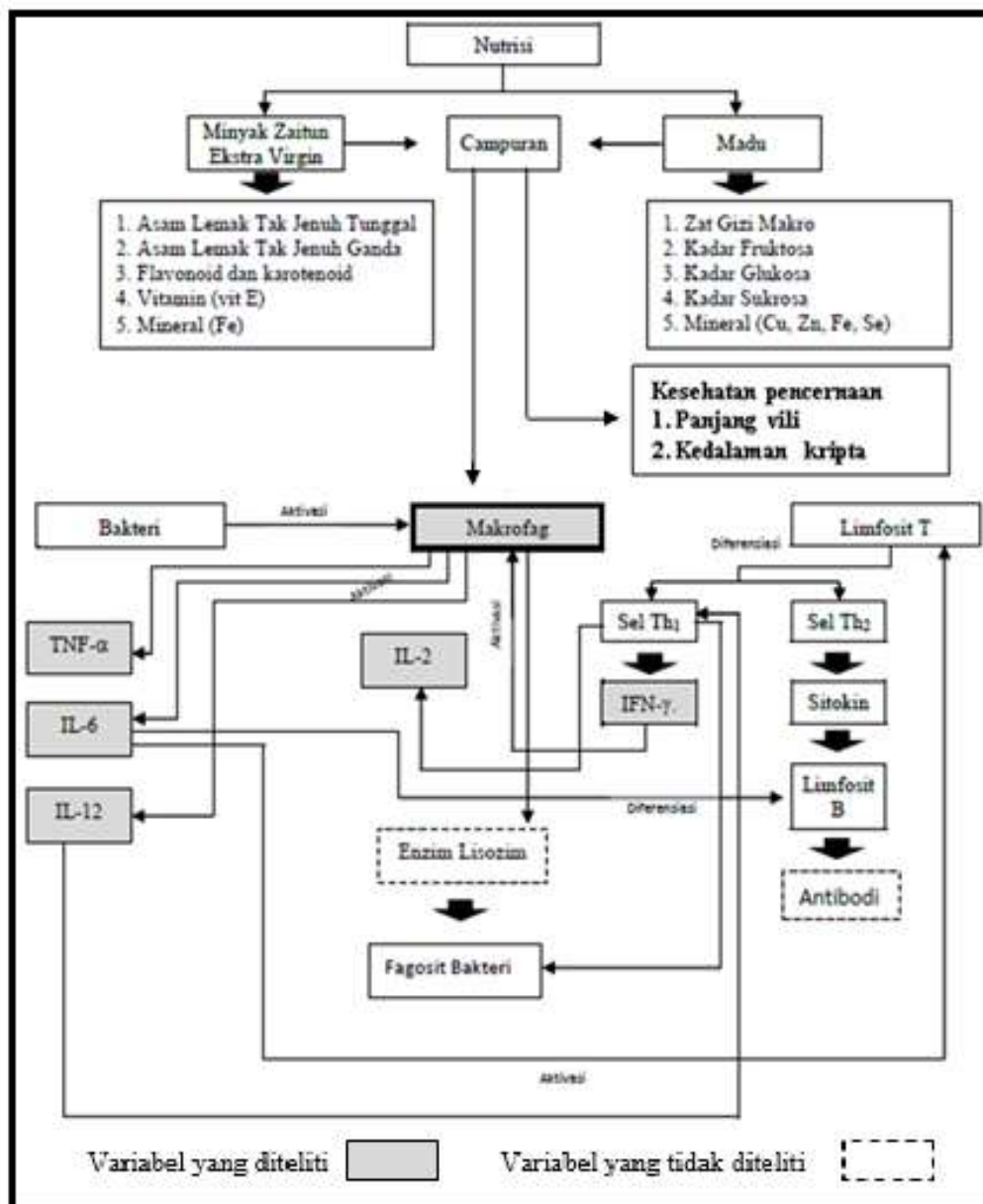
EVOO dan madu memiliki banyak kandungan zat gizi yang dapat meningkatkan daya tahan tubuh atau mengatur sistem imun tubuh. EVOO mengandung beberapa zat antara lain asam lemak tak jenuh tunggal, asam lemak tak jenuh ganda, senyawa fenolik, vitamin, dan mineral. Madu mengandung banyak zat diantaranya fruktosa, asam fenolik, enzim, vitamin, dan mineral. Campuran EVOO + madu, akan memiliki kandungan zat gizi lebih banyak daripada pemberian hanya EVOO saja atau madu saja. Campuran EVOO + madu, memiliki komponen yang akan menstimulus sistem imun dan meningkatkan kerja vili serta kriptus halus. Asam lemak tak jenuh pada EVOO menjadi salah satu komponen terbesar dalam membran sel.

Sistem imun bersifat kompleks. Makrofag adalah salah satu bagian dari sel darah putih yang diproduksi oleh sel induk di sumsum tulang belakang, yang memiliki kemampuan mengembara ke semua sel. Jenis makrofag ada 2 yakni makrofag yang beredar dalam sel-sel dan makrofag yang menetap dalam sel. Fungsi makrofag adalah menfagosit benda asing salah satunya bakteri. Makrofag membentuk kantong yang disebut fagosom dan di membran sel terdapat lisosom yang berisi enzim hidrolitik untuk mencerna bakteri. Salah satu enzim yang disekresikan oleh makrofag yakni lisozim. Lisozim akan menyerang dinding sel beberapa bakteri. Mekanisme lisozim menyerang dinding sel bakteri dengan memutuskan rantai ikatan -1,4-glikosida antara asam-N-asetil glukosamin dengan asam-N-asetil pada peptidoglikan. Setelah proses fagositosis berjalan, makrofag mengeluarkan protein yang mampu mengidentifikasi kuman tersebut, Setelah itu makrofag mengeluarkan enzim mikrobioksidase untuk membunuh kuman.

Makrofag memberikan sinyal pada sel limfosit, tentang keberadaan kuman tersebut. Hal ini, makrofag akhirnya dikenal sebagai *Antigen Presenting Cells* (APC). Makrofag juga teraktivasi oleh kuman/bakteri yang masuk ke dalam tubuh. Bakteri memiliki reseptor yang dikenal dengan *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP), seperti lipopolisakarida pada dinding kuman atau peptidoglikan. Lipopolisakarida merupakan PAMP untuk bakteri negatif dan peptidoglikan untuk bakteri positif. Kemudian reseptor dalam sistem imun, yang dikenal sebagai *Pattern-Recognition Receptor* (PRR) mengenali PAMP. PRR menjadi peringatan dini dalam tubuh, sehingga respon imun alami menjadi cepat. PRR sebagian besar ditemukan pada makrofag. Ikatan antara PRR dengan PAMP menimbulkan aktivasi jalur sinyal intraseluler, secara umum dikenal dengan inflamasi dan adanya ikatan molekul bakteri dengan reseptor permukaan makrofag memicu proses penghancuran bakteri atau makrofag teraktivasi melakukan fagositosis. Penghancuran bakteri dilakukan dengan serangan respiratori dari makrofag yang aktif. Proses ini melepaskan salah satu ROS.

Makrofag memberikan sinyal pada sel limfosit, tentang keberadaan kuman tersebut. Hal ini, makrofag akhirnya dikenal sebagai *Antigen Presenting Cells* (APC). Makrofag juga teraktivasi oleh kuman/bakteri yang masuk ke dalam tubuh. Bakteri memiliki reseptor yang dikenal dengan *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP), seperti lipopolisakarida pada dinding kuman atau peptidoglikan. Lipopolisakarida merupakan PAMP untuk bakteri negatif dan peptidoglikan untuk bakteri positif. Kemudian reseptor dalam sistem imun, yang dikenal sebagai *Pattern-Recognition Receptor* (PRR) mengenali PAMP, PRR menjadi peringatan dini dalam tubuh, sehingga respon imun alami menjadi cepat. PRR sebagian besar

ditemukan pada makrofag. Ikatan antara PRR dengan PAMP menimbulkan aktivasi jalur sinyal intraseluler, secara umum dikenal dengan inflamasi dan adanya ikatan molekul bakteri dengan reseptor permukaan makrofag memicu proses penghancuran bakteri atau makrofag teraktivasi melakukan fagositosis. Penghancuran bakteri dilakukan dengan serangan respiratori dari makrofag yang aktif. Proses ini melepaskan salah satu ROS yakni zat H_2O_2 (hidrogen peroksida) untuk membunuh kuman. Makrofag juga bekerjasama dengan sel *mast*, yakni sel jaringan besar yang melepaskan mediator inflamasi, kemudian meningkatkan permeabilitas vaskular.



Gambar 24 Kerangka pemikiran

Molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) merupakan sistem molekul yang heterogen. MHC pada semua sel merupakan MHC I, sedangkan MHC II pada makrofag dan sel dendrit. MHC menyajikan peptida antigenik pada

reseptor sel T. Proses ini terjadi pada makrofag yang mengirim informasi tentang antigen pada limfosit T melalui molekul MHC II. Setelah itu limfosit T mensekresikan beberapa sitokin. Sitokin merupakan sebuah glikoprotein. Sitokin dapat berasal dari sel T helper, sel natural killer (NK) dan makrofag. Jumlah sitokin banyak dan memiliki perbedaan fungsi dan perbedaan asal terbentuknya.

Limfosit merupakan sel kecil dalam darah yang memiliki siklus dari jaringan kembali ke limfe atau sebaliknya, dikenal sebagai sel limfoid. Sel limfoid terdiri dari sel B dan sel T serta sel NK. Sel T berdiferensiasi menjadi sel Th₁ dan sel Th₂. Makrofag yang teraktivasi, kemudian memproduksi beberapa sitokin seperti TNF- α , IL-12, dan IL-6. Limfosit Th₁ yang teregulasi oleh IL-12 dan IFN- γ , memproduksi sitokin proinflamasi seperti IL-2 dan IFN- γ . IFN- γ akan mengaktivasi makrofag untuk melakukan fungsi fagositnya. Proses ini berjalan secara kompleks. Limfosit T yang berdiferensiasi menjadi sel Th₂ yang menghasilkan sitokin untuk peningkatan kerja limfosit B sebagai produsen antibodi.

Campuran EVOO dan madu juga mendukung kesehatan pencernaan. Penelitian ini mengamati panjang vili dan kedalaman kriptas sebagai bagian kesehatan pencernaan. Vili dan kriptas yang diukur merupakan bagian dari usus halus tikus.

III METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu pelaksanaan penelitian adalah bulan Mei 2018 sampai Juli 2019. Penelitian ini melakukan analisis sifat kimia serta zat gizi EVOO dan madu di Balai Besar Industri Agro (BBIA) Bogor. Analisis aktivitas dan kapasitas makrofag dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB Bogor. Analisis sitokin interleukin 12 (IL-12), Interleukin 2 (IL-2), dan Interferon gamma (IFN- γ) dan analisis panjang vili serta kedalaman kriptas usus halus dilakukan di PSSP (Pusat Studi Satwa Primata) IPB Bogor.

3.2 Alat dan Bahan

Sampel produk EVOO dan sampel produk madu menjadi bahan perlakuan di penelitian ini. Sampel produk EVOO dan madu yang digunakan 1 merek sampel. Sampel produk EVOO dan madu berasal dari supermarket besar di DKI Jakarta. Bahan yang digunakan untuk pemeliharaan dan penanganan hewan coba yakni obat cacing (*combantrin*) dan AIN-93M. Bakteri yang digunakan *S. aureus* dari Laboratorium Bakteriologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB Bogor. Bahan kimia yang digunakan untuk pemeriksaan kimia EVOO dan madu meliputi alkohol 95%, larutan *Wijs*, larutan pati, NaOH, KOH 0,1 %, asam asetat glasial, Na₂S₂O₃ 0,1 N, kloroform, metanol, alkohol netral, indikator *Phenolphthalein*, HCL 0,5 N, dan Aquades. Bahan kimia yang digunakan untuk pemeriksaan makrofag, sitokin, panjang vili, dan kedalaman kriptas meliputi *Ketamine*, *Xylazine*, *NaCl*, pewarna Giemsa 10%, metanol, etanol, *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10 %, *Xylo*, aquades, paraffin, dan minyak imersi.

Alat yang digunakan untuk pemeriksaan EVOO dan madu antara lain oven, kertas saring, timbangan analitik, *cabinet dryer*, labu erlenmeyer, *hot plate*, pendingin, refraktometer *abbe*, corong pemisah, *vochdost*, pipet ukur, gelas kimia, penangas air, termometer, blender, piknometer, gelas ukur, peralatan ekstraksi *soxhlet*, buret, dan desikator. Alat pemeriksaan makrofag, sitokin, panjang vili dan kedalaman kriptas tikus meliputi sonde, jarum suntik 1 ml, 3 ml, dan 5 ml, kit bedah hewan coba, mikro pipet, *effendorf*, *cover glass*, *object glass*, *colony counter*, botol gelas ukuran 250 ml, gelas ukur, tabung EDTA, tabung *vaccutainer* kecil, alat mikrosentrifus (Sigma 16,000 rpm), kit Elisa, *Elisa reader*, mikroskop cahaya beserta kamera (Nikon Eclipse 80i, DS Fil, Jepang), sarung tangan, dan masker.

3.3 Prosedur Kerja

Penelitian awal dilakukan analisis sifat kimia dan kandungan zat gizi sampel produk EVOO dan sampel produk madu. Penelitian utama merupakan penelitian eksperimen pada hewan coba dengan desain faktorial, dengan pengamatan variabel bahan perlakuan dan waktu perlakuan. Pengujian perlakuan dilakukan secara *in vivo*, Tahapan penelitian terdiri dari :

1. Pemeriksaan karakteristik kimiawi dan kandungan zat gizi sampel produk EVOO dan sampel produk madu.
2. Pengambilan darah dan pemeriksaan darah untuk uji sitokin (IL-12, IL-2, dan IFN- γ).

3. Pengambilan dan pemeriksaan cairan peritoneal untuk uji aktivitas dan kapasitas makrofag.
4. Pengambilan dan pemeriksaan histologi usus halus untuk analisis panjang vili dan kedalaman kript.

Tahapan penelitian 2 sampai 4 dilakukan setiap minggu. Tahapan sebagai berikut :

- a. Tahapan Penelitian I : Identifikasi sifat kimiawi dan kandungan zat gizi sampel produk EVOO dan madu.

Beberapa variabel pengamatan pada sampel produk EVOO. Sifat kimia meliputi air, abu, bilangan iod, bilangan penyabunan, dan bilangan asam. Asam lemak meliputi asam laurat, asam miristat, asam palmitat, asam stearat, asam oleat, asam linoleat, dan asam linolenat. Zat gizi minor meliputi vitamin E, zat besi, total flavonoid, dan total karotenoid.

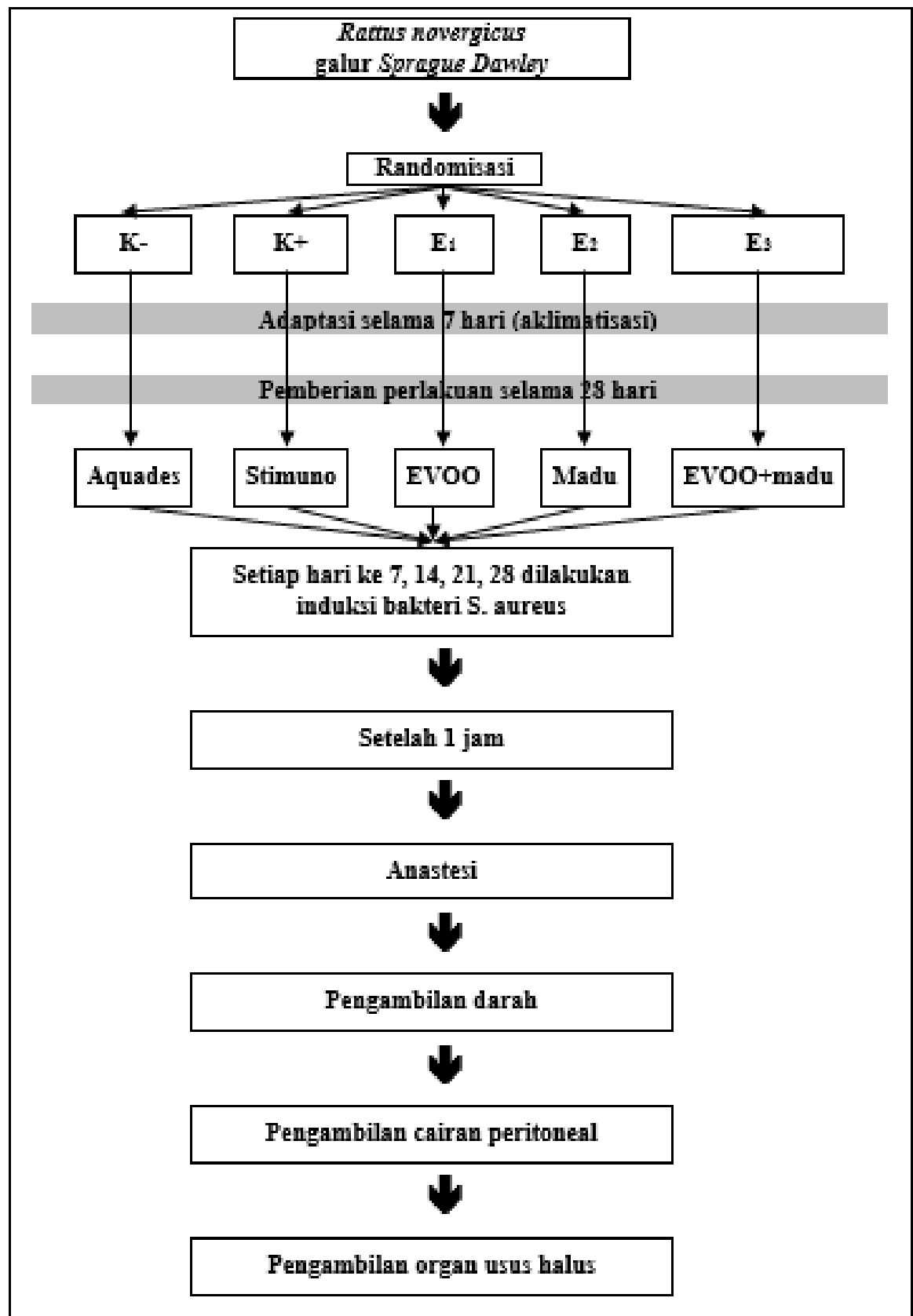
Pengujian sampel yang berkaitan dengan sifat kimia EVOO dilakukan dengan beberapa metode yakni SNI 01-3555-1998 (air), SNI 01-3555-1992 (abu), SNI 01-3555-1998 (bilangan iod, bilangan penyabunan, bilangan asam). Pemeriksaan kadar asam lemak dengan metode GC sesuai IUPAC metode 2,301. Pemeriksaan total flavonoid dan total karotenoid, dengan teknik spektrofotometer. Pemeriksaan vitamin E dengan HPLC, Pemeriksaan zat besi dengan metode AOAC 999.11. Bahan dan alat yang digunakan sesuai dengan standar prosedur yang akan dilakukan. Analisis data dilakukan dengan analisis deskriptif.

Identifikasi sampel produk madu meliputi aktivitas enzim diastase, pH, keasaman, kadar air, dan kadar abu. Analisis kadar gula pada sampel produk madu meliputi glukosa, fruktosa, dan sukrosa. Kandungan zat gizi makro meliputi energi, karbohidrat, protein, dan lemak. Beberapa kandungan mineral dalam madu juga diidentifikasi (Cu, Zn, Fe, dan Selenium). Zat bioaktif yang diamati yakni total flavonoid dan total karotenoid.

Pemeriksaan pH dengan metode SNI 01-2891-1992. Pemeriksaan air dengan metode SNI 3545:2013, pemeriksaan abu dengan SNI 01-2891-1992, metode SNI 3545:2013 untuk mengetahui bilangan keasaman dan enzim diastase. Pemeriksaan energi dan karbohidrat dengan metode IK.5.4.5, pemeriksaan protein dan lemak dengan metode SNI 01-2891-1992. Metode HPLC untuk pemeriksaan gula (sukrosa, glukosa, fruktosa). Analisis kandungan mineral menggunakan dengan metode AOAC 999.11. Metode spektrofotometer untuk analisis total flavonoid dan total karotenoid. Analisis data pada tahapan ini, menggunakan analisis deskriptif dengan menampilkan hasil pemeriksaan yang diperoleh dari laboratorium.

- b. Tahapan Penelitian II-IV : Studi hewan coba untuk mengetahui kadar beberapa sitokin, aktivitas dan kapasitas makrofag, panjang vili usus halus serta kedalaman kript.

Penelitian berkaitan dengan makrofag, sitokin, panjang vili, dan kedalaman kript, dilakukan dengan metode eksperimen. Desain yang digunakan adalah desain faktorial. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini yakni bahan perlakuan dan lamanya perlakuan.



Gambar 26 Alur Penelitian

3.4 Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba. *Rattus norvegicus* yang berjenis kelamin jantan, dari galur *S. Dawley*. Tikus yang digunakan berumur 2-3 bulan dengan bobot badan 150-200 g. Bratawidjaja dan Rengganis (2014) menyatakan adanya kemiripan sistem imun antara hewan rat dengan sistem imun manusia, dan hewan golongan rat memiliki imunitas alamiah yang kuat. *Rattus norvegicus* dengan alur *Sprague Dawley* memiliki respon yang kuat untuk sistem imun seluler dan humoral, Tikus yang digunakan berjenis kelamin jantan. Pemilihan jenis kelamin jantan dikarenakan kondisi tikus jantan tidak banyak dipengaruhi oleh kondisi hormon. Umur tikus yang digunakan umur 2-3 bulan dan bobot badan 150-250 g (Sulistiani dan Rahayuningsih 2015).

Ada 5 kelompok hewan coba yang terdiri dari 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok positif, dan 3 kelompok eksperimen, dimana pengamatan akan dilakukan pada 4 waktu. Jumlah tiap kelompok ada 4 tikus. Perhitungan rumus menggunakan rumus *Federer*. Sumber hewan coba dari Balai Besar Penelitian Veteriner, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian. Kriteria pemilihan tikus antara lain : jenis kelamin, umur dan berat badan tikus sesuai kriteria, tikus sehat dan lincah. Tikus akan dikeluarkan sebagai sampel jika tikus tersebut mengalami bobot badan yang turun, mengalami sakit, dan mati saat masa penelitian. Tikus dipilih ke tiap kelompok secara random. Selama penelitian, penanganan hewan coba sudah menimbangankan prinsip 3 R dan 5 F. Selama penelitian, penggunaan hewan coba sudah memenuhi prinsip *Replacement*, *Reduse*, dan *Refinement*. Penelitian sudah memilih hewan coba terendah dalam klasifikasi, menggunakan sampel minimal, dan memberikan kesejahteraan pada hewan coba. Selain itu, hewan coba dipelihara dengan baik dalam masa adaptasi penelitian dengan kondisi terjaga dari kelaparan dan kehausan (*Freedom From Hungry and Thirsty*), ketidaknyamanan (*Freedom From Discomfort*), tidak mengalami rasa sakit, cedera, dan penyakit (*Freedom From Pain, Injury and Disease*), tidak mengalami ketakutan dan kesusahan (*Freedom From Fear and Distress*) serta hewan coba dapat berperilaku secara alami (*Freedom to Express Natural Behaviour*).

Tikus dipelihara terlebih dahulu dalam kandang selama 7 hari, Ukuran kandang 50 x 30 x 20 cm. Tiap kandang diisi oleh 2 tikus. Suhu kandang 26 ± 2 °C dan kelembaban berkisar 30-40%, pencahayaan 12 jam terang dan gelap. Selama pemeliharaan tikus diberi sirup *combantrin* 0,012 ml/kg BB. Kandang dibersihkan setiap hari, alas kandang (beeding) diganti 2 kali seminggu. Pakan tikus menggunakan merek *American Institute of Nutrition* (AIN)-93M dan minum secara *ad libitum*. AIN-93M yang digunakan memiliki kandungan serat 4,38 g, lemak kasar 6,17 g, protein kasar 13,8 g, bahan kering 88 g, kandungan mineral kalsium 1,49 g, fosfor 0,58 g, nitrogen 59,68 g. El-Arab *et al.* (2006) menyatakan pakan AIN-93 M terkandung, protein (14%), pati (62,07%), sukrosa (10%), lemak (4%), serat (5%), campuran mineral (3,5%), campuran vitamin (1%)), L-sistin (0,18%), bitratat kolin (0,25%), dan tetra-butylhidrokuinon (0,00008%).

Setelah adaptasi selama 7 hari, pada hari ke 8, tikus diberikan bahan perlakuan sesuai dengan hasil hitung rumus konversi pakan. Pemberian bahan perlakuan dilakukan sampai 28 hari. Pada hari ke 7, 14, 21, dan ke 28, dilakukan

uji makrofag dan sitokin serta pengambilan organ usus halus. Tiap kelompok diambil 5 ekor tikus pada hari pengamatan tersebut.

3.5 Bahan Perlakuan : Dosis EVOO, madu, dan Campuran EVOO+madu

Bahan perlakuan terdiri dari EVOO, madu dan campuran EVOO+madu. Merek EVOO dan madu yang digunakan memiliki kandungan flavonoid tertinggi. Campuran EVOO+madu yang dilakukan dengan perbandingan 1:1 tanpa penambahan emulsifier. Pembuatan bahan perlakuan dilakukan tiap hari. Bahan perlakuan yang diberikan ke tikus sesuai dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Dosis Tikus} = \text{Dosis Manusia (mg/kg)} \times \frac{\text{KM manusia (37)}}{\text{KM tikus (6)}}$$

Gambar 25 Rumus perhitungan sampel hewan coba

Kontrol positif (Stimuno) hanya diamati untuk melihat pengaruh EVOO, madu dan campuran EVOO+madu terhadap status imun, sedangkan pengaruh EVOO, madu dan campuran EVOO+madu terhadap kesehatan pencernaan (panjang vili dan kedalaman kript) hanya menggunakan kontrol negatif. Kontrol negatif hanya diberikan aquades sebanyak 1 ml. Pemberian bahan uji madu pada tikus dilakukan dengan pengenceran terlebih dahulu, dengan penambahan aquades (Mustaba *et al.* 2012).

Dosis madu yang diberikan 0,8 g/ekor/hari. Dosis EVOO yang diberikan 0,185 g/ekor/hari. Dosis campuran dengan menambah dosis EVOO dan madu. Dosis stimuno 0,25 ml/ ekor/ hari. Dosis akuades 1 ml/ ekor/hari.

Tikus dipilih ke tiap kelompok secara random. Kelompok yang dibuat ada 5 kelompok untuk analisis sitokin dan makrofag, sedangkan analisis panjang vili dan kedalaman kript hanya menggunakan 1 kelompok control. Pemberian perlakuan dilakukan selama 28 hari. Pengambilan darah, cairan makrofag, dan organ usus halus dilakukan setiap hari ke 7, 14, 21, dan 28, diambil 5 tikus dari tiap kelompok,

Tahapan tindakan yang dilakukan, tikus diinduksi bakteri *S. aureus* sebanyak 1 ml dengan konsentrasi 10^8 cfu, pada bagian intraperitoneal, Setelah 1 jam, tikus dianestesi dengan *Ketamine* 0,15 ml dan *Xylazin* 0,12 ml. de-Moraes *et al.* (2018) menyatakan membius tikus melalui intraperitoneal injeksi *Ketamine* dan *Xylazin*. Kemudian pengambilan darah tikus dari jantung secara maksimal atau *exanguinasi*. Setelah tikus mati, dilanjutkan dengan pengambilan cairan peritonealnya dan organ usus halus, alur penelitian, hal ini dapat dilihat pada Gambar 18.

3.6 Analisis data

Analisis data dengan analisis deskriptif (rerata dan standar deviasi) dan uji *One Way of Anova* dengan uji *Post Hoc* menggunakan *Test Duncan*. Variabel yang diamati kadar IL-12, IL-2, dan IFN- γ , aktivitas makrofag, kapasitas makrofag, serta panjang vili, dan kedalaman kript.

3.7 Etik penelitian

Semua tindakan dan prosedur pada hewan coba sudah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Hewan Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) IPB Bogor. Surat persetujuan etik No. 142-2019 IPB pada tanggal 3 Mei 2019.

IV IDENTIFIKASI SIFAT KIMIA DAN ZAT GIZI PADA SAMPel PRODUK EVOO

4.1 Pendahuluan

Extra Virgin Olive Oil (EVOO) merupakan salah satu bahan makanan yang menjadi pilihan masyarakat, untuk dikonsumsi secara rutin untuk meningkatkan dan memelihara kesehatan. Di Indonesia, EVOO sebagai suplemen kesehatan memiliki harga yang lebih mahal dibandingkan tumbuhan herbal lokal, namun harga EVOO masih terjangkau oleh masyarakat.

Kualitas kandungan zat gizi dalam produk EVOO sangat dipengaruhi oleh proses pengepakan, penyimpanan, dan pendistribusian EVOO. Kráčmar *et al.* (2019) menyatakan penyimpanan produk EVOO meningkatkan bilangan peroksida berkisar 50-80%. Produk EVOO dari Spanyol menunjukkan kandungan asam lemak dapat stabil dalam waktu 2 tahun.

Winarti (2010) menyatakan pangan fungsional memiliki persyaratan adanya klaim kesehatan, memiliki takaran berstandar, keamanan konsumsi, dan penyajian tidak berbentuk produk obat. EVOO termasuk bahan makanan fungsional dikarenakan mengandung zat gizi yang meningkatkan kesehatan. EVOO memenuhi syarat sebagai makanan fungsional berdasarkan secara ilmiah memiliki takaran dan keamanan konsumsi, memiliki klaim kesehatan secara ilmiah, dan penyajiannya berbeda dengan produk obat-obatan. EVOO mengandung senyawa yang dapat mempengaruhi fungsi tubuh, memberikan efek fungsional dengan menurunkan risiko timbulnya penyakit. EVOO memiliki senyawa makronutrien dan senyawa mikronutrien yang dapat memberikan efek kesehatan, hal ini yang mendukung EVOO termasuk pangan fungsional.

Sarolic *et al.* (2014) menyatakan adanya potensial EVOO dalam kesehatan diantaranya kesehatan kardiovaskuler, menurunkan enzim proinflamasi, menurunkan beberapa penyakit infeksi dan non infeksi seperti hipertensi, diabetes, jantung. Champe *et al.* (2010) menyatakan metabolisme lipid dalam makanan berkaitan dengan kesehatan. Lipid sebagai sumber energi, media pada vitamin yang tidak larut dalam air, mendukung fungsi koenzim, fungsi hormon, meningkatkan kemampuan protein intra sel yang melekat pada membran. Peri (2014) menyatakan kandungan asam lemak tidak jenuh rantai tunggal terutama asam oleat pada produk EVOO merupakan salah satu yang memperkuat integritas sel membran dan membantu perbaikan sel dan jaringan yang rusak.

Borges *et al.* (2017) menyatakan kualitas EVOO ditentukan oleh kandungan asam lemak tak jenuh tunggal yang tinggi yakni asam oleat (C18:1), zat lainnya vitamin E, zat besi (Fe), kandungan flavonoid, dan kandungan karotenoid, beserta beberapa zat bioaktif seperti *hydroxytyrosol*, *tyrosol*, *oleuropein*, oleukantal, dan squalen. (diperkirakan 1-3 %). Kandungan zat bioaktif dalam EVOO sulit untuk terdeteksi dikarenakan jumlah zat sangat minor.

Beberapa studi ilmiah menyatakan kandungan utama EVOO yaitu asam lemak yang terdiri dari beberapa asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh. Asam lemak tak jenuh tunggal (MUFA) menjadi zat gizi utama EVOO yang ikut berperan dalam kesehatan terutama meningkatkan kadar HDL (Cicerale *et al.* 2009; Sarolic *et al.* 2014; Peri 2014; Amiot 2014; Orsavova *et al.* 2015;). Kandungan

MUFA EVOO paling tinggi jika dibandingkan dengan minyak kacang-kacangan, minyak jagung, minyak kedelai, dan minyak bunga matahari (Sarolic *et al.* 2014).

EVOO juga memiliki kandungan asam lemak tak jenuh ganda (Orsavova *et al.* 2015; Sarolic *et al.* 2014; Peri 2014; Amiot 2014; Cicerale *et al.* 2009). Asam lemak dalam EVOO pada beberapa penelitian ditemukan EVOO mengandung trigliserida 97-99%, asam lemak tak jenuh tunggal 55-83%, asam lemak jenuh 13.8-20%, asam linoleate 9.7-16.4%, asam linolenat sebesar 0.76-1% (Orsavova *et al.* 2015; Sarolic *et al.* 2014; Peri 2014; Amiot 2014; Cicerale *et al.* 2009). Kandungan total sterol buah EVOO berkisar 20.2-54.8 mg/100g, total alkohol lemak 4.6-36 mg/100 g, total alkohol triterpenik 2.19-11.59 mg/100g (Rotondi *et al.* 2010).

Kandungan vitamin E memiliki fungsi sebagai antioksidan yang dapat mencegah oksidasi nonenzimatik komponen sel. EVOO memiliki kandungan vitamin E yang cukup tinggi, sehingga EVOO juga digunakan dalam peningkatan kesehatan kulit. Amiot (2014) menyatakan mendukung kekuatan EVOO sebagai antiinflamasi dikarenakan kandungan vitamin E dalam EVOO sangat lengkap (tokoferol tipe α , β , γ , δ). Muchtadi (2012) menyatakan tokoferol merupakan antioksidan yang paling penting. Dalam darah, terdapat 90% vitamin E dalam bentuk tokoferol- α dan 10% dalam bentuk tokoferol- γ . Cicerale *et al.* (2010) menyatakan EVOO bersifat antimikroba dan antiinflamasi. Amiot (2014) menyatakan EVOO sebagai antiinflamasi dikarenakan EVOO memiliki kandungan flavonoid yang berfungsi melindungi struktur sel.

Kráčmar *et al.* (2019) menyatakan adanya faktor varietas pohon, wilayah, iklim, kematangan buah zaitun, periode penyimpanan buah atau produk, dan jenis pengemasan, mempengaruhi kualitas produk EVOO. Kadar kandungan zat gizi pada produk EVOO yang sudah beredar di supermarket, perlu diteliti untuk menggambarkan kualitas produk EVOO tersebut.

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini bertujuan untuk : 1) menganalisis karakteristik kimia EVOO (kadar air, kadar abu, bilangan iod, bilangan penyabunan, bilangan asam) pada sampel produk EVOO, 2) menganalisis kandungan asam lemak jenuh (asam laurat, asam miristat, asam palmitat, asam stearat) dan asam lemak tak jenuh (asam oleat, asam linoleate, asam linolenat) sampel produk EVOO, 3) menganalisis kandungan vitamin E, zat besi, total flavonoid, dan total karotenoid, pada sampel produk EVOO.

4.2 Metode

4.2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Ada Beberapa laboratorium yang digunakan dalam penelitian ini. Variabel sifat kiiawi, kadar asam lemak, dan kadar vitamin dan mineral, dilakukan di laboratorium BBIA (Balai Besar Industri Agro) Kementerian Perindustrian, dibawah pengurusan Balai Penelitian dan Pengembangan Industri. Variabel at bioaktif diperiksa di laboratorium Pusat Studi Biofarmaka, dibawah tanggungjawab Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat IPB. Kedua laboratorium berada di Bogor, Jawa Barat. Penelitian dilakukan sejak tahun 2018 sampai 2019.

4.2.2 Bahan dan Alat

Sampel produk EVOO berasal dari supermarket besar di DKI Jakarta. Penelitian ini hanya menggunakan 1 merek EVOO yang memiliki standar produk. Beberapa bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri dari yaitu indikator fenolftalein (pp) 1 %, reagen wijs, kalium hidroksida (KOH) 0,1 N, kalium iodida 10%, etanol 95%, karbon tetraklorida, larutan indikator pati segar, kalium asetat 120 mM, kalium dikromat, natrium tiosulfat, aquades, HCL, dan larutan $AlCl_3$ 2%.

Penelitian ini juga menggunakan beberapa alat diantaranya, oven, kertas saring, alat HPLC, labu takar 1000 ml, gelas piala 50 ml, alat spektrofotometer (Shimadzu AA-7000), desikator, pengukur waktu, piringan aluminium, labu erlenmeyer 250 ml, pipet beberapa ukuran, pelat magnetic, cawan porselen, alat kromatografi gas (HP 5890 series II), pengaduk, tanur listrik, buret, dan neraca analitik.

4.2.3 Pemeriksaan Kadar Air

Pemeriksaan kadar air sesuai SNI 01-3555-1998. Prinsip pemeriksaan kadar air berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(130 \pm 1) ^\circ C$. Prosedur kerja diawali dengan penggunaan oven untuk memanaskan piringan beserta tutupnya dengan suhu $130^\circ C$. Pemanasan dilakukan selama 30 menit. Selanjutnya didinginkan dengan desikator selama 20-30 menit, kemudian ditimbang kembali untuk mendapatkan nilai W_0 . Langkah selanjutnya, sampel produk EVOO 5 g dimasukkan ke dalam piringan, ditutup dan ditimbang untuk mendapatkan nilai W_1 . Kemudian sampel dipanaskan dengan kondisi tanpa tutup piringan dengan suhu $130^\circ C$ selama 30 menit. Selanjutnya dimasukkan ke desikator dan didinginkan selama 20-30 menit. Setelah suhu sama dengan suhu ruangan, ditimbang kembali untuk mendapatkan nilai W_2 . Penimbangan dilakukan sampai nilai bobot stabil.

4.2.4 Pemeriksaan Kadar Abu

Kadar abu ditentukan dengan metode sesuai SNI 01-2891-1992. Prinsip pemeriksaan kadar abu yaitu menimbang dari sisa mineral hasil pembakaran bahan organik. Prosedur kerja dengan menentukan diawali dengan membakar sampel secara langsung dengan suhu tinggi $500-600^\circ C$ selama 28 jam. Hasil sisa pembakaran yang menjadi abu ditimbang.

4.2.5 Pemeriksaan Bilangan Iod

Pemeriksaan bilangan iod dengan metode sesuai SNI 01-3555-1998. Prinsip kerja pemeriksaan bilangan IOD yakni jumlah iodin dihitung dengan pengamatan selisih titran pada blanko dengan contoh. Reaksi iodin merupakan reaksi dengan ikatan ganda. Pemeriksaan dimulai dengan minyak diletakkan dalam labu takar. Menambahkan 15 mL larutan karbon tetraklorida kemudian diaduk hingga sempurna. Langkah selanjutnya reagen wijs sebanyak 25 ml ditambahkan sebanyak 25 ml. kemudian dikocok dengan memutar labu agar isinya tercampur sempurna. Setelah itu disimpan pada ruangan $20-30^\circ C$ selama 1 jam. Dilanjutkan dengan menambahkan 20 ml larutan KI dan 150 ml akuades.

Pengadukan dilanjutkan titar, tambahkan ke dalam labu larutan standar natrium tiosulfat 0,1 N, setelah diketahui normalitas eksaknya sampai warna coklat pada iodium samar hamper hilang. Langkah selanjutnya menambahkan 2 ml indikator pati, kemudian dititar sampai warna biru iodium pati hampir hilang.

4.2.6 Pemeriksaan Bilangan Penyabunan

Bilangan penyabunan diperiksa dengan metode sesuai SNI 01-3555-1998. Prinsip kerja pada pemeriksaan bilangan penyabunan yakni membandingkan larutan KOH dalam etanol dan asam klorida serta indikator fenolftalein dengan contoh sampel produk EVOO. Prosedur pemeriksaan dengan menimbang dua gram contoh sampel produk EVOO, dimasukan ke labu Erlenmeyer bervolume 250 ml. Kemudian ditambahkan KOH 0,5 N sebanyak 25 ml dalam etanol 95%. Langkah selanjutnya memanaskan labu Erlenmeyer tersebut selama satu jam dengan pemanas listrik atau penagas air. Setelah itu, menambahkan 1 ml fenolftalein ke larutan tersebut dan titar dengan HCL 0,5 N sampai tidak berwarna.

4.2.7 Pemeriksaan Bilangan Asam

Berdasarkan SNI 01-3555-1998, larutan contoh sampel produk EVOO dalam pelarut organik. Kemudian larutan basa KOH digunakan untuk menetralkan. Prosedur kerja diawali dengan menimbang sampel minyak 10-50 mg ke dalam erlenmeyer 250 ml. Langkah selanjutnya sampel produk EVOO dilarutkan dengan etanol sebesar 50 ml, dengan suhu hangat. Kemudian digunakan indikator fenolftalein 5 tetes larutan, seterusnya titrasi larutan dengan KOH sampai terbentuk warna merah muda selama 30 menit. Selama titrasi, pengadukan dengan menggoyangkan erlenmeyer.

4.2.8 Pemeriksaan Kadar Asam Lemak

Pemeriksaan kadar asam lemak dengan metode *Gas Cromatografi* (GC). Sampel produk EVOO sebanyak 20-30 mg ke tabung tertutup, NaOH 0,5 N sebanyak 1 ml dalam methanol. Setelah itu, dipanaskan selama 20 menit dengan suhu 70°C diatas penangas air. Selanjutnya didinginkan, kemudian penambahan BF₃ 20% sebanyak 2 ml dalam methanol dan dipanaskan lagi selama 20 menit dengan suhu 70°C. kemudian didinginkan lagi, NaCl jenuh sebanyak 2 ml dan 1 ml heksana ditambahkan dan dikocokkan, didiamkan hingga terpisah. Lapisan teratas dipindahkan ke tabung yang sudah berisi Na₂SO₄ anhidrat sebesar 0,1 g selama 15 menit untuk menyerapkan air. Setelah itu, fase heksana diinjeksi ke dalam peralatan GC dengan asam oleat, asam palmitoleat, asam laurat, asam palmitat, dan asam miristat sebagai standar. Alat yang digunakan HP 5890 series II Kromatografi Gas.

4.2.9 Pemeriksaan Total Flavonoid dan Total Karotenoid

Pemeriksaan total flavonoid dan total karotenoid dengan spektrofotometri. Prinsip kerja spektrofotometri adalah mengamati interaksi yang menghasilkan hamburan, serapan, dan emisi. Interaksi antara spektrometer dan fotometer. Prosedur kerja pemeriksaan sampel dengan

menimbang sampel produk EVOO yang dicampur dengan 10 ml etanol hingga 1500 ppm, campuran yang terbentuk sebanyak 1 ml ditambah dengan AICI 2 % sebanyak 1 ml dan kalium asetat 120mM sebanyak 1 ml. Larutan diinkubasi dengan suhu kamar selama 1 jam. Panjang gelombang yang digunakan maksimum 435 nm.

4.2.10 Pemeriksaan Vitamin E

Pemeriksaan vitamin E dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Prinsip kerja HPLC yaitu teknik pemisahan molekul berdasarkan struktur ataupun komposisinya. HPLC menggunakan zat cair sebagai fase geraknya, dimana pemisahan terjadi ketika sampel bergerak melewati fase diam. Sampel diinjeksi ke alat HPLC, terbawa oleh fase gerak, kemudian melewati fase diam pada kolom, kemudian terbaca oleh detektor. Dalam kolom terjadi pemisahan komponen sampel yang dihitung waktu retensi dari masing-masing komponen oleh detektornya. Waktu yang dibutuhkan oleh senyawa melewati kolom menuju detektor dinamakan waktu retensi.

4.2.11 Pemeriksaan Zat Besi (Fe)

Pemeriksaan zat besi dengan metode AOAC 999.11. Bahan dan alat yang digunakan sesuai dengan standar prosedur yang akan dilakukan. Prinsip pemeriksaan zat besi berdasarkan metode AOAC 999.11 yakni pengabuan sampel produk EVOO. Sampel sebanyak 5 g masuk ke krus, kemudian dimasukkan ke *muffle furnace* dengan suhu 600°C selama 6 jam. Hasilnya ditimbang lanjut dihitung kadar abunya. Langkah berikutnya penambahan HCL sebanyak 25 ml ke krus seta dipanaskan selama 30 menit. Setelah itu diencerkan menggunakan akuades. Hasil dimasukan ke labu takar dengan volume 25 ml. Larutan diberi 2 tetes sodium asetat dan bromofenol biru untuk mendapatkan pH 3,5. Larutan ditambah 1,1 penantrolin sebanyak 4 ml, penambahan akuades dan pengocokan. Langkah perlakuan yang sama dengan standar larutan besi (II). Pengukuran dengan spektrofotometri terhadap intensitas warna sampel. Panjang gelombang yang digunakan 515 nm.

4.2.12 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini, dengan menggunakan analisis deskriptif. Hasil pemeriksaan ditampilkan dengan beberapa tabel.

4.3 Hasil dan Pembahasan

Kadar air dan kadar abu pada sampel produk EVOO yang digunakan dalam penelitian sebesar 0,13% dan 0,02%. Bilangan IOD, bilangan penyabunan, dan bilangan asam pada sampel produk EVOO sesuai dengan standar produk EVOO. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 5.

Chaiyana *et al.* (2016) menemukan EVOO memiliki bilang penyabunan 192,1 mg KOH/g, bilangan iod berkisar 88,2 mg/g, dan bilangan asam 0,38 mg KOH/g. Roiaini *et al.* (2015) menyatakan karakteristik produk EVOO Malaysia, pada bilangan iod sebesar 94 g/100 g. Aydar *et al.* (2018) menyatakan produk EVOO asal Turki memiliki bilangan asam berkisar 0,44-0,69%. Konuskan *et al.*

(2019) menyatakan bilangan asam produk EVOO Arab Saudi 0,82%, bilangan iod 80%, dan bilangan sabun 1,23%.

Tabel 5 Identifikasi sifat kimiawi pada sampel produk EVOO

Kriteria	Satuan	IOC 2017	Sampel Produk EVOO
Air	%		0,13
Abu	%		0,02
Bilangan IOD	mg/ 100g	75-94	81,6
Bilangan Penyabunan	mg KOH/ g	184-196	191
Bilangan Asam	mg KOH/ g	< 0,8	0,61

Karakteristik kimia pada beberapa minyak nabati Handajani *et al.* (2010) menemukan bilangan iod pada minyak wijen berkisar 89-90,08 mg/100 g, bilangan penyabunan berkisar 186-191 mg KOH/g, dan bilangan asam 1,02-2,48 mg KOH/g. Katja (2012) menyatakan hasil pemeriksaan minyak biji matahari, bilangan penyabunan minyak biji matahari 188-194 mg KOH/g, bilangan iod 130-144 mg/100g.

Tabel 6 Karakteristik kimia EVOO pada beberapa penelitian

Kriteria	Minyak bunga matahari ¹	Minyak kelapa ²	Minyak kacang ¹	Minyak wijen ³
Bilangan IOD (mg/100g)	102,02	17,58	111,19	89-90,0
Bilangan Penyabunan (mg KOH/g)	0,81	252,22	0,94	186-191
Bilangan Asam (mg KOH/g)		15,71		1,02-2,48

¹ Konuskan *et al.* (2018), ² de Azevedo *et al.* (2020), ³ Handajani *et al.* (2010)

Sukandar *et al.* (2009) menyatakan bilangan iod pada minyak kelapa 8,355 mg iod/g dan bilangan penyabunan minyak kelapa 388,65 mg KOH/g sampel. Menurut Wibowo dan Komarayati (2015) bahwa bilangan asam menandakan mutu minyak, dimana bilangan asam yang tinggi menandakan mutu yang rendah. Semakin tinggi bilangan asam, minyak akan mudah berbau tengik. Kráčmar *et al.* (2019) menyatakan penyimpanan produk EVOO dapat meningkatkan bilangan asam berkisar 50-80%. EVOO yang sudah terbuka segelnya sebaiknya digunakan tak lebih dari setahun. Penyimpanan EVOO dengan suhu 10-16°C, penutupan yang kuat untuk menghindari oksidasi.

Sampel produk EVOO mengandung kadar asam lemak jenuh sesuai dengan standar EVOO, namun kandungan asam laurat dan miristat tidak terdeteksi. Kandungan asam lemak tidak jenuh sesuai dengan standar produk EVOO, kecuali kandungan asam linoleat yang memiliki kadar diatas standar. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 7.

Orsavova *et al.* (2015) menemukan kadar asam oleat pada sampel EVOO dalam penelitiannya 66,4%. Peri (2014) menemukan kadar asam oleat 65-83%. Qarnifa *et al.* (2013) menemukan kandungan beberapa asam lemak pada produk EVOO di Maroko, diantaranya asam palmitat 11-14,6%, asam oleat berkisar 59-69%, dan asam linoleate berkisar 14,4-21,2%. Assy *et al.* (2009) menunjukkan dalam 100 g EVOO terdapat MUFA 73,7 g, SFA 13,5 g, dan PUFA 7,9 g.

Tabel 7 Kandungan asam lemak (satuan %) pada sampel produk EVOO

Kriteria	IOC 2017	Sampel
Lemak Jenuh		
Asam Laurat		nd
Asam Miristat	≤ 0.03	nd
Asam Palmitat	7,5-20	10,4
Asam Stearat	0,5-5	4,31
Lemak Tidak Jenuh		
Asam Oleat	55-83	74,7
Asam Linoleat	2,5-21	7,65
Asam Linolenat	0-1	1,63

Ket. : nd (tidak terdeteks)

Kadar asam oleat dalam sampel produk EVOO dalam penelitian ini termasuk tinggi. Hal ini menunjukkan adanya proses pengemasan dan penyimpanan produk EVOO yang baik. Principal *et al.* (2010) menyatakan komponen mayor EVOO terdiri dari asam oleat, asam palmitat, asam linoleat, asam stearat, asam palmitoleat, asam linolenat, asam miristat. Komponen minor meliputi sterol, komponen phenol. Komponen phenol terdiri dari komponen lipofilik seperti tokoperol dan tokotrienol. Sedangkan komponen hidropilik meliputi asam phenol, sekoiridoids, lignin, dan flavonoid. Azmi dan Yagmur (2014) menyatakan presentasi asam oleat lebih dipengaruhi oleh faktor lingkungan (suhu panas dan dingin, perbedaan siang / malam), radiasi matahari, dan kelembaban (intensitas curah hujan). Beberapa minyak nabati menunjukkan kandungan komposisi asam lemak sebagai berikut :

Tabel 8 Kandungan asam lemak pada beberapa minyak nabati (satuan %)

	Asam Miristat	Asam Palmitat	Asam Stearat	Asam Oleat	Asam Linoleat	Asam Linolenat
Minyak almond	0,02	6,73	1,78	66,69	23,9	0,14
Minyak biji gandum	0,12	21,1	2,79	15,84	53,0	4,68
Minyak b. matahari	0,05	4,98	3,24	53,11	37,8	0,28
Minyak biji rami	nd	5,88	3,10	20,50	15,0	55,2
Minyak kenari	0,13	8,02	4,64	26,31	60,4	0,05
Minyak alpukat	0,14	16,3	1,50	60,61	14,7	0,73
Minyak wijen	Nd	9,82	5,96	41,12	41,8	0,51
Minyak biji anggur	0,05	7,66	4,53	17,65	69,3	0,33
Minyak kedelai	0,06	9,17	3,81	24,44	54	8,03
Minyak labu	0,22	15,6	3,38	24,52	54,7	0,43

Keterangan : nd (tidak terdeteks)

Tabel 8 menunjukkan kandungan asam lemak dari minyak nabati lainnya. Asam oleat juga banyak dimiliki oleh minyak alpukat dan minyak almond. Asam lemak linoleat paling tinggi pada minyak biji anggur dan minyak biji kenari (Rueda *et al.* (2014). Alanso *et al.* (2005) juga menyatakan kandungan MUFA dalam minyak EVOO 73,9 g/100g, minyak canola 58,9 g/100g, minyak kacang-kacangan 46,2 g/100g, minyak bunga matahari 31,8 g/100g, minyak jagung 29,3 g/100g, dan minyak kedelai 24,3 g/100g.

Akkaya (2018) menyatakan beberapa kandungan asam lemak pada minyak biji bunga matahari, antara lain asam palmitat (5,0-7,6%), asam stearat (2,7-6,5%), asam oleat (14-39,4%), asam linoleat (48,3-74%), dan asam linolenat (0-3%). Jika

dibandingkan dengan kandungan asam lemak minyak biji matahari maka produk EVOO di pasaran memiliki kandungan asam stearat dan asam palmitat lebih tinggi dibandingkan minyak biji matahari. Orsavova *et al.* (2015) menyatakan EVOO dan minyak alpukat merupakan sumber MUFA paling banyak.

Šarolić *et al.* (2014) menyatakan nilai gizi EVOO terdapat pada kandungan asam oleat, alkohol alifatik dan triterpen, sterol (terutama β -sitosterol), hidrokarbon (squalene), senyawa volatil, tokoferol (terutama α -tokoferol), pigmen (klorofil dan karoten) dan antioksidan. Pérez *et al.* (2019) menyatakan ada kandungan vit E dalam EVOO, sangat tergantung pada kultivar zaitun, iklim, kematangan buah, dan memiliki variasi jumlah berkisar 89-1410 mg tokoferol / kg minyak.

International Olive Council menetapkan standar kandungan dalam EVOO untuk beberapa asam lemak yakni asam palmitat 7,5-20%, asam stearat 0,5-5%, asam oleat 55-83%, asam linoleat 2,5-21%, asam linolenat 0-1%. Sartika (2008) juga menyatakan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) banyak ditemukan pada minyak ikan dan minyak *safflower*, minyak jagung, minyak biji matahari. Fungsi PUFA antara lain transfor metabolisme lemak, fungsi imun, mempertahankan fungsi integritas membran sel dan peningkatan ransangan saraf. Asam lemak tak jenuh tunggal (MUFA) lebih efektif daripada PUFA dalam menurunkan kadar kolesterol, lebih stabil, lebih baik perannya dalam meningkatkan HDL dan menurunkan LDL. PUFA juga berperan mengatur tekanan darah, fungsi jantung, fungsi kekebalan tubuh, dan memperkuat ransangan saraf. PUFA menjadi asam memiliki keturunannya yakni asam arakidonat (asam linoleat) dan eikosapentaenoat (EP) dan Dokosaheksaenoat (DHA). Varquez *et al.* (2019) menemukan dalam penelitiannya, kandungan EVOO memiliki 10,09 % asam palmitat, 3,79 asam stearat, 79,87 asam oleat, 3,91 % asam linoleat, dan total phenol 749.9 mg/kg. Kracmar *et al.* (2019) menyatakan beberapa merek EVOO dari Itali menunjukkan kandungan asam linoleat pada *Luccese* (9,53%), *Blanqueta* (7,15%), *Agrocreta* (7,35%) dan asam linolenat *Luccese* (0,25%), *Blanqueta* (0,29%), *Agrocreta* (0,27%). Hasil penelitian ini, menunjukkan kandungan asam linoleat tidak berbeda jauh dengan penelitian lain.

Tabel 9 Kandungan vitamin E (tokoferol- α), zat besi, total flavonoid dan total karotenoid pada sampel produk EVOO

Kriteria	Satuan	Sampel
Vitamin E	mg/kg	20,6
Zat Besi	mg/kg	1,12
Total Flavonoid	%(b/b)	0,36
Total Karotenoid	mg/kg	25,2

Tabel 9 menunjukkan kadar vitamin E yang ditemukan dalam penelitian ini berkisar 20,6 mg/kg. Kandungan zat besi berkisar 1,12 mg/kg. Kadar total flavonoid produk EVOO berkisar 0,36 mg/kg. Kadar karotenoid berkisar 25,2 mg/kg.

Kandungan vitamin E, kadar Fe, dan jumlah total flavonoid serta kadar karotenoid berkaitan dengan fungsi imun tubuh (Gaforio *et al.* 2019). Kandungan karotenoid dalam minyak zaitun asal Turki varietas *Queslati* (1,74 mg/kg) dan varietas *Chemleli* (1,63 mg/kg), dalam penelitian ini berkisar 11,5 – 25,2 mg/kg, proses pengolahan EVOO juga menentukan kandungan karotenoid (Fares *et al.* 2016). Total karotenoid EVOO sebesar 6,21 mg/kg (Konuskan *et al.* 2019). Total karotenoid dari produk EVOO Italy berkisar 4,20-4,62 mg/kg. Kandungan

flavonoid dalam EVOO yang sudah terdeteksi yakni Luteolin dan Apigenin (Sanmartin *et al.* 2019). Tuck dan Hayball (2002) menyatakan senyawa fenolik utama pada EVOO yaitu oleuropein, hydroxytyrosol dan tyrosol, memiliki sifat antioksidan dan antimikroba.

Menurut Winarti (2010) bahwa EVOO memiliki kandungan vitamin E yang lebih tinggi dibandingkan minyak nabati lainnya. Vitamin E merupakan antioksidan yang larut dalam lemak. Vitamin E sebagai antioksidan lebih efektif meredakan radikal bebas daripada antioksidan lain. Dosis konsumsi vitamin E bagi orang dewasa 8-10 IU per hari. Vitamin E mampu mengakhiri proses reaksi berantai radikal bebas, dengan menghambat produksi radikal bebas yang baru, dan membatasi perusakan sampai batas area membran sel.

EVOO memiliki kandungan vitamin E paling lengkap. Terdapat tokoferol dalam α , δ , dan γ . Antioksidan utama dalam EVOO yang paling utama berbentuk tokoferol- α . Kandungan tokoferol- α dari Turki variesta *Queslati* (156-252 mg/kg) dan *Chemlali* (100-188 mg/kg). Kandungan tokoferol- α berbeda dengan asal geografis asal buah zaitun. Fares *et al.* (2016) menyatakan kandungan tokoferol- α berkaitan dengan stabilitas oksidatif. Semakin tinggi kandungan α -tokoferol maka semakin stabil. Demertz *et al.* (2018) menyatakan kandungan tokoferol- α EVOO Albania dan Coffu ditemukan 47,39 mg/kg dan 158,54 mg/kg, lebih tinggi dari sampel di penelitian ini.

Sanmartin *et al.* (2019) menyatakan produk EVOO asal Itali, kandungan tokoferol- δ ($0,48 \pm 0,19$ mg/kg), kandungan tokoferol- γ ($2,93 \pm 0,4$ mg/kg), dan kandungan tokoferol- α ($122,37 \pm 2,33$ mg/kg). Tuberoso *et al.* (2016) menyatakan kandungan produk EVOO dari Sardinia Italy di Villacidro (tokoperol- α 172,2 mg/kg dan tokoperol- γ 15,3 mg/kg), di Cagliari (tokoperol- α 159,3 mg/kg dan tokoperol- γ 8,8 mg/kg), di Semidana (tokoperol- α 181,5 mg/kg dan tokoperol- γ 9,1 mg/kg), dan di Basana (tokoperol- α 213,3 mg/kg dan tokoperol- γ 8,7 mg/kg).

Maazzocchi *et al.* (2019) menyatakan kandungan vitamin E sekitar 0–37 mg dari 100 gram EVOO, diperkirakan memenuhi kebutuhan sekitar 72-96%. Keberagaman kandungan vitamin E dalam EVOO berdasarkan varietas dan wilayah. Kandungan vitamin E dalam penelitian ini antara 11,6-24,7 mg/kg. Rizvi *et al.* (2014) menyatakan kandungan vitamin E dalam 100 gram berbentuk tokoferol- α pada minyak kelapa (0,5 mg), minyak jagung (11,2 mg), minyak sawit (25,6 mg), minyak zaitun (5,1 mg), minyak kacang (13 mg), minyak kedelai (10,1 mg), minyak gandum (133 mg), dan minyak bunga matahari (48,7 mg). Penelitian ini memiliki kandungan vitamin E dalam sampel EVOO lebih tinggi yakni 11,6-24,7 mg. Dibandingkan dengan minyak yang lain, kandungan vitamin E dalam sampel EVOO lebih rendah dari minyak gandum dan minyak bunga matahari. Popa *et al.* (2015) menyatakan jumlah tokotrienol dan tokoferol 900 mg/100 g, paling tinggi dibandingkan minyak palm dan kedelai.

Caro *et al.* (2006) menyatakan kandungan zat gizi EVOO dapat berbeda dikarenakan faktor suhu, cahaya, dan penyimpanan. Kandungan klorofil, karotenoid, α -tocopherol dan fenol dapat mengalami penurunan selama penyimpanan dan pengiriman, namun aktivitas antioksidan tidak mengalami perubahan. Kráčmar *et al.* (2019) menyatakan beberapa penelitian menunjukkan, adanya zat fenolik meningkatkan kualitas dan umur simpan EVOO, serta meningkatkan ketahanannya terhadap autooksidasi EVOO yang sudah terbuka

segelnya sebaiknya digunakan tak lebih dari setahun. Penyimpanan EVOO dengan suhu 10-16°C, penutupan yang kuat untuk menghindari oksidasi.

4.4 Simpulan

Kadar air, abu, bilangan IOD, bilangan penyabunan, dan bilangan asam pada sampel produk EVOO memenuhi standar. Kandungan asam lemak jenuh pada sampel produk EVOO yang digunakan dalam penelitian ini juga memenuhi standar. Kandungan asam lemak tak jenuh yang tidak memenuhi standar yaitu asam lemak linolenat. Kadar vitamin E pada sampel sebesar 20,6 mg/kg dan kadar zat besi 1,12 mg/kg. Sampel produk EVOO yang digunakan dalam penelitian ini memiliki total flavonoid 0,36%b/b dan total karotenoid sebesar 25,2 mg/kg.

V IDENTIFIKASI SIFAT KIMIA DAN ZAT GIZI SAMPEL PRODUK MADU

5.1 Pendahuluan

Kesehatan menjadi bagian yang terpenting dalam kehidupan manusia. Dalam meraih kondisi kesehatan yang optimal, manusia berupaya dengan menerapkan pola hidup bersih dan sehat. Pola makan seimbang dan bervariasi, aktivitas fisik yang baik, kebiasaan olah raga, mengkonsumsi suplemen dan herba, dilakukan oleh manusia untuk meningkatkan status imun tubuh. Masyarakat sudah mengonsumsi madu sebagai nutrisi untuk meningkatkan sistem imun tubuh, meningkatkan kesehatan pencernaan, dan mencegah berbagai penyakit. Madu dikembangkan diberbagai daerah di Indonesia. Hadisoesilo (2001) menyatakan madu Indonesia berasal dari beberapa lebah *Apis* (*A. andreniformis*, *A. dorsata*, *A. cerana*, *A. koschevnikovi*, *A. nigrocincta*, dan *A. nuluensis*).

Cucu *et al.* (2021) menyatakan madu dapat memberikan manfaat kesehatan, bernilai gizi tinggi, mampu mengobati atau mencegah penyakit. Madu memiliki kriteria sebagai makanan fungsional yang mengandung berbagai macam nutrisi dan zat bioaktif yang mendukung kesehatan. Tren saat ini madu sebagai produk kuratif yang potensial. Arawwawala and Hewageegana (2017) menyatakan madu dianggap sebagai pengobatan tradisional di masyarakat. Ebrahimi *et al.* (2016) menyatakan selama konsumsi madu untuk mencegah dan pengobatan penyakit, tidak pernah ditemukan adanya efek samping.

Salah satu kemampuan madu yaitu mengatur kerja sistem imun, ketika tubuh memiliki kurang menerima stimulasi meningkatkan kerja sistem imun, maka madu bekerja agar stimulasi tersebut dapat diterima tubuh, dan sebaliknya (Tonks *et al.* 2003; Erejuwa *et al.* 2012; Ebrahimi *et al.* 2016; Arawwawala and Hewageegana 2017). Madu meningkatkan kerja limfosit dan fagositosis netrofil, menguatkan membran sel, dan terjadi penurunan kadar sitokin TNF- α , Interleukin 6 dan 1 sebagai sitokin proinflamasi (Erejuwa *et al.* 2014). Hal yang sama juga ditemukan dalam penelitian Tonks *et al.* (2003) yang menyatakan konsumsi madu Manuka terbukti adanya penurunan sitokin proinflamasi sel MM6 seperti Interleukin 6 dan 1 β , serta sitokin TNF- α . Keterlibatan yang madu yang lain dalam mekanisme sistem imun juga dibuktikan oleh Owoyele *et al.* (2011) yang menemukan dampak pemberian madu pada pasien terhadap peradangan akut dan kronis, terbukti terjadi penghambatan pelepasan NO. Ebrahimi *et al.* (2016) menyatakan ada penurunan jumlah sel darah putih ditemukan secara signifikan setelah mengonsumsi madu saat sakit. selama konsumsi madu. González-Gil *et al.* (2016) melakukan analisis data kohort, hasil secara signifikan menemukan adanya hubungan penurunan kadar CRP dalam darah pada orang yang sering mengonsumsi madu dalam bentuk selai madu.

Pu'scion-Jakubik *et al.* (2020) menyatakan jenis lebah alami, menghasilkan madu dengan komposisi asam amino, asam organik, vitamin, mineral, senyawa polifenol, serta kandungan utama sukrosa, glukosa, dan fruktosa. Olaitan (2012) menyatakan komponen utama madu adalah karbohidrat dengan kandungan tertinggi dalam bentuk fruktosa dan glukosa. Kandungan karbohidrat madu melebihi 80 %. Ada sifat prebiotik yang berpotensi dalam madu adalah karbohidrat seperti oligosakarida. Cucu *et al.* (2020) menyatakan madu mengandung senyawa –

senyawa yang bermanfaat untuk tubuh, dengan komposisi dominan fruktosa dan glukosa, dilengkapi mineral, protein, asam amino, enzim, vitamin, asam fenolik, flavonoid. Kandungan zat gizi ini meningkatkan sifat antimikroba, antiinflamasi, antimutagenik, antivirus, antitumor, dan antioksidan. Beberapa mineral esensial juga ditemukan dalam madu. Madu dari Turki banyak mengandung mineral Cu dan Zn, sedangkan madu dari Brazil ditemukan banyak mengandung Fe, Mn, dan Mg (Batista *et al.* 2012). Nolan *et al.* (2019) senyawa polifenol meliputi flavonoid dan asam fenolik.

Agussalim *et al.* (2019) menyatakan kadar glukosa, fruktosa, sukrosa dipengaruhi asal geografis, iklim, pemrosesan, penyimpanan, asal pohon, jenis bunga, pasca panen, paparan cuaca, pengepakan, dan waktu penyimpanan. Cucu *et al.* (2020) juga menyatakan kualitas madu tergantung pada asal botani dan geografis tanaman, kondisi lingkungan, faktor pengolahan madu, pengemasan, dan penyimpanan.

Ada beberapa tujuan penelitian ini yakni menggambarkan hasil identifikasi profile sampel madu berdasarkan sifat kimia, jenis gula, zat gizi (makro), dan beberapa mineral serta zat bioaktif.

5.2 Metode

5.2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian yang dilakukan berdesain deskriptif. Penelitian ini menggambarkan beberapa sifat kimia dan kandungan zat gizi. Penelitian dilakukan di 2 laboratorium yaitu laboratorium yang dimiliki oleh LPPM IPB Bogor yaitu Laboratorium Biofarmaka dan laboratorium yang dikelola Kementerian Perindustrian yaitu Laboratorium Balai Besar Industri Agro, yang dikelola Balai Penelitian dan Pengembangan Industri. Penelitian dilakukan dari tahun 2018 sampai 2019.

5.2.2 Bahan dan Alat

Penelitian ini menggunakan 1 produk madu. Sampel madu diperoleh dari supermarket yang terletak di wilayah DKI Jakarta. Jumlah sampel madu yang diteliti 1 sampel tiap merek. Identifikasi sifat kimiawi terdiri dari kadar air, abu, sifat asam, dan aktivitas enzim diastase. Analisis zat gizi makro (energi, karbohidrat, protein, dan lemak). Kandungan gula terdiri dari glukosa, fruktosa, dan sukrosa. gula meliputi sukrosa, glukosa, dan fruktosa. Analisis beberapa kandungan mineral terdiri dari tembaga, seng, besi, selenium. Serta analisis beberapa total flavonoid dan total karotenoid.

Beberapa bahan kimia yang digunakan dalam pemeriksaan madu ini, meliputi sebuah larutan stock iod, 0,0007 N larutan iod, larutan dapar asetat dengan pH 5,3, kadar 0,5 N larutan natrium klorida, sebuah larutan pati, standardisasi untuk enzim diastase, 2 N dan 4 N larutan H₂SO₄, 0,1 N larutan Na₂S₂O₃, 0,1 N larutan KIO₃, 10% larutan (NH₄)₂HPO₄, aquades, sebuah larutan *luff schoorl*, 25% HCl, 30% NaOH, alat indikator Brom Timol Blue, alat indikator PP, alat KI 20, sebuah larutan Pb asetat, larutan *Carezz I*, larutan *Carrez II*, Natrium bisulfit (NaHSO₃) 0.20%, dan larutan buffer pH 7.

Alat kimia yang digunakan dalam pemeriksaan madu ini, meliputi sebuah pipet *volumetric* dengan ukuran 1 ml, 10 ml, dan 25 ml, tabung reaksi,

fotometer fotoelektrik, gelas labu dengan ukur 100 ml dan 250 ml, gelas erlenmeyer 250 ml, gelas piala 400 ml, pemanas listrik, penangas air, neraca analitik, pendingin tegak, pH meter, spektrofotometer, termometer, buret ukuran 10 ml dan 50 ml, stopwatch, labu kjeldahl, refraktometer, botol timbang, oven, desikator, dan kertas saring.

5.2.3 Pemeriksaan pH

Pemeriksaan pH pada penelitian ini menggunakan metode SNI 01-2891-1992 (butir 16). Prinsip pemeriksaan ini adalah pengukuran aktifitas ion hidrogen dengan menggunakan pH meter. Prosedur kerja dengan menimbang sampel madu sebanyak 1 g, kemudian diencerkan dengan aquades sehingga volume menjadi 10 ml. Kemudian dilanjutkan dengan penyetaraan pH dengan angka 7, dengan cara mencelupkan cara reseptor pH meter pada larutan *buffer* pH 7 hingga muncul pada layar digital angka 7 yang menunjukkan pH netral. Reseptor pH meter dicelupkan pada larutan sampel, angka yang muncul pada layar digital pH meter merupakan pH larutan tersebut.

5.2.4 Pemeriksaan Kadar Air

Pemeriksaan kadar air pada penelitian ini menggunakan metode SNI 3545-2013. Prinsip pemeriksaan ini adalah saat suhu 20°C, dilakukan pengamatan pada nilai indeks bias sampel madu. Pengukuran menggunakan alat refraktometer. Analisis kadar air menggunakan prosedur kerja dengan mencari perbandingan indeks bias dan air sesuai dengan tabel hubungan indeks bias dan kadar air dalam madu.

5.2.5 Pemeriksaan Kadar Abu

Pemeriksaan kadar abu pada penelitian ini menggunakan metode SNI 01-2891-1992 (butir 6.1). prinsip kerja pemeriksaan ini adalah menimbang siswa sampel yang dipijarkan. Prosedur kerjanya, dengan memasukkan ke dalam cawan dimasukkan sampel madu sebanyak 10,00 g. Kemudian sampel madu dipijarkan dalam tanur hingga menjadi abu, yang selanjutnya beratnya ditimbang. Pengerjaan ini dilakukan tiga kali.

5.2.6 Pemeriksaan Keasaman

Pemeriksaan keasaman pada penelitian ini menggunakan metode SNI 3445-2013. Prinsip kerja pemeriksaan ini adalah volume NaOH yang digunakan dikali dengan normalitas NaOH per-bobot contoh sampel madu. Prosedur kerja pemeriksaan diawali dengan penimbangan sampel madu dengan ketelitian 10,0 g, dilanjutkan dengan melarutkan dengan air suling sebanyak 75 ml dalam gelas Erlenmeyer ukuran 250 ml. Selanjutnya, menambahkan 4-5 tetes indikator PP. Langkah berikutnya, melakukan titrasi dengan 0,1 N larutan NaOH selama 10 detik. Pencatatan volume NaOH 0,1 N yang dibutuhkan selama titrasi.

5.2.7 Pemeriksaan Aktivitas Enzim Diastase

Pemeriksaan aktivitas enzim diastase pada penelitian ini menggunakan metode SNI 3545-2013. Prinsip pemeriksaan ini diukur secara fotometrik, tahapan sampel madu dilarutkan bersama pati (telah didaparkan), dilakukan inkubasi sampai mencapai titik akhir, dengan pengukuran secara fotometrik. Pencatatan waktu selama inkubasi, juga dilakukan. Prosedur kerja diawali dengan menimbang sampel madu 5 g, kemudian dimasukkan ke dalam piala 20 ml, kemudian ditambah 10 ml sampai 15 ml air serta 2,5 ml larutan dapar asetat, selanjutnya dilakukan pengadukan sampai terjadi kelarutan. Hasil larutan kemudian dituangkan ke labu ukur dengan volume 25 ml. Dalam labu ukur juga sudah berisi larutan NaCl sebanyak 1,5 ml. Langkah selanjutnya penetapan absorban dengan cara mengambil larutan sampel madu yang sudah bercampur dengan larutan NaCl, ambil larutan sampel tersebut sebanyak 10 ml dimasukkan ke tabung reaksi yang berukuran 50 ml, ditambah larutan pati sebanyak 5 ml, yang dimasukkan melewati dinding bagian dalam dari tabung tersebut, kemudian selama 15 menit, tabung diletakkan diatas penangas air dengan suhu 400C. Pengambilan 1 ml larutan setiap 5 menit, kemudian ditambahkan 10 ml larutan iod ke dalamnya. Selanjutnya menetapkan nilai absorbannya pada panjang gelombang 660 nm.

5.2.8 Pemeriksaan Fruktosa, Glukosa, Sukrosa, dan Gula Pereduksi

Pemeriksaan fruktosa, glukosa, sukrosa pada penelitian ini menggunakan metode MU/INST/23 (HPLC). Pemeriksaan menggunakan larutan (standar) fruktosa, glukosa dan sukrosa 0,125 %. Penggunaan *auto syringe injector* untuk memasukan 20 μ L larutan (standar) dengan cara menginjeksikan. Kondisi semua komponen didiamkan sampai komponen keluar dari kolom dan terpisah. Pengamatan dan pencatatan pada waktu retensi komponen glukosa dan komponen fruktosa. Pengulangan dilakukan pada langkah tersebut, 20 μ L larutan (standar) glukosa, fruktosa, dan sukrosa 0,25 % diinjeksikan kembali. Pengulangan juga dilakukan untuk larutan standar 0,5 % dan larutan standar 1 %.

5.2.9 Pemeriksaan Protein

Pemeriksaan protein pada penelitian ini menggunakan metode SNI 01-2891-1992 (butir 7.1). Prosedur kerja meliputi tahapan destruksi, kemudian tahapan destilasi, dan tahapan titrasi. Tahap awal yaitu destruksi, dimana sampel madu 0,5 gr ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam gelas labu kjeldahl. Selenium sebanyak satu butir dan 3 ml H_2SO_4 , dimasukan bersama-sama ke dalam tabung tersebut. Langkah selanjutnya, alat pemanas bersuhu 410°C disiapkan untuk memanasi tabung tersebut dengan penambahan air sebanyak 10 ml. Setelah itu, larutan didiamkan sampai menjadi jernih. Kedua, tahap destilasi, dimana larutan hasil proses destruksi yang jernih kemudian didinginkan. Selanjutnya, penambahan akuades sebanyak 50 ml dan NaOH 40% sebanyak 20 ml. Larutan yang sudah siap kemudian didestilasi. Proses destilasi dimasukan dalam gelas erlenmeyer bervolume 125 ml, dalam gelas erlenmeyer juga berisi asam borat (H_3BO_3) dengan kadar 2% sebanyak 25 ml. Asam borat ini mengandung *bromcresol green* kadar 0,1% dan *methyl red*

kadar 0,1% sebagai indikator. Jumlah perbandingan 2:1 untuk *bromcresol green* kadar 0,1% dan *methyl red* kadar 0,1%. Hasil proses destilat berwarna hijau kebiruan. Ketiga, tahap melakukan titrasi, dimana larutan HCL dititrasi sampai warna merah muda pada larutan di gelas Erlenmeyer.

5.2.10 Pemeriksaan Lemak

Pemeriksaan lemak berdasarkan AOAC 2005. Proses menyiapkan selongsong lemak dan kertas saring terlebih dahulu. Memasukkan sampel produk madu 2 g (W1) ke dalam kertas saring dan memasukan ke selongsong lemak, setelah itu sampel produk madu dimasukkan ke gelas labu lemak, berat dicatat sebagai W2. Gelas labu lemak disambungkan pada tabung *soxhlet*. Ruang ekstraktor pada tabung *soxhlet* berisi selongsong lemak yang sudah dibalur pelarut lemak. Alat destilasi *soxhlet* dipasangkan dengan tabung ekstraksi, setelah itu dipanaskan menggunakan pemanas listrik selama 6 jam dengan suhu 40°C. Proses selanjutnya, menguapkan semua pelarut lemak yang berada dalam labu lemak dengan proses destilasi. Dalam ruang ekstraktor, pelarut akan ditampung setelah proses destilasi selesai. Pelarut yang sudah keluar tidak kembali. Proses selanjutnya pengeringan labu lemak dengan suhu 105°C dengan oven. Pendinginan dilakukan untuk mendapatkan berat yang tetap.

5.2.11 Pemeriksaan Total Flavonoid dan Total Karotenoid

Pemeriksaan total flavonoid dan total karotenoid dengan spektrofotometri. Prinsip kerja spektrofotometri adalah mengamati interaksi yang menghasilkan hamburan, serapan, dan emisi. Interaksi antara spektrometer dan fotometer. Prosedur kerja pemeriksaan sampel dengan menimbang sampel produk EVOO yang dicampur dengan 10 ml etanol hingga 1500 ppm, campuran yang terbentuk sebanyak 1 ml ditambah dengan AICI 2 % sebanyak 1 ml dan kalium asetat 120mM sebanyak 1 ml. Larutan diinkubasi dengan suhu kamar selama 1 jam. Panjang gelombang yang digunakan maksimum 435 nm.

5.2.12 Pemeriksaan Vitamin E

Pemeriksaan vitamin E dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Prinsip kerja HPLC yaitu teknik pemisahan molekul berdasarkan struktur ataupun komposisinya. HPLC menggunakan zat cair sebagai fase geraknya, dimana pemisahan terjadi ketika sampel bergerak melewati fase diam. Sampel diinjeksi ke alat HPLC, terbawa oleh fase gerak, kemudian melewati fase diam pada kolom, kemudian terbaca oleh detektor. Dalam kolom terjadi pemisahan komponen sampel yang dihitung waktu retensi dari masing-masing komponen oleh detektornya. Waktu yang dibutuhkan oleh senyawa melewati kolom menuju detektor dinamakan waktu retensi.

5.2.13 Pemeriksaan Zat Besi (Fe)

Pemeriksaan zat besi dengan metode AOAC 999.11. Bahan dan alat yang digunakan sesuai dengan standar prosedur yang akan dilakukan. Prinsip

pemeriksaan zat besi berdasarkan metode AOAC 999.11 yakni pengabuan sampel produk EVOO. Sampel sebanyak 5 g masuk ke krus, kemudian dimasukkan ke *muffle furnace* dengan suhu 600°C selama 6 jam. Hasilnya ditimbang lanjut dihitung kadar abunya. Langkah berikutnya penambahan HCL sebanyak 25 ml ke krus seta dipanaskan selama 30 menit. Setelah itu diencerkan menggunakan akuades. Hasil dimasukan ke labu takar dengan volume 25 ml. Larutan diberi 2 tetes sodium asetat dan bromofenol biru untuk mendapatkan pH 3,5. Larutan ditambah 1,1 penantrolin sebanyak 4 ml, penambahan akuades dan pengocokan. Langkah perlakuan yang sama dengan standar larutan besi (II). Pengukuran dengan spektrofotometri terhadap intensitas warna sampel. Panjang gelombang yang digunakan 515 nm.

5.2.14 Analisis Data

Analisis deskriptif digunakan dalam penelitian ini. Penyajian data menggunakan table dan narasi.

5.3. Hasil dan Pembahasan

Sampel produk madu yang digunakan dalam penelitian memiliki pH dalam batas normal. Kadar air maksimal dalam SNI 2013 sebesar 22, kadar air sampel produk madu yang digunakan 19,2 % b/b, hal ini menunjukkan terpenuhi persyaratan kadar air. Kadar abu pada sampel produk madu berada dibawah 0,5 % b/b, juga memenuhi persyaratan. Kadar keasaman pada sampel produk madu dibawah batas maksimal 50 ml NAOH 1N/kg, sedangkan aktivitas enzim diastase diatas batas minimal yakni 10,2 DN. (Tabel 10)

Tabel 10 Identifikasi sifat kimia sampel produk madu

Sifat Kimiawi	pH	Kadar air	Abu	Keasaman	Aktivitas enzim diastase
Satuan		(% b/b)	(% b/b)	(ml NAOH 1N/kg)	(DN)
Sampel Produk	4,04	19,2	0,37	16,4	10,2
SNI 2013	3,2-4,5	22 (maks)	0,5	50 (maks)	3 (min)

Laaroussi *et al.* (2020) menyatakan variasi sifat kimia menunjukkan adanya perbedaan geografis, cuaca, komposisi tanah, dan sumber bunga. Hasil penelitian ini menunjukkan pH, kadar abu dan kadar air sampel produk madu tidak berbeda jauh dengan temuan hasil penelitian madu lainnya. Penelitian Mofid *et al.* (2016) menemukan pH 3,2-4,5 dan kandungan abu ada 0,06 % pada madu Iran. Laaroussi *et al.* (2020) menyatakan pH madu Maroko berkisar 4,11-4,81. Evahelda *et al.* (2017) menemukan madu dari nektar pohon karet di Bangka Indonesia, ditemukan nilai pH $3,92 \pm 0,01$. Ajibola *et al.* (2012) menemukan dalam penelitiannya, pH madu kemasan (3,2-4,5) lebih rendah dari madu mentah (4,5-6,5). Saepudin *et al.* (2014) menyatakan temuan penelitiannya, sampel madu Indonesia memiliki pH berkisar 3,4-3,8. Hasil penelitian Saepudin *et al.* (2014) menyatakan sifat kimia dari produk madu di pasaran di wilayah Bengkulu memiliki kadar air 23-25 %. Evahelda *et al.* (2017) menemukan salah satu madu asal Indonesia yaitu madu Bangka dari nektar pohon karet memiliki kadar air $24,25 \pm 1,49\%$. Wulandari (2017)

menyatakan kadar air pada salah satu produk madu Indonesia 28,6 % di suhu ruang lebih tinggi daripada di suhu dingin 27,1%. Laaroussi *et al.* (2020) menyatakan keasaman madu Maroko berkisar 12,16-31,85 mEq/kg.

Tabel 11 Kandungan fruktosa, glukosa, dan sukrosa pada sampel produk madu

Gula	Glukosa (g/100 g)	Fruktosa (g/100 g)	Sukrosa (g/100 g)	Gula pereduksi (g/100 g)
Sampel produk madu	27,6	22,4	<0,05	60,6
SNI 2013	-	-	5 (maks)	65 (maks)

Kandungan fruktosa pada sampel produk madu penelitian ini adalah 22,4 g/100g. Kandungan sukrosa dan gula pereduksi memenuhi persyaratan SNI 2013. Kandungan glukosa pada sampel penelitian ini 27,6 g/100g. Kadar glukosa dan fruktosa tidak memiliki batas maksimal dan minimal dalam SNI 2013. (Tabel 11)

Wulandari (2017) menyatakan gula pereduksi berkaitan dengan suhu ruang. Gula pereduksi di suhu dingin lebih tinggi daripada suhu ruang. Ada beberapa faktor yang berkaitan dengan gula pereduksi terutama masa panen, kadar air dan kelembaban. Hasil penelitian ini, masih memiliki kadar glukosa dan fruktosa yang rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Arawwawala and Hewageegana (2017), dimana kadar fruktosa berkisar 32,56-38,2 % dan glukosa berkisar 28,54-31,3 %, pada madu India dan Pakistan. Olaitan (2012) menyatakan komponen utama madu adalah fruktosa dan glukosa. Hasil penelitian Mofid *et al.* (2016) menemukan kadar glukosa 23,63 % dan kadar fruktosa 47,98%, ini menunjukkan kualitas madu lebih baik, dikarenakan tingginya kadar fruktosa dalam madu. Wulandari (2017) menyatakan kadar sukrosa 4,2%, dimana enzim invertase mampu merubah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Evahelda *et al.* (2017) juga menemukan madu dari nektar pohon karet memiliki kadar gula total $74,77 \pm 0,15\%$. Nolan *et al.* (2019) menyatakan komposisi kimia madu bervariasi terutama monosakarida dalam madu.

Tabel 12 Kandungan zat gizi makro pada sampel produk madu

Zat Gizi Makro	Energi (kal/100 g)	Karbohidrat (%)	Protein (%)	Lemak (%)
Sampel produk madu	322	80,3	0,03	0,10

Mofid *et al.* (2016) menemukan dalam penelitiannya, kandungan protein pada madu Iran 0,62% dan lipid 0,04 %. Cucu *et al.* (2021) menyatakan madu juga memiliki lemak seperti gliserida, sterol, dan fosfolipid, dan beberapa asam lemak, namun dalam jumlah yang kecil. Protein dalam madu berasal dari enzim yang dikeluarkan melalui saliva lebah. Kandungan lemak dan protein madu dapat meningkatkan fungsi membran sel.

Jika dibandingkan hasil penelitian lain, kandungan mineral pada sampel madu ini masih dalam batas *range* penelitian-penelitian lainnya. Kandungan zat besi (Fe) lebih tinggi dari madu lainnya. Batista *et al.* (2012) menyatakan kandungan mineral esensial ditemukan dalam madu dari Brasil yakni Cu (0,01-0,7µg/g), Zn (0,01-7,1µg/g), Mn (0,08-18,8µg/g), Se (0,001-0,01µg/g), Fe (0,4-14,1µg/g), Mo (0,001-0,01µg/g), P (8-486µg/g), Co (0,001-0,03µg/g), dan Mg (12,4-360µg/g).

Tabel 13 Kandungan mineral (Cu, Zn, Fe, Se) pada sampel produk madu

Mineral	Tembaga (Cu) mg/kg	Seng (Zn) mg/ kg	Besi (Fe) Mg/ kg	Selenium (Se) Mg/ kg
Sampel produk madu	0,05	0,86	20,1	< 0,002

Seng (Zn) memiliki peran dalam proliferasi sel induk dan sel lainnya, diferensiasi sel B dan sel T beserta interaksinya, produksi antibody, dan destruksisel jaringan terinfeksi dan tumor. Kekurangan Zn dapat menyebabkan stress oksidatif dan meningkatkan kerusakan DNA, penurunan rasio CD4/CD8, penurunan aktivitas sel NK, dan sekresi sitokin Th₁ (Baratawidjaja dan Rengganis 2014). Cu terlibat dalam proses pembuatan enzim dalam tubuh dan peningkatan kerja sel B. Peran zat besi banyak sekali dalam system imun tubuh. Beberapa peran Fe dalam proses sistem imun antara lain regulasi gen, regulasi produksi sitokin, namun pemberian yang berlebih Fe akan menyebabkan kerentanan infeksi.

Ajiboa *et al.* (2012) menyatakan dalam 100 g madu, ada kandung vitamin C 2,2-2,5 g, vitamin B9 sebesar 0,002-0,01 g, vitamin B6 sebesar 0,01-0,32 g, vitamin B5 sebesar 0,02-0,11 g, vitamin B3 sebesar 0,1-0,2 g, vitamin B2 sebesar 0,01-0,02 g, dan vitamin B1 sebesar 0,00-0,01 g. Dalam 100 g madu ditemukan memiliki kandungan mineral mangan sebesar 0,02-2 g, kalium sebesar 40-3500 g, natrium sebesar 1,6-17 g, kalsium 3-31 g, zink sebesar 0,05-2 g, magnesium sebesar 0,7-13 g, pospor sebesar 2-15 g, selenium sebesar 0,002-0,01 g, tembaga sebesar 0,02-0,6 g, besi sebesar 0,03-4 g, dan kromium sebesar 0,01-0,3 g.

Tabel 14 Kandungan total flavonoid dan total karotenoid pada sampel produk madu

Senyawa	Total Flavonoid % b/b	Total Karotenoid mg/ kg
Sampel produk madu	0,07	0,64

Alvarez-Suarez *et al.* (2014) menyatakan ditemukan kandungan flavonoid dalam madu manuka diantara nya *pinobanksin*, *pinocembrin* and *chrysin*, while *luteolin*, *quercetin*, *8-methoxykaempferol*, *isorhamnetin*, *kaempferol* dan *galangin*. Adanya kandungan beberapa flavonoid, memberikan madu kemampuan sebagai antioksidan bertindak sebagai pengatur produksi radikal bebas, sehingga melindungi sel. Madu Manuka lebih tinggi antikoksidannya dibandingkan madu Akasia. Madu sebagai pemulung radikal bebas dan melindungi dari kerusakan oksidatif. Scepankova *et al.* (2017) menyatakan antioksidan yang terkandung pada madu menekan ROS. Jika radikal bebas dan oksidan dalam tubuh berlebihan, akan menghasilkan kerusakan oksidatif biomolekul sel seperti kerusakan DNA. Mekanisme proses mengurangi kerusakan DNA melalui modulasi aktivitas enzim aktioksidan dan kapasitas antioksidan yang tinggi dalam madu. Efek zat gizi yang terkandung dalam madu memberikan banyak manfaat dalam kesehatan tubuh. Escriche *et al.* (2014) menyatakan asal nektar madu berdasarkan jenis pohon mempengaruhi profil flavonoid dan senyawa fenolik madu, hesperetin (madu dari nektar jeruk jeruk); kaempferol, *chrysin*, *pinocembrin*, asam *caffeic* dan naringenin (madu dari nektar pohon rosemary) dan *myricetin*, *quercetin*, galangin dan *p-coumaric acid* (madu dari honeydew). Scepankova *et al.* (2017) menyatakan adanya efek sinergis semua kandungan antioksidan pada madu. Samarghandian *et al.* (2017) menyatakan madu mengandung beberapa enzim yaitu diastase, invertase, glukose oksidase, katalase, dan asam fosfatase.

5.4 Simpulan

Identifikasi kimiawi, kadar gula, dan zat gizi makro pada sampel produk madu penelitian ini tidak berbeda dengan temuan penelitian lain. Sifat kimiawi, kadar gula, kandungan zat gizi m dari sampel produk madu penelitian ini berada dalam batas – batas standar menurut SNI tahun 2013. Kandungan mineral sampel produk madu dalam penelitian ini juga berada dalam batas-batas temuan penelitian madu lainnya, kecuali kandungan zat besi (Fe) yang ditemukan lebih tinggi dari temuan penelitian orang lain.

VI PENGARUH PEMBERIAN EVOO, MADU, DAN EVOO+MADU TERHADAP AKTIFITAS, DAN KAPASITAS MAKROFAG

6.1. Pendahuluan

Pola makan mediterania, menjadi salah satu kebiasaan sehat untuk mencegah berbagai penyakit. Beberapa masalah kesehatan diantaranya hiperkolesterol, hipertensi, stres oksidatif, radang, dan diabetes dapat dicegah dengan menjalani diet mediterania (Camamia *et al.* 2012; Gaforio *et al.* 2019). Kebiasaan mengonsumsi makanan yang banyak mengandung asam lemak tak jenuh, salah satu dari diet mediterania (Visioli *et al.* 2005). Produk EVOO yang memiliki kandungan asam lemak tak jenuh tunggal tinggi dan mengandung antioksidan, dapat mengurangi inflamasi (Waterman and Lockwood 2007; Gaforio *et al.* 2019).

Aranda *et al.* (2004) menyatakan kandungan dari produk EVOO antara lain palmitat (C16:0) sebesar 9,22 %, palmitoleat (C16:1) sebesar 0,77 %, margarik (C17:0) sebesar 0,06 %, stearat (C18:0) sebesar 3,36 %, oleat (C18:1) sebesar 80,4 %, linoleat (C18:2) sebesar 4,46 %, linolenat (C18:3) sebesar 0,62 %, asam arakidat (C20:0) sebesar 0,51 %, total asam lemak jenuh sebesar 13,3%, total asam lemak tak jenuh tunggal sebesar 81,6%, dan total asam lemak tak jenuh ganda sebesar 5,08%. Li *et al.* (2016) menyatakan kandungan EVOO berasal dari Lara Victoria, Australia antara lain α -tokopherol 0,19 g/L. Senyawa aktif phenol dalam EVOO antara lain hidroksityrosol sebesar 29,37 mg/L, tirosol sebesar 36,86 mg/L, *oleuropein* sebesar 4,02 mg/L, *oleokanthal* sebesar 389,16 mg/L as 3, 5-*dimethoxyphenol*, *squalene* sebesar 428 mg/100 g oil, dan total phenol 452 mg/kg *caffeic acid equivalent*.

Ghanbari *et al.* (2012) dan Peri (2014) menemukan EVOO mengandung 1-3 % komponen minor terdiri dari hidrokarbon, tokopherol, senyawa fenolik, sterol, klorofil, karotenoid, monogliserida dan digliserida, asam lemak bebas, ester dan lainnya. Marinho-da Silva *et al.* (2015) dalam penelitiannya menemukan EVOO membantu meningkatkan kekebalan tubuh paling efektif dibandingkan minyak nabati (minyak jagung dan minyak kedelai). Rahim *et al.* (2017) menyatakan pemberian madu pada perempuan selama 8 minggu dapat meningkatkan kadar limfosit dalam darah. Dimana limfosit menjadi salah satu bagian sistem imun adaptif yang berperan memproduksi sitokin dan mengaktifkan makrofag. Gabriel *et al.* (2019) menemukan tikus yang diinduksi *Salmonella typhi* kemudian diberi EVOO mengalami penurunan jumlah koloni bakteri pada kotorannya. EVOO memiliki kemampuan antibakteri dan menurunkan inflamasi.

Madu yang merupakan suplemen makanan yang memiliki kandungan terbanyak karbohidrat dalam bentuk glukosa dan fruktosa (Cianciosi *et al.* 2018). Marcucci *et al.* (2019) dalam penelitiannya menemukan kadar fruktosa 38,19 %, glukosa 31,28%, maltosa 7,31% dan sukrosa 1,31% pada sampel madu Amerika.

Enzim dan asam amino terdapat di madu, dimana prolin merupakan asam amino utama madu, asam amino lain seperti alanin, fenilalanin, tirosin, asam glutamat, isoleusin, dan leusin juga terdapat di madu. Miguel *et al.* (2017) menyatakan madu memiliki kandungan protein (0,5%), dan beberapa enzim seperti

sukrase, diastase, dan glukosa oksidase) dan bentuk asam amino (> 20 asam amino), prolin diduga asam amino yang paling penting.

Mineral yang terkandung pada madu yakni kalium, kalsium, tembaga, besi, magnesium, mangan, fosfor, natrium, seng, dan selenium. Vitamin dalam madu yakni asam askorbat (C), tiamin (B1), riboflavin (B2), niasin (B3), asam pantotenat (B5), dan piridoksin (B6). Mejías dan Montenegro (2012) menemukan kandungan Fe ($1,32 \pm 0,13 \mu\text{g/g}$), Zn ($0,586 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$), Cu ($0,602 \pm 0,083 \mu\text{g/g}$), dan Mg ($0,838 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$), dan pada madu dari zona gunung Llaima. Wieczorek *et al.* (2014) menyatakan kandungan mineral dalam madu Polandia, K ($7,82 \pm 3,05 \mu\text{g/g}$), Ca ($0,687 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$), dan Mg ($0,240 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$).

Alvarez-Suarez *et al.* (2014) menyatakan beberapa penelitian menemukan flavonoid utama dalam madu Manuka yakni pinobanksin, *pinocembrin* dan *chrysin*, sedangkan *quercetin*, kaempferol, *galangin*, *luteolin*, *isorhamnetin*, dan 8-methoxykaempferol merupakan flavonoid dengan konsentrasi yang kecil. Nweze *et al.* (2017) menemukan dalam penelitiannya, madu dari lebah *Apis mellifera*, memiliki kandungan total phenol ($439,16 \pm 29,06 \text{ mgGAE/kg}$), flavonoid ($61,72 \pm 3,89 \text{ mgCEQ/kg}$), proline ($386,46 \pm 71,11 \text{ mg/kg}$), *ascorbic acid* ($156,29 \pm 5,48 \text{ mg/kg}$). Cahyati (2008) menemukan madu Indonesia memiliki kadar total gula pereduksi untuk madu Rambutan (88,14%), madu Kopi (87,04%), madu Sengon (74,40%), madu Randu (61,42%) dan madu Kelengkeng (62,07%). SNI 3545-2013 tentang madu bahwa kadar total gula pereduksi minimal 65 %. Nora *et al.* (2018) menyatakan hasil pemeriksaan kualitatif terdapat kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, dan terpenoid pada madu Baduy hitam pahit dan madu Baduy kuning manis. Beberapa penelitian sudah membuktikan adanya efek mengonsumsi madu untuk mengurangi inflamasi dan meningkatkan kekebalan tubuh.

Kandungan asam oleat yang tinggi dan asam lemah tak jenuh ganda serta vitamin E, karotenoid dan senyawa antioksidan, menyebabkan adanya sifat imunomodulator dan antiinflamasi pada EVOO. Sedangkan madu memiliki sifat imunomodulator dan antiinflamasi, karena didukung adanya kandungan vitamin dan mineral, senyawa antioksidan, karotenoid, dan enzim. Celep dan Yeşilada (2017) menyatakan adanya kemungkinan interaksi antioksidan yang terdapat dalam madu dengan senyawa lain yang menghasilkan sinergis meningkatkan kesehatan dan modulasi sistem imun. Siswanto *et al.* (2013) menyatakan integritas sel terutama membran sel dan lipoprotein dalam plasma, bekerja dengan dukungan antioksidan. vit E dalam bentuk α -tokoferol merupakan salah satu antioksidan. Radikal bebas dapat dihentikan dengan memberikan ion hidrogen yang terdapat pada cincin fenol vitamin E.

Makrofag termasuk sel mononuklear dalam sistem imun non spesifik yang bekerja dalam jaringan. Makrofag lebih banyak ditemukan dalam jaringan dan rongga seperti peritoneum. Makrofag bekerja setelah diaktifkan dengan adanya ransangan masuknya bakteri (Roitt 2003; Louise 2011; Parmely 2013; Soedarto 2014; Playfair dan Chain 2015). Jumlah makrofag dapat meningkat setelah pemberian madu selama 7 hari (Rozaini *et al.* 2004). Majtan (2014) menyatakan beberapa madu menunjukkan madu dapat meningkatkan aktivitas fagosit monosit, neutrofil, dan makrofag. Berdasarkan latar belakang diatas, dilakukan penelitian efek campuran EVOO+madu terhadap kerja fagosit makrofag setelah diinduksi *S. aureus*.

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan adanya pengaruh campuran EVOO+madu terhadap aktivitas makrofag pada tikus. Penelitian ini juga

membuktikan pengaruh campuran EVOO+madu terhadap kapasitas makrofag pada tikus. Pengaruh diamati setelah tikus diinduksi *Staphylococcus aureus*.

6.2 Metode

6.2.1 Desain, Tempat, dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan rancangan penelitian yang digunakan yakni rancangan faktorial. Variabel yang diamati aktivitas makrofag dan kapasitas makrofag berdasarkan perlakuan dan waktu perlakuan. Desain faktorial merupakan desain yang memiliki efek dua atau lebih faktor, dimana setiap replikasi memiliki kombinasi perlakuan yakni efek interaksi (Suwanda 2011). Protokol penelitian telah disetujui oleh Komisi Etik Hewan, Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) IPB dengan Nomor: 142-2019 per-tanggal 3 Mei 2019. Penelitian ini dinyatakan memenuhi syarat penggunaan hewan coba dan memperhatikan kesejahteraan hewan coba.

Masa aklimasi, persiapan dan perlakuan pada hewan coba dilakukan di Rumah Sakit Hewan IPB Bogor. Uji makrofag dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB Bogor. Waktu pelaksanaan penelitian pada bulan Mei sampai Juni tahun 2019.

6.2.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan EVOO merk Guillen, Madurasa, stimuno, aquades, *Ketamine*, *Xylazin*, pewarna *Giemsa*, bakteri *Staphylococcus aureus*, metanol, dan minyak imersi. Penelitian ini menggunakan Beberapa alat yaitu jarum suntik ukuran 1,3,5 ml), pisau, gunting bedah untuk hewan coba, mikro pipet, *Effendorf*, kaca objek, cover glass, minyak imersi, *colony counter*, botol gelas ukuran 250 ml, gelas ukur, timbangan analitik, mikroskop, sarung tangan, dan masker.

6.2.3 Sampel

Penelitian ini menggunakan 80 tikus jenis *Rattus norvegicus*, *Galur Sprague Dawley*. Tikus berjenis kelamin jantan dan berumur 2-3 bulan dengan bobot 150-250 g. Tikus yang digunakan berasal dari Balai Besar Penelitian Veteriner, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian (BBALIVET). Jumlah sampel dihitung berdasarkan rumus *Federer*.

6.2.4 Hewan Coba

Pemeliharaan tikus dilakukan dengan menggunakan kandang berukuran 50 x30x20 cm. Ketersediaan kandang yang cukup untuk dihuni 2 tikus. Suhu kandang 26 ± 2 °C, cahaya (terang: 12 jam, gelap: 12 jam), kelembaban 50-70%. Kandang diberikan serbuk kayu untuk mencegah agar kandang tidak basah, dan dapat diganti sesuai kebutuhan. Sebelum perlakuan tikus diaklimatisasi selama 7 hari untuk adaptasi dan penyesuaian lingkungan baru. Selama aklimasi, tikus diberi minum dan pakan standar dalam kandang. Pakan tikus diberikan sesuai dengan ransum standar sebanyak 10-15 gram per-ekor setiap hari dan pemberian minum dilakukan secara *ad libitum*. Ransum

yang digunakan yakni AIN-93. Selama pemeliharaan tikus diberi obat cacing 1 kali (dosis 0,4 ml/kg bobot badan).

Tabel 15. Jumlah sampel tiap pengamatan makrofag

Kelompok	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	Eksperimen 1	Eksperimen 2	Eksperimen 3
Jumlah sampel	16 ekor tikus	16 ekor tikus	16 ekor tikus	16 ekor tikus	16 ekor tikus
Jenis Perlakuan	(Pemberian aquades 1 kali sehari)	Pemberian Stimuno 1 kali sehari	Pemberian EVOO 1 kali sehari	Pemberian Madu 1 kali sehari	Pemberian Campuran EVOO + Madu 1 kali sehari

Tiap kelompok terdiri dari 16 ekor. Setelah adaptasi 7 hari, tikus diberikan bahan uji sesuai dengan hasil hitung rumus konversi pakan. Pemberian bahan uji dilakukan sampai hari ke 28. Pada hari ke 7, 14, 21, dan ke 28, dilakukan uji makrofag. Tiap kelompok diambil 4 ekor tikus pada hari pengamatan tersebut. Dapat dilihat pada Tabel 15.

6.2.5 Bakteri

S. aureus diperoleh dari Laboratorium Terpadu Bakteriologi FKH IPB. Dosis *S. Aureus* dengan konsentrasi 10^8 cfu sebanyak 1 ml, disuntikkan secara intraperitoneal (i.p) pada tikus.

6.2.6 Dosis Bahan Perlakuan

Pemberian akuades sebanyak 1 ml pada kelompok 1 sebagai kontrol negatif diberi aquades 1 ml (Mustaba *et al.* 2012). Kelompok 2 sebagai kontrol positif diberi stimuno sirup sebanyak 0,25 ml, per-ekor, per-hari (Nugroho 2012), sebanyak 0,8 g madu, per-ekor, per-hari pada kelompok 3, dan kelompok 4 diberi EVOO sebanyak 0,185 g per-ekor, per-hari, serta kelompok 5 diberi campuran EVOO+madu. Dosis dihitung berdasarkan dosis kebiasaan manusia mengonsumsi EVOO dan madu, kemudian yang dikonversikan ke dosis tikus. Campuran EVOO+madu dari masing-masing dosis dilakukan tanpa alat elektronik dan penambahan zat lain.

6.2.7 Uji Aktivitas dan Kapasitas Makrofag

Pengamatan dilakukan 4 pekan, dimana tiap pekan, diambil tikus sebanyak 4 ekor. Tiap waktu yang sudah ditentukan, tikus diberi 1 ml bakteri *Staphylococcus aureus* secara intraperitoneal. Setelah 1 jam pemberian bakteri, tikus dianastesi dengan *Ketamin* sebanyak 75 mg/kg BB tikus dan *Xylazin* 12 mg/kg BB tikus. Kemudian dilakukan *euthanasi* dengan cara eksanquinasi. Setelah itu tikus dibedah dan diambil cairan peritonealnya. Hewan scoba penelitian dikremasi di insenerator FKH IPB.

Pemeriksaan cairan peritoneal menggunakan preparat apus kemudian difiksasi menggunakan methanol absolut. Fiksasi dilakukan selama 5 menit. Kemudian preparat diwarnai dengan Giemsa. Penggunaan air suling untuk mengencerkan Giemsa. Setelah didiamkan (20 menit), preparat dibilas dan

dikeringkan. Preparat dibaca dengan mikroskop dengan pembesaran 10-100 kali dengan minyak imersi. Penetapan nilai aktivitas dan kapasitas (Haeria *et al.* 2017) dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Nilai Aktivitas Fagositosis} = \frac{\text{Jumlah Makrofag Aktif}}{\text{Jumlah Makrofag Secara Keseluruhan}} \times 100\%$$

$$\text{Nilai Kapasitas Fagositosis} = \frac{\text{Jumlah Bakteri yang difagosit}}{50 \text{ Sel Makrofag Aktif}}$$

6.2.8 Analisis Data

Analisis awal dilakukan dengan membandingkan rerata dan standar deviasi dari aktivitas dan kapasitas makrofag tiap kelompok pada hari ke 7, 14, 21, dan 28. Analisis Anova digunakan untuk melihat pengaruh campuran EVOO dan madu terhadap aktivitas dan kapasitas makrofag. Perbedaan tiap kelompok dengan analisis *Duncan*.

6.3 Hasil dan Pembahasan

6.3.1 Uji Aktivitas Makrofag

Perlakuan campuran EVOO+madu menunjukkan aktivitas makrofag tertinggi setelah pemberian perlakuan selama 28 hari. Rerata aktivitas makrofag pada kelompok perlakuan pemberian EVOO atau madu saja, juga terjadi setelah pemberian selama 28 hari. Aktivitas makrofag pada perlakuan pada kelompok campuran EVOO+madu terus menerus mengalami peningkatan sampai ke hari 28, namun peningkatan aktivitas makrofag tidak berjalan secara linier. Pada pemberian EVOO, aktivitas makrofag mengalami peningkatan secara waktu dan membentuk garis linier, namun jumlah aktivitas makrofagnya dibawah kelompok yang diberi perlakuan campuran EVOO+madu. Rerata aktivitas makrofag pada hari ke 7 ($62,5 \pm 3,32$), hari ke 14 ($63,43 \pm 3,12$), hari ke 21 ($70,1 \pm 5,33$), dan hari ke 28 ($72,12 \pm 2,06$) pada kelompok perlakuan campuran EVOO+madu menunjukkan peningkatan rerata aktivitas makrofag. Rerata terendah aktivitas makrofag pada kelompok kontrol negatif pada hari ke 7, 14, 21, dan 28 setelah perlakuan. Angka aktivitas makrofag yang paling kecil ada pada kelompok tanpa perlakuan pada hari ke 21 yakni 42,2475. Angka aktivitas makrofag paling besar pada kelompok perlakuan campuran EVOO+Madu yang diberikan sampai hari ke 28 yakni 72,1. Hasil *One Way of Anova* menunjukkan ada pengaruh campuran EVOO+madu pada hari ke 14, 21, dan 28 pada aktivitas makrofag ($p_{\text{value}} < 0,05$), namun pada hari ke 7 tidak ada pengaruh campuran EVOO+madu terhadap aktivitas makrofag ($p_{\text{value}} \geq 0,05$). Kelompok campuran EVOO+madu memiliki pengaruh pada aktifitas makrofag berdasarkan waktu perlakuan. Hasil uji *Duncan* menunjukkan kelompok yang berbeda nyata antara kelompok campuran EVOO+madu dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 16.

Tabel 16 Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap aktivitas makrofag pada tikus

Kelompok	Aktivitas makrofag (%)				Rerata±SD	P _{value}
	7 hari	14 hari	21 hari	28 hari		
Kontrol (-)	45,92±3,72 ^{ab}	46,17±4,47 ^{ab}	42,25±1,50 ^a	47,78±5,05 ^{abc}	45,4±4,0	0,298
Kontrol (+)	53,75±4,45 ^{bcd}	54,33±5,00 ^{bode}	56,33±2,23 ^{odef}	65,08±5,92 ^{fgh}	57,4±6,25	0,148
EVOO	61,17±12,54 ^{defg}	64,0±5,28 ^{cfigh}	66,17±6,29 ^{fgh}	67,50±5,02 ^{gh}	64,7±7,5	0,696
Madu	60,53±13,05 ^{defg}	62,0±10,48 ^{defg}	65,92±10,37 ^{fgh}	61,17±3,18 ^{defg}	62,4±9,2	0,870
EVOO + Madu	62,50±3,32 ^{defgh}	63,43±3,12 ^{defgh}	70,10±5,33 ^{gh}	72,12±2,06 ^h	69,1±5,1	0,000
Rerata±SD	56,8 ±10,0	58,0± 8,9	61,5± 11,5	66 ± 8,3		
P _{value}	0,079	0,004	0,000	0,000		
P _{value} BP	: 0,000					
P _{value} WP	: 0,012					
P _{value} BP*WP	: 0,448					

Keterangan :

BP: Bahan perlakuan

WP: Waktu perlakuan

BP*WP : Interaksi bahan perlakuan dengan waktu perlakuan

Notasi huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji Duncan $\alpha = 0.05$.

Pemberian Makrofag merupakan sel yang bagian dari darah putih yang memiliki kemampuan fagosit di jaringan. Makrofag merupakan sel yang mengambil antigen yang merusak tubuh dan menghancurkannya dengan enzim-enzim lisosom yang berada di dalam granulanya. Kemampuan makrofag bergerak cepat sehingga menjadi awal benteng tubuh menghadapi kuman. Fungsi makrofag akan berjalan setelah makrofag diaktivasi. Aktivasi makrofag dengan stimulus dari sitokin IFN- γ dan keberadaan kuman itu sendiri juga mengaktivasi makrofag.

Stimulus dengan menginduksikan bakteri *S. aureus* pada tikus. Aktivitas makrofag merupakan gambaran jumlah makrofag yang aktif untuk menghancurkan atau mengfagosit mikroba. Aktivitas makrofag ketika pemberian 7 hari pertama, hari ke 21 dan hari ke 28, kelompok campuran minyak zaitun dan madu memiliki aktivitas makrofag tertinggi. Namun pada hari ke 14, kelompok campuran minyak zaitun ekstra virgin dan madu memiliki jumlah aktivitas mendekati kelompok madu dan kelompok minyak zaitun ekstra virgin. Hal ini dapat dikarenakan banyak faktor yang mempengaruhi nilai aktifitas makrofag selain bahan perlakuan, seperti efek stress pada hewan coba setelah pemberian bahan perlakuan dengan sonde selama 7 hari.

Aktifitas makrofag pada beberapa perlakuan menunjukkan jumlah aktifitas makrofag dipengaruhi oleh bahan perlakuan, dosis perlakuan, dan lamanya perlakuan serta jenis bakteri yang diinduksikan pada hewan coba. Uji aktivitas makrofag bisa dikerjakan secara in vivo atau in vitro. Afiyata *et al.* (2011) menemukan aktifitas makrofag pada mencit yang diberi perlakuan tempe selama 12 hari ($760,6 \pm 109,898$) lebih tinggi daripada yang tidak diberi perlakuan tempe ($9,6 \pm 2,839$) dan yang diberi perlakuan imboost ($244,2 \pm 70,159$). Reni *et al.* (2010) dalam penelitiannya menemukan aktivasi makrofag terhadap *Salmonella typhimurium* setelah pemberian susu kuda sumbawa dosis 1.5 ml/hari selama 14 hari pada mencit berkisar $51,23 \pm 9,72$. Penelitian Nugroho (2012) menunjukkan ramuan kombinasi buah sirih, daun miyana, madu dan kuning telur dapat meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag. Pada dosis 0,6 ml/20 g bb mencit yang setara dengan 150 mL/orang.

6.3.2 Uji Kapasitas Makrofag

Tabel 17 Menunjukkan kelompok campuran EVOO+madu memiliki rerata kapasitas makrofag di hari ke 7 ($2927,3 \pm 42,3$), 14 ($3011,3 \pm 72,3$), 21 ($3051,6 \pm 265,1$), dan 28 ($3539,4 \pm 59,5$). Rerata tertinggi kapasitas makrofag hari ke 7 adalah kelompok perlakuan campuran EVOO+madu ($2927,3 \pm 42,3$). Hari ke 14, angka kapasitas makrofag tertinggi juga pada kelompok campuran EVOO+madu dibandingkan kelompok lainnya. Namun pada hari ke 21 dan ke 28, angka kapasitas makrofag pada kelompok yang mendapatkan EVOO saja. Hasil uji *One Way of Anova* menunjukkan ada pengaruh perlakuan campuran EVOO+madu terhadap kapasitas makrofag ($p < 0.05$). Perlakuan berpengaruh nyata pada perbedaan kapasitas makrofag. Berdasarkan waktu, ada peningkatan secara signifikan kapasitas makrofag pada kelompok campuran EVOO+madu. Pengaruh pemberian campuran EVOO+madu pada kapasitas makrofag merupakan hasil tertinggi dan memiliki pola linier positif. Pada hari ke-7 kapasitas makrofag berbeda secara signifikan dengan ke 14, 21 dan hari ke 28, ditemukan hasil yang signifikan adanya perbedaan kapasitas makrofag setelah perlakuan. Namun angka kapasitas makrofag pada kelompok selain campuran EVOO+madu, tidak memiliki pola linier. Kapasitas makrofag terendah terjadi pada kelompok K(-) pada hari ke 28, sedangkan kapasitas makrofag tertinggi terjadi pada kelompok perlakuan EVOO pada hari ke 28. Perlakuan campuran EVOO+madu memiliki kapasitas makrofag tertinggi pada kelompok perlakuan pemberian EVOO pada hari ke 28.

Tabel 17 Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap kapasitas makrofag pada tikus

Kelompok	Kapasitas makrofag (Jumlah bakteri)				Rerata $\pm$ SD	P _{value}
	7 hari	14 hari	21 hari	28 hari		
Kontrol (-)	2241,8 $\pm$ 43,8 ^a	2280,3 $\pm$ 44,8 ^a	2297,8$\pm$106,1 ^a	2172,7 $\pm$ 30,1 ^a	2253,1 $\pm$ 74,8	0,298
Kontrol (+)	2193,5 $\pm$ 56,4 ^a	2902,0 $\pm$ 508,4 ^{bcd}	3239,3 $\pm$ 25,5 ^{ef}	3256,5$\pm$26,5 ^f	2897,0 $\pm$ 500,3	0,148
EVOO	2692,3 $\pm$ 41,0 ^b	2834,8 $\pm$ 127,4 ^{bcd}	3483,7 $\pm$ 38,7 ^g	3552,0$\pm$24,0 ^g	3140,7 $\pm$ 398,9	0,696
Madu	2802,5 $\pm$ 42,3 ^{bc}	3010,8 $\pm$ 24,7 ^{cd}	3462,8$\pm$58,7 ^g	3023,3 $\pm$ 43,4 ^{cd}	3074,8 $\pm$ 252,4	0,870
EVOO + Madu	2927,3 $\pm$ 42,3 ^{cd}	3011,3 $\pm$ 72,3 ^{cd}	3051,6 $\pm$ 265,1 ^{de}	3539,4$\pm$59,5 ^g	3264,3 $\pm$ 303,3	0,000
Rerata $\pm$ SD	2571,5 $\pm$ 309,7	2807,8 $\pm$ 350,2	3099,8 $\pm$ 439,8	3289,5 $\pm$ 432,5		
P _{value}	0,000	0,000	0,003	0,000		
P _{value} BP	: 0,000					
P _{value} WP	: 0,000					
P _{value} BP*WP	: 0,000					

Keterangan :

BP: Bahan perlakuan

WP: Waktu perlakuan

BP*WP : Interaksi bahan perlakuan dengan waktu perlakuan

Notasi huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji Duncan $\alpha = 0.05$.

Makrofag dapat memfagositosis jauh lebih banyak daripada neutrophil dan juga memakan banyak jaringan nekrotik (Guyton dan Hal 2007). Fagositosis oleh 50 makrofag aktif terhadap sejumlah bakteri, merupakan pengamatan kapasitas makrofag. Kapasitas makrofag menggambarkan kemampuan makrofag dalam menfagosit bakteri *S. aureus* pada tahapan mencerna. Adanya bakteri, memberikan stimulus bermigrasi dan melakukan fagositosis (Sacher dan McPherson 2012). Kapasitas makrofag menjadi indikator kemampuan 1 sel makrofag melakukan fagositosis bakteri. Makrofag dapat ditingkatkan kemampuannya dengan adanya kandungan zat bioaktif pada bahan perlakuan, lamanya keterpaparan bahan perlakuan, jumlah bahan perlakuan yang diberikan

dan jenis bakteri yang diinduksi ke hewan coba. Beberapa hasil penelitian menunjukkan jumlah kapasitas makrofag yang berbeda-beda.

Scotece *et al.* (2012) menyatakan kandungan *oleocanthal* dalam senyawa polifenol EVOO mempengaruhi kerja makrofag. EVOO dan Madu memiliki kandungan flavonoid yang dapat meningkatkan aktivitas dan kapasitas makrofag. Senyawa flavonoid yang terkandung pada EVOO dan madu mendukung kerja IL-2 dan limfosit yang berproliferasi. CD4⁺ dipengaruhi oleh limfosit yang berproliferasi. CD4⁺ terstimulus, mengaktivasi sel Th₁. Kelanjutan dari aktivasi sel Th₁, mempengaruhi *Spesific Makrofag Activating Factor*, dimana molekul-molekul IFN- γ mengaktifkan makrofag.

Mark *et al.* (2014) menyatakan ketika ada jaringan yang terluka atau rusak, adanya asam oleat bekerja pada membran sel memperbaiki sel dan jaringan. Amiot (2014) menyatakan manfaat flavonoid dalam EVOO antara lain untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektifitas vitamin C, dan antiinflamasi. Madu mengandung polifenol dalam bentuk asam fenolat dan flavonoid. Khasiat madu lebih banyak dipengaruhi oleh flavonoid, dimana antioksidan dalam flavonoid bekerja merangsang produksi hormon, memperlambat proses radikal bebas, dan meningkatkan produksi hormone. Gannabathula *et al.* (2012) menjelaskan zat dalam madu menstimulus makrofag melepas sitokin TNF- α dari sel THP-1.

Pasupuleti *et al.* (2017) menyatakan *kaemphenol*, *chrysin*, *galangan*, *quercetin*, *caffeic acid*, *acacatin*, dan *pinocembrin* pada madu, berhubungan dengan proses induksi membran mitokondria, proses induksi apoptosis, proses mengaktifkan jalur mitokondria, dan perbaikan inflamasi dengan menekan produksi TNF- α dan aktivasi NF-KB. Siswanto *et al.* 2013 menyatakan proses dalam membran sel berkaitan dengan proliferasi sel T dan jumlah sitokin yang keluar. Vitamin E memiliki kemampuan meningkatkan kerja membran sel dengan menstabilkan permeabilitas membran. Membran sel juga meningkatkan fungsi imunitas melalui kerjasama sel T_{helper} dengan *antigen presenting cell* (APC). Oelschlaegel *et al.* (2012) menyatakan madu memiliki aktivitas antimikroba yang tinggi. Aktivitas antimikroba berasal dari asam fenolik, flavonoid, dan norisoprenoid yang ada dalam madu. Asam lemak lain seperti asam laurat yang juga terkandung pada EVOO memiliki aktivitas antimikrobal yang signifikan terhadap bakteri gram positif, serta beberapa fungsi serta virus (Dayrit 2014). Asam laurat lebih efektif menghambat bakteri gram positif dibandingkan pada bakteri gram negatif (Anzaku *et al.* 2017).

6.4 Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan ada pengaruh pemberian campuran EVOO+madu terhadap aktivitas dan kapasitas makrofag tikus secara signifikan ($p < 0,05$). Aktivitas makrofag tertinggi pada kelompok tikus yang diberi campuran EVOO+madu terjadi pada hari ke 28 yaitu sebesar $72,12 \pm 2,06$ %. Kapasitas makrofag tertinggi pada kelompok tikus yang diberi campuran EVOO+madu pada hari ke 28, sebesar $3539,4 \pm 59,5$ bakteri per 50 makrofag aktif. Hasil menunjukkan ada pengaruh pemberian campuran EVOO dan madu terhadap aktivitas dan kapasitas makrofag.

VII PENGARUH PEMBERIAN EVOO, MADU, DAN EVOO+MADU TERHADAP IL-2, IL-12, DAN IFN- γ PADA TIKUS

7.1 Pendahuluan

Sistem imun terdiri dari imun bawaan (alami) dan adaptif. Sistem imun bawaan merupakan sistem imun sebagai respon awal tubuh terhadap infeksi kuman. Kusumo (2012) menyatakan pemberian antibiotik, konsumsi makanan, dan lingkungan, memberikan pengaruh pada perkembangan sistem imun bawaan. Sistem imun sangat berkaitan dengan asupan zat gizi. Minyak zaitun *extra virgin* (EVOO) dan madu merupakan bahan pangan yang memiliki banyak zat gizi menunjang kerja sistem imun dan dikenal sebagai imunomodulator. EVOO dan madu juga dikenal sebagai immunogen, dimana EVOO dan madu dapat memacu respons imun.

Campos *et al.* (2013) menyatakan asam oleat dalam EVOO sebagai pengatur fungsi kekebalan tubuh dan kesehatan. Asam oleat yang banyak memiliki mekanisme aksi dan perubahan fisiologis pada kesehatan. Asam oleat mempengaruhi aktivitas dan fungsi banyak komponen sistem kekebalan tubuh baik non spesifik dan spesifik, diantaranya presentasi antigen, proliferasi limfosit, produksi sitokin, granulosit dan aktivitas sel pembunuh.

Zat yang terkandung dalam EVOO seperti *Hydroxytyrosol* dapat mencegah inflamasi (Peyrol *et al.* 2017). Kandung senyawa minor EVOO seperti tokoferol, polifenol berkisar 1-2%, memberikan manfaat pada kesehatan manusia (Nocella *et al.* 2017). Sanchez-Fidalgo *et al.* 2013 menyatakan konsumsi EVOO setelah 30 hari pada tikus, memberikan dampak penurunan produksi sitokin proinflamasi. beberapa penelitian menunjukkan asam oleat yang dikandung EVOO memiliki kemampuan untuk proliferasi leukosit pada studi hewan. Konsumsi EVOO selama 8 atau 12 minggu menghasilkan peningkatan produksi IL-2 dan mengurangi sintesis IL-12 yang proinflamasi.

Carrillo *et al.* (2012) menyatakan asam lemak tak jenuh tunggal EVOO menjadi salah satu faktor penting dalam mempengaruhi proliferasi sel-sel kekebalan tubuh, daripada asam lemak yang lain. *Oleocanthal* menghambat produksi *nitric oxide* (NO) pada makrofag J774 yang diinduksi bakteri. Selain itu, ini menghambat ekspresi *Messenger Ribonucleic acid* (mRNA), *macrophage inflammatory protein 1-alpha* (MIP-1 α) dan Interleukin (IL) 6, serta sintesis protein, pada makrofag J774. *Oleocanthal* juga menghambat sintesis protein IL-1 β dan TNF- α dari makrofag yang distimulasi bakteri. Hal ini menunjukkan kandungan *oleocanthal* pada EVOO sebagai anti inflamasi. Popa *et al.* (2015) menyatakan squalene merupakan triterpen alami dalam EVOO berkisar 150-170 mg/100 g. Biosintetik squalene menjadi pitosterol seperti sitosterol, stigmasterol, dan campesterol. Squalene bersifat antioksidan dan berperan dalam pencegahan kanker. Hal ini menunjukkan EVOO dapat menurunkan tingkat peradangan.

Zat yang terkandung pada madu juga mampu mencegah inflamasi dan antibakteri. Vallianou *et al.* (2014) menyatakan madu mengandung beberapa vitamin terutama vitamin B kompleks dan vitamin C. Madu juga mengandung beberapa mineral seperti kalsium, tembaga, besi, mangan, fosfor, kalium. Samarghandian *et al.* (2017) menunjukkan adanya kandungan asam folat

yang tinggi pada beberapa madu, disusul dengan kandungan vitamin C. Kandungan mineral tertinggi yakni potassium, kalsium, fosfor, dan sodium. Beberapa flavonoid yang terdapat di madu antara lain, hesperetin apigenin, *chrysin*, pinocembrin, *quercetin*, kaempferol, dan *galangin*. Madu juga mengandung asam fenolik seperti *ellagic*, *caffeic*, *p-coumaric* dan *ferulic acids*. Kandungan antioksidan dalam madu bekerja secara sinergis. Soares *et al.* (2017) menemukan madu dari lebah *Apis mellifera* mengandung total phenol 101,39 eq mg asam galat/100g madu dan total flavonoid 29,29 eq mg *quercetine*/100g madu. Kandungan 100 gram madu mengandung *gallic* 0,082 mg, vanil 0,031 mg, *ellagic* 0,244 mg, *p-coumaric* 0,046 mg, *quercetin* 0,177 mg. Namun kandungan antioksidan ini dapat menurun saat proses penanganan madu dan penyimpanan tidak berjalan dengan baik. Pemberian madu 1,5 g/kg pada manusia dapat meningkatkan kadar fenol dan antioksidan dalam darah. Madu sebagai antiinflamasi dapat mengurangi aktivitas siklooksigenase-1 dan siklooksigenase-2 (Vallianou *et al.* 2014). Gannabathula *et al.* (2012) menyatakan aktivitas imunostimulan madu sangat bergantung dari individu dan asal nektar madu. Leong *et al.* (2012) menyatakan komponen bioaktif madu menekan leukosit (monosit dan neutropil) dan ada penurunan produksi superoksida. Madu diklaim bersifat antiinflamasi.

Sitokin merupakan hasil kerja sel limfosit dan monosit. Adanya senyawa protein atau polipeptida yang dihasil oleh dua sel tersebut, yang bekerja dan dihasilkan secara unik, terkadang berbagai sitokin yang diproduksi dapat menunjukkan reaksi tumpang tindih. Sitokin memiliki kemampuan autoregulasi dan sekresi sitokin berjalan cepat dan tidak disimpan dalam bentuk apapun serta jumlahnya sesuai kebutuhan. Sitokin memiliki kemampuan meningkatkan atau menghambat sintesis sitokin lainnya, dan juga dapat meningkatkan atau menghambat aksi kerja sitokin lainnya. Sitokin salah satu protein yang terlibat dalam komunikasi antar sel sistem imun, reaksi imun dan proses inflamasi. Sitokin berperan pada sistem imun alami dan sistem imun adaptif. Berbagai sitokin yang diproduksi dapat menunjukkan cara kerja yang tumpang tindih. Sitokin dibagi 2 yakni sitokin yang proinflamasi dan sitokin antiinflamasi. Sitokin proinflamasi antara lain IL-6 dan TNF- α , sedangkan sitokin antiinflamasi, salah satunya adalah IL-4. Dalam sistem imun, sitokin bekerja secara kompleks dalam mengaktifkan sel lain seperti makrofag (Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Playfair and Chain 2015).

Beberapa sitokin yang bekerja berkaitan dengan makrofag dan sel limfosit yakni IFN- γ , IL-12, IL-6, IL-2, dan TNF- α . IL-2 merupakan faktor pertumbuhan sel T, dapat menstimulasi berbagai jenis sel, termasuk sel pembuatnya, melalui reseptor rantai ganda. IL-2 bersumber dari sel T, aktivitasnya merangsang pertumbuhan sel T, B, NK, monosit, makrofag. Peran IL-2 pada proliferasi sel T sehingga meningkatkan kerja IFN- γ . IL-2 juga memiliki peran pada proliferasi sel B yang menghasilkan antibodi. IL-2 juga melakukan proliferasi sel NK yang meningkatkan aktivitas sitosik. IL-6 berperan dalam sistem imun alami dan sistem imun adaptif. IL-6 diproduksi di beberapa tempat yakni fagosit mononuklear, sel endotel vaskular, fibroblast, sel B, sel T, keratinosit, sel lainnya sebagai respon terhadap mikroba dan sitokin lainnya. Aktivitas IL-6 mengatur respons fase akut, inflamasi. Syam *et al.* (2016) menyatakan pemberian madu selama 7 hari dapat meningkatkan ekspresi mRNA IL-6 pada tikus setelah diinduksi bakteri *Salmonella tyhi*. IL-6 merupakan faktor diferensiasi sel B, diperlukan untuk sekresi antibodi

dan juga merupakan suatu mediator penting dalam respon fase akut inflamasi. IL-12 bersumber dari sel B, monosit, makrofag, dimana IL-12 merupakan sebagian besar hasil produksi sel dendrit dan makrofag sebagai respons terhadap stimulasi mikroba. IL-12 memiliki peran kunci dalam menstimulasi respon TH-1, adanya laporan defisiensi IL-12. Aktivitasnya mengatur aksis Th1-Th2 merangsang aktivitas sel NK dan Th1. IL-12 meningkatkan sitolitik sel CD8⁺. Kadar IL-12 juga merangsang produksi IFN- γ . Tumor Nekrosis Faktor (TNF) merupakan hasil kerja sel fagosit mononuklear dan sel T. Dua sel ini dapat aktif oleh sel NK, sel mast dan antigen. TNF ada 2 macam yakni TNF- α dan TNF- β . TNF- α bersumber dari Sel B, T, monosit, makrofag, dan fibroblast. TNF- β disebut juga TNF limfotoksin. TNF- α merupakan sitokin proinflamasi. IFN terdiri dari IFN- α , IFN- β , dan IFN- γ . IFN- α dan IFN- β merupakan IFN yang terlibat dalam regulasi ekspresi MHC-1, dan proses resistensi terhadap virus, sedangkan IFN- γ terlibat dalam aktivasi makrofag. Sumber IFN- α yakni limfosit, monosit dan makrofag. IFN- β berasal dari fibroblast dan epitel. IFN- γ bersumber sel T dan NK. Komponen IFN yakni *Acute Phase Protein* (APP), golongan protein serum yang kadarnya meningkat sebagai respons terhadap inflamasi. (Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Playfair and Chain 2015).

Uraian diatas menggambarkan peran sitokin dalam sistem imun dan antioksidan dalam EVOO dan madu mendukung sekresi dan kerja sitokin. Tujuan penelitian ini meliputi 1) Menganalisis pengaruh pemberian EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu terhadap kadar sitokin (IL-12, IL-2, dan IFN- γ) dalam darah pada tikus. 2) Menganalisis perbedaan kadar sitokin (IL-12, IL-2, dan IFN- γ) berdasarkan waktu pemberian perlakuan, bahan perlakuan, dan interaksi faktor waktu dan bahan perlakuan. 3) menganalisis kadar sitokin (IL-12, IL-2, dan IFN- γ) tertinggi dan terendah berdasarkan interaksi faktor waktu dan bahan perlakuan.

7.2 Metode

7.2.1 Waktu dan Lokasi

Waktu pelaksanaan penelitian bulan Juni-Juli 2019. Persiapan dan perawatan hewan coba dan perlakuan, dilaksanakan di RS Hewan FKH IPB Bogor. Analisis sitokin (IL-12, IL-2, dan IFN- γ) di laboratorium Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) IPB Bogor.

7.2.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah EVOO merek “Guillen” dan madu merek “Madurasa”, stimuno untuk kontrol positif, aquades untuk kontrol negatif. Bahan untuk pemberian perlakuan diperoleh dari supermarket atau apotik di DKI Jakarta. Anastesis dengan *Ketamin* dan *Xylazil*.

Beberapa alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain Kit Elisa merek Elabscience, sonde, pipet, spuit 1 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml, gunting bedah, pinset, alat sentrifus (merek Rayto, PLC Series no 1515096, power 220 VAC/50 Hz; 0654, Gemmy Industrial Corp, made inTaiwan), *eppendrof*, tabung darah EDTA. sarung tangan steril, dan EDTA.

7.2.3 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan pendekatan *in vivo* pada hewan coba. Desain penelitian ini adalah desain *factorial*, dimana penelitian ini mengamati waktu pemberian perlakuan dan bahan perlakuan serta interaksi antara waktu dan pemberian bahan perlakuan. Variabel dependen atau respon yang akan dilihat terdiri dari kadar IL-12, IL-2, dan IFN- γ dalam darah hewan coba.

7.2.4 Dosis dan Pembuatan Campuran Bahan Perlakuan

Kelompok hewan coba terdiri dari 5 kelompok, Kelompok Eksperimen (1) perlakuan pemberian EVOO sebanyak 0,185 g, kelompok Eksperimen (2) perlakuan pemberian Madu sebanyak 0,8 g/ekor/hari, kelompok Eksperimen (3) perlakuan pemberian campuran EVOO + Madu (pembuatan campuran terdiri dari EVOO 0,75 ml ditambah madu 0,8 gram, yang diaduk secara manual dengan tangan untuk menghindari adanya panas yang dihasilkan saat pengadukan). Kelompok kontrol positif diberi perlakuan stimuno sebanyak 0,246 ml/ekor/hari $\approx$ 0,25 ml/ekor/hari dan kelompok kontrol negatif diberi perlakuan dengan aquades. Bahan perlakuan diberikan dengan menggunakan alat sonde.

7.2.5 Hewan Coba

Rattus norvegicus dengan strain *Sparague Dawley* berjenis kelamin jantan, dengan bobot 150-250 g, dan umur 2-3 bulan. Tikus yang digunakan berasal Balai Besar Penelitian Veteriner Kementerian Pertanian RI. Tikus memasuki masa aklimatisasi selama 7 hari. Pemberian pakan AIN-93M sesuai standar sebanyak 10-15 gram per-ekor setiap hari. Minum *ad libitum*. Besar kandang, suhu ruangan, kelembaban ruangan, serta pencahayaan, mengikuti standart yang diterapkan pada ruang kandang tikus RS Hewan IPB Bogor. Bahan perlakuan diberikan selama 28 hari. Pada hari ke 7, 14, 21, dan ke 28, diambil tiap kelompok 4 ekor tikus untuk diamati kadar sitokin IL-12, IL-2, dan IFN- γ dalam darah.

Tabel 18 Jumlah sampel tiap pengamatan sitokin

Kelompok	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	Eksperimen 1	Eksperimen 2	Eksperimen 3
Jumlah sampel	16 tikus	16 tikus	16 tikus	16 tikus	16 tikus
Jenis Perlakuan	Tanpa perlakuan (Pemberian aquades 1 kali sehari)	Pemberian Stimuno 1 kali sehari	Pemberian EVOO 1 kali sehari	Pemberian Madu 1 kali sehari	Pemberian Campuran EVOO + Madu 1 kali sehari
Hari ke 7	4 tikus	4 tikus	4 tikus	4 tikus	4 tikus
Hari ke 14	4 tikus	4 tikus	4 tikus	4 tikus	4 tikus
Hari ke 21	4 tikus	4 tikus	4 tikus	4 tikus	4 tikus
Hari ke 28	4 tikus	4 tikus	4 tikus	4 tikus	4 tikus

Tabel 18 menunjukkan tiap kelompok terdiri dari 16 ekor. Setelah adaptasi 7 hari, pada hari ke 8, tikus diberikan bahan uji sesuai dengan hasil hitung rumus konversi pakan. Pemberian bahan uji dilakukan sampai 28 hari. Pada hari ke 7, 14, 21, dan ke 28, dilakukan analisis sitokin. Tiap kelompok diambil 4 ekor tikus pada hari pengamatan tersebut.

Pada setiap waktu hari pengamatan, tikus dianastesi secara *intra peritoneal* dengan suntikkan berisi *Ketamine* sebanyak 75 mg/kg dan *Xylazine* 12 mg/kg. Kemudian pengambilan darah dilakukan dengan eksaquinasi yakni mengeluarkan darah sebanyak-banyaknya. Setelah pengambilan darah, hewan dikremasi di insenerator FKH IPB.

7.2.6 Bakteri

Staphylococcus aureus diperoleh dari Laboratorium Terpadu Bakteriologi FKH IPB. Dosis *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 10^8 cfu sebanyak 1 ml, disuntikkan pada intraperitoneal tikus.

7.2.7 Pengambilan Darah Tikus

Pengambilan darah tikus dilakukan setelah 1 jam induksi bakteri ke intraperitoneal tikus. Pengambilan darah tikus dilakukan untuk uji sitokin (IL-12, IL-2, dan IFN- γ) Pengambilan darah dilakukan pada hari ke 7, 14, 21, dan 28. Darah diambil setelah tikus dieuthanasia 5 menit. Pengambilan darah dengan penghisapan pipa kapiler dari *intracardial*. Pengambilan darah dilakukan dengan eksaquinasi yakni mengeluarkan darah sebanyak-banyaknya selama 10 menit. Darah yang sudah diambil diletakkan pada tabung yang mengandung 10 % asam etilen diamin tetraasetat (EDTA). Darah diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C kemudian disentrifus dengan alat mikrosentrifus (Sigma) pada 3024 rpm, selama 10 menit, suhu 4°C. Hasil yang sudah terpisah antara plasma dan serum. Bagian plasma tidak digunakan, sedangkan bagian serum disimpan dalam mikrotube, dibungkus dengan parafilm dan disimpan dalam pendingin dengan suhu -70°C sampai akan digunakan.

7.2.8 Penentuan Kadar Interleukin (IL-12, IL-2, dan IFN- γ)

Pengujian dilakukan menggunakan Rat (IL-12, IL-2, dan IFN- γ) Elisa *Kit Wash Buffer*. Prosedur pengukuran kadar dimulai dengan proses pada larutan konsentrat yang diencerkan 25x. Tabung yang disiapkan untuk memasukan larutan standar 10000pg/ml sebanyak 150 μ l. Tabung sudah mengandung 850 μ l standard diluent buffer lalu dihomogenkan dan diperoleh larutan dengan konsentrasi 1500pg/ml kemudian dari larutan 1500pg/ml dilakukan pengenceran bertingkat hingga diperoleh konsentrasi 750pg/ml, 375pg/ml, 187 pg/ml, 93,7pg/ml, 44,9pg/ml, 2,4 pg/ml dan 0 pg/ml. Kemudian streptavidin-HRP disiapkan dan dilakukan pengenceran 100 x yaitu dengan menambah 10 μ l streptavidin-HRP ke dalam 990 μ l HRP *diluent*.

Sebanyak 1 *strip well* untuk standard an sampel. Jumlah yang dimasukan 50 μ l sampel dan 50 μ l ke dalam *well*. Langkah selanjutnya memasukan *plate* ke inkubasi dengan suhu 20-25°C selama 1 jam. Setelah itu

dengan *wash buffer* dilakukan pencucian *plate* sebanyak 3 kali. Selanjutnya diberikan RBA (*reagent biotinylate antibody*) sebanyak 100µl ke semua well, kembali dimasukan ke dalam inkubasi selama 30 menit dengan suhu 20-25°C.

Proses diulang, *namun larutan yang ditambahkan* 100µl solusi *streptavidin- HRP*, setelah *plate* dicuci terlebih dahulu. Kemudian selama 30 menit kembali inkubasi dengan suhu 20-25°C. Langkah diulang dengan menggunakan 100µl substrat TMB. Selanjutnya dengan *plate* tertutup kemudian diinkubasi selama 30 menit pada ruang gelap. Langkah diulang kembali dengan penambahan 100µL *stop solution* ke setiap *well*. Langkah selanjutnya pengukuran absorbansi pada 450 nm. Absorbansi dibaca menggunakan *ELISA reader*.

7.2.9 Analisis Data

Perbedaan kadar Sitokin IL-12, IL-2, dan IFN-γ, antar kelompok, dianalisis dengan *One Way of Anova* dan Uji *Post Hoc* menggunakan Uji *Duncan*. Kadar Sitokin IL-12, IL-2, dan IFN-γ, juga dianalisis secara deskriptif dengan menganalisis rerata dan standar deviasi.

7.3 Hasil dan Pembahasan

Sitokin memiliki potensi yang menguntungkan sistem imun. Sitokin dapat diproduksi dari makrofag, eosinophil, sel mast, sel endotel, dan epitel. Sitokin memiliki fungsi yang berbeda-beda. Fungsi sitokin tidak selalu saling berkaitan dengan fungsi sitokin yang lain. Sitokin dapat bekerja secara sinergis dengan sel imun yang lain, namun bisa juga saling bertolak belakang. Sitokin bisa mengaktifasi sel yang memproduksi dirinya. Penelitian ini menganalisis beberapa sitokin dalam darah tikus setelah diberi perlakuan.

7.3.1 Interleukin 12 (IL-12)

Kadar IL-12 pada semua kelompok tertinggi setelah 7 hari pemberian perlakuan. Pada waktu perlakuan selama 7 hari, rerata kadar IL-12 tertinggi pada kelompok perlakuan EVOO. Kelompok campuran EVOO+madu memiliki kadar IL-12 ke 2 tertinggi setelah kelompok EVOO. Semakin lama pemberian perlakuan semua kelompok mengalami penurunan IL-2 kecuali kelompok kontrol positif dan kelompok madu. Rerata kadar IL-12 pada kelompok campuran EVOO+madu adu pada hari ke 7 ($27,242 \pm 9,26$ pg/ml), ke 14 ($12,297 \pm 2,03$ pg/ml), ke 21 ($8,083 \pm 1,20$ pg/ml), dan ke 28 ($7,244 \pm 1,60$ pg/ml). Ada penurunan kadar IL-12 pada kelompok campuran EVOO+madu. Hal yang sama dengan rerata kadar IL-12 pada kelompok EVOO. Pada hari ke 28, kadar IL-12 pada kelompok kontrol negatif tidak terdeteks. Kadar IL-12 di hari ke 7 setelah pemberian perlakuan, paling tinggi pada kelompok perlakuan EVOO (32,3 pg/ml). Kadar IL-12 paling rendah setelah pemberian madu selama 21 hari. Kadar IL-12 paling tinggi juga pada kelompok yang diberi perlakuan madu selama 7 hari. Hasil uji *One Way of Anova* menunjukkan ada pengaruh campuran EVOO + madu terhadap kadar IL-12 berdasarkan waktu perlakuan. Hasil uji *Duncan* menunjukkan kadar IL-12 pada campuran EVOO + madu berbeda bermakna dengan kelompok lainnya pada hari ke 7. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 19.

Tabel 19 Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap sitokin IL-12 pada tikus

Kelompok	Kadar IL-12 (pg/ml)				Rerata±SD	P _{value}
	7 hari	14 hari	21 hari	28 hari		
Kontrol (-)	12,390±4,65 ^{ab}	9,483±1,69 ^{ab}	9,164±2,09 ^{ab}	-	10,4±3,1	0,427
Kontrol (+)	19,716±6,02 ^{bc}	8,047±2,41 ^{ab}	5,812±0,00 ^{ab}	10,123±0,00 ^{ab}	12,4±7,1	0,004
EVOO	32,290±29,39 ^d	18,815±8,93 ^{bc}	13,087±6,33 ^{ab}	4,384±0,00 ^a	20,3±17,9	0,178
Madu	12,866±3,12 ^{ab}	12,546±3,78 ^{ab}	7,603±0,46 ^{ab}	9,654±2,75 ^{ab}	10,5±3,5	0,078
EVOO + Madu	27,242±9,26 ^{cd}	12,297±2,03 ^{ab}	8,083±1,20 ^{ab}	7,244±0,60 ^{ab}	14,6±9,7	0,000
Rerata±SD	21,3±14,3	12,6±5,8	8,8±3,9	9±3,7		
P _{value}	0,347	0,100	0,083	0,003		
P _{value} BP	: 0,308					
P _{value} WP	: 0,002					
P _{value} BP*WP	: 0,686					

Keterangan :

BP: Bahan perlakuan

WP: Waktu perlakuan

BP*WP : Interaksi bahan perlakuan dengan waktu perlakuan

Notasi huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji *Duncan* $\alpha = 0,05$.

IL-12 salah satu sitokin pada imunitas nonspesifik. Sasaran utama IL-2 antara lain membantu diferensiasi Th1 pada sel T, terlibat membantu sel T dan sel NK dalam sintesis IFN- γ dan meningkatkan aktivitas sitolitik (Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Playfair and Chain 2015). Croft *et al.* (2011) menyatakan sumber utama dari makrofag dan sel-sel B. Daya kerja meningkatkan diferensiasi Th₁ dan sintesis IFN- γ . Merangsang sel-sel NK dan sel-sel T CD4⁺ kepada sitolisis. IL-12 bekerja sinergik dengan IL-2. IL-12 juga penginduksi IFN- γ untuk pengaktifan makrofag dalam pembasmian intraseluler. IL-12 bersama IFN- γ sebagai penginduksi imunitas seluler terhadap pathogen bakteri intrasel. IL-12 yang berasal dari sel-sel dendritik dan makrofag membantu transisi makrofag, dan sel-sel NK pada sistem imun seluler.

7.3.2 Interleukin 2 (IL-2)

IL-2 merupakan salah satu sitokin pada sistem imun adaptif. Sumber utama IL-2 dari sel T, setelah IL-2 diproduksi oleh sel T, IL-2 yang membantu sel T untuk berproliferasi, meningkatn sintesis sitokin, dan apoptosis. IL-2 juga membantu proliferasi dan aktivasi sel NK. Pada sel B, IL-2 membantu proliferasi sel B dan sintesis antibodi. IL-2 merangsang proliferasi dan diferensiasi sel T, sel B, dan NK (Baratawidjaja dan Rengganis 2014).

Tabel 20 menunjukkan kadar IL-2 tertinggi pada kelompok campuran EVOO+madu terjadi setelah pemberian selama 7 hari. Kelompok EVOO juga memiliki kadar IL-2 tertinggi setelah pemberian selama 7 hari. Kelompok madu memiliki kadar IL-2 tertinggi setelah pemberian selama 14 hari. Rerata kadar IL-2 pada kelompok campuran EVOO+madu pada hari ke 7 (30,426±12,74 pg/ml), ke 14 (16,514±2,59 pg/ml), ke 21 (17,501±1,33 pg/ml), dan ke 28 (14,990±1,74 pg/ml). Hasil uji *One Way of Anova* menunjukkan ada pengaruh campuran EVOO+madu terhadap kadar IL-2 berdasarkan waktu perlakuan. Namun tidak ada pengaruh campuran EVOO+madu berdasarkan interaksi antara bahan perlakuan dengan waktu perlakuan. Hasil uji *Duncan* menunjukkan ada perbedaan kadar IL-2 yang signifikan, antara kadar IL-2 hari ke 7 dengan hari

ke 14, 21, dan 28. Sedangkan berdasarkan perlakuan tidak ada yang berbeda. Rerata kadar IL-2 mengalami penurunan pada semua perlakuan berdasarkan waktu. Pemberian EVOO berdasarkan waktu, memiliki kadar IL-2 berpola linier negatif, dimana semakin lama pemberian EVOO semakin mengalami penurunan kadar IL-2, namun pola ini tidak signifikan ($p\text{-value} \geq 0.05$).

Tabel 20 Pengaruh evoo, madu, dan campurannya terhadap sitokin IL-2 pada tikus

Kelompok	Kadar IL-2 (pg/ml)				Rerata $\pm$ SD	P _{value}
	7 hari	14 hari	21 hari	28 hari		
Kontrol (-)	20,091 $\pm$ 4,18 ^{bc}	18,453 $\pm$ 3,68 ^a	17,129 $\pm$ 3,90 ^{ab}	14,385 $\pm$ 2,59 ^a	17,5 $\pm$ 3,8	0,334
Kontrol (+)	25,242 $\pm$ 3,94 ^a	17,120 $\pm$ 1,53 ^{ab}	14,582 $\pm$ 0,17 ^a	12,967 $\pm$ 0,46 ^a	17,5 $\pm$ 5,3	0,000
EVOO	39,826 $\pm$ 30,15 ^c	20,105 $\pm$ 0,98 ^{ab}	14,836 $\pm$ 0,91 ^a	13,169 $\pm$ 0,61 ^a	21,3 $\pm$ 15,7	0,114
Madu	15,496 $\pm$ 1,93 ^{ab}	19,093 $\pm$ 7,06 ^{ab}	15,593 $\pm$ 0,61 ^a	15,036 $\pm$ 1,60 ^a	16,2 $\pm$ 3,4	0,448
EVOO + Madu	30,426 $\pm$ 12,74 ^{ab}	16,514 $\pm$ 2,59 ^{ab}	17,501 $\pm$ 1,33 ^{ab}	14,990 $\pm$ 1,74 ^a	19,9 $\pm$ 8,7	0,022
Rerata $\pm$ SD	26,5 $\pm$ 15,2	18,3 $\pm$ 3,4	15,8 $\pm$ 1,9	26,5 $\pm$ 15,2		
P _{value}	0,344	0,657	0,146	0,338		
P _{value} BP	: 0,282					
P _{value} WP	: 0,000					
P _{value} BP*WP	: 0,188					

Keterangan :

BP: Bahan perlakuan

WP: Waktu perlakuan

BP*WP : Interaksi bahan perlakuan dengan waktu perlakuan

Notasi huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji Duncan $\alpha = 0.05$.

Ros dan Cantrell (2018) menemukan IL-2 memiliki kemampuan membelah jalur pensinyalan sehingga IL-2 mengontrol diferensiasi dan homeostasis dari sel T proinflamasi dan antiinflamasi. IL-2 sebagai pengatur utama program metabolisme sel T dan menentukan nasib sel. IL-2 menurunkan pada terapi kesehatan *al hijamah* menurunkan IL-2 dari 2023,34 menjadi 1789,34 setelah 3 bulan terapi (Baghdadi *et al.* 2015). Benczik dan Gaffen (2004) menyatakan IL-2 bersama IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, dan IL-21 berbagi reseptor untuk mempromosikan dan mempertahankan populasi limfosit, melalui 3 jalur utama yakni jalur JAK/ *Signal Transducer and Activator Of Transcription* (STAT), *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK), dan *Phosphatidylinositol-3 Kinase* (PI3K) dalam proliferasi dan pesinyalan kelangsungan hidup.

Malik (2008) menyatakan IL-2 memiliki peran dalam toleransi imun dan merupakan pusat respons imun protektif. Louise (2011) menyatakan sumber utama IL-2 dari sel Th₁. Daya kerja yang utama IL-2 sebagai faktor pertumbuhan sel T dan mengaktifkan sel-sel NK dan B. IL-2 dapat bersinergis dengan IL-5 untuk membantu diferensiasi sel-sel B. IL-10 dapat menghambat pelepasan IFN- γ dan IL-2 oleh Th₁, maka mengurangi pengaktifan makrofag oleh IFN- γ . IL-2 yang diperlukan untuk transformasi sel T dan sel B. IL-2 merangsang sel-sel Th₂, sehingga sel Th₂ mengalami transformasi, berdiferensiasi, dan membelah diri serta mengeluarkan sitokin IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13. Suatu zat immunosupresif dapat menghambat efek IL-2 dan banyak mendukung terjadinya proliferasi banyak tipe sel. Zat immunosupresif juga meningkatkan perubahan sel-sel B menjadi sel yang mensintesis immunoglobulin A (IgA). Cacat gen dapat mengganggu respon terhadap IL-2. Beberapa obat juga dapat menghambat IL-2 yang sudah diproduksi sel T yang

teraktivasi. Malik (2008) menyatakan ada defisiensi IL-2 ketika sel T regulator akan mengalami gangguan.

7.3.3 Interferon Gamma (IFN- γ)

Kadar IFN- γ pada kelompok campuran EVOO+madu terjadi setelah pemberian perlakuan selama 7 hari. Hal yang sama juga pada kelompok EVOO, dimana kadar IFN- γ tertinggi setelah diberi perlakuan selama 7 hari. Kelompok perlakuan madu memiliki kadar IFN- γ tertinggi setelah pemberian 28 hari. Rerata kadar IFN- γ pada kelompok campuran EVOO+madu pada hari ke 7 ($61,322 \pm 64,91$ pg/ml), ke 14 ($7,38 \pm 8,729$ pg/ml), dan ke 28 ($6,90 \pm 9,24$ pg/ml). Hari ke 21, kadar IFN- γ tidak terdeteks. Kadar IFN- γ pada kelompok campuran EVOO+madu tertinggi pada hari ke 7 dibandingkan kelompok yang lain. Kelompok tertinggi kadar IFN- γ pada hari ke 14, pada kelompok kontrol positif dan kelompok madu. Hari ke 21 dan hari ke 28, tidak semua kadar IFN- γ terdeteks dalam pengukuran. Pola fluktuasi kadar IFN- γ terjadi pada kelompok madu dan kelompok EVOO. Hasil uji *One Way of Anova* menunjukkan tidak ada pengaruh campuran EVOO+madu terhadap kadar IFN- γ . Hasil *Duncan* menunjukkan kelompok campuran EVOO+madu berbeda secara signifikan dengan kelompok perlakuan lain di hari ke 7. Penurunan kadar IFN- γ pada kelompok campuran EVOO+madu sangat drastis. Hal ini dapat dilihat pada tabel 21.

Tabel 21 Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap sitokin ifn- γ pada tikus

Kelompok	Kadar IFN- γ (pg/ml)				Rerata $\pm$ SD	P.value
	7 hari	14 hari	21 hari	28 hari		
Kontrol (-)	11,563 $\pm$ 1,87 ^a	7,511 $\pm$ 1,426 ^a	3,161 $\pm$ 0,0 ^a	-	7,4 $\pm$ 3,8	0,001
Kontrol (+)	14,378 $\pm$ 4,086 ^a	16,722 $\pm$ 0,47 ^a	-	-	15,6 $\pm$ 2,9	0,380
EVOO	15,237 $\pm$ 13,66 ^a	11,809 $\pm$ 6,55 ^a	5,338 $\pm$ 3,765 ^a	6,273 $\pm$ 5,13 ^a	9,8 $\pm$ 8,1	0,421
Madu	14,697 $\pm$ 6,256 ^a	15,007 $\pm$ 5,176 ^a	-	16,252 $\pm$ 0,00 ^a	15,4 $\pm$ 3,9	0,881
EVOO + Madu	61,322 $\pm$ 64,91 ^b	7,38 $\pm$ 8,729 ^a	-	6,90 $\pm$ 9,24 ^a	22 $\pm$ 40,0	0,149
Rerata $\pm$ SD	25,8 $\pm$ 36,4	11,1 $\pm$ 6,4	5,9 $\pm$ 4,8	6,8 $\pm$ 5,9		
P.value	0,293	0,215	0,373	0,293		
P.value BP	: 0,495					
P.value WP	: 0,094					
P.value BP*WP	: 0,103					

Keterangan :

BP: Bahan perlakuan

WP: Waktu perlakuan

BP*WP : Interaksi bahan perlakuan dengan waktu perlakuan

Notasi huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji *Duncan* $\alpha = 0.05$.

IFN terdiri dari IFN- α , IFN- β , dan IFN- γ . IFN- α dan IFN- β merupakan IFN yang terlibat dalam regulasi ekspresi MHC-1, dan proses resistensi terhadap virus, sedangkan IFN- γ terlibat dalam aktivasi makrofag. Sumber IFN- α yakni limfosit, monosit dan makrofag. IFN- β berasal dari fibroblast dan epitel. IFN- γ bersumber sel T dan NK. Komponen IFN yakni *Acute Phase Protein* (APP), golongan protein serum yang kadarnya meningkat sebagai respons terhadap inflamasi. (Parmely 2013; Baratawidjaja dan Rengganis 2014; Playfair and Chain 2015).

Croft *et al.* (2011) menyatakan mutasi reseptor IFN- γ dapat menyebabkan kegagalan aktivasi makrofag. Setiap sitokin yang akan

meningkatkan perkembangan limfosit spesifik antigen yang memproduksi IFN- γ . Individu yang tidak dapat memproduksi IFN- γ memiliki risiko mudah terinfeksi kuman. IFN- γ yang meningkatkan sel imun seluler dengan meningkatkan makrofag dan sel sel NK. Kinanthi (2009) menyatakan EVOO mengandung *squalene* yang bekerja sebagai *interferon* (IFN) *inducer* untuk meningkatkan jumlah sel *Natural Killer* (NK) atau *lymphocytes* dalam sistem imun. Lavermicocca *et al.* (2010) menyatakan prinsip homeostatis terkait dalam menjaga keseimbangan kerja Th1 dan Th2. Aktivitas Th1 dapat diinduksi oleh mikroba, sehingga Th1 memproduksi IL-1 β , IL-2, dan TNF- α . Aktivitas modulator pada differensiasi sel T oleh kehadiran mikroba mendukung *Antigen Presenting Cell* (APC) sebagai respon adaptif.

7.4 Simpulan

Hasil analisis kadar sitokin pada tikus yang diberikan campuran EVOO+madu menunjukkan kadar IL-12, dan IFN- γ menurun berdasarkan waktu perlakuan. Kadar IL-2 pada kelompok campuran EVOO+madu menunjukkan fluktuasi. Tidak ada pengaruh pemberian campuran EVOO+madu terhadap kadar IL-2 dan IL-12, berdasarkan semua waktu perlakuan. Kadar IL-2 terendah pada hari ke 28 kelompok kontrol negatif, sedangkan IL-2 tertinggi pada kelompok EVOO hari ke 7. Kadar IL-12 terendah pada hari ke 21 kelompok madu, sedangkan IL-12 tertinggi pada kelompok madu hari ke 7. Kadar IFN- γ terendah pada hari ke 21 kelompok kontrol negatif, sedangkan IFN- γ tertinggi pada kelompok campuran EVOO+madu hari ke 7.

VIII PENGARUH PEMBERIAN EVOO, MADU, DAN EVOO+MADU TERHADAP PANJANG VILI DAN KEDALAMAN KRIPTA PADA TIKUS

8.1 Pendahuluan

Kesehatan pencernaan merupakan hal yang sangat penting, dikarenakan pencernaan merupakan pintu masuk makanan untuk sel-sel tubuh. Pencernaan yang baik, akan maksimal menyerap zat gizi untuk tubuh, namun jika pencernaan bermasalah, maka makanan tidak optimal diserap tubuh dan bisa terjadi kekurangan zat gizi, dengan menjaga kesehatan pencernaan sangat penting untuk keseluruhan kesehatan tubuh.

Extra Virgin Olive Oil (EVOO) memiliki banyak manfaat untuk kesehatan, salah satunya untuk kesehatan pencernaan. Beberapa hasil penelitian menunjukkan EVOO berkaitan dengan rehabilitas usus pada penderita gastroenteritis, tukak lambung atau infeksi usus lainnya. Sanchez-Fidalgo *et al.* (2013) menyatakan konsumsi EVOO setelah 30 hari pada tikus, memberikan dampak penurunan *chronic colitis*. EVOO meningkatkan kerja enzim pencernaan, mencegah inflamasi dalam saluran pencernaan, dan bersifat antibakteri. EVOO melindungi saluran pencernaan dan lambung dengan meningkatkan mukosa saluran pencernaan dan menurunkan sekresi asam lambung (Bermúdez *et al.* 2004; de Lastra *et al.* 2001). Rebollada-Merino *et al.* (2019) menyatakan adanya peningkatan panjang vili dan kedalaman kriptas pada duodenum usus halus ayam betina setelah diberi pakan dengan dicampurkan EVOO. Lavermicocca *et al.* (2010) menyatakan produk zaitun dapat mengantar bakteri probiotik sebagai pembawa untuk manusia

Madu terbukti secara ilmiah meningkatkan kesehatan pencernaan. Samarghandian *et al.* (2017) menyatakan madu salah satu suplemen kesehatan yang digunakan untuk meningkatkan saluran pencernaan. Mannina *et al.* (2016) menyatakan madu memiliki kemampuan meningkatkan kesehatan lambung dan duodenum. Soares *et al.* (2017) menemukan madu yang kaya akan senyawa antioksidan mampu menghambat peradangan di mukosa lambung tikus. Ajibola (2012) menyatakan madu dapat meningkatkan pencernaan zat makanan karena madu mengandung beberapa enzim. Madu sebagai pemanis memiliki kemudahan untuk dicerna karena madu mengandung sukrosa yang rendah dan monosakarida yang tinggi.

El-Arab *et al.* (2006) menyatakan mengonsumsi makanan dengan penambahan madu, dapat meningkatkan perubahan histopatologis usus halus kearah yang lebih sehat. Jumlah bakteri *Bifidobacteria* dan jumlah *Lactobacilli* pada usus meningkat tajam pada tikus yang menerima pakan yang ditambah dengan madu. National Honey Board (2010) menyatakan madu digolongkan prebiotik karena madu mampu meningkatkan bakteri *Bifidobacteria* di saluran pencernaan. Oligosakarida merupakan salah satu yang juga terkandung dalam madu dan bermanfaat untuk pencernaan. Kandungan oligosakarida ditemukan 3.1 g di madu kemasan dan 10.1 g di madu mentah per 100 g madu. Amin *et al.* (2020) menyatakan madu dari lebah *Heterotrigona itama* mengandung probiotik. Hasil isolasi menunjukkan ada *B. amyloliquefaciens* HTI-19 (gram positif) dan *B. subtilis* HTI-23 (gram negatif),

memiliki kelangsungan hidup mendekati probiotik komersial seperti *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Madu juga memiliki kemampuan meningkatkan penyerapan zat gizi. Ariefdjohan *et al.* (2008) menyatakan madu membantu penyerapan kalsium dalam pencernaan. Gollu *et al.* (2008) menyatakan memberikan madu pada tikus memberikan hasil gambaran histologi ileum usus halus yang lebih baik. Afroz *et al.* (2013) menyatakan kandungan enzim dalam madu memberikan keuntungan pada pencernaan. Enzim utama yang terkandung dalam madu antara lain invertase (*saccharase*), diastase (*amylase*), dan glukosa oksidase.

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini bertujuan 1) mengetahui rerata panjang vili dan rerata kedalaman kriptas usus halus berdasarkan waktu pemberian perlakuan dan bahan perlakuan. 2) menganalisis perbedaan panjang vili dan kedalaman kriptas berdasarkan waktu perlakuan, bahan perlakuan dan interaksi antara faktor waktu dan bahan perlakuan. 3) mengetahui rerata tertinggi dan terendah pada panjang vili dan kedalaman kriptas berdasarkan interaksi faktor waktu dan bahan perlakuan.

8.2 Metode

8.2.1 Waktu dan Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di RS Hewan FKH IPB Bogor. Analisis panjang vili dan kedalaman kriptas dilakukan di Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) IPB Bogor. Penelitian dilakukan pada bulan Juni sampai Juli 2019.

8.2.2 Bahan dan alat

Bahan perlakuan terdiri dari madu merek “Madurasa” dan EVOO merek “Guiellen”. Larutan BNF 10%, alkohol 70%, 80%, 90%, *xylol*, larutan etanol, larutan NaCl, aquades, parafin, *Ketamine*, *Xylazine*, formalin, dan larutan hematoxilin-eosin. Alat yang digunakan sonde untuk pemberian bahan perlakuan, *kit* bedah hewan coba, spuit 1ml untuk anastesi, *spuit* 5 ml untuk eksanestesi, cawan petri untuk penempatan organ usus, dan tabung *vacutainer* untuk menyimpan organ serta mikroskop cahaya (kamera (Nikon Eclipse 80i, DS Fi1, Jepang), masker, sarung tangan, *cover glass*, mikrotom, dan preparat.

8.2.3 Bahan perlakuan

EVOO diberikan sebanyak 0,185 g /ekor/hari, madu diberikan sebanyak 0,8 g/ekor/hari, dan campuran EVOO+madu terdiri dari EVOO 0,75 ml ditambah madu 0,8 g, yang diaduk tanpa menimbulkan kenaikan suhu. Aquades sebanyak 1 ml/ekor/hari. Bahan perlakuan campuran EVOO+madu dibuat setiap hari untuk menghindari kontaminasi jamur atau mikroba lainnya.

8.2.4 Hewan Coba dan Penanganannya

Rattus norvegicus merupakan hewan coba yang digunakan, dengan strain *Sprague Dawley* berbobot 150-250 g, jantan, usia 2-3 bulan, jantan. Tikus dalam kondisi baik dan sehat. Hewan coba berasal dari Balai Besar Penelitian Veteriner Kementerian Pertanian RI. Masa aklimasi selama 7 hari, pemberian pakan AIN-93M sebanyak 10-15 gram per-ekor per-hari. Minum *ad libitum*. Besar ruangan,

besar kandang, ukuran pencahayaan, ukuran kelembaban, dan suhu mengikuti standar yang diterapkan RS Hewan FKH IPB Bogor. Pemberian perlakuan selama 4 pekan. Setiap kelompok diambil 4 tikus tiap kelompok, tiap pekannya. Tikus kemudian dianestesi (*Ketamine* sebanyak 75 mg/kg BB tikus dan *Xylazine* 12 mg/kg BB tikus), di ekskuinasi, dibedah, dilanjutkan proses pengambilan organ. Setelah itu hewan dikremasi di insenerator FKH IPB.

8.2.5 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen murni dengan desain *factorial*, dimana pengamatan panjang vili dan kedalaman kriptus berdasarkan dua faktor yakni waktu perlakuan dan bahan perlakuan. Desain penelitian menggunakan 3 kelompok perlakuan yang akan diberi EVOO, madu, dan campuran EVOO+madu. Penelitian ini juga menggunakan 1 kelompok kontrol, dengan pemberian aquades untuk kelompok kontrol negatif. Jumlah tiap kelompok 16 tikus, yang akan diamati 4 tikus pada hari ke 7, 14, 21, dan 28.

8.2.6 Pembuatan Preparat Histologi Usus Halus

Pembuatan preparat dengan metode paraffin yaitu fiksasi organ, pembuatan blok paraffin, pemotongan dan pewarnaan.

a) Fiksasi organ

Pemeriksaan histologi usus dilakukan dengan pengambilan organ yang dilanjutkan dengan pembuatan preparat histologi organ. Larutan BNF (*Buffered Neutral Formalin*) 10% digunakan untuk fiksasi organ selama minimal 24 jam.

b) Pembuatan blok paraffin

Jaringan hewan coba yang sudah fiksasi, lalu dipotong-potong, kemudian dimasukkan ke dalam wadah spesimen yang dibuat dari plastik. Tahap selanjutnya, pemberian alkohol (70%, 80%, dan 90%) untuk proses dehidrasi. Proses *clearing* bertingkat dilakukan 40 menit ke dalam *xylol*. Langkah selanjutnya pencetakan blok paraffin, dan disimpan ke lemari es.

c) Pemotongan dan pewarnaan

Ukuran pemotongan paraffin sangat tipis sekitar 4-6 μm memakai mikrotom. Langkah selanjutnya dimasukkan ke air bersuhu 60°C. Setelah itu, potongan atau irisan diletakkan ke gelas objek, lalu diwarnakan dengan *Hematoxylin* dan *Eosin* (HE). Gelas objek yang sudah menyimpan bahan preparat yang diwarnai, kemudian direndam *xylol* 1 dan 2 selama 2 menit. Proses deparafinasi dilanjutkan rehidrasi. Selanjutnya pewarnaan selama 8 menit, kemudian dibilas diwarnai Eosin selama 2-3 menit, dicuci dan dikeringkan. Langkah selanjutnya sediaan dimasukkan ke alkohol 95% dan absolut dengan frekuensi 10 celupan di alkohol 95%, 2 menit di alkohol absolut.

Tahapan berikutnya, dimasukkan ke *xylol* 1 kembali 1 menit dilanjutkan *xylol* 2 selama 2 menit. Pemberian perekat *permount* pada tutup preparat. Selanjutnya pemeriksaan preparat dengan mikroskop pembesaran 100x dan 400x. Tinggi vili dan kedalaman kriptus kemudian diukur dan direrata.

8.2.7 Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis pada pewarnaan HE untuk mengukur panjang vili dan kedalaman kriptus dilakukan dengan pengamatan jaringan menggunakan

fotomikroskopi dengan menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi kamera (Nikon Eclipse 80i, DS Fi1, Jepang). Analisis preparat jaringan dilakukan secara semi kuantitatif dengan *software Mac Biophotonics Image J*. Penghitungan dilakukan pada 5 lapang pandang tiap preparat jaringan dengan magnifikasi 40x. Nurhamidah dan Irawati (2014) menyatakan panjang vili usus halus diukur dari garis atas muskularis mukosa sampai puncak vili.

8.2.8 Analisis Data

Analisis univariat dilakukan dengan menggambarkan rerata dan standar deviasi pada panjang vili dan kedalaman kript. Pengaruh campuran EVOO + madu terhadap perbedaan panjang vili dan kedalaman kript diuji dengan *One Way of Anova*. Menganalisis kelompok mana saja yang berbeda berdasarkan waktu dan perlakuan dilakukan Uji *Duncan*.

8.3 Hasil dan Pembahasan

Tabel 22 menunjukkan panjang vili usus tertinggi pada kelompok EVOO, kelompok madu, dan campuran EVOO+madu, setelah diberikan perlakuan selama 14 hari. Hasil pengukuran panjang vili usus halus pada kelompok campuran EVOO+madu pada hari ke 7 ($331,79 \pm 11,25 \mu\text{m}$), ke 14 ($685,31 \pm 37,91 \mu\text{m}$), ke 21 ($416,64 \pm 109,19 \mu\text{m}$) dan ke 28 ($364,80 \pm 28,02 \mu\text{m}$). Panjang vili usus tertinggi ada pada kelompok campuran EVOO+madu pada pemberian perlakuan sampai hari ke 14. Sedangkan panjang vili terendah ada pada kelompok kontrol negatif setelah pemberian perlakuan selama 21 hari.

Tabel 22 Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap panjang vili pada usus halus tikus

Kelompok	Panjang vili (μm)				Rerata $\pm$ SD	P _{value}
	7 hari	14 hari	21 hari	28 hari		
Kontrol (-)	336,81 $\pm$ 7,39 ^{efghi}	390,06 $\pm$ 265,11 ^{hi}	537,07 $\pm$ 26,81 ^j	247,04 $\pm$ 12,67 ^{bcd}	253,1 $\pm$ 85,4	0,006
EVOO	237,43 $\pm$ 8,51 ^{bed}	390,95 $\pm$ 134,9 ^{ij}	210,43 $\pm$ 23,31 ^{bc}	297,53 $\pm$ 37,77 ^{cdefgh}	293,8 $\pm$ 106,4	0,000
Madu	211,37 $\pm$ 10,17 ^{bc}	559,65 $\pm$ 33,84 ^j	372,77 $\pm$ 64,47 ^{ghi}	270,10 $\pm$ 52,31 ^{bcd}	312,0 $\pm$ 106,5	0,000
EVOO + Madu	331,79 $\pm$ 11,25 ^{defghi}	685,31 $\pm$ 37,91 ^k	416,64 $\pm$ 109,19 ⁱ	364,80 $\pm$ 28,02 ^{fghi}	436,1 $\pm$ 147,7	0,004
Rerata $\pm$ SD	279,9 $\pm$ 56,4	472,2 $\pm$ 170	306,1 $\pm$ 134,8	285,3 $\pm$ 54,0		
P _{value}	0,000	0,001	0,000	0,001		
P _{value} BP	: 0,000					
P _{value} WP	: 0,000					
P _{value} BP*WP	: 0,000					

Keterangan :

BP: Bahan perlakuan

WP: Waktu perlakuan

BP*WP : Interaksi bahan perlakuan dengan waktu perlakuan

Notasi huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji *Duncan* $\alpha = 0.05$.

Hasil uji *One Way of Anova* menunjukkan ada pengaruh campuran EVOO+madu terhadap panjang vili usus. Hasil uji *Duncan* menunjukkan berdasarkan perlakuan, ada perbedaan panjang vili usus pada kelompok campuran dengan kelompok yang diberi EVOO, diberi madu, dan kelompok kontrol negatif. Berdasarkan waktu, ada perbedaan panjang vili secara bermakna pada pemberian perlakuan sampai hari ke 7 dengan hari ke 14 dan ke 21. Demikian juga dengan pemberian perlakuan hari ke 14. Hasil pengukuran panjang vili usus halus mengalami fluktuatif pada semua kelompok. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya perbedaan

bagian irisan pada penampang histologi usus halus. Panjang vili usus halus paling tinggi setelah perlakuan selama 14 hari pada kelompok pemberian campuran EVOO+madu, kelompok pemberian EVOO, dan kelompok pemberian madu. Setelah pemberian perlakuan selama 21 hari, hasil ukur panjang usus mengalami penurunan rata-rata disemua kelompok perlakuan.

Vili berbentuk seperti kumpulan benang di dinding usus halus. Kondisi usus yang normal dan sehat, dimana sel-sel epitel masih berbentuk silindris sebaris, susunan sel epitel berbentuk barisan, ada tunika mukosa yang rata dan halus. Panjang vili akan memendek ketika bagian epitel dinding usus mengalami kerusakan. Adanya inflamasi menyebabkan sel epitel tidak dapat memperluas area vili duodenum, permukosa tunika menjadi kasar, dan terlihat sel goblet ketika terjadi radang di usus. Sel goblet akan mengeluarkan cairan mukus untuk sterilisasi makanan yang masuk

Sediaoetama (2018) menyatakan lipatan-lipatan dalam usus memiliki tonjolan mukosa yang disebut vili. Vili memiliki permukaan yang tertutup oleh selapis sel-sel epitel. Membran sel lapisan epitel mempunyai tonjolan mikroskopik yang disebut dengan mikrovili. Dengan adanya mikrovili, mukosa usus menjadi lebih luas berlipat ganda, yang meninggikan daya serap dinding usus tersebut. Zalizar *et al.* (2006) menyatakan luas permukaan vili usus halus setelah terinfeksi mikroorganisme akan berkurang. Penelitian Emma *et al.* (2013) menemukan hasil peningkatan tinggi vili usus halus ayam, setelah diberi perlakuan jeruk nipis yang banyak mengandung vitamin C yang bersifat antioksidan.

EVOO dan madu banyak mengandung zat antioksidan yang dapat menghambat inflamasi pada organ duodenum akibat peroksidasi lipid. Konsumsi suplemen yang kaya antioksidan menstabilkan fraksi lipid dalam memperbaiki permukaan vili duodenum. Wijayanthi *et al.* (2017) menyatakan pemberian vitamin E dapat memperbaiki histologi usus halus tikus putih, dimana pada dosis 200 mg/kg lebih baik efeknya daripada dosis 100 mg/kg dan 150 mg/kg. Madu sebagai probiotik dapat meningkatkan jumlah mikroorganisme yang membantu pencernaan. Mikroorganisme akan menghasilkan asam lemak rantai pendek yang dapat meningkatkan proliferasi vili usus, mengontrol regulasi apoptosis, proliferasi serta diferensiasi sel (Hartono *et al.* 2016). Madu memiliki kandungan banyak enzim yang dapat membantu pencernaan. Penyerapan akan semakin optimal ketika area absorpsi semakin luas. Madu sebagai probiotik mempengaruhi tinggi vili usus dan densitasnya lebih padat. Gultom *et al.* (2016) menyatakan kandungan antioksidan dapat memperbaiki jaringan duodenum termasuk berdampak pada vili usus halus. Zat bioaktif dalam makanan yang dikonsumsi menguatkan barrier usus yang memodulasi fungsi sel epitel usus. Mekanisme probiotik dalam kesehatan pencernaan, diawali sel goblet yang memicu keluarnya lendir pada mukosa usus. Probiotik meningkatkan jumlah koloni bakteri baik diusus, memperbaiki permukaan vili usus dan kerapatan vili usus.

Purnama *et al.* (2013) menyatakan erosi vili dapat terjadi dikarenakan kongesti, yang menyebabkan ketidaklancaran suplai darah ke sel-sel epitel, akhirnya terjadi edema yang menyebabkan sel epitel vili terangkat. Paparan beberapa obat menyebabkan pembengkakan vili jejunum usus halus karena peradangan.

Tabel 23 menunjukkan kelompok campuran EVOO+madu memiliki ukuran kedalaman kriptas yang rendah atau dangkal setelah pemberian perlakuan selama 7 hari dan 14 hari, namun ukuran kedalaman kriptas bertambah tinggi setelah perlakuan dilakukan selama 21 hari. Hasil pengukuran kedalaman kriptas usus halus pada kelompok campuran EVOO+madu pada hari ke 7 ($94,47 \pm 11,25 \mu\text{m}$), ke 14 ($332,89 \pm 19,60 \mu\text{m}$), ke 21 ($235,19 \pm 9,84 \mu\text{m}$) dan ke 28 ($162,94 \pm 21,21 \mu\text{m}$). Rerata tertinggi kedalaman kriptas usus halus ada pada kelompok campuran EVOO+madu ($349,62 \mu\text{m}$), sedangkan terendah ada pada kelompok kontrol negatif ($33,71 \mu\text{m}$). Waktu pemberian sama yakni setelah diberi perlakuan sampai 21 hari. Kelompok campuran EVOO+madu memiliki ukuran kedalaman kriptas tertinggi sesudah pemberian perlakuan 14 hari dan 21 hari. Ukuran kedalaman kriptas pada madu tertinggi di hari ke 21 setelah pemberian perlakuan. Hasil uji *One Way of Anova* menunjukkan ada pengaruh campuran EVOO+madu terhadap kedalaman kriptas usus halus. Hasil uji *Duncan* menunjukkan ada perbedaan ukuran kedalaman kriptas berdasarkan bahan perlakuan dan waktu perlakuan. Semua kelompok memiliki ukuran kedalaman kriptas yang fluktuatif berdasarkan waktu pemberian perlakuan. Ukuran kriptas dapat menjadi tanda sehatnya pencernaan di usus halus. Semakin baik kondisi pencernaan di usus halus, semakin besar hasil ukuran kedalaman kriptas.

Tabel 23 Pengaruh EVOO, madu, dan campurannya terhadap kedalaman kriptas pada usus halus tikus

Kelompok	Kedalaman kriptas (μm)				Rerata $\pm$ SD	Pvalue
	7 hari	14 hari	21 hari	28 hari		
Kontrol (-)	$64,87 \pm 7,39^{ab}$	$230,88 \pm 13,57^f$	$174,18 \pm 16,05^e$	$133,67 \pm 50,64^{ode}$	$94,7 \pm 54,6$	0,000
EVOO	$157,94 \pm 8,51^c$	$219,98 \pm 29,16^f$	$292,53 \pm 12,17^g$	$235,56 \pm 9,15^f$	$226,5 \pm 51,6$	0,000
Madu	$82,58 \pm 10,17^b$	$76,22 \pm 7,42^b$	$349,62 \pm 74,60^h$	$139,55 \pm 16,47^{de}$	$206,4 \pm 91,9$	0,000
EVOO + Madu	$94,47 \pm 11,25^{bc}$	$332,89 \pm 19,60^h$	$235,19 \pm 9,84^f$	$162,94 \pm 21,21^c$	$161,9 \pm 11,9$	0,000
Rerata $\pm$ SD	$100,0 \pm 37,0$	$182,9 \pm 106,7$	$245,1 \pm 77,0$	$148,9 \pm 53,0$		
Pvalue	0,000	0,001	0,000	0,001		
Pvalue BP	: 0,000					
Pvalue WP	: 0,000					
Pvalue BP*WP	: 0,000					

Keterangan :

BP: Bahan perlakuan

WP: Waktu perlakuan

BP*WP : Interaksi bahan perlakuan dengan waktu perlakuan

Notasi huruf kecil superskrip berbeda pada kolom yang sama menyatakan perbedaan nyata pada taraf 5 %, Uji *Duncan* $\alpha = 0.05$.

Zainuddin *et al.* (2016) menyatakan dalam pencernaan terdapat kelenjar intestinal yang bermuara pada kriptas yang terdapat pada vili-vili intestinal, yang disusun oleh sel epitel silindris sebaris. Kriptas mensekresikan sejumlah air dan elektrolit. Dengan kadar air dan elektrolit yang cukup, kelenjar intestinal mendukung perkembangan sel epitel penyusun vili. Harimurti dan Rahayu (2009) menyatakan ukuran kedalaman kriptas akan meningkat setelah pemberian suplementasi probiotik. Ukuran kedalaman kriptas pada usus duodenum dan jejunum lebih tinggi daripada ileum.

Wresdiyati *et al.* (2013) menyatakan tebal mukosa usus halus bertambah setelah pemberian probiotik. Ketebalan mukosa usus disebabkan adanya peningkatan tinggi vili serta kedalaman kriptas. Probiotik mampu menginduksi asam lemak rantai pendek pada sel epitel. Peningkatan asam lemak rantai pendek mampu menstimulasi proliferasi sel epitel. Vincents *et al.* (2014) menyatakan paparan bahan perasa

makanan dapat mendangkalkan ukuran kript. Budiartawan *et al.* (2018) menunjukkan asam butirat meningkatkan proliferasi sel kript pada usus tikus.

8.4 Simpulan

Perlakuan campuran EVOO+madu berpengaruh secara signifikan terhadap panjang vili dan kedalaman kript usus halus. Ukuran panjang vili memiliki perbedaan secara bermakna berdasarkan waktu perlakuan dan bahan perlakuan. Kelompok perlakuan campuran EVOO+madu memiliki ukuran panjang vili tertinggi yakni 685,31 μm pada hari ke 14. Ukuran kedalaman kript memiliki perbedaan secara signifikan berdasarkan waktu perlakuan dan bahan perlakuan. Kelompok pemberian campuran EVOO+madu memiliki ukuran kedalaman kript tertinggi pada hari ke 14 yakni 332,89 μm .

IX PEMBAHASAN UMUM

9.1 Generalisasi

Temuan dari penelitian ini menunjukkan sifat kimia EVOO sesuai dengan standar produk EVOO. Kandungan asam lemak jenuh juga sesuai dengan acuan standar. Pada asam lemak tak jenuh, ada asam lemak yang tidak sesuai batas standar yakni asam linolenat. Kandungan vitamin E yang hampir sama dengan hasil temuan peneliti lain. Kandungan total karotenoid lebih tinggi dari temuan hasil peneliti lain. Beberapa minyak nabati lainnya menunjukkan kadar asam oleat dengan jumlah banyak, juga dimiliki minyak almond, minyak buah matahari, dan minyak alpukat. Kandungan asam linoleat EVOO tidak setinggi minyak nabati lainnya. Beberapa penelitian menunjukkan efek EVOO terhadap kesehatan tubuh dikarenakan kandungan asam oleat yang tinggi dan kandungan vitamin E serta adanya zat bioaktif.

Hasil penelitian tahap kedua, kandungan zat gizi makro, kandungan glukosa, kandungan mineral pada sampel produk madu penelitian ini hampir sama dengan hasil penelitian lain. Kandungan madu dominan karbohidrat, sehingga madu sering digunakan untuk menambah stamina tubuh. Madu memiliki kandungan glukosa, fruktosa, sukrosa, dan maltose. Madu juga mengandung flavonoid yang diduga terlibat dalam meningkatkan kerja sistem imun tubuh. Alvarez-Suarez *et al.* (2014) menyatakan dalam madu terdapat beberapa senyawa fenol dan senyawa flavonoid seperti Asam caffeic, Asam isoferulic, p-Coumaric acid, Asam Kojic, Asam galat, Asam 4-Hydrobenzoic, Asam syringin, Quercetin, Luteolin, 8-Methoxykaempferol, Pinocembrin, Isorhamnetin, Kaempferol, Chrysin, Galangin, dan Pinobanksin. Karotenoid merupakan pigmen alami yang memiliki sifat antioksidan. Karotenoid mampu menurunkan sitokin proinflamasi (TNF- dan IL-6). Rahim *et al.* (2017) menyatakan konsumsi madu 8 minggu sebanyak 20 gram yang diencerkan 300 ml, dapat meningkatkan jumlah limfosit, T helper (CD4⁺) dan T sitotoksik (CD8⁺) Selain itu madu juga meningkatkan sel darah putih sebanyak $1.15 \times 10^3/L$ dan neutrophil sebanyak $1.6 \times 10^3/L$. Mofid *et al.* (2016) menyatakan pada pasien kanker, pemberian madu dapat menurunkan angka CRP.

Hasil penelitian tahap ketiga, Ada peningkatan aktivitas makrofag setelah pemberian campuran EVOO dan madu pada hari ke 7, 14, dan 28, namun di hari ke 21 aktivitas makrofag mengalami penurunan. Penurunan aktivitas makrofag ini dapat disebabkan banyak faktor, diantaranya faktor stress hewan coba. Campuran EVOO dan madu yang digunakan dalam penelitian ini tidak menggunakan bahan emulsifier. Hal ini dikarenakan pembuatan campuran EVOO dan madu harus menghindari perubahan termal pada bahan. EVOO dapat mengalami perubahan ketika mengalami paparan suhu yang panas, sehingga campuran EVOO dan madu hanya dilakukan secara manual. Hal ini juga menjadi mudah dilakukan untuk masyarakat. Hari ke 28, aktivitas makrofag menunjukkan campuran EVOO dan madu memiliki aktivitas makrofag tertinggi, namun tidak pada kapasitas makrofag.

Mekanisme imun tubuh terdiri dari sistem imun non spesifik (alami) dan sistem imun spesifik (adaptif). Dalam sistem imun ada sel myeloid dan sel limfoid. Sel myeloid terdiri dari granulosit dan monosit. Granulosit terdiri dari neutrophil, basophil dan eosinophil, sedangkan monosit menjadi makrofag, sel kupffer, dan sel dendrit. Sel Limfoid terdiri dari sel T, sel B, dan sel NK. Fagositosis merupakan

salah satu reaksi sistem imun alami, dimana makrofag sebagai salah satu pelaku dalam menfagosit kuman. Makrofag berasal dari sumsum tulang yang berdiferensiasi ke darah dalam bentuk monosit, kemudian masuk ke jaringan dalam bentuk makrofag. Peran makrofag setelah teraktivasi antara lain sebagai suatu sel jaringan yang berperan membuang jaringan yang rusak, menfagosit bakteri atau mikroorganisme lainnya, peningkatan imunitas spesifik, dan peningkatan presenting antigen. Makrofag merupakan fagosit utama dalam jaringan dan rongga serosa seperti peritoneum. Makrofag menjalani fungsinya sebagai fagositosis dengan tahapan pengenalan, pergerakan, perlekatan, penelanan, pencernaan, dan pengeluaran (kemotaksis, menangkap, memakan, fagositosis, memusnahkan, mencerna). Proses penelanan dalam fagositosis terjadi secara endositosis yaitu transpor makromolekul dan materi yang sangat kecil ke dalam sel dengan cara membentuk vesikula baru dari membran plasma. Fagolisosom merupakan gabungan valvula fagostik (fagosom) dengan lisosom. Fagolisosom menjadi tempat konsentrasi pemusnahan kuman. Makrofag diaktivasi oleh keberadaan kuman dan sitokin IFN- yang berasal dari sel T (Bratawidjaja dan Rengganis 2014; Playfair dan Chain 2015).

Aktivasi makrofag oleh karena keberadaan kuman atau mikroorganisme, diawali adanya reseptor sel yang mengenali jenis mikroorganisme tersebut. Salah satu reseptor makrofag yaitu *Scavenger reseptor* (SRs) membrane sel, yang merupakan reseptor makrofag yang memacu fagositosis. Sasaran reseptor SRs ini adalah bakteri positif, apoptosis, dan sel pejamu. Aktivasi makrofag oleh bakteri, meningkatkan fungsi makrofag termasuk fungsi sitotoksitas. Interaksi antara makrofag dan komponen bakteri tertentu juga memacu produksi sejumlah sitokin yang dapat meningkatkan reaksi inflamasi. Sitokin proinflamasi yakni IL-6, TNF- α , dan IL-1 dan sitokin antiinflamasi IL-12, IL-8, mediator lainnya (Bratawidjaja dan Rengganis 2014). Playfair dan Chain (2015) menyatakan makrofag dapat tertarik dan teraktivasi ke lokasi antigen yang menetap saat infeksi kronik, menimbulkan nekrosis jaringan maupun pembentukan granuloma.

Mikroorganisme menyebabkan kerusakan jaringan, sebagai akibat toksin yang dikeluarkan oleh mikroorganisme. Bakteri yang tidak berhasil menginfeksi, disebabkan proses fagositosis berjalan dengan baik. Namun bakteri akan berusaha untuk bertahan melalui perlengkatan, dinding sel, dan melepaskan eksotoksin. Makrofag mengeluarkan lisozim untuk melisis bakteri. Bagian dekat membrane sel, bakteri memiliki dinding sel yang tersusun dari mukopeptida yang disebut peptidoglikan (PG), dibagian ini lisozim bekerja dengan menyerang ikatan N-asam asetilmuramat-N-asetilglukosamin. Dinding sel bakteri merupakan penginduksi kuat inflamasi, sebagian besar melalui kemampuannya mengaktivasi reseptor TLR pada imunitas bawaan. Penelitian ini menggunakan bakteri *Stapylococcus*, jenis bakteri gram positif. Bakteri ini digunakan dengan pertimbangan didukung oleh data-data ilmiah yang berkaitan dengan aktivasi makrofag yang dapat diamati dengan jelas dibawah mikroskop karena bentuk bakteri dapat dilihat dengan jelas (berbentuk bulat).

Mekanisme kerja makrofag dalam sistem imun termasuk ke mekanisme jalur kelas II. Jalur kelas II dalam pengolahan dan penyajian antigen. Setiap benda asing yang dimakan dengan cara fagositosis atau endositosis akan masuk ke dalam vesical jalur endositik, secara kolektif disebut endosome, tetapi termasuk lisosom asam, sehingga berbagai enzim digestif dapat bekerja pada pH yang sesuai. Pada

saat infeksi, mikro masuk ke fagolisosom. Sel makrofag membawa banyak reseptor pada permukaannya yang dapat mengikat gula atau unsur umum lain permukaan patogen dan sangat meningkatkan efisiensi ambilan, melalui endositosis atau fagositosis yang diperantai reseptor. Fagositosis oleh leukosit polimorfonuklear atau makrofag adalah akhir perjalanan mayoritas patogen yang tidak berhasil. Faktor ketidakberhasilan kerja makrofag dikarenakan adanya faktor antifagosit. Faktor antifagosit meliputi koagulase pembentuk fibrin dan protein A, yang berikatan dengan bagian Fc IgG, dengan kemampuan menghambat opsonisasi. Ada faktor komplemen dan antibody yang dapat membantu proses perlengketan mikroba tersebut kepada sel fagosit yakni melalui reseptor C3 atau Fc pada antibody. Proses ini disebut opsonisasi. Produksi produk makrofag salah satunya spesies oksigen reaktif dan $\text{TNF-}\alpha$.

Hasil penelitian tahap keempat, gambaran sitokin setelah pemberian perlakuan Semua kelompok perlakuan menunjukkan kadar sitokin yang menurun, dan beberapa tidak terdeteksi pada hari ke 28. Dalam penelitian ini, campuran EVOO+madu memberikan sinergi untuk kerja $\text{IFN-}\gamma$ dengan waktu pemberian perlakuan yang berbeda-beda. Campuran EVOO dan madu efektif setelah 7 hari pemberian perlakuan untuk mendapatkan kadar $\text{IFN-}\gamma$ yang optimal.

Sitokin merupakan suatu kelompok besar molekul yang dihasilkan oleh sel limfoid dan sel myeloid. Sitokin yang mengatur aktifitas sel. Beberapa sitokin berkaitan dengan imunitas seluler. Louise (2011) menyatakan sitokin mengubah pertumbuhan faktor sel B. Hampir semua sel normal mengeluarkan sitokin yang mengubah pertumbuhan faktor sel B. Mekanisme kerja dengan menghambat proliferasi sel T maupun sel B, mengurangi reseptor sitokin, memproduksi zat kemotaktik kuat untuk leukosit, memediasi peradangan dan perbaikan jaringan. IL-2 , $\text{IFN-}\gamma$, dan $\text{TNF-}\alpha$ bersama-sama mengaktifkan sel-sel B, sel-sel Tc , sel-sel Th , dan sel pemapar antigen (APC). Juga menurunkan fungsi-fungsi sel-sel Th_2 , dan meningkatkan *Cell Mediated Immunity* (CMI). Antigen dan sitokin sel-sel T (IL-2 , IL-4 , IL-5 , dan IL-6) mengaktifkan sel-sel B, sehingga sel-sel plasma mensekresi antibody IgM dan perubahan Ig menjadi IgG, IgA, dan IgE. Sel-sel B yang teraktivasi juga mengeluarkan sel-sel memori. Peradangan kronik dipertahankan oleh pengaktifan produksi sitokin tipe Th_1 , termasuk IL-12 , $\text{IFN-}\gamma$ dan $\text{TNF-}\alpha$. Aktivitas sitolitik sel-sel NK juga dapat ditingkatkan oleh IL-2 , IL-12 , dan $\text{IFN-}\gamma$.

Sitokin IL-12 diaktifkan oleh makrofag untuk memberi dukungan pada sel Nature Killer (NK) dan sel Th . IL-12 sebagian besar juga dihasilkan oleh sel dendrit dan makrofag sebagai respons terhadap stimulus mikroba, memiliki peran kunci dalam menstimulasi respons Th_1 . Makrofag mengaktifkan $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ dan IL-1 , yang memberikan pengaruh pada endotel vaskuler dan berhubungan dengan sistem imun saraf.

Sitokin IL-2 juga merupakan sitokin yang berkaitan dengan pengaktifan makrofag secara tidak langsung. IL-2 yang bekerja mematangkan sel T sehingga sel berproliferasi kemudian sel T mengeluarkan $\text{IFN-}\gamma$. Oleh karena itu, IL-2 juga dikenal sebagai faktor pertumbuhan sel T. Kemampuan IL-2 menstimulasi berbagai jenis sel, termasuk sel pembuatnya. Selain itu, IL-2 juga memiliki struktur yang berhubungan dengan memacu diferensiasi sel natural killer (NK). IL-2 juga merupakan sitokin yang mendukung fungsi dewasa sel B dan memberikan stimulus pada proliferasi dan diferensiasi sel B. Salah satu peristiwa yang menyertai

pengenalan antigen oleh sel T adalah sel T yang merespon mengalami pembelahan sel beberapa kali. Proliferasi sel T dipicu sebagian besar oleh sekresi sitokin IL-2 dari sel T sendiri. IL-2 berperan dalam mencetuskan proliferasi sel T, IL-2 juga memiliki efek pada limfosit B, makrofag. Aktivasi sel T menghasilkan sekresi sejumlah sitokin lain.

Sitokin IFN ada 3 jenis yakni IFN- α , IFN- β dan IFN- γ . IFN- α dan IFN- β berperan dalam menstimulasi produksi protein antivirus dalam sel. IFN- γ mengaktivasi sel Nature Killer (NK). Defisiensi IFN- γ membuat tidak mampu menyusun respon Th₁. Interferon dapat berperan sebagai antibiotik alami pada lisis virus, yang peran sama dengan lisozim pada lisis bakteri, walaupun mekanisme yang berbeda. Interferon menstimulasi sel untuk membentuk protein. TNF- α , IL-1 dan IFN- γ berhubungan dengan sistem imun saraf. IFN- γ suatu molekul yang dihasilkan oleh sel T dan sel NK. Molekul ini merupakan aktivator makrofag utama dan dianggap subset Th₁. IFN- γ lebih bersifat spesifik spesies dibandingkan sitokin lain. IFN- γ dapat terjadi defisiensi maupun reseptornya.

Carrillo *et al.* (2012) menyatakan asam lemak tak jenuh tunggal menjadi salah satu faktor penting dalam mempengaruhi proliferasi sel-sel kekebalan tubuh, daripada asam lemak yang lain. Orsavova *et al.* (2015) menyatakan mekanisme asam oleat bekerja sebagai antiapoptosis dan antiinflamasi melalui pengaturan cyclooxygenase-2 (COX-2) dan nitric oxide synthase (iNOS) yang diinduksi melalui aktivasi faktor-kappa B (NF- κ B) yang dihasilkan dalam aktivasi mediator inflamasi hilir.

De Pablo *et al.* (2004) menyatakan mekanisme EVOO memodulasi sistem imun dan kesehatan pencernaan, melalui kinerja kandungan asam lemak tak jenuh tunggal, asam lemak tak jenuh ganda, kandungan fenolik, dan kandungan vitamin E. Kandungan asam lemak n-3 pada minyak zaitun berkontribusi sebagai immunosupresor, sedangkan kandungan asam lemak n-6 berfungsi immunostimulan. EVOO juga menyebabkan *down-regulation* awal dari siklooksigenase-2 (COX-2). EVOO memiliki kemampuan mengurangi proliferasi limfosit, meningkatkan produksi sitokin antiinflamasi (IL-2, IL-4), penurunan pada produksi IL-1, IL-10 dan IL-12. Beberapa data epidemiologi dan studi eksperimen membuktikan bahwa dalam diet mediterania, kandungan asam oleat, hidroksitirosol, dan oleuropein dalam EVOO menghambat aktivasi endotel dan menurunkan inflamasi (Carluccio *et al.* 2010)

EVOO memiliki kandungan asam oleat yang memiliki *cis* pada rantai strukturnya. Hal ini memberikan efek biologis secara molekuler dalam mengatur sel membran. Asam oleat dapat digunakan dalam proses esterifikasi dan asidolisis. Sel membran berbentuk bilayer dan mekanisme biomolekuler pada membran sel bersifat bioadhesif. Sel membran juga bersifat hidrofilik dan hidrofobik. Fosfolipid merupakan komponen utama membran sel bagian luar bersifat hidrofobik. Fungsi asam oleat menjadi zat antara yang terlibat dalam sintesis organik. Asam oleat juga dapat berperan dalam menghambat proliferasi sel, memodulasi dan pemantauan struktur membran sel, memodulasi fungsi protein. Asam oleat bekerja dalam aktivasi jalur intraseluler.

Hasil penelitian tahap ke-lima, gambaran panjang vili dan kedalaman kriptas setelah mendapatkan perlakuan campuran EVOO+madu meningkat namun hasil pengukuran vili usus dan kedalaman kriptas menunjukkan hampir sama dengan perlakuan yang hanya diberikan madu.

Karimah *et al.* (2011) menyatakan pengujian *in vitro* menunjukkan isolate oligosakarida madu memenuhi kriteria prebiotik, dimana ada resisten terhadap asam lambung dan enzim pencernaan, memiliki efek stimulasi pertumbuhan bakteri, tambahan sumber vitamin C menghasilkan asam laktat.

EVOO dan madu memiliki kandungan zat gizi yang berkaitan dengan bahan imunomodulator. EVOO dan madu memiliki kandungan zat antioksidan, dimana dalam penelitian ini diperoleh angka total flavonoid. Scephankova *et al.* (2017) menyatakan antioksidan yang terkandung pada madu menekan ROS. Jika radikal bebas dan oksidan dalam tubuh berlebihan, akan menghasilkan kerusakan oksidatif biomolekul sel seperti kerusakan DNA. Madu memiliki kemampuan melindungi tubuh dari efek radikal bebas dan ROS yang merusak sel.

EVOO memiliki kandungan vitamin E yang tinggi. Vitamin E salah satu vitamin yang berkaitan dengan peningkatan daya tahan tubuh. Fungsi utama vitamin E sebagai antioksidan dapat mencegah oksidasi dan peroksidasi asam lemak tak jenuh dan fosfolipid membrane plasma sel, mencegah lesion dinding sel dan distrofi otot. Fungsi lain vitamin E yakni terlibat dalam sintesis asam nukleat, pembentukan sel darah merah, dan sintesis koenzim A di saluran pernafasan. Kekurangan vitamin E dapat menyebabkan pergantian zat besi dalam darah lebih cepat. Vitamin E diabsorpsi dalam usus halus dengan bantuan asam empedu. Tokoferol merupakan bentuk yang paling mudah diabsorpsi. Vitamin E disimpan pada otot, kelenjar adrenal, jantung dan hati. Mekanisme vitamin E dalam sistem imun bekerja dengan meningkatkan proliferasi limfosit sebagai respons terhadap mitogen. Vitamin E juga meningkatkan produksi IL-2 yang merupakan salah satu protein antiinflamasi yang terlibat dalam komunikasi antar sel imun. Vitamin E mendukung kerja sitokin Th1 namun menekan kerja sitokin Th2. Kandungan zat besi dalam EVOO juga mendukung sistem imun dalam tubuh. Fe atau zat besi dibutuhkan dalam regulasi produksi sitokin dan proliferasi sel T. Temuan adanya penurunan CD4/CD8 dalam kondisi defisiensi zat Fe. Namun asupan Fe yang berlebihan dapat meningkatkan sitokin Th2 dan menurunkan Th1. Kadar karotenoid dalam EVOO bekerja dalam sistem imun dengan mengurangi kerusakan oksidatif. Beberapa penelitian sudah membuktikan penurunan kerusakan oksidatif setelah konsumsi EVOO berkaitan juga dengan penurunan risiko penyakit jantung.

9.2 Kekuatan dan Keterbatasan Penelitian

Kekuatan penelitian ini berdasarkan aspek desain penelitian, teknik sampling, dan bahan perlakuan. Berdasarkan desain penelitian, penelitian ini memiliki kekuatan karena merupakan penelitian eksperimen dengan desain *factorial*, dimana desain *factorial* menggunakan adanya interaksi antara variabel. Interaksi variabel dalam penelitian ini adalah variabel waktu dan variabel bahan perlakuan. Pendekatan Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang melakukan sampling hewan coba secara random. Hewan coba dikelompokkan menjadi 5 kelompok secara random. Kekuatan lain yang juga dimiliki penelitian ini yaitu bahan perlakuan. Bahan perlakuan atau bahan perlakuan yang digunakan merupakan bahan perlakuan yang diperoleh di supermarket besar, yang menjamin produk asli. Bahan perlakuan juga sudah mendapatkan sertifikasi SNI dan sertifikasi halal. Bahan penelitian, sudah digunakan oleh masyarakat, sehingga dampak dari hasil penelitian ini dapat langsung diimplementasikan di masyarakat.

Keterbatasan penelitian ini, pada tahap pemeriksaan sifat kimia EVOO dan madu, hanya menggunakan 1 sampel tiap merek dan jumlah 7 sampel EVOO dan 5 sampel madu. Keterbatasan lain, penelitian ini tidak melakukan penelitian perlakuan berdasarkan dosis. Penelitian ini hanya menggunakan 1 dosis EVOO dan madu, yang kemudian dikonversikan ke dosis hewan coba dengan . Keterbatasan lainnya, penelitian ini tidak dapat mengontrol timbulnya stress pada hewan coba ketika diberi perlakuan dengan menggunakan sonde. Keterbatasan lain adalah perhitungan panjang vili dan ukuran kedalaman kriptas sangat dipengaruhi oleh posisi organ usus dalam paraffin. Keterbatasan harga produk EVOO yang tidak murah, sehingga penggunaan EVOO dalam meningkatkan kesehatan hanya bisa dibeli oleh masyarakat yang ekonomi menengah keatas.

9.3 Implikasi Hasil Penelitian

Penelitian ini memberikan informasi ilmiah tentang manfaat konsumsi EVOO dan madu serta campuran EVOO dan madu. Penelitian yang berkaitan dengan hasil aktivitas dan kapasitas makrofag setelah pemberian campuran EVOO dan madu belum pernah dilakukan. Penelitian ini memberikan bukti secara ilmiah, bahwa ada pengaruh pemberian campuran EVOO + madu secara bersama-sama dibandingkan secara sendiri-sendiri pada aktivitas makrofag dan panjang vili serta kedalaman kriptas usus pada tikus percobaan.

Penelitian ini juga menjadi data dasar untuk penelitian lanjut yang berkaitan dengan aktivitas makrofag. Penelitian lanjut dapat dilakukan dengan mempertimbangkan beberapa dosis untuk EVOO dan madu. Penelitian lanjutan juga dapat menimbang indikator status imun lainnya pada studi manusia.

X SIMPULAN DAN SARAN

10.1 Simpulan

1. Sampel produk EVOO penelitian ini memiliki Beberapa sifat kimia meliputi 0,13 % kadar air, 0,02 %kadar air 0.127 dengan kadar air terendah 0.12% dan kadar air tertinggi 0.13% kadar abu, 81,6 mg/100g bilangan IOD, 191 mg KOH/g bilangan penyabunan, 0,61 mg KOH/g bilangan asam. Kandungan asam lemak jenuh antara lain 10,4% asam palmitat dan 4,31% asam stearate, sedangkan yang lain tidak terdeteks. Kandungan asam lemak jenuh antara lain asam oleat sebesar 74,7%, asam linoleat 7,65%, dan asam linolenat sebesar 1,63%. Kandungan vitamin E sebesar 20,6 mg/kg, zat besi (Fe) sebesar 1,12 mg/kg, total flavonoid 0,36 %b/b, dan total karotenoid 25,2 mg/kg.
2. Beberapa sifat kimia sampel produk madu penelitian ini antara lain pH 4,04, kadar air 19,2%, kadar abu 0,37 %b/b, keasaman 16,4 ml N NAOH 1/kg, aktivitas enzim diastase 10,2 DN. Kandungan fruktosa 22,4 g/100g, glukosa 27,6 g/100f, sukrosa dibawah 0,05 g/100g, dan gula pereduksi 60,6%. Kandungan zat gizi makro menunjukkan energy 322 kal/100g, karbohidrat 80,3%, protein 0,03%, dan lemak 0,10%. Kandungan mineral antara lain Cu sebesar 0,05 mg/kg, Zn sebesar 0,86 mg/kg, Fe sebesar 20,1 mg/kg, dan Se dibawah 0,002 mg/kg. Kandungan total flavonoid 0,07 %b/b dan total karotenoid 0,64 mg/kg.
3. Hasil penelitian aktivitas dan kapasitas makrofag pada kelompok tikus yang diberi campuran EVOO+madu menunjukkan ada peningkatan aktivitas dan kapasitas makrofag. Aktivitas makrofag pada hari ke 7 ($62,5 \pm 3,32$ %), hari ke 14 ($63,43 \pm 3,12$ %), hari ke 21 ($70,1 \pm 5,33$ %), dan hari ke 28 ($72,12 \pm 2,06$ %). Hasil analisis kapasitas makrofag menunjukkan pada hari ke 7 ($2927,3 \pm 42,3$), hari ke 14 ($3011,3 \pm 72,3$), hari ke 21 ($3051,6 \pm 265,1$), dan hari ke 28 ($3539,4 \pm 59,5$). Ada peningkatan aktivitas dan kapasitas makrofag pada kelompok yang diberi campuran EVOO + madu secara bermakna ($p_{value} < 0,05$). Hasil uji *One Way of Anova* menunjukkan ada pengaruh pemberian campuran EVOO + madu terhadap aktivitas dan kapasitas makrofag
4. Hasil analisis kadar sitokin pada tikus yang diberikan campuran EVOO+madu menunjukkan kadar IL-12 dan IFN- γ menurun berdasarkan waktu perlakuan. Kadar IL-2 pada kelompok campuran EVOO+madu menunjukkan fluktuasi. Tidak ada pengaruh pemberian campuran EVOO+madu terhadap kadar IL-2 dan IL-12 berdasarkan semua waktu perlakuan. Kadar IL-2 terendah pada hari ke 28 kelompok kontrol negatif, sedangkan IL-2 tertinggi pada kelompok EVOO hari ke 7. Kadar IL-12 terendah pada hari ke 21 kelompok madu, sedangkan IL-12 tertinggi pada kelompok madu hari ke 7. Kadar IFN- γ terendah pada hari ke 21 kelompok kontrol negatif, sedangkan IFN- γ tertinggi pada kelompok campuran EVOO+madu hari ke 7.
5. Perlakuan campuran EVOO+madu berpengaruh secara signifikan terhadap panjang vili dan kedalaman kriptus usus halus. Ukuran panjang vili memiliki perbedaan secara bermakna berdasarkan waktu perlakuan dan bahan perlakuan. Kelompok perlakuan campuran EVOO+madu memiliki ukuran panjang vili

tertinggi yakni 685,31 μm pada hari ke 14. Ukuran kedalaman kriptas memiliki perbedaan secara signifikan berdasarkan waktu perlakuan dan bahan perlakuan. Kelompok pemberian campuran EVOO+madu memiliki ukuran kedalaman kriptas tertinggi pada hari ke 21 yakni 349,62 μm .

10.2 Saran

Studi lanjut untuk membuktikan sinergis pemberian campuran EVOO dan madu pada manusia dalam peningkatan status imun. Penelitian lanjut yang juga mengamati variabel dosis, waktu, dan bahan perlakuan dengan menggunakan desain bujur sangkar penelitian eksperimen. Penelitian lanjut, yang berkaitan dengan kadar sitokin, waktu pemberian perlakuan sebaiknya maksimal 2 minggu. Hal ini dikarenakan penelitian ini memberikan info berkaitan waktu perlakuan yang lebih dari 2 minggu, kadar sitokin beberapa tidak terdeteksi. Penelitian lanjut juga disarankan, menggunakan skor pengukuran pada histologi usus, sehingga data menunjang keberhasilan perlakuan untuk kesehatan pencernaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abast MA, Koleangan H, Pontoh J. 2016. Analisis asam lemak dalam minyak kelapa murni menggunakan derivatisasi katalis basa. *Jurnal Mipa Unsrat Online* 5 (1): 29-31
- Adalina Y. 2017. Kualitas madu putih asal Provinsi Nusa Tenggara Barat. Prosiding Seminar Nasional Masyarakat *BIODIV INDON* 3(2): 189-193
- Afrin S, Giampieri F, Forbes-Hernández TY, Gasparrini M, Amici A, Cianciosi D, Quiles JL, Battino M. 2018. Manuka honey synergistically enhances the chemopreventive effect of 5-fluorouracil on human colon cancer cells by inducing oxidative stress and apoptosis, altering metabolic phenotypes and suppressing metastasis ability. *Radic Biol Med.* 126:41-54
- Afroz R, Tanvir EM, Zheng W, Little PJ. 2016. Molecular Pharmacology of Honey. *Journal of Clinical & Experimental Pharmacology* 6(3): 1-13
- Agrawal K, Melliou E, Li X, Pedersen TL, Wang SC, Magiatis PM, Newman JW, Holt RR. 2017. Oleocanthal-rich extra virgin olive oil demonstrates acute anti platelet effects in healthy men in a randomized trial. *Journal of Functional Foods* 36: 84-93
- Agung I. 2014. Tin dan zaitun, penyakit kronis dan berbahaya. Surakarta : AQ Publishing
- Agussalim, Agus A, Nurliyani, Umami N. 2019. The sugar content profile of honey produced by the Indonesian Stingless bee, *Tetragonula laeviceps*, from different regions. *Livestock Research for Rural Development* 31 (6) : 1-6
- Ahmed S, Othman NH. 2013. Review of the medicinal effects of tualang honey and a comparison with manuka honey. *Malays J Med Sci.* 20(3): 6-13
- Aikaterini F, Dimitra A, Konstantina P, Petros O, Maria T. 2019. Therapeutic Properties of Honey. *American journal of Biomedical Science and Research* 4(6):486-489
- Ajibola A. 2012. Physico-chemical and physiological values of honey and its importance as a functional food. *International Journal of Food and Nutritional Science* 2(2):180-188
- Ajibola A. 2015. Novel Insights into the Health Importance of Natural Honey. *Malays J Med Sci.* 22(5): 7-22
- Akkaya MR. 2018. Fatty acid compositions of sunflowers (*Helianthus annuus* L.) grown in east Mediterranean region. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* 157
- Akkol EK, Orhan DD, Gürbüz I, Yesilada E. 2010. In vivo activity assessment of a “honey-bee pollen mix” formulation. *Pharmaceutical Biology* 48(3): 253–259
- Almatsier S. 2012. Prinsip dasar ilmu gizi. Jakarta : Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama
- Alonso A, Gutierrez VR, González MAM. 2005. Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence. *Public Health Nutrition* 9(2) : 251–257

- Alouache B, Khechena FK, Lecheb F, Boutkedjirt T. 2015. Characterization of olive oil by ultrasonic and physico-chemical methods. *Physics Procedia* 70: 1061-1065
- Alqarni AS, Owayss AA, Mahmoud AA, Hannan MA. 2014. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society* 18 : 618–625
- Al-Waili NS. 2005. Mixture of honey, beeswax and olive oil inhibits growth of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Arch Med Res* 36(1):10-23
- Al Waili NS, Boni NS. 2003. Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. *J Med Food* 6(2):129-133
- Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M. 2010. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterr J Nutr Metab* 3:15–23
- Alzahrani HA, Alsabehi R, Boukraa L, Abdellah F, Bellik Y, Bakhotmah BA. 2012. Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origin. *International Journal of Molecules Sciences* 17:10540-1049
- Amin FAZ, Suriana Sabri S, Ismail M, Chan KW, Ismail N, Esa NM, Mohd Azmi Mohd Lila MAM, Zawawi N. 2020. Probiotic Properties of *Bacillus* Strains Isolated from Stingless Bee (*Heterotrigona itama*) Honey Collected across Malaysia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17(278):1-15
- Aminah, Tomayahu N, Abidin Z. 2014. Penetapan kadar flavonoid total minyak alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan metode spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia* 4(2): 226-230.
- Amiot MJ. 2014. Olive oil & health effects: from epidemiological studies to the molecular mechanisms of phenolic fraction. *Oilseeds & fats Crops & Lipids* 21(5): D512
- Anggraini DN, Radiati LK, Purwadi. 2016. Penambahan carboxymethyle cellulose (CmC) pada minuman madu sari apel ditinjau dari rasa, aroma, warna, ph, viskositas, dan kekeruhan *carboxymethyle cellulose* (CmC). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak* 11(1): 59-68
- Angraini DI. 2014. Immunonutritions intake (vitamin A,C, & E) associated with lymphocyte numbers. *JUKE* 4(7): 39-44
- Anorital, Andayasari L. 2011. Kajian epidemiologi penyakit infeksi saluran pencernaan yang disebabkan oleh amuba di indonesia. *Media Litbang Kesehatan* 21(1): 1-9
- Anzaku AA, Akyala JI, Juliet A, Obianuju EC. 2017. Antibacterial activity of lauric acid on some selected clinal isolates. *Anna Clinical Lab Resc.* 5(2) : 170-175
- Aparicio R & Harwood J. 2013. Handbook of olive oil, analysis & properties. Springer New York Heidelberg Dordrecht London
- Apriani D, Gusnedi, Darvina Y. 2013. Studi tentang nilai viskositas madu hutan dari beberapa daerah di Sumatera Barat untuk mengetahui kualitas madu. *Pillar of Physics* 2: 91-98
- Aranda F, Gomez-Alonso S, del-Alamo RMR, Salvador MD, Fregapane G. 2004. Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: comparison with other spanish cultivars. *Food Chemistry* 86: 485–492

- Arawwawala LDAM, Hewageegana HGSP. 2017. Health benefits and traditional uses of honey: a review. *J Apither* 2(1): 9-14
- Arifah AN, Nurkhasanah. 2014. Efek fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi (*Eurycoma Longifolia*, Jack) terhadap aktivitas fagositosis makrofag secara in vitro. *Pharmacia* 4 (1): 9-14
- Ariefdjohan MW, Martin BR, Lachcik PJ, Weaver CM. 2008. Acute and chronic effects of honey and its carbohydrate constituents on calcium absorption in rats. *J. Agric. Food Chem.* 56(8): 2649–2654
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 2007. Official methods of analysis of AOAC international. Washington DC : Association of Official Agricultural Chemists.
- Assy N, Nasser F, Nasser G, Grosovski M. 2009. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 15(15): 1809-1815
- Astawan M, Wresdiyati T, Nasution NA. 2015. Fakta dan manfaat minyak zaitun. Jakarta : Penerbit Buku Kompas
- Asyadi A. 2018. Sistem imun. *Widya* 29 (320): 55-63
- Aydar AY, Öner TO, Üçok EF. 2017. Effects of hydroxytyrosol on human health. *EC Nutrition* 11(4) : 147-157.
- Ayed RB, Ennouri K, Ercişli S, Hlima HB, Hanana M, Smaoui S, Rebai A, Moreau F. 2018. First study of correlation between oleic acid content and *SAD* gene polymorphism in olive oil samples through statistical and bayesian modeling analyses. *Lipids in Health and Disease* : 17:74
- Azmi IDM, Yaghmur A. 2014. Influence of oleic acid on self-assembled liquid crystalline nanostructures. New York : Nova Science Publishers Inc.
- Baghdadi H, Abdel-Aziz N, Ahmed NS, Mahmoud HS, Barqhash A, Nasrat A, Nabo MMH, Sayed SME. 2015. Ameliorating role exerted by al-hijamah in autoimmune diseases: effect on serum autoantibodies and inflammatory mediators. *Int J Health Sci (Qassim)* 9(2): 207–232
- Baloš MZ, Popov N, Vidaković S, Pelić DL, Pelić MŽ, Mihaljev E, Jakšić S. Electrical conductivity and acidity of honey. 2018. *Arhiv veterinarske medicine*, 11(1) : 91 - 101
- Baratawidjaja KG, Rengganis I. 2014. Imunologi dasar. Jakarta : Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Basu A, Devaraj S, Jialal I. 2006. Dietary factors that promote or retard inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26(5): 995-1001
- Batista BL, da Silva LRS, Rocha BA, Rodrigues JL, Berretta-Silva AA, Bonates TO, Gomes VSD, Barbosa RM, Barbosa F. 2012. Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques. *Food Research International* 49: 209–215
- Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A. 2007. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity & analytical methods. An overview of the last decade. *International Journal of Molecules Sciences* 12: 1679–1719.
- Bermúdez B, Pacheco YM, López S, Abia R, Muriana FJG. 2004. Digestion and absorption of olive oil. *Grasas y Aceites* 55(1): 1-10

- Bilikavo K, Krakova TK, Yamaguchi K, Yamaguchi Y. 2015. Major royal jelly proteins as markers of authenticity and quality of honey. *Arh Hig Rada Toksikol* 66:259-267
- Bintari SH dan Nugraheni K. 2012. Penurunan kadar gula darah akibat pemberian extra virgin olive oil (studi pada tikus galur sprague dawley yang diinduksi pakan tinggi lemak). *Jurnal MIPA* 35(2): 116-121
- Bogdanov S. 2016. Honey as Nutrient and Functional Food. Spain : Bee Product Science
- Bony E, Boudard F, Dussossoy E, Portet K, Brat P, Giaimis J, Michel A. 2012. Chemical composition & anti-inflammatory properties of the unsaponifiable fraction from awara (*astrocaryum vulgare* m.) Pulp oil in activated j774 macrophages & in a mice model of endotoxic shock. *Plant Foods Hum Nutr* 67:384–392
- Borges TH, Lopez LC, Pereira A, Vique CC. 2017. Comparative analysis of minor bioactive constituents (coq10), tocopherols & phenolic compounds) in arbequina extra virgin olive oil from brazil & spain. *Journal of Food Composition & Analysis* 63: 47-54
- Borges TH, Pereira JA, Vique CC, Seiquer I. 2017. Study of the antioxidant potential of Arbequina extra virgin olive oils from Brazil & Spain applying combined models of simulated digestion & cell culture markers. *Journal of Functional Foods* 37: 209–218
- Budiartawan KA, Darmawan IGAC, Berata K, Setiasih NLE. 2018. Perkembangan secara histologi vili duodenum ayam pedaging yang diberikan imbuhan asam butirrat pada pakan. *Indonesia Medicus Veterinus* 7(5): 522-530
- Calder PC, Field CJ. 2002. Nutrition and immune function : fatty acids, inflammation and immunity. New York : CABI Publishing
- Campos HS, de Souza PR, Peghini BC, da Silva JS, Cardoso CR. 2013. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini-Reviewers in Medicinal Chemistry* 13(1): 1-9
- C´ardeno A, Hidalgo MS, Soto MA, Fidalgo SS, Lastra AC. 2014. Extra virgin olive oil polyphenolic extracts downregulate inflammatory responses in LPS-activated murine peritoneal macrophages suppressing NFkB & MAPK signalling pathways. *Food Funct.* 5: 1270–1277
- Carluccio MA, Massaro M, Scoditti, de-Caterina R. 2010. Endothelial activation and olive oil. Olive oil in health and disease prevention. USA : Elsevier
- Caro AD, Vacca V, Poiana M, Fenu P, Piga A. 2006. Influence of technology, storage & exposure on components of extra virgin olive oil (Bosana cv) from wole & de-stoned fruits. *Food Chemistry* 98: 311-316
- Carrillo C, Cavia MM, Alonso-Torre S. 2012. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. *Nutricion Hospitalaria* 27(4): 978-990.
- Cariello M, Contursi A, Gadaleta RM, Piccinin E, De Santis S, Piglionica M, Spaziante AF, Sabbà C, Villani G, Moschetta A. 2020. Extra-virgin olive oil from Apulian cultivars and intestinal inflammation
- Cahyati I. 2008. Sifat fisikokimia madu monoflora dari daerah istimewa yogyakarta dan jawa tengah. *AGRITECH* 28 (1): 9-14
- Candiracci M, Piatti E, Dominguez-Barragán M, García-Antrás D, Morgado B, Ruano D, Gutiérrez JF, Parrado J, Castaño A. 2012. Anti-inflammatory

- activity of a honey flavonoid extract on lipopolysaccharide-activated n13 microglial cells. *J Agric Food Chem.* 60(50): 12304-12311.
- Caramia G, Gori A, Valli E, Cerretani L. 2012. Virgin olive oil in preventive medicine: From legend to epigenetics. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 114: 375–388
- Chaiyana W, Leelapornpisid P, Phongpradist R, Kiattisin K. 2016. Enhancement of antioxidant and skin moisturizing effects of olive oil by incorporation into microemulsions. *Nanomaterials and Nanotechnology* 6: 1–8
- Chayati I, Miladiyah I. 2014. Kandungan komponen fenolat, kadar fenolat total, dan aktivitas atioksidan mau dari beberapa daerah di Jawa dan Sumatera. *Media Gizi Mikro Indonesia* 6(1):11-24
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. 2010. Biokimia, ulasan bergambar, Edisi 3. Jakarta : EGC Penerbit Buku Kedokteran
- Chakir A, Romane A, Barbagianni N, Bartoli D, Ferrazzi P. 2011. Major and trace elements in different types of moroccan honeys. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(4): 223-231
- Chakir A, Romane A, Marcazzan GL, Ferrazzi P. 2016. Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in morocco. *Arabian Journal of Chemistry* 9:S946-S954
- Chauhan A, Pandey V, Chacko KM, Khandal RK. 2010. Antibacterial activity of raw and processed honey. *Electronic Journal Of Biology* 5(3): 58-66
- Chen FH, Li K, Yin L, Chen CQ, Yan ZW, Chen GM. 2015. Protective effect of sodium nitroprusside on the rat small intestine transplanted mucosa. *Biochemistry Research International*, ID 786010: 1-6
- Chepulis L, Starkey N. 2008. The long -term effects of feeding honey compared with sucrose and a sugar-free diet on weight gain, lipid profiles, and dexta measurements in rats. *Journal of Food Science* 73(1): H1-H7
- Cholid S, Santosa B, Suhartono. 2011. Pengaruh pemberian madu pada diare akut. *Sari Pediatri* 12(5): 289-295
- Cicerale S, Lucas L, Keast R. 2010. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 458-479
- Cianciosi D, Forbes-Hernández TY, Afrin S, Gasparrini M, Quiles JL, Gil E, Bompadre S, Simal-Gandara J, Battino M, Giampieri F. 2020. The influence of in vitro gastrointestinal digestion on the anticancer activity of Manuka honey. *Antioxidants* 9(64) : 1-20
- Cortez PM, Ulloa JA, Ulloa PR, Rodriguez RR, Vazquez JAR. 2013. Physicochemical characterization of honey from the west region of Mexico. *CyTA- Journal of Food* 11(1):7-13
- Cortes ME, Vigil P, Montenegro G. 2011. The medicinal value of honey: a review on its benefits to human health, with a special focus on its effects on glycemic regulation. *Cien. Inv. Agr.* 38(2):303-317.
- Daha L. 2011. Rancangan percobaan untuk bidang biologi dan pertanian teori dan aplikasinya. Makasar : Masagena Press.
- da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2016. Honey: chemical composition, stability & authenticity. *Food Chem.* 196:309–323.
- Davanzo RM, Crisma AR, Murata G, Newsholme P, Curi R. 2020. Review impact of dietary fatty acids on macrophage lipid metabolism, signaling and function. *Immunometabolism* 2(1): 1-41

- Dayrit FM. 2014. The Properties of lauric acid and their significance in coconut oil. *J. American Oil Chem Society* 92: 1-15.
- Debicka MG, Przychodzen P, Cappelo F, Jankowska AK, Gammazza AM, Knap N. 2018. Review : potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 547: 1-13
- de Azevedo WM, de Oliveira LFR, Alcântara MA, Cordeiro AMT, Damasceno KSFS, de Araújo NK, de Assis CF, Junior FCS. 2020. Physicochemical characterization, fatty acid profile, antioxidant activity and antibacterial potential of cacay oil, coconut oil and cacay butter. *PLoS One*. 15(4): 1-11
- de La Torre-Carbot K, Chavez-Servin JL, Jauregui O. 2007. Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: determination by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 583: 402–410.
- de La Lastra CA, Barranco MD, Motilva V, Herrerías JM. 2001. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Current Pharmaceutical Design*, 7: 933-950
- de Man JM. 2010. Kimia Makanan. Bandung : Penerbit ITB
- de Moraes IMM, de-Albuquerque CFG, Kurz ARM, Oliveira FMJ, de Abreu VHP, Torres RC, Carvalho VF, Estado V, Bozza PT, Sperandio M, Neto HCCF, Silva AR. 2018. Omega-9 oleic acid, the main compound of olive oil, mitigates inflammation during experimental sepsis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Vol 2018 : 1-13
- de Pablo MA, Puertollano MA, Alvarez de Cienfuegos G. 2004. olive oil & immune system functions: potential involvement in immunonutrition. *Grasas y Aceites* 55(1): 42-51
- Demertz KA, Roukos C, Demertzis. 2018. Basic characteristics and quality of virgin olive oil produced in Corfu (cv. Lianolia) and South Albania (cv. Kalinioti). *International Journal of Scientific Research and Management* 6(3): 16-32
- Dewi M, Khomsan A, Sukandar D. 2010. Intervensi isoflavon kedelai tidak berpengaruh terhadap status inflamasi dan imunitas pada remaja dengan kegemukan. *Jurnal Gizi dan Pangan* 5(1):1-5
- Dewi MA, Kartasmita RE, Wibowo MS. 2017. Uji aktivitas antibakteri beberapa madu asli lebah asal Indonesia terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Kartika-Jurnal Ilmiah Farmasi* 5(1): 27-30
- Dinnela C, Masi C, Zoboli G, Monteleone E. 2012. Sensory functionality of extra-virgin olive oil in vegetable foods assessed by Temporal Dominance of sensations & descriptive analysis. *Food Quality & Preference* 26:141-150
- Djaelani MA. 2015. Profil kolesterol darah tikus setelah pemberian virgin coconut oil dan minyak zaitun. *Bioma* 17(2): 102-105
- Djarkasi S, Raharjo S, Noor Z, Sudarmadji S. 2007. sifat fisik dan kimia minyak kenari physical and chemical properties of canarium Oil G.S. *AGRITECH* 27(4): 165-170
- Ebrahimi M, Allahyarib A, Ebrahimic M, Toroghid HM, , Hosseinid G, Karimie M, Rezaieane A, Kazemi MR. 2016. Effects of dietary honey & ardeh combination on chemotherapy induced gastrointestinal & infectious complications in patients with acute myeloid leukemia: a double-blind

- randomized clinical trial. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 15 (2): 661-668
- Ebrahimi M, Dehghani F, Farhadian N, Karimi M, Golmohammadzadeh S. 2017. Investigating the anti-apoptotic effect of sesame oil & honey in a novel nanostructure form for treatment of heart failure. *Nanomed. J.* 4(4): 245-253
- El-Arab AME, Girgis SM, Hegazy EM, El-Khalek ABA. 2006. Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice. *Complementary and Alternative Medicine* 6(6) 1-13
- Emma WMSM. Karakteristik usus halus ayam pedaging yang diberikan asam jenruk nipis dalam pakan. *Jurnal Veteriner* 14(1): 105-110
- Emmanuel A, Inns S. 2017. Gastroenterologi dan Hepatologi. Jakarta : Penerbit Erlangga
- Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS. 2012. Review honey: a novel antioxidant. *International Journal of Molecules Sciences* 17:4400-4423
- Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wabab MS. 2014. Effects of honey & its mechanisms of action on the development & progression of cancer. *International Journal of Molecules Sciences* 19: 2497-2522
- Erywiyatno L, Djoko SSB, Krihariyani D. 2012. Pengaruh madu terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. *Jurnal Analis Kesehatan Sains* 1(1): 30-37
- Escriche I, Kadar M, Juan-Borrás M, Domenech E. 2014. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chem.* 1(142):135-143.
- Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of northeast portugal honey. *Food Chem Toxico.* 46(12):3774-3779.
- Evahelda E, Pratama F, Malahayati N, Santoso B. 2017. Sifat fisik dan kimia madu dari nektar pohon karet di Kabupaten Bangka Tengah, Indonesia. *AGRITECH* 37(4): 363-368
- Ewnetu Y, Lemma W, Birhane N. 2014. Synergetic antimicrobial effects of mixtures of ethiopian honeys & ginger powder extracts on standar & resistant clinical bacteria isolates. *Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 2014
- FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations). 2010. Fats and fatty acids in human nutrition. Geneva : Food and Agriculture Organization of The United Nations
- Fares N, Jabri K, Abderrabba. 2016. Physical chemical and sensory characterization of olive oil of the region of Kairouan. *J. Mater. Environ. Sci.* 7 (6): 2148-2154
- Fardian N, Johan A, Kisdjamiatun RA. 2015. Pengaruh pemberian seng terhadap indeks fagositosis makrofag dan kadar nitric oxyde mencit balb/c yang terpapar lipopolisakarida e.coli. *Jurnal Gizi Indonesia* 3(2): 68-72
- Fitriyaningtyas SI, Widyaningsih TD. 2015. Pengaruh penggunaan lesitin dan cmc terhadap sifat fisik, kimia, dan organoleptik margarin sari apel manalagi (Malus Sylfertris Mill) tersuplementasi minyak kacang tanah. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 3(1):226-236.
- Fritsche KL. 2015. The science of fatty acids and inflammation. *American Society for Nutrition. Adv. Nutr.* 6: 293S–301S

- Fukuda M, Kobayashi K, Hirono Y, Miyagawa M, Ishida T, Ejiogu EC, Sawai M, Pinkerton KE, Takeuchi M. 2011. Jungle honey enhances immune function and antitumor activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 908743: 1-8
- Gaforio JJ, Visioli F, Lastra CADL, Castañer O, Rodríguez MD, Fitó M, Hernández AF, Huertas JR, González MAM, Menendez JA, Osada JDL, Papadaki A, Parrón T, Pereira JE, Rosillo MA, Quesada CS, Schwingshackl L, Toledo E, Tsatsakis AM. 2019. Review virgin olive oil and health: summary of the iii international conference on virgin olive oil and health consensus report, JAEN (Spain) 2018. *Nutrients* 11, 2039
- Gairola A, Tiwari P, Tiwari JK. 2013. Physico-chemical properties of *Apis cerana indica* f, honey from Uttarkashi district of Uttarakh & India. *J. Global Biosci* 2 (1): 20 – 25
- Gannabathula S, Skinner MA, Rosendale D, Greenwood JM, Mutukumira AN, Steinhorn G, Stephens J, Krissansen GW, Schlothauer RC. 2012. Arabinogalactan proteins contribute to the immunostimulatory properties of New Zealand honeys. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34(4): 598-607
- Gambino CM, Accardi G, Alello A, Candore G, DaraGuccione G, Mirisola M, Procopio A, Taormina G, Caruso C. 2018. Effect of extra virgin olive oil and table olives on the immune inflammatory responses: potential clinical applications. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 18(1): 1-10
- Gartner LP, Hiatt JL. 2014. Histologi, buku ajar berwarna, edisi III. Singapura : Elsevier
- Gavahian M, Khaneghab AM, Lorenzo JM, Munekata PES, Mantrana IG, Collado MC, Melendez-Martinez AJ, Barba FJ. 2019. Health benefits of olive oil and its components: Impacts on gut microbiota/antioxidant activities, and prevention of noncommunicable disease. *Trends in Food Science & Technology* 88: 220-227
- Gaw A, Murphy MJ, Cowan RA, Reily DStJ, Steart MJ, Shepherd J. 2011. Biokimia klinis. Jakarta : EGC Penerbit Buku Kedokteran
- Ghanbari R, Anwar F, Alkharfy KM, Gilani AH, Saari N. 2012. Valuable nutrients & functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea L.*). *International Journal of Molecules Sciences* 13(3):3291-340.
- Gharby S., Harhar H., Matthaus B., Bouzoubaa Z., Charrouf. 2016. The chemical parameters & oxidative resistance to heat treatment of refined & extra virgin moroccan picholine olive oil. *Journal of Taibah University for Science* 10(1): 100-106
- Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. 2003. Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem.* 51(5):1500-1505.
- Gollu A, Kismet K, Kilicoglu B, Erel S, Gonultas MA, Sunay AE, Akkus MA. 2008. Effect of honey on intestinal morphology, intraabdominal adhesions and anastomotic healing. *Phytother Res.* 22(9): 1243-1247
- González-Gil EM, Santabàrbara J, Russo P, Ahrens W., Claessens M, Lissner L, Börnhorst C, Krogh V, Iacoviello L, Molnar D, Siani A, Tornaritis M, Veidebaum T, Moreno LA, 2016. Food intake & inflammation in European children: the IDEFICS study. *Eur J Nutr* 55:2459–2468

- Gomes T, Feas X, Iglesias A, Estevinho LM. 2011. Study of organic honey from the Northeast of Portugal. *International Journal of Molecules Sciences* 16: 5374-5386.
- Gomes SV, Dias BV, Pereira RR, de Pádua Lúcioa K, de Souza DMS, Talvanib A, Brandão GC, Cosenza GP, de Queiroze KB, Costa DC. 2020. Different source of commercial vegetable oils may regulate metabolic, inflammatory and redox status in healthy rats. *Journal of Functional Foods* 66, 103780: 1-10
- Gultom T. 2016. Pengaruh pemberian kolkisin terhadap jumlah kromosom bawang putih (*Allium sativum*) lokal kultivar doulu. *Jurnal Biosains* 2(3): 165-172
- Guyton. 2012. Fisiologi manusia dan mekanisme penyakit. Jakarta : EGC Penerbit Buku Kedokteran
- Hadianah HR, Dewi P, Peristiowati Y, Imam S. 2014. Imunologi : diagnosis dan teknik biologi molekuler. Yogyakarta : Nuha Medika
- Hadisoesilo S. 2001. Keanekaragaman spesies lebah madu asli Indoensia. *Biodiversitas* 2(1): 123-128
- Hammad S. 2010. 70 Resep sehat dengan minyak zaitun. Solo : Aqwam
- Hanafiah KA. 2012. Rancangan percobaan, teori dan aplikasi. Jakarta : PT RajaGrafindo Persada.
- Handajani S, Manuhara GJ, Anandito RBK. 2010. Pengaruh suhu ekstraksi terhadap karakteristik fisik, kimia dan sensoris minyak wijen (*Sesamum indicum* L.). *AGRITECH*, 30(2): 116-122
- Harris LG, Foster SJ, Richards RG. 2002. An introduction to staphylococcus aureus, & techniques for identifying & quantifying s. Aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cells & Materials* 4: 39-60
- Harimurti S, Rahayu ES. 2009. Morfologi usus ayam broiler yang disuplementasi dengan probiotik strain tunggal dan campuran. *AGRITECH* 29(3): 179-186
- Harti AS. 2013. Imunologi dasar & imunologi klinis. Jakarta : Graha Ilmu
- Hartono EF, Iriyanti N, Suhermiyati S. 2016. Efek penggunaan sinbiotik terhadap kondisi mikroflora dan histologi usus ayam sentul jantan. *Agripet* 16(2): 97-105
- Harvey KA, Walker CL, Xu Z, Whitley P, Pavlina TM, Hise M, Zaloga GP, Siddiqui RA. 2010. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *Journal of Lipid Research* 51: 3470-3480
- Hassanzadeh-Taheri M, Hassanzadeh-Taheri M, Jahani F, Erfanian Z, Moodi H, Hosseini M. 2019. The impact of long-term consumption of diets enriched with olive, cottonseed or sesame oils on kidney morphology: A stereological study. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 91(2): 1-11
- Hasdianah, Dewi P, Peristiowati Y, Imam S. 2013. Imunologi, diagnosis dan Teknik biologi molekuler. Yogyakarta: Nuha Medika
- Haynes JS, Callaghan R. 2011. Properties of honey: its mode of action and clinical outcomes. *Wounds UK* 7(1): 50-57
- Hendarsyah F, Kurniawaty E, Mustofa S. 2014. Comparison of the effects of extra virgin olive oil, honey, and combination on blood levels of HDL in male white rats (*Rattus norvegicus*) sprague dawley strain that induced by high-cholesterol diet. *Medical Journal Of Lampung University* 3(2): 55-63

- Hosseinzade A, Sadeghi O, Biregani AN, Soukhtehzari S, Brandt GS, Esmailizadeh A. 2019. Immunomodulatory Effects of Flavonoid: Possible Induction of TCD4⁺ Regulatory Cells Through Suppression of mTOR Pathway Signaling Activity. *Jurnal of cellular biochemistry* 12(2): 1511-1520
- Hudson L, Hay FC. 1989. *Praktical immunology*, Third Edition. Melbourne : Blackwell Scientific Publications
- Hussein SZ, Yusoff KM, Makpol S, Yusof YAM. 2018. Gelam Honey Attenuates Carrageenan-Induced Rat Paw Inflammation via NF- κ B Pathway. *Plos One* 8(8): 1-12
- Ibnu YS. 2019. Potensi madu sebagai terapi topikal otitis eksternal. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma* 8(2) : 7-22
- Ide P. 2009. *Health secret of olive*. Jakarta : PT Alex Media Komputindo
- IOC (International Olive Council). 2017. Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils. Madrid : International Olive Council
- Ismail N, Olano JP, Feng HM, David H. Walker DH. 2002. Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganism. *FEMS Microbiology Letters* 207 :111-120
- Jabeur H, Zribi A, Bouaziz M. 2017. Changes in chemical and sensory characteristics of chemlali extra-virgin olive oil as depending on filtration. *European Journal of Lipid Science and Technology* 119; 1500602: 1-10
- Jaganathan SK, Mandal M. 2009. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2009: 1-13
- Kajiwarra S, Gandhi H, Ustunol Z. 2002. Effect of honey on the growth of and acid production by human intestinal bidobacterium spp.: an in vitro comparison with commercial oligosaccharides and inulin. *Journal of Food Protection*, 65(1): 214–218
- Kamilatussaniah, Yuniastuti A, Iswari RS. 2015. Pengaruh suplementasi madu kelengkeng terhadap kadar TSA dan MDA tikus putih yang diinduksi timbal (Pb). *Jurnal MIPA* 38(2): 108-114.
- Karimela EJ, Ijong FG, Dien HA. 2017. Karakteristik *Staphylococcus aureus* yang di isolasi dari ikan asap pinekuhe hasil olahan tradisional Kabupaten Sangihe. *JPHPI* 20(1): 188-189
- Kassim M, Mansor M, Suhaimi A, Ong G, Yusoff KM. 2012. Gelam honey has a protective effect against lipopolysaccharide (LPS)-induced organ failure. *International Journal Molecular Sciences* 13(5): 6370–6381
- Katja DG. 2012. Kualitas minyak bunga matahari komersial dan minyak hasil ekstraksi biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.). *Jurnal Ilmiah Sains* 12(1): 59-64
- Katmawanti S, Wirdjadmaji B, Adi AC. 2016. Pengaruh glutamin & glukosa unhidrat pada jumlah limfosit tikus model kurang energi protein. *Jurnal Preventia* 1(1)::25-34
- Katzung, B.G., Masters, S.B., dan Trevor, A.J. 2012. *Basic & Clinical Pharmacology*. Edisi ke-12. New York: McGraw Hill Medical.
- Kementerian Pertanian RI. 2017. *Penggunaan dan penanganan hewan coba rodensia dalam penelitian*. Jakarta : Kementerian Pertanian
- Ketaren S. 2012. *Pengantar teknologi minyak dan lemak pangan*. Jakarta : UI Press

- Keke A, Cinkmanis I. 2019. Determination of organic acids in honey samples from latvian market by high-performance liquid chromatography. *Research For Rural Development* 1: 229-233
- Khlil E, Mansouri F, Moumen AB, Caid HS, Berrabah M, Tahri E. 2017. Physicochemical characteristic of monovarietal olive oil produced at Beni Tajjit, south-west of the region of eastern Morocco. *Journal of Material and Environmental Sciences* 8(12): 4264-4272
- Kivrak S, Kivrak I, Karababa E. 2017. Characterization of Turkish honeys regarding of physicochemical properties and their adulteration analysis. *Food Science and Technology, Campinas* 37(1):80-89
- Kráčmar S, Fišera M, Přikrylová V, Fišerová L, Málek Z, Tvrzník P. 2019. Storage of extra virgin olive oil and its impact on fatty acid levels. *J Microbiol Biotech Food Sci* 8 (5): 1228-1230
- Kresno SB. 2001. *Imunologi : diagnosis dan prosedur laboratorium*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Indonesia
- Kusmardi, Kumala S, Triana E.E. 2007. Efek imunomodulator ekstrak daun ketepeng cina (*Cassia Alata* L.) terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag. *Makara Kesehatan* 11 (2): 50-53
- Kusomo PD. 2012. Kolonisasi mikrobiota normal dan pengaruhnya pada perkembangan sistem imunitas neonatal. *WIDYA* 29(320): 55-63
- Kurniyawan CB, Kosasih MI. 2015. faktor-faktor yang mempengaruhi kekambuhan gastritis. *Jurnal AKP* 6(2): 36-41
- Larussa T, Oliverio M, Suraci E, Greco M, Placida R, Gervasi S, Marasco R, Imeneo M, Paolino D, Tucci L, Gulletta E, Fresa M, Procopio A, Luzzza F. 2017. Oleuropein decreases cyclooxygenase-2 and interleukin 17 expression and attenuates inflammatory damage in colonic sample from ulcerative colitis patients. *Nutrients* 9(4): 391-402
- Laaroussi H, Bouddine T, Bakour M, Ousaaaid D, Lyoussi B. 2020. Physicochemical Properties, Mineral Content, Antioxidant Activities, and Microbiological Quality of Bupleurum spinosum Gouan Honey from the Middle Atlas in Morocco. *Journal of Food Quality* 7609454: 1-12
- Lavermicocca P, Rossi M, Russio F, Srirajaskanthan R. 2010. Table olives : a carrier for delivering probiotic bacteria to humans. *Olive oil in health and disease prevention*. USA : Elsevier
- Lee GY, Han SN. 2018. Review The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients*, 10, 1614:1-18
- Leong AG, Herst PM, Harper JL. 2012. Indigenous New Zealand honeys exhibit multiple anti-inflammatory activities. *Innate Immun* 18(3):459-466
- Li S, Tan HY, Wang N, Cheung F, Hong M, Feng Y. 2018. Review article the potential and action mechanism of polyphenols in the treatment of liver diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 8394818:1-25
- Li X, Bremer GC, Connell KN, Ngai C, Pham QAT, Wang S, Flynn M, Ravetti L, Guillaume C, Wang Y, Wang SC. 2016. Changes in chemical compositions of olive oil under different heating temperatures similar to home cooking. *J. Food Chem. Nutr.* 04 (01): 07-15
- Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, Liu H, Yin Y. 2016. Review quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* 8(167): 1-23

- Loiuse H. 2011. *Imunologi, berorientasi pada kasus klinik*. Tangerang : Binarupa Aksara Publisher
- Lopez AL, Montano A, Garrido-Fernandez A. 2010. Nutrient profiles of commercial table olives: protein and vitamin. *Olive oil in health and disease prevention*. USA : Elsevier
- Machado AM, Miguel MG, Vilas-Boas M, Figueiredo AC. Honey volatiles as a fingerprint for botanical origin—a review on their occurrence on monofloral honeys. *Molecules* 25(374):1-32
- Maiuri MC, Stefano DD, Meglio PD, Irace C, Savarese M, Sacchi R, Cinelli MP, Carnuccio R. 2005. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371: 457–465
- Majtan J. 2014. Honey: an immunomodulator in wound healing. *Wound Rep Reg* 22 :187–192
- Malole MBM, Pramono CSU. 1989. *Penggunaan hewan-hewan percobaan di laboratorium*. Bogor : Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor
- Mannina L, Sobolev AP, Coppo E, Lorenzo AD, Nabavi SM, Marchese A, Daglia M. 2016. Antistaphylococcal activity and metabolite profiling of manuka honey (*Leptospermum scoparium* L.) after in vitro simulated digestion. *Food Funct* 7(3):1664-1670
- Mansour AB, Gargouri B, Melliou E, Magiatib P, Bouaziza M. 2016. Oil quality parameters and quantitative measurement of major secoiridoid derivatives in Neb Jmel olive oil from various Tunisian origins using qNMR. *J Sci Food Agric* 96: 4432–4439
- Manyi-Loh CE, Clarke AM, Ndip RN. 2011. An overview of honey: Therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *African Journal of Microbiology Research* 5(8): 844-852.
- Marks DB, Marks AD, Smith CM. 2014. *Biokimia kedokteran dasar, sebuah pendekatan klinis*. Jakarta : EGC Penerbitan Buku Kedokteran
- Martin VA, Arroyo FS, Cufí S, Ferraros OC, Sánchez LJ, Vellón L, Micol V, Joven J, Carretero SA, Menendez JA. 2012. Phenolic secoiridoids in extra virgin olive oil impede fibrogenic and oncogenic epithelial-to-mesenchymal transition: extra virgin olive oil as a source of novel antiaging phytochemicals. *Rejuvenation Res.* 15(1):3-21
- Martín-Peláez S, Mosele J, Pizarro N, Farràs M, de la Torre R, Subirana I, Pérez-Cano F, Castañer O, Solà R, Fernandez-Castillejo S, Heredia S, Magí F, Motilva MJ, Fitó M. 2015. Effect of virgin olive oil and thyme phenolic compounds on blood lipid profile: implications of human gut microbiota. *European Journal of Nutrition* 56(1): 1-27
- Mattjik AA, Sumertajaya IM. 2013. *Perancangan percobaan dengan aplikasi sas dan minitab*. Bogor: IPB Press
- Maulana T, Said S. 2013. Pengaruh pemberian ekstrak buah merah (*P&anus Conoideus Lam*). terhadap karakteristik organ reproduksi jantan dan kualitas sperma mencit (*Mus Mucullus*). Prosiding Seminar Nasional dan Forum Komunikasi Industri Peternakan. LIPI
- Mazzocchi A, Leone L, Agostoni C, Schöll IP. 2019. Review the secrets of the mediterranean diet. Does [only] olive oil matter? *Nutrients* 11, 2941

- Medina E, de Castro A., Romero C, Brenes M. 2007. Antimicrobial activity of olive oil, vinegar, & varios beverages agains Foodborne pathogens. *J. Food Prot* 70(5): 1194-9
- Miguel MG, Antunes MD, Faleiro ML. 2017. Honey as a complementary medicine. *Integrative Medicine Insights* 12: 1-15
- Mofid B, Rezaeizadeh H, Termos A, Rakhsha A, Mafi AR, Taheripanah T, Ardakani MM, Taghavi SME, Moravveji SA, Kashi ASY. 2016. Effect of processed honey and royal jelly on cancer-related fatigue: a double-blind randomized clinic trial. *Electron Physician* 8(6): 2475-2482
- Moulodi F, Qajarbeigi, Rahmani K, Babaei AHH, Mohammadpoorasi A. 2015. Effect of fatty acid composition on thermal stability of extra virgin olive oil. *Journal of Food Quality & Hazards Control* 2(5): 56-60
- Muchtadi D. 2012. Pangan fungsional dan senyawa bioaktif. Bandung: Alfabeta
- Mulyani S, Susilowati, Hutabarat M. 2009. Analisis GC-MS dan daya anti bakteri minyak atsiri Citrus amblycarpa (Hassk) Ochse. *Majalah Farmasi Indonesia* 20(3):127 – 132
- Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. 2009. Biokimia Harper edisi 27. Jakarta : EGC Penerbit Buku Kedokteran
- Mustaba R, Winaya IO, Ketut IB. 2012. Studi histopatologi lambung pada tikus putih yang diberi madu sebagai pencegahan ulkus lambung yang diinduksi aspirin. *Indonesia Medicus Veterinus* 1(4):471-482
- Nadhilla NF. 2014. The activity of antibacterial agent of honey againts Staphylococcus aureus. *J Majority* 3(7): 94-101
- Naraya KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna. 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology* 33 (1) : 2-16
- National Honey Board. 2010. Honey–health and therapeutic qualities. Longmont : National Honey Board
- Nayik GA, Suhag Y, Majid I, Nanda V. 2014. Discrimination of high altitude indian honey by chemometric approach according to their antioxidant properties and macro mineral. *Journal of The Saudi Society of Agricultural Sciences* 17(2): 200-207
- Nešović M, Gašić U, Tosti T, Trifković J, Baošić R, Blagojević S, Ignjatović I, Tešić Ž. 2020. Physicochemical analysis and phenolic profile of polyfloral and honeydew honey from Montenegro. *RSC Adv.*, **10**: 2462-2471
- Ngadiarti I, Kusharto CM, Briawan D, Marliyati SA, Sayuthi D. 2013. Kandungan asam lemak dan karakteristik fisiko-kimia minyak ikan lele dan minyak ikan lele terfermentasi. *Penelitian Gizi dan Makanan* 36(1): 82-90
- Nguyen HTL, Panyoyai N, Kasapis S, Pang E, Mantri N. 2019. Review honey and its role in relieving multiple facets of atherosclerosis. *Nutrients* 11(167): 1-13.
- Nidhi B, Mamatha BS, Baskaran V. Olive oil improves the intestinal absorption and bioavailability of lutein in lutein-deficient mice. *European Journal of Nutrition*, 2013: 1-12
- Niaz K, Maqbool F, Bahadar H, Abdollahi M. 2017. Health benefits of Manuka honey as an essential constituent for tissue regeneration. *Current Drug Metabolism* 18(10): 881-892

- Nocella C, Cammisotto V, Fianchini L, D'Amico A, Novo M, Castellani V, Stefanini L, Violi F, Carnevale R. 2018. Extra virgin olive oil and cardiovascular diseases: benefits for human health. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 18(1):4-13
- Nolan VC, Harrison J, Cox JAG. 2019. Review dissecting the antimicrobial composition of honey. *Antibiotics* 8 (251): 1-16
- Noori S, Al-Waili. 2005. Mixture of honey, beeswax & olive oil inhibits growth of *Staphylococcus aureus* & *Candida albicans*. *Archives of Medical Research* 36(1): 10-13
- Nugroho YA. 2011. Aktivitas antimalaria (in vivo) kombinasi buah sirih (*Piper betle* L), daun miyana (*Plectranthus scutellarioides* L), madu dan kuning telur pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. *Buletin Penelitian Kesehatan* 39(3):129-137
- Nurhamidah N, Erawati E. 2014. Pengaruh pemberian ekstrak ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas poiret*) terhadap kadar glukosa darah, kadar immunoglobulin a (IgA) dan villi usus pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) diabetes. *Scientia* 4(1): 22-28
- Nworu CS, Akah PA. 2015. Anti-inflammatory medicinal plants and the molecular mechanisms underlying their activities. *J Tradit Complement Altern Med.* 12:52-61
- Oelschlaegel S, Gruner M, Wang PN, Boettcher A, Koelling-Speer I, Speer K. 2012. Classification and characterization of manuka honeys based on phenolic compounds and methylglyoxal. *J Agric Food Chem* 60(29):7229-7237
- Olaitan PB, Adeleke OE, Ola IO. 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences* 7 (3): 159-165
- Olas B. 2020. Honey and its phenolic compounds as an effective natural medicine for cardiovascular diseases in humans? *Nutrients* 12 (283) : 1-14
- Omar SH. 2008. Plant review olive: native of mediterranean region and health benefits. *Pharmacognosy* 2(3): 135-142
- Omotoso GO, Muonagolu JN, Enaibe BU. Histological evaluation of the jejunum and ileum of rats after administration of high dose garlic aqueous extract. *International Journal of Health Sciences* 6(2): 111-116
- Orsavova J, Misurcova L, Ambrozova JV, Vicha R, Mlcek J. 2015. Fatty acids composition of vegetable oils & its contribution to dietary energy intake & dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *International Journal of Molecules Sciences* 16: 12871-12890
- Oskouel TE, Najafi M. 2013. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 16(6):731-742
- O'sullivan AM, O'callaghan YC, O'connor TR, O'brien NM. 2013. Comparison of the antioxidant activity of commercial honeys, before and after in-vitro digestion. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 63 (3): 167-171.
- Oswan WA, Labib DA, Abdelhalim MO, Elrokh EM. 2017. Synergistic analgesic, anti-pyretic and anti-inflammatory effects of extra virgin olive oil and ibuprofen in different experimental models of albino mice. *Int J Rheum Dis.* 20(10):1326-1336

- Owoyele BV, Adenekan OT, Soladoye AO. 2011. Effects of honey on inflammation and nitric oxide production in wistar rats. *Journal of Chinese Integrative Medicine* 9(4): 447-452
- Ozden S, Bolkent S, Gezginci-Oktayoglu S, Arda-Pirincci P, Karatug A, Alpertunga B. 2012. Effects of taurine and vitamin E on lipid peroxidation, antioxidant system and histological changes in Wistar rat liver and kidney after short-term exposure of methiocarb. *J. Fac. Pharm. Istanbul* 42(2) : 83-102
- Paramitha DS, Dharmana E. 2014. Pengaruh pemberian tiga jenis kombinasi herbal a,b, dan c terhadap kapasitas produksi interferon gamma (IFN- γ) dan interleukin 4(IL-4) pada mencit Balb/C. *Jurnal Media Medika Muda* 3(2): 89-96
- Parmely MJ. 2013. *Imunologi klinik*. Tangerang : Karisma Publishing Group
- Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. 2017. Review article honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*: 1-21
- Pedan V, Popp M, Rohn S, Nyfeler M, Bongartz A. 2019. Characterization of phenolic compounds and their contribution to sensory properties of olive oil. *Molecules* 24(11): 2041-
- Pérez AG, León L, Pascual M, de la Rosa R, Belaj A, Sanz C. 2019. Analysis of olive (*Olea europaea* L.) genetic resources in relation to the content of vitamin E in virgin olive oil. *Antioxidants* 8(242): 1-13
- Pérez RA, Iglesias MT, Pueyo E, Gonzalez M, de Lorenzo C. 2007. Amino acid composition and antioxidant capacity of spanish honey. *J Agric Food Chem.* 55(2): 360-365
- Peri C. 2014. The extra – virgin olive oil handbook : the extra-virgin olive oil chan. UK : John Wiley & Sons, Ltd, page 501 – 507
- Peyrol J, Riva C, Amiot MJ. 2017. Hydroxytyrosol in the prevention of the metabolic syndrome and related disorders. *Nutrients* 9(3): 306-324
- Playfair JHL, Chain B.M. 2015. At a glance, imunologi Edisi 9. Jakarta : Penerbit Erlangga
- Poli PS. 2011. Komunikasi sel dalam biologi molekular, jalur sinyal dan implikasi klinis. Jakarta : EGC Penerbit Buku Kedokteran
- Popa O, Babeanu NE, Popa I, Nita S, Dinu-Parvu CE. 2015. Methods for obtaining and determination of squalene from natural sources. *BioMed Research International* 367202: 1-16
- Prahastuti S. 2011. Konsumsi Fruktosa Berlebihan dapat Berdampak Buruk bagi Kesehatan Manusia. *Jurnal Kesehatan Masyarakat* 10(2): 173-189
- Pramesti G. 2011. Mahir menggunakan SPSS 18.0 dalam rancangan percobaan. Jakarta : Elex Media Komputindo.
- Prasetya NBA, Ngadiwiyana. 2006. Identifikasi senyawa penyusun minyak kulit batang kayu manis (*Cinnamomum cassia*) menggunakan GC-MS. *JSKA*.10(1):345-351
- Prasetyo RH, Safitri E. 2016. Effects of honey to mobilize endogenous stem cells in efforts intestinal and ovarian tissue regeneration in rats with protein energy malnutrition. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 5(3): 198–203
- Pravst I. 2014. Oleic acid and its potential effects. New York : Nova Science Publishers Inc.

- Principal SG, Quiles JL, Tortosa JRL, Rovira PS, Tortosa MCR. 2015. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews* 68(4):191–206
- Purnama MTE, Plumeriastuti H, Widjaja NMR. 2013. The effect of borax on duodenal histopathological changes in rats (*Rattus norvegicus*). *Buletin Veteriner Udayana* 8(2): 47-53
- Qarnifa SE, Abderraouf El Antari AE, Hafidi A. 2019. Research article effect of maturity and environmental conditions on chemical composition of olive oils of introduced cultivars in morocco. *Journal of Food Quality*, Article ID 1854539: 1-14
- Rababah TM, Omoush MA, Brewer S, Alhamad M. 2014. Total phenol, antioksidant activity, flavonoids, anthocyanins & color of honey as affected by floral origin found in the arid & semiarid mediterranean areas. *Journal of Food Processing & Preservation* 38(3): 1119-1128.
- Radzikowska U, Rinaldi AO, Sözener ZÇ, Karaguzel D, Wojcik M, Cypryk K, Akdis M, Cezmi A. Akdis CA, Sokolowska M. 2018. Review the influence of dietary fatty acids on immune responses. *Nutrients* 11: 1-52
- Rahim M, Ooi FK, Hamid WZWA. 2016. Blood immune fuction parameters in response to combined aerobic dance exercise and honey supplementation in adult women. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7(2):165-171
- Rao PV, Krishnan KT, Salleh N, Gan SH. 2016. Biological & therapeutic effects of honey produced by honey bees & stingless bees: a comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26: 657–664
- Ratnayani K, Adhi S, Gitadewi IG. 2008. Penentuan kadar glukosa dan fruktosa pada madu randu dan madu klengkeng dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi. *Jurnal Kimia* 2 (2): 77–86.
- Ratnayani K, Laksmiwati AAIAM, Septian NPIP. 2012. Kadar total senyawa fenolat pada madu randu dan madu kelengkeng serta uji aktivitas antiradikal bebas dengan metode DPPH (Difenilpikril Hidrazil). *Jurnal Kimia* 6(2): 163-168
- Reagen-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. 2007. Dose translation from animal to human studies revisited. *The Faseb Journal* 22: 659-661
- Rebollada-Merino A, Bárcena C, Ugarte-Ruiz M, Porras N, Mayoral-Alegre FJ, Tomé-Sánchez I, Domínguez L, Rodríguez-Bertos A. 2019. Effects on intestinal mucosal morphology, productive parameters and microbiota composition after supplementation with fermented defatted alperujo (FDA) in laying hens. *Antibiotics* 8(215): 1-12
- Rezk MY, Abulfadle KA. 2013. Does natural honey affect gastric emptying in rats?. *National Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology* 3(2): 185 – 190
- Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F. 2014. The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos University Med J* 14(2): 157-165
- Rodriguez ES, Glesson SB, Navarro JRF, Calleja MA, Calvo JAS, Extremera BG, de la Torre R, Fito M, Covas MI, Vilchez P, de Dios Alche J, de Victoria EM, Gil A, Mesa MD. 2019. Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on biomarkers of oxidative stress and

- inflammation in healthy adults: a randomized double-blind controlled trial. *Nutrients* 11, 561 : 1-14
- Rohman A. 2016. *Lipid : Sifat fisika-kimia dan analisisnya*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- Roitt IM. 2007. *Imunologi : essential immunology*, Edisi 8. Jakarta : Widya Medika
- Roiaini M, Ardiannie T, Norhayati H. 2015. Physicochemical properties of canola oil, olive oil & palm olein blends. *International Food Research Journal* 22(3): 1227-1233.
- Rocha DM, Bressan J, Hermsdorff HH. 2017. The role of dietary fatty acid intake in inflammatory gene expression: a critical review. *Sao Paulo Med. J.* 135(2) : 1-10
- Roodaki MSM, Sahari MA, Tarzi BG, Barzegar M, Gharachorloo M. 2016. Effect of refining and thermal processes on olive oil properties. *J. Agr. Sci. Tech.* 18: 629-641
- Rosa DD, de Sales RL, Moraes LFS, Lourenço FC, Neves CA, Sabarense CM, Ribeiro SMR, Peluzio MCG. 2010. Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of wistar rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* 25 (3): 275-280
- Ross SH, Cantrell DA. 2018. Signaling and function of interleukin-2 in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 26(36): 411–433.
- Rotondi A, Lapucci C. 2010. Nutrient properties of extra virgin olive oil from the emilia-romagana region: profiles of phenols, vitamins, and fatty acids. *Olive oil in health and disease prevention*. USA : Elsevier
- Rozaini MZ, Zuki ABZ, Noordin MM, Norimah Y, Hakim AN. 2004. The effect of topical application of malaysian honey on burn wound healing. *J. Vet. Malaysia* 16 (2): 47-50
- Rueda A, Seiquer I, Olalla M, Gimenez R, Lara L, Vique CC. 2014. Characterization of fatty acid profile of argan oil and other edible vegetable oils by gas chromatography and discriminant analysis. *Journal of Chemistry* 2014;1-8
- Sacher RA, McPherson R.A. 2012. *Tinjauan klinis hasil pemeriksaan laboratorium edisi 11*. Jakarta : EGC Penerbit Kedokteran
- Scepankova H, Saraiva JA, Estevinho LM. 2017. Honey health benefits and uses in medicine. *Handbook Bee products-chemical and biological properties*: 83-96
- Saepudin R, Sutriyono, Saputra RO. 2014. Kualitas madu yang beredar di kota Bengkulu berdasarkan penilaian konsumen dan uji secara empirik. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia* 9(1): 30-40.
- Saha S. 2015. Honey- The natural sweetener become a promising alternative therapeutic: a review. *South Indian Journal of Biological Sciences* 1(2); 103-114
- Salazar DM, Cortés IL, García DCS. 2017. *Olive oil: composition and health benefits*. New York : Nova Science Publishers, Inc.
- Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F. 2017. Honey and health : a review of recent. *Clinical Research* 9(2): 121-127
- Sameh BK, Dorsaf M, Masarra M, Zouheir S, Rebai T. 2018. Effects of Minor Components of Olive Oil on Health. *J Complement Med Alt Healthcare* 5(2): 1-5

- Sanchez-Fidalgos, Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, Apricio-Soto M. 2013. Dietary virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice. *The Journal of nutritional biochemistry* 24(7): 125-132
- Sanmartin C, Taglieri I, Macaluso M, Sgherri C, Ascrizzi R, Flamini G, Venturi F, Quartacci MF, Luro F, Curk F, Pistelli L, Zinnai A. 2019. Cold-pressing olive oil in the presence of cryomacerated leaves of olea or citrus: nutraceutical and sensorial features. *Molecule* 24: 1-20
- Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Sanctis PD, Giovannini C, Archivio MD, Masella R. 2018. Anti-inflammatory activity of extra virgin olive oil polyphenols: which role in the prevention & treatment of immune-mediated inflammatory diseases?. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 18: 36-50
- Santis SD, Cariello M, Piccinin E, Sabbà C, Moschetta A. 2019. Review extra virgin olive oil: lesson from nutrigenomics. *Nutrients*. 11, 2085: 1-17
- Saprudin D, Palupi CA, Rohaeti E. 2019. Evaluasi pemberian unsur hara pada kandungan asam amino dan mialar dalam biji jagung. *Jurnal Kimia Riset* 4(1): 49-61.
- Sari YW, Astuti H, Sumantri. 2016. Uji kualitas minyak zaitun (Oleum Olivarum) merk "X" dan "Y" berdasarkan bilangan asam yang beredar di Kecamatan Kasihan, Bantul, DIY. *AKFARINDO* 1(1) : 62-68
- Sarolic M, Gugic M, Marijanovic Z, Suste M. 2014. Virgin olive oil & nutrition. food in health & disease, scientific-professional. *Journal Of Nutrition & Dietetics* 3 (1): 38-43
- Sartika RAD. 2008. Pengaruh asam lemak jenuh, tidak jenuh dan asam lemak trans terhadap kesehatan. KESMAS, *Jurnal Kesehatan Masyarakat Nasional* 2(4): 154-160
- Sasmito E. 2017. Imunomodulator bahan alami. Yogyakarta : Rapha Publisihing.
- Sastrohamidjojo H. Kimia organik : stereokimia, karbohidrat, lemak, dan protein. Yogyakarta : Gadjah Mada University.
- Savitri NPT, Hastuti ED, Suedy SWA. 2017. Kualitas madu lokal dari beberapa wilayah di Kabupaten Temanggung. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* 2(1): 58-66
- Scotece M, Gomez R, Conde J, Lopez V, Reino JG, Lago F, Smithill AB, Gualillo O. 2012. Futher Evidence for The anti-inflammatory activity of oleocanthal: inhibition of mip-1 α & IL-6 In J774 macrophages & in ATDC5 chondrocytes. *Life Sciences* 91(23–24): 1229-1235
- Sediaoetama AD. 2018. Ilmu gizi untuk mahasiswa dan profesi. Jakarta: Dian rakyat
- Servili M, Sordini B, Sonia E, Urbani S, Veneziani G, Maio HD, Selvaggini R, Taticci A. 2014. Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *J. Antioxidants* 3: 1-23
- Setiyaningsih FY, Jayasa PMD, Sujuti H, Retnani DP. 2018. Pengaruh Pemberian Extra Virgin Olive Oil terhadap jumlah Sel Granulosa dan Kadar 17 Estradiol Tikus yang di Papar Rhodamin B. *Jurnal Ners dan Kebidanan* 5(3): 241–248
- Shobirin MY, Susantiningsih T, Wahyuni A. 2014. Pengaruh pemberian minyak zaitun dan madu terhadap kadar trigliserida pada tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague Dawley* yang diinduksi diet tinggi lemak. *Medical Journal of Lampung University* 4(3): 146-153

- Sirait M. 2007. Penuntun fitokimia dalam farmasi. Bandung : Penerbit ITB
- Siswanto, Budisetyawati, Ernawati F. 2013. Peran beberapa zat gizi mikro dalam sistem imunitas. *Gizi Indon* 36 (1):57-64
- Situmorang PC, Ilyas S, Hutahaean S. 2019. Study of combination of nanoherbal andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium*) and extra virgin olive oil (EVOO) effects in the expression of malondialdehyde (MDA), heat shock protein-70 (HSP70) and placental histology of preeclamptic rats. *Pharmaceutical Sciences* 25(3): 205-220
- SNI (Standar Nasional Indonesia). 2013. Standar nasional indonesia (SNI) 01-3545-2013 mutu madu. Jakarta : Badan Standar Nasional
- Soares S, Amaral JS, Oliveira M, Mafra I. 2017. A Comprehensive review on the main honey authentication issues: production and origin: honey authentication. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5(6): 1-9
- Sudarto. 2014. Alergi dan Imunologi. Surabaya : Sagung Seto
- Sudiono J. 2014. Sistem kekebalan tubuh. Jakarta : EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Sudiyatmo, Rivai MI, Puar N, Lipooeto NI. 2016. Effects of preoperative honey drink on gastric content, perioperative discomfort & insulin resistance in patients undergoing open colorectal surgery a randomized, controlled trial. *British Journal of Medicine & Medical Research* 14(7): 1-8
- Sukandar D, Hermanto, Silvia E. 2009. Sifat fisiko kimia dan aktivitas antioksidan minyak kelapa murni (VCO) hasil fermentasi *Rhizopus orizae*. *JKTI* 11(2): 7-14
- Sulistiani R, P, Rahayuningsih HM. 2015. Pengaruh ekstrak lompong mentah (*Colocasia esculenta* L. Schoot) terhadap aktivitas fagositosis dan kadar NO (Nitrat Oksida) mencit BALB/C sebelum dan sesudah terinfeksi *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nutrition College* 4(2): 409-415
- Sumarlin LO, Muawanah A, Wardhani P, Masitoh. 2014. Aktivitas antikanker dan antioksidan madu di pasaran lokal Indonesia. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia* 19(3): 136-144
- Sumarna D. 2014. Studi metode pengolahan minyak sawit merah (Red Palm Oil) dari Crude Palm Oil (CPO). Proding Seminar Kimia 2014
- Suminar DL, Kurniawaty E, Mustofa S. 2014. Protective effect of granting extra virgin olive oil (evoo) & honey on blood LDL levels in male white spatague dawley rats that induced by high cholesterol diet. *Medical Journal of Lampung University* 8(1): 35-44
- Sunartaty R, Yulia R. 2017. Pembuatan abu dan karakteristik kadar air dan kadar abu dari abu pelepah kelapa. Prociding Seminar Nasional II USM 1: 560-562
- Suparno A, Nusantara AD. 2013. Perancangan percobaan, aplikasi minitab, SAS, dan CoStat dalam analisis data. Bandung : Penerbit Alfabeta
- Suranto A. 2007. Terapi madu. Jakarta : Penebar Plus
- Suroso A.S. 2013. Kualitas minyak goreng habis pakai ditinjau dari bilangan peroksida, bilangan asam dan kadar air. *Jurnal Kefarmasian Indonesia* 3(2):77-88
- Susilo. 2004. Komposisi madu. *Jurnal Herbal Indonesia* 7(1) : 12-17
- Suwanda. 2011. Desain eksperimen untuk penelitian ilmiah. Bandung : Penerbit Alfabeta.

- Syam Y, Usman AN, Natzirc R, Rahardjod SP, Hattae M, Sjattarf E, Saleh A, Sa'na M. 2016. Nutrition and pH of trigona honey from masamba, south Sulawesi, Indonesia. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research* 27(1): 32-36
- Syamsu RF. 2017. Efek pemberian minyak zaitun (Olive oil) terhadap perubahan profil lipid pada tikus putih (*Rattus novergicus*). *As-Syifaa* 9(1): 75-84.
- Tao L dan Kendall K. 2014. Gastrointestinal. Tangerang Selatan : Karisma Publishing Group
- Tizard IR. 2000. Immunology: an introduction. 6th Ed. New York: Saunders College Publishing: 98 – 161.
- Tonks J, Cooper RA, Jones KP, Blair S, Parton J, Tonks A. 2003. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine* 21: 242–247
- Toman R, Hajkova Z, Hluchy S. 2015. Changes in intestinal morphology of rats fed with different levels of bee pollen. *Pharmacognosy Communications* 5(4): 261-264
- Trade Data International. 2014. Sample file - Indonesia imports of virgin olive oil. Australia : Trade Data International
- Triana D. 2014. Frekuensi β -Lactamase hasil *Staphylococcus aureus* secara iodometri. *Jurnal Gradien* 10(2): 992-995
- Tuberoso CIG, Jerkovic I, Maldini M, Serreli G. 2016. Phenolic compounds, antioxidant activity, and other characteristics of extra virgin olive oils from Italian autochthonous varieties tonda di Villacidro, tonda di Cagliari, Semidana, and Bosana. *Journal of Chemistry* 8462741: 1-12
- Tuck KL, Hayball PJ. 2002. Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13(11):636-644
- Ustadi, Radiati LE, Thohari I. 2017. Komponen bioaktif pada madu karet (*Hevea brasiliensis*) madu kaliandra (*Calliandra calothyrsus*) dan madu randu (*Ceiba pentandra*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak* 12(2): 97-102
- Uthia R, Dharma S, Dewita FM. 2016. Pengaruh pemberian campuran jahe merah, bawang putih, cuka anggur dan madu terhadap kadar kolesterol total dan histopatologis pembuluh aorta jantung tikus putih jantan. *Jurnal Farmasi Higea* 8(2):151-162
- Uthurry CA, Hevia D, Gomez-Cordoves C. 2011. Role of honey polyphenols in health. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 3 (4): 141 - 159
- Udonkang MI, Ubi KA, Inyang IJ. 2018. Honey as fixative and safer substitute for formalin in histology. *Int J Med Lab Res.* 3(3):11-17
- Vallianou NG, Gounari P, Skourtis A, Panagos J, Kazazis C. 2014. Honey and its anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-oxidant properties. *Gen Med (Los Angel)* 2:132-136
- Vazquez A, Rodriguez ES, Vargas F, Molina SM, Romero M, Calvo JAE, Vilchez P, Jaramilo S, Garcia LO, Pancorbo AC, Torre RDL, Fito M, Covas MI, Victoria EMD, Mesa MD. 2019. Cardioprotective effect of a virgin olive oil enriched with bioactive compounds in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients* 11(8): 1728-1738
- Vázquez CMP, Netto RSM, Barbosa KBF, de Moura TR, de Almeida RP, Duthie MS, de Jesus AR. 2014. Revisión micronutrients influencing the immune response in leprosy. *Nutr Hosp.* 29(1):26-36

- Vincent A, Trianto HF, Ilmiawan MI. 2014. Pengaruh pajanan monosodium glutamat terhadap histologi duodenum tikus putih. *JKI* 2(3): 166-172
- Viola P, Viola M. 2009. Virgin olive oil as a fundamental nutritional component & skin protector, *Clin. Dermatol.* 27: 159-165.
- Virruso C, Accardi G, Romano CG, Candore G, Vasto S, Caruso C. 2014. Nutraceutical properties of extra virgin olive oil: nature remedy for age related disease ?. *Rejuvenation Res* 17(2): 217-220
- Vossen P. 2007. Olive oil: history, production, & characteristics of the world's classic oils. *Hortscience* 42(5): 2093-2100
- Ward J, Clarke R, Linden R. 2017. At a glance, fisiologi. Jakarta : Penerbit Erlangga
- Warsito. 2014. Antibodi dan imunohistokimia. Yogyakarta : Rapha Publishing
- Waterman E, Lockwood B. 2007. Active component and clinical applications. *Alternative Medicine Review* 12(4): 331-342
- Weir DM. 1990. Imunologi. Jakarta : Binarupa Aksara
- WHO & FAO. 2015. Standard for olive oils & olive pomace oils codex stan 33-1981. International Food Standard 2015
- Wibowo BA, Rivai M, Tasripan. 2016. Alat uji kualitas madu menggunakan polarimeter dan sensor warna. *Jurnal Teknis ITS* 5 (1): 28–33.
- Wibowo S, Komarayati S. 2015. Sifat fisiko kimia minyak cupresus (*Cupressus benthamii*) asal Aek Nauli, Parapat Sumatera Utara (physico-chemical properties of cupresuss benthamii oil from Aek Nauli, Parapat North Sumatra). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan* 33(2): 93-103
- Wiedosari E. 2007. Peranan imunomodulator alami (*Aloe vera*) dalam sistem imunitas seluler dan humoral. *Wartazoa* 17(4): 165-171
- Wijayanthi KKD, Berata IK, Samsuri, Sudira IW. 2017. Histopatologi usus halus tikus putih jantan yang diberikan deksametason dan vitamin E. *Buletin Veteriner Udayana* 9(1): 47-53
- Winarno F.G. 2008. Kimia pangan dan gizi. Bogor : M-Brio Press
- Winarno FG dan Winarno W. 2017. Nikrobioma usus bagi kesehatan tubuh : Peran probiotik, prebiotik, dan para probiotik. Jakarta : Penerbit Gramedia Pustaka Utama.
- Winarti S. 2010. Makanan fungsional. Yogyakarta : Graha Ilmu
- Wresdiyati T, Setiorini Y, Laila SR, Arief II, dan Astawan M. 2013. Probiotik lokal meningkatkan kandungan IgA usus halus tikus yang diinfeksi *Enteropathogenic E. Coli* (EPEC): studi imunohistokimia. *Jurnal Kedokteran Hewan* 7(2): 109-115
- Wulandari DD. 2017. Kualitas madu (keasaman, kadar air, dan kadar gula pereduksi) berdasarkan perbedaan suhu penyimpanan. *Jurnal Kimia Riset* 2(1): 16 - 22
- Yaqqob P, Newsholme EA, Calder PC. 1994. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology* 82: 603-610
- Yaqoob P, Calder P. 1995. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell Immunol* 163(1): 120-128
- Yuniastuti A, Kamilatussainah, Sasi FA. 2015. Pengaruh pemberian madu kelengkeng terhadap aktivitas enzim superoxide dismutase dan katalase pada tikus yang diinduksi Pb asetat. Prosiding SNST ke-6 Universitas Wahid Hasyim Semarang

- Yuliati. 2017. Uji efektivitas larutan madu sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode disk diffusion. *Jurnal Profesi Medika* 11(1): 10-22
- Yusibani E, Hazmi NA, Yufita E. 2017. Pengukuran viskositas beberapa produk minyak goreng kelapa sawit setelah pemanasan. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pertanian Indonesia* 9(1): 28-32
- Zainuddin, Masyitha D, Fitriani, Sarayulis, Jalaluddin M, Rahmi E, Nasution I. 2016. Gambaran histologi kelenjar intestinal pada duodenum ayam kampung (*Gallus domesticus*), merpati (*Columba domesticus*) dan bebek. *Jurnal Medika Veterinaria* 10(1): 9-11
- Zalizar L, Satrija F, Tiuria R, Astuti DA. 2006. Dampak infeksi ascaridia galli terhadap gambaran histopatologi dan luas permukaan vili usus halus serta penurunan bobot hidup starter. *JITV* 11(3): 222-228.
- Zampa A, Silvi S, Servili M, Montedoro G, Orpianesi C, Cresci A. 2006. In vitro modulatory effects of colonic microflora by olive oil iridoids. *Microbial Ecology in Health and Disease* 18: 147-153.
- Zamuz S, Purriños L, Tomasevic I, Domínguez R, Brnčić M, Barba FJ, Lorenzo JM. 2020. Quality Parameters of the Commercial Olive Oils Manufactured with Cultivars Grown in Galicia (NW Spain). *Foods* 9, 427: 1-13

LAMPIRAN

Lampiran 1 Dokumentasi penelitian



Dokumentasi 1 Masa Aklimasi



Dokumentasi 2 Proses Pengambilan Darah



Dokumentasi 3 Proses Pengambilan Cairan Peritoneal dan Proses Histologi Jaringan Usus Halus

Lampiran 2 Surat persetujuan Etik

13



Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi
Institut Pertanian Bogor
Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
KOMISI ETIK HEWAN
 Gedung Andi Hakim Nasoetion Lantai 5, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
 Telepon (021) 8622093, 8622642 Facsimile (0251) 8622323
 email : lppm@apps.ipb.ac.id, komisietikhewanipb@gmail.com, <http://lppm.ipb.ac.id>

PERSETUJUAN ATAS PERLAKUAN ETIK

Judul Penelitian : **Pengaruh Campuran Minyak Zaitun Extra Virgin dan Madu Terhadap Status Imun dan Kesehatan Pencernaan pada Tikus (*Rattus Novergicus*) Jantan Galur Sparague Dawley**

Peneliti Utama: Retno Mardhiati
 Fakultas Ekologi Manusia
 Institut Pertanian Bogor

Bahan Review:

1. Form Aplikasi ACUC
2. Protokol Penelitian
3. Surat Tanggapan Peneliti kepada ACUC

Dengan memperhatikan:

1. Spesies dan Relevansi Hewan Model
2. Justifikasi jumlah hewan yang digunakan
3. Prosedur Penelitian pada hewan coba

Kami menyatakan bahwa prosedur dalam penelitian ini memenuhi persyaratan etik dan memperhatikan kesejahteraan hewan coba yang digunakan.

Maka, kami memberikan *Ethical Approval* pada penelitian ini.

Nomor: 142 – 2019 IPB

Bogor, 3 Mei 2019

Ketua Komisi



Prof. Dr. drh. Dondin Sajuthi, M.ST
 NIP. 19541027 197603 1 001

Catatan:
 Ijin Etik ini dapat dicabut sewaktu-waktu apabila tidak sesuai dengan prosedur yang telah disetujui.
 Tembusan Yth:
 Kepala LPPM (sebagai laporan)

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Jakarta pada tanggal 19 Maret 1974, anak ke-2 dari tiga bersaudara. Ayahanda penulis bernama Werku Nirhawa Adiwiryo (alm) dan Ibunda penulis bernama Husnal Hayati. Pendidikan S1 Sarjana Kesehatan Masyarakat Universitas Indonesia (Lulus tahun 1997), Pendidikan S2 Pascasarjana Ilmu Kesehatan Masyarakat Universitas Indonesia (Lulus tahun 2001), dan berkesempatan melanjutkan S3 Ilmu Gizi di Fakultas Ekologi Manusia Institut Pertanian Bogor tahun 2013.

Penulis bekerja sebagai Dosen Program Studi Kesehatan Masyarakat, Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Prof Dr Hamka, Jakarta, sejak tahun 1998. Penulis menikah dengan Rikza Maulan, Lc., M.Ag dan telah memiliki dua remaja putri bernama Nadiyah Robbaniyah dan Azka Nabila.

Salah satu artikel ilmiah dari disertasi ini berjudul “Karateristik dan Beberapa Kandungan Zat Gizi pada Lima Sampel Madu yang Beredar di Supermarket” sudah publish di Jurnal Gizi Indonesia (Sinta 2) Volume 43 Nomor 1, halaman 49-56 (doi: 10.36457/giziindo.v%vi%i.507/ URL: https://persagi.org/ejournal/index.php/Gizi_Indon/article/view/507/250). Artikel berjudul “*The Effect of Extra Virgin Olive Oil and Honey Mixture on Macrophage Activity and Capacity of Rattus novergicus, Sprague Dawley Strain*” dalam status *under review* pada *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture-JITAA* (Q3-Scopus).