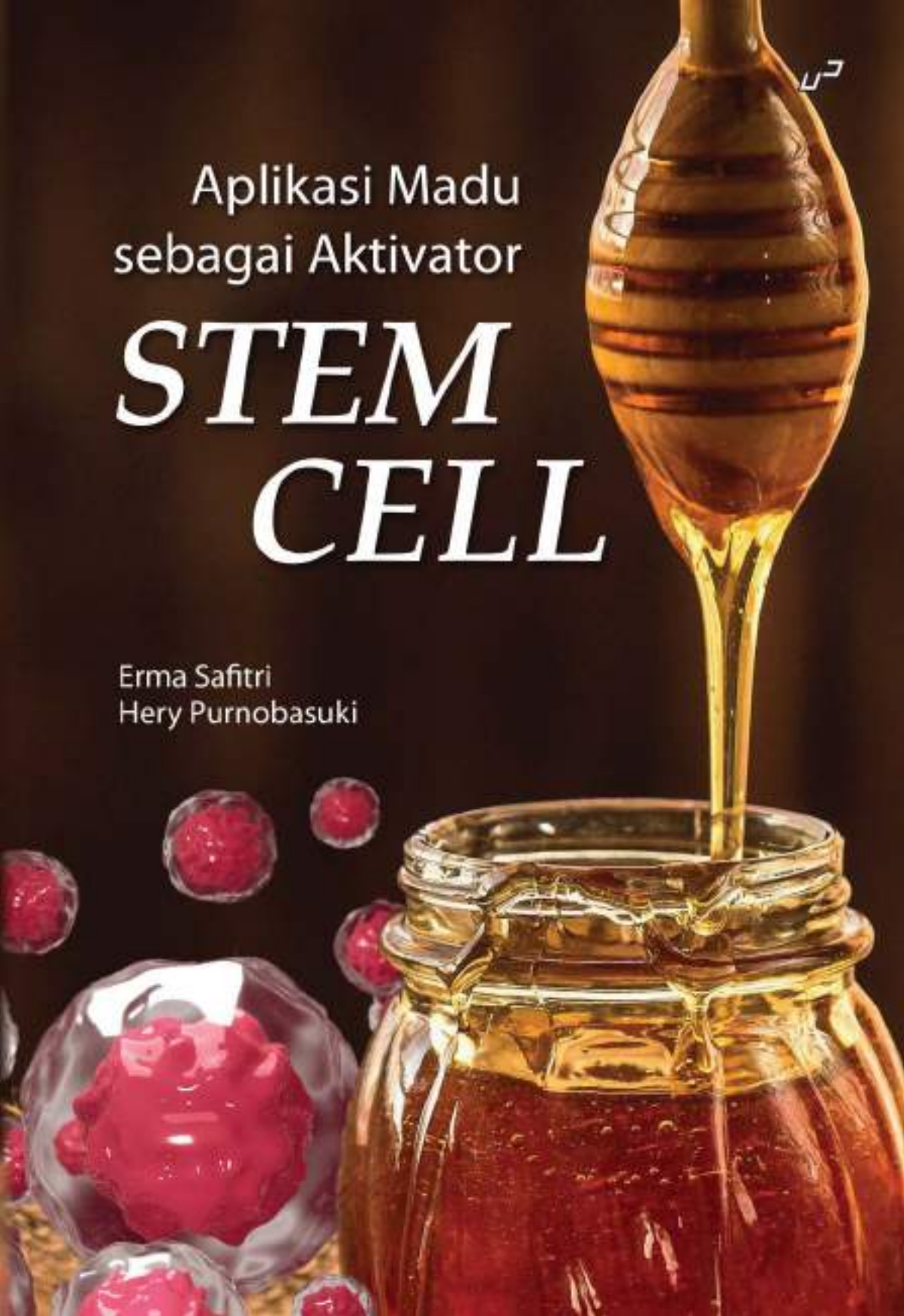
Aplikasi Madu sebagai Aktivator

STEM CELL

Erma Safitri
Hery Purnobasuki



Aplikasi Madu
sebagai Aktivator

STEM CELL

PASAL 113 UNDANG-UNDANG NOMOR 28 TAHUN 2014 TENTANG HAK CIPTA

(1) Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).

(2) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

(3) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).

(4) Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

Aplikasi Madu
sebagai Aktivator

STEM CELL

Erma Safitri
Hery Purnobasuki

Airlangga University Press

Aplikasi Madu sebagai Aktivator *STEM CELL*

Erma Safitri dan Hery Purnobasuki

ISBN 978-602-473-830-3 (PDF)

© 2022 Penerbit **Airlangga University Press**

Anggota IKAPI dan APPTI Jawa Timur
Kampus C Unair, Mulyorejo Surabaya 60115
Telp. (031) 5992246, 5992247 Fax. (031) 5992248
E-mail: adm@aup.unair.ac.id

Editor Naskah (Anas Abadi)
Layout (Akhmad Riyanto)
Cover (Roy Wahyudi)
AUP (1187/04.22)

Hak Cipta dilindungi oleh undang-undang.
Dilarang mengutip dan/atau memperbanyak tanpa izin tertulis
dari Penerbit sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apa pun.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirrobbilalamin, berkat limpahan rahmat dan karunia Allah Swt., buku referensi dengan judul "APLIKASI MADU SEBAGAI AKTIVATOR *STEM CELL*" yang ditulis oleh Dr. Erma Safitri, DVM., M.Si. dan Prof. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D., telah terselesaikan dengan baik. Sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, saya mengapresiasi atas diterbitkanya buku ini, yang mendukung terhadap perkembangan dan khazanah serta keilmuan di bidang *stem cell*, perlebahan, dan reproduksi veteriner.

Selain itu, apresiasi saya berikan kepada Dr. Erma Safitri, DVM., M.Si sebagai dosen Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang juga pernah menjabat sebagai Ketua Satuan Penjaminan Mutu FKH UNAIR (2017–2020) dan sebagai Koordinator Program Studi (KPS) S-2 Biologi Reproduki (2020–sekarang). Prestasi dan kiprahnya pada Tri Dharma Perguruan tinggi salah satunya dengan menerbitkan buku ini. Setelah sebelumnya beberapa buku referensi maupun buku ajar yang telah diterbitkan, selain juga publikasi artikel ilmiah terindeks Scopus dengan *h-index* 5, yang

bersangkutan telah berpengalaman menjadi editor pada beberapa Jurnal Internasional terindeks Scopus.

Apresiasi juga saya berikan kepada Prof. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D., di tengah kesibukkan beliau sebagai Ketua Lembaga Inovasi, Pengembang Jurnal & Hak Kekayaan Intelektual (LIPJPHKI) Universitas Airlangga (2020–sekarang), berkenan berkolaborasi dalam penulisan buku ini. Prof. Hery Purnobasuki memiliki *h*-index Scopus 6 dan lebih dari 60 *scientific papper*, 5 buku, dan proyek disajikan atau diterbitkan. Beliau adalah seorang ahli yang diakui secara Internasional di bidang struktur dan pengembangan tanaman terutama pada tanaman mangrove dan menjadi editor pada beberapa Jurnal Internasional terindeks Scopus.

Dari sisi Pendidikan Tinggi tentunya buku ini akan menjadi bermanfaat bagi seluruh sivitas akademika, peneliti, mahasiswa, divisi Reproduksi Veteriner, dan juga penggiat perlebahan dalam upaya untuk memperkuat pengetahuan di bidang kajian *stem cell*, perlebahan, dan reproduksi veteriner.

Akhir kata, harapan saya sebagai Pimpinan Fakultas, ke depan terkait dengan kiprah, tindak lanjut, dan pengembangan keilmuan untuk tetap semangat dan terus menulis serta menghasilkan karya-karya inovatif berikutnya yang bermanfaat untuk kemaslahatan umat.

Surabaya, April 2022

Prof. Dr. Mirni Lamid, DVM., MP.
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

PRAKATA

Segala puja dan puji ke Hadirat Allah Swt., Tuhan sekalian alam atas ridho-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan buku berjudul "APLIKASI MADU SEBAGAI AKTIVATOR *STEM CELL*" dengan lancar dan sukses.

Karya ini ditulis sebagai sarana berbagi dan sebagai sumber pengetahuan ilmiah, praktis, dan menyenangkan dalam membuka cakrawala baru tentang upaya mobilisasi dan diferensiasi *stem cells* melalui pemanfaatan madu pada kasus terjadinya degenerasi berbagai jaringan tubuh, seperti organ reproduksi (testis dan ovarium), selain juga sebagai antioksidan, antiosteoporosis, dan antibakterial. Keberhasilan buku ini tak akan terwujud tanpa adanya dukungan berbagai pihak yang kompeten. Oleh karena itu, penulis dengan tulus ikhlas menghaturkan penghargaan yang setinggi-tingginya dan berterima kasih atas semua kontribusi, dukungan, dan doanya.

Penghargaan yang setinggi-tingginya kami sampaikan kepada Kementerian Riset dan Teknologi Pendidikan Tinggi (KEMENRISTEKDIKTI) yang telah memberikan dukungan pendanaan pada beberapa penelitian, sehingga

bisa menjadi sumber referensi yang dapat dituangkan dalam buku ini, Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi (LPI) Universitas Airlangga, Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs., M.Si., Ph.D., yang berkenan menyetujui beberapa proposal riset antara tahun 2014–2020, Prof. Dr. Mirni Lamid, Drh., M.P. sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang selalu mendukung terbitnya buku ini, Prof. Dr. R. Heru Prasetyo, dr., MS., Sp.ParK. (Rohimahulloh) yang telah mengajarkan bagaimana trik-trik menulis buku referensi, Drh. Akhmad Afifudin Al-Anshori mahasiswa S-2 Biologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang berkenan membantu melengkapi gambar-gambar pada buku ini.

Informasi yang dijelaskan di setiap bab dalam buku ini diharapkan dapat menjadi jendela pengetahuan dan memberikan kemanfaatan secara ilmiah dan praktis bagi para pembaca dari semua kalangan masyarakat. Informasi dari buku ini diarahkan untuk membuka wawasan baru tentang pemanfaatan madu sebagai aktivator *stem cell* dalam menangani masalah kesehatan. Selain itu, diharapkan dapat dijadikan inspirasi bagi peneliti untuk dapat mengeksplorasi lebih dalam lagi, baik secara molekuler maupun aplikasi penggunaannya dalam membantu kehidupan manusia dan pelestarian produk alam seperti halnya madu.

Buku ini tentu tidak luput dari kesalahan dan kekurangan. Oleh karena itu, jika ditemukan suatu kesalahan, penulis menghaturkan maaf yang sedalam-dalamnya. Semoga diberi kesempatan untuk memperbaiki kesalahan. Dukungan berupa kritik dan saran akan selalu penulis terima dengan lapang dada untuk perbaikan di masa yang akan datang.

Surabaya, April 2022

Penulis

DAFTAR ISI

Kata Pengantar v
Prakata vii
Daftar Tabel xii
Daftar Gambar xiv

BAB 1
PENDAHULUAN 1

BAB 2
KLASIFIKASI DAN JENIS LEBAH 9

KLASIFIKASI LEBAH 9
JENIS LEBAH 16
1. Lebah Hutan (*Apis dorsata*) 17
2. Lebah *Apis mellifera* 24
3. Lebah Lokal (*Apis cerana*) 27
4. Lebah Kerdil (*Apis florea*) 28

5. Lebah Kecil (*Apis andreniformis*) 29
6. Lebah Merah (*Apis koschevnikovi*) 30
7. Lebah Gunung (*Apis nuluensis*) 31
8. Lebah Lokal Sulawesi (*Apis nigrocincta*) 31
9. Lebah Tanpa Sengat (*Trigona* spp.) 32
DAFTAR PUSTAKA 34

BAB 3
KARAKTERISTIK & JENIS *BEE PRODUCT* 39

KARAKTERISTIK 39
JENIS *BEE PRODUCT* 41
1. Madu 42
2. Propolis 75
3. *Bee Pollen* (Tepung Sari) 80
4. Roti Lebah (*Bee Bread*) 85
5. *Royal Jelly* 87
6. Lilin Lebah (*Bee Wax*) 92
7. *Bee Venom* (*Apitoxin*) 96
DAFTAR PUSTAKA 101

BAB 4
STEM CELL 105

PENGERTIAN *STEM CELL* 105
BIOTEKNOLOGI ABAD MILENIAL 107
SPESIFIKASI 110
TIPE *STEM CELLS* 112
1. *Stem Cells* Dewasa (*Adult Stem Cell*/ASC) 112
2. *Stem Cells* Embrionik (*Embrionic Stem Cell*/ESC) 115
SUMBER ORIGINALITAS 116
1. *Hematopoietic Stem Cells* 118
2. *Mesenchymal Stem Cells* 119

NICHE DARI *STEM CELLS* 129
Hypoxic Niche 130
LONG TERM MAINTENANCE QUIESCENCE CELLS 134
1. *Slow Proliferation* 135
2. Kadar ROS Intraseluler 136
3. *Undifferentiation* 140
4. *Pluripotency* 142
INOVASI KE DEPAN 146
DAFTAR PUSTAKA 147

BAB 5
APLIKASI MADU SEBAGAI AKTIVATOR *STEM CELLS* 155
APLIKASI MADU PADA BIDANG REPRODUKSI 155
1. Aplikasi Madu pada Reproduksi *Female* 156
2. Aplikasi Madu pada Reproduksi *Male* 180
APLIKASI MADU PADA BIDANG YANG LAIN 207
1. Madu sebagai Antioksidan 207
2. Madu sebagai Antiosteoporosis 212
DAFTAR PUSTAKA 226

INDEKS 241
GLOSARIUM 247
TENTANG PENULIS 259

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Senyawa bioaktif fitokimia yang terkandung pada madu hutan (*Apis dorsata*) 24
Tabel 3.1 Komposisi Nutrisi Madu 44
Tabel 3.2 Komposisi Madu dan Nilai Komposisi dalam g/100g 50
Tabel 3.3 Komposisi Mineral dalam Madu..... 57
Tabel 3.4 Terbentuknya Aroma Madu..... 58
Tabel 3.5 Komposisi Madu Menurut Beberapa Sumber 59
Tabel 3.6 Mutu Madu Berdasarkan SNI No: 01-3545-1994 72
Tabel 3.7 Hasil Uji Laboratorium terkait Analisis Madu di Indonesia ... 73
Tabel 3.8 Kandungan Logam Berat Sampel Madu di Indonesia. 74
Tabel 3.9 Komponen Propolis..... 79
Tabel 3.10 Berbagai jenis propolis dan senyawa yang bertanggung jawab pada aktivitas biologisnya..... 80
Tabel 3.11 Perbandingan Kadar Protein antara Tepung Sari dan Makanan Protein Lengkap (100 gram porsi makan) 83
Tabel 3.12 Komposisi Kandungan dari *Bee Pollen* 84
Tabel 3.13 Komposisi dari *Bee Pollen* (Berat Kering) 84

Tabel 3.14 Kandungan Mineral dari *Bee Pollen*..... 84
Tabel 3.15 Jumlah Vitamin B kompleks yang ditemukan dalam 1 g serbuk 85
Tabel 3.16 Komposisi Produk Lebah setelah Proses Pengeringan..... 87
Tabel 3.17 Komponen dari *Royal Jelly* (mg/g berat kering) 91
Tabel 3.18 Vitamin pada *Royal Jelly*..... 92
Tabel 3.19 Karakterisasi Fisikokimia dari Lilin Lebah..... 94
Tabel 5.1 Rerata ekspresi G-CSF, VEGF, and GDF-9 dengan pewarnaan jumlah *Folikel de Graaf* 162
Tabel 5.2 Rerata Persentase CD34 dan CD45 dengan *flocytometry*, ekspresi skor Hsp70, PGE2, dan GDF-9 dengan metode imunohistokimia 175
Tabel 5.3 Persentase dari CD34 dan CD45 dengan f*lowcytometry* dan ekspresi SSCs pada jaringan testis dari *mice* pada beberapa perlakuan (rataan ± SD, %) 186
Tabel 5.4 Skor dari ekspresi testosterone pada testis *rat* dengan metode IHC pada beberapa perlakuan 193
Tabel 5.5 *Libido test* didasarkan pada tiga kategori dari libido..... 193
Tabel 5.6 Jumlah sel Leydig, *spermatogonia, spermatocyte primary-secondary,* dan *spermatid* pada beberapa perlakuan..... 203
Tabel 5.7 Skor dari HSP70 dan PGE2 pada beberapa perlakuan..... 203
Tabel 5.8 Kandungan Antioksidan pada Beberapa Madu 210
Tabel 5.9 Jenis senyawa flavonoid yang menunjukkan aktivitas ALP dan AChE..... 219
Tabel 5.10 Senyawa Bioaktif pada Madu..... 224

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Pembagian Segmen Anatomi Lebah 10
Gambar 2.2 Larva lebah hidup dalam *Royal Jelly*..... 13
Gambar 2.3 Lebah pekerja yang menjaga panas pada pupa..... 14
Gambar 2.4 Lebah ratu yang diberi makan secara eksklusif dengan *Royal Jelly* dan dikelilingi oleh lebah pekerja untuk diberikan pelayanan dan perawatan khusus seumur hidup..... 15
Gambar 2.5 Lebah hutan (*Apis dorsata*)..... 18
Gambar 2.6 Lebah *Apis dorsata* mencari nektar pada bunga *Grewia eriocarpa*..... 19
Gambar 2.7 Lebah hutan (*Apis dorsata*) membentuk satu koloni..... 19
Gambar 2.6 Lebah *Apis dorsata* mencari nektar pada bunga *Grewia eriocarpa*..... 19
Gambar 2.8 Persebaran lebah *Apis dorsata* dan *Apis laboriosa* 20
Gambar 2.9 Lebah *Apis dorsata* pencari nektar..... 22
Gambar 2.10 Grafik aktivitas antioksidan dari tiga jenis madu: Sumatera (SM1), Kalimantan Barat (KB1), dan Sumbawa (SB1)..... 23

Gambar 2.11 Persebaran *Apis mellifera* 26
Gambar 2.12 Lebah *Apis cerana* 27
Gambar 2.13 Lebah *Apis florea* 29
Gambar 2.14 Lebah *Apis andreniformis* 30
Gambar 2.15 Lebah *Apis konschevnikovi* 30
Gambar 2.17 Lebah *Apis nigrocincta* 31
Gambar 2.16 Lebah *Apis nuluensis* 31
Gambar 2.18 *Comparative* berbagai spesies *Apis* 32
Gambar 2.19 Lebah *Trigona* spp. 34
Gambar 3.1 Propolis 76
Gambar 3.2 *Bee Pollen* 81
Gambar 3.3 *Bee Bread* di dalam *Honeycomb* 85
Gambar 3.4 *Royal Jelly* Mengelilingi Larva Lebah Ratu 88
Gambar 3.5 Lebah mengeluarkan *Bee Wax*: lilin muncul dari kelenjar perut lebah dan memadat menjadi platelet kecil 93
Gambar 3.6 Proses Terapi Apitoxin (*Bee Venom*) 97
Gambar 4.1 Klasifikasi *Stem Cell* Berdasar Originalitas 117
Gambar 4.2 Diferensiasi *Multipotent* dari *Mesenchymal Stem Cell* 120
Gambar 4.3 Transdiferensiasi *Mesechymal Stem Cell* 121
Gambar 4.4 Sel mononuklear (*stem cells*) berada di atas larutan *ficoll hypaque* 125
Gambar 4.5 Peralatan *Flowcytometry* 128
Gambar 4.6 Fase Siklus Pembelahan Sel dan Posisi *Quiescence Cells* 131
Gambar 4.7 Hipoksia *Chamber* di dalam inkubator CO_2 5% 135
Gambar 5.1 *Homing* dari *stem cells* didasarkan pada adanya ekspresi dari *vascular endothelial growth factor* (VEGF) pada jaringan ovarium tikus dengan metode immunohistokimia 161
Gambar 5.2 *Homing* dari *stem cells* didasarkan pada ekspresi *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) pada jaringan *ovary* tikus dengan metode immunohistokimia 163
Gambar 5.3 Ekspresi dari *growth differentiation factor*-9 (GDF-9) pada jaringan *ovary* tikus ditunjukkan dengan metode pewarnaan immunohistokimia pada beberapa perlakuan 164

Gambar 5.4 Regenerasi dari jaringan *ovary* diamati secara mikroskopis dengan pewarnaan *hematoxylin and eosin* (HE) pada jaringan ovary tikus pada beberapa perlakuan 167
Gambar 5.5 Analisis *Flowcytometry* dari mobilisasi *stem cell* endogen 174
Gambar 5.6 GDF-9 *expression* pada jaringan *ovary* tikus menggunakan metode immunohistokimia pada beberapa perlakuan 176
Gambar 5.7 Regenerasi dari jaringan ovarium tikus melalui metode *immunohistopathology anatomy* (HPA) dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE) pada beberapa perlakuan..... 178
Gambar 5.8 Ekspresi SSCs pada jaringan testis *mice* dengan teknik immunohistokimia 186
Gambar 5.9 Regenerasi *seminiferous tubule* jaringan *testicular* secara mikroskopis dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE) pada jaringan testis *mice* pada beberapa perlakuan..... 187
Gambar 5.10 Analisis immunohistokimia dari sinyal respons imun jaringan testikular didasarkan pada ekspresi Testosterone (*brown chromogen*) pada beberapa perlakuan dengan pembesaran 200× (Nikkon Microscope H600L; DS Fi2 digital camera 300 megapixel) 194
Gambar 5.11 Identifikasi dari jaringan tubulus seminiferous dan sel Leydig dari testikuler tikus melalui metode histopatologi anatomi (HPA) dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE) pada beberapa perlakuan..... 201
Gambar 5.12 Kromatografi Flavonoid pada Madu..... 214
Gambar 5.13 Jalur transduksi sinyal dalam fungsi regulasi osteoblas modifikasi..... 216
Gambar 5.14 Regulasi osteoblas oleh polifenol modifikasi..... 218

1

PENDAHULUAN

Kehidupan manusia sangat ditopang oleh keberadaan sel-sel yang menyusun tubuhnya. Ada banyak jenis sel di dalam tubuh yang bekerja secara seksama agar semua jaringan dan organ tubuh dapat berfungsi dengan baik. Namun apakah anda pernah mendengar tentang *stem cells* (sel punca)? Pada dunia medis kedokteran, sel punca saat ini menjadi trending topik yang hangat dibicarakan, hal ini dikarenakan sel punca mempunyai kemampuan yang 'spesial' sehingga dapat menjadi terobosan baru dalam pengobatan berbagai penyakit dan gangguan pada tubuh manusia.

Stem cells pada abad milenial dan ke depan merupakan suatu fenomena yang sangat menakjubkan di bidang bioteknologi dan kedokteran medis. *Stem cell* mempunyai potensi yang sangat luar biasa dan memberikan harapan yang sangat meyakinkan bagi penderita dengan tingkatan "tiada harapan" untuk kesembuhan terutama pada kasus penyakit degeneratif yang menyebabkan kerusakan pada organ, seperti Alzheimer[1], stroke[2], Parkinson[3], diabetes melitus[4], HIV[5], maupun infark miokard[6] dan malnutrisi berat[7] yang

berakibat pada gangguan reproduksi seperti *testis failure*[7–9] ataupun *ovary failure*.[10–11]

Berdasarkan eksistensinya, *stem cells* telah menjadi trending dan topik utama pembicaraan banyak *researcher* dan *scientist*, ahli di bidang medis bahkan orang awam di seluruh penjuru dunia, dikarenakan *stem cell* sangat dipercaya menjadi jalan keluar bagi penyembuhan dari berbagai penyakit degeneratif. Penyebab penyakit degeneratif telah diketahui berakibat pada kerusakan sel sebagai penyusun jaringan atau organ, yang berakibat tidak lagi berfungsi jaringan atau organ tersebut sesuai dengan kebutuhan tubuh. Kerusakan sel pada penderita penyakit degeneratif adalah bersifat *irreversible*, hal ini menyebabkan obat-obatan yang tersedia pada saat ini hanya dapat memperlambat atau mencegah terjadinya kerusakan yang lebih meluas yang tidak dapat diperbaiki lagi. Selama ini penggantian komponen organ atau jaringan yang rusak tersebut dengan organ atau jaringan baru yang masih berfungsi optimal merupakan jalan satu-satunya yang harus ditempuh. Berdasarkan hal inilah para ahli berpikir bahwa di masa yang akan datang *stem cell* dapat dijadikan tumpuan terapi di bidang kedokteran.[3,9,12,13]

Namun demikian, dikarenakan program terapi transplantasi *stem cell* harus dilakukan beberapa kali pengulangan (*booster*) sebanyak 6–10 kali tergantung tingkat keparahan penyakit agar dapat dicapai kesembuhan, maka hal ini menyebabkan seseorang berpikir beberapa kali untuk menjalani terapi ini. Selain hal tersebut, tentu saja menyebabkan mahalnya biaya terapi dikarenakan terapi transplantasi *stem cell* yang tidak dapat dilakukan dengan satu kali transplantasi.

Oleh karena itu, diperlukan suatu inovasi dalam upaya peningkatan jumlah *stem cell* yang berasal dari dalam tubuh sendiri. Peningkatan ini dikenal juga dengan istilah eksplorasi *stem cell* endogen. Peningkatan ini dilakukan dengan jalan menginisiasi *stem cell* endogen agar teraktivasi. Proses eksplorasi *stem cell* endogen yang dari dalam tubuh sendiri ini dikenal dengan istilah aktivasi *endogenous stem cell*. Proses aktivasi *endogenous stem cell* dari dalam tubuh ini diupayakan agar didapatkan jumlah *stem cell* yang lebih banyak lagi jika dibandingkan tanpa pemberian bahan aktivasi *stem cell* dari

luar tubuh, salah satunya melalui pemberian bahan alam atau sintetik secara per oral seperti madu.

Eksplorasi *endogenous stem cell* ini dapat dilakukan berdasarkan terjadinya mobilisasi dan diferensiasi *stem cell* yang bersumber dari tubuh sendiri. Eksplorasi *endogenous stem cell* ini dapat dilakukan melalui berbagai bahan, baik bahan yang bersifat alami maupun sintetik, salah satu bahan alami adalah berasal dari *bee product*, salah satunya seperti madu. Melalui pemanfaatan madu ini diharapkan akan terjadi autoregenerasi sel dari jaringan yang mengalami kerusakan (degeneratif) sehingga akan terjadi perbaikan (regeneratif) pada jaringan tersebut. Harapan terjadinya autoregenerasi sel penyusun jaringan ini adalah melalui mobilisasi *stem cells* dari tubuh sendiri (*stem cell endogen*) yang dapat terjadi dengan cepat dan dalam jumlah yang cukup disertai proses diferensiasi yang optimal sehingga terjadi regenerasi pada sel yang telah mengalami degenerasi (kerusakan).

Salah satu aspek penting dari sel adalah kemampuan memperbanyak diri atau berproliferasi. Dalam meningkatkan proliferasi sel, diperlukan energi yang cukup, salah satunya adalah dari sumber energi berupa gula. Kebutuhan gula dalam proses metabolisme tubuh juga sangat berperan penting. Banyak alternatif dalam mendapatkan sumber energi gula, salah satu sumbernya adalah madu. Madu dapat menjadi pengganti suplemen tambahan pada berbagai proses kultur sel hewan maupun tumbuhan. Stimulasi proliferasi sel yang diinduksi oleh madu sepertinya bukan karena kandungan gulanya saja, tetapi juga karena zat lain yang terkandung di dalam madu.[14] Protein yang terkandung dalam *bee product* seperti madu dan *royal jelly* juga memiliki kemampuan untuk meningkatkan proliferasi sel dan mencegah sel dari apoptosis sehingga merupakan media yang baik untuk kultur sel punca.[15,16]

Madu suatu bahan alam yang dihasilkan lebah merupakan sumber nutrisi[17,18], mempunyai potensi sebagai antibakteri[19], antiosteoporosis[20], dan antioksidan.[21] Antioksidan merupakan substansi penting yang diperlukan oleh tubuh dalam upaya membantu dan melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dengan meredam efek negatif dari senyawa ini. Namun, hal ini juga tergantung dari pola hidup dan pola makan yang benar. Konsumsi

antioksidan yang cukup dapat mengurangi terjadinya berbagai risiko penyakit seperti kanker, kardiovaskuler, katarak, masalah pencernaan, serta penyakit degeneratif yang lain.[7] Pemberian madu diketahui dapat memperbaiki sistem pencernaan[18] dan menunjukkan hasil baik pada pengobatan penderita diare[10] serta gangguan reproduksi.[7-11]

Materi dari buku ini diambil dari berbagai referensi ilmiah yang terkait, di antaranya juga hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan oleh penulis (dalam kurun waktu antara tahun 2014–2020), sehingga bisa menjadi tambahan wawasan yang lebih *up to date* terkait beberapa aspek kajian yang dieksplorasi yang ditulis dalam buku ini, di antaranya:

1. Upaya Mobilisasi dan Diferensiasi *Stem Cells* melalui Pemanfaatan Madu pada Kasus Degenerasi Ovarium baik berupa Regenerasi Folikel, Ekspresi CD 34+, HSP90β, VEGF-1, dan GDF-9.
2. Kasus Degeneratif Testis Berbasis Mobilisasi, Homing, dan Diferensiasi *Stem Cells* pada Hewan Coba Mencit melalui Pemanfaatan Madu melalui terjadinya Auto-Regenerasi Tubulus Seminiferus.
3. Analisis Histopatologi dan Imunohistokimia Hsp70, IgA, dan PGE2 Mukosa Usus Halus dan Sel Jaringan Hati pada Pengobatan Penderita Kurang Energi Protein melalui Pemanfaatan Madu.
4. Aplikasi program *Induce Purypotency Stem Cells* (iPS) melalui *Hypoxia Precondition* yang Dikombinasi *Bee Product* sebagai Inovasi Berbasis *Paracrine Effect*, dan *Homing System* pada Terapi Berbagai Kerusakan Jaringan Akibat Kondisi *Protein Energy Malnutrition* (PEM) (2019–2021)

Untuk mempermudah penjelasan dan alur ilmiah terkait hubungan, peran dan manfaat dari *stem cell* serta madu, maka pada buku ini akan dibahas dan dibagi dalam beberapa bab. Di mana di setiap bab akan diungkapkan secara rinci dan disertai ilustrasi terkait dari acuan ilmiah yang dapat dipertanggungjawabkan kebenarannya sehingga pembaca dapat menelusuri kembali dari pustaka yang diacu.

Pada Bab 2 merupakan pemaparan tentang klasifikasi dan jenis dari lebah, seperti lebah *Apis dorsata, Apis mellifera, Apis cerana,* dan *Trigona spp*., baik yang berada di Indonesia maupun di seluruh dunia. Pada bab ini juga dipaparkan secara rinci terkait spesifikasi dari beberapa jenis lebah tersebut, termasuk tipe lebah dalam satu koloni. Selain itu, juga dipaparkan tentang produk utama yang dihasilkan dan keberadaan lebah tersebut di seluruh dunia.

Bab 3 merupakan pemaparan tentang Karakterisasi, klasifikasi *bee product,* dan hasil olahannya, seperti propolis, *bee* polen, *royal jelly*, roti lebah, lilin lebah, apitoxin, dan juga produk utama seperti MADU. Ketujuh *product* tersebut akan dijelaskan secara terperinci spesifikasi, perbedaan, maupun manfaat utama yang bisa diberikan. Pada bab 3 ini juga dijelaskan lebih terperinci terkait tentang MADU, seperti:

1. pengertian atau definisi madu;
2. jenis madu;
3. karakteristik madu, baik karakteristik secara fisik maupun karakteristik biokimiawi;
4. khasiat dan manfaat madu;
5. popularitas madu, termasuk keistimewaan madu sebagai pengobatan, madu dalam pengolahan industri pangan; dan
6. Penetapan standar mutu madu; serta
7. dugaan adanya logam berat di dalam madu yang dapat ditepiskan.

Pada Bab 4 dipaparkan secara jelas dan terperinci tentang pengertian *stem cell*, penerapan bioteknologi *stem cell* pada abad milenial dapat dilakukan, spesifikasi yang menggambarkan dengan jelas karakteristik dari *stem cell*, tipe dari *stem cell* disertai sumber-sumber penghasilnya di dalam tubuh makhluk hidup, inovasi ke depan dan bahkan kemungkinan peningkatan imunitas tubuh dalam mengatasi Pandemi Covid-19 seperti saat ini atau mikroorganisme penyebab berbagai penyakit infeksius yang lain.

Adapun mekanisme madu dapat menjadi inovasi terapi berbasis mobilisasi dan diferensiasi *stem cell* yang bersumber dari tubuh sendiri akan dijelaskan lebih rinci pada Bab 5.

Bab 5 merupakan beberapa contoh hasil penelitian terkait aplikasi madu sebagai aktivator *stem cells* endogen sehingga terjadi proses mobilisasi dan *homing*. Mekanisme madu dapat menyebabkan terjadinya mobilisasi dan *homing* dari *stem cell* endogen menuju jaringan yang *defect* sampai akhirnya terjadi diferensiasi *stem cell* yang berakhir pada proses penyembuhan (*healing system*). Beberapa contoh penelitian tersebut berupa aplikasi madu pada bidang reproduksi, baik reproduksi *female* maupun reproduksi *male* dan aplikasi madu pada bidang-bidang yang lain, seperti sebagai antioksidan, antiosteoporosis, dan antibiotika alami.

Pada bab 5 ini, penelitian terkait aplikasi madu pada bidang reproduksi baik reproduksi *female* maupun reproduksi *male* dijelaskan lebih terinci lagi, seperti:

1. Aplikasi Madu, Mobilisasi, dan *Stem Cells Homing* pada *Ovary Failure*.
2. Aplikasi Madu, Regenerasi Intestinal, dan *Ovary* pada Kondisi *Protein Energy Malnutrition* (PEM).
3. Aplikasi Madu dan Autoregenerasi pada Jaringan Testis.
4. Aplikasi Madu, Produksi Testosteron, dan Peningkatan Libido. Observasi pada tingkat libido didasarkan pada 3 kategori dari libido: 1. Jumlah berapa kali terjadi *mating* (kopulasi); 2. Waktu reaksi atau waktu pertama kali menaiki betina; dan 3. Periode *mating* (waktu antara satu mating dengan mating berikutnya). Observasi dilakukan selama 4 hari, setelah 1 jam perkawinan, *rats male* dipisahkan dari *rats female*.
5. Aplikasi Madu, Deteksi Molekuler, dan Respons Imun pada *Male.*

DAFTAR PUSTAKA

1. Wu L. and Wang XJ. 2010. Understand stem cell therapy. Like Cell Research Center. Stem Cell. Neuroscience. 2010:1-10.
2. Lindvall O. and Kokaia Z. 2004. Recovery and rehabilitation in stroke: stem cells. Journal of The American Heart Associaton. 35:2691-2694.
3. Kenichiro H, Noritoshi N, Takashi I, Itoh T, Murakami S, Shimizu Y, Taki W, Miyatake K, Kangawa K. 2005. Adrenomedullin enhances therapeutic

potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats. Stroke. 36:853-858.
4. Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Srojkovic M. 2011. Concise review: mesenchymal stem cells treatment of the complications of diabetes mellitus. Stem Cells Regenerative Medicine. Stem Cells. 29:5-10.
5. Purwati. 2012. Transfeksi Mutan 32 bp Gen Pengkode CCR5 pada Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells sebagai Prototipe Limfosit TCD4+ Resisten terhadap Infeksi HIV. Ringkasan Disertasi. Surabaya: Program Studi Ilmu Kedokteran. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
6. Song H, Song BW, Cha MJ, Choi IG, Hwang KC. 2010. Expert Opinion. Modifiation of mesenchymal stem cells for cardiac regeneration. Informa Healthcare. doi 10.1517/14712590903455.
7. Safitri E, Utama S, Widiyatno TV, Sandhika W, Prasetyo, RH. 2016. Auto-regeneration of mice testicle seminiferous tubules due to malnutrition based on stem cells mobilization using honey. Asian Pac. J. Reprod., 5:31-35.
8. Kilani Z. 2009. Stem cell transplantation in human testis for the treatment of male infertility. ISRCTN75604065. Available from: http://www.farah-hospital.com
9. Safitri E, Hariadi M. 2019. Comparison of biotechnological culture of hypoxia-conditioned rat mesenchymal stem cells with conventional in vitro culture of normoxia-conditioned rat mesenchymal stem cells for testicular failure therapy with low libido in rats. Vet World.12:916-924.
10. Prasetyo RH. and 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 Pac. J. Reprod. 5(3): 198-203.
11. Safitri E, Widiyatno TV. and Prasetyo RH. 2016. Honeybee product therapeutic as stem cells homing for ovary failure. Vet World. 9(11): 1324-1330.
12. Fodor WL. 2010. Tissue engineering and cell based therapies. From the bench to the clinic. The potensial to replace, repair and regeneration. Journal of Reproductive Biology and Endocrinology. 200.
13. Kaczmarczyk K. 2008. Is the clinical use of adult stem cells a realistic possibility for myocardial regeneration? Journal of Bioscience Horizons, 1(1):67-74.
14. Al-Mahdi, Al-Jadi, AM, Enchang FK. and Yusoff KM. 2014. The effect of Malaysian honey and its major components on the proliferation of cultured fibroblasts. Turkish Journal of Medical Sciences. 44:733-740.

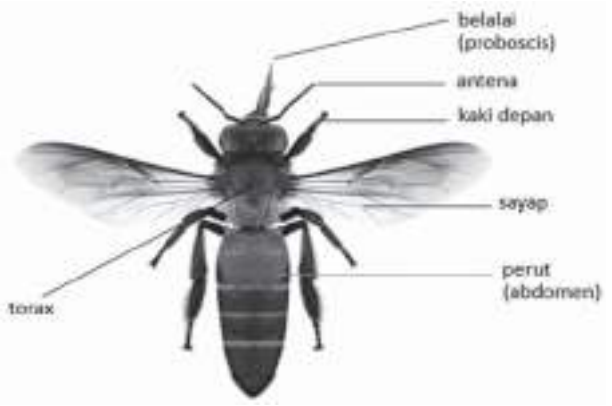
15. Chen YF, Wang K, Zhang YZ, Zheng YF, Hu FL. 2016. In Vitro Anti-Inflammatory Effects of Three Fatty Acids from Royal Jelly. Mediators of Inflammation. 2016:1-11
16. Jiang CM, Liu X, Li CX, Qian HC, Chen D, Lai CQ, Shen LR. 2018. Anti-senescence effect and molecular mechanism of the major royal jelly proteins on human embryonic lung fibroblast (HFL-I) cell line. J Zhejiang Univ Sci B. 19(12):960-972.
17. Ratnayani K, Adhi D. dan Gitadewi I. 2008. Penentuan Kadar Glukosa dan Fruktosa pada Madu Randu dan Madu Kelengkeng dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. J. Kimia. 2(2):77-86.
18. Sakri FM. 2012. Madu dan Khasiatnya, Suplemen Sehat Tanpa Efek Samping. 1st ed. Diandra Pustaka Indonenesia, Yogyakarta. p20-25.
19. Taormina PJ, Niemira BA, Beuchat LR. 2001. Inhibitory Activity of Honey Againts Foodborne Pathogens as Influenced by tha Presence of Hydrogens Peroxide and Level of Antioxidant Power. Int.J. Food Microbiol. 69:217-225.
20. Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, Wallace RB, Robbins J. Lewis CE, Bassford T, Beresford SAA, Black HR, Blanchette P, Bonds DE, Brunner RL, Brzyski RG, Caan B, Cauley JA, Chlebowski RT. and Cummings SR. 2006. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. N Engl J Med. 354:669-83.
21. Saputri DS dan Putri YE. 2017. "Aktivitas Antioksidan Madu Hutan di Beberapa Kecamatan di Kabupaten Sumbawa Besar. J. Tambora 2:3.

2

KLASIFIKASI DAN JENIS LEBAH

KLASIFIKASI LEBAH

Lebah adalah serangga yang memiliki struktur kulit luar yang keras atau dikenal sebagai *exosceleton* yang menutupi seluruh tubuh lebah. Berdasarkan struktur anatomi penyusun tubuh, tubuh dari seekor lebah terbagi menjadi tiga bagian, yaitu kepala (*head*), dada (*thorax*), dan perut (*abdomen*) (Gambar 2.1). Bagian kepala dari lebah mempunyai peran sebagai organ sensorik yang juga menghasilkan berbagai enzim dan hormon *pheromone*. Pada bagian *thorax* terdapat dasar sayap yang berperan untuk terbang, pada bagian ini juga terdapat *spiracles. Spiracles* mempunyai fungsi sebagai organ pernapasan. Pada bagian *abdomen* terdapat organ pencernaan (*digestive*), organ reproduksi, dan organ penyengat.[1,2]



Gambar 2.1 Pembagian Segmen Anatomi Lebah.[2]

Lebah termasuk serangga sosial yang hidupnya secara berkoloni yang terdiri atas ratu lebah, lebah jantan, dan lebah pekerja. Terdapat hanya satu ekor ratu lebah di dalam satu koloni yang bertugas bertelur sepanjang hidupnya. Lebah jantan bertugas membuahi ratu lebah, sedangkan lebah pekerja yang bertanggung jawab memenuhi kebutuhan koloni, baik menyediakan makan, membuat dan memperbaiki sarang, serta mengumpulkan madu.[3] Jumlah anggota yang berada dalam satu koloni dapat mencapai puluhan ribu ekor dengan rincian beribu lebah pekerja betina steril, beratus lebah jantan, dan hanya satu ratu lebah sebagai betina fertil.[4]

Lebah yang ada pada saat ini sudah terdapat keberadaannya sejak ratusan juta tahun yang lalu. Disebutkan juga lebah muncul melalui beberapa tahapan dengan detail bentuk tubuh yang dapat dibedakan pada tiap tahapan. Lebah pada jutaan tahun yang lalu tidak memiliki bentuk yang dapat dipastikan seperti saat ini, namun dalam hal *basic* organisasi yang dikenal dengan istilah *honey bee colony superorganism* adalah tidak berubah.[5]

Lebah merupakan organisme yang termasuk dalam Kingdom Animalia, Kelas Insekta, Ordo Hymenoptera, Famili Apidae. Beberapa famili lain selain Apidae adalah Famili Andrenidae, Apoidae, Colletidae, Dasypodaidae, Halictidae, Megachillidae, Meganomiidae, dan Melittidae.[6] Indonesia memiliki beberapa jenis lebah, yaitu seperti *Apis mellifera, Apis dorsata*

binghami, Apis dorsata dorsata, Apis andreniyormis, Apis cerana, Apis nigrocicta, Apis koschevnikovi, serta *Trigona* sp.[7]

Spesies lebah yang paling banyak ditemui saat ini adalah *Apis mellifera*. Lebah *Apis mellifera* merupakan salah satu jenis lebah monoflora yang terkenal paling produktif dalam menghasilkan madu. Oleh karena itulah lebah ini banyak dipilih untuk dibudidayakan oleh manusia. Selain *Apis mellifera* terdapat spesies lain yang juga produktif dalam menghasilkan madu, yaitu *Apis dorsata*. *Apis dorsata* adalah jenis lebah hutan atau yang dikenal juga sebagai lebah multiflora. Lebah *Apis dorsata* adalah salah satu jenis lebah yang juga paling produktif dalam memproduksi madu baik di Indonesia maupun Asia. Spesies lain seperti *Trigona* sp. adalah merupakan spesies yang paling banyak menghasilkan produk perlebahan yang lain di Indonesia, yaitu berupa propolis.[8]

Lebah hutan atau *Apis dorsata* merupakan penghasil madu paling produktif bagi masyarakat Indonesia pada saat ini menjadi perhatian lebih mendalam. Hal ini dikarenakan kepedulian dan kesadaran masyarakat terhadap kesehatan yang semakin meningkat. Pada kondisi pandemik Covid-19 ini, kesehatan tubuh yang prima sangat dibutuhkan dalam upaya peningkatan imunitas. Telah diketahui bahwa madu yang diproduksi oleh lebah *Apis dorsata* mengandung bahan fenol yang tertinggi dan aktivitas antioksidan yang terbaik jika dibandingkan dengan madu dari produk lebah yang lain.[9]

Lebah *Apis dorsata* adalah tergolong lebah liar, mempunyai sifat agresif dan paling produktif dalam menghasilkan madu apabila dibandingkan dengan jenis lebah yang lain. Sarang lebah hutan ini terdapat pada tempat terbuka dan pada umumnya menggantung pada dahan ranting pohon tinggi yang berada pada ketinggian lebih dari 10 meter di atas permukaan tanah.[10] Lebah hutan *Apis dorsata* adalah merupakan spesies lebah madu yang asli berasal dari Indonesia yang dapat ditemukan di beberapa daerah seperti Sumatra, Sulawesi, Kalimantan, atau pulau-pulau kecil seperti di Nusa Tenggara Timur ataupun Nusa Tenggara Barat. Lebah jenis ini memiliki potensi besar untuk dapat dijadikan mata pencaharian masyarakat sekitar hutan. Hal ini dikarenakan

sarang lebah *Apis dorsata* mudah ditemukan di pedesaan yang berbatasan langsung dengan hutan, di mana tingkat produksi madunya sangat tinggi. Produksi madu per koloni yang dihasilkan setiap tahunnya dapat mencapai 10–20 kg.[11]

Lebah dengan salah satu produksinya berupa madu merupakan kekayaan hayati sumber daya alam di Indonesia. Lebah selain dimanfaatkan sebagai penghasil madu juga dapat dimanfaatkan dalam menghasilkan produk perlebahan yang lain, yaitu sebagai pemenuhan gizi masyarakat. Peran lebah selain bermanfaat bagi manusia, mempunyai peran sangat penting lainnya, berupa terjaganya keseimbangan alam, salah satunya adalah pada proses penyerbukan tanaman. Hal ini dikarenakan banyaknya jenis tanaman yang proses polinasinya hanya dapat dilakukan oleh lebah.[12]

Lebah memiliki kepekaan sangat sensitif, yaitu dapat mengetahui asal sumber makanan meski berada pada jarak yang sangat jauh.[13] Sumber makanan pokok dari lebah yaitu berupa serbuk sari (*pollen*) dan nektar (larutan gula yang dihasilkan oleh tanaman). Serbuk sari adalah merupakan bahan makanan sebagai sumber protein, sedangkan nektar merupakan sumber karbohidrat. Kedua jenis makanan baik berupa serbuk sari maupun nektar ini didapatkan oleh lebah khususnya pada bagian bunga dari tanaman.[12]

Berbagai penelitian bidang biologi terkait sistem sensorik, tingkah laku, komunikasi, dan dinamika populasi lebah telah dilakukan sejak abad ke-20. Lebah diketahui tidak memiliki retina *mosaic* halus pada mata seperti yang dimiliki manusia. Lebah bernavigasi dengan cepat dan tepat menggunakan reseptor ultraviolet dengan cara menerima informasi susunan polarisasi pada organ optik. Lebah juga mempunyai kelebihan lain berupa dapat dengan mudah membedakan warna lain saat terbang dan juga memiliki pola cahaya kerlap-kerlip yang terlihat pada saat terbang dengan jarak dekat. Lebah juga dapat merasakan aroma yang peka seperti manusia dan lebih peka terhadap aroma tertentu.[13]

Lebah di alam bertugas sebagai *pollinat* dari bunga, dengan hasil akhir berupa produk lebah.[14] Produk utama dari lebah adalah madu. Produk selain madu dari lebah adalah dapat berupa propolis, *royal jelly, bee pollen, bee venom*

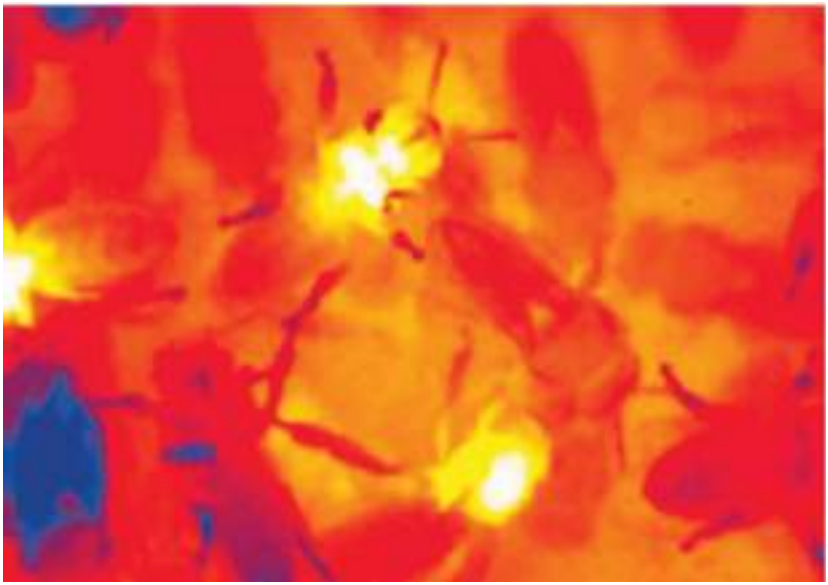
(racun atau sengat lebah), dan *bee bread* (roti lebah). Propolis merupakan lapisan lilin yang digunakan untuk melindungi koloni lebah dari gangguan luar ataupun predator. *Bee venom* merupakan racun yang dihasilkan dari sengat lebah. *Bee bread* merupakan *pollen* dari bunga yang diambil kemudian digunakan oleh lebah untuk membuat makanan. *Royal jelly* adalah makanan yang dihasilkan lebah, khusus ratu lebah dan larva yang sedang dirawat.[6] Adapun larva lebah hidup dalam *nourhising jelly* yang dibuat oleh *nurse bee* (Gambar 2.2).

Gambar 2.2 Larva lebah hidup dalam *Royal Jelly*.[5]

Calon ratu dirawat oleh lebah pekerja. Secara hierarki, di dalam koloni lebah terdapat lebah ratu atau yang disebut *queen bee*, lebah pejantan atau *drone,* lebah yang berada dalam fase pertumbuhan atau disebut *brood,* dan lebah pekerja yang biasa disebut *worker*.[6] Lebah pekerja bertugas memenuhi kebutuhan operasional koloni, seperti memberi makan ratu dan larva lebah. Lebah pejantan dan lebah ratu melakukan regenerasi koloni melalui perkawinan.[15]

Dalam satu koloni lebah, memiliki 20.000–80.000 organisme lebah pekerja betina yang steril (tidak bereproduksi). Adapun ciri khas dari lebah ini adalah memiliki ukuran yang paling kecil dan secara umum terlihat mengambil nektar.[6] Lebah pekerja bertugas bekerja selama hidupnya, yaitu untuk mencari nektar, mendesain sarang, merawat ratu, merawat calon ratu dan larva lebah, serta menyekresikan zat fungsional untuk keperluan hidup

koloni. Pada negara dengan 4 musim, lebah pekerja mempunyai peran juga untuk menjaga panas dalam sarang mereka,[15] seperti tampak terlihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Lebah pekerja yang menjaga panas pada pupa.[5]

Lebah ratu yaitu betina yang fertil (subur) dan hanya terdapat satu ratu dalam satu koloni. Lebah ratu memiliki ukuran yang lebih besar sekitar 1,5 kali dibanding lebah jantan. Lebah ratu memiliki masa hidup lebih lama daripada lebah jantan.[6] Lebah ratu keberadaannya selalu di dalam sarang (tidak pernah terlihat keluar dari sarang). Lebah ratu mempunyai peran untuk menghasilkan telur. Selama proses pengeluaran telur, lebah ratu melakukan upaya dengan menghabiskan energi secara terus-menerus, selama proses ini berlangsung, lebah ratu dilayani oleh lebah pekerja (Gambar 2.4). Proses menjadi lebah ratu diawali dari calon lebah ratu yang menetas berupaya melawan calon ratu yang lain. Pemenang dari pertarungan akan menjadi lebah ratu dan pada akhirnya akan terbang menuju lebah pejantan untuk melakukan beberapa kali perkawinan.[6,15]

Gambar 2.4 Lebah ratu yang diberi makan secara eksklusif dengan *Royal Jelly* dan dikelilingi oleh lebah pekerja untuk diberikan pelayanan dan perawatan khusus seumur hidup.[5]

Lebah pejantan yang berada di dalam koloni memiliki ukuran tubuh di antara ratu dan lebah pekerja (yaitu dengan ukuran yang lebih kecil dari ukuran lebah ratu namun lebih besar dari ukuran lebah pekerja). Jumlah lebah pejantan di dalam koloni terdapat berkisar antara 300–800 ekor. Kehidupan lebah pejantan ini hanya bertugas untuk melakukan perkawinan dengan sang ratu.[6,15] Pada negara empat musim, lebah pejantan hanya akan hidup selama musim panas dan musim semi, selanjutnya akan mati pada saat musim gugur dan kemudian keberadaannya tidak ada lagi di saat musim salju. Selama kehidupannya, lebah ini hanya menunggu untuk melakukan perkawinan dengan sang ratu dan kemudian akan mati.[15] Keberadaan lebah pejantan berasal dari telur ditetaskan yang tidak dibuahi.[6]

JENIS LEBAH

Negara Indonesia memiliki flora dan fauna yang melimpah ruah, termasuk spesies lebah sebagai penghasil madu. Indonesia adalah negara yang dikenal memiliki jenis lebah asli paling banyak di dunia dibandingkan dengan negara-negara lain. Jenis lebah asli penghasil madu tersebut dapat diklasifikasikan ke dalam grup *Apis* dan *Trigona*.[16] Grup *Apis* di antaranya seperti lebah hutan atau *Apis dorsata*, lebah lokal atau lebah ternak atau *Apis cerana*, lebah kerdil hitam atau *Apis andreniformis*, lebah merah atau *Apis koschevnikovi*, lebah lokal Sulawesi atau *Apis nigrocincta*, lebah madu barat atau *Apis mellifera*, lebah kerdil merah atau *Apis florae*, lebah gunung atau *Apis nuluensis*. Grup *Trigona* sp. adalah merupakan salah satu jenis lebah yang dikenal tidak memiliki sengat. Lebah ini juga dikenal mempunyai kemampuan menghasilkan propolis dalam jumlah yang cukup banyak, yaitu sekitar ±3 kilogram per koloni per tahunnya. Dibandingkan dengan lebah jenis *Apis*, yang hanya mampu menghasilkan propolis sekitar 20–30 gram per koloni per tahun. *Trigona sp*. memiliki ukuran tubuh yang paling kecil dibanding lebah yang lain. Panjang tubuh *Trigona sp*. berukuran antara 3,6–8,06 mm, dengan sepasang sayap yang lebih panjang dari ukuran tubuhnya, serta tiga pasang kaki beruas dan berduri.[17] Keberadaan jenis lebah *Trigona* sp. di dunia tercatat sebanyak 150 spesies, di mana Indonesia memiliki sekitar 37 spesies yang tersebar, yaitu 9 spesies di Jawa, 18 spesies di Sumatra, 31 spesies di Kalimantan, dan 2 spesies di Sulawesi. Jumlah ini dapat meningkat lebih banyak karena tiap daerah memiliki keanekaragaman yang berbeda.[18]

Lebah madu ini mampu menghasilkan berbagai macam produk, baik berupa madu, ataupun *royal jelly*, roti lebah, *bee pollen*, maupun propolis. Madu mempunyai beberapa fungsi, baik sebagai antiseptik, antibakteri, maupun antioksidan. *Royal jelly* merupakan cairan kental yang berasa asam dan manis dan mempunyai fungsi sebagai antibakteri, antitumor, dan meningkatkan imunitas, serta berperan dalam penyembuhan luka.[19] Polen sendiri mempunyai fungsi sebagai sumber nutrisi utama dari lebah, selain juga berfungsi sebagai antibakteri dan antioksidan.[10] Propolis adalah produk

lebah yang mengandung substansi kompleks, sehingga selain berfungsi sebagai antibakteri juga berperan sebagai imunomodulator, dikarenakan mengandung flavonoid yang tinggi.[10,20]

1. Lebah Hutan (*Apis dorsata*)

Menurut Lamerkabel (2011), taksonomi lebah hutan *Apis dorsata* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:[21]

Kingdom : Animalia
Phylum : Arthropoda
Classis : Insecta
Ordo : Hymenoptera
Familia : Apidae
Genus : *Apis*
Spesies : *Apis dorsata*

Lebah hutan (*Apis dorsata*) memiliki struktur tubuh yang terdiri atas tiga bagian, seperti kepala, toraks, serta abdomen. Pada bagian kepala dilengkapi mata majemuk dan mata tunggal, mata majemuk berfungsi untuk melihat jarak jauh dan mengendalikan arah terbang, adapun mata tunggal dari lebah ini juga berkembang sangat baik.[10] Pada bagian kepala juga dilengkapi adanya antena yang mempunyai peran sebagai indra penciuman dan juga perasa. Lebah hutan ini mempunyai mulut yang berbentuk tabung panjang, dengan fungsi utama untuk mengumpulkan nektar dari tanaman.[19] Pada bagian toraks terdapat tungkai dan sayap, di mana pada bagian ujung tungkai terdapat tarsi yang berfungsi sebagai pendeteksi kualitas bahan kimia dari serbuk sari tanaman. Setiap spesies lebah yang ada, mempunyai bentuk venasi sayap yang berbeda.[19] *Apis dorsata* memiliki panjang sayap depan dengan ukuran sekitar 12–14 mm, panjang sayap belakang sekitar 4–5 mm dan panjang tungkai sekitar 11 mm.[10] Bagian abdomen yang merupakan bagian ketiga dari lebah hutan ini terdiri atas tujuh segmen, dengan perbatasan setiap segmen terlihat dengan jelas. Pada segmen ketujuh dari lebah ratu dan lebah pekerja terdapat sengat yang berfungsi sebagai alat pertahanan diri. Lebah

hutan *Apis dorsata* memiliki karakteristik warna abdomen kecokelatan dengan disertai strip berwarna oranye.[19] Secara makroskopis, gambaran lebah madu hutan (*Apis dorsata*) disajikan dalam Gambar 2.5 di bawah ini.

Gambar 2.5 Lebah hutan (*Apis dorsata*).[5]

Apis dorsata, bagi masyarakat Indonesia dikenal sebagai lebah hutan atau lebah raksasa. Lebah dalam bahasa Jawa dikenal dengan sebutan *tawon*, sedangkan lebah hutan disebut *tawon gung,* dalam bahasa Sunda disebut tawon *gadang* atau tawon *odeng*, bahasa Palembang disebut madu *sialang*, dan di Kalimantan Barat dikenal dengan sebutan *muanyi* atau *manye*, sedangkan di negara Inggris dikenal dengan sebutan *Honey bee*.

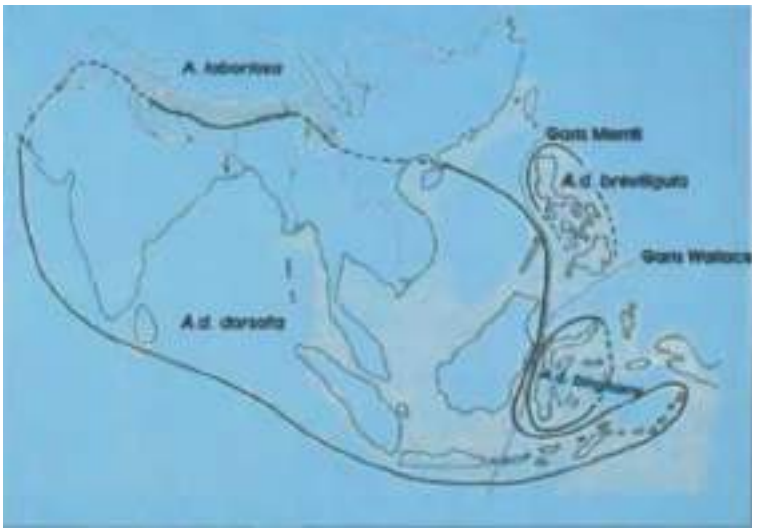
Lebah ini masih liar dan sulit untuk dibudidayakan. Secara morfologi, lebah *Apis dorsata* memiliki ukuran tubuh paling besar dibandingkan dengan ukuran tubuh lebah yang lain. Panjang sayap berkisar 12–14 milimeter, panjang kaki belakang berkisar 10,5 sampai 11,5 milimeter, dan panjang probosis berkisar 6,5 milimeter, serta panjang tubuh berkisar 1,9 sentimeter[22] (Gambar 2.6). Jenis dari lebah Apis ini merupakan jenis lebah yang belum dapat dibudidayakan. Sampai pada saat ini, lebah hutan *Apis dorsata* merupakan jenis lebah yang berkontribusi penting, dengan produksi madu yang sangat tinggi sehingga dapat dijadikan peluang usaha yang sangat menguntungkan bagi masyarakat di sekitar hutan tempat keberadaan lebah tersebut.

Gambar 2.6 Lebah *Apis dorsata* mencari nektar pada bunga *Grewia eriocarpa*.[14]

Gambar 2.7 Lebah hutan (*Apis dorsata*) membentuk satu koloni.[23]

Lebah *Apis dorsata* memiliki bentuk dan ukuran tubuhnya yang lebih besar jika dibandingkan dengan lebah yang lain. Diperkirakan tiga kali lipat lebih besar dibanding lebah *Apis mellifera* ataupun *Apis cerana*. *Apis dorsata* memiliki warna tubuh dominan berwarna kuning dengan sayap berwarna hitam gelap disertai belang berwarna kuning (Gambar 2.7), Adapun warna perut adalah hitam. Pembagian tugas yang berbeda dalam satu koloni lebah *Apis dorsata*, yaitu berdasar jenis kelamin dan fungsinya. Pembagian tugas tersebut adalah seperti satu ekor lebah ratu atau *Queen*, dengan ratusan lebah jantan atau *drones*, serta ribuan lebah pekerja atau *worker-bees* yang hidup berdampingan di dalam satu koloni. *Apis dorsata* memiliki kebiasaan yang unik yaitu suka berpindah tempat atau bermigrasi untuk mencari tempat baru dengan jarak 100–200 km.

Spesies *Apis dorsata* ini hanya berkembang di kawasan daerah subtropis dan tropis Asia, tidak tersebar ke luar kawasan Asia. *Apis dorsata* di negara Indonesia banyak terdapat di kepulauan Sumatra, Kalimantan, Sulawesi, Papua, dan juga Nusa Tenggara. Jenis lebah *Apis dorsata* tersebar di Indo-Malaya ke arah barat hingga sungai Indus Pakistan dan ke arah timur hingga Pulau Timor kecuali Pulau Maluku dan Papua seperti tampak pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Persebaran lebah *Apis dorsata* dan *Apis laboriosa*.[22]

Lebah *Apis dorsata* terdiri atas beberapa subspesies. Subspesies tersebut antara lain adalah *Apis dorsata binghami*, *Apis dorsata dorsata*, *Apis dorsata breviligula,* dan *Apis dorsata fabricius*. Spesies lebah hutan yang ada di Indonesia hanya *Apis dorsata binghami* dan *Apis dorsata dorsata* yang keberadaaanya di Sulawesi.[22]

Lebah *Apis dorsata* hidup di alam dengan cara bermigrasi dan tinggal di *combless cluster* atau *bivouacs* seperti pada Gambar 2.7. Konstruksi sarang disesuaikan untuk mengakumulasikan makanan yang disediakan untuk terbang.[24] Keberadaannya di alam merupakan koloni terbesar dan berfungsi sebagai *pollinator* di alam.[14,25]

Lebah hutan, seperti lebah penghasil madu lainnya adalah makhluk sosial yang cenderung membentuk koloni. Dalam satu koloni lebah hutan terdiri atas satu ekor lebah ratu, satu ekor lebah jantan, dan beberapa ekor lebah pekerja.[27] Hierarki dari koloni lebah memiliki sistematika yang jelas. Ratu lebah selain berperan sebagai pemimpin koloni, juga sebagai penghasil telur. Lebah jantan berperan menemani ratu dan melakukan aktivitas seksual atau perkawinan dengan sang ratu, lebah pekerja berperan mempertahankan koloni dari pihak luar dan mencari makan.[28] Lebah pekerja juga berperan dalam menyediakan *royal jelly queen* sebagai makanan utama bagi ratu lebah.[29]

Struktur anatomi lebah ratu adalah unik, yaitu ditandai dengan spesifikasi berupa bentuk perut yang runcing dan lebih panjang dibandingkan dengan lebah lainnya. Selain itu, struktur dada dari ratu lebah adalah lebih lebar jika dibandingkan lebah jantan ataupun lebah pekerja.[29]

Lebah jantan memiliki ukuran tubuh yang lebih besar daripada lebah pekerja, namun lebih kecil daripada ukuran lebah ratu. Lebah jantan tidak memiliki sengat pada tubuhnya seperti lebah pekerja, selain juga tidak mempunyai kemampuan untuk mengumpulkan nektar maupun serbuk sari seperti yang dilakukan oleh lebah pekerja. Lebah jantan hanya berperan untuk melakukan aktivitas perkawinan dengan lebah ratu. Umur kematangan seksual dari lebah jantan berkisar antara 12 hari dan mempunyai daya tahan hidup hingga 8 minggu.[27]

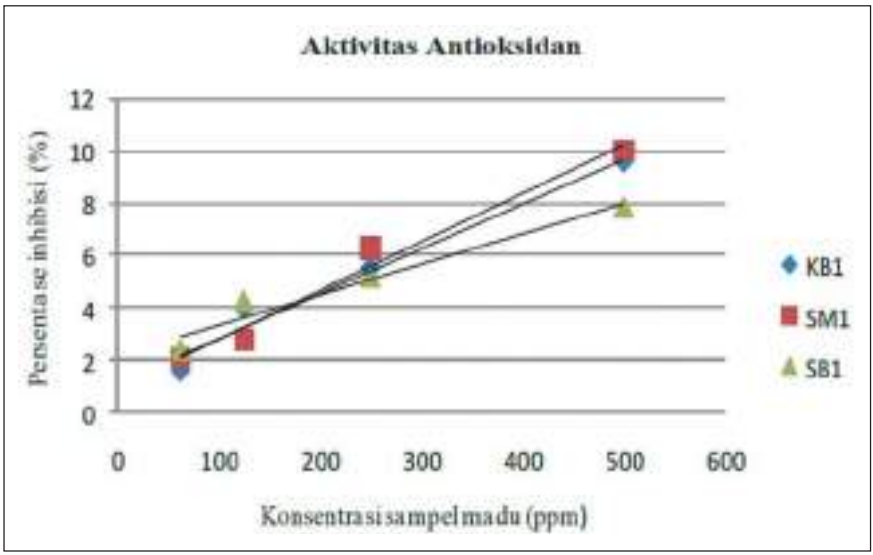
Kelompok lebah pekerja merupakan kelompok lebah paling banyak jumlahnya yang ditemukan dalam satu koloni. Kelompok lebah pekerja ini bertugas mencari makan untuk lebah ratu. Lebah ini memiliki struktur khusus yang disebut kantung polen, yang berperan untuk proses penyerbukan.[29] Pembagian tugas dari lebah pekerja didasarkan pada umur: pada umur 3 hari lebah pekerja berperan untuk membersihkan kandang, umur 4–9 hari berperan dalam merawat larva, umur 10–16 hari berperan membangun sarang, umur 17–19 hari berperan menerima nektar yang dibawa oleh lebah pekerja lain yang berumur di atasnya, atau umur 21 hari ke atas, sebagai lebah pencari nektar (Gambar 2.9). Adapun umur 20 hari berperan menjaga sarang dari musuh-musuhnya. Terakhir umur 20 hari sampai mati, lebah pekerja mempunyai peran menjadi lebah lapangan, yaitu lebah yang mencari nektar dan air.[6]

Gambar 2.9 Lebah *Apis dorsata* pencari nektar [6].

Produk Madu dari Lebah *Apis dorsata*

Produk madu yang dihasilkan atau diproduksi oleh lebah *Apis dorsata* berasal dari nektar yang berasal dari banyak tanaman atau *multiflora* sehingga memiliki intensitas warna pada absorbansi ABS_{450} 585,33 mAU dengan karakteristik warna 122,00 *Dark Amber* [9]. Parameter ABS_{450}

dapat menginterpretasikan patokan kadar pigmen yang tinggi dan dapat diandalkan berupa aktivitas antioksidan seperti karotenoid dan beberapa flavonoid. Berdasarkan konfirmasi hasil uji *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) aktivitas sebagai antioksidan, yang dikenal juga sebagai *radical scavenging acivity* (RSA) adalah sebesar 56,7% dari 9 madu yang diukur, 5 di antaranya adalah madu dari lebah *Apis dorsata*. Persentase RSA sebagai aktivitas antioksidan tersebut tidak berbeda jauh jika dibandingkan dengan *manuka honey* yang merupakan *golden standard* dari madu, di mana *manuka honey* mempunyai persentase RSA sebesar 58,00% [30]. Pada madu hutan *Apis dorsata* yang terdapat di beberapa kepulauan di Indonesia, seperti Kepulauan Sumatera, Kalimantan, dan Sumbawa memiliki aktivitas antioksidan (RSA) sebesar sekitar 50% [31] (Gambar 2.10).



Gambar 2.10 Grafik aktivitas antioksidan dari tiga jenis madu: Sumatera (SM1), Kalimantan Barat (KB1), dan Sumbawa (SB1).[31]

Bahan padat terlarut pada madu yang dihasilkan sebesar 368,33 ppm mengandung 64,93% merupakan gula dan 2,77% per 100 g merupakan sukrosa. Kandungan protein sebesar 3,14 g/kg protein dengan 261,33 mg/kg

merupakan *proline*, yaitu senyawa asam amino yang dihasilkan oleh saliva lebah.[9] Protein yang terkandung pada madu dapat berupa *enzim phosphatase, glucose oxidase invertase,* dan *catalase.*[32]

Senyawa bioaktif berupa fitokimia dari madu hutan *Apis dorsata* telah dilaporkan oleh beberapa orang peneliti. Senyawa bioaktif adalah berupa metabolit sekunder yang secara kualitatif terinterpretasikan pada warna madu. Analisis fitokimia madu mengacu pada *Medical Material Plant* (MMI).[31] Berdasarkan MMI, madu hutan *Apis dorsata* teridentifikasi mengandung berbagai senyawa aktif seperti fenolik, flavonoid, saponin, alkaloid, triterpenoid, dan glikosida.[31,33] Kandungan senyawa bioaktif tersajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Senyawa bioaktif fitokimia yang terkandung pada madu hutan (*Apis dorsata*).[31,33]

Senyawa Bioaktif	Madu Hutan dari Lebah *Apis dorsata*		
	Sumatera	Kalimantan Barat	Sumbawa
Fenolik	√	√	√
Flavonoid	√	√	√
Tanin	-	-	-
Saponin	√	√	√
Alkaloid	√	√	√
Triterpenoid	√	√	√
Steroid	-	-	-
Glikosida	√	√	√

2. Lebah *Apis mellifera*

Taksonomi dari lebah *Apis mellifera* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:[6,34]

Kingdom : Animalia
Phylum : Arthropoda
Classis : Insecta
Ordo : Hymenoptera

Familia : Apidae
Genus : *Apis*
Spesies : *Apis mellifera*

Apis mellifera merupakan lebah yang berasal dari dataran Tropis Afrika, kemudian menyebar hingga Eropa Utara dan Asia, namun lebah ini lebih dikenal sebagai lebah Eropa.[34] Karakteristik *Apis mellifera* adalah lebah yang dikenal dengan produksi madu yang dihasilkan sangat tinggi. Lebah ini juga mudah untuk dibudidayakan dan sudah terdomestikasi sejak berabad-abad tahun yang lalu. Produksi berupa madu yang dihasilkan oleh lebah ini dikenal mempunyai produksi yang tertinggi dibanding dengan lebah yang lain.[6]

Masa hidup lebah ratu dari *Apis mellifera* adalah berkisar selama dua tahun, tergantung ada tidaknya sperma dari si pejantan. Lebah pejantan memiliki waktu hidup selama 21–32 hari selama musim semi, 90 hari selama musim panas, dan akan mati selama musim dingin. Lebah pekerja hidup selama 20–40 hari pada musim panas atau bekerja hingga mati, sedangkan pada musim dingin mempunyai lama hidup sekitar 140 hari.[34]

Apis mellifera tersebar secara luas di dataran Afrika, Asia Barat, dan Eropa dengan subspesies sebanyak 24 yang terbagi menjadi empat silsilah, baik berdasarkan morfometrik maupun kajian molekulernya. Keempat silsilah tersebut antara lain *A-lineage* untuk Afrika, *M-lineage* untuk Eropa Barat dan Utara, *C-lineage* untuk Eropa timur, serta *O-lineage* untuk Timur Tengah dan Asia Barat seperti pada Gambar 2.11.

Subspesies dari *Apis mellifera* antara lain adalah *Apis mellifera mecadonica, Apis mellifera iberiensis, Apis mellifera cecropia, Apis mellifera siciliana, Apis mellifera cypria, Apis mellifera caucasica, Apis mellifera adami, Apis mellifera ruttneri,*[35] *Apis mellifera mellifera, Apis mellifera carnica, Apis mellifera ligustica, Apis mellifera anatoliaca, Apis mellifera scutellata*,[36] *Apis mellifera adansonii, Apis mellifera capensis, Apis mellifera syriaca, Apis mellifera ligustica*,[37] *Apis mellifera iberica, Apis mellifera caucasia*.[38] *Apis mellifera intermissa, Apis mellifera sahariensis, Apis mellifera capensis*.[39]

Banyaknya jumlah subspesies dari *Apis mellifera* dikarenakan sejarah didomestikasi yang sudah sejak berabad yang lalu terjadi yang kemudian dibawa menyebar ke seluruh penjuru dunia untuk dibudidayakan. *Apis mellifera* sebenarnya berasal dari daerah tropis dan subtropis yang kemudian terkena radiasi menuju ke daerah beriklim dingin. Adaptasi menuju daerah beriklim dingin merupakan kunci dari sejarah terjadinya evolusi. Populasi *Apis mellifera* iklim dingin dan tropis memiliki perbedaan karakteristik yang dipengaruhi oleh musim dingin.

Gambar 2.11 Persebaran *Apis mellifera*.[36]

Produk Madu dari Lebah *Apis mellifera*

Madu yang diproduksi atau dihasilkan oleh lebah *Apis mellifera* berasal dari bunga yang berjenis sama atau dari satu jenis tanaman, sehingga disebut monoflora. Karakteristik warna bervariasi antara 82,33–150,00 *Dark Amber* dengan intensitas warna 327.67–875.67 mAU [40]. Madu yang dihasilkan memiliki kandungan proline berkisar antara 0,2–1,6%. Kandungan gula fruktosa 29,80–73,5 g/100 g, glukosa 21,00–38,30 g/100 g, dan sukrosa 0,12–8,80 g/100 g. Warna dari madu tersebut bervariasi, mulai dari jernih seperti air hingga *dark amber*. *5-hydroxymethylfurfural* (5-HMF) madu *Apis mellifera* sebesar 0–30,43 mg/kg.[41]

Pada madu Algeria, yang diproduksi lebah *Apis mellifera*, memiliki HMF 3,8–21,4 mg/kg dengan *DPPH RSA* 22,70–29,76% dan FRAP 223,19–958,42 µM Fe[II]/100g.[32] Madu Pakistan yang merupakan monoflora memiliki HMF sebesar 26.54 mg/kg. Bahan padat terlarut 378,3 ppm. Protein yang dikandung sebesar 3,68 mg/g dan sejumlah 287,75 mg/kg merupakan proline. Intensitas warna yang dimiliki madu yang ada di Negara Pakistan adalah sebesar 589.31 mAU.[32]

3. Lebah Lokal (*Apis cerana*)

Lebah lokal yang ada di Indonesia atau dikenal sebagai *Apis cerana* atau disebut juga *Apis indica* adalah lebah madu asli kawasan Asia yang jinak dan kemudian menyebar dari Afganistan, Cina, sampai ke Jepang. Berabad-abad yang lalu sudah diternakkan di wilayah Asia termasuk wilayah Indonesia. *Apis cerana* dalam Bahasa Jawa dikenal dengan sebutan tawon laler atau lalat dalam Bahasa Indonesia, tawon madu atau disebut juga tawon unduhan. Bahasa Sunda menyebutnya dengan sebutan *nyiruan*, di daerah Palembang disebut sebagai madu lobang, beberapa daerah yang lain menyebutnya lebah lalat atau lebah madu (Gambar 2.12).

Gambar 2.12 Lebah *Apis cerana*.[42]

Lebah ini selain jinak, juga mempunyai daya atau kemampuan adaptasi yang sangat tinggi terhadap kondisi lingkungan. Lebah ini banyak bersarang di dalam rumah-rumah, maupun dipelihara secara tradisional dengan menggunakan gelodok yang berasal dari batang kelapa atau randu, yang berfungsi sebagai tempat untuk membentuk koloni atau kelompok. Hasil madu dari lebah ini mudah dipanen, yaitu 5–10 kilogram per koloni per tahunnya. Pemeliharaan juga dapat dilakukan dengan cara intensif melalui pemanfaatan kotak atau *box* lebah (stup), sehingga dapat dipindah-pindahkan.[6]

Namun demikian, *Apis cerana* secara umum oleh masyarakat di pedesaan masih dibudidayakan secara sampingan, sehingga produktivitasnya tetap rendah. Padahal jika dikembangkan lebih intensif dapat dijadikan sumber penghasilan yang dapat meningkatkan kesejahteraan dan nilai gizi masyarakat.

4. Lebah Kerdil (*Apis florea*)

Lebah *Apis florea* atau dikenal dengan sebutan tawon klanceng. *Apis florea* merupakan lebah dengan ukuran tubuh paling kecil di antara semua jenis lebah madu yan lain. Lebah kerdil ini awalnya berasal dari Oman dan Iran di Timur Tengah kemudian menuju Asia Barat, dan akhirnya sampai di dataran India hingga sampailah di Indonesia. Namun lebah ini keberadaannya tidak terdapat pada bagian utara pegunungan Himalaya, di beberapa lokasi menunjukkan bahwa *Apis florea* (Gambar 2.13) dapat hidup berdampingan dengan beberapa lebah lokal yang lain seperti *Apis cerana* dan *Apis dorsata* ataupun dengan lebah nonlokal seperti *Apis mellifera*.

Gambar 2.13 Lebah *Apis florea*.[43]

Keberadaan lebah *Apis florea* ini masih menjadi perdebatan ilmiah, dikarenakan spesimennya hanya ditemukan di museum, sedangkan kenyataan yang ada di lapangan sampai saat ini belum pernah ada laporan keberadaannya.

5. Lebah Kecil (*Apis andreniformis*)

Lebah jenis *Apis andreniformis* (Gambar 2.14) ini mempunyai morfologi serupa dengan *Apis florea*. Jenis lebah ini membuat sarang tunggal yang berada pada semak belukar. Namun demikian, produktivitas madu dari lebah ini tergolong rendah dan kurang bernilai secara ekonomis jika akan diintensifkan atau dikembangbiakkan. Penyebaran lebah jenis ini terdapat di daerah Jawa, Kalimantan, Sumatra, dan Nusa Tenggara.

Gambar 2.14 Lebah *Apis andreniformis*.[43]

6. Lebah Merah (*Apis koschevnikovi*)

Lebah *Apis konschevnikovi* atau lebah merah merupakan spesies yang baru dikenalkan oleh beberapa ilmuwan. Jenis lebah ini banyak terdapat di Pulau Sumatra bagian barat dan Kalimantan. Adapun karakteristik yang paling menonjol adalah warna merah di sebagian besar dari lebah, dengan ukuran tubuh sedikit lebih besar dibanding *Apis cerana* (Gambar 2.15).

Gambar 2.15 Lebah *Apis konschevnikovi*.[44]

7. Lebah Gunung (*Apis nuluensis*)

Lebah *Apis nuluensis* adalah jenis lebah yang juga masih menjadi perdebatan akan keberadaannya di Indonesia. Sampai saat ini, keberadaannya dilaporkan ada pada dataran tinggi Serawak. Namun demikian ada juga dugaan terdapat pula di kepulauan Kalimantan (Gambar 2.16). Ukuran dari lebah ini adalah hampir sama dengan ukuran lebah *Apis cerana*.

Gambar 2.16 Lebah *Apis nuluensis*.[44]

8. Lebah Lokal Sulawesi (*Apis nigrocincta*)

Lebah *Apis nigrocincta* adalah lebah yang mirip dengan lebah *Apis cerana*, namun mempunyai warna tubuh yang lebih kuning (Gambar 2.17). Keberadaan lebah jenis ini hanya terdapat di Sulawesi.

Gambar 2.17 Lebah *Apis nigrocincta*.[43]

Beberapa spesies lebah Apis dengan berbagai ukuran tubuh dan spesifikasi warna tubuh tertuang pada Gambar 2.18.

Gambar 2.18 *Comparative* berbagai spesies *Apis*.[43]

9. Lebah Tanpa Sengat (*Trigona* spp.)

Taksonomi dari lebah tanpa sengat *Trigona* spp. adalah diklasifikasikan sebagai berikut:[6]

Kingdom : Animalia
Phylum : Arthropoda
Classis : Insecta
Ordo : Hymenoptera
Familia : Apidae
Genus : *Trigona*
Spesies : *Trigona* spp.

Salah satu subspesies Trigona adalah *Trigona clypearis friese*.

Lebah *Trigona* spp. adalah jenis lebah asli Asia yang berasal dari Genus *Trigona* (Gambar 2.19). Karakteristik spesifik dari lebah ini, yaitu menghasilkan madu yang memiliki rasa dan aroma asam, namun demikian ternyata madu ini tahan terhadap proses fermentasi yang terjadi. Selain itu, mempunyai sifat mempertahankan kedaerahan, sehingga jarang sekali hijrah ke daerah lain. Harga madu yang diproduksi oleh lebah ini diketahui lebih tinggi dibandingkan harga madu produk lebah dari genus *Apis* yang lain.

Lebah *Trigona* spp. atau lebah yang dikenal sebagai lebah klanceng ini merupakan salah satu jenis lebah madu yang paling banyak dipelihara secara tradisional oleh masyarakat pedesaan di sekitar kawasan hutan di seluruh Indonesia. Karakteristik yang paling spesifik dari lebah ini adalah tidak mempunyai sengat (*Stingless bee*) serta jinak. Lebah ini mempunyai ukuran tubuh sangat kecil, sehingga berfungsi sebagai *pollinator* atau penyerbuk pada bunga-bunga dengan ukuran kecil. *Trigona* spp. pada Bahasa Jawa disebut sebagai *malam klanceng* atau *lonceng,* adapun di daerah Sunda disebut dengan nama *gala-gala, teuweul* atau lilin lebah.

Tidak adanya *stingless bee* tersebut pada lebah Trigona adalah sebagai kompensasi dari Trigona dalam mempertahankan diri melalui produksi propolis yang lebih banyak dalam upaya mekanisme pertahanan diri, selanjutnya propolis yang diproduksi tersebut juga mempunyai peran dalam mensterilkan sarang dari mikroorganisme pengganggu baik bakteri, cendawan, maupun virus. Kuantitas dari propolis yang dihasilkan lebah Trigona adalah jauh lebih banyak dibandingkan dengan lebah yang lain, demikian juga dengan kualitas dari propolis yang dihasilkan juga cukup tinggi, yaitu dengan kadar flavonoid yang relatif tinggi dibanding lebah yang lain.

Karakteristik ukuran tubuh yang sangat mungil menyebabkan lebah ini mampu untuk mengambil nektar pada bunga yang berukuran relatif kecil. Kondisi menguntungkan ini menyebabkan lebah Trigona mempunyai variasi mendapatkan makanan dengan jenis yang lebih banyak dibanding lebah jenis Apis yang lain, sehingga sangat memungkinkan untuk dapat diternakkan secara menetap tanpa perlu harus digembalakan.

Lebah madu Trigona spp. yang berada di Hutan Pendidikan Lempake Samarinda, telah berhasil diidentifikasi ada sembilan jenis yaitu: *Trigona apicalis*, *Trigona descheri*, *Trigona Fuscibasis*, *Trigona fuscobalteata*, *Trigona insica*, *Trigona itama*, *Trigona laeviceps*, *Trigona melino*, dan *Trigona terminate*.[45]

Gambar 2.19 Lebah *Trigona* spp.[45]

Sama seperti lebah yang lain, Trigona juga merupakan serangga berkehidupan sosial yang hidup secara berkelompok membentuk suatu koloni. Satu koloni lebah jenis ini berjumlah antara 300–80.000 lebah. *Trigona* spp. banyak hidup di daerah tropis dan subtropis, di Asia Selatan dan Amerika Selatan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Blackiston H. 2017. Beekeeping for dummies. 1st Ed John Wiley and Sons. New York. Amerika Serikat.
2. Stephen WP, Bohart GE and Torchio PF. 1969. The Biology and External Morphology of Bees. Department of Printing, Oregon State University. Corvallis. Oregon
3. Mckay B. 2010. The hind quarter: animal news you can see. sweet melissa: a brief review ot the honey bee. Journal of Agricultural and Food Information. 11:63-69.
4. Idris NA. 2017. Uji aktivitas antioksidan ekstrak sarang lebah madu hutan dari Luwu Utara dengan metode DDPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Alaudin. Makassar.

5. Tautz J. 2008. The Buzz about Bees Biology of a Superorganism. Springer. Heidelberg.
6. Hutagalung JS. 2016. Rumah Lebah from Traditional to Modern Medicine. Surabaya. Airlangga University Press.
7. Jaya F. 2017. Produk-produk Lebah Madu dan Hasil Olahannya. 1st Ed. Malang. UB Press.
8. Novandra A and Widnyana IM. 2013. Peluang Pasar Produk Perlebahan Indonesia. Jakarta. BPTHHBK.
9. Moniruzzaman M, Khalil MI, Sulaiman SA and Gan SH. 2013. Physicochemical and Antioxidant Properties of Malaysian Honeys Produced by *Apis cerana*, *Apis dorsata* and *Apis mellifera*. J. Compl Altv Med, 43(13):1-12.
10. Idriss HT and Naismith JH. 2000. TNF Alpha and TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship. Microsc Res Tech. 50(3): 184-195. https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3%3C184::aid-jemt2%3E3.0.co;2-h
11. Jack C, Lucky A and Ellis DJ. 2015. Giant Honey Bee - *Apis dorsata*. Retrieved from http://entnemdept.ufl.edu/creatures/MISC/BEES/Apis_dorsata.htm
12. Kuntadi. 2008. Langkah-langkah Memaksimalkan Produksi dan Produktivitas Koloni Lebah Madu. Makalah Gelar Teknologi 5-6 Nov 2008 di Padang Pariaman Sumatra Barat. Pusat Pengembangan dan Penelitian Hutan.
13. Ericson EH, Carlson JSD and Garmen MB. 2009. A Scanning Electron Microscope Atlas of Honey Bee. Iowa. Iowa University Press.
14. Kato M, Kosaka Y, Kawakita A, Okuyama Y, Kobayashi C, Phimminith T and Thongphan D. 2008. Plant – pollinator interactions in tropical monsoonplant – pollinator interactions in tropical monsoon. J Botany, 95(11): 1375–1394.
15. Winston ML. 1987. The Biology of Honey Bee. Harvard. Harvard University Press.
16. Kek S, Chin N, Yusof Y, Tan S and Chua L. 2017. Classification of entomological origin of honey based on its physicochemical and antioxidant properties. Inter. J. of Food Prop, 20(3):2723-2738.
17. Muharani E. 2016. Pengaruh pemberian MSG (monosodium glutamate) pada tikus *Sprague-Dowley* betina usia reproduktif selama 2 minggu terhadap kadar enzim penanda kerusakan sel hati (*AST/ALT*) Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.

18. Nagir MT, Atmowidi T and Kahono S. 2016. The distribution and nest-site preference of *Apis dorsata binghami* at Maros Forest, South Sulawesi, Indonesia. Journal of Insect Biodiversity, 4(23):1–14.
19. Mokosuli YS, Kaunang ES dan Manoppo JS. 2019. Potensi Bioaktif dari *Apis dorsata Binghami*, Lebah Madu Endemik Sulawesi. UNIMA. Menado. Indonesia.
20. Rinaldhi WA, Hestianah EP, Sosiawati SM, dan Yustinasari LR. 2017. Propolis potential toward the amount of limphoblast and spleen diameter of male mice (*Mus musculus*). The Veterinary Medicine International Conference, KnE Life Sciences. 2017:386-394.
21. Lamerkabel JSA. 2011. Mengenal jenis-jenis lebah madu, produk-produk dan cara budidayanya. Jurnal Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, 9(1).
22. Hadisoesilo S. 2001. Diversity in Traditional Techniques for Enticing *Apis dorsata* Colonies in Indonesia. 37th International Apicultural Congress, Durban. 66.
23. Yang P, Peng Y, Zhao R, and Yang D. 2018. Biological characteristics, threat factors and conservation strategies for the giant honey bee Apis dorsata. Biodiversity Science, 26 (5): 476–485.
24. Robinson WS. 2012. Migrating giant honey bees (*Apis dorsata*) congregate annually at stopover site in Thailand. J Plos One, 7(9):1-9.
25. Itioka T, Inoue T, Kaliang H, Kato M, Nagamitsu T, Momose K, Sakai S, Yumoto T, Mohammad SU, Hamid AA and Yamane S. 2001. Six-year population fluctuation of the giant honey bee *Apis dorsata* (Hymenoptera: Apidae) in a Tropical Lowland Dipterocarp Forest in Sarawak. J Entomol. Soc. Am, 94(4): 545-549.
26. Bertoni R. 2013. Perbandingan ukuran-ukuran bagian tubuh lebah pekerja *Apis dorsata* (lebah hutan) pada empat lokasi. Skripsi. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan. Institut Pertanian Bogor.
27. Hamza R, and AL-Harbi M. 2014. Monosodium glutamate induced testicular toxicity and the possible ameliorative role of vitamin E or selenium in male rats. Toxicology Reports, 1: 1037-1045.
28. Murtidjo BA. 1991. Memelihara Lebah Madu. Kanisius. Jakarta Indonesia.
29. Devillers J. and Minh-Hà. 2002. Pham-Delègue. eds. Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. CRC Press.

30. Khalil MI, Mahaneem M, Jamalullail SMS, Alam N and Sulaiman SA. 2011. Evaluation of radical scavenging activity and colour intensity of nine malaysian honeys of different origin. J Api. Pro Api Med Sci. 3(1): 04-11.
31. Sholihah J. 2013. Aktivitas antibakteri dan antioksidan tiga jenis madu hutan Indonesia. Skripsi. Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor.
32. Ahmed M, Shafiq MI, Khaleeq A, Huma R, Qadir MA, Khalid A, Ali A. and Samad A. 2016. Physicochemical, biochemical, minerals, content analysis, and antioxidant potential of national and international honey of Pakistan. J Chem, 2016: 1-10.
33. Sandi NA and Salasia SIO. 2016. Alternative antibiotics source from symbiont of lactid acid bacteria inside stomach of honeybees (*Apis mellifera* and *Apis dorsata*) against multiresistant antibiotics pathogenic bacteria. J Microbio, 1-6.
34. Winston ML. 1987. The Biology of Honey Bee. Harvard. Harvard University Press.
35. Meixner MD, Pinto MA, Bouga M, Kryger P, Ivanova E. and Fuchs S. 2013. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. J Apicult Res, 52(4): 1-27.
36. Chen C, Liu Z, Pan Q, Chen X, Wang H, Guo H, Liu S, Lu H, Tian S, Li R and Shi W. 2016. Genomic analyses reveal demographic history and temperate adaptation of the newly discovered honey bee subspecies *Apis mellifera sinisxinyuan n. ssp.* J Mol Biol Evol, 33(5): 1337–1348.
37. Wallberg A, Han F, Wellhagen G, Dahle B, Kawata M, Haddad N, Simões ZLP, Allsopp MH, Kandemir I, Rúa PDl., Pirk CW. and Webster MT. 2014. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. J Nature Genetic, 46(10):1081-1190.
38. Kadri SM, Harpur, BA, Orsi RO. and Zayed A. 2016. Data descriptor: a variant reference data set for the africanized honeybee, *Apis mellifera*. J Sci Data, 3:1-6.
39. Barour C. and Baylac M. 2016. Geometric morphometric discrimination of the three African honeybee subspecies *Apis mellifera* intermissa, *A. m. sahariensis* and *A. m. capensis* (Hymenoptera, Apidae): Fore Wing and Hind Wing Landmark Configurations. J Hym Res, 52: 61-70.

40. Attanzio A, Tesoriere L, Allegra M. and Livrea MA. 2016. Monofloral honeys by sicilian black honeybee (*Apis mellifera ssp. sicula*) have high reducing power and antioxidant capacity. J Heliyon, 2(193):1-18.
41. Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO and Fett R. 2016. Honey: chemical composition, stability and authenticity. J Food Chem, 196: 309-323.
42. Paternmore DE. 2017. Pollination. Encyclopedia of Applied Plant Sciences. 2nd Ed. Reference Module in Life Sciences. 2: 2309-320.
43. Suwannapong G, Benbow ME and Nieh JC. Biology of Thai Honeybees: Natural History and Threats In: Bees: Biology. Threats and Colonies. Editor: Richard M. Florio, pp. 1-98.
44. Oldroyd B. 2018. Asian bees and their mites, parasitic flies, hunting wasps and other exotic nasties. Behaviour and Genetics of Social Insects Lab, University of Sydney.
45. Syafriza S and Marji D. 2012. Diversity of kelulut bee (Trigona spp.) in Lempake education forest. Mulawarman Scientifie, 11.(1): 11-18.

3

KARAKTERISTIK & JENIS *BEE PRODUCT*

KARAKTERISTIK

Secara karakteristik, lebah madu harus dibedakan dengan tawon meskipun keduanya mampu memberikan sengatan yang sangat menyakitkan. Namun lebah madu baru akan menyerang jika ada provokasi atau jika merasa terancam, sedangkan tawon lebih bersifat agresif dan mudah menyerang meski tanpa provokasi. Tawon dikenal juga sebagai predator, di mana setiap individu mempunyai kemampuan beberapa kali untuk menyengat, sedangkan lebah madu hanya sekali menyengat dan kemudian mati. Melakukan identifikasi perbedaan antara lebah madu dan tawon adalah penting, terkait ketepatan pada pengobatan terhadap luka maupun pengendalian hama yang tepat. Kedua serangga tersebut adalah anggota dari Kelas Insecta dan Ordo Hymenoptera, namun secara fisik terdapat perbedaan. Lebah madu beberapa di antaranya memiliki seluruh tubuhnya hitam, sementara yang lain berwarna hitam atau cokelat dengan sisiran pusat berwarna kuning atau oranye. Lebah madu memiliki kulit yang berbulu, sedangkan tawon pada umumnya memiliki kulit yang halus

mengkilap. Tawon, seperti insekta yang lain dilengkapi dengan empat sayap (dua pasang) yang berwarna cerah dengan pola hitam dan kuning.

Terdapat perbedaan pula dalam pola hidup dan habitualisnya. Koloni dari lebah madu dapat memiliki populasi lebih dari 75.000 ekor lebah, sedangkan koloni tawon memiliki populasi yang jauh lebih rendah, yaitu kurang dari 10.000 ekor tawon. Kebiasaan hidup yang berbeda lainnya adalah, pada umumnya tawon berhibernasi selama musim dingin dan membangun sarang baru pada musim gugur berikutnya, sedangkan lebah madu tidak berhibernasi. Hal ini bisa terjadi karena lebah madu memiliki cadangan makanan yang nantinya akan digunakan pada musim dingin, sedangkan tawon tidak. Selain itu, untuk menghangatkan kandang koloni ribuan pekerja dari lebah madu akan menghasilkan panas. Perbedaan yang utama adalah spesies tawon tidak menghasilkan madu, akan tetapi semua spesies lebah madu mampu menghasilkan madu dan kemudian menyimpan produk madu tersebut dengan jumlah yang sangat besar dalam sarang mereka.

Berbagai macam jenis lebah madu yang telah dijelaskan pada bab sebelumnya mempunyai karakteristik yang berbeda dalam menghasilkan produknya (*bee product*). Salah satu produk utamanya, seperti madu mempunyai kuantitas dan kualitas yang berbeda. Perbedaan tersebut dapat dipengaruhi oleh berbagai macam faktor, sebagai berikut:

1. Ketersediaan nektar dan polen sebagai pakan bagi lebah
2. Iklim, kelembapan, dan suhu
3. Proporsi jumlah lebah dalam satu koloni, jumlah semakin meningkat pada saat ketersediaan nektar paling banyak di lingkungan.

Di Indonesia, kualitas madu yang merupakan salah satu *bee product* sudah distandardisasi berdasarkan Standar Nasional Indonesia pada tahun 2013 (SNI, 2013) dengan nomor 01-3545-2013.[1] Hal tersebut dilakukan agar dapat dijadikan acuan standar bagi madu yang akan dan telah beredar di pasaran, sehingga dapat terjamin mutu dan keamanannya. Berdasarkan perkembangan ilmu pengetahuan, penggunaan madu tidak hanya sebagai asupan gizi atau nutrisi, tetapi juga dapat digunakan sebagai pengobatan

alternatif. Penggunaan utama madu dalam berbagai terapi atau pengobatan alternatif baik untuk pencegahan maupun untuk pengobatan berbagai macam penyakit seperti perawatan luka, luka bakar, maupun infeksi,[2,3] dan juga luka karena virus herpes[4] maupun kasus infertilitas baik pada jantan[5,6] maupun betina.[7,8]

Upaya untuk mendapatkan produk lebah yang berkualitas, diperlukan langkah awal dalam pemilihan bibit lebah yang unggul, di Indonesia dikenal dua jenis bibit unggul lebah madu yang diternakkan, yaitu: *Apis cerana* (bibit lokal) dan *Apis mellifera* (bibit impor). Pemilihan bibit lebah yang unggul adalah pemilihan ratu lebah, ratu lebah adalah inti dari pembentukan populasi suatu koloni lebah. Satu ratu lebah *Apis cerana* bibit unggul, mampu menghasilkan telur sebanyak 500 sampai 900 butir per hari, sedangkan satu ratu *Apis mellifera* mampu bertelur berkisar 1500 butir per hari.

Ada beberapa ciri yang harus diketahui oleh peternak atau pegiat perlebahan dalam pemilihan bibit ratu lebah, sehingga dapat menghasilkan produk lebah yang berkualitas, yaitu antara lain:

1. Umur ratu lebah antara 3 bulan sampai 1 tahun, dengan ciri-ciri fisik yang bagus dan sehat (terlihat lebih agresif).
2. Jumlah telur yang dihasilkan ratu per harinya harus melebihi target minimal.
3. Kuantitas hasil panen tinggi, baik madu, *royal jelly, bee pollen,* maupun propolis.
4. Larva lebah terlihat segar yang nantinya ditetaskan dari telur.

JENIS *BEE PRODUCT*

Beratus abad yang silam, manusia sudah mengenal dan memanfaatkan obat-obatan sebagai bahan terapi yang berasal dari bahan alam, baik yang berasal dari tumbuhan maupun hewan dan produk dari hewan seperti lebah. Beberapa tahun terakhir dan juga beberapa tahun ke depan banyak peneliti memfokuskan pada penggunaan bahan alam dari lebah tersebut, di antaranya adalah madu dan propolis. Padahal produk lebah tidak hanya dua itu saja,

antara lain adalah: *royal jelly, pollen* atau tepung sari, lilin atau malam lebah atau dikenal juga sebagai *bee wax*, dan racun lebah atau *apitoxin*.

1. Madu

Madu adalah salah satu jenis *bee product* utama dari lebah madu selain propoplis dan juga produk-produk yang lain seperti *royal jelly, pollen* atau tepung sari, lilin atau malam lebah atau dikenal juga sebagai *bee wax*, dan racun lebah atau *apitoxin*.

Definisi Madu

Madu merupakan cairan alami dan juga merupakan substansi *liquid* manis yang diproduksi oleh lebah madu dari sari bunga tanaman (floral nektar), atau sekresi bagian lain dari tumbuhan (ekstra floral nektar) yang kemudian diolah, disekresi, dan diekskresi dari serangga.[1] Madu merupakan zat yang dibuat saat nektar dan endapan manis dari tumbuhan dihisap, dikumpulkan, dimodifikasi atau diubah dengan mengombinasi substansi spesifik, dideposit, didehidrasikan, disimpan, dan ditinggalkan di sarang untuk dimatangkan dan disempurnakan.[9]

Sejak beribu tahun silam sampai saat ini, madu merupakan salah satu bahan makanan dan minuman alami yang mempunyai peranan penting dalam kehidupan manusia. Seperti diketahui, madu mempunyai berbagai manfaat pada banyak aspek, baik aspek pangan, kesehatan, maupun aspek kecantikan. Pada aspek pangan, madu sering digunakan pada berbagai bahan pemanis, penyedap pada makanan, dan campuran minuman, selain juga digunakan untuk pengobatan.

Madu dikatakan murni, jika madu tersebut tidak ditambahkan substansi lain seperti air dan pemanis. Madu merupakan salah satu bahan pangan yang mempunyai rasa manis, dengan konsistensi kental, berwarna keemasan sampai cokelat gelap disertai kandungan gula yang tinggi namun rendah lemak.[1] Madu yang diproduksi oleh lebah memiliki karakteristik yang berbeda karena sangat bergantung pada sumber nektar tersebut berasal. Madu terasa manis karena terdiri atas monosakarida (karbohidrat), fruktosa, dan glukosa sehingga

memiliki derajat kemanisan yang relatif menyerupai gula pasir yang berasal dari tebu.

Madu dikenal sebagai salah satu pengobatan tradisional tertua yang sangat efektif untuk dimanfaatkan sebagai pengobatan berbagai penyakit infeksi, seperti pernapasan atau pada kondisi sesak napas, infeksi pada saluran pencernaan disertai kondisi diare[10] dan berbagai penyakit lain seperti gangguan reproduksi pada hewan coba jantan[5,6] dan betina[7,8] akibat kondisi malnutrisi. Madu juga telah lama digunakan untuk mengatasi kasus luka, baik karena luka bakar maupun karena luka infeksi (*borok*) yang disertai bau dan rasa sakit.[11] Pada aspek kesehatan, madu juga dapat dimanfaatkan untuk mengatasi rasa kelelahan dan letih yang sangat, sedangkan untuk aspek kecantikan fisik, madu dapat digunakan sebagai penghalus kulit wajah dan tubuh, serta pertumbuhan pada rambut yang mengalami kebotakan.[12]

Madu adalah salah satu sumber makanan yang sangat lengkap, karena madu mengandung berbagai zat yang dibutuhkan oleh tubuh. Beberapa zat tersebut seperti protein, asam amino, karbohidrat, dan beberapa jenis vitamin serta mineral yang semuanya dapat dengan mudah diserap oleh tubuh. Beberapa mineral penting yang terkandung di dalam bahan madu antara lain seperti kalium, magnesium, potassium, klorin, sodium, zat besi, sulfur, dan fosfat. Kandungan vitamin yang terdapat di dalam bahan madu antara lain seperti vitamin B1, B2, B6, dan vitamin E, serta vitamin C[13] Seperti diketahui, vitamin C dan vitamin E merupakan sumber antioksidan yang diperlukan oleh tubuh untuk mengatasi reaksi oksidatif yang berujung pada kerusakan sel. Namun demikian kandungan madu dan kapasitas antioksidan dari madu tergantung dari sumber flora, musim, lingkungan, pengolahan,[14] penyimpanan, letak geografis, dan faktor entomologis.[15]

Madu berdasarkan asal nektarnya dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis. Madu poliflora atau multiflora, adalah madu yang memiliki sumber nektar lebih dari satu jenis bunga, sedangkan madu uniflora atau monoflora, adalah madu yang bersumber dari satu jenis nektar saja. Madu yang memiliki satu jenis flora diberi nama berdasarkan asal tumbuhannya seperti, *Accacia honey, Sunflower honey*,[16] madu rambutan, madu kelengkeng,

madu kaliandra, madu mangga, dan madu randu. Perbedaan asal tumbuhan tersebut memengaruhi kandungan madu.[14] Madu monoflora mempunyai spesifikasi baik warna, wangi, dan rasa yang spesifik sesuai dengan sumber nektarnya.

Madu multiflora adalah merupakan madu yang berasal dari nektar beberapa jenis nektar dari tanaman bunga. Madu ini pada umumnya didapatkan dari hutan dan yang diproduksi oleh lebah liar. Dikarenakan jenis madu yang berbeda-beda tergantung dari sumber nektar tanaman yang berada pada hutan tersebut, maka memungkinkan untuk memiliki aktivitas antibakteri yang berbeda. Sumber nektar yang berbeda tentunya akan memengaruhi sifat madu yang dihasilkan oleh lebah, baik dari segi rasa, warna, dan komponen dari madu. Komposisi nutrisi madu dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Komposisi Nutrisi Madu.[22]

Komposisi Nutrisi di dalam Madu	Jumlah
Kalori	328 kal
Protein	0.5 g
Karbohidrat	82.4 g
Kadar air	17.2 g
Abu	0.2 g
Tembaga	4.4–9.2 mg
Mangan	0.02–0.4 mg
Fosfor	1.9–6,3 mg
Besi	0,06–1,5 mg
Magnesium	1.2–3.5 mg
Thiamin	0.1 mg
Riboflavin	0.02 mg
Niasin	0.20 g
Lemak	0,1 g
Asam	43.1 mg
pH	3.9

Beberapa penelitian membuktikan bahwa madu dapat menjadi penghambat pertumbuhan dari bakteri yang bersifat patogen. Bakteri tersebut,

seperti *Staphylococcus aureus, Escherichia coli*, dan *Listoria monocytogenes*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan terjadinya zona atau daerah penghambatan yang dihasilkan oleh madu. Namun demikian berdasarkan penelitian menunjukkan bahwa produksi maupun jenis madu yang dihasilkan bergantung pada berkembangnya bunga vegetatif alami yang berbunga pada musim yang berbeda. Oleh karena itu, bunga dari nektar yang dikumpulkan oleh lebah dalam upaya untuk menghasilkan madu juga akan memberikan pengaruh yang berbeda pada aktivitas antibakteri dari madu tersebut.[17] Berdasar sifat antibakteri ini, maka madu juga dapat digunakan sebagai pengawet makanan yang alami dan aman, khususnya sebagai pengawet dari daging segar. Seperti telah diketahui bahwa daging merupakan bahan makanan dengan kandungan gizi yang lengkap sehingga mudah mengalami kerusakan. Pemanfaatan madu bertujuan untuk memperlambat proses kerusakan selain juga memberikan cita rasa yang khas dari madu.

Kandungan utama dari madu adalah berupa gula dan air, adapun kandungan lain dari madu adalah protein, vitamin, enzim, mineral dan senyawa polifenol.[18] Gula yang terdapat di dalam madu ada beberapa jenis, seperti monosakarida 75%, disakarida 10–15%, dan sejumlah kecil yang lain. Keberadaan gula di dalam madu bertanggung jawab terhadap nilai energi, viskositas, higroskopitas, dan granulasi. Kandungan nutrisi protein yang terkandung dalam madu berbentuk enzim dan monomer asam amino atau protein nonenzim yang didapatkan dari proses sekresi dan nektar bunga.[19] Enzim yang terdapat di dalam madu antara lain terdiri atas *katalase, glukosa oksidase, invertase*,[20] *fosfatase acid, diastase* serta α, dan β-*glukosidase*.[19]

Protein nonenzim yang utama dan menentukan kualitas madu adalah *proline*.[16] *Proline* diproduksi melalui sekresi lebah madu selama konversi nektar menjadi madu.[16,20] *Proline* digunakan sebagai indikator kematangan dan kemurnian madu.[19,21]

Madu merupakan hasil sekresi dari lebah, di mana madu yang diproduksi ditempatkan pada bagian khusus yang ada di dalam perut lebah yang disebut sebagai perut madu. Bagian dari perut madu ini terpisahkan dari perut besar. Adapun nektar yang dihisap lebah madu mengandung 60% air, sehingga

lebah harus dapat menurunkannya menjadi 20% atau lebih rendah lagi untuk menjadikan madu tersebut berkualitas. Penurunan kadar air yang dikandung ini dapat terjadi melalui dua proses, yaitu baik sacara fisis maupun khemis.

Proses fisis penurunan kadar air diawali dari lebah menjulurkan lidahnya atau yang dikenal sebagai *proboscis* dalam rangka untuk memindahkan madu dari perut madu ke dalam sarang, selanjutnya di dalam sarang, kadar air akan terus diturunkan melalui putaran dan kibasan sayap-sayap lebah sehingga memberikan sirkulasi hawa yang hangat ke dalam sarang lebah. Adapun proses kimiawinya terjadi di dalam perut lebah di mana terdapat enzim *invertase* yang akan mengubah sukrosa (disakarida) menjadi glukosa dan fruktosa yang keduanya adalah merupakan monosakarida.

Penelitian yang terkait kualitas madu menunjukkan terdapat korelasi positif antara total senyawa fenol dengan warna gelap madu.[21] Semakin gelap warna dari madu yang diamati, maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Semakin terang warna madu, maka dapat dikatakan semakin rendah aktivitas antioksidannya.[16,18,20] Selain antioksidan, hal tersebut juga berbanding lurus dengan kandungan mineral yang terdapat di dalamnya. Semakin gelap warna dari madu, maka semakin tinggi pulalah kandungan mineralnya.[19]

Madu diproduksi oleh lebah madu dengan mensekresikan nektar bunga dan mensekresikan eksudat dari serangga penghisap tumbuhan. Pemanfaatan madu telah digunakan sejak lama sebagai makanan dan pengobatan. Madu telah digunakan oleh tabib pengobatan tradisional dan diteliti memiliki efek dalam kajian kedokteran modern.[18]

Madu merupakan salah satu sumber dari makanan yang mengandung nutrisi lengkap. Madu juga dapat digunakan sebagai pengganti gula atau makanan suplemen. Konsumsi madu sangat bermanfaat sebagai makanan untuk kesehatan, yaitu dapat meningkatkan stamina dari tubuh pada saat dibutuhkan energi ekstra. Berdasar berbagai literatur, menyebutkan bahwa madu sebagai produk lebah ini dapat digunakan sebagai penyembuhan berbagai macam penyakit dalam, seperti paru-paru, jantung, lambung dan sistem pencernaan, influenza, katarak, luka infeksi atau borok, dan juga luka bakar serta berbagai penyakit yang lain. Gula dan mineral yang terkandung

dalam bahan madu dapat berfungsi sebagai tonikum bagi kesehatan jantung. Antioksidan yang terkandung di dalam madu diyakini juga mampu mencegah kejadian berbagai kasus penyakit berat lainnya, baik seperti penyakit jantung, kanker, ataupun kasus penyakit yang lain. Madu juga banyak dimanfaatkan dalam dunia kecantikan dan bidang kosmetik, baik dalam bentuk sabun, krim, atau masker. Selanjutnya madu dengan perannya sebagai antibakteri juga mempunyai kemampuan untuk membunuh dan mencegah kuman agar tidak berkembang, sehingga madu juga dipercaya dapat menyembuhkan berbagai macam luka infeksi atau borok. Luka yang dapat disembuhkan seperti luka bakar, luka infeksi, luka pascaoperasi, dan lain-lain.

Madu yang diketahui mengandung beberapa vitamin seperti vitamin E dan C, serta vitamin B1, B2, dan B6. Madu juga memiliki derajat keasaman yang rendah, yaitu dengan pH sekitar 3,9. Kandungan air dari madu sekitar 17%, dengan aktivitas air antara 0,56 sampai 0,62. Selain itu, terkandung juga asam glukonat dan protein serta asam amino. Selanjutnya madu juga mengandung senyawa organik penting dan yang telah teridentifikasi adalah *polyphenol, flavonoid,* dan *glukosida* serta beberapa enzim, antara lain enzim *glukosa oksidase* dan enzim *invertase* yang berperan dalam proses pengolahan sukrosa untuk diubah menjadi glukosa dan fruktosa yang keduanya mudah diserap dan dicerna. Enzim berikutnya yang juga terkandung di dalam madu adalah enzim amilase dan enzim lipase serta minyak *volatile*, seperti hidroksi metil furfural. Madu juga mengandung lilin dan asam formic serta mengandung dekstrosa. Dekstrosa adalah gula yang biasanya ditemukan pada tanaman.

Komposisi kimia dari madu yang bervariasi tersebut, tergantung dari sumber tanaman, musim, maupun bagaimana metode produksinya. Komposisi akhir juga dipengaruhi dari kondisi penyimpanan, yaitu berupa peningkatan proporsi disakarida selama waktu penyimpanan. Kandungan dua gula utama penyusun madu adalah fruktosa sekitar 38% dan glukosa sekitar 31%, dengan jumlah sukrosa yang kecil, sekitar 1%, serta disakarida dan oligosakarida yang lain. Adapun mineral utama yang terdapat di dalam madu adalah *potassium*. Selanjutnya mineral yang terkandung di dalam madu adalah sebagai berikut: Ca, P, Fe, Mg, dan Mn.

Di Indonesia, jenis lebah yang paling banyak dimanfaatkan sebagai sumber madu adalah lebah *Apis cerana* atau lebah lokal, lebah *Apis dorsata* atau lebah hutan dan lebah import atau *Apis mellifera*). Ada beberapa jenis madu berdasarkan karakteristiknya. Karakteristik dari madu dibedakan atas dasar sumber nektar, letak geografis, dan teknologi pemrosesannya. Jenis madu berdasar sumber nektarnya dapat dibagi menjadi dua, yaitu madu monoflora dan madu multiflora. Madu monoflora merupakan madu yang didapatkan dari satu nektar seperti madu kaliandra, madu kelengkeng, madu manga, madu rambutan, dan madu randu. Madu monoflora mempunyai ciri khas aroma wangi serta mempunyai warna dan rasa yang spesifik sesuai dengan sumber asalnya. Madu monoflora yang juga disebut madu ternak, hal ini dikarenkan madu jenis ini pada umumnya diternakkan. Madu poliflora merupakan madu yang bersumber dari nektar beberapa jenis tanaman bunga. Ada kecenderungan dari lebah adalah mengambil nektar dari satu jenis tanaman dan baru mengambil dari tanaman lain bila belum mencukupi. Contoh dari madu jenis poliflora ini adalah madu hutan. Madu hutan adalah madu yang diproduksi oleh lebah liar yang dikenal dengan nama *Apis dorsata*. Sumber makanan dari lebah hutan ini adalah berasal dari tanaman atau tumbuhan yang banyak tumbuh di hutan hujan tropis.

Madu dapat dicirikan berdasarkan letak geografis di mana madu tersebut dihasilkan atau diproduksi, seperti contohnya madu Cina, madu Yaman, madu Arab, dan lain-lain. Madu juga dapat dibedakan berdasarkan proses pengambilannya, yaitu madu ekstraksi (*extracted honey*) dan madu paksa (*strained honey*). Madu ekstraksi adalah madu yang cara mendapatkannya melalui proses ekstraksi, yaitu dengan menggunakan alat ekstraktor di mana tidak sampai merusakkan sarang lebah, sedangkan *strained honey* adalah madu yang cara mendapatkannya melalui metode pengepresan, sehingga sarang lebah mengalami kerusakan akibat proses pengepresan dan penekanan atau dengan cara lain yang memaksa. Perbandingan hasil madu yang didapat dengan cara ekstraksi (*filtered honey*) dibandingkan dengan cara pemerasan (*strained honey*).

Spesifikasi Madu Berdasarkan Jenis

Jenis madu dibedakan menjadi dua berdasarkan sumber nektar (bunga), yaitu madu monofloral dan madu multifloral. Madu monofloral adalah jenis madu yang disekresi oleh lebah berasal hanya dari satu jenis tanaman, misal Kaliandra, Randu, Kapuk, Mangga, dan lain-lain. Sebagai contoh madu Randu merupakan madu yang berasal dari nektar tanaman Randu, sedangkan madu Kaliandra adalah madu yang berasal dari nektar tanaman Kaliandra. Oleh karena itulah madu floral hanya didominasi atau terdiri atas satu jenis nektar. Adapun madu multifloral adalah madu yang didapat dari nektar bermacam-macam jenis tanaman, sebagai contoh adalah madu hutan, adalah madu di mana lebah mendapatkan nektar berasal dari beberapa jenis tanaman yang terdapat dalam suatu area tertentu di mana hutan tersebut berada.

Berdasarkan sumber asal nektar, jenis-jenis madu yang dihasilkan, antara lain yaitu:

a. Madu floral

   Madu floral adalah madu yang diproduksi atau dihasilkan dari nektar bunga. Jika nektar bunga tersebut berasal dari berbagai macam bunga, maka madu tersebut dikatakan sebagai madu multiflora dan jika hanya terdiri atas satu jenis tanaman disebut madu monoflora. Nektar yang disekresi oleh berbagai macam jenis bunga adalah dengan komposisi sekitar 95% substansi gula, sedangkan sisanya 0,05% asam amino, 0,02–0,045% mineral serta asam organik, vitamin, dan senyawa *volatile* dengan jumlah yang terbatas.

b. Madu ekstrak floral

   Madu ekstrak floral adalah madu yang diproduksi atau dihasilkan dari nektar selain bagian dari tanaman atau bunga, yaitu seperti bagian dari cabang, daun, dan batang.

c. Madu Embun (*Honeydaw*)

   Madu embun atau dikenal dengan sebutan *honeydew* merupakan produk sekresi yang diproduksi atau dihasilkan oleh serangga seperti kumbang-

kumbang kecil dari famili *Psyllidae, Lechnidae* atau *Lechanidae,* di mana eksudat yang dihasilkan diletakkan pada bagian-bagian tanaman. Kemudian hasil dari sekresi yang berasal dari pencernaan serangga tersebut dikeluarkan dalam bentuk embun dan kemudian selanjutnya dikumpulkan oleh lebah yang kemudian diproses di dalam sarang.

d. Madu Organik

Madu organik merupakan madu yang diproduksi oleh peternak lebah dari tumbuh-tumbuhan organik. Komposisi madu organik tidak memiliki perbedaan dengan madu normal atau madu yang lain, namun madu organik tidak terdapat residu pestisida yang digunakan dalam tahap proses produksi seperti madu yang lain.

Komposisi madu seperti diketahui bervariasi bergantung dari sumber nektar bunga berasal, namun demikian faktor musim dan lingkungan juga dapat berpengaruh terhadap komposisi atau susunan dan efek biologisnya, secara lengkap komposisi madu tertuang pada Tabel 3.2 di bawah ini.

Tabel 3.2 Komposisi Madu dan Nilai Komposisi dalam g/100g.[2]

	Madu Blossom		Madu *Honeydew*			Madu *Blossom*		Madu *Honeydew*	
	Re-Rata	**Min-Maks**	Re-Rata	Min-Maks		**Re-Rata**	**Min-Maks**	**Re-Rata**	**Min-Maks**
Air	17,2	15-20	16,3	15-20	Erlose	0,8	0,56	1,0	0,16
Fruktosa	38,2	30-45	31,8	28-40	Oligosakarida lainnya	3,6	0,5-1	13,1	0,1-6
Glukosa	31,3	24-40	26,1	19-32	Total Gula	**79,7**		80,5	
Sukrosa	0,7	0,1-4,8	0,5	0,1-4,7	Mineral	0,2	0,1-0,5	0,9	0,6-2
Disakarida lainnya	5,0	28	4,0	16	Asam Amino, Protein	0,3	0,2-0,4	0,6	0,4-0,7
Melezitose	< 0,1		4,0	0,3-22,0	Asam	0,5	0,2-0,8	1,1	0,8-1,5

Karakteristik Madu

Karakteristik Fisik Madu

Karakteristik fisik merupakan salah satu karakteristik madu, selain karakteristik biokimiawi.

a. Higroskopis (menarik air)

Madu mempunyai sifat higroskopis, yaitu artinya bahwa madu mempunyai kemampuan untuk menyerap uap air dari udara sekitarnya sampai mencapai keseimbangan. Kemampuan menyerap air ini akan menyebabkan madu menjadi lebih encer karena menyerap kelembapan udara dari sekitarnya. Sifat higroskopis ini dapat terjadi dikarenakan madu merupakan larutan gula yang begitu jenuh atau dikenal dengan istilah *supersaturated solution* yang juga bersifat tidak stabil. Namun demikian, karena negara Indonesia mempunyai kelembapan relatif (RH) yang cukup tinggi yaitu sekitar 60–90%, sehingga hal ini mengakibatkan madu yang berkadar air tinggi menjadikan viskositas madu lebih encer, lalu pada akhirnya madu mudah terfermentasi. Madu yang mempunyai sifat mudah terfermentasi dapat dikatakan madu tersebut mempunyai kualitas yang rendah.

b. Tekanan Osmosis

Madu seperti yang diketahui adalah merupakan larut lewat jenuh atau disebut *supersaturated solutio*n dari karbohidrat, sehingga madu dapat dikatakan sebagai medium hiperosmotik. Ada sekitar 84% padatan pada madu adalah campuran dari dua monosakarida, yaitu fruktosa dan glukosa. Oleh karena itulah, jika terdapat organisme bersel satu masuk ke dalam medium hiperosmotik, maka organisme tersebut akan mati terbunuh dikarenakan kehilangan cairan tubuh sebagai akibat terjadinya perbedaan tekanan osmosis yang sangat besar. Lebih lanjut adanya interaksi yang kuat antara molekul gula dengan molekul air, sehingga menyebabkan ketersediaan air untuk mikroorganisme menjadi terbatas. Adapun tekanan osmosis pada madu adalah lebih besar dari 2000 *miliosmols*.

c. Kadar air

Kadar air yang terkandung dalam madu adalah merupakan salah satu faktor penentu utama dari kualitas madu. Jika kadar air yang terlalu tinggi di dalam madu, maka akan menjadi penyebab rendahnya kualitas madu. Ada beberapa faktor yang dapat menjadi penyebab tinggi kadar air di dalam madu, yaitu faktor pengelolaan saat panen, demikian juga kondisi iklim, serta jenis dari nektar atau cairan manis yang telah dikumpulkan oleh lebah.

Konsentrasi atau kandungan air yang terdapat pada sisiran madu adalah berasal dari nektar yang dimatangkan oleh lebah, dan hal tersebut tergantung pada beberapa faktor. Beberapa faktor yang dapat memengaruhi proses pematangan madu, antara lain seperti kondisi cuaca, kadar air awal nektar, laju sekresi, dan kekuatan dari koloni lebah. Kadar maksimum yang masih diizinkan sebagai standar air yang terkandung di dalam madu di Indonesia adalah 22%.[1]

Kadar air yang terdapat atau terkandung di dalam madu yang terdapat pada sarang lebah sebenarnya telah mengalami penurunan kadar air karena adanya perbedaan tekanan uap antara udara luar dengan cairan bakal madu. Terjadinya perbedaan tekanan uap air ini disebabkan oleh kipasan sayap lebah yang berfungsi sebagai pengatur ventilasi pada sarang, sehingga kadar air menjadi turun sampai mencapai 15 sampai 20%. Kemudian sel akan ditutup menggunakan lilin yang diproduksi juga pada bagian perut lebah. Konsentrasi air ini tergantung pada beberapa faktor yang dapat memengaruhi pematangan pada madu, salah satu faktor yang termasuk adalah kondisi awal kadar air pada nektar. Selanjutnya selain hal tersebut adalah kondisi cuaca, kekuatan koloni lebah, maupun laju sekresi. Oleh karena itulah madu yang telah diekstraksi dari sarang madu (*frame*), dianjurkan diletakkan dalam wadah yang kedap udara dan juga dilakukan secara higienis agar tidak terjadi kontaminasi.

d. Viskositas (Kekentalan)

Viskositas merupakan salah satu karakteristik fisik dari madu. Viskositas pada madu sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti: suhu, jenis flora bunga, dan kadar air. Viskositas pada madu akan menjadi turun jika kadar air dan suhu yang meningkat. Pengaruh peningkatan kadar air sebesar 1%, setara dengan peningkatan suhu 35°C. Pada suhu yang sama, misalnya 25°C madu dengan kadar air 16,5%, yang berasal dari flora *sage*, mempunyai viskositas 115 poise. Madu dengan spesifikasi sama namun berasal dari *sweet clover*, ternyata hanya mempunyai visikositas sebesar 87.5 poise.

Dikarenakan kandungan protein yang kecil sekali pada madu, maka bersama-sama dengan mineral dan vitamin yang jumlahnya hanya sekitar 0,5%. Namun, protein madu meskipun jumlahnya sangat kecil, secara fungsional memiliki sifat yang penting khususnya dengan sifat koloidalnya. Sifat-sifat aliran "*newtonian*"nya menyebabkan madu digunakan sebagai produk makanan di mana kemantapan viskositas dapat dijadikan parameter yang penting, seperti misalnya sebagai produk yang dioleskan ataupun berupa saus. Sifat fisik madu seperti viskositas membuat madu sangat cocok sekali untuk digunakan sebagai tujuan tertentu seperti zat pengental atau pengikat atau *coating*. Selain hal tersebut dengan pH sekitar 3,1 madu sangat cocok digunakan pada produk saus dengan pH rendah ataupun *salad dressing*, di mana rasa manis sesuai dengan yang diinginkan sebagai salah satu yang menjadi ciri khas dari produk tersebut.

Madu yang baru diekstraksi adalah berupa cairan kental. Kekentalan dari madu ini tergantung pada komposisi madu, terutama kandungan airnya. Demikian halnya jika terjadi peningkatan suhu, maka kekentalan madu akan menjadi turun.

e. Titik Beku

Salah satu sifat fisik madu adalah menurunkan terjadinya titik beku. Madu yang mempunyai kadar air 15%akan membeku pada

suhu 1,42–1,53°C, sedangkan suatu larutan yang lain baru akan beku pada suhu sekitar –12°C. Madu merupakan larutan lewat jenuh atau *supersaturated solution* karena mempunyai kandungan gula, baik berupa fruktosa maupun glukosa. Seperti diketahui glukosa memiliki sifat yang mudah mengkristal, sehingga madu adalah mudah dan dengan cepat mengalami kristalisasi jika rasio glukosa tinggi.

Laju proses kristalisasi dari madu paling cepat terjadi pada suhu sekitar 14°C. Oleh karena itu, madu sebaiknya disimpan pada suhu antara 20–27 derajat *celsius* di dalam kemasan yang kedap udara. Namun demikian pada madu yang jernih jarang sekali ditemui mengalami proses kristalisasi. Proses kristalisasi ini menjadi hilang jika madu dipanaskan.

Perlu dikenal juga istilah "madu set" atau madu yang tidak jernih. Cara pembuatan madu set adalah dengan cara memasukkan inti kristal pada ukuran tertentu ke dalam produk. Selanjutnya bahan tersebut dijaga dengan memberikan pengendalian keadaan, suhu, dan lain-lain untuk menjaga agar kristal yang dibentuk memiliki ukuran yang tepat seperti yang dikehendaki. Oleh karena itu, sifat akhir produk sangat bergantung dengan ukuran kristal.

Madu cenderung membentuk kristal pada proses penyimpanan pada suhu kamar. Pada umumnya kebanyakan orang berpikir bahwa jika madu mengkristal, maka ada anggapan bahwa madu tersebut berkualitas buruk ataupun sudah ditambahkan gula.

Madu yang mengkristal dapat terjadi sebagai akibat dari pembentukan kristal glukosa monohidrat yang juga tergantung baik dari segi komposisi maupun kondisi penyimpanan madu. Pembentukan kristal dapat dipercepat jika kandungan airnya makin rendah sedangkan kadar glukosanya tinggi. Selama proses pengkristalan, kandungan air yang berada di dalam madu tidak terikat dan hal ini mengakibatkan terjadinya fermentasi pada madu.

f. Berat Jenis

Berat jenis madu juga dipengaruhi salah satunya oleh kadar air, sedangkan sumber jenis bunga sedikit berpengaruh pada berat jenis. Berat jenis madu dengan kadar air 15% adalah sekitar 1.435, adapun berat jenis madu dengan kadar air 18% adalah sekitar 1,417 pada suhu 20°C. Kedua kadar air tersebut baik 15% maupun 18% adalah dua jenis kadar air yang umum ditemui di pasaran.

g. Aktivitas Air

Aktivitas air yang terkandung di dalam madu tergantung pada kadar air dan juga suhu, selain itu keasaman dari madu juga berpengaruh terhadap aktivitas air meskipun sedikit. Aktivitas air pada umumnya dijumpai pada suhu antara 4 sampai 37°C dengan persentase kadar air 16% adalah 0,5 sedangkan pada persentase kadar air 18,3% adalah 0,6.

h. Tegangan Permukaan (*surface tension*)

Tegangan permukaan dari madu adalah rendah, sehingga sering digunakan sebagai campuran kosmetik. Faktor apa saja yang memengaruhi tegangan permukaan pada madu selain sumber dari nektar, juga kandungan zat koloidnya. Namun demikian, jika tegangan permukaan madu yang rendah tersebut disertai kekentalan yang tinggi, maka akan terbentuk madu yang berbusa.

i. Suhu

Madu dengan sifat yang lambat menyerap suhu lingkungan ternyata bergantung pada komposisi dan derajat pengkristalannya. Namun demikian adanya sifat madu yang mampu menghantarkan panas dan kekentalan yang tinggi menjadi penyebab madu mudah mengalami *overheating* (kelebihan terhadap panas). Oleh karena sifat madu yang mudah menghantarkan panas, maka madu juga memiliki kekentalan yang tinggi, sehingga proses pemanasan dan pengadukan pada madu harus dilakukan dengan hati-hati. Apabila telah terbentuk kristal pada madu, maka dapat dipanaskan pada suhu *blanching,* yaitu berkisar antara 35–40°C sampai didapatkan madu mencair kembali.

j. Warna Madu

Warna alami dari madu pada umumnya adalah kuning kecokelatan seperti warna gula karamel. Namun demikian, warna madu sangat bervariasi, mulai dari transparan hingga berwarna amber gelap. Warna dari madu sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti sumber nektar, umur panen madu, waktu, dan kondisi penyimpanan. Madu yang didapatkan dengan cara pemanenan cepat akan menghasilkan warna yang lebih terang dibandingkan dengan pemanenan yang dilakukan secara lambat. Selanjutnya, warna madu juga ditentukan oleh kualitas sarang dan juga subspesies lebah. Adapun warna bening atau tidaknya madu sangat ditentukan oleh partikel yang tercampur, seperti ada tidaknya *pollen*. Madu yang mengalami proses kristalisasi, akan memiliki warna lebih terang karena kristal glukosan yang dikandungnya berwarna putih.

Konsumen pada umumnya menyukai madu dengan warna yang terang, hal ini disebabkan konsumen lebih mementingkan tingkat kualitas dari madu (*grade*), yang mengindikasikan warna terang mempunyai tingkat kualitas yang lebih tinggi. Pada perdagangan Internasional, madu memiliki harga paling tinggi jika berwarna "*extra light*" dan "*white*". Madu berwarna terang pada umumnya banyak dipilih sebagai pelengkap makanan atau minuman, dikarenakan warna terang tersebut tidak memengaruhi warna makanan atau minuman tersebut. Adapun madu dengan harga yang lebih murah adalah dengan warna "*light amber*" dan madu dengan warna yang lebih gelap, akan mempunyai harga yang lebih murah lagi. Oleh karena itulah madu dengan warna gelap ini biasanya digunakan untuk keperluan industri, sebagai bahan tambahan. Namun demikian ada beberapa negara yang lebih menyukai madu dengan warna gelap, seperti Jerman dan Swiss.

Warna madu yang tampak masih segar juga dipengaruhi oleh kandungan dari mineralnya. Madu dengan warna yang gelap menunjukkan bahwa madu tersebut banyak mengandung mineral yang

tinggi. Jenis mineral yang terkandung pada madu beberapa di antaranya dituangkan pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Komposisi Mineral dalam Madu.[22]

Beberapa Mineral	Konsentrasi dalam 100 g
Magnesium (Mg)	1.20–3.50 mg
Mangan (Mn)	0,02–0.40 mg
Kalsium (Ca)	4.40–92.0
Tembaga (Cu)	0.03–0.10 mg
Besi (Fe)	-
Posfor (P)	1.90–6.30 mg
Natrium (Na)	0.00–7.60 mg
Zinc atau Seng (Zn)	0.03–0.40 mg

k. Aroma Madu

Aroma dari madu berasal dari zat organik atau zat aromatik (khas madu) yang mudah menguap (*volatile*) yang terkandung dalam madu. Zat aromatik sebagai penyusun komposisi dalam madu sangat bervariasi. Hal inilah yang menjadikan wangi madu menjadi spesifik dan unik sesuai dengan nektarnya. Beberapa zat aromatik dari madu yang umum adalah campuran karbonil *(asetaldehid, aseton, propionaldehyd, formaldehid, metil etil, keton,* dan lain-lain), minyak esensial serta ikatan ester (*propionate* atau asam *benzoate*) (Tabel 3.4).

Aroma madu yang berasal dari sel kelenjar bunga, zat tersebut dikeluarkan dan bercampur di dalam nektar. Selain itu, aroma madu yang juga merupakan hasil dari proses fermentasi dari asam amino, gula, dan vitamin selama proses pematangan madu. Aroma dari madu tidak bertahan lama, hal ini dikarenakan zat tersebut akan menguap selama penyimpanan, apalagi jika cara penyimpanan dilakukan dengan kurang baik.

Tabel 3.4 Terbentuknya Aroma Madu.[23]

Kandungan Karbonil	Kandungan Alkohol	Ester
Buteraldehyde	*Ethanol*	*Methyl formate*
Acetaldehyde	*Benzyl alcohol*	*Dietyl ether*
Aceton	*B-methallil alcohol*	*Ethyl formate*
Methacrolein	*2-methyl-1-buthanol*	
Methyl ethyl ketine	3-methyl-1-buthanol	
Propionaldehyde	32-methyl-2-buthanol	
Formaldehye	Isobuthanol	
Isovalaradehyde	2-buthanol	
3-pentanol		
n-butanal		
n-pentanol		
n-propanol		
Phenylethyl alcohol		

l. Rasa Madu

Rasa madu pada indera pengecap ditimbulkan oleh karena adanya kandungan asam organik, karbohidrat, dan jenis nektarnya. Hampir semua madu memiliki rasa yang manis dan agak sedikit asam. Rasa yang manis pada madu tergantung dari perbandingan antara karbohidrat, fruktosa dengan glukosa yang terkandung di dalam nektar tanaman. Rasa pada madu dapat mengalami perubahan menjadi kurang enak dan masam jika disimpan pada suhu di atas 30°C.

Karakteristik Biokimiawi Madu

Pada umumnya, madu mempunyai nilai pH sekitar 3,9 dengan rentang antara 3,4 sampai 6,1 dan persentase asam 0,57 dengan rentang antara 0,17–11.7% terutama asam glukonat. Selain itu, madu juga mengandung sedikit beberapa senyawa seperti protein (0,26%), nitrogen (0,04%), asam amino (0,05–0,10%) dengan titik isoelektriknya pada angka 3,5.

Madu mempunyai senyawa yang kompleks, di mana telah teridentifikasi 181 macam senyawa dalam madu. Komposisi madu tergantung pada dua faktor utama, yaitu komposisi nektar asal madu dan faktor-faktor eksternal. Madu yang dihasilkan sangat sulit untuk diharapkan mempunyai mutu yang sama. Hal ini dikarenakan ada pengaruh beberapa faktor seperti kondisi topografi yang tidak sama, perbedaan iklim, pola pertanian dan peternakannya, lama waktu penyimpanan, metode pengujian sampel yang berbeda, serta yang tak kalah pentingnya adalah sumber nektar sebagai bahan dasar madu.

Tabel 3.5 Komposisi Madu Menurut Beberapa Sumber.[22]

Komposisi Madu	A	B	C	D	E
Kadar (%)	17.20	20.00	23.00	17.20	17.10
Dekstrosa (%)	31.30	-	-	-	31.00
Fruktosa (%)	38.20	-	-	-	38.50
Maltosa (%)	7.30	-	-	-	7.20
Sukrosa (%)	1.30	-	-	-	1.5
Oligosakarida (%)	1.50	-	-	-	-
Karbohidrat (%)	79.60	79.50	76.00	8.30	82.40
Glukonolaktone (%)	0.14	-	-	-	-
Asam bebas (%)	0.43	-	-	-	-
PH	3.90	-	-	-	3.90
Total asam (%)	0.57	-	-	-	0.57
Nitrogen (%)	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04
Nilai diastase	20.80	-	-	-	-
Kadar abu (%)	0.17	0.22	-	0.20	-
Fosfor (mg)	-	16.00	-	6.00	1.90-6.30
Natrium (mg)	-	-	-	5.00	0-0.76
Besi (mg)	-	0.90	0.40	0.50	0.06-1.50
Kalium (mg)	-	-	-	51.00	13.2-168
Kalsium (mg)	-	5.00	5.00	5.00	4.4-9.20
Thiamin (mg)	-	-	0.05	Trace	<0.006
Vitamin A (mg)	-	0.00	Trace	0.00	-
Vitamin C (mg)	-	4.00	-	0.00	2.2-2.40
Niacin (mg)	-	-	Trace	0.30	<0.36
Riboflavin (mg)	-	-	0.02	0.04	<0.06

Keterangan: a. White *et al.* (1975), b. Direktorat Jendral Kesehatan Republik Indonesia (1980), c. Suhardjo *et al.* (1985), d. Sukartiko (1986), e. *The honey Board* (2001). (-) Tidak ada data.

a. Karbohidrat

Komponen karbohidrat utama dari madu adalah dalam bentuk gula dengan jumlah yang cukup besar yaitu 80% atau lebih. Adanya komponen karbohidrat berupa fruktosa dan dekstrosa (glukosa) yang cukup tinggi kadarnya berkisar antara 85–90% dari total gula yang terkandung di dalam madu, sisanya adalah disakarida, polisakarida, dan oligosakarida. Kandungan dari fruktosa dan glukosa merupakan parameter untuk membedakan antara madu dengan gula pasir di mana kandungan gulanya adalah sukrosa. Fruktosa cenderung memiliki rasa manis yang jauh lebih tinggi dibanding dekstrosa. Campuran D-dekstrosa dan D-fruktosa dengan kadar yang sebanding diperoleh dengan menggunakan proses hidrolisis asam atau enzimatik dan sukrosa atau disebut sebagai gula invert.

b. Vitamin

Kandungan vitamin yang terdapat dalam madu mulai diperkenalkan pada tahun sekitar 1920–1930. Namun pada saat itu, vitamin yang diketahui masih sedikit jenisnya. Sejak tahun 1930, baru diketahui berbagai macam jenis vitamin yang dapat ditemukan di dalam madu. Berdasarkan berbagai penelitian terkait bidang mikrokimiawi dan mikrobiologis, meskipun saat itu madu masih belum dianggap menjadi sumber pokok yang penting bagi kehidupan manusia, beberapa vitamin yang terkandung dalam madu dan bersifat larut di dalam air yang diketahui adalah Niasin, Asam pantotenat, Tiamin (B1), Riboflavin (B2), piridoksin (B6), dan asam askorbat. Selanjutnya juga terkandung berbagai vitamin yang lain di dalam madu seperti biotin, kholin, asam folat, dan asetil kholin. Vitamin lain yang larut dalam lemak juga ditemukan seperti vitamin K, yaitu yang setara dengan 25 µg manadion per 100 gram.[23]

c. Enzim

Enzim yang terkandung di dalam madu, seperti *diastrase, invertase, amilase, glikosa oksidase, katalase*, *perioksidase,* proteolitik, dan enzim

fosfatase. Beberapa faktor yang berpengaruh pada kandungan enzim tersebut yaitu tergantung dari nektar, serbuk sari, dan sekresi kelenjar saliva yang dihasilkan oleh lebah. Di antara beberapa jenis enzim yang terdapat di dalam madu, enzim *diastase* yang dijadikan sebagai parameter apakah madu telah mengalami pemanasan atau tidak. Angka minimal kadar enzim *diastase* berdasarkan SNI tahun 2004[24] adalah 3 DN. Hal tersebut menunjukkan bahwa jika aktivitas *diastase* madu kurang dari 3 DN, maka terindikasi bahwa madu telah mengalami proses pemanasan. Pada uji secara laboratorium, madu palsu akan mudah diketahui berdasarkan aktivitas enzim dengan jumlah maksimum 3 mg per 100 g. Adapun madu yang dipanaskan atau disimpan dalam jangka waktu yang lama akan berakibat pada terjadinya inaktivasi enzim.

Salah satu enzim penting dalam madu, seperti *amilase* terbagi menjadi dua, yaitu α-*amilase* yang berperan memutus secara acak rantai pati, menjadi dekstrin dengan menghasilkan sedikit gula tereduksi. Kelompok kedua yaitu β-*amilase*, yang mempunyai peran dalam memutus gula tereduksi maltose dari ujung rantai pati. α-*amilase* pada suhu 22–30°C memiliki pH optimum 5.0 dan pH 5.3 pada suhu 45–50°C. Adapun β-*amilase* memiliki pH sekitar 5.3.

Pati tidak dapat dimanfaatkan oleh lebah madu, oleh karena itu lebah menghasilkan enzim *diastase* untuk memutus rantainya, namun beberapa peneliti lain menduga enzim tersebut berasal dari nektar. Enzim yang lain, seperti *invertase* yang terdiri atas *sakharase* dan *sukrose* mempunyai peran dalam proses mengonversi nektar menjadi madu, kemudian lebah madu membawa enzim ini menuju nektar, selanjutnya aktivitas *invertase* terus berlanjut dalam madu yang diekstrasi. Terdapat dua tipe dari enzim *invertase*, yaitu enzim *glucoinvertase* dan *fruktoinvertase*. Adapun substrat bagi *invertase* adalah *sucrose* yang sudah mengalami hidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa. Hidrolisis ini berlanjut sampai terbentuknya oligosakarida, di mana salah satu oligosakarida terpenting adalah trisakarida baru yaitu α-*maltosyl*-β -*fruktoside*, yang dikenal dengan nama *frukromaltosa, gluko-sukrosa,*

atau *erlosa*. Salah satu enzim produk hidrolisis sukrosa oleh enzim lebah adalah *melezitosa* yaitu yang terdapat pada *honeydew*.[2]

d. *Hydroxyl methyl furfural* (HMF)

Hydroxyl methyl furfural (HMF) merupakan produk dari pemecahan fruktosa dan glukosa, sehingga keberadaannya dapat dijadikan salah satu indikasi kualitas dari madu. Keberadaan HMF selalu terdapat dalam setiap madu yang dihasilkan. Kadar HMF pada negara yang sudah maju diatur melalui peraturan Codex, yaitu maksimal bernilai 15 mg per kg madu. Salah satu perlakuan yang dapat meningkatkan kandungan HMF adalah dilakukannya pemanasan yang terlalu tinggi. Jika hal ini terjadi, bisa menjadi salah satu parameter bahwa madu telah diberi perlakuan pemanasan atau madu telah dipalsukan dengan air gula ataupun sirup. Kandungan HMF dapat dianalisis melalui tes di laboratorium, berdasarkan SNI 2004, yaitu untuk menentukan madu palsu dengan jumlah maksimal adalah 50 kg per mg.[24]

e. Keasaman

Madu memiliki pH yang rendah yaitu berkisar antara 3.4–6.1. Oleh karena itulah madu dikelompokkan ke dalam makanan yang asam. Namun demikian jika pada madu tersebut terkandung kadar mineral yang tinggi, maka mempunyai nilai pH yang tinggi pula. Madu dikatakan memiliki pH rendah karena adanya kandungan asam organik di dalam madu, antara lain seperti asetat, butirat, format, oksalat, laktat, glukonat, maleat, 2/3 fosfogliserat, β-gliserofosfat, pyroglutamate, sitrat, α-ketoglutarat, glikolat, piruvat, α-gliserofosfatsuksinat, dan glukosa-6-fosfat. Jenis asam utama dalam madu adalah glukonat yang dihasilkan oleh dekstrosa melalui kerja enzim *glukosa oksidase*. Keasaman dari madu selain ditentukan oleh disosiasi ion hidrogen dalam larutan air, juga sebagian besar dikarenakan terdapat berbagai mineral antara lain Ca, Na, K, dan madu yang kaya akan mineral, hal inilah yang menjadi penyebab madu mempunyai pH yang tinggi.

f. Mineral

Beberapa literatur dari hasil penelitian menyatakan bahwa di dalam madu terkandung 18 unsur mineral esensial dan 19 unsur nonesensial. Mineral yang terkandung di dalam madu tersebut dikelompokkan menjadi tiga katagori, yaitu mineral esensial, total abu (mineral), dan logam-logam dengan jumlah yang sangat sedikit. Total abu dalam madu yang berasal dari benua Amerika misalnya sebanyak 0.17%, maka berarti kandungan mineralnya berkisar antara 0.02 sampai 1.03%. Berdasarkan literatur yang lain juga menyebutkan bahwa total abu pada madu yang berasal dari Jerman hanya mengandung abu kurang dari 0.1%. Standar abu yang berasal dari Amerika memperbolehkan maksimum 0.25%.

Khasiat dan Manfaat Madu

Sejak berabad tahun yang lalu, madu sebagai bahan alam sudah banyak digunakan oleh para ahli kedokteran untuk penyembuhan berbagai macam penyakit. Beberapa macam penyakit yang dapat disembuhkan dengan pemanfaatan madu antara lain seperti luka, baik luka pasca pembedahan, luka infeksi maupun borok. Selain itu madu juga dapat menyembuhkan penyakit saluran pernapasan bagian atas, seperti flu, penyakit paru seperti TBC, penyakit perut dan usus, penyakit liver, penyakit saraf maupun penyakit kulit, demikian juga penyakit jantung. Otot jantung seperti yang kita ketahui bekerja tanpa istirahat, sehingga memerlukan dekstrosa sebagai sumber energi untuk menggantikan energi yang hilang.

Pada zaman peradaban kuno, madu dianggap sebagai makanan dewa, dikarenakan manusia yang mengonsumsi madu dapat berusia panjang. Orang-orang bangsa Mesir, bangsa Romawi kuno dan juga Yunani telah memanfaatkan madu sebagai bahan makanan, kue, minuman, dan bumbu pada daging atau masakan. Madu merupakan makanan manis tertua di dunia bagi manusia. Demikian juga dengan pemanfaatan untuk pengobatan telah dikenal oleh bangsa Romawi kuno dan Mesir sejak 2600 SM. Bangsa Cina kuno, Yunani, Assyria, dan Romawi menggunakan madu sebagai obat oles atau salep atau krim antiseptik sebagai pengobat luka. Demikian juga

Bangsa Jerman, telah menggunakannya saat Perang Dunia Kedua. Beberapa manfaat madu adalah membantu mempercepat penyerapan gizi pada tubuh, dikarenakan madu mencegah terjadinya fermentasi di dalam saluran pencernaan, sehingga madu dapat menjadi suplemen makanan yang baik bagi tubuh. Madu dengan kandungan elemen-elemen khusus menunjukkan khasiat dalam membantu pembentukan sel-sel darah baru. Selanjutnya dikarenakan madu memiliki efek laksatif, maka dapat juga mencegah dan mengatasi rasa mual. Madu karena mempunyai efek sedatif, juga dapat dimanfaatkan oleh orang yang mengalami kesulitan tidur, sehingga dapat menyebabkan perbaikan kualitas tidur menjadi lebih baik. Hal ini dikarenakan madu yang masuk ke dalam tubuh dimetabolisme sehingga terbentuk serotonin, yaitu suatu senyawa yang dapat meredakan aktivitas otak, sehingga terjadi relaksasi serta keinginan untuk tidur.

Madu di dalam tubuh manusia tidak memerlukan proses pencernaan lagi, dikarenakan sudah melalui proses pencernaan terlebih dahulu di dalam organ pencernaan lebah pada saat masih berupa nektar. Pada beberapa tahun belakangan sekitar abad ke-19, kehadiran gula yang terbuat dari tebu telah menggeser peranan madu sebagai pemanis. Namun demikian, sampai saat ini madu tetap digunakan oleh manusia di seluruh penjuru dunia untuk berbagai keperluan seperti pembuatan kue, *ice cream,* ataupun *pudding*. Lebih lanjut madu juga digunakan sebagai pengoles roti. Adapun kue yang telah diberi madu sebelum dipanggang tak akan mengalami pengeringan atau pengerasan. Hal ini dikarenakan sifat dari madu yang mengikat molekul air.

Madu juga mengandung komponen kimia asetilkolin dengan efek koligenik. Asetilkolin mempunyai fungsi dalam upaya untuk melancarkan peredaran darah serta mengurangi tekanan darah yang muncul. Gula yang terdapat di dalam madu akan terserap secara langsung ke dalam darah sehingga energi yang dihasilkan akan secara cepat bisa didapat bila dibandingkan dengan gula biasa.

Kandungan gula dari madu yang tinggi seperti fruktosa dengan persentase sebesar 41%, glukosa 35%, dan sukrosa 1,5% dan juga kandungan komponen yang lain seperti tepung sari dan juga berbagai enzim pencernaan.

Selain itu kandungan beberapa vitamin di dalam madu seperti A, B1, B2, serta mineral seperti kalsium, natrium, kalium, magnesium, besi, juga garam iodine, bahkan mengandung antibiotik dari berbagai asam organik seperti oksalat, laktat, sitrat, asam malat, dan tartarat, sehingga madu mempunyai banyak khasiat.

Popularitas Madu

Sejak beratus-ratus abad yang lalu, madu lebah telah dikenal sebagai satu jenis makanan yang digemari oleh masyarakat selain juga digunakan sebagai terapi medis. Kenyataan tersebut didasarkan pada bukti-bukti ditemukannya beberapa lukisan dalam monumen-monumen piramida yang berada di Mesir Kuno. Lukisan tersebut menggambarkan penggunaan madu sudah populer, baik sebagai makanan maupun sebagai obat. Pada lukisan tersebut terlihat bahwa madu dapat dipakai sebagai pengobatan terhadap berbagai macam luka, melancarkan urinasi, dan melancarkan pengeluaran isi pencernaan.

Berikut dipaparkan gambaran terkait popularitas madu yang sudah viral sejak zaman dahulu kala. Beberapa pendapat dari beberapa orang yang ahli dalam ilmu pengetahuan di bawah ini menyatakan betapa hebatnya efektivitas madu tersebut. Beberapa orang yang ahli dalam ilmu pengetahuan tersebut adalah sudah tidak asing lagi dan terkenal di seluruh penjuru negeri.

1. Ibnu Sina, adalah seorang sarjana kompeten yang memperingati hari ulang tahun kelahirannya yang ke-100 tahun, pada tahun 1952. Ibnu Sina menyatakan pendapatnya bahwa madulah yang menyebabkan umur diperpanjang dan tetap aktif di hari tua. Ibnu Sina juga menyarankan pada orang dengan umur 45 tahun ke atas wajib minum madu secara teratur selain mengonsumsi buah-buahan yang berdaging keras dan juga yang banyak mengandung air dan minyak.
2. Aristoteles, seorang ilmuwan dalam bidang *natural science* (ilmu alam), mengemukakan bahwa madu dapat meningkatkan kesehatan manusia secara umum, selain juga dapat memperpanjang umur.
3. Democritus, seorang pelopor pengembangan teori dari atom. Dalam kehidupannya sehari-hari selalu mencampurkan madu ke dalam

makanannya, sehingga dapat mempertahankan hidup lebih dari 100 tahun.

4. Dioscorides adalah seorang sarjana yang berasal dari Yunani, pada tulisannya dinyatakan bahwa madu sangat ampuh untuk mengatasi berbagai penyakit yang menyerang usus ataupun luka-luka akibat infeksi.
5. Hipocrates, seorang ahli fisika yang terkenal, konsumsi madu dilakukan secara teratur dalam kehidupan sehari-harinya dan memanfaatkan madu dalam praktik pengobatan yang dilakukannya, yaitu untuk mengobati berbagai macam penyakit. Hipocrates selanjutnya menyatakan bahwa makanan yang dicampur dengan madu ternyata mempunyai khasiat yang tiada taranya. Hipocrates mencapai umur 107 tahun.
6. Ovid, seorang peneliti dari Romawi yang sangat terkenal, dalam beberapa tulisannya menyarankan dan menyebutkan agar orang selalu mengonsumsi madu setiap harinya.
7. Pythagoras, bapak ilmu pasti yang sangat terkenal, pada beberapa kesempatan seringkali menyatakan rasa terima kasih dapat mencapai umur 90 tahun dikarenakan teratur mengonsumsi dan minum madu.

Keistimewaan Madu sebagai Pengobatan

Pada bidang *medicinal*, ilmu pengobatan merupakan cabang ilmu yang tergolong tertua. Beribu tahun yang lalu, para orang kuno selalu hidup akrab dengan alam, memanfaatkan dan menggunakan bahan yang bersumber dari alam untuk mengatasi bermacam penyakit. Salah satunya adalah madu. Madu telah digunakan dan dimanfaatkan untuk obat pada kondisi masuk angin ataupun kondisi flu, baik madu murni maupun sebagai campuran, seperti dengan susu atau sari jeruk peras ataupun lemon.

Pada penyakit lambung dan alat pencernaan, pemanfaatan madu merupakan pilihan obat yang tepat, karena madu merupakan makanan yang baik untuk pencernaan. Hal ini dikarenakan pada madu mengandung zat besi dan mangan yang berperan dalam proses perbaikan pencernaan dan

penyerapan bahan pangan. Madu juga dapat dimanfaatkan secara ampuh sebagai obat sembelit atau konstipasi.

Madu juga dapat meningkatkan kandungan pH dari isi lambung, hal ini dikarenakan madu mengandung beberapa mineral penting. Mineral-mineral tersebut seperti Na, K, Mg dan Ca. Demikianlah pemilihan jenis makanan yang tepat untuk dikonsumsi seharusnya diatur sedemikian rupa sehingga keseimbangan cairan tubuh dapat terjaga dan agar tetap alkalis. Hal ini dikarenakan penumpukan asam bebas yang tinggi dapat menjadi penyebab gangguan fisiologis, sehingga pada akhirnya akan menyebabkan terjadinya gangguan secara fisiologis.

Madu merupakan sumber penting untuk alkalinitas, semakin tinggi kadar mineral, maka akan semakin gelap warnanya, sehingga mempunyai daya alkalinitas yang lebih tinggi. Oleh karena itu, madu diakui mempunyai potensi yang bagus dalam mengatasi penyakit yang menyerang lambung ataupun usus sebagai akibat terjadinya penumpukan asam pada lambung. Hasil penelitian juga menunjukkan madu dapat mengatasi radang atau perdarahan baik pada usus maupun lambung.

Madu juga ampuh mengatasi penyakit pernapasan seperti penyakit tuberkulosis (TBC) pada tingkat yang awal, yaitu meredakan gejala batuk, meningkatkan berat badan meningkatkan haemoglobulin serta memperlambat laju sedimentasi darah dari pasien penderita TBC yang mengonsumsi madu sebanyak 100 sampai 150 gram setiap hari.

Demikian juga untuk kasus penyakit jantung, seperti *cardiac insufficiency atau angina pectoralis* madu telah digunakan pada berabad yang lalu untuk pengobatan terhadap kasus penyakit jantung. Seperti diketahui otot jantung bekerja tiada henti tanpa ada fase istirahat, oleh karena itu glukosa selalu diperlukan sebagai sumber energi untuk mengganti tenaga yang hilang. Kadar glukosa yang tinggi dari madu sudah sewajarnya jika madu mempunyai khasiat sangat penting untuk jantung. Penelitian pada pasien dengan kasus penyakit jantung yang berat dapat diperbaiki.

Pada bidang-bidang kesehatan dan kecantikan kulit yang lain seperti kesehatan mata, gangguan tidur atau insomnia maupun kosmetik, madu sudah

sejak berabad yang lampau sudah menjadi pengobatan yang penting. Pada kasus sakit mata seperti luka bakar pada kelopak mata, dapat disembuhkan dengan dioleskan madu pada bagian yang terluka. Demikian juga untuk kasus sakit mata yang lain dapat dioleskan salep mata.

Pada kasus insomnia, madu mempunyai peran sebagai sedatif dan *soporific*, yaitu dengan dosis kecil madu dapat diberikan pada orang dengan gangguan kesulitan tidur, namun demikian jika diberikan dalam dosis besar maka akan menjadi penyebab rangsangan berlebihan pada susunan saraf pusat. Pada kecantikan kulit dan kesehatan, madu juga dapat digunakan sebagai lulur pada wajah, karena madu dapat memberikan nutrisi bagi kulit. Hal ini dikarenakan madu memiliki senyawa *inhibine* yang mampu bekerja sebagai antiseptik yang aman bagi wajah dan madu juga mempunyai sifat hidroskopis, sehingga madu dapat menyerap sekresi maupun lemak dari kulit. Hal inilah yang menyebabkan penggunaan madu sebagai lulur pada wajah akan menyebabkan kulit menjadi halus, menghilangkan noda atau flek hitam pada wajah serta kulit menjadi cerah dan sehat.

Pada tujuan pengobatan sebaiknya madu dilarutkan dalam air sebelum dikonsumsi, sehingga komponen-komponen yang terkandung di dalam madu lebih mudah untuk terserap dan juga lebih mudah untuk mencapai ke dalam pembuluh darah yang selanjutnya dapat terdistribusi pada sel-sel di seluruh tubuh.

Keistimewaan madu sehingga dapat dikatakan baik untuk penyembuhan adalah dikarenakan madu memiliki beberapa hal sebagai berikut: madu mudah dicerna, ini adalah salah satu dari keistimewaan madu. Madu yang asli, molekul gulanya dapat berubah menjadi gula lain, dalam hal ini misalnya fruktosa akan menjadi glukosa, sehingga madu menjadi mudah dicerna oleh pencernaan, meskipun pada kondisi orang yang sensitif karena pada madu terkandung asam yang tinggi. Oleh karena itu, madu dalam hal ini berperan membantu usus dan ginjal agar dapat berfungsi menjadi lebih baik.

Keistimewaan dari madu yang lain adalah jika dibandingkan dengan sejumlah gula yang sama dari bahan yang lain, maka madu mempunyai kandungan kalori 40% lebih rendah. Oleh karena itu, madu mampu

memberikan energi yang sangat tinggi, namun tidak berefek menambah berat badan. Lebih lanjut madu dapat yang dapat berdifusi lebih cepat melalui darah jika penggunaannya dicampurkan dengan air hangat. Madu dalam larutan air hangat ini mampu berdifusi masuk dalam darah dalam waktu tidak sampai sepuluh menit. Adapun molekul gula bebas yang berasal dari madu akan menyebabkan otak berfungsi menjadi lebih baik. Otak adalah merupakan pengonsumsi gula terbesar.

Madu dalam Pengolahan Industri Pangan

Seperti diketahui, madu yang terdiri atas lebih dari 80% karbohidrat, dengan 8 komponennya adalah fruktosa, maka hal inilah yang menjadi penyebab madu berasa manis. Tingginya kadar gula disertai tingkatan rasa kemanisan dari fruktosa, maka berdasarkan berat yang sama antara madu dengan bahan lain, maka madu memiliki tingkat kemanisan yang lebih tinggi daripada gula murni produk dari tebu. Oleh karena alasan tersebut, maka jika dibandingkan dengan gula pasir, dengan berat yang sama, maka diperlukan madu yang lebih sedikit untuk dicampurkan ke dalam bahan makanan untuk mendapatkan tingkat rasa kemanisan yang sama. Fruktosa di dalam madu selain berpengaruh terhadap tingkat kemanisan, juga menjadi penyebab madu bersifat higroskopis. Kandungan fruktosa yang tinggi pada madu akan menarik atau memegang air dengan kuat, sehingga dapat memperbaiki tekstur dan kesegaran dari produk, kemudian produk pun menjadi lebih segar.

Madu juga banyak digunakan pada produk saus *barbeque*, hal ini karena tingkat kemanisannya juga menimbulkan warna yang lebih segar. Kandungan gula dan sedikit rasa asam saus akibat adanya pemanasan, akan menjadi penyebab proses karamelisasi, sehingga menghasilkan warna *barbeque* menjadi keemasan yang cerah. Pemanasan juga menjadi penyebab dikeluarkannya senyawa aromatik yang mudah menguap, sehingga menimbulkan cita rasa yang lezat dan mencirikan *taste flavor* khas sate. Penggunaan madu pada *marinade*, menyebabkan kandungan asam di dalam madu, mampu membantu proses pengempukan daging. Selain itu, madu mampu merasuk dan merembes pada lapisan permukaan daging sehingga daging tidak menjadi kering dan

terlihat menjadi lebih mengkilap. Hal ini dikarenakan kandungan asam yang secara alami terdapat dalam madu memberi banyak manfaat dalam proses pembuatan *marinade*. Kandungan asam dari madu juga memiliki kemampuan dalam meningkatkan dan memacu keluarnya cita rasa yang lain. Kombinasi madu jika digabungkan dengan lemon, maka akan memunculkan cita rasa "*the sweet tart sensation*". Demikian juga jika madu dikombinasi dengan apel, *orange,* ataupun *grape*. Peningkatan cita rasa dari madu juga dapat dimodifikasi dan dikembangkan untuk produk yang lain seperti *yoghurt, soy sauce*, *savoury sauce*, atau berbagai *baverages* dan *dessert*.

Selanjutnya protein yang terkandung di dalam madu juga mempunyai sifat penting yang fungsional, khususnya sifat koloidal. Hal ini menyebabkan sifat viskositas yang penting dalam pengolahan produk makanan. Sifat fisik dari madu, dalam hal viskositasnya membuat madu sangat tepat untuk digunakan pada tujuan tertentu seperti *coating*, sebagai zat pengikat atau pengental pada makanan.

Madu juga mempunyai kemampuan sebagai penggumpal atau *clarifying agent* pada berbagai minuman penyegar atau sari buah. Kemampuan madu sebagai penjernihan pada pengolahan produk minuman juga sudah dimanfaatkan. Pada industri minuman yang melakukan proses penjernihan secara tradisional, membutuhkan waktu yang cukup lama, yaitu selama 24 jam pada suhu 10°C dikarenakan melalui proses enzimatis. Proses penjernihan secara enzimatis juga mempunyai kecenderungan menurunkan kadar pektin di dalam minuman. Penurunan kadar pektin di dalam minuman sari buah tidak diinginkan oleh industri pangan. Penggunaan madu ternyata tidak mereduksi kadar pektin, selanjutnya pada suhu yang sama 10°C, dapat menghasilkan tingkat kejernihan yang sama dengan waktu yang jauh lebih singkat, yaitu hanya 30 menit.

Penjelasan bagaimana proses tersebut dapat terjadi adalah sebagai berikut: adanya satu protein dari lebah yang terdapat di dalam madu dan kandungan tanin yang ada pada sari buah menyebabkan terjadinya penggumpalan disertai pengendapan dan penyaringan sehingga diperoleh hasil akhir produk yang jernih. Hasil dari penelitian dan dapat dijadikan

standard *pilot plant*, bahwa penambahan madu sebesar 0,5%, sudah cukup mampu menginduksi terjadinya proses penggumpalan, dengan kadar optimal sebesar 3%. Kemampuan penggumpalan dari madu ini dapat secara sinergis jika digabungkan dengan penggumpalan dari enzim *pectinase*. Jika teknik ini dilakukan maka efektivitas laju penggumpalan menjadi meningkat 10 sampai 20 kali lipat. Pada saat ini melalui teknologi penyaringan yang canggih (*ultrafulration)*, protein madu dapat dipisahkan sehingga produk tersebut dapat menjadi prospek yang menjanjikan di masa yang akan datang. Namun demikian, jika madu dihilangkan kandungan proteinnya, maka akan memiliki dampak negatif berupa penurunan viskositasnya.

Standar Mutu Madu

Adanya diversitas mutu atau kualitas dari madu, akan diperlukan standardisasi dari madu yang beredar. Berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) dengan nomor 01-3545-1994 dan kemudian SNI tahun 2004, madu merupakan cairan berasa manis yang dihasilkan lebah madu dari beberapa nektar. Nektar adalah semacam cairan yang dihasilkan kelenjar tanaman yang kaya berbagai bentuk karbohidrat 3 sampai 87%, seperti fruktosa, glukosa, dan sukrosa, serta sedikit kandungan senyawa asam amino, nitrogen, amida, asam organik, senyawa aromatik, vitamin, dan juga mineral. Madu yang sudah mengalami proses pematangan, kandungan beberapa komponen tersebut adalah berkisar sebagai berikut: glukosa 35%, fruktosa 41%, sukrosa 1,9%, dekstrin 1,5%, mineral 0,2%, dan zat lain seperti asam amino sebesar 3,5%, serta air sebesar 17%.

Sumber referensi lain menyebutkan bahwa definisi madu adalah merupakan zat berasa manis berasal dari nektar bunga yang dihasilkan oleh lebah madu, sekresi oleh tanaman tersebut dikumpulkan oleh lebah, kemudian oleh lebah diubah bentuk dengan dikombinasikan dengan zat khusus yang ada pada tubuh lebah. Lebih lanjut kemudian disimpan sampai matang pada sel-sel madu. Cairan saliva lebah yang mengandung enzim-enzim *hydrolase* merupakan zat khusus terdapat pada lebah dan berfungsi dalam proses pemecahan gula. Selanjutnya lebah pekerja juga menambahkan

enzim *invertase* pada saat meminum dan kemudian mengeluarkan dengan cara memuntahkan kembali madu tersebut. Kerja enzim inilah yang mengubah sukrosa menjadi dekstrosa (glukosa) dan levulose (fruktosa).

Madu yang dapat dikatakan sebagai produk yang spesifik dan unik dari insekta dengan kandungan karbohidrat yang tinggi dan protein serta lemak yang rendah. Kandungan gizi madu bergantung pada gula sederhananya, yaitu fruktosa dan glukosa. Bahan berasa manis ini bersifat kental dengan warna keemasan sampai gelap, diproduksi di dalam kantung madu dari berbagai jenis lebah yang berasal dari berbagai nektar bunga. Harum dan rasanya sangat dipengaruhi oleh jenis bunga di mana nektar didapat dan dikumpulkan.

Oleh karena itulah, dibutuhkan standar mutu atau kualitas madu di Indonesia, terutama diperuntukkan untuk kepentingan komersial. Standar kualitas mutu tersebut mengacu pada SNI No. 01-3545-1994, di mana kandungan kadar air dari madu maksimal 22%, dengan kadar sukrosa maksimal 10% di mana berat sukrosa per berat madu atau b/b. Standar mutu madu yang lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 3.6.

Tabel 3.6 Mutu Madu Berdasarkan SNI No: 01-3545-1994.[24]

Jenis	Satuan	Standard Minimal
Gula pereduksi (dihitung sebagai glukosa	% b/b	Minimal 60
Sukrosa	% b/b	Maksimal 10
Aktivitas enzim diastase	DN	Minimal 3
Hidroksimetilfufural (HMF)	mg/kg	Maksimal 40
Air	%	Maksimal 22
Keasaman	Ml NaOH 1 N/kg	Maksimal 40
Timbal (Pb)	mg/ kg	Maksimal 5.0
Tembaga (Cu)	-	-
Cemaran Arsen	mg/ kg	Maksimal 0.5
Padatan yang tidak larut dalam air	% b/b	Maksimal 0.5
Abu	% b/b	Maksimal 0.5
Cemaran logam	mg/kg	Maksimal 1.0

Beberapa sampel madu yang beredar di negara Indonesia, berdasarkan hasil uji laboratorium, disajikan pada Tabel 3.7 di bawah ini.

Tabel 3.7 Hasil Uji Laboratorium terkait Analisis Madu di Indonesia.[22]

Parameter	Persyaratan SII-86	Sampel				
		1	2	3	4	5
Kadar air	Maks 25%	21.68	18.85	18.85	20.31	24.78
Keasaman A	Maks 40 ml NaOH 1N/kg	13.97	8.94	20.03	7.65	5.6
Enzim Diastase	Min 3 DN	15.52	20.45	13.79	23.73	19.17
HMF	Max 40 mg/kg	0.23	0.19	9.53	1.65	0.15
Kadar Abu	Max 0,5%	0.30	0.28	0.11	0.23	0.27
Gula Pereduksi	Min 50%	67.82	74.27	69.74	73.83	73.66
Sukrosa	Max 10%	2.80	2.28	4.96	2.19	3.14
Padatan tak larut	Max 0,5%	0.03	0.02	0.02	0.04	0.03
Asam Benzoat		-	-	-	-	-
Logam (ppm):						
Fe		0.50	0.82	0.37	0.64	1.02
Zn		1.03	1.93	0.79	1.22	8.62
Pb		-	-	-	-	-
Cu		0.25	0.02	-	-	-

Keterangan:

1. Madu Kapuk/Randu
2. Madu Karet
3. Madu Rambutan
4. Madu Pahitan
5. Madu Multiflora

Dugaan Adanya Logam Berat dalam Madu

Berdasarkan hasil penelitian Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) terhadap 54 sampel madu lokal, tidak ditemukan satu sampel pun yang mengandung logam berat. Kadar tembaga (Cu) yang ada demikian rendahnya, yang dinyatakan aman untuk konsumsi. Berdasarkan batas yang diperbolehkan, maksimum cemaran logam berat yang ada dan terkandung dalam makanan, seperti yang diatur oleh Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan di Indonesia (Ditjen POM), khusus untuk madu kadar maksimal dari Pb dan Cu adalah 10 dan 30 mg/kg (ppm). Oleh karena itu, jelaslah bahwa kandungan logam berat pada madu lokal tidak berbeda jauh dengan madu impor. Kandungan logam berat yang terdapat pada madu lokal aman untuk dikonsumsi oleh masyarakat. Selanjutnya yang perlu diingat, bahwa jarang sekali madu dikonsumsi dalam jumlah besar sekaligus.

Pada umumnya hanya beberapa sendok makan per harinya. Berdasarkan hal tersebut, maka tidak ada alasan untuk berhenti mengonsumsi madu, dikarenakan madu mempunyai banyak khasiat.

Tabel 3.8 Kandungan Logam Berat Sampel Madu di Indonesia.[25]

Sampel Madu yang Diuji	Kadar Logam Berat (mg/kg)		
	Zn	Pb	Cu
Madu Lokal 1	5.2	10.6	1.3
Madu Lokal 2	4.0	2.6	3.5
Madu Lokal 3	4.0	2.6	3.4
Madu Lokal 4	3.2	2.3	8.1
Madu Impor 1	2.5	2.5	1.2
Madu Impor 2	25.4	2.6	1.1

Alergi dan Efek Samping dari Madu

Alergi atau dikenal juga sebagai *ideosinkrasi*, merupakan suatu kondisi kepekaan berlebihan tubuh terhadap pengaruh rangsangan meskipun kecil. Alergi seperti misalnya ada beberapa orang yang peka terhadap telur, susu, *bromide*, *iodium,* madu, ataupun tepung sari dan racun dari sengat lebah. Adapun gejala alergi yang dapat kita lihat seperti terjadinya pembengkakan lokal atau sebagian dari badan, pada umumnya pengaruh terlihat pada kulit, seperti eksema, atau yang muncul pada saluran pernapasan seperti asma dan batuk-batuk, atau yang muncul dari saluran pencernaan seperti muntah atau diare.

Pada beberapa orang tertentu, pada umumnya anak-anak, terjadinya alergi terhadap madu dapat terjadi karena beberapa kondisi. Alergi ini bisa terjadi pada waktu madu masuk ke dalam lambung, di mana sifat madu yang hidroskopis, maka madu akan menyerap air di dalam lambung yaitu pada dinding-dinding lambung. Hal ini ternyata menimbulkan mual, muntah, dan kesakitan. Namun demikian pernyataan tersebut masih menjadi kontroversi dan perdebatan, dikarenakan madu yang dikonsumsi masih dalam dosis kecil, bahkan sudah dilarutkan dalam larutan air. Kemungkinan lain bisa jadi

dikarenakan di dalam madu juga terkandung berbagai jenis gula, sehingga kemungkinan senyawa tersebut juga bertanggung jawab terhadap alergi madu.

Madu adalah salah satu dari produk yang dihasilkan oleh lebah dengan efek samping kecil, bahkan dapat hampir tidak ada kasus alergi akibat madu yang dikonsumsi. Namun demikian untuk langkah awal sebaiknya berkonsultasi kepada ahli gizi atau dokter terlebih dahulu agar dapat dicegah jika terjadi reaksi alergi, yaitu dengan mengonsumsi sedikit dahulu jika akan memulai mengonsumsi madu. Bila dengan dosis sedikit tersebut tidak terlihat reaksi alergi, maka dosis dapat ditingkatkan secara bertahap sampai dosis maksimal yang dianjurkan oleh dokter. Hal ini biasanya dianjurkan pada orang-orang tertentu, seperti ibu hamil atau menyusui, manula, dan balita. Beberapa gejala alergi yang muncul akibat mengonsumsi madu, seperti sesak napas disertai nyeri di bagian tenggorokan atau dada, timbul gatal pada kulit, diare, atau rasa kurang nyaman di bagian perut.

2. Propolis

Propolis adalah salah satu jenis *bee product* utama dari lebah madu selain madu dan juga produk-produk lain seperti *royal jelly, pollen* atau tepung sari, lilin atau malam lebah atau dikenal juga sebagai *bee wax*, dan racun lebah atau *apitoxin*.

Definisi Propolis

Propolis merupakan resin lengket, bersifat termoplastik, dan berwarna kecokelatan. Propolis diambil dari Bahasa Yunani kuno, *Pro* adalah sebelum atau awal atau bisa juga berarti benteng, *Polis* yaitu kota, sehingga propolis berarti sebelum kota, yang berarti benteng atau pertahanan kota terdepan pada sarang lebah. Propolis yang merupakan lem lebah, adalah suatu cairan lengket yang dihasilkan lebah madu, zat, atau cairan lengket tersebut mengandung resin dan juga lilin lebah (Gambar 3.1).

Gambar 3.1 Propolis.[26]

Cairan lengket tersebut dikumpulkan dan digabungkan dari berbagai sumber tanaman, terutama dari bunga dan pucuk daunnya. Propolis berguna dalam upaya untuk melindungi sarang dari perubahan suhu maupun serangan bakteri, virus, dan jamur. Proses terbentuknya propolis dilakukan oleh lebah dengan cara mencampur resin dengan beberapa enzim yang berasal dari sekresi mandibula lebah. Komponen yang terkandung dalam propolis ini tidak mengalami perubahan dalam fungsinya dalam mempertahankan sarang lebah. Struktur propolis pada sarang lebah, merupakan resin berbentuk pasta yang lengket, sehingga disebut sebagai *bee-glue* atau lem lebah.[27]

Resin sebagai bahan propolis didapat dengan cara mengeruk resin pelindung dari bunga dan tunas daun menggunakan rahang bawah, yang kemudian dibawa ke sarang dengan kaki belakang mereka. Selanjutnya resin yang telah dikumpulkan oleh lebah dan dicampur dengan dengan sekresi saliva dari lebah beserta lilin, campuran ini digunakan oleh lebah untuk melapisi sarangnya. Namun demikian komponen penyusun propolis sangat tergantung baik pada musim maupun sumber dari mana eksudat resin tersebut dikumpulkan oleh lebah.[28]

Propolis digunakan oleh koloni lebah sebagai pelindung pada sarang mereka terhadap gangguan atau ancaman dari luar, seperti serangga,

kumbang, dan tikus, yaitu berupa bahan perekat pada celah yang terdapat pada sarang lebah dan untuk melindungi larva lebah dari infeksi ataupun bakteri. Adapun komposisi kimia, warna, dan aroma dari propolis sesuai dengan lokasi geografisnya. Selain itu, komposisi dari propolis sangatlah bervariasi, yang erat hubungannya tergantung jenis dari tanaman tempat propolis tersebut berasal. Flavonoid sebagai komposisi utama propolis adalah merupakan suatu golongan fenol yang terbesar. Efek propolis dalam menghambat mikroorganisme tergantung pada sinergisitas dari banyak komponen. Daya hambat mikroorganisme yang dimiliki oleh ekstrak propolis dipengaruhi oleh senyawa aktif dalam ekstrak tersebut yaitu flavonoid, polifenol, terpenoid, galangin, *myricetin, robinetin, quercetine, epighalacathecin, licochalcones, A-B, caffeic acid*, tanin, dan minyak atsiri. Kandungan dari setiap bahan aktif tersebut mempunyai mekanisme tersendiri dalam aktivitasnya sebagai antimikroba. Propolis juga mengandung terpenoid atau tarnesol yang merupakan alkohol yang terdapat pada minyak esensial dari berbagai ekstrak tanaman yang dapat memengaruhi pertumbuhan banyak bakteri.[29]

Dari sekian banyak jenis lebah, ada satu jenis lebah yang mempunyai kemampuan menghasilkan propolis dalam jumlah banyak yaitu jenis lebah *Trigona* spp.[27] Selain *Trigona* spp., spesies lain dari lebah madu yang juga aktif menghasilkan propolis salah satunya adalah lebah *Apis mellifera*. *Apis mellifera* merupakan lebah yang diternakkan oleh manusia. Lebah *Apis mellifera* ini lebih banyak menghasilkan madu dibandingkan propolis, demikian juga sebaliknya *Apis mellifera* menghasilkan propolis yang lebih sedikit dibandingkan *Trigona* spp.

Pada spesies *Apis mellifera*, lebah betina bertugas mencari polen yang merupakan bahan baku propolis, yang kemudian diolah menjadi propolis yang berasal dari berbagai bahan seperti kulit, pucuk daun, maupun getah berbagai tumbuhan seperti akasia, pinus, atau lainnya. Hal ini dikarenakan lebah jantan tidak mempunyai kantong polen pada bagian berkemampuan mencari dan mengangkut polen menuju sarang lebah. Penerbangan lebah dalam berburu polen terjadwal menyesuaikan mekarnya bunga-bunga

penghasil serbuk sari yang dikunjungi, di luar waktu tersebut lebah tetap berada di dalam sarang.

Karakteristik Propolis

Karakteristik propolis merupakan substansi resin alami yang beraroma wangi dan sangat lengket pada suhu sarang yang baru dibentuk dan selanjutnya mengeras pada suhu kurang dari 15°C serta mudah menjadi pecah pada suhu 5°C. Pada suhu yang lebih tinggi, sekitar 25–25°C, karakteristik propolis yang bersifat lembut, sangat lengket, dan elastis. Pada suhu lebih dari 45°C, propolis akan semakin lengket menyerupai karet. Pada suhu yang sangat tinggi 60–100°C propolis akan mencair.

Adapun sumber tanaman sebagai penghasil propolis sampai saat ini belum banyak diketahui. Sampai saat ini yang diketahui adalah berasal dari getah resin tanaman pinus dan akasia. Propolis seperti dijelaskan sebelumnya berfungsi menutup sebagai penutup ruang heksagonal atau sel-sel pada sarang lebah. Propolis secara umum menjadi penutup celah kecil yang hanya berukuran 4–6 mm, adapun celah yang lebih besar akan ditutup oleh lilin lebah. Pada jaman dahulu ada anggapan bahwa propolis adalah bahan pengganggu, sebab menyebabkan terjadinya rasa lengket di tangan, pakaian, atau sepatu pada saat cuaca yang panas, kemudian berubah menjadi keras dan berkerak ketika cuaca sudah dingin.

Warna dari propolis dapat beragam dari kuning yang terang, hijau hingga kecokelatan dan kemerahan bergantung pada sumber tanaman. Warna propolis yang baru diambil dari sarangnya cenderung berwarna kemerahan yang kemudian semakin lama berubah menjadi gelap. Demikian juga dengan aroma dari propolis berbeda tergantung pada sumber tumbuhannya. Namun demikian dari berbagai macam propolis, warna cokelat gelap adalah warna yang paling umum ditemui.

Komposisi Propolis

Komposisi dari propolis bervariasi, tergantung pada letak geografisnya. Perkiraan nilai nutrisi terutama berupa protein dengan kadar karbohidrat,

dan lemak maksimal sebesar 1g/100 g, adapun komposisi utama propolis adalah flavonoid, asam fenolat dengan kadar mencapai persentase 50% dari seluruh komposisi lengkap. Kandungan propolis dapat dijabarkan sebagai berikut: terbesar adalah berupa resin dengan persentase 40–50%, lilin lebah dan asam lemak yaitu 20–35%, minyak alkohol sekitar 10%, serbuk sari sekitar 5%, dan komposisi lainnya adalah vitamin dan mineral.

Komposisi kimia yang lain adalah seperti asam alcohol-esternya, asam amino, asam alifatik-esternya, aldehida, alkohol, khalkon, dihidrokhalkon, flavonon, flavon, hidrokarbon, terpenoid, dan keton. Komponen penyusun tersebut kaya akan vitamin B1, B2, B6, C, dan E serta elemen mineral seperti K, Na, Mg, Ca, I, Cu, Zn, Fe, dan Mn. Propolis juga mengandung asam lemak dan beberapa enzim seperti *succinic dehydrogenese, denosine trifosfat, sam fosfatase,* dan *lukosa-6-fosfat.* Komponen propolis dapat diringkas seperti terlihat pada Tabel 3.9.

Tabel 3.9 Komponen Propolis.[30]

Komponen	Prosentase	Grup Komponen
Resin	45–55%	Asam fenolat, Flavonoid, dan esternya
Minyak Essensial	10%	Senyawa *volatile*
Lilin dan asam lemak	25–53%	Lilin lebah dan beberapa dari tanaman
Protein	5%	Protein berasal dari pollen dan amino bebas
Senyawa organik lain dan mineral	5%	14 macam mineral: Fe dan Zu, sisanya seperti Au, Ag, Cs, Hg, senyawa organik lain: keton, laktan, kuinon, asam benzoate dan esternya, gula, vitamin (B3), dan gula

Komposisi kimia dari propolis, susunannya tergantung pada flora lokal yang ada pada lokasi di mana bahan penyusun propolis dikumpulkan. Hasil ini memberikan fakta bahwa banyak keragaman mencolok komposisi kimiawi dari propolis, secara spesifik yaitu propolis yang berasal dari daerah tropis. Oleh karena itu, kesamaan dari berbagai keaktifan kurang dapat dijelaskan. Hal ini dikarenakan senyawa yang bertanggung jawab terutama seperti flavonon, flsavon, asam fenolat, dan esternya terdapat dalam jenis propolis *poplar* (dari

Eropa), sedangkan senyawa yang terkandung pada propolis jenis *Baccharis* (dari Brasil) adalah asam p-kumarat terprenilasi dan diterpene. Selanjutnya senyawa yang bertanggung jawab pada propolis merah jenis Kuba adalah benzofenon terprenilasi. Namun demikian beberapa kenyataan memberikan fakta bahwa komposisi kimia yang berbeda memberikan aktivitas yang sama dan bahkan dalam beberapa studi menunjukkan besaran tingkat aktivitas yang sama efektifnya. Berbagai jenis propolis dan senyawa yang bertanggung jawab pada aktivitas biologisnya terdapat pada Tabel 3.10.

Tabel 3.10 Berbagai jenis propolis dan senyawa yang bertanggung jawab pada aktivitas biologisnya.[30]

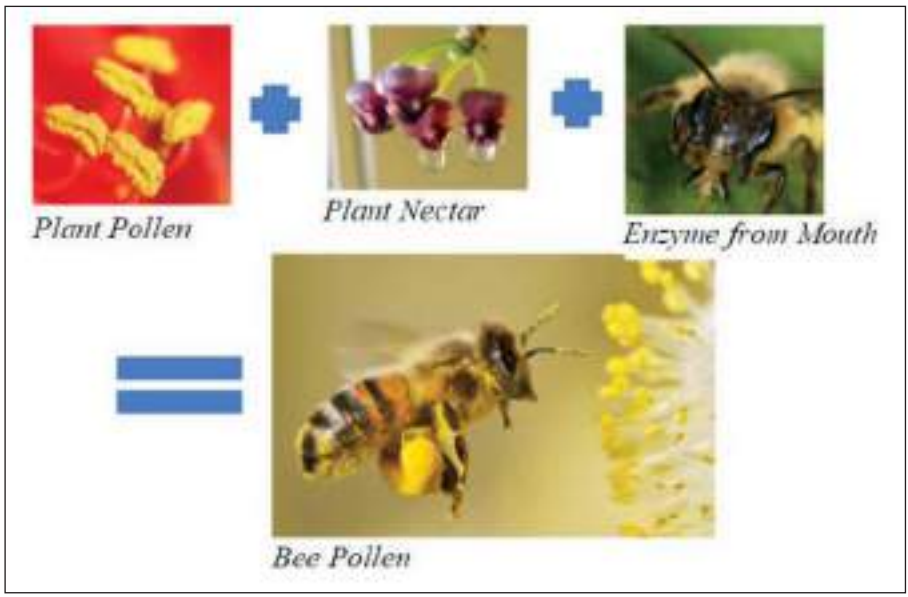
Jenis Propolis	Antibakteri	Antiinflamasi	Antitumor	Hepato Protektif	Antioksidan
Eropa (Poplar)	Flavonon, Flavon, asam fenolat dan esternya	Flavonon. Flavon, asam fenolat dan esternya	Asam kafeat, fenetil ester asam kafeat	Asam kafeat, asam ferulat, ester asam kafeat	Flavonoid, fenolat dan esternya
Brazilida (Baccharis	Asam p-kumarat terprenilasi, diterpene labdan	Tidak teridentifikasi	Asam p-kumarat terprenilasi, Klerodan, diterpene, benzofuran	Asam p-kumarat terprenilasi, flavonoid, lignin, asam kafeoilkuinat	Asam p-kumarat terprenilasi, flavonoid
Cuba	Benzofenon terprenilasi	Tidak diuji	Benzofenon terprenilasi	Tidak teridentifikasi	Benzofenon terprenilasi
Taiwan	Tidak diuji	Tidak diuji	Flavonon terprenilasi	Tidak diuji	

3. *Bee Pollen* (Tepung Sari)

Bee pollen adalah salah satu jenis *bee product* dari lebah selain produk utama madu dan propolis, serta produk-produk yang lain seperti *royal jelly* atau tepung sari, lilin atau malam lebah atau dikenal juga sebagai *bee wax*, dan racun lebah atau *apitoxin*.

Definisi *Bee Pollen*

Polen artinya adalah serbuk dari sari bunga, sehingga *bee pollen* adalah serbuk dari sari bunga yang dikumpulkan dan digabungkan oleh lebah madu (*honey bee*) untuk digunakan sebagai sumber makanan bagi koloni dari lebah. Polen yang menempel pada kaki lebah yang berambut pada saat lebah datang dan menghisap nektar bunga (Gambar 3.2). Menurut Sihombing,[24] pollen merupakan alat reproduksi jantan dari tumbuhan dengan kandungan protein yang tinggi. Bagi seekor lebah, polen merupakan bahan pengganti sel-sel yang telah mengalami kerusakan atau usang dan pembentuk pertumbuhan. Adapun untuk manusia, polen dapat dimanfaatkan sebagai campuran obat-obatan, selain juga bermanfaat pada daya tahan tubuh terhadap penyakit ataupun tekanan fisik dan psikis dan peningkatan stamina.



Gambar 3.2 *Bee Pollen.*[31]

Pollen (bahasa Inggris) atau disebut juga serbuk sari adalah merupakan alat penyerbukan dan perbanyakan secara generatif pada tumbuhan yang berbunga. Serbuk sari dapat juga dikatakan sebagai modifikasi sel sperma.

Secara sitologi, serbuk sari adalah merupakan sel yang terdiri atas tiga nukleus, yaitu inti vegetatif, inti generatif pertama, dan inti generatif kedua. Serbuk sari diproduksi dalam mikrosporangium jantan menyerupai kerucut. Berbagai bentuk serbuk sari yang paling umum adalah berbentuk bola.

Lebah berusaha mengambil polen terbaik untuk makanannya, lebah memilihnya dari puluhan ribu bunga. Dalam waktu satu hari, suatu koloni lebah dapat menghinggapi lebih dari 250.000 bunga. Adapun untuk mengumpulkan 1 sendok teh polen, seekor lebah harus bekerja selama 8 jam sehari selama satu bulan penuh. Manusia mengumpulkan polen di luar sarang lebah, yaitu dengan menggunakan *pollen trap*.

Polen yang berasal dari serbuk sari yang dibawa oleh kaki lebah dapat dipanen oleh manusia, yaitu pada saat lebah kembali dari lapangan ke sarang. Polen yang berbentuk pellet terkikis dari kaki bagian belakang dari lebah pekerja sewaktu lebah masuk kandang koloni melalui lubang sekat yang sempit. Polen yang terjatuh, selanjutnya ditampung pada wadah yang ditutup kain kasa berlubang sangat halus untuk mencegah agar lebah tidak dapat mengambilnya kembali. Saat ditampung, polen agak basah, dikeringkan untuk mencegah kerusakan oleh jamur. Pengeringan dengan oven dapat dilakukan dengan syarat perlu dijaga agar pengeringan tidak melebihi panas 80°C. Pada umumnya, *pollen* memerlukan pembersihan dan penggolongan sebelum dipasarkan kepada konsumen.

Kandungan Kimia *Bee Pollen*

Lebah yang pulang dari lapangan menuju sarang membawa beban berupa polen pada kakinya. Polen tersebut selanjutnya dipindahkan masuk ke dalam sisiran sel-sel heksagonal menggunakan kaki depannya. Selanjutnya lebah menambahkan cairan saliva sehingga terbentuk polen menjadi berupa bola. Tahap selanjutnya lebah akan memproses dan mematangkannya menjadi *bee bread* (roti lebah). Perbandingan nilai gizi antara serbuk sari dibandingkan daging sapi, telur, dan keju adalah seperti yang terlihat pada Tabel 3.11.

Tabel 3.11 Perbandingan Kadar Protein antara Tepung Sari dan Makanan Protein Lengkap (100 gram porsi makan).[29]

	Telur	Keju	Daging Sapi	Serbuk Sari
Leusine	1,17	2,63	1,28	6,70
Isoleusine	0,85	0,85	0,93	4,50
Lysine	0,93	2,34	1,45	5,70
Phenylalamine	0,69	1,43	0,66	3,90
Metionin	0,39	0,80	0,42	1,82
Tryptophane	0.20	0.34	0,20	1,30
Treanin	0,67	1,38	0,81	4,00
Valin	0,90	2,05	0,91	5,70

Serbuk sari terdiri atas kandungan kimia yang kaya protein, asam amino, asam lemak tak jenuh, mineral, vitamin, dan elemen lainnya yang bermanfaat terhadap kesehatan. *Lactobacillus* yang terkandung dalam *bee pollen* mengubah karbohidrat menjadi asam laktat, sehingga menimbulkan rasa asam dan bersifat menghambat pertumbuhan bakteri.[29] *Bee pollen* adalah merupakan sumber protein, karbohidrat, lemak, dan mineral. Rataan kandungan protein kasarnya adalah dengan persentase sekitar 23%, serta mengandung semua asam lemak esensial dan asam amino esensial. Oleh karena itulah nutrisi *bee pollen* disebutkan berdasarkan hasil penelitian dapat mengatasi alergi, antibakteri, antijamur, antioksidan, imunomodulator, hepatoprotektif, mempertahankan kondisi vitalitas, mengatasi penyakit kanker, mencegah kanker prostat, kegemukan atau obesitas dengan cara menurunkan trigliserida. Kandungan senyawa kimia dari serbuk sari dapat dicermati pada Tabel 3.12 sampai 3.15.

Tabel 3.12 Komposisi Kandungan dari *Bee Pollen*.[22]

Mineral	Vitamin & Hormon	Asam Amino	Pigmen	Komponen Lain
Potassium	Thiamine	Arginine	Flavoxantine	Water
Magnesium	Riboflavin	Histidine	Carotene	Carbohydrate
Calcium	Nicotinic acid	Isoleucine	Flavonols	Hormone
Copper	Pyridoxine	Leucine	Ethylic ether	Protein
Iron	Pantothenic acid	Lysine	Quercetin	Eteric extract
Silicon	Biotin	Methionine	Zeaxanthine	Rutin
Phosphorus	Folic acid	Phenylalanine	Lycopene	
Sulfur	Lactoflavine	Threonine	Crocetin	
Chlorine	Alpha/beta	Tryptophan		
Manganese	Carotene	Valine		
	B2, B12, C, D, E			

Tabel 3.13 Komposisi dari *Bee Pollen* (Berat Kering).

Komponen Utama	Kandungan (g/100 g berat kering)
Karbohidrat Total	13–55
Lemak	1–13
Protein	10–40
Pektin	0,3–20
Kadar Abu	2–6
Tidak diketahui	2–5

*Karbohidrat total diperoleh setelah determinasi dari protein dan lemak.

Tabel 3.14 Kandungan Mineral dari *Bee Pollen*.

Mineral	Kadar Abu (%)
Tembaga	0,05–0,08
Kalsium	1–15
Klorin	1
Magnesium	1–12
Besi	0,01–0,3
Mangan	1,4
Fosfor	1–20
Kalium	20–45
Silikon	2–10
Belerang	1

Tabel 3.15 Jumlah Vitamin B kompleks yang ditemukan dalam 1 g serbuk.

Satuan (mg)	Vitamin
200,0	*Nicotinic acid*
27,6	*Pantothenic acid*
9,2	Vitamin B1 (tiamin)
18,5	Vitamin B2 (riboflavin)
5,0	Vitamin B6 (piridoksin)
5,0	Asam Folat

4. Roti Lebah (*Bee Bread*)

Roti lebah (*Bee breed*) adalah salah satu jenis *bee product* dari lebah selain produk utama madu dan propolis dan juga produk-produk yang lain seperti *royal jelly* atau tepung sari, lilin atau malam lebah atau dikenal juga sebagai *bee wax*, dan racun lebah atau *apitoxin*.

Definisi Roti Lebah

Roti lebah atau yang dikenal sebagai *bee bread* adalah hasil fermentasi yang dihasilkan oleh lebah yang berasal dari penggabungan air liur dari lebah pekerja ditambah serbuk sari tanaman atau nektar. Roti lebah ini digunakan sebagai makanan bagi larva maupun lebah muda untuk menghasilkan produk *royal jelly* (Gambar 3.3). Dikarenakan melalui proses fermentasi, maka roti lebah mempunyai nilai nutrisi yang lebih tinggi dibanding *bee pollen*.

Gambar 3.3 *Bee Bread* di dalam *Honeycomb*.[32]

Nutrisi yang terkandung pada roti lebah adalah semua unsur vitamin, mineral, asam amino, dan serbuk sari segar, selain juga memiliki enzim alami yang ditambahkan oleh lebah pekerja, sebagai proses fermentasi secara perlahan. Proses fermentasi ini menghasilkan banyak bakteri menguntungkan yang menyehatkan badan, yaitu bakteri asam laktat yang berperan pada kesehatan sistem pencernaan. Roti lebah juga digunakan sebagai pengobatan terutama terkait gangguan pencernaan, metabolisme, dan alergi. Komposisi yang terkandung pada roti lebah yaitu protein dengan kandungan hampir seluruh asam amino esensial bagi manusia, seperti *fenilalanin, leucine, valin, isoleucine, argiginm histidin, lisin, metionin, prolin, treonin, triptofan*; vitamin A, B1, B2,B3, B6, C, H (Biotin), E, K, asam folat, P (rutin), *nikotionic acid, folic*; 25 jenis mineral seperti: kalsium, zat besi, kalium, fosfor, natrium; asam pantotenik; pigmen, karotenoid, dan antosianin; enzim *sakarase, amilase,* dan *fosfatse*; serta flavonoid.

Roti lebah memiliki nilai gizi lebih tinggi dari serbuk sari atau *bee polen*. Hal ini disebabkan serbuk sari umumnya kehilangan banyak nilai gizi pada saat pengolahan atau penyimpanan yang kurang tepat. Adapun roti lebah tidak mengalami kehilangan gizi sama sekali, dikarenakan proses fermentasi dilakukan secara alamiah oleh lebah itu sendiri, bahkan roti lebah dapat disimpan dalam waktu dua tahun tanpa kehilangan nilai gizi.

Roti lebah juga merupakan bahan dasar pembuatan *royal jelly* yang disekresikan oleh lebah betina. Proses fermentasi ini terjadi melalui proses biokimia dengan memanfaatkan enzim yang berasal dari saliva maupun perut lebah. Mikroorganisme dan suhu dari sarang lebah yang berkisar 35–36°C merupakan faktor utama dalam pematangan roti lebah yang membutuhkan waktu sekitar dua minggu.

Roti lebah juga memilki asam laktat enam kali lebih tinggi dibandingkan *bee pollen*. Oleh karena itulah dapat menghambat pertumbuhan beberapa jamur dan mikroorganisme karena pH yang rendah dan keasaman yang tinggi. Kondisi ini menjadikan roti lebah mempunyai masa simpan lebih lama dibandingkan *bee pollen*. Roti lebah merupakan sumber protein,

mikroelemem, dan vitamin, serta lemak yang dibutuhkan oleh lebah. Namun demikian roti lebah mempunyai nilai protein yang lebih rendah dibanding *bee pollen*. Lebih lanjut, kadar air juga akan mengalami penurunan sekitar 13–14% selama proses pengeringan. Perbandingan susunan komponen kimia pada roti lebah dibandingkan produk lebah yang lain dapat dilihat pada Tabel 3.16.

Tabel 3.16 Komposisi Produk Lebah setelah Proses Pengeringan.[22]

	Persentase Beberapa Komponen (%)				
Produk	Protein	Lemak	Karbohidrat	Kadar Air	Kadar Abu
Madu	0,4	0	79,83	17–21	0,1
Pollen	22	5	31	25=>11	3
Bee bread	20	3	24–35	20=>14	3
Royal Jelly	11	6	9	67	1

Roti lebah mempunyai komponen-komponen yang dapat mencegah penyakit secara biologis. Hal ini dikarenakan memiliki vitamin B yang meningkatkan fungsi sistem persarafan dan metabolisme, sehingga menstimulus produksi sel darah merah dan hemoglobin, baik pada anak-anak maupun orang dewasa. *Bee bread* maupun *bee pollen* keduanya memiliki efek positif terhadap sistem kekebalan tubuh sehingga dapat menjadi sumber antioksidan bagi manusia, *bee bread* juga memiliki sifat antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan virus serta sebagai antipiretik penurun demam.

5. *Royal Jelly*

Royal Jelly atau tepung sari adalah salah satu jenis *bee product* dari lebah selain produk utama madu dan propolis dan juga produk-produk yang lain seperti lilin atau malam lebah atau dikenal juga sebagai *bee wax*, roti lebah dan racun lebah atau *apitoxin*.

Definisi *Royal Jelly*

Royal jelly atau dikenal sebagai susu lebah adalah zat hasil sekresi lebah pekerja yang digunakan sebagai sumber makanan baik oleh sang ratu lebah maupun larva lebah (Gambar 3.4). *Royal jelly* ini berguna untuk membantu ratu lebah dalam proses 'prokreasi' atau bereproduksi. *Royal jelly* juga dimanfaatkan oleh larva dari lebah madu dalam rangka dapat berkembang biak secara optimal.

Gambar 3.4 *Royal Jelly* Mengelilingi Larva Lebah Ratu.[33]

Lebah pekerja menyimpan hasil sekresinya pada sel heksagonal di dalam sarang. *Royal jelly* tersusun atas dua komponen, yaitu cairan berbentuk putih susu (*milky*) dan cairan jernih. Lebah pejantan membawa *royal jelly* pada saat lebah tersebut telah berumur tua dan sekresi akan berhenti setelah lebah berumur tiga minggu, selanjutnya lebah pekerja akan pergi mencari nektar dan polen.

Royal jelly adalah cairan dengan konsistensi kental berwarna putih yang dihasilkan oleh lebah muda, dan merupakan makanan bagi larva muda tersebut selain juga sebagai makanan khusus bagi ratu lebah sepanjang hidupnya. *Royal jelly* dihasilkan lebah muda yang mengonsumsi *bee pollen*.

Madu selanjutnya dikeluarkan melalui kelenjar *hypopharyngeal* lebah pekerja, dengan hasilnya berupa cairan berwarna putih dan kental yang berada pada kedua sisi, yaitu kepala dan bagian leher lebah. Biasanya ratu lebah langsung meminum *Royal jelly* dari kelenjar lebah madu tersebut.

Royal jelly yang juga sering disebut sebagai 'susu ratu' sebenarnya bukanlah susu, bukan pula susu yang dihasilkan ratu lebah. Namun dikarenakan warnanya yang putih kental dengan rasa asam dan menjadi konsumsi ratu lebah, sehingga disebut *bee milk* atau susu ratu. Selain itu *royal jelly* memiliki banyak kandungan zat bergizi yang baik bagi tubuh. Kandungan gizi tersebut adalah karbohidrat, protein, vitamin, lipid, hormon, enzim, mineral, niasin, asam folat, dan biotin. Kandungan gizi yang tinggi inilah sehingga menyebabkan ukuran ratu menjadi lebih besar serta mempunyai umur yang relatif lebih panjang dibandingkan jenis lebah yang lain, yaitu sekitar 3–4 tahun.

Umur simpan *royal jelly* pada suhu 20°C hanya bertahan sekitar 5 hari. *Royal jelly* jika disimpan pada bagian *freezer* dapat bertahan sangat lama, dengan tetap terjaga nilai kandungan gizinya. Penyimpanan *royal jelly* dapat lebih lama dan menjamin kualitasnya agar tidak terfermentasi, yaitu disimpan di dalam botol kaca. Penyimpanan lebih baik lagi jika dilakukan dengan cara pencampuran dengan madu yang murni dengan komposisi 1 dibanding 9. Perbandingan tersebut yaitu satu bagian dari *royal jelly* dicampur dengan 9 bagian dari madu murni.

Apabila *royal jelly* dipanen, maka jika terjadi kontak dengan udara pada suhu 15°C, maka warna *royal jelly* akan menguning. Hal tersebut menjadi penanda jika *royal jelly* menjadi memburuk karena terdapat albumin, sebagai akibat proses pengeringan. *Royal jelly* juga memiliki daya simpan terbatas, sehingga akan terjadi pengurangan atau penurunan komposisinya. Perubahan yang terjadi jika *royal jelly* disimpan dalam waktu yang lama, yaitu antara lain tingginya kadar asam sitrat dan perubahan fraksi protein menjadi tidak stabil, penurunan asam amino bebas, serta berkurangnya oksidasi glukosa. Cara penyimpanan *royal jelly* sebaiknya dilakukan pada suhu 0–5°C. Di negara

Eropa, pada musim dingin *royal jelly* dapat tahan selama 18 bulan. Pada penyimpanan 17°C, *royal jally* dapat bertahan selama dua tahun.[34]

Komponen Bioaktif *Royal Jelly*

Komponen paling aktif pada *royal jelly* adalah asetilkolin, yang mengandung sebanyak 17 macam asam amino protein, lipid, karbohidrat, dan asam aspartat. Komponen ini berfungsi untuk mengatasi kelelahan yang kronis, menjaga kesehatan badan, dan untuk pertumbuhan normal. Kandungan *pantothenic acid* yang terdapat pada *royal jelly* adalah sangat tinggi, yang mencapai 6 kali kandungan dibandingkan dengan yang terdapat pada ragi dan liver.

Pantothenic acid adalah senyawa antioksidan yang mempunyai peran menghambat proses terjadinya radikal bebas. Selain itu, *pantothenic acid* juga berperan untuk mengubah *choline* menjadi *acethle choline*, dengan perannya sebagai neurotransmitter dalam perkembangan mental, fungsi memori, maupun reproduksi. Lebih lanjut, *pantothenic acid* berperan sebagai katalisator yang mengatur pada produksi dan pelepasan hormon adrenal.

Komponen protein pada *royal jelly* yang mempunyai fungsi fisiologis sebagai penekan reaksi alergi, imunomodulator, penurun hipertensi, dan berperan pada proses proliferasi melalui cara peningkatan diferensiasi pada semua jenis sel penyusun otak. Adapun *10-hidroksi-trans-2 decenoicacid* (HDEA) dan asam lemak tak jenuh dapat meningkatkan terjadinya regenerasi sel neuron dan penurunan astrosit dari sel induk persarafan, sehingga dapat terjadi peningkatan nafsu makan dan vitalitas.

Komponen lain yang terkandung pada *royal jelly* adalah *royalisin,* yang mempunyai peran menghambat pertumbuhan bakteri, namun demikian *royalisin* tidak menghambat pertumbuhan jamur (fungi). *Royalisin* juga mengandung gamma globulin yang merupakan salah satu jenis asam amino yang berperan sebagai imunomodulator. Selanjutnya, senyawa *royalisin* juga mengandung 16% asparginin yang berperan sebagai jaringan sel tubuh dari manusia. Komponen bioaktif dari *royal jelly* dapat dilihat pada Tabel berikut (Tabel 3.17).

Tabel 3.17 Komponen dari *Royal Jelly* (mg/g berat kering).[22]

Komponen *Royal Jelly* (mg/g Berat Kering)	Nilai Maksimum	Nilai Minimum
Pantothenic acid	265	159
Niacin	88	48
Tiamin	5	1,44
Riboflavin	25	5
Pyrodox	4,0	1,0
Inositol	350	80
Folic acid	0,530	0,130
Biotin	19,8	1,1

Komposisi Kimia dan Manfaat *Royal Jelly*

Kandungan gizi dari *royal jelly* yaitu berupa protein dengan persentase 45% yang terdiri atas nitrogen 73,9%, peptide 0,165%, dan asam amino bebas berkisar 2,3%; lemak 13%, gula 20%, garam mineral, vitamin, yang terdiri atas Vitamin B kompleks, H dan E; enzim pencernaan, hormon gonadotropin, niasin, biotin, asam pantotenat, dan inositol. Asam amino yang teridentifikasi pada *royal jelly* adalah *asam aspartat* dan asam glutamat. *Royal jelly* juga mengandung berbagai macam vitamin seperti vitamin C dan E (tokoferol), B1, B2, B6, asam folat, insitol, asam pantotenat. *Royal jelly* juga mengandung lipid, steroid, peptida, minyak aromatik, karbohidrat antosianin, karotenoid, enzim, flavonoid, asam ferulik, serta mineral. Bahan dasar *royal jelly* yang berasal dari roti lebah yang dicerna oleh kelenjar adrenal dari lebah pekerja menyebabkan *royal jelly* kaya akan protein oligopeptida dan asam amino bebas. Adanya kandungan *royalisin* yang merupakan fraksi dari asam lemak, menyebabkan rasa asam pada *royal jelly* meski pada keadaan segar. Secara ilmiah, *royal jelly* terbukti memiliki efek *antiaging* (antipenuaan), memperpanjang usia melalui efeknya pada kesehatan tubuh dan meningkatkan kolagen sehingga mempertahankan keremajaan dan kelenturan kulit; meningkatkan fertilitas dan memperbaiki sistem reproduksi; mengatasi nyeri haid dan menjaga kesehatan sistem reproduksi pada saat menopause; serta meningkatkan daya ingat dan melindungi sistem saraf, mencegah osteoporosis melalui kemampuan tulang menstimulasi pembentukan tulang dan menyerap kalsium. Kandungan berbagai vitamin pada *royal jelly* dapat dilihat pada Tabel 3.18.

Tabel 3.18 Vitamin pada *Royal Jelly*.[22]

Vitamin	Satuan
Inositol	78,0–150,0
Niacin (*Nicotinic acid)*	91,0–149,0
Vitamin B2 (*Riboflavin*)	5,3–10,0
Vitamin B6 (*Pyridoxin*)	2,2–10,2
Vitamin B1 (*Thiamine*)	1,5–7,4
Pantothenic acid	65,0–200,0
Biotin	0,9–3,7
Folic acid	0,16–0,50
Vitamin C	*Trace*

Efek Samping *Royal Jelly*

Beberapa efek samping konsumsi *royal jelly* adalah dermatitis, asma, dan bahkan syok anafilatik. Alergen yang terkandung pada *royal jelly* seperti fragmen protein *royal jelly* 1 dan 2 (MRJ1 dan MRJ2), merupakan alergen utama di dalam *royal jelly*. Kasus yang jarang, mengonsumsi *royal jelly* dapat menyebabkan diare yang disertai darah, hal tersebut karena terjadinya perdarahan pada usus. Bagi pasien penderita hipotensi, *royal jelly* dapat menurunkan tekanan darah, sehingga tidak disarankan mengonsumsi *royal jelly*. Penggunaan olesan *royal jelly* pada kulit yang alergi dapat memperparah dan menyebabkan peradangan dan ruam.

6. Lilin Lebah (*Bee Wax*)

Lilin lebah (*Bee Wax*) adalah salah satu jenis *bee product* dari lebah selain produk utama madu dan propolis dan juga produk-produk yang lain seperti *pollen*, *roya jelly,* roti lebah dan racun lebah atau *apitoxin*.

Definisi Lilin Lebah

Lilin lebah disebut juga *bee wax* atau malam lebah, dapat diperoleh pada sarang lebah. Lebah madu menggunakan lilin untuk membangun sarang mereka (Gambar 3.5). Lilin lebah dihasilkan dari sekresi sepasang kelenjar yang berada pada ruas-ruas bagian abdomen. Lilin yang dihasilkan bergantung

pada polen dan madu yang dikonsumsi oleh lebah setelah muncul dari sel sarang, sehingga polen yang dikonsumsi harus berkualitas tinggi. Lebah bisa menghabiskan madu 7–15 kg, untuk menghasilkan 1 kg lilin. Lebah pada umur 10 hari secara optimal akan menyekresikan lilin lebah melalui pori-porinya.

Gambar 3.5 Lebah mengeluarkan *Bee Wax*: lilin muncul dari kelenjar perut lebah dan memadat menjadi platelet kecil.[35]

Jenis lebah *Apis melifera* menghasilkan lilin sekitar 284 senyawa, 48 senyawa di antaranya berperan sebagai aroma lilin lebah, 111 komponennya mempunyai sifat *volatile*. Keseluruhan dari komponen secara umum terdiri atas berbagai senyawa alkohol rantai panjang seperti senyawa monoester jenuh dan tak jenuh dan ester asam lemak, diester hidrokarbon jenuh dan tak jenuh, poliester hidroksi, dan asam lemak.

Beberapa jenis lilin yang dikenal di alam ada beberapa bagian, yaitu yang berasal dari tumbuhan, hewan, dan petroleum atau mineral. Lilin asal hewan seperti *bee wax* merupakan jenis lilin yang mempunyai struktur kimia yang stabil. Berdasarkan kualitasnya, lilin lebah dibagi menjadi dua golongan. Golongan 1, lilin kualitas pertama, diperoleh dari sarang lebah yang masih baru dan belum pernah diisi madu atau tepung sari. Lilin yang diperoleh dari sarang yang demikian ini warnanya putih dan bersih. Golongan 2, lilin kualitas kedua, yaitu lilin yang diperoleh dari sarang lebah yang telah diisi madu serta telah diambil madunya. Karakteristik berbagai fisikokimia lilin lebah dapat dilihat pada Tabel berikut (Tabel 3.19).

Tabel 3.19 Karakterisasi Fisikokimia dari Lilin Lebah.[36]

Sifat Fisika	Sifat Kimia
1. Titik leleh = 62–65°C	Memiliki rantai karbon tidak jenuh
2. Nilai BJ = 0,95–0,96	Kandungan terbanyak monoester 35%
3. Larut dalam benzene kloroform, minyak atsiri atau eter hangat	Hidrokarbon 40%, diester 14%, triester 3%, hidroksimonoester 4%, hidroksipoliester 8%, asam lemak bebas 12%, ester asam 1%, poliesters asam 2%, alkohol aromatik 1%, dan bahan tidak teridentifikasi 6%
4. Tidak larut dalam air, hanya sedikit larut dalam alkohol	Lebih reaktif jika direaksikan dengan bahan lain
5. Mudah terbakar dan menyala lebih terang, tidak berasap dengan warna kekuningan	

Warna Lilin Lebah

Beberapa warna dapat ditimbulkan dari lilin lebah akibat pigmen yang terkandung pada propolis dan polen, atau bisa juga dari besi oksida yang terhubung dengan metal besi. Lilin lebah ini sering tercampur dengan produk lebah yang lain seperti propolis, polen, dan madu yang meningkatkan kepadatan serta berpengaruh pada warna. Warna dari lilin lebah dapat bervariasi, mulai dari kuning, oranye, dan kecokelatan disertai aroma tumbuh-tumbuhan.

a. Lilin Lebah Kuning (*Cera Flava*)

Lilin lebah kuning atau disebut *cera flava*, berupa bentuk padatan berwarna keuningan sampai kecokelatan, berbau seperti madu dan cukup rapuh jika didinginkan, serta bila patah akan berbentuk menjadi granula. *Cera flava* larut dalam etanol panas, tidak larut air, dan juga sulit larut dalam etanol 95% dingin. Kandungan *cera flava* seperti asam serotat dan sedikit mirisin, merupakan kandungan lilin kuning yang larut dalam eter hangat, kloroform, minyak lemak, dan minyak atsiri. Larut sebagian dalam karbon disulfida dingin dan benzena. Pada suhu sekitar 30°C larut sempurna dalam disulfida dan benzena.

Bahan kimia dalam *cera flava* sekitar 70% ester. Selain itu, juga mengandung asam bebas sebesar 14%, hidrokarbon 20%, ester kolesterol, propolis, dan zat warna polen. Pada umumnya untuk memutihkan *cera flava* dilakukan dengan cara kimiawi, yaitu menggunakan asam kromat. Untuk mendapatkan *cera flava* dilakukan pemisahan dengan sarang lebah dan madu, yaitu dengan cara melarutkannya dalam air, kemudian didinginkan dan sarangnya dilarutkan kembali dalam air yang dipanaskan. Selanjutnya, dilakukan ekstraksi pada sarang yang telah dilarutkan tadi hingga terbentuk padatan. Padatan tersebut selanjutnya dimurnikan dengan cara dididihkan di dalam bejana air, sehingga dihasilkan lilin yang bersih. Lilin murni tersebut lalu dituangkan ke dalam cetakan dari tanah liat dan kemudian dibersihkan dengan kain basah.

b. Lilin Lebah Putih (*Cera Alba*)

Lilin diperoleh dengan cara memutihkan lilin lebah kuning. Lilin lebah putih yang berbentuk lempengan atau potongan berwarna putih atau putih kekuningan, tipis bening dengan butiran halus dan tidak mengkilat, menjadi lunak dan liat bila digenggam, bau khas madu, tidak tengik, dan tidak mempunyai rasa, serta tidak melekat pada gigi. *Cera alba* larut dalam minyak lemak dan minyak atsiri dan dalam etanol

panas, agak sukar larut dalam etanol konsentrasi 95% dingin dan eter, tidak larut dalam air.

Efek Samping Lilin Lebah

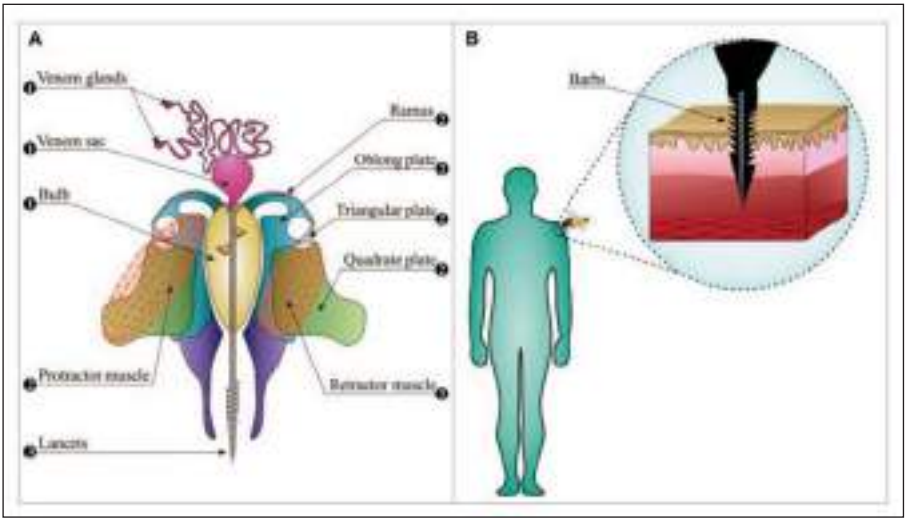
Lilin lebah memiliki efek samping berupa reaksi alergi. Meskipun jarang terjadi, namun sebaiknya dihindari penggunaannya bagi yang alergi. Alergi yang terjadi biasanya terjadinya ruam pada kulit atau kemerahan. Konsumsi propolis atau produk lebah lain yang masih terkandung lilin lebah, dalam jangka pendek tidak membahayakan kesehatan, namun apabila lilin lebah yang masuk ke dalam tubuh manusia berjalan dalam waktu yang lama secara terus-menerus, maka akan berisiko terjadinya penyumbatan pada usus. Penyumbatan pada usus, akan menghalangi makanan serta cairan yang masuk melalui usus, menghalangi sistem pencernaan, serta menghalangi tubuh menyingkirkan limbah melalui proses detoksifikasi yang berakibat pada kerusakan organ liver.

7. *Bee Venom* (*Apitoxin*)

Bee Venom (Apitoxin) adalah salah satu jenis *bee product* dari lebah selain produk utama madu dan propolis dan juga produk-produk yang lain seperti *royal jelly,* lilin atau malam lebah atau dikenal juga sebagai *bee wax* dan roti lebah.

Definisi *Bee Venom* (*Apitoxin*)

Bee venom atau disebut juga racun lebah atau dengan nama Internasional dikenal sebagai *apitoxin* (Gambar 3.5). *Bee venom* merupakan enzim yang terdiri atas susunan asam amino dan protein. Bentuk *bee venom* berupa cairan bening tak berwarna, namun berasa manis dan sedikit pahit. *Bee venom* bersifat larut dalam air, tidak larut dalam ammonium sulfat dan alkohol. Jika terjadi kontak dengan udara, *bee venom* membentuk kristal buram atau kelabu-putih.



Gambar 3.6 Proses Terapi Apitoxin (*Bee Venom*).[37]

Bentuk dari *bee venom* adalah cairan bening yang merupakan enzim dengan komposisi kompleks dengan asam amino dan protein. *Bee venom* adalah senyawa larut dalam air dan tidak larut dalam alkohol. *Bee venom* merupakan racun yang dibuat oleh lebah pekerja yang berbentuk cairan bening yang cepat mengering. Racun lebah adalah suatu bentuk perubahan dari alat pengantar telur. Sengat yang dimilikinya digunakan sebagai penghalau bagi pengganggu sarang.

Bee venom terdiri atas beberapa unsur protein. Jumlah takaran yang diinjeksikan dalam satu sengatan lebah tidak boleh melebihi dari 0,1 mg. Adapun komponen utamanya adalah *melittin* dengan persentase sekitar 52%. *Mellitin* merupakan suatu senyawa antiinflamasi yang kuat dan dapat memicu pembentukan kortisol dari larutan tubuh. *Apamin* yang terkandung dalam sengatan lebah merupakan racun saraf yang lemah, namun dapat meningkatkan produksi kortisol pada kelenjar adrenalin.

Apitoxin yang disengatkan oleh lebah akan menimbulkan rasa sakit dan bengkak karena pengaruh racun. Jika terjadi serangan lebah sebanyak sekitar 500 ekor, maka akan menyebabkan kematian seketika pada orang yang

disengat. Hal ini terjadi karena orang tersebut mengalami paralisis pernapasan. Namun demikian, sengatan lebah dalam jumlah tertentu dapat dimanfaatkan sebagai terapi beberapa macam penyakit, hal ini dikarenakan racun lebah tersebut mengandung bahan yang diperlukan untuk pengobatan.

Pada saat ini, apitoxin atau *bee venom* melalui sengatan lebah sudah mulai umum digunakan dalam pengobatan dengan memanfaatkan titik-titik akupunktur. Namun demikian, pemakaian *bee venom* sebagai pengobatan harus hati-hati karena tidak bisa diberikan begitu saja pada orang yang memiliki penyakit tertentu seperti penyakit jantung dan alergi (hipersensitif). Oleh karena itulah, penggunaan *bee venom* harus berdasarkan diagnosis yang tepat. Istilah popular secara Internasional untuk pengobatan yang memanfaatkan racun lebah atau *bee venom* adalah *bee venom therapy* (BWT).

Komposisi *Bee Venom*

Bee venom mempunyai karakteristik meningkatkan stimulasi aliran darah menjadi lebih kuat atau dikenal sebagai sifat *hemorrhagic*. Karakteristik ini berbeda dengan racun ular atau yang dikenal sebagai *viper*, viper mempunyai sifat *koagulan* (terjadi aglutinasi). Komposisi *bee venom* terdiri atas *apamin, fosfolipase A, melittin,* dan *hyaluronidase* yang merangsang aktivitas jantung dan juga kelenjar adrenal serta menghambat sistem saraf.

Bee venom yang juga mengandung zat mineral, volatile, asam format, asam organik, asam klorida, dan asam orto-fosfat. Selain itu, juga mengandung antibiotik, ensim *fosfolipase A*, serta dua jenis asam amino yang kaya akan *sulfur metionin* dan *sistein*.

Manfaat *Bee Venom*

Manfaat dari *bee venom* dapat dijelaskan berdasarkan komponen yang terkandung. Komponen utama dalam *bee venom* adalah *melittin*, yaitu sebesar 52% dari racun peptide. Komponen-komponen yang lain, yaitu: 1. *Apamin*, berfungsi meningkatkan produksi kortisol dari kelenjar adrenal. *Apamin* adalah termasuk golongan neurotoksin ringan; 2. Adolapin, berkontribusi 2–5%

dari peptida, yang berperan sebagai antiinflamasi, dan berfungsi juga dalam *blockade siklooksigenase*, sehingga dapat sebagai analgesik; 3. *Phospholipase A2* yang terkandung sebesar 10–12% dari peptide, adalah komponen yang paling merusak dari *bee venom*. Komponen ini adalah merupakan enzim yang berperan mendegradasi fosfolipid membran sel. Hal ini menjadi penyebab penurunan tekanan darah dan menghambat pembekuan darah. *Phosfolipase A2* mengaktifkan asam arakhidonat yang dimetabolisme dalam siklooksigenase-siklus dalam membentuk prostaglandin, di mana prostaglandin berperan mengatur respons inflamasi tubuh; 4. *Hyaluronidase*, berkontribusi sebesar 1–3% dari peptida dalam melebarkan kapiler pembuluh darah sehingga menyebabkan peradangan yang meluas; 5. Histamin mempunyai kontribusi sebesar 0.5–2% yang terlibat dalam respons alergi; 6. Noradrenalin dan Dopamin berkontribusi pada peningkatan pulsus sebesar 1 sampai 2%. Protease inhibitor bertindak sebagai anti inflamasi dan menghentikan perdarahan berkontribusi sebesar 2%. Perlu diketahui sengatan yang diberikan adalah sengatan lebah, bukan tawon, karena tawon mengandung *phosfolipase A1* yang berbeda dengan lebah, yakni *phosfolipase A2*.

Bee venom sebagai racun lebah juga dapat digunakan sebagai terapi pengobatan rematik, karena berfungsi menstimulasi pelepasan kortisol (kortison). Penerapan terapi dapat dilakukan melalui penyuntikan intramuskuler atau dapat diberikan secara per oral. Terapi lainnya dapat berupa salep dan obat gosok untuk pengobatan beberapa kasus poliarthritis. Beberapa kasus dapat diatasi seperti mengurangi nyeri otot, saraf, serta *neuromialgias*.

Racun lebah berfungsi sebagai peningkatan kelancaran aliran darah dan saraf. *Bee venom* yang merupakan racun lebah juga dapat dimanfaatkan sebagai antivirus alami, yaitu sebagai antiretroviral yang digunakan untuk menghambat virus HIV-AIDS. Dikatakan *bee venom* mampu memecah dan menghancurkan cangkang virus, sehingga mampu menyembuhkan penyakit akibat virus tersebut, demikian juga dikatakan bahwa *bee venom* mengandung zat antikanker.

Mekanisme Terapi *Bee Venom*

Mekanisme terapi *bee venom* adalah dilakukan dengan cara menusukkan kaki belakang dari lebah sehingga terjadi sengatan racun lebah pada bagian permukaan tubuh yang merasa sakit atau dapat juga pada titik-titik akupunktur. Pada awal terapi dilakukan uji sensitivitas dengan cara menyuntikkannya. Namun pada kasus-kasus tertentu, terapi *bee venom* lebih efektif jika diberikan dalam bentuk ekstrak yang dikemas dalam bentuk kapsul bersama dengan propolis, *bee pollen,* dan *bee wax*.

Melalui sengatan lebah akan menyebabkan terjadinya pelebaran pembuluh darah di sekitar lokasi sengatan, maka terjadilah peningkatan aliran darah, sehingga aliran darah menjadi lancar. Hal ini juga menyebabkan lunturnya kotoran yang menyumbat aliran darah, sehingga akan menghilang pada saat racun lebah masuk ke dalam aliran darah melalui sengat lebah tersebut.

Efek Samping *Bee Venom*

Reaksi demam dapat muncul setelah terapi sengatan lebah untuk pertama kalinya. Namun hal tersebut adalah pertanda efek baik, karena demam merupakan respons imun tubuh yang menandakan terapi sengat lebah telah bekerja. Reaksi demam yang muncul merupakan proses atau pembentukan antibodi. Beberapa jam kemudian setelah menjalani terapi sengat lebah atau *bee venom therapy* (BVT), dapat juga timbul rasa gatal di sekitar sengatan lebah ataupun di bagian tubuh lainnya. Penjelasannya, karena racun lebah yang disengatkan langsung terdistribusi melalui aliran darah sehingga mampu tersebar ke seluruh bagian tubuh. Itulah tidak mengherankan jika sengatan lebah diberikan pada daerah kepala, maka gatalnya dapat sampai pada daerah punggung atau anggota tubuh lainnya yang letaknya berjauhan dari lokasi di mana sengatan diberikan.

Efek lain dapat berupa odematus atau kebengkakan pada daerah yang terkena sengatan. Besar kecilnya kebengkaan akibat sengatan dapat berbeda untuk masing-masing orang, bahkan ada yang sama sekali tidak mengalami kebengkakan. Penjelasannya adalah sebagai berikut: kebengkakan merupakan

respons tubuh di mana terjadi pelebaran pembuluh darah di sekitar lokasi sengatan, sehingga terjadilah peningkatan aliran darah. Hal ini menyebabkan efek baik, yaitu lunturnya kotoran yang ada dalam darah.

Mekanisme reaksi alergi atau hipersensitivitas pada sengatan lebah dapat dibagi dua, yaitu *delayed hypersensitivity* (hipersensitivitas tipe lambat) dan *immediate hypersensitivity* (hipersensitivitas tipe cepat). *Delayed hypersensitivity* (hipersensitivitas tipe lambat) atau dikenal dengan istilah reaksi tipe IV yang disebut juga sebagai *cell mediated immunity* (CMI), *delayed type hypersensitivity* (DTH). Reaksi alergi baru muncul setelah lebih dari 24 jam terpapar oleh antigen. Reaksi alergi dapat terjadi karena respons sel T yang mengalami desensitisasi terhadap antigen sehingga berakibat sel T melepaskan limfokin seperti *macrophage activating factor* (MAF) atau *macrophage inhibition factor* (MIF). Makrofag yang teraktivasi menjadi penyebab kerusakan jaringan.

Reaksi hipersensitivitas cepat disebut juga reaksi anafilaksis atau dikenal juga sebagai reaksi hipersensitivitas tipe I. Anafilaksis adalah reaksi alergi akut yang dapat berujung pada kematian, ini dikarenakan pelepasan mediator yang dengan cepat terjadi. Pelepasan mediator tersebut berasal dari basofil atau sel *mast* sebagai interaksi antara alergen dengan respons imun berupa Immunoglobulin E (IgE).

DAFTAR PUSTAKA

1. SNI 2013. Madu. Badan Standardisasi Nasional Indonesia. SNI. No 01-3545-2013.
2. Bogdanov S. 2016. Honey Composition. In: The Honey Book: Chapter 5. Bee Product Science. www.bee-hexagon.net. sss
3. Prasetyo RH and Safitri E. 2018. Topical honey to treat an abscess caused by staphylococcus aureus: a case report. Southeast Asian J Tropic Med and Pub Health, 49(5): 835-838.
4. Prasetyo RH and Safitri E. 2019. Topical honey to treat a herpes simplex virus skin infection: experience with two cases. Southeast Asian J Tropic Med and Pub Health, 49(6): 1848-1853.

5. Safitri E, Utama S, Widiyatno TV, Sandhika W. and Prasetyo RH. 2016. Autoregeneration of mice testicle seminiferous tubules due to malnutrition based on stem cells mobilization using bee honey. Asian Pac. J. Reprod, 5(1): 30-34.
6. Safitri E, Widiyatno TH, Sandhika W. and Prasetyo RH. 2019. Effectivity of honey to regenerate the production of testosterone by induction of endogenous stem cells of rat with low libido due to malnutrition. Biocell, 43(4-1): 235-239 239.
7. Prasetyo RH and 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 Pac. J. Reprod, 5(3); 198-203.
8. Safitri E, Widiyatno TV and Prasetyo RH. 2016 Honeybee product therapeutic as stem cells homing for ovary failure. Vet World, 9(11): 1324-1330.
9. Codex-Alimentarius. 2001. Codex Standard for Honey. CODEX STAN 12-1981.
10. Prasetyo RH. 2010. Intestinal parasites infection in AIDS patients with chronic diarrhea at Dr. Soetomo General Hospital Surabaya. Indo J. Tropic lnfec Dis, 1 (1): 36-37.
11. Djoenaedi, Intania, Sudjatmiko, Gentur. 2012. topical honey aplication in treating large ulcerated wound as a complication of vascular malformation in a 5-month-old babby. J. Plastik Rekonstr, 1(2): 182-186.
12. Alten AV. 2022. Bee venom helps treat baldness and hair loss in study.https://www.bee-pollen-buzz.com/bee-venom-treats-aldnes.html.
13. Ratnayani K, Adhi D dan Gitadewi I. 2008. Penentuan kadar glukosa dan fruktosa pada madu randu dan madu kelengkeng dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi. J. Kimia. 2(2): 77-86.
14. Baltrušaitytė V, Čeksteryte V. and Venskutonis R. 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. J Chemistry. 101(2): 502-514.
15. Moniruzzaman M, Khalil MI, Sulaiman SA and Gan SH. 2013. Physicochemical and antioxidant properties of malaysian honeys produced by *Apis cerana*, *Apis dorsata,* and *Apis mellifera*. J. Compl Altv Med, 43(13): 1-12.
16. Ruoff K. 2006. Authentication of the Botanical Origin of Honey. Eidgenössische Technische Hochschule. Zürich.

17. Taormina PJ, Niemira BA, Larry R, Beuchat. 2001. Inhibitory activity honey against foodborne pathogens as influenced by the prescence of hydrogens peroxide and level of antioxidant power. Inter. J. Food Microbiol. 69(2001): 217-225.
18. Ajibola A, Chamunorwa JP and Erlwanger KH. 2012. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. J Nut & Met. 9(61): 1-12.
19. Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO and Fett R. 2016. Honey: chemical composition, stability and authenticity. J Food Chem. 196: 309-323.
20. Ahmed M, Shafiq MI, Khaleeq A, Huma R, Qadir MA, Khalid A, Ali A. and Samad A. 2016. Physicochemical, biochemical, minerals, content analysis, and antioxidant potential of national and international honey of Pakistan. J Chem. 2016: 1-10.
21. Can Z, Yildiz O, Sahin H, Turumtay EA, Silici S. and Kolayli S. 2015. An Investigation of Turkish Honeys: Their Physicochemical properties. Food Chem. 1(180): 133-141.
22. Jaya F. 2017. Produk-produk Lebah Madu dan Hasil Olahannya. 1st Ed. UB Press. Malang. Indonesia.
23. Sihombing DTH. 1994. Ilmu Ternak Lebah Madu. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Indonesia.
24. SNI 2004. Madu. Badan Standardisasi Nasional Indonesia. SNI. No 01-3545-2004.
25. Hutagalung JS. 2016. Rumah Lebah from Traditional to Modern Medicine. AUP. Surabaya.
26. Bogdanov S. 2016. Propolis : Origin, Production, Composition. The Propolis Book. Chapter 1: Bee Product Science. p.1-21. https://www.researchgate.net/publication/304012141_Propolis_Origine_Production_Composition.
27. Surendra NS, Bhusshanam M dan Ravikumar H. 2012. Antimikrobial activity of propolis of *Trigona* sp., and *Apis melifera* of karnataka. India. Primer J. Microbiol. Res, 2(2): 80-85.
28. Gomez CAM, Gomez RM, Raez RD, Sagura CA. and Fernandez GA. 2011. Advances in the analysis of phenolic compound in products Derived from Bees, J. Pharmac. Bio.Anal, 41: 1226.

29. Campos MGR, Bogdanov S, de Almeida-Muradian LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, Ferrreira F. 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods. Review Article. J. Apicultur. Res. Bee World, 47(2): 156-163.
30. Sabir A. 2005. The Inflammatory Response on Rat Dental Pulp Following Ethanolic Extract of Propolis (EEP) Application. Dental J. 38(2): 77-83
31. New Westminster Beekeeper's Association. 2019. Things to Know about Beekeeping Module 9 – Collecting and Storing Pollen and Propolis. This module was prepared for members of the New Westminster Beekeeper's Association and are intended to be augmented by hands-on experience in the bee yard. https://nwbee.ca/education-2/
32. Kieliszek M, Kolotylo V, Mikołajczuk-Szczyrba A, Giurgiulescu L, Kot AM, Kalisz S, Pobiega K, Cendrowski A. 2021. Isolation And Identification Of New Yeast Strains From Bee Bread.Carpathian J Food Sci Tech, 13(1): 207-213
33. Chalapathy CV, Chatterjee A, Jayaramaiah U, Shivasharanappa K, Hanchinalmath JV, Patil SJ. 2020. Impact of Royal Jelly on Infertility: A Review. Asian J Biol Life Sci. 9(3): Sep-Dec
34. Krell R. 1996. Value added Products from Beekeping. FAO Agriculture Service Bulletin. 124
35. Rtter W. 2018. Facts about Wax : Part 1 Beeswax in apiculture. Bees Develop J. 126
36. Kuntadi. 2008. Langkah-langkah Memaksimalkan Produksi dan Produktivitas Koloni Lebah Madu. Makalah Gelar Teknologi 5-6 Nov 2008 di Padang Pariaman Sumatra Barat. Pusat Pengembangan dan Penelitian Hutan.
37. Pucca MB, Cemi FA, Olieviera IS, Jenkins TP, Argemi R, Serensen CV, Ahmadi S, Barbosa JE, Laustsen AH. 2019. Bee Updated: Current knowledge on Bee Venom and Bee Evenoming Therapy. Frontiers in Immunology. 10: 2000.

4

STEM CELL

Pembahasan terkait *stem cell* diawali dari pengertian *stem cell* itu sendiri, kemudian bioteknologi yang dapat diterapkan pada abad milenial ini. Selanjutnya juga spesifikasi apa saja yang menjadi ciri khas maupun tipenya. Sumber originalitasnya juga perlu diketahui agar dapat dioptimalkan penggunaannya, termasuk juga bagaimana inovasi ke depan dari *stem cell* bagi dunia kedokteran modern.

PENGERTIAN *STEM CELL*

Stem cell berasal dari kata dasar *stem* dan *cell*. *Stem* berarti batang dan *cell* berarti sel. *Stem cell* berarti merupakan sel awal mula atau pertama kali yang mengawali pertumbuhan dari sel lain yang menyusun keseluruhan jaringan tubuh suatu organisme, baik seperti binatang, tumbuhan, maupun manusia. Ibarat sebagai suatu batang dari pepohonan yang merupakan sumber awal bagi perkembangan cabang atau ranting, daun, bunga, maupun buahnya. Demikian halnya *stem cell* merupakan sel awal mula dari terbentuknya

berbagai jaringan yang menyusun tubuh, baik jaringan *endoderm*, *mesoderm,* maupun *ectoderm*.[1]

Syarat agar dapat disebut sebagai *stem cell* adalah karakteristik dari sel tersebut juga harus mempunyai kemampuan memperbanyak diri sendiri atau *self renewal* dan bersifat plastisitas, yaitu mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi serta memperbanyak diri menjadi lebih dari satu tipe atau jenis sel, baik yang bersifat *multipotent* maupun *pluripotent*. Karakteristik spesifik lain yaitu sel tersebut belum berdiferensiasi (*undifferntiated*).[2]

Stem cell mulai *booming* dan *viral* pemanfaatannya pada dunia kedokteran manusia yaitu pada awal abad ke-20, di mana pertama kali ditemukan sel penyusun *bone marrow* yang mampu membentuk berbagai jenis dan tipe sel di dalam tubuh suatu individu. Jenis atau tipe sel yang bersumber dari *bone marrow* atau sumsum tulang ini dikenal sebagai *stem cell* mesenkimal atau *mesenchymal stem cell* (MSC).

Sel punca yang mengandung arti awal mula, bermakna yang diperkuat dengan ditemukannya keberadaan *stem cell* di awal masa kehidupan embrional dari manusia. *Stem cell* yang berasal dari masa embrional dapat berkembang dan bereplikasi menjadi semua sel dan jaringan. Tubuh manusia diketahui tersusun >100 triliunan sel yang terdiri atas 200 berbagai jenis dan tipe sel yang mempunyai berbagai fungsi yang berbeda pula. Hal inilah yang semakin memperkuat teori bahwa *stem cell* merupakan sel yang menjadi sumber awal mula dari terbentuknya 200 jenis atau tipe sel penyusun tubuh manusia.[1]

Karakteristik yang unik dalam *stem cell* ini membutuhkan suatu inovasi berkesinambungan pada metode eksplorasi melalui pengembangbiakan kultur sel disertai kelengkapan fasilitas laboratorium yang memadai, sehingga pemanfaatannya dapat dioptimalkan. Inovasi tersebut harus aplikatif dan mempunyai ketepatan yang tinggi agar efikasi sebagai terapi dapat dicapai. Oleh karena itulah dibutuhkan suatu panduan yang tepat dalam penyelesaiannya. Namun sampai pada saat ini masih dan akan terus dilakukan penelitian, baik penelitian dasar maupun *medical research*, sehingga nantinya dapat dicapai keberhasilan yang kompetitif. Sampai saat ini dan beberapa dekade ke depan *stem cell* merupakan salah satu topik utama berbagai riset

bioteknologi *biomedical* yang akan membuka peluang berbagai konsep dan gagasan pengobatan terbaru pada dunia kedokteran, baik pada masa milenial ini maupun ke depan.

Permenkes Nomor 833 Tahun 2009, Pasal 1 ayat 1 disebutkan bahwa sel punca adalah sel tubuh dari manusia yang mempunyai kemampuan istimewa dalam memperbaharui atau meregenerasi dirinya sendiri atau "*self renewal*" dan berkemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel lain yang dibutuhkan oleh tubuh. Sel punca dapat berasal dari darah jaringan lemak, sumsum tulang, tali pusat, darah tepi, dan juga berbagai jaringan yang lain. Berdasarkan Permenkes Nomor 833 Tahun 2009 tersebut, sel punca yang diambil untuk pengobatan pada manusia harus sel punca yang berasal dari sel tubuh manusia, bukan berasal dari tumbuhan ataupun hewan. Sel punca juga bisa didapat dari orang lain atau *allogeneic* atau berasal dari tubuh manusia itu sendiri atau disebut *autologus*.

BIOTEKNOLOGI ABAD MILENIAL

Bioteknologi *stem cell* dalam kemampuannya meregenerasi sel pada organ atau jaringan yang mengalami kerusakan pada penderita penyakit dengan kondisi *medical* degeneratif dan *injury*, pemanfaatannya meningkatkan "*expectation*" jutaan pasien yang berada pada titik "keputusasaan". Kemampuan regenerasi pada kerusakan organ atau jaringan akibat suatu penyakit atau *injury* ini adalah berupa penggantian sel yang telah mengalami kerusakan dengan sel baru dan normal. Perbaikan organ dan jaringan yang rusak menggunakan *stem cell* dapat secara potensial dan langsung pada bagian yang dibutuhkan oleh pasien.[2]

Stem cell merupakan sel yang unik dan berbeda dengan sel lain penyusun tubuh, dikarenakan mempunyai beberapa karakteristik yang luar biasa istimewa sehingga membuatnya unik. Karakteristik yang unik dari *stem cell* seperti sifat *totipotent* yaitu dapat berkembang menjadi semua jenis atau tipe sel yang ada di dalam tubuh, *pluripotent* yaitu dapat berkembang menjadi banyak sel tetapi lebih terbatas dibandingkan *totipotent* ataupun *multipotent*

yaitu dapat berkembang menjadi beberapa jenis sel yang segolongan, seperti *endoderm*, *mesoderm,* atau *ectoderm*. Hal ini menjadikan harapan yang sangat menggembirakan dan menjanjikan berupa ketersediaan terapi medis bagi penderita berbagai penyakit degeneratif.[1]

Kemajuan bioteknologi dalam bidang medis berupa pemanfaatan *stem cell* pada era global dan milenial ini sudah merupakan kebutuhan yang tidak dapat dihindarkan. *Stem cell* menyingkap mata dunia dan mampu mengubah konsep-konsep pengobatan di bidang kedokteran medis pada saat ini dan juga pada masa-masa yang akan datang berupa transplantasi sel. *Stem cell,* dalam Bahasa Indonesia, dikenal dalam beberapa istilah seperti sel punca, sel induk atau sel batang, namun istilah sel punca lebih *familiar* dan umum dipergunakan. *Stem cell* atau sel punca yang berarti merupakan awal sel adalah sel yang mengawali pertumbuhan seluruh sel lain penyusun keseluruhan jaringan tubuh organisme, baik manusia, hewan, mupun tumbuhan.

Stem cell merupakan suatu bahan (sel awal) yang bersumber dari tubuh dan harus diketahui dan dipahami oleh berbagai lapisan masyarakat yang berkecimpung dan terkait pada dunia kesehatan dan kedokteran, baik yang berhubungan dengan dunia riset, pengobatan, pemerintahan, maupun industri. Perkembangan riset terkait *stem cell* di Indonesia juga sudah semakin maju. Di Indonesia terdapat 11 rumah sakit (RS) yang tersebar di tujuh kota, yaitu Jakarta, Bandung, Surabaya, Semarang, Padang, Denpasar dan Yogyakarta yang ditunjuk menjadi tempat pelayanan terapi *stem cell*, yaitu seperti R.S. Dr. Soetomo (Surabaya), R.S. Cipto Mangunkusumo (Jakarta), R.S. Dharmais (Jakarta), R.S. Fatmawati (Jakarta), R.S. Harapan Kita (Jakarta), R.S. Persahabatan (Jakarta), R.S. Hasan Sadikin (Bandung), R.S. Dr Kariadi (Semarang), R.S. Dr.Sardjito (Yogyakarta), R.S. Sanglah (Denpasar), dan R.S. Dr. M Djamil (Padang).

Kesebelas R.S. yang tersebar di 7 kota yang ada di Indonesia tersebut wajib memiliki fasilitas instalasi *stem cell*, bank *stem cell*, riset terpadu, dan juga tenaga medis yang memiliki keahlian di bidang *stem cell*. Demikian juga pengolahan dari *stem cell* dapat dilakukan baik di dalam maupun di

luar rumah sakit sesuai Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 32 Tahun 2014.

Pelayanan berbasis riset pada R.S. Umum Daerah Dr. Soetomo Surabaya dilakukan oleh Tim *Stem Cell and Tissue Engineering Research Center*. Tercatat terdapat sekitar 379 pasien yang melakukan terapi transplantasi *stem cell* dengan berbagai kasus penyakit. Penyakit yang telah ditangani antara lain diabetes mellitus sebanyak 99 kasus, penyakit nyeri sendi pada lutut sebanyak 40 kasus, *stroke* 30 kasus, jantung 12 kasus, serta sebanyak 198 kasus lainnya pada penyakit liver, saraf, dan penyakit darah berbahaya lainnya. Tingkat perbaikan melalui terapi *stem cell* ini yaitu berkisar antara 30–100% pada penderita penyakit diabetes melitus, 60–70% pada pasien penderita nyeri sendi lutut dan rataan sekitar 50%, pada pasien penderita *stroke*, adapun uji klinis pemanfaatan *stem cell* pada pasien penyakit jantung, memiliki tingkat keberhasilan antara 60–80%.

Salah satu Universitas yang berada di Indonesia yang ditunjuk oleh Kemenristek Dikti sebagai pusat pengembangan *stem cell* adalah Universitas Airlangga, sebagai pusat pengembangan *stem cell* untuk wilayah Indonesia Timur. Wilayah Indonesia Barat adalah Universitas Indonesia. *Stem Cell Research and Development Centre* Universitas Airlangga yang berada di RSUD Dr Soetomo, Rumah Sakit Pendidikan Universitas Airlangga, dan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga telah membentuk *Surabaya Degenerative Medicine Centre* yang ditunjuk oleh Kementerian Kesehatan RI sebagai pusat penelitian berbasis *stem cell* di Indonesia.

Universitas Airlangga Surabaya mempunyai Pusat Penelitian dan Pengembangan *Stem Cell* (P3SC) yang pada saat ini mengembangkan *stem cell* untuk *anti-aging* (antipenuaan) yang diproduksi secara massal dalam skala industri. Pengembangan *stem cell* untuk *anti-aging* ini dipilih karena memiliki pangsa pasar komersil yang luas dan banyak dibutuhkan. Bahan baku *stem cell* yang diproduksi ini dapat diperoleh dari bahan yang sudah tidak terpakai, di antaranya seperti plasenta dari ibu yang baru saja melahirkan ataupun plasenta dari ibu yang menjalani operasi *section caesaria* setelah dilakukan *screening*

terlebih dahulu tentunya, agar tidak terkontaminasi baik oleh bakteri maupun virus. Adapun untuk proses pemasarannya menggandeng pihak ketiga, baik swasta maupun BUMN yang berada di bidang obat-obatan dan kesehatan setelah mendapat registrasi BPOM tentunya.

SPESIFIKASI

Ada beberapa spesifikasi dari *stem cell* yang pertama adalah kemampuannya dalam melanjutkan proliferasi dan dapat disimpan sebagai sel yang tetap *available* untuk dapat digunakan pada beberapa waktu yang akan datang apabila sewaktu waktu dibutuhkan. Spesifikasi kedua berupa kemampuan merespons *signal* dengan tepat sehingga dapat berdiferensiasi menjadi satu atau lebih tipe sel-sel yang dibutuhkan.

Karakteristik yang spesifik dari *stem cell* di antaranya adalah belum mengalami diferensiasi (*undifferentiated*) dan mampu memperbanyak diri sendiri (*self renewal*) serta dapat berdiferensiasi menjadi lebih dari satu jenis sel (*multipotent*/*pluripotent*).[1] *Stem cell* adalah merupakan sel yang belum memiliki bentuk ataupun fungsi yang spesifik layaknya seperti sel lainnya pada organ tubuh. Sel β pankreas, sel neuron, dan sel *cardiomicyte* atau otot jantung adalah jenis-jenis sel tubuh yang telah memiliki bentuk serta fungsi yang sudah spesifik. Sel-sel tersebut bekerja secara jelas dalam menjalankan fungsi dari organ yang dibentuknya. Sel β pankreas terdapat dalam jaringan pulau Langerhans pada pankreas yang berfungsi memproduksi hormon insulin, sel neuron dari otak juga telah memiliki bentuk yang memungkinkan untuk menghantarkan impuls-impuls saraf, sedangkan otot sel jantung mempunyai bentuk yang mendukung fungsinya untuk berdenyut.[4.5]

Stem cell berbeda dengan ketiganya, yaitu sel yang belum memiliki fungsi secara khusus, seperti halnya sel neuron yang berfungsi menghantarkan impuls, sel β pankreas yang menghasilkan hormon dan sel otot jantung yang berdenyut ataupun fungsi lainnya. Berdasarkan bukti hasil penelitian secara ilmiah, telah menunjukkan bahwa populasi *stem cell* dalam suatu jaringan yang *mature* sebagai sumber *stem cell* menunjukkan suatu populasi sel yang

bersifat *dormant,* bersifat *inactive,* dan baru berfungsi dalam waktu dan kondisi tertentu, misalnya karena terjadinya *defect*.[6]

Keistimewaan *stem cell* salah satunya adalah kemampuan melakukan replikasi dan menghasilkan sel-sel dengan karasteristik yang sama dengan sel induknya, dikenal dengan istilah *self renewal*. Lebih lanjut jumlah populasi dari *stem cell* di dalam tubuh dapat dipertahankan melalui kemampuannya dalam memperbanyak diri sendiri, yaitu melalui proses proliferasi. Kemampuan ini dapat terjadi berulang kali, bahkan diduga kemampuan tersebut tanpa batas. Kemampuan tersebut juga dapat dipertahankan dalam jangka waktu yang relatif lama.[7] Kemampuan dan aktivitas untuk berproliferasi dalam menghasilkan sel yang sama seperti sel induknya ini tidak dimiliki oleh jenis sel tubuh lainnya seperti sel pankreas, sel otak, maupun sel jantung. Oleh karena itulah apabila jaringan dalam pankreas, otak, maupun jantung mengalami kerusakan, maka secara umum kerusakan tersebut bersifat *irreversible* yang artinya tidak dapat diperbaiki kembali seperti sedia kala.[8]

Sampai pada saat ini masih terus dan terus dilakukan penelitian dalam rangka menemukan faktor mutlak dan tepat yang juga mampu mengendalikan proliferasi *stem cell* tanpa harus mengalami proses diferensiasi. Berbagai penelitian telah berhasil menemukan induksi sel somatis menjadi *stem cell* melalui program induksi *pluripotency* (iPS) dari sel somatis. Hal ini menjadi titik terang terkait peranan faktor-faktor transkripsi terkait proses iPS tersebut. Namun demikian peran utama dan penting dari beberapa faktor transkripsi tersebut, sampai saat ini masih terus menjadi bahan perdebatan oleh para peneliti. Jika mimpi ditemukannya faktor mutlak penentu potensi proliferasi dari *stem cell* tersebut ditemukan tanpa terjadi proses diferensiasi, maka stok *stem cell* dapat diperbanyak dengan mudah, baik oleh peneliti maupun ahli medis agar dapat digunakan sebagai bahan utama pada terapi transplantasi sel bagi pengguna atau *stakeholder* (penderita penyakit degeneratif) maupun riset medis yang terkait. Faktor mutlak sebagai pengendali ini juga menjadi penting dalam mempertahankan keberadaan populasi dari *stem cell* yang ada di dalam tubuh (*stem cell niche*), dalam upaya menjaga homeostasis dari jaringan tubuh.[1]

Faktor mutlak yang menjamin keberadaan dari *stem cell* sebagai sel yang bersifat *dormant* dan belum mengalami diferensiasi adalah dimaksudkan untuk menjaga kontinuitas dan regenerasi dari populasi sel penyusun jaringan atau organ tubuh. Kondisi ini dapat dilakukan mengingat *stem cell* mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel tubuh sesuai dengan sel yang dibutuhkan. Kemampuan *stem cell* dalam berdiferensiasi juga mempunyai nilai yang lebih istimewa dibandingkan sel-sel lain yang meski jauh lebih *mature,* karena kemampuan dari *stem cell* untuk berdiferensiasi menjadi lebih dari satu atau bahkan beberapa jenis sel dari tubuh.

TIPE *STEM CELLS*

Tipe atau jenis *stem cell* yang dihasilkan oleh tubuh dibedakan berdasarkan tingkat kematangan dari jaringan penyusunnya. Berdasarkan tingkat kematangan jaringan penyusunnya, *stem cell* terbagi menjadi dua jenis, yaitu *stem cell* dewasa atau disebut *adult stem cell* (ASC) dan *stem cell* embrional atau disebut *embryonic stem cell* (ESC).

1. *Stem Cells* Dewasa (*Adult Stem Cell*/ASC)

Stem cell dewasa dikenal juga sebagai *Adult Stem Cell* (ASC) adalah *stem cell* yang dapat ditemukan di antara sel-sel lain di dalam suatu jaringan atau organ yang telah *mature*, namun *stem cell* tersebut belum mengalami diferensiasi. *Stem cell* merupakan sekelompok sel yang belum mengalami diferensiasi dan lebih sering ditemukan dalam keadaan *dormant* (diam) di samping juga mempunyai sifat inaktif meski berada pada suatu jaringan yang telah memiliki fungsi spesifik dalam tubuh. Keberadaan *stem cell* yang *dormant* dan inaktif diduga mempunyai tujuan dalam menjaga homeostasis pada jaringan tempat keberadaannya. Kemampuan diferensiasi dari *stem cell* dewasa berdasarkan bukti ilmiah hasil penelitian yang telah ada tergolong bersifat *multipoten*. Sifat *multipoten* ini menunjukkan *stem cell* dewasa dikatakan memiliki kemampuan berdiferensiasi yang lebih rendah dibandingkan dengan *stem cell* embrionik. *Stem cell dewasa* hanya mampu berdiferensiasi menjadi

beberapa jenis sel yang segolongan.[9] Kekurangan lain, *stem cell* dewasa adalah mempunyai konsentrasi yang tergolong jauh lebih rendah dibandingkan dengan sel yang telah berdiferensiasi pada jaringan *mature*. Contoh, *stem cell* jaringan hematopoetik yang terdapat dalam sumsum tulang, diperkirakan hanya berjumlah 1 berbanding 10^5 dari jumlah sel total yang ada. Oleh karena itulah, hal ini menjadi penyebab jauh lebih sulitnya tahap isolasi dibandingkan isolasi dari tipe *stem cell* embrionik. Lebih lanjut kemampuan *stem cell* dewasa untuk memperbanyak diri atau berproliferasi adalah jauh lebih rendah dibandingkan *stem cell* embrionik, hal tersebut diperkirakan karena maturitas *stem cell* dewasa yang sudah lebih tua.[10]

Pada hampir seluruh organ dan jaringan tubuh yang telah mengalami pendewasaan atau *mature*, terbukti mengandung *stem cell* dewasa. Oleh karena itulah penggolongan *stem cell* dewasa didasarkan pada nama organ atau golongan sel yang nantinya akan menjadi jalur diferensiasinya. Beberapa penggolongan *stem cell* dewasa, yaitu *mesenchymal stem cell* (MSCs), derivat *bone marrow,* hematopoetik *stem cell* (HSCs), *stem cell* jantung, *stem cell liver*, *stem cell* jaringan saraf (*neural stem cell*), *stem cell* kulit, *stem cell* mata, *stem cell* pankreas, *stem cell* usus, *stem cell* mesenkimal, dan lain sebagainya.[2,11]

Terkait jalur diferensiasi dari *stem cell* dewasa seperti *hematopoietic stem cell* (HSCs) penjelasannya adalah sebagai berikut: mampu untuk berdiferensiasi menjadi seluruh jenis sel darah, baik sel darah merah, monosit (makrofag), neutrofil, basofil, eosinofil, trombosit, limfosit B, limfosit T, ataupun *natural killer* (*NK*) *cell.* Adapun *stem cell* jaringan saraf (*neural*), mampu untuk berdiferensiasi menjadi tiga golongan utama sel saraf, yaitu neuron, astrosit, dan oligodendrosit. Selain itu, *stem cell* jaringan saraf juga mampu untuk berdiferensiasi menjadi kelompok sel saraf yang memiliki aktivitas dopaminergik, sehingga *stem cell* ini dapat digunakan pada terapi *Parkinson*. Jalur diferensiasi *stem cell* jaringan kulit yang banyak ditemukan pada stratum basalis epidermis kulit dan dasar folikel rambut adalah mampu untuk berdiferensiasi menjadi sel penyusun lapisan epidermis kulit dan keratinosit. *Stem cell* mesenkimal, mempunyai jalur diferensiasi menjadi kondrosit, adiposit, osteosit, dan berbagai jenis sel penyusun jaringan ikat.

Adapun *stem cell* jantung, mempunyai jalur diferensiasi menjadi tiga jenis sel utama penyusun organ jantung, seperti kardiomisit, endotel, dan sel otot polos.[12,13]

Potensi diferensiasi dari *stem cells* dewasa yang sebelumnya hanya tergolong bersifat multipoten, namun pada beberapa tahun terakhir ini menunjukkan fenomena di mana dapat terjadi proses transdiferensiasi. Contoh fenomena transdiferensiasi adalah sebagai: *stem cell hematopoietic* ternyata juga mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel jantung, *stem cell* mensenkimal ternyata berkemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel saraf, adapun *stem cell* hati terbukti mampu berdiferensiasi menjadi sel β pankreas sebagai penghasil insulin untuk metabolisme dari glukosa.[4,5]

Terjadi atau tidaknya transdiferensiasi diatur oleh faktor-faktor '*complex*' dan merupakan suatu hal yang masih harus dan akan terus diteliti lebih lanjut. Sampai saat ini penelitian secara *in vitro* yang berkenaan dengan transdiferensiasi masih *trial and error.* Penelitian penggunaan berbagai faktor pertumbuhan spesifik (*growth factor*) saat ini sedang gencar dilakukan. Apabila jalur diferensiasi *stem cell* dapat dikendalikan sepenuhnya oleh para *scientis* dan juga sesuai keinginan para ahli medis, maka impian untuk dapat dilakukannya *autotransplantation stem cell* untuk mengatasi semua penyakit degeneratif yang diderita oleh pasien itu sendiri akan semakin nyata untuk penyembuhannya.[14]

Secara umum telah diketahui, bahwa penyebab berbagai kasus penyakit degeneratif adalah terjadinya kerusakan dari sel sebagai penyusun jaringan maupun organ tubuh. Kerusakan sel tersebut tentu saja menjadi penyebab tidak berfungsinya jaringan maupun organ yang mengalami degeneratif, dan sebagai akibatnya memunculkan gangguan pada tubuh yang juga bersifat *irreversible*, sehingga pada akhirnya perbaikan pada jaringan dan organ yang telah mengalami degenerasi tidak akan pernah terjadi.

Kerusakan yang bersifat *irreversible* merupakan kerusakan yang tidak dapat disembuhkan, oleh karena itu tindakan terapi medis berupa konsumsi berbagai macam obat yang diberikan hanya dapat berperan sebagai pencegah atau memperlambat terjadinya kerusakan yang mengenai jaringan atau organ

akan menjadi lebih luas lagi. Perumpamaan organ kaki atau tangan manusia yang mengalami kecelakaan, sehingga mengalami kecacatan atau kerusakan, maka tidak mungkin dapat untuk diperbaiki, sehingga jalan satu-satunya yang bisa dilakukan adalah dengan membuatkan kaki atau tangan palsu, yang merupakan komponen pengganti yang rusak dengan komponen yang baru (kaki atau tangan palsu) sehingga dapat berfungsi kembali untuk beraktivitas. Berdasarkan pemikiran inilah, maka para peneliti berpendapat bahwa *stem cell* sebagai komponen baru, dapat menjadi tumpuan pengobatan yang efektif di masa yang akan datang.

Terkait fungsi dan efektivitasnya, saat ini *stem cell* telah merupakan trending topik yang viral dan fenomenal karena dipercaya dapat menjadi sumber utama kesembuhan berbagai macam penyakit, khususnya penyakit degeneratif yang tidak dapat disembuhkan baik melalui tindakan medis berupa pengobatan maupun tindakan operatif.

Namun bioteknologi yang sangat spektakuler ini bukan berarti tidak memiliki kekurangan atau kelemahan. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa efektivitas *stem cell* yang ditransplantasikan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti umur, gender, adanya osteoporosis, ataupun penderita yang sebelumnya telah mendapatkan *chemoterapy* atau radiasi dosis tinggi.[15,16] Oleh karena itulah riset tentang *stem cell* dan pengembangannya masih banyak membuka peluang bagi para peneliti di bidang kedokteran, tidak hanya kedokteran secara umum, namun juga kedokteran gigi dan kedokteran hewan.

2. *Stem Cells* Embrionik (*Embrionic Stem Cell*/ESC)

Stem cell embrionik atau *Embryonic Stem Cell* (ESC) adalah *stem cell* yang didapatkan pada saat perkembangan individu masih berada didalam tahap embrional. *Stem cell* ini adalah merupakan massa sel dalam atau *inner cell mass* yang terdapat pada fase blastosis. *Inner cell mass* terbentuk pada saat embrio berusia sekitar 3 sampai 5 hari, yaitu saat terbentuknya blastosis yang nantinya akan berimplantasi ke dalam endometrium atau dinding rahim.[1]

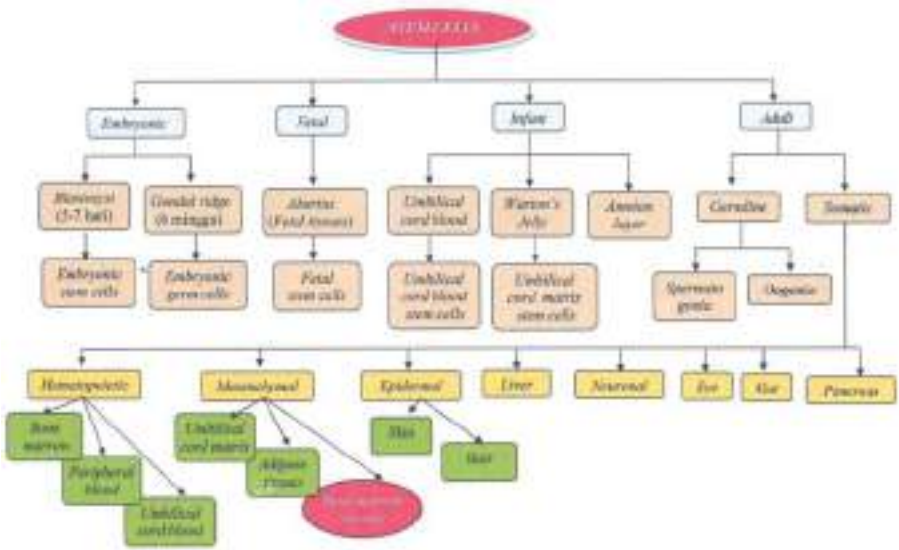
Stem cell embrionik adalah tergolong sebagai *stem cell* yang 'istimewa', yaitu sifat pluripotennya, artinya *stem cell* ini mempunyai karakteristik yang sulit disaingi oleh *stem cell* jenis yang lain. Oleh karena keistimewaan sifat pluripoten sebagai sifat dasar, maka secara teoritik tidak ada satupun penyakit yang bersifat degeneratif yang tidak dapat diobati dan disembuhkan melalui pemanfaatannya. Berbagai penelitian yang telah dipublikasikan baik yang dilakukan secara *in vitro* maupun *in vivo* hingga saat ini, menunjukkan hasil yang mendukung keberhasilan ini.[17] Keistimewaan lain dari *stem cell* embrionik adalah sifat daya proliferasi yang dimilikinya sangat tinggi, telomer yang panjang disertai aktivitas enzim *telomerase* yang tinggi. Oleh karena itu, terapi dengan memanfaatkan *stem cell* embrionik, mempunyai risiko yang lehih tinggi pula terhadap kejadian proliferasi sel yang berlebih, yang pada akhirnya berakibat pada terjadinya pembentukan tumor yang tidak diharapkan.[18]

Kelemahan lain dari pemanfaatan *stem cell* embrionik adalah berkaitan dengan nilai etis penggunaan embrio sebagai sumber didapatkannya, baik untuk uji suatu riset maupun uji klinis yang diaplikasikan pada manusia. Oleh karena itulah riset yang terkait embrionik pada umumnya dengan penggunaan embrio hewan, sehingga tentu saja akan memberikan hasil yang tidak dapat disamakan dengan manusia.[19,20] Adapun untuk melakukan keperluan riset *stem cell* embrionik dari manusia, para peneliti telah menggunakan berbagai metode yang dianggap tidak bertentangan dengan nilai etis, termasuk dengan program kloning terapeutik.[21] Selain kloning terapeutik terdapat satu metode 'partenogenesis' dianggap sebagian negara tidak bertentangan dengan nilai etik yang ada, sehingga dapat dijadikan salah satu metode yang banyak digunakan.[22]

SUMBER ORIGINALITAS

Terdapat beberapa variasi dari *stem cell* telah diisolasi dan diidentifikasi baik secara *in vivo* maupun *in vitro.* Klasifikasi *stem cell* dapat dibagi menjadi 4 tipe berdasar sumber *originalitas* dari mana *stem cell* tersebut berasal, yaitu *stem*

cell yang berasal dari *embrio*, *stem cell* yang berasal dari *fetal*, *stem cell* yang berasal dari *infant,* dan *stem cell* yang berasal dari *adult*.[1] Masing-masing tipe *stem cell* dapat diklasifikasikan berdasar *originalitas* sumber dari *stem cell* (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Klasifikasi *Stem Cell* Berdasar Originalitas.[23]

Penentuan pilihan tipe dari *stem cell* berdasar sumber originalitas yang nantinya akan diaplikasikan membutuhkan ketepatan yang tinggi agar dapat dicapai efektivitas keberhasilan terapi yang optimal. Efektivitas keberhasilan tersebut dapat dicapai melalui tiga pendekatan. Pendekatan pertama adalah pendekatan *genomic* dengan fokus pada *polymorphisme* tingkat genetik molekular. Pendekatan kedua, *proteomic* dengan fokus pada *epitope* dan *paratope* tingkat *cellular*. Pendekatan ketiga, bioteknologi *stem cell* dengan fokus pada ekspansi dan diferensiasi *original cell* dari *stroma cell*.[2]

Bioteknologi pemanfaatan *stem cell* mempunyai potensi secara total untuk meregenerasi jaringan yang rusak akibat suatu penyakit atau *injury*. Potensi tersebut menjadi terbaik karena mampu berdiferensiasi menjadi banyak tipe sel dari sel penyusun tubuh.[24]

1. *Hematopoietic Stem Cells*

Hematopoietic stem cell (HSCs) dapat bersumber dari beberapa jaringan, yaitu darah tali pusar (*umbilical cord blood*), darah tepi (*peripheral blood*), dan sumsum tulang (*bone marrow*). Sebelumnya para periset ataupun praktisi klinis hanya memahami bahwa HSCs hanya berperan pada sistem *hematopoietic* pada *bone marrow*. Oleh karena itulah demi mendapatkan dan isolasi HSCs, dilakukan aspirasi melalui *bone marrow*, sehingga cara yang ditempuh ini termasuk dalam tindakan invasif. Berdasarkan pengembangan keilmuan dan hasil riset, ditemukan bukti bahwa HSCs selain bisa didapatkan di dalam *bone marrow*, juga bisa diisolasi dari *peripheral blood* (darah tepi) atau *umbilical cord blood* (darah tali pusar).

HSCs ini adalah salah satu kelompok dari *stem cell* dewasa (*adult stem cell*) dan merupakan sumber potensial pada program transplantasi sel. Jika dibandingkan dengan tipe *adult stem cells* yang lain, keberadaan HSCs merupakan *adult stem cells* yang paling terdahulu diketahui. Sesuai dengan namanya HSCs adalah *stem cell* yang mempunyai kemampuan untuk membentuk seluruh progenitor sel darah. Seperti diketahui fungsi sel darah yang terbentuk adalah untuk terselenggaranya fungsi hematopoiesis maupun respons imunologis tubuh. Oleh karena itulah, *stem cell* ini merupakan induk dari segala jenis sel darah yang beredar di seluruh tubuh baik hewan vertebrata ataupun manusia. HSCs mempunyai kesamaan spesifikasi dengan progenitor sel endotel, terutama pada ekspresi protein permukaan. Hal ini dikarenakan HSCs merupakan hasil diferensiasi dari hemangioblast, yang juga ternyata dapat berdiferensiasi menjadi progenitor dari sel endotel.

Berdasarkan variasi diferensiasi HSCs yang banyak, maka perlu diketahui protein sebagai *marker* permukaan spesifik seperti *cluster of differentiation* (CD) sehingga dapat dibedakan dengan tipe *stem cell* yang lain. Hal ini dilakukan agar dapat dengan mudah untuk mengenali dan melakukan isolasi HSCs baik dari *umbilical cord blood*, *peripheral blood* maupun *bone marrow*. Berdasarkan berbagai hasil penelitian, dapat ditentukan berdasarkan ekspresi positif tiga penanda protein permukaan spesifik yaitu CD45, CD34,

dan CD14 tidak mengekspresikan CD105, CD90, CD73, dan CD44 yang merupakan penanda protein spesifik dari *mesenchymal stem cells* (MSCs).

Selanjutnya untuk membedakan dengan progenitor sel endotel yang mempunyai asal usul yang sama dengan HSCs, sehingga mempunyai karakteristik yang hampir sama pula. Oleh karena itu, untuk membedakannya ditemukan bahwa HSCs mengekspresikan CD45, sedangkan sel endotel tidak.

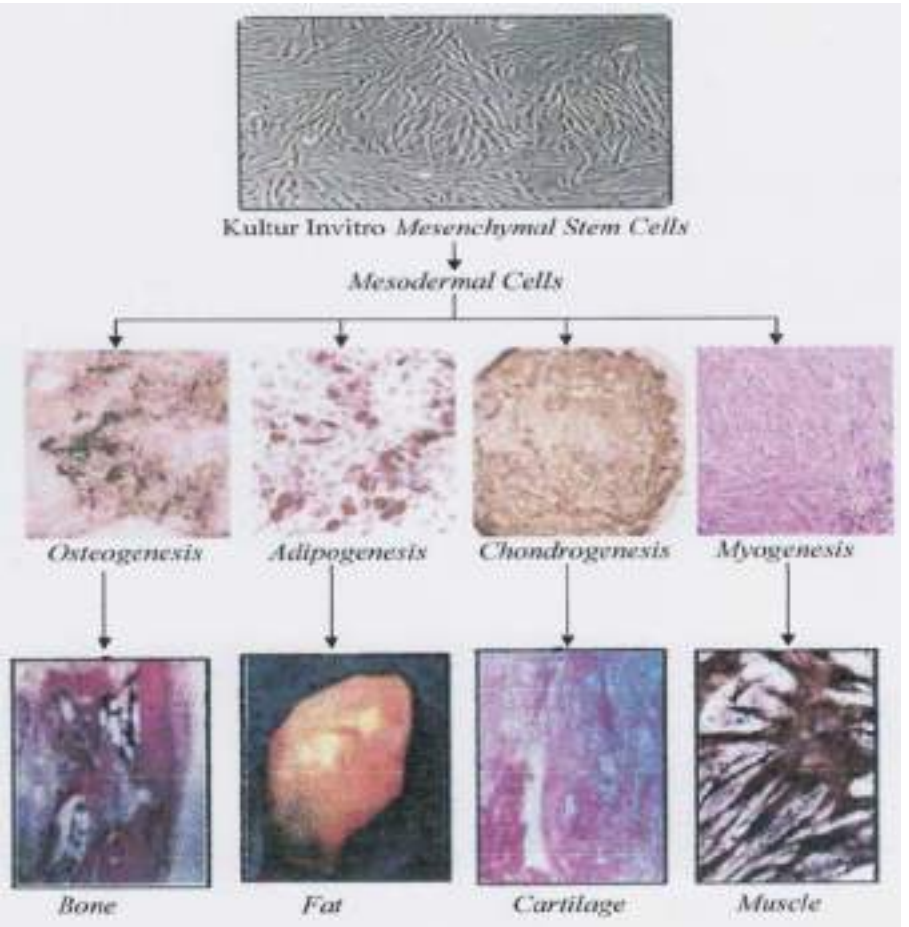
Namun demikian, dari tiga penanda protein permukaan spesifik CD45, CD34, dan CD14, molekul protein permukaan CD34 adalah penanda paling umum digunakan dalam mengidentifiksi atau karakterisasi pada *stem cell* yang diisolasi baik dari sediaan darah maupun sediaan jaringan tubuh. Selanjutnya, CD34 ada dugaan memiliki fungsi adhesi leukosit pada proses inflamasi. Selanjutnya, juga ada dugaan bahwa CD34 berfungsi dalam perlekatan HSCs di stroma sumsum tulang.[1,7]

Secara logis, HSCs hanya dianggap mampu menyelenggarakan fungsi imunologis dan hematopoiesis, namun seiring perkembangan keilmuan yang bersifat ilmiah, memperlihatkan potensi HSCs yang selain bersifat multipoten, juga mampu melakukan transdiferensiasi menjadi sel somatik di luar jalur imunologis maupun hematopoiesis, yaitu bisa berdiferensiasi menjadi sel saraf, *cardiomicyte*, sel epitel paru, maupun sel otot lurik (*miocyte*), dan lain sebagainya.

2. *Mesenchymal Stem Cells*

Mesenchymal stem cell (MSCs) dapat bersumber dari beberapa jaringan, yaitu *umbilical cord matrix*, *adipose tissue,* dan *bone marrow*. Namun pada buku ini hanya akan dibahas MSCs yang sering digunakan, baik untuk bidang penelitian maupun aplikasi klinik, yaitu MSCs yang bersumber dari *bone marrow* yang dikenal dengan istilah MSCs *derived bone marrow.* MSCs ini adalah salah satu kelompok dari *stem cell* dewasa (*adult stem cell*) dan merupakan sumber potensial pada program transplantasi sel. Hal ini dikarenakan MSCs mempunyai potensi *transdiferensiasi*. MSCs termasuk jenis *stem cell* dewasa

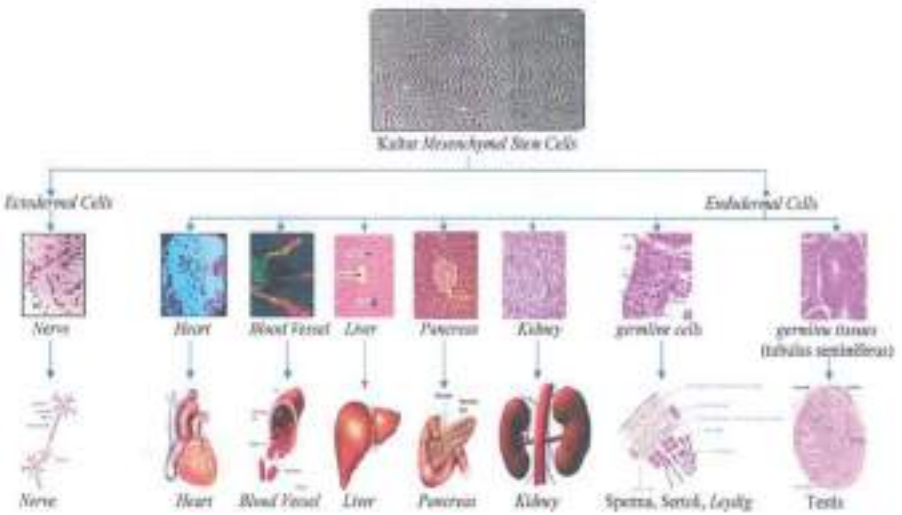
yang paling banyak dilakukan penelitian atau dilakukan uji klinis, selain juga *hematopoietic stem cells* (HSCs). HSCs selain dapat ditemukan pada *bone marrow*, darah tepi, maupun darah tali pusat. Sumber MSCs adalah selain *bone marrow*, darah tali pusat, juga pada jaringan adiposa.[25] Perbedaan antara *MSCs* dengan *HSCs* adalah berupa tiga marker atau penanda molekul permukaan, pada *MSCs* ditandai dengan terekspresinya CD105, CD90, dan CD73 serta tidak mengekspresikan CD45, CD34, dan CD14, ketiga *marker* terakhir terekspresi positif pada permukaan HSCs.[26]



Gambar 4.2 Diferensiasi *Multipotent* dari *Mesenchymal Stem Cell*.[23]

Beberapa keuntungan pemanfaatan MSCs *derived bone marrow* dibandingkan *stem cell* yang lain adalah; termasuk *stem cells* dewasa yang tidak menentang nilai etik yang ada dibandingkan dengan ESCs;[19,20] Risiko proliferasi berlebih seperti pada ESCs yang berujung pada terjadinya pembentukan tumor tidak sampai terjadi;[18] Bersifat multipoten dan mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel, seperti adiposit, miosit, osteosit, kondrosit, dan kardiomisit, serta berbagai jenis sel penyusun jaringan ikat[24] (Gambar 4.2).

Fenomena *transdiferensiasi* juga terjadi pada *MSCs derived bone marrow*, artinya selain bisa berdiferensiasi membentuk berbagai macam jenis sel yang segolongan (*mesoderm*) juga bisa lintas golongan, misalnya golongan *endoderm*, yang bisa berdiferensiasi menjadi sel hepatosit,[2] ataupun golongan *ectoderm*, seperti neuron[1] bahkan *germline cells (spermatogonial, sertoli, Leydig),* dan *tissues* (*tubulus seminiferus*)[27,28,29] (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Transdiferensiasi *Mesechymal Stem Cell*.[23]

Isolasi MSCs lebih mudah dilakukan karena tanpa menyebabkan terjadinya trauma dibandingkan dengan isolasi dari *adult stem cell* yang lain seperi HSC dan UMCB;[30] Konsentrasi sel MSC didapat lebih

banyak dibandingkan dengan isolasi dari *adult stem cell* yang lain, seperti HSC dan UMCB;[2] Kultur MSC jika dikaitkan dengan poliferasi sampai terbentuknya koloni *stem cell* membutuhkan waktu yang lebih singkat, yaitu hanya membutuhkan waktu sekitar 2 minggu,[31] dibandingkan kultur ESC yang membutuhkan waktu 3–4 bulan mulai dari sebuah blastomer hingga terbentuknya satu koloni *stem cell*,[1] Pelaksanaan autologus lebih mudah karena proses isolasi hanya diawali dengan pemberian bius lokal dan aspirasi tidak menyebabkan terjadinya trauma;[30] Dapat digunakan sebagai *autologus transplantation cell* dan bersifat *imunocompatible* pada proses *allogenus transplantation*.[32]

Mesenchymal stem cell dari *bone marrow* merupakan salah satu sumber ideal dari *stem cell*, yaitu mudah dipanen dan didapatkan secara autologus, berlimpah, mempunyai angka proliferasi yang tinggi pada *ex vivo expansion*, mempunyai kemampuan *multilineage differentiation,* dan menghasilkan sel yang tinggi.[16,32]

Ada beberapa kekurangan MSCs *derived bone marrow* dibandingkan *stem cell* yang lain, namun kekurangan tersebut masih bisa untuk ditoleransi dan tidak mengurangi esensi yang optimal dibanding *stem cell* yang lain. Kekurangan tersebut seperti lebih rendahnya sifat *multipotent* dari MSCs *derived bone marrow* pada proses diferensiasi dibandingkan ESCs yang bersifat pluripoten,[17] namun demikian, MSCs ini masih memungkinkan untuk berdiferensiasi menjadi banyak sel yang dibutuhkan pada berbagai kasus penyakit degeneratif dengan sifatnya yang "*multipotent*".[1] Isolasi MSCs *derived bone marrow* lebih sulit dibanding *ESCs*, jika dikaitkan dengan konsentrasi yang didapatkan jauh lebih rendah. Demikian juga halnya jika dibandingkan dengan sel-sel lain yang telah mengalami diferensiasi di sekitarnya. MSCs dari *bone marrow* diperkirakan konsentrasinya hanya berjumlah $1{:}10^6$ dari total jumlah sel yang ada.[10] Semua kekurangan tersebut jika dibandingkan dengan ESCs. namun jika dibandingkan dengan konsentrasi *adult stem cell* yang lain, maka MSCs *derived bone marrow* adalah lebih tinggi dan lebih mudah pada pelaksanaan isolasinya.[1] Meskipun jumlah volume yang didapat ketika isolasi lebih rendah dibanding *adiposit stem cell* (ASC), akan tetapi jumlah

sel *stem cell* yang didapat hampir sama.[30] Demikian juga untuk tercapainya proliferasi adalah lebih rendah dibanding *umbilical cord blood* (UMCB), namun demikian proses isolasi UMCB sangat sulit jika dibandingkan isolasi MSCs *derived bone marrow* sehingga keberhasilan isolasi dari UMCB hanya berkisar 29–63%.[1]

Isolasi MSCs *Derived Bone Marrow*

Mesenchymal stem cell (MSC) dapat diisolasi dengan mudah dari *bone marrow* dengan dukungan ekspansi *tissue culture plastic* untuk dikembangkan dengan beberapa kali pasase dalam medium berisi *fetal calf serum* (FCS) dengan konsentrasi tinggi. Angka proliferasi dari sel secara perlahan-lahan berubah selama pertumbuhan, dan pada akhirnya tidak berkembang lagi setelah 4–5 kali pasase yang dikenal dengan istilah '*late passage*'. Sel-sel yang dikultur tersebut dapat memperbanyak diri sebagai *single-cell* yang berasal dari koloni atau '*colonny forming unit*' (CFU) yang terbentuk. Angka proliferasi dari koloni menjadi *single cell* berbeda, secara morfologi dan secara fenotip, sel koloni terlihat pada awal pasase. Pada kultur densitas rendah, sel tampak kecil dan berbentuk *spindle* yang dengan cepat mengalami *self-renewing* (*Rapid Self-renewing*/*RS cell*) dan menjadi besar, selanjutnya membentuk sel datar (*flat*) dan bereplikasi secara perlahan menjadi *mature*. Proporsi dari sel *RS* tetap tinggi pada beberapa pasase jika kultur dipelihara pada densitas rendah. Sel menjadi lebih unggul dan lebih besar pada pasase paling belakangan. Kultur peningkatan sel RS diperoleh jika kultur di awal pasase dikembangkan sampai 70% atau dikenal sebagai '*confluent*' kemudian dipindahkan pada densitas rendah. Oleh karena itu, jika kultur dibiarkan berkembang sampai terbentuk *confluent*, sel RS tidak akan mendapatkan tempat.

Pada proses selanjutnya MSCs dapat dibuat mengalami diferensiasi menjadi berbagai sel seperti *osteoblasts*, kondrosit, adiposit, miosit, kardiomisit, dan tipe sel jenis lain. Secara *in vitro*, MSCs juga dapat berdiferensiasi menjadi muskulus skeletal dan kardiomisit,[9] dan juga sel otak. MSCs yang diisolasi dari *bone marrow* dan dikembangkan secara *in vitro* dapat digunakan sebagai terapi secara *in vivo*, seperti misalnya pada kasus oligospermia kemudian

disertai terjadinya regenerasi dan mengembalikan jaringan testis yang telah mengalami degeneratif.[27,33]

Tahap awal sebelum program transplantasi diberlakukan adalah dilakukan isolasi sel *mononuclear* dari *bone marrow* yang kemudian diaspirasi dan dilanjutkan dengan proses sentrifugasi dari sampel pada densitas gradien tertentu dan setelah didapatkan sel mononuklear baru kemudian diletakan pada *tissue culture plastic,* tahap ini dikenal sebagai pasase *zero cells*. Pasase *zero cells* dikembangkan dengan lempeng dan densitas rendah yang sesuai pada kultur jaringan *multilayer* dalam *flask* (*Cell factory; Nune*). Ekspansi atau pengembangan kultur pada densitas rendah meningkatkan volume dengan bentuk *spindle* dan secara cepat sel berkembang (*Rapidly self-renewing* atau *RS cell*) kemudian dipindahkan pada tempat atau *petridish* dengan diameter yang lebih besar. Jika sel ditempatkan pada densitas tinggi atau kultur dipasasekan lebih dari 4–6 kali akan terbentuk *flat* dan *MSCs* menjadi *mature* dan berkembang lebih lambat karena kehilangan potensinya untuk berdiferensiasi dibandingkan RS. Oleh karena itu, perlu diupayakan bagaimana *stem cell* yang dikultur tersebut dapat dipertahankan kemampuan untuk tetap *undiferentiated* secara *in vitro*.[9]

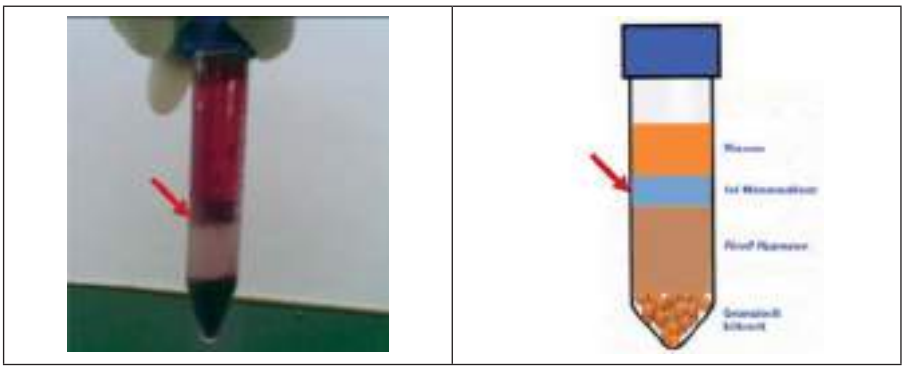
Identifikasi *MSCs Derived Bone Marrow*

Upaya mendapatkan isolasi murni dari *stem cell* yang berasal dari *bone marrow*, perlu dilakukan karakterisasi untuk dapat mengidentifikasi kebenaran dari MSCs yang didapat. Karakterisasi dalam rangka identifikasi MSCs dapat dilakukan dengan pemanfaatan metode *fluorescence activated cell sorting* (FACS) atau yang dikenal juga dengan metode *Flowcytometry*,[1] yaitu dilakukan melalui pemisahan sel mononuklear yang di dalamnya mengandung *stem cell*.

Pemisahan dari sel mononuklear yang di dalamnya mengandung *stem cell* dari *bone marrow*, dapat dilakukan dengan menggunakan perbedaan *dencity gradient centrifugation* (densitas sentrifugasi). Medium umum yang digunakan untuk melakukan hal ini adalah dengan memanfaatkan larutan *Ficol®-Hypaque®*. Larutan *Ficol-Hypaque* merupakan polimer dekstran yang

menginduksi agregasi eritrosit yang tercampur dengan senyawa aromatik teriodinisasi untuk peningkatan osmoralitas maupun densitas cairan. Populasi sel mononuklear yang telah terbentuk dapat diisolasi dengan menggunakan satu lapis medium, yaitu dengan densitas 1,077 g/mL.

Setelah suspensi *bone marrow* bercampur dengan *Ficoll-Hypaque*, kemudian dilakukan sentrifugasi pada suhu ruangan, dengan kecepatan ± 400 *dencity gradient centrifugation*. Hasil dari sentrifugasi didapatkan sediaan cair yang terbagi dalam beberapa lapis (Gambar 4.4). Lapisan terbawah merupakan populasi sel neutrofil dan eritrosit. Pada bagian atasnya terdapat lapisan yang bening, yaitu lapisan *Ficoll-Hypaque*, di antara *Ficoll-Hypaque* dan lapisan plasma-platelet itulah terdapat lapisan tipis yang merupakan populasi dari sel mononuklear yang mengandung *stem cell*,[34] sel inilah yang nantinya diambil untuk diisolasi.



Gambar 4.4 Sel mononuklear (*stem cells*) berada di atas larutan *ficoll hypaque*.

Stem cell yang berada pada lapisan sel monolayer hanyalah subpopulasi kecil dari jumlah total sel mononuklear, maka diperlukan teknik *dencity gradient centrifugation* sebagai tambahan untuk mendapatkan populasi murni dari *stem cell* yang dikehendaki. Berdasarkan karakteristiknya adalah dapat dilakukan dengan menggunakan metode *flowcytometry*. Prinsip identifikasi atau karakterisasi dan isolasi terhadap sel dengan metode *flowcytometry* telah puluhan tahun lamanya dilakukan. Pada awal penggunaanya, alat ini dibuat untuk mendapatkan sel murni dari berbagai jenis sel imun dari tubuh agar

dapat diamati bagaimana mekanisme kerjanya secara spesifik. Pada umum, *flowcytometry* terdiri atas tiga sistem yang bekerja secara simultan, yaitu sistem *fluiditik* (hidrodinamik), sistem optik, dan sistem komputer.

Setiap partikel/sel yang dianalisis dalam *flowcytometry* menggunakan prinsip sistem *fluiditik* (hidrodinamik) sebagai tahap pertama, yaitu dengan disalurkan melalui suatu aliran cairan yang isotonik, hingga dapat sampai pada tempat dilakukannya analisis melalui penggunaan sinar laser. Diameter ruang tempat dialirkannya cairan isotonik ini sangatlah teramat kecil, sehingga setiap sel atau partikel yang melewatinya dapat dianalisis satu per satu.

Tahap kedua adalah sistem optik. Analisis partikel/sel yang dialirkan pada *flowcytometry* dengan memanfaatkan cahaya laser yang dilakukan melalui penyinaran. Terjadinya pembiasan (hamburan) cahaya laser ini dapat menembus sel, sehingga granularitas sel pun akan dapat ditentukan. Tiga hal utama yang menentukan pembiasan cahaya yang mengenai sel, yaitu *granularitas*, ukuran, dan *fluoresensi* sel. Oleh karena itulah agar dapat dikenali secara tepat, perlu ditambahkan molekul protein yang mempunyai kemampuan untuk menempel secara spesifik pada permukaan dari *stem cell* yang karakteristik dan yang hendak diidentifikasi. Seperti diketahui, masing-masing *stem cell* pada permukaan selnya memiliki ciri khas, seperti keberadaan '*cluster differensiation*' (CD), seperti CD45, CD34, CD90, dan CD73. Molekul penanda sebagai marker yang menempel pada permukaan *stem cell* tersebut, dapat berpijar bila dikenai sinar laser yang terdapat dalam *flowcytometry*, sehingga menghasilkan cahaya fluoresensi pada sel.

Panjang cahaya laser dalam *flowcytometry* sangatlah bervariasi, yaitu tergantung dari jenis sumber laser itu sendiri. Pada umumnya pada *flowcytometry* digunakan laser argon yang memiliki panjang gelombang 351 sampai 528 nm. Beberapa jenis laser yang lain yang juga dapat digunakan antara lain laser kripton, sinar ultraviolet, laser helium-kadmium, dan laser helium-neon.

Tahap terakhir adalah sistem komputer yang digunakan, cahaya laser yang dibiaskan selanjutnya akan diteruskan oleh partikel atau sel yang dianalisis dan kemudian selanjutnya akan ditangkap dan ditampilkan

sebagai data melalui komputer. *Flowcytometry* telah dilengkapi dengan sistem perangkat lunak yang mampu mengatur dan menampilkan hasil analisis data partikel atau sel yang hendak diamati. Biasanya hasil analisis dari *flowcytometry* disajikan dalam bentuk histogram.

Flowcytometry, selain digunakan untuk proses identifikasi keberadaan *stem cell*, juga dapat diaplikasikan dalam mendapatkan isolasi murni dari populasi sel, dan yang nantinya dapat digunakan untuk riset lebih lanjut. Metode ini juga dapat dilakukan dengan memberikan vibrasi secara teratur pada aliran yang membawa sel atau partikel. Hal tersebut dapat diidentikkan dengan saat kita menggoyangkan pipa air yang sedang menyala, akibat adanya vibrasi pada aliran yang membawa maka sel pun akan memecah dan membagi aliran cairan yang keluar, sehingga pada akhirnya molekul air yang keluar dari lubang pipa dapat berbentuk tetes air (droplet). Selanjutnya setelah partikel atau sel yang mengalir dianalisis oleh cahaya laser yang melaluinya, aliran yang menghantarkan partikel atau sel tersebut akan dikenai vibrasi, sehingga menghasilkan droplet (tetes cairan) yang berisi partikel atau sel sesuai dengan yang dikehendaki. Pada tahapan berikutnya, droplet yang mengandung partikel atau sel tersebut akan dilewatkan pada sebuah medan elektrik, sehingga sel yang berfluoresensi merupakan sel yang dikehendaki akan bermuatan negatif dan sel yang tidak berfluoresensi akan bermuatan positif.

Pada akhirnya, sel yang dikehendaki berupa sel yang bermuatan negatif akan terpisah dari tetesan yang berisi, sel bermutan positif dan droplet yang tidak mengandung muatan apa pun baik negatif maupun positif. Pada akhirnya pula, akan diperoleh populasi murni dari *stem cell* yang berfluoresensi.[9] Peralatan *flowcytometry* dalam melakukan analisis dan isolasi *stem cell* dikenal dengan sebutan *Fasc Calibur*, yang dilengkapi dengan layar monitor, sehinnga hasil langsung dapat teramati (Gambar 4.5).

Gambar 4.5 Peralatan *Flowcytometry.*

Kultur *MSCs Derived Bone Marrow*

Sel yang terdapat di dalam *bone marrow* terdiri atas bermacam-macam jenis *stem cell*, dari sumber ini dapat dikultur menjadi beberapa sel salah satunya seperti sel *mesenchymal*. Sel setelah diisolasi selanjutnya dikultur menggunakan *ficol histopaque* 0,177 (Sigma). Pada beberapa penelitian, kultur sel menggunakan *growth medium* seperti α-*modified essential medium* (α-MEM) (Sigma) dengan penambahan *fetal bovine serum* 20% (Biowest), penicillin dan streptomycin (Sigma), serta amphotericyne (Sigma). Selanjutnya sel-sel dicuci terlebih dahulu sebelum ditumbuhkan yaitu pada 24 jam masa inkubasi pada inkubator dengan suhu 37° C dan 5% CO_2.[9]

Beberapa penelitian lain, menggunakan formulasi berbeda sebagai media penumbuh, baik yang dapat digunakan untuk isolasi dan ekspansi maupun untuk perkembangan MSCs. Beberapa media yang sering digunakan adalah *Dulbecco's Modified Eagles Media* (DMEM) berisi 1,0 g/L glukosa atau dengan formulasi 4,5 g/L glukosa. Media tersebut digunakan pada *mesenchymal stem cell* dari *adult bone marrow* sebagai media diferensiasi menjadi sel *chondrogenic*. Media lain telah digunakan secara sukses untuk mengembangbiakkan human MSCs termasuk BGJb, α-MEM, DMEM:F12, McCoy's 5A, dan RPMI 1640. Namun demikian, beberapa media lain meskipun terkandung banyak komponen-komponen lain dibanding DMEM, namun media-media tersebut belum terbukti sebagai formula original yang unggul, sehingga banyak peneliti

melakukan riset tetap menggunakan media DMEM. Komponen utama lain seperti *fetal bovine serum* (FBS) perlu dipersiapkan, baik pada saat isolasi *MSCs* maupun sebagai media penumbuh, yaitu *fetal calf serum* dengan persentase sekitar 10% yang diperlukan untuk melengkapi campuran dari faktor-faktor penumbuh yang *undefined*.[34]

NICHE DARI *STEM CELLS*

Stem cell secara khusus mempunyai sifat menyeimbangkan antara *self renewal* dan diferensiasi. Keseimbangan tersebut dikontrol oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik yang akan mengintegrasikan dan mendukung *microenvironment* sekitar *stem cells* yang dikenal sebagai *stem cell niche*.[35] *Niche* dalam jaringan telah teridentifikasi dan terkarakterisasi yang menunjukkan keterkaitan dari banyak komponen. Oleh karena itu, regulasi *niche* yang *establish*, perlu ditetapkan dalam upaya mendukung fungsi spesifik dari *stem cell*. Lokal *microenvironment* diketahui dapat memelihara dan memengaruhi *behaviour stem cell*. Hal ini menjadi awal mula yang penting penentuan di mana keberadaan *stem cell*. Karakterisasi dan identifikasi *stem cell niche* sampai saat ini adalah sulit karena jumlah *stem cell in vivo* sangat sedikit sehingga marker spesifik untuk identifikasi dari *stem cell* adalah sulit. Identifikasi *stem cell niche*, secara khusus pada jaringan mamalia, seperti HSCs yang banyak berada sepanjang permukaan endotelial dari *trabecula bone* dekat bagian proksimal *osteoblast* dari *endothelial cell* yang melapisi pembuluh darah.[36,37,38] Namun demikian HSCs ternyata dapat meninggalkan *niche* kemudian masuk dalam sirkulasi dan kembali ke *niche* yang terletak dekat endotelial sehingga memudahkan dan memfasilitasi pergerakan dari *bone marrow* masuk sirkulasi.[39]

Dukungan dari sel stromal dapat secara langsung berinteraksi dengan *stem cell* sehingga juga memengaruhi lingkungan *microenvironment* sebagai *niche* yang kondusif bagi *stem cell*, salah satunya adalah kondisi hipoksia.[33, 40,41,42]

Salah satu contoh *niche* dari jaringan avasculer dikarenakan sedikit mengandung pembuluh darah adalah *niche* dari *spermatogonoal stem cells* (*SSCs*) di dalam tubulus seminiferus testis. Kondisi ini menyebabkan O_2 yang

masuk sangat rendah, dikarenakan O_2 sulit untuk masuk ke dalam lumen tubulus seminiferus. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa spermatogonia sebagai progenitor dari *stem cell germline* dipengaruhi oleh *microenvironment* dengan kondisi *hypoxya*.

Proses spermatogenesis yang terdiri atas spermatositogenesis dan spermiogenesis membutuhkan kecepatan yang tinggi. Oleh karena itu, *self renewal* dari spermatogonia seharusnya juga membutuhkan konsumsi oksigen yang tinggi pula. Namun demikian, letak pembuluh darah secara eksklusif berada di antara tubulus seminiferus, sedangkan O_2 untuk sampai ke dalam lumen tubulus seminiferus hanya melalui proses difusi, sehingga terjadilah tekanan O_2 yang tajam pada daerah luminal yang dikenal dengan istilah *luminal* O_2 *partial pressure* (pO_2). Kondisi inilah menyebabkan sampainya O_2 di dalam tubulus seminiferus berjalan sangat lambat.[43]

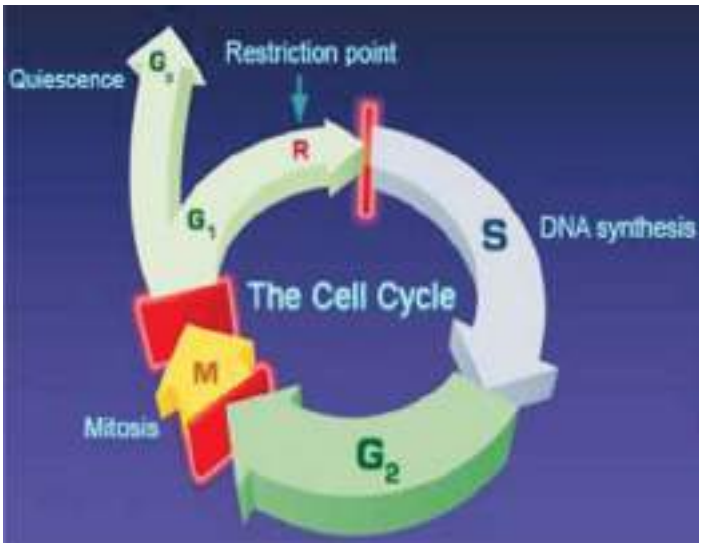
Hypoxic precondition (*low* O_2) disebutkan pada berbagai hasil penelitian merupakan salah satu target potensial peningkatan *MSCs* yang *survival* melalui *antiapoptotic effect* pada kultur *MSCs*.[44]

Hypoxic Niche

Microenvironment yang kondusif menyebabkan *stem cell* berada pada kondisi G0 yang disebut sebagai *dormant cells*[24] atau dikenal juga dengan sebutan *Quiescence cells*.[42,45] Pada kondisi G0, *active cell cycling* maupun *exhausting* dari sel akan terhambat, sehingga hal inilah yang menyebabkan tidak terbentuk sel yang mengalami penuaan (*senescence cell*),[45,46] maupun apoptosis[47,48] namun tetap dalam formasi *undifferentiated*.[49]

Dormant cells atau *Quiescence cell* dari *stem cell* adalah *stem cell* yang tidak mengalami siklus dalam pembelahan sel (*cycling state*), sehingga tidak terjadi proses yang merupakan empat fase dalam siklus pembelahan sel, seperti G1, S, G2, dan M.[50] Tahap G1 (Gap 1) adalah jeda atau jarak antara akhir fase M (Mitosis) dengan awal fase S. Fase S (Sintesis) merupakan fase penggandaan DNA, G2 (Gap 2) merupakan jeda antara akhir fase S dengan awal fase M (Mitosis) atau dikenal sebagai fase penggandaan sel.[51] *Dormant cells* atau

Quiescence cell dari *stem cell* tidak termasuk dalam ke-4 fase pembelahan sel di atas, sehingga dapat dikatakan terkondisi dalam bentuk G0 (Gambar 4.6). Bentuk ini terdapat pada kondisi *in vivo*[52] namun dapat dibuat pada saat kultur *in vitro*.[53]



Gambar 4.6 Fase Siklus Pembelahan Sel dan Posisi *Quiescence Cells*.[50]

Dormant cells atau *Quiescence cells* dari *stem cell* secara *in vivo* diperlukan untuk melindungi dan mempertahankan viabilitas jaringan sekaligus untuk mempertahankan *stem cell pool* (keberadaan) dari *premature exhaustion* (kelelahan) di bawah kondisi berbagai variasi stres yang mengenai jaringan tubuh.[52] Selanjutnya *long term maintenance* (perawatan jangka panjang) dari *stem cell* sangat tergantung pada interaksi dengan *niche (microenvironment* spesifik) mereka. Penelitian-penelitian mendetail pada saat ini menjelaskan bahwa interaksi antara *stem cell* dengan *niche* yang sangat penting untuk mempertahankan keberadaan *stem cell* di dalam jaringan pada periode yang lebih lama. Selain itu fungsi *stem cell niche* juga meregulasi beberapa properti spesifik dari *stem cell*, seperti *self renewal*, *multi potentiality,* dan relativitas dari *dormant atau quiescence* dalam siklus sel.

Spesifik *microenvironent* (*niche*) di sekeliling *stem cells* mempunyai peran penting dalam meregulasi aktivitas *stem cells*. Schofield pada tahun 1978, adalah orang pertama yang mengemukakan konsep *stem cells niche*, yaitu pada *human hematophoietic stem cell* (HSCs).[52] Saat ini *stem cell* dan *niche* telah diidentifikasi pada mamalia, yaitu pada HSCs,[52] *central nervous stem muscle cell, satellite cell*,[24,54] *interfollicular epidermis, intestinal* epithelium,[55] *bulge region* pada folikel rambut,[56] dan *spermatogonial stem cells* (SSCs) pada basal membran tubulus seminiferus.[57] Pada HSCs, secara jelas disebutkan bahwa *hypoxic niche* pada lokasi endosteum memelihara *stem cell* dalam kondisi *quiescence* sehingga terjadi *slow cycling* atau bahkan pada Go *state*, tetapi ketika *stem cell* bermigrasi keluar dari *niche* untuk *homing* dan menuju ke lokasi *sinusoidal vasclature* yang bersifat *vasculer niche* (*oxygenic niche*), menyebabkan *stem cell* segera berdiferensiasi menjadi progenitor yang secara aktif akan terus melakukan proliferasi dengan cepat[58] yang akhirnya berdiferensiasi menjadi berkomitmen menjadi sel yang dibutuhkan.[52] *Stem cell niche* dari epidermal adalah sebuah sistem yang *perfect* untuk mempelajari regulasi dari *stem cell* yang *dormant (quiescense stem cell)*. Hal ini dikarenakan identifikasi dan lokasi *stem cells* terorganisasi dengan baik, yaitu di dalam *hair folicle*. *Quiescense stem cell* berada di dalam *bulge region* dan proliferasi baru terjadi ketika *stem cell* bermigrasi ke dalam *bulb region*.[56]

Demikian halnya dengan HSCs, dapat berubah dari *quiescenct stem cells* masuk ke *cycling state*, 6 hari setelah perlakuan induksi 5-FU *myelosuppressive*, di mana kelompok HSCs yang berada dalam endosteum bermigrasi menuju area *central* dari *marrow*. Hal ini menunjukkan bahwa *cycling state* dari HSCs terjadi di luar *niche* mereka dan termobilisasi dan bermigrasi menuju *peripheral circulation*.[52]

Quiescence merupakan salah satu properti umum dari *stem cell* pada *term* siklus sel. Kelangkaan *stem cell in vivo* di dalam tubuh dan yang relatif dalam bentuk *quiescence* atau *dormant* telah menjadikan keberadaannya tidak mungkin untuk dikonfirmasi secara langsung. *Self renewal* pada *postnatal HSCs* berhubungan erat dengan *slow cell cycling* atau *quiescence*. *HSCs adult* adalah lebih dominan dalam bentuk *quiescent* sehingga memungkinkan *maintenance.*

HSCs quiescence dan *slow cell cycle progresion* dapat menjadi penting dan diperlukan dalam mempertahankan *self-renewal* HSCs *compartment* untuk tetap *viable*. Subpopulasi *long-term* HSCs adalah berada dalam tahap *quiescent* dan mempunyai aktivitas kuat membentuk kembali (*reconstitution*) proses hematopoiesis yang lebih efisien.[59]

Compartement long-term dari *stem cell* dapat dipertahankan jika berada pada bentuk *quiescence.* Pada saat ketika terjadi defisiensi gen $p21^{Cip1}$, hal ini akan menjadi penyebab HSCs tidak berada pada fase G0 dan selanjutnya akan kehilangan kemampuan *long-term repopulation*.[60] Pada penelitian lain disebutkan bahwa populasi HSCs *quiescent* adalah *resistent* terhadap induksi 5-*Fluorouracil* (5FU) *myelosuppression*.[59] Hal ini menunjukkan bahwa *quiescence* dari HSCs adalah berhubungan erat dengan proteksi dari HSCs *pool* dari induksi berbagai variasi stres termasuk toxin *myelotoxic*.[52]

Oleh karena itulah sampai detik ini, masih terus dilakukan riset terkait mencari faktor absolut dari *niche in vitro* agar proliferasi *stem cells* dapat dikendalikan tanpa terjadinya pembentukan *senescence cell* atau bahkan proses apoptosis, tetapi tetap bersifat *undifferentiated,* sehingga mempunyai viabilitas yang tinggi ketika *stem cell* tersebut ditransplantasikan. Berbagai penelitian tentang pengkondisian hipoksia telah menjadi titik terang tentang pentingnya peranan *niche* secara *in vitro* yang dikaitkan dengan *niche* secara *in vivo*.[31,33] Sehingga pada akhirnya jika impian ditemukannya faktor absolut penentu potensi proliferasi dari *stem cell* secara *in vitro* dapat terwujud, disertai tanpa terjadi proses diferensiasi, maka ketersediaan *stem cell* dapat diperbanyak dengan mudah dan aplikatif, baik oleh peneliti maupun ahli medis agar dapat digunakan sebagai bahan utama pada terapi transplantasi sel.[1]

Beberapa penelitian sebelumnya hanya mengaitkan hubungan antara hipoksia dengan hambatan dari ekspresi enzim *Prolyl hydroxylases* (PHDs) disertai peningkatan *Hypoxia Inducible Factor-1* (HIF-1) sehingga proses apoptosis dan pembentukan *senescence cells* tidak terjadi. Padahal faktor terpenting dari pengondisian hipoksia secara *in vitro*, selain mencegah apoptosis dan *senescence cell, stem cell* yang dikultur tetap berproliferasi, tetapi

tidak berdiferensiasi dan tetap terpelihara dalam bentuk *dormant*[24] atau disebut juga sebagai *quiescence cell*.[42,45,33]

Maintenance Quiescence cell yang berupa *stem cell* pada tahap G0, memberikan keuntungan berupa *Long Term Maintenance* (LTM) dari *stem cell*. Kondisi LTM akan mempertahankan viabilitas atau daya hidup dari *stem cell* yang ditransplantasikan,[60,61] khususnya transplantasi sel pada penderita oligospermia.[27,62] Berdasarkan hasil penelitian terbaru, kultur prekondisi hipoksia dari *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* dapat menghasilkan bentuk *quiescence cell*, melalui empat kunci yang diduga sebagai *maintenance* dari *quiescence cell,* yaitu *slow proliferation, viable*, *pluripotency,* dan hambatan *differentiation* dari *stem cell* yang dikultur *in vitro*.[63]

LONG TERM MAINTENANCE QUIESCENCE CELLS

Maintenance *stem cell* pada penelitian-penelitian awal adalah hanya ditujukan untuk mencari metode paling optimal dalam mengatasi proses apoptosis dan pembentukan *senescence cell* pada saat kultur *in vitro* dari *stem cell,* dengan harapan proses proliferasi dari sel yang dikultur tetap dapat dipertahankan. Padahal proses proliferasi selain didasarkan pada keberhasilan proses *clonning* dari *stem cell* yang dikultur tanpa terjadi proses apoptosis dan *senescence cells*, juga bagaimana sel tersebut dapat *viable* dan *adaptif* (*long term maintenance*) sehingga *viabilitas stem cell* dapat dipertahankan dan adaptif ketika ditransplantasikan.

Penelitian eksperimental kultur *in vitro* dari *stem cell* yang telah banyak dipelajari, baik dari aspek biokimia maupun biofisika terhadap dinamika selular dari berbagai sumber yang berbeda yang selanjutnya dimanipulasi secara khusus. Diperlukan seni dalam mengkultur *stem cell* untuk mempelajari mekanisme proses perbaikan dan pertumbuhan dari sel.[61] Beberapa tahap proses perbaikan tergantung faktor fisik, salah satunya seperti tingkatan tekanan dari oksigen.

Pada saat melakukan kultur sel *in vitro*, dapat dikerjakan dengan pemberian lingkungan hipoksia. Beberapa penelitian terakhir mencatat

sebuah metode alternatif dengan biaya murah untuk membuat lingkungan hipoksia pada kultur sel yang ditempatkan pada botol *flasks* yang ditempatkan dalam sebuah *chamber hyppoxia* yang terhubung pada tabung oksigen dan mesin pengatur konsentrasi oksigen dan lama waktu pemberian hipoksia, selanjutnya satu set *chamber* tersebut diletakkan pada inkubator CO_2 5% (Gambar 4.7).

Gambar 4.7 Hipoksia *Chamber* di dalam inkubator CO_2 5%.

Berdasarkan dari berbagai penelitian yang telah disebutkan di atas, maka *Long Term Maintenance* (LTM) dari *stem cell* yang berproliferasi dapat dipertahankan jika sel yang dikultur dibuat mengalami kondisi inaktif/Go (*Quiescence cells*), yaitu suatu kondisi di mana sel yang dikultur dibuat tidak mengalami *cycling state* (G1/S/G2/M),[53,63] melalui terekspresinya *cell cycle arrest genes*.[64] Melalui ekspresi *genes* tersebut akan terjadi 4 hal yang menjadi kunci *maintenance* dari *Quiescence cell* yang dikultur *in vitro*, yaitu *slow proliferation,* kadar optimal ROS, *undifferentiation,* serta *pluripotency*.[63]

1. *Slow Proliferation*

Kemampuannya memperbanyak diri sendiri melalui proses proliferasi di dalam tubuh dapat mempertahankan populasi dari *stem cell*. Kemampuan proliferasi ini dapat dilakukan secara berulang kali dan diduga tanpa batas, selain juga dapat dipertahankan untuk jangka waktu yang relatif lama secara *in vivo*.[7] Namun demikian, secara *in vitro* pada proses kultur sel, umumnya

dirangsang untuk terus-menerus berproliferasi melalui serangkaian beberapa kali pasase sampai proliferasi sel menjadi terbatas dan sampai pada akhirnya akan masuk pada keadaan pertumbuhan terhenti secara permanen, yang dikenal dengan istilah *replicative senescence*.[65] Proliferasi juga dapat terhenti lebih awal akibat oleh beberapa paparan *agent* yang merusak sel. Paparan *agent* tersebut, seperti ultraviolet, radiasi sinar gamma, *treatment* dengan *hystone deacetylase inhibitors*, *agent* farmakologi, dan stres oksidatif (H_2O_2 atau *hyperoksia*). Terhentinya proliferasi yang lebih awal ini dikenal dengan istilah *premature senescence*.

Oleh karena itulah agar kedua bentuk *senescence*, baik yang *replicative* maupun yang *premature* tidak terjadi, diperlukan suatu perlakuan khusus (*niche* yang sesuai dengan *in vivo*) agar sel yang dikultur tetap dapat berproliferasi berulangkali dan tidak terbatas tetapi tidak mengalami kedua bentuk *senescence*. Perlakuan khusus berupa *niche* yang sesuai tersebut diduga dapat dicapai jika proliferasi dimanipulasi menjadi lambat (*slow proliferation*). *Slow proliferation*, berdasarkan hasil penelitian[63] dapat ditentukan melalui jumlah terkecil terbentuknya *colony-forming unit-fibroblasts* (*least CFU-Fs*) pada kultur hypoxia (1–3% O_2) dibandingkan denga kontrol (21% O_2).[66] Penelitian lain menyebutkan bahwa kondisi oksigen lingkungan (18%) menghasilkan peningkatan jumlah *stem cell* yang berdiferensiasi menjadi sel *progenitor*.[67] Secara ironis, *stem cell* hanya mampu berproliferasi membentuk *CFU-Fs* maksimum pada hari ke-7 pada proses kultur (*day-7CFU-Fs*).[63] Kultur dengan kondisi hipoksia 1% menyebabkan hambatan proses diferensiasi sehingga terjadi penurunan semua tipe progenitor kecuali *stem cell*, yang akan tetap terpelihara.

2. Kadar ROS Intraseluler

Kadar optimal ROS intraseluler merupakan salah satu dari 4 hal yang menjadi kunci *maintenance* dari *Quiescence cell* yang dikultur secara *in vitro* selain *slow proliferation, pluripotency* dan *undifferentiated*. Kadar optimal ROS intraseluler diperlukan dalam upaya hambatan terhadap penuaan sel (*senescence cell*) dan hambatan terhadap kematian sel (apoptosis).

Hambatan Terhadap *Senescence Cell*

Hambatan terhadap pembentukan *senescence cells* pada kultur *in vitro stem cells* sangat diperlukan agar *stem cells* yang diproduksi secara *in vitro* tetap bersifat *viable.* Dengan demikan *stem cells* yang ditransplantasikan dapat berproliferasi dan berdiferensiasi lebih lanjut sesuai kebutuhan dari penderita. Terbentuknya *senescence* pada kultur sel memberikan petunjuk bahwa *microenvironment* mempunyai peranan penting bagi *life span stem cell* yang dikultur. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa *stem cell* akan berproliferasi sampai jumlah tertentu, selanjutnya *stem cell* mengalami *senescence*.[68] Secara morfologi sel yang mengalami *senescence* ditandai dengan bentuk sel yang besar dan *flat*, irreversibel, dan berpotensi kehilangan sifat regeneratif sehingga berhenti berproliferasi.[69] Hal tersebut berakibat pada proses penuaan dari *stem cell*. Jika *senescence* bersifat memicu proses penuaan secara seluler, maka akan berpengaruh juga terhadap semua *adult stem cell*. Kegagalan fungsi regenerasi jaringan dari *adult stem cell* pada suatu individu berakibat pada terjadinya proses penuaan. Beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa kultur *in vitro* yang dilakukan dalam beberapa kali pasase menyebabkan sel menjadi tua sehingga mengurangi kemampuan berdiferensiasi.[68] Hal tersebut dapat menjadi keterbatasan secara aplikatif dalam penggunaan *stem cell* sebagai terapi.[69]

Mekanisme molekuler yang mendasari terbentuknya *senescence* ada dugaan disebabkan oleh pemendekan telomer yang secara progresif atau perubahan pada struktur dari telomer. Terbentuknya *senescence* melibatkan kerusakan pada DNA sebagai akibat akumulasi dari *cyclin-dependent kinase* (*CDK*) inhibitor p16INK4a.[70] Selain itu, bisa juga akibat akumulasi *reactive oxygen species* (*ROS*) yang berakibat pada peningkatan ekspresi dari protein p53. Peningkatan ekspresi protein p53 akan meningkatkan ekspresi protein p21 sehingga menghambat pertumbuhan bahkan terbentuk *senescence* melalui *CDK* inhibitor.[71]

Pada proses kultur sel, secara umum sel dirangsang untuk terus berproliferasi melalui serangkaian pasase sampai sel menjadi terbatas dalam

berproliferasi dan masuk pada kondisi pertumbuhan yang terhenti secara permanen dan *irreversible* yang dikenal sebagai *replicative senescence*.[65] Jenis *senescence* yang lain adalah *premature senescense*, dengan salah satu penyebabnya adalah stres oksidatif akibat tingginya konsentrasi oksigen (*hyperoksia*).

Senescence premature dan *replicative* mempunyai gambaran yang sama terhadap kemampuan proliferasi sel yang hilang, peningkatan volume sel, *flat formed,* dan peningkatan ekspresi CDKs inhibitor seperti p16 dan p21. Selular *senescence* juga dapat diidentifikasi dan dikarakterisasi dengan menggunakan biomarker *senescence-associated* β-*galactosidase* (SA-β-Gal).[68] SA-β-Gal adalah hasil residu dari aktivitas β-*galactosidase lisosom* yang terjadi pada pH sub-optimal yang dapat dideteksi keberadaannya di dalam sel *senesence,* sebagai akibat peningkatan isi lisosom.[71,72] SA-β-Gal sebenarnya tak diperlukan dalam perkembangan *senescence*, tetapi aktivitasnya mengalami peningkatan secara *irreversibel* pada beberapa sel yang mengalami penuaan atau stres.

Pada beberapa penelitian menyebutkan, hambatan *senescence* dapat terjadi dikarenakan adanya peran kompleks HIF-1α HIF-1β pada awal terpapar hipoksia,[73] sehingga menjadi penyebab ekspresi *cell cycle arrest genes*.[64] Hal ini menghambat ekspresi p21, sehingga terjadi *inaktivasi cell cycling* dan hambatan *senescence*.[68]

Hambatan Apoptosis

Agar *stem cell* yang diproduksi secara *in vitro* tetap *viable* dan tidak mengalami kematian sebelum sel tersebut ditransplantasikan, maka sangat diperlukan hambatan terhadap proses apoptosis pada saat *stem cell* dikultur *in vitro*. Hal ini dikarenakan harus terpenuhinya jumlah sel hidup minimal yang ditransplantasikan pada penderita. Kejadian apoptosis merupakan salah satu jalur kematian sel pada saat kultur sel, selain proses nekrosis. Kedua jalur baik apoptosis maupun nekrosis, meskipun memiliki mekanisme yang berbeda secara histologis dan biokimia, namun kedua jalur tersebut menjadi penyebab kematian sel sebelum ditransplantasikan. Pada proses apoptosis, stimulus penyebab kematian sel terjadi melalui aktivasi kaskade caspase yang mengatur terjadinya penghancuran sel.[74] Pada proses nekrosis, stimulus

penyebab kematian sel terjadi secara langsung. Nekrosis dianggap sebagai proses patologis, sedangkan apoptosis merupakan bagian dari perkembangan normal dikenal sebagai apoptosis fisiologis, namun jika terjadi akibat suatu penyakit disebut sebagai apoptosis patologis.

Apoptosis secara molekuler dipicu oleh berbagai macam stimulus, seperti aktivitas dari *death receptor* (DR) oleh suatu sitokin seperti *tumor necrotic factor* (TNF α) dan juga Fas, toksin, stres oksidatif, tidak berfungsinya hormon pertumbuhan (GH), dan kalsium influks yang terjadi melalui kanal ion pada selaput membran ataupun keluarnya kalsium dari endoplasmik retikulum.[75] Apoptosis dapat terjadi melalui dua jalur utama, yakni melalui jalur ekstrinsik dan intrinsik. Jalur ekstrinsik atau dikenal juga jalur *death receptor* (DR) *pathway*, sedangkan jalur intrinsik diketahui merupakan jalur mitokondria.[76] Proses apoptosis pada jalur ekstrinsik, diawali setelah terjadi ikatan pada membran plasma antara DR dengan protein Fas, suatu *glycocylated cell-surface* protein dengan berat molekul 42 sampai 52 kDa ataupun dengan TNF-α yang diproduksi oleh makrofag yang mengalami sensitisasi atau limfosit T. Selanjutnya reaksi ini diikuti oleh *apoptotic pathway* yang terdiri atas seperangkat enzim seperti FAAD, TRADD, caspase 8, dan caspase 10 yang berfungsi sebagai penggerak efektor apoptosis. Sebagian induksi apoptosis juga dapat berasal dari sitokin TNF-α yang akan menstimulus mitokondria.

Pada jalur intrinsik munculnya inisiasi apoptosis akibat produksi biokimia yang bersumber dari intraseluler stres, seperti perubahan oksidatif stres, redoks, peroksidasi lipid, dan ikatan kovalen.[77] Berbagai riset ditemukan suatu hubungan sinyal intrinsik terhadap apoptosis pada sel, riset tersebut dilakukan pada hewan coba. Kerusakan DNA baik akibat tindakan secara induksi maupun herediter diawali adanya peningkatan ekspresi p53 sehingga terjadi peningkatan kalsium influks akibat stimulasi yang berlebihan terhadap reseptor glutamat dan pada akhirnya berakibat pada kerusakan komponen dari membran plasma serta stres oksidatif atau pembentukan dari radikal bebas, serta stres metabolik seperti hipoglikemia dan hipoksia. Keadaan ini dapat menyebabkan terjadinya kerusakan membran dari mitokondria dan

berakibat pada dikeluarkannya sitokrom c sebagai *apoptosis-inducing factor,* dan akhirnya terjadilah kematian sel.[78]

Semua zat tersebut akan memberikan suatu *signal* terhadap mitokondria sehingga menyebabkan terjadinya perubahan pada mitokondria itu sendiri, yaitu dimulai dari terbukanya membran pada bagian luar dan selanjutnya diikuti pembengkakan matriks dan hilangnya potensial membran, sehingga akhirnya keluarlah berbagai jenis protein mitokondria termasuk sitokrom c sebagai aktivator kaspase. Selanjutnya, sitokrom c mengaktivkan caspase 9 yang berperan menggerakkan efektor apoptosis.[79] Pada proses inilah terjadi influks kalsium akibat kerusakan membran atau keluarnya kalsium dari retukulum endoplasma sebagai penyebab terjadinya penumpukan kalsium pada daerah intraseluler. Selanjutnya apoptosis akan menghasilkan suatu *apoptotic bodies* yang terdiri atas beberapa fragmen sisa sel dan selanjutnya akan difagositosis oleh sistem retikulo endotelial yang berada di sekitarnya.[76]

Pada penelitian terbaru,[63] hambatan apoptosis dapat terjadi dikarenakan adanya peran HIF-1α yang menghambat ekspresi ROS akibat kondisi hipoksia yang diberikan. Hambatan pada ekspresi ROS akan menghambat ekspresi gen p53, selanjutnya hambatan terhadap ekspresi gen p53 menyebabkan hambatan pada terbukanya *pt pore* dari membran mitokondria, sehingga cytocrom-C yang bertindak sebagai *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) tidak terekspresi. Tidak terekspresinya Apaf-1 menyebabkan hambatan pada dikeluarkannya berbagai caspase, seperti caspase 9 dan caspase 3 yang merupakan cascade apoptosis. Hambatan pada p53, *cytocrom-C*, dan caspase diduga akan menyebabkan hambatan pula pada proses apoptosis pada BMSC yang dikultur pada prekondisi hipoksia.

3. *Undifferentiation*

Undifferentiation dari *stem cell* pada beberapa penelitian juga menjadi tujuan utama dari produksi sel yang dikultur. Hal tersebut dikarenakan, bahwa *undiferentiated stem cell* merupakan salah satu dari empat kunci *maintenance quiescence stem cell*. *Undifferentiation* adalah salah satu karakteristik yang unik dari *stem cell* yang juga bisa menjadi pembeda dari sel lain dari organ tubuh.[10]

Karakteristik *undifferentiation* yang unik ini menjadikan *stem cell* hasil kultur *in vitro* diduga mampu bertahan hidup lebih lama dibandingkan progenitor ataupun *stem cell* yang telah *mature*. Hal tersebut didasarkan pada beberapa riset yang menyebutkan agar viabilitas *stem cell* yang ditransplantasikan dapat dipertahankan, maka *stem cell* yang dikultur harus dibuat mengalami *long term maintenance* (LTM).[60,61, 63] LTM tersebut dapat diupayakan jika *stem cell* berada pada tahap G0 pada saat transplantasi. Tahap G0 merupakan suatu tahap di mana sel yang dikultur tidak mengalami *cycling state* (G1/S/G2/M).[52,53] Tahap G0 dikenal dengan istilah *Quiescence cell* atau *dormant cell*.[24] Kondisi ini dapat diupayakan jika terdapat *microenvironment* yang kondusif dan sesuai *niche* yang dibutuhkan.[42,45]

Kondisi *undifferentiation* dari *stem cell,* lebih lanjut akan mampu berdiferensiasi dan menjadi sel apa saja yang dibutuhkan setelah ditransplantasikan. Hal ini merupakan keistimewaan dari *stem cell*, bahwa ketika berada pada kondisi *undifferentiated*, maka sel tersebut dapat mengalami diferensiasi menjadi lebih dari satu jenis atau tipe sel baik bersifat multipoten ataupun pluripoten. Oleh karena itulah maka *stem cell* dapat dikatakan sebagai sel yang belum memiliki baik bentuk maupun fungsi yang spesifik seperti sel lain dari organ tubuh.[1] Sebagai contoh sel otot jantung yang berperan untuk berdenyut, sel neuron sebagai penghantar impuls saraf dan sel dari pulau Langerhans pada pankreas yang mempunyai fungsi penghasil hormon insulin.[4] Berbeda dari ketiga sel tersebut, *stem cell* belum memiliki fungsi khusus seperti berdenyut, menghantarkan impuls saraf, menghasilkan hormon, ataupun fungsi lain.[80] Berdasarkan berbagai hasil riset, dikatakan bahwa populasi dari *stem cell* pada suatu jaringan *mature*, menunjukkan suatu populasi dari sel yang inaktif dan baru berfungsi pada waktu maupun kondisi tertentu.

Keberadaan MSCs sebagai sel yang inaktif dan juga belum mengalami diferensiasi adalah dimaksudkan untuk menjaga kontinuitas dari regenerasi populasi sel sebagai penyusun jaringan. Hal ini dapat dilakukan berdasar kemampuan dari *stem cell* untuk berdiferensiasi menjadi sel tubuh apapun yang sesuai dengan yang dibutuhkan.[35] MSCs dikatakan bersifat multipoten,

sehingga mampu berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel yang segolongan yaitu mesoderm, seperti osteosit, kondrosit, adiposit, miosit, berbagai jenis sel penyusun jaringan ikat serta kardiomisit (Gambar 2.2).[24] Selanjutnya, MSCs juga mampu berfungsi *transdiferensiasi,* artinya selain bisa mengalami diferensiasi menjadi berbagai jenis sel yang segolongan (*mesoderm*) juga bisa lintas golongan (Gambar 2.3), misalnya golongan *ectoderm*, sehingga bisa berdiferensiasi menjadi sel neuron[1] ataupun golongan *endoderm*, seperti sel hepatosit[81] dan *germline cell (spermatogonial, sertoli, Leydig)* dan *germline tissues* (tubulus seminiferus).[27]

4. *Pluripotency*

Selain dapat melakukan replikasi dan *self-renewal* atau menghasilkan sel yang berkarakteristik sama dengan sel induknya. *Stem cell* juga mempunyai potensi untuk dapat mengalami diferensiasi menjadi sel tubuh manapun yang berasal dari ketiga lapisan embrional, baik ektoderm, mesoderm, maupun endoderm. Potensi bisa menjadi ke-3 lapisan embrional ini dikenal dengan istilah *pluripotency*.[82] Namun demikian sifat *pluripotency* sampai saat hanya dimiliki oleh *embryonal stem cell* (ESCs) dan tidak pada *adult stem cell*.[2] ESCs memiliki potensi diferensiasi yang jauh lebih besar dibandingkan *adult stem cells* yang bersifat multipoten maupun sel progenitor yang hanya bersifat *unipotent*.[1] *ESCs* yang berasal dari *inner cell mass* (ICM) yang berada di dalam blastosis bersifat *pluripotent*, sehingga mempunyai kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel penyusun tubuh dari ketiga lapisan embrional termasuk sel saraf, sel darah, sel penyusun jantung, maupun sel sistem imun. Hal ini menunjukkan bahwa *stem cell* bersifat multipoten atau pluripoten bergantung pada jenis dari *stem cell* itu sendiri.

Induksi Pluripotency (IPs) merupakan salah satu fokus utama pada penelitian *adult stem cell* pada saat kultur *in vitro stem cell*. Dibutuhkan keseimbangan antara diferensiasi, apoptosis, dan *self renewal* dari *stem cell in vivo* yang diregulasi oleh *niche* dari *microenvironment* di mana *stem cell* berada. Pada kultur *in vitro*, nasib *stem cell* selain dipengaruhi oleh *growth*

factor, interleukins atau serum, dalam memengaruhi keseimbangan antara *self renewal*, diferensiasi, dan apoptosis, juga dipengaruhi kondisi yang diberikan pada saat proses kultur, seoperti kondisi konsentrasi oksigen.[83]

Self-renewal adalah proses dari *stem cells* untuk membuat lebih banyak *stem cells* itu sendiri atau menggandakan diri sendiri, sehingga kehidupan *stem cell pool* dapat menjadi abadi. *Self-renewal* adalah merupakan *maintenance* dari *undifferentiated state*. Kontrol terhadap siklus sel dan *maintenance* dari *multipotency* atau *pluripotency*, tergantung sumber *stem cells*. Program *self-renewal*, melibatkan keseimbangan jaringan *promoting self – renewal* (proto-onkogene), membatasi *self-renewal* atau penahan *tumor suppressors* dan mempertahankan integritas enomic atau pertahanan *tumor suppresors*. Mekanisme intrinsik sel diregulasi oleh *signal* sel ekstrinsik dari *niche*, bahwa *microenvironment* yang mempertahankan keberadaan *stem cell* dan meregulasi fungsi mereka di dalam jaringan. Pada respons untuk memenuhi kebutuhan jaringan, *stem cell* mengalami perubahan dalam status siklus sel dan potensial berkembang *overtime*, membutuhkan program *self-renewal* yang berbeda pada beberapa tahap kehidupan. Penurunan fungsi dari *stem cell* dan potensi enomictive jaringan selama penuaan disebabkan oleh perubahan pada program *self-renewal* yang meningkatkan *tumor suppression*.[46]

Self-renewal merupakan petunjuk *biological pathway* dan mekanisme pertahanan pada tahap *undifferent of stem cell*.[66] Susunan enomic digunakan untuk identifikasi molekuler dari *self-renewal* yang mempertahankan *stem cells state*, termasuk MSCs.[44] Pendekatan kandidat gen secara enomic tersebut dapat digambarkan pada Gambar 2.14. Pada gambar tersebut dapat dijelaskan bahwa *extracellular factor*[66] dan *niche*[52] dapat memengaruhi *self-renewal* berdasarkan petanda marker dari MSCs, seperti Oct-4, Sox-2,[84,85] dan Rex-1.[66]

Pluripoten dari *stem cell* adalah jika sel mempunyai kemampuan berdiferensisi menjadi sel tubuh manapun yang berasal dari ketiga lapisan embrional baik ektoderm, mesoderm, maupun endoderm. Adapun *stem cells* dikatakan bersifat multipoten apabila hanya mampu berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel yang berada dalam suatu golongan serupa, seperti sel-sel sistem hematopoetik menjadi sel darah dan sistem saraf menjadi sel neuron.[86]

Proses terjadinya diferensiasi *stem cell in vivo* di dalam tubuh ada dugaan disebabkan karena faktor internal dari sel dan faktor eksternal di luar sel. Faktor internal dari sel dapat dipengaruhi oleh faktor epigenetik dan genetik, sedangkan faktor eksternal dari dipengaruhi beberapa faktor seperti faktor pertumbuhan (*growth factor*), kondisi lingkungan sekitar sel, ataupun bergantung pada organ tubuh itu sendiri atau kebutuhan jaringan ketika mengalami *defect* atau *injury*. Sampai saat ini, berbagai faktor penentu terjadinya proses diferensiasi dari *stem cell* masih akan terus dilakukan penelitian.[35]

Adapun, ESCs yang berasal dari *inner cell mass* (ICM) di dalam blastosis adalah bersifat *pluripotent*, sehingga mampu berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel penyusun tubuh dari ketiga lapisan embrional.[9] Namun demikian penggunaan ESCs dianggap melanggar kode etik, sehingga pemanfaatannya untuk terapi pada manusia tidak diperkenankan.

Oleh karena itulah, dilakukan berbagai upaya agar sifat *pluripotency* dapat diinduksi pada kultur *in vitro adult stem cell* melalui program *induce pluripotent stem cell* (iPS). Hal tersebut menjadi salah satu fokus utama pada beberapa penelitian *adult stem cell*. Secara *in vivo*, dibutuhkan keseimbangan antara diferensiasi, apoptosis, dan *self-renewal* dari *stem cell* yang diregulasi oleh *niche* dari *microenvironment* di mana *stem cell* berada.

Program iPS telah terbukti berhasil dan mengantarkan penemunya Profesor Yamanaka, seorang ilmuwan dari Jepang mendapatkan NOBEL pada tahun 2013.[87] Namun dikarenakan program iPS tersebut dilakukan melalui pemanfaatan transfeksi virus dengan empat faktor transkripsi seperti OCT3/4, SOX2, C-MYC, dan KLF4 yang dikenal sebagai "*kuartet Yamanaka*". Transfeksi virus oleh Yamanaka adalah dengan menggunakan virus retro viral.[1]

Namun demikian, teknologi ini masih memiliki banyak kelemahan, seperti:

a. Kekhawatiran penggunaan virus sebagai suatu vektor transfeksi berpotensi berakibat pada terjadinya proses mutasi sel somatis atau *stem cell* dewasa yang diinfeksinya nanti di kemudian hari.

b. Keberhasilan dari transfeksi kuartet Yamanaka hanya mencapai 0,01% pada sel fibroblas. Kenyataan ini tentu saja tidak efektif dan efisien baik dari segi ekonomi maupun waktu dikarenakan perlu dilakukan proses transfeksi secara berulang kali.
c. Efek samping dikarenakan pemanfaatan jumlah faktor transkripsi yang terlalu banyak bisa saja terjadi. Selain hal tersebut, kerja faktor transkripsi ketika sudah ditransplantasikan secara *in vivo* ke dalam tubuh manusia tidak memungkinkan lagi untuk dapat dilakukan kontrol atau kendali.
d. Kekhawatiran lainnya berupa munculnya reaksi onkogenik akibat pemanfaatan penyisipan gen C-MYC yang merupakan gen bersifat onkogenik. Hal ini tentu saja akan memunculkan risiko terjadinya suatu keganasan sebagai akibat program iPS di kemudian hari nanti.[1]

Oleh karena itulah diperlukan suatu solusi atau alternatif yang bersifat inovatif dalam upaya program *induce pluripotent stem cell* (iPS) tanpa melalui penyisipan gen faktor transkripsi pada berbagai vektor. Hasil penelitian dalam upaya program *induce pluripotent stem cell* (iPS) yang aman dan aplikatif telah dilakukan. Salah satunya melalui pemanfaatan teknologi fisis, yaitu melalui pemberian *low oksigen tension* (*hypoxia*) pada saat kultur *in vitro.* Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan adalah pemberian *low oksigen tension* pada MSCs dari *bone marrow* pada pasase zero dan juga setelah pasase ke-3.[63,88] Pada penelitian selanjutnya pemberian hipoksia diberikan setelah pasase ke-9, atau setelah terjadi perubahan pada *stem cell,* baik secara molekuler maupun secara genomik yang dikenal sebagai *late passage*.[63]

Berbagai penelitian *stem cell* saat ini adalah ditujukan untuk pengembangan dalam upaya mendapatkan *stem cell* yang bersifat *pluripotent* yang tanpa disertai proses mutasi gen. Melalui pemberian kondisi *hypoxia* pada saat proses kultur *in vitro,* mendukung proses *induce pluripotent stem cell* (iPS). Program iPS ditujukan agar *stem cell* yang dikultur dapat berdiferensiasi menjadi berbagai macam jenis sumber sel baik endoderm, mesoderm, maupun ektoderm. Lebih lanjut, pemberian hipoksia pada saat kultur *in vitro* dapat

mengatasi problem yang selama ini terjadi seperti rendahnya viabilitas, baik pada saat ditransplantasikan, yaitu berupa pembentukan *senescence cell*,[46] apoptosis,[48] perubahan mutasi gen setelah ditransplantasikan[84] maupun sebelum ditransplantasikan.[63]

Penelitian pengembangan program iPS adalah *urgent*, yaitu berupa ketersediaan bank *stem cell* yang bersumber dari *adult stem cell* (ASCs), namun bersifat *pluripotent* layaknya *embrional stem cell* (ESCs), sehingga dapat digunakan untuk transplantasi berbagai jenis sel di seluruh tubuh yang dibutuhkan. Hal ini perlu diupayakan karena ESCs dianggap tidak memenuhi kode etik dalam program transplantasi sel pada manusia.

Keuntungan lain program iPS dengan metode fisis *low oxygen tension* adalah, bahwa *stem cell* yang diproduksi selain bersifat *pluripotent* juga tanpa disertai proses mutasi gen. Selanjutnya program iPS juga dapat dilakukan tanpa pemanfaatan penyisipan faktor-faktor transkripsi berbagai vektor virus yang mempunyai banyak kelemahan seperti yang telah disebutkan sebelumnya.

INOVASI KE DEPAN

Penelitian *stem cell* saat ini dan beberapa dekade ke depan diprediksi akan sangat meningkat tajam. Hal ini dikarenakan potensi dari *stem cell* sangat menjanjikan sebagai terapi berbagai macam penyakit, termasuk penyakit reproduksi penyebab infertilitas yang tidak dapat disembuhkan, baik melalui pengobatan maupun tindakan operatif. Namun demikian biaya yang harus dikeluarkan pada program terapi transplantasi *stem cell* tidaklah sedikit, maka hal ini menyebabkan seseorang berfikir beberapa kali untuk menjalani terapi ini. Belum lagi harus dilakukan beberapa kali pengulangan (*booster*) agar program terapi ini efektif.

Oleh karena itu, diperlukan suatu inovasi eksplorasi *stem cell* endogen agar terjadi peningkatan jumlah *stem cell* yang diproduksi oleh tubuh sendiri. Peningkatan eksplorasi ini dapat dilakukan dengan berbagai cara pengaktifan *stem cell* dari dalam tubuh melalui inisiasi *stem cell* endogen agar aktif

tereksplorasi. Proses eksplorasi *stem cell* endogen ini dikenal dengan istilah aktivasi *endogenous stem cell*. Proses ini diupayakan untuk mendapatkan *stem cell* yang lebih banyak lagi jumlahnya jika dibandingkan tanpa melakukan pemberian bahan aktivasi *stem cell endogen* dari luar. Salah satunya melalui pemberian bahan alam atau sintetik yang diberikan secara per oral.

Mekanisme eksplorasi *stem cell endogen* diawali melalui proses mobilisasi, *homing,* dan terakhir proses diferensiasi *stem cell endogen* tersebut. Eksplorasi *stem cell endogen* ini dapat dilakukan melalui berbagai bahan, baik bahan yang bersifat alami maupun sintetik. Salah satu bahan alam tersebut berasal dari *bee product* atau produk perlebahan seperti madu. Pemanfaatan madu ini terbukti menyebabkan termobilisasinya *stem cell* endogen menuju tempat yang *defect* sehingga terjadi auto-regenerasi pada sel dari jaringan yang mengalami kerusakan (degeneratif) sehingga pada akhirnya terjadi perbaikan (regeneratif) pada jaringan baik intestine, hepar, ovarium, maupun testis.[28,89-92] Auto-regenerasi sel penyusun jaringan ini dapat terjadi melalui mobilisasi *stem cell endogen* yang dapat terjadi dengan lebih cepat dan dalam jumlah yang cukup disertai proses diferensiasi yang optimal sehingga terjadi regenerasi pada sel yang telah mengalami degenerasi (kerusakan).

DAFTAR PUSTAKA

1. Halim DH, Murty F, Sandra A, Boediono T, Djuwantono B, dan Setiawan B. 2010. Stem Cell Dasar Teori dan Aplikasi Klinis. Jakarta: Erlangga.
2. Bongso A and Lee EH. 2005. Stem Cells from Bench to Bedside. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte.Ltd.
3. Fodor WL. 2003. Tissue engineering and cell based therapyies. From the bench to the clinic. The potensial to replace, repair and regeneration. J. Reprod. Biol. Endocrinol. 200
4. Guz Y, Nazir I and, Teitelman G. 2001. Regeneration of pancreatic β cells from intra-islet precursor cells in experimental model of diabetes. Endocrinol. 142(11):4956-4968.
5. Voltarelli JC and Courl CEB. 2009. Stem cell transplantation for type 1 diabetes melitus. Diabetol. Metab. Synd. 1: 4. doi:10.1186/1758-5996:1-4.

6. Li C, Kong Y, and Wang H. 2009. Homing of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by sphingosine 1-phosphate contributes to liver fibrosis. Journal of Hepatology. doi:10.1016/j.jhep.2009.01.028.
7. Adams GB and Scaddden DT. 2008. The Hematopoietic Stem Cell in Its Place. Nat.Immunol. 7:333-337.
8. Tang YL, Zhang YC, Qian LP, Shen, and Phillips M. 2005. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia regulated heoxygenase 1 vector. J. Am.Coll.Cardiol. 46:1339-1350.
9. Rantam FA, Ferdiansyah, Nasronudin and Purwati. 2009. Stem Cell Exploration. Methods of Isolation and Culture. First Ed. Surabaya: Airlangga University Press.
10. Kim YJ. 2007. Culture of Umbilical Cord and Cord Blood Derived Stem Cells. In: Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM, editors. Culture of Human Stem Cells. Wuley Interscience.
11. National Academy of Science. 2008. Understanding Stem Cells: an Overview of The Science and Issues From The National Academies. Available from: www.national-academies.org
12. National Institutes of Health. 2008. Stem Cell Basics. Stem Cell Information. The National Institutes of Health Resource for Stem Cell Research.
13. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakhrisnan A, Simmons PJ. 2003. Review Article. Mesenchymal Stem Cells. Archives of Medical Research. 34:565-571.
14. Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. 2002. In vitro differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone producing cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 99(12):8078-8083.
15. Oreffo RO, Bord S and Triffitt JT. 1998. Skletal progenitor cells and ageing human populations. Clin Sci (Lond). 94(5): 549-555.
16. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I,Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. 2005. Multipotential differetiation of adipose tissue-derived stem cells. Keio J Med. 54(3): 132-141.
17. Wobus AM and Boheler KK. 2005. Embryonic Stem cells: prospectc for developmental biology and cell therapy. J. Phys. Rev. 85:635-678.
18. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. 2000. Human embryonic stem cells. J. Cell Sci.113: 5-10.

19. de Werr G and Mumery C. 2003 Human embryonic stem cells. Researh, Ethics and Policy. Journal of Human Reproduction. 18(4):672-682.
20. Gruen L and Grabe Ll. 2006. Concise review: scientific and etichal roadblocks to human embryonic stem cell therapy. Stem Cells. 24:2162-2169.
21. Murdoch A. 2007. Cloning. The Obstretrician and Gynecologist. 9:177-180.
22. Mai Q, Yu Y, Li T, Wang L, Chen M, Huang S, Zhou C, and Zhou Q. 2007. Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenesis blastocysts. Cell Res.. 17:1008-1019.
23. Safitri E., Hariadi M. and Prasetyo RH. 2019. Stem Cell. Kultur Kondisi Hipoksia Upaya Peningkatan Viabilitas dan Pemeliharaan Jangka Lama Sel Punca Diam. 1st Ed. Airlangga University Press. Surabaya. Indonesia.
24. Morrison SJ and Spradling AC. 2008. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Review. Cell. 132:598-611.
25. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Biebak K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. Stem Cells. 20:11-20.
26. Mori, Bellini A, and Stacey MA. 2005. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marow. Exp Cell Res. 304:81-90.
27. Kilani Z. 2009. Stem cell transplantation in human testis for the treatment of male infertility. Available from: http://www.farah-hospital.com
28. Safitri, E., Utama, S., Widiyatno, T.V., Sandhika, W. and Prasetyo, R.H. 2016. Autoregeneration of mice testicle seminiferous tubules due to malnutrition based on stem cells mobilization using bee honey. Asian Pac. J. Reprod., 5(1): 30-34.
29. Safitri E, Utama S, Bumi C, Mulyani SWM, Susilowati H, Retnowati E. 2013. The role of adaptive MSCs an attempt regeneration of spermatogenesis process using by hypoxia precondition in vitro. J Anim Prod Adv. 3(11): 318-322.
30. Ferdiansyah. 2021. Stem Cells and Regenerative Medicine. Ppt perkuliahan Stem Cells S-3 Ilmu Kedokteran. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
31. Safitri E, Prasetyo RH, Hariadi M and Srianto P. 2018. Hypoxic precondition for induce pluripotency of rabbit's bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Biochem. Cell. Arch. 2018;18(2):1509-1517.

32. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonzo Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, and Hedrick MH. 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. Cells Tissues Organ. 174(3):101-109.
33. Safitri E, Hariadi M. 2019. Comparison of biotechnological culture of hypoxia-conditioned rat mesenchymal stem cells with conventional in vitro culture of normoxia-conditioned rat mesenchymal stem cells for testicular failure therapy with low libido in rats. Vet World. 12: 916-924.
34. Macey MG. 2007. Flow cytometry, principle, and aplications. Human Press. 1-31.
35. Jones DL and AJ Wagers. 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. Nature Reviews. Molecular Cell Biology. 9:11-21.
36. Calvi LM. 2003 Osteoblastic cells regulates the haematopoietic stem cell niche. Nature. 425: 841-846.
37. Zhang. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of te niche size. Nature. 425: 836-841.
38. Kiel MJ. 2005. SLAM family receptor distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cell. Stem Cell. 121: 1109-1121.
39. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, and Weissman I. 2001. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. Science. 294:1933-1936.
40. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. 2001. Modelling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartement. I, Krogh's model. Biophys. J. 81(2): 675-84.
41. Bizzari A, Koehler H, Cajlakovic M, Pasic A, Schaupp L, Klimant I, Ribitsch V. 2006. Continuous oxygen monitoring in subcutaneous adipose tissue using microdialisis. Analytica Chimica Acta. 573: 48-56.
42. Mohyeldin A, Muvdi TG, Hiojosa AQ. 2010. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. Cell Stem Cell. 6(7): 150-161.
43. Wenger RH and Katschinki DM. 2005. Review. The hypoxic testis and post-meiotic expression of PAS domain proteins. Seminar in Cell & Developmental Biology. Elsevier Ltd; 547-553. doi: 10.1016/j.semedb.2005.03.008.
44. Song H, Song BW, Cha MJ, Choi IG, Hwang KC. 2010. Expert Opinion. Modifiation of mesenchymal stem cells for cardiac regeneration. Informa Healthcare. 309-319. doi: 10.1517/14712590903455997.

45. Suda T, Takubo K, and Semenza GL. 2011. Cell Stem Cell Review. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in hypoxic niche. Cell Stem Cell. 7(9):296-310. doi: 10.1016/j/stem.2011.09.010.
46. Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, Chen LL, Wang JY, Chiu CH, and Hung SC. 2011. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties though down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. The American Society of Hematology. Blood. 13: 459-469.
47. He A, Jiang Y, and Gui C. 2009. The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning. Can J Cardiol. 296:18888-97.
48. Wang J, Chen TL, Jiang J, Shi H, Gui C, Luo RH, Xie XJ, Xiang MX, and Zhang X. 2008. Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. Acta Pharmacol Sin. 29(1):74-82. doi: 10.1111/j.1745-7254. 2008.00716.x.
49. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, and Garrido C. 2007. Apoptosis Versus Cell Differentiation Role of Heat Shock Proteins HSP 90, HSP70 and HSP27.
50. Bersenev A. 2008. Stem Cells, Quiescence, and Cancer. In Cancer Stem Cells. Journal Club Quiescence. IOSR Journals; 2008.
51. Sudiana IK. 2008. Patobiologi Molekuler Kanker. Jakarta: Salemba Medika.. 2008: 35-52.
52. Arai F and Suda T. 2008. Quiescent Stem Cells in the Niche. Stembook.ed. The Stem Cell Research Commmunity. StemBook, doi/10.3824/stembook 1.6.1.
53. Hermitte F, de la Grange PB, Belloc F, Praloran V, and Ivanovic Z. 2006. Very Low O2 consentration (0,1%) favors Go return of dividing CD34+cells. Stem Cell. 24:65-73.
54. Fuchs E, Tumbar T, and Guasch G. 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. Cell. 116:769-778.
55. Moore KA and Lemischka IR. 2006. Stem cells and their niche. Review. Science. 2006 March 31;311:1880-1885.
56. Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, and Barrandon Y. 2001. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. Cell. 104:235-245.

57. Nobrega RH, Greebe CD, van de Kant H, Bogerd J, de Franca LR and Schulz RW. 2010. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. Plos ONE. September: 5(9).
58. Yin T and Li L. 2006. The stem cell niches in bone. J. Clin Invest. 116:1195-1201.
59. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY and Suda T. 2004. Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cells Quiescence in the Bone Marrow Niche. Cell. 118:149-161.
60. Elliason P, Rehn M, Hammar P, Larsson P, Sirenko O, Flippin LA, Cammenga J, and Johnson JI. 2010. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. Exp.Hematol. 38:301-310.
61. Takubo K. 2011. The hypoxia regulatory system in hematopoietic stem cells. Advances in Hematopoietic Stem Cell Research. 2011;133-146.
62. Masarani M, Wazait H, and Dinneen M. 2006. Mumps orchitis. Journal of the Royal Society of Medicine. 99(11):573-5. doi: 10,1258/jrsm. 99.11.573.
63. Safitri E. 2014 Prekondisi Hipoksia untuk Mencapai Long Term Maintenance (LTM) dari Quiescence BMSCs. Disertasi. Prodi Ilmu Kedokteran. Surabaya Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga.
64. Li L and Bhatia R. 2011. Stem Cell Quiescence. Clin Cancer Res. 17(15). doi:10.1158/1078-0432.CCR-101499.
65. Duan J, Zhang Z, Tong T. 2005. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H_2O_2 involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37:1407-142.
66. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. 2007. Review mesenchymal stromal. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Research and Therapy. 9:204. doi: 10.1186/ar2116.
67. Cipolleschi MG, Sbarba PD, and Olivotto M. 1993. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. Blood. 1993 October.
68. Leontieva OV, Natarajan V, Demidenko ZN, Burdelya LG, Gudkov AV and Blagoskonny MV. 2012. Hypoxia Suppresses Convension from Proliferative Arrest to Cellular Senescence. PNAS Early Edition 1-5.
69. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F. Ghafari SH, and, Ghavamzadeh A. 2006. Aging of mesenchymal stem cells in vitro. BMC Cell Biol. 7:14.

70. Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT. 2006. Stem cell aging modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. Nature. 443:421-426.
71. Macip S, Igarashi M, Fang L, Chen A, Pan ZQ, Lee SW, and Aeronson SA. 2002. Inhibition of p21-Mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. The Embo Journal. 21:2180-2188.
72. Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, and Toguchida J. 2010. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. Biochem and Biophys Res Comm. 391:1471-1476.
73. Forristal CE, Wright KL, Hanley, Oreffo O, and Houghton FD. 2010. Hypoxia inducible factor regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. Reproduction. 139:85-97.
74. Friedlander RM. 2003. Mechanisms of disease apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. The New England Journal of Medicine. 1365-1375.
75. Mattson MP and Chan SL. 2003. Calsium orchestrates apoptosis. Nat Cell Biol. 5:1041-1043.
76. Yoon JG and Gores GJ. 2002. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. J. Hepatol. 37:400-410.
77. Emery E, Aldana P and Bunge MB. 1998. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. J. Neurosurg. 89:911-20.
78. Kermer P, Liman J, Weishaupt AH and Baer M. 2004. Neuronal apoptosis in neurodegenerative disease: from basic research to clinical aplication. Neurodegenerative Dis. 1:9-19.
79. Green DR and Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. Science. 281:1309-1312.
80. Lin JL, Wang MJ, Lee D, Liang CC, and Lin S. 2008. hypoxia inducible factor-1α regulates matrix metalloproteinase-1 activity in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. FEBS Letters. 582: 2615-2619.
81. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, and Blackstad M. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. J Clin Invest. 109:1291-1302.

82. Rizino A. 2009. Sox2 and OCT3/4: a versatile pair of master regolators that orchestrate the self renewal and luripotency of embryonic stem cells by functioning as molecular rheostats. NIH–PA Author Manuscript. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. I(2):228-236. Doi:10.1002/ wsbm.12.
83. Barria E, Mikels A, and Haas M. 2004. Maintenance and self-renewal of long-term reconstituting hematopoietic stem cells supported by amniotic fluid. Stem Cells Dev. 13(5):548-62.
84. Szablowska-Gadomska I, Zayat V, Buzanska L. 2011. Influence of low oxygen tension on expression of pluripotecy genes en stem cells. Acta Neuroiol Exp. 71: 86-93.
85. Yamanaka S. 2007. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. Cell Stem Cell Review. July:1. doi: 10.1016/ j.stem.2007.05.012.
86. Ogawa T, Ohmura M, Ohbo K. 2005. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. International Journal of Hematology. 82:381-388.
87. Jawa Pos. 2013. Yamanaka Penerima Nobel Terapi dengan Pemanfaatan Stem Cells. Halaman 3. Tanggal 3 Februari 2013.
88. Safitri E, Utama S, Bumi, RH. Prasetyo, Purwati and FA. Rantam. 2014. Quiescence Cells of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) by Hypoxic Preconditioning for Therapeutic of Testis Degeneration Cause by Protein Energy Manutrition. Global Challenges in Tropical Diseases: Bridging Gaps and Building Partnerships. March: 5-7 . Intercontinental Kuala Lumpur Malaysia.
89. Prasetyo, R.H., and 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 Pac. J. Reprod. 5(3):198-203.
90. Safitri E, Widiyatno, TV. and Prasetyo RH. 2016. Honeybee product therapeutic as stem cells homing for ovary failure. Vet World. 9(11): 1324-1330.
91. Safitri E, Widiyatno TH, Sandhika W. and Prasetyo RH. 2019. Effectivity of honey to regenerate the production of testosterone by induction of endogenous stem cells of rat with low libido due to malnutrition. Biocell. 43(4-1): 235-239 239.
92. Hasib A, Muhamad R, Reksa TY, Artha AU, Safitri E. 2017. Utilization of Sumbawa tropical forest honey Apis dorsata to improve fertility of Indonesai oriental magpie robin (Copsyhus saularis). KnE Life Sci. 619- 626.

5

APLIKASI MADU SEBAGAI AKTIVATOR *STEM CELLS*

APLIKASI MADU PADA BIDANG REPRODUKSI

Beberapa komponen bioaktif madu berkhasiat untuk berbagai kehidupan makhluk hidup baik bidang veteriner (kedokteran hewan) maupun kehidupan manusia, salah satunya yaitu bidang reproduksi. Pemanfaatan madu sebagai terapi dalam hal ini dikaitkan dengan teraktivasinya *stem cell* endogen yang ada di dalam tubuh. Aktivasi tersebut menyebabkan terjadinya proses mobilisasi atau tergeraknya *stem cell* dari sumbernya seperti *bone marrow* menuju tempat yang mengalami '*defect*' (kerusakan) baik pada ovarium sebagai organ reproduksi utama *female* maupun testis sebagai organ reproduksi utama pada *male*.

Aplikasi madu merupakan inovasi dalam upaya peningkatan jumlah *stem cell* dari dalam tubuh sendiri atau yang dikenal sebagai proses eksplorasi *stem cell* endogen. Eksplorasi ini dilakukan melalui inisiasi atau aktivasi *endogenous stem cell*. Program aktivasi *endogenous stem cell* dari dalam tubuh ini diupayakan untuk mendapatkan *stem cell* yang lebih banyak lagi jumlahnya dan dalam waktu yang cepat. Salah satunya melalui pemberian bahan alam atau sintetik

secara per oral. Salah satu bahan alami adalah berasal dari *bee product*, seperti madu. Melalui pemanfaatan madu ini diharapkan akan terjadi auto-regenerasi sel dari jaringan yang rusak (degeneratif) sehingga akan terjadi perbaikan (regeneratif) pada jaringan tersebut. Auto-regenerasi sel penyusun jaringan adalah melalui mobilisasi *stem cell endogen*, sehingga dapat terjadi dengan cepat dan dalam jumlah yang cukup disertai proses diferensiasi yang optimal sehingga terjadi regenerasi pada sel yang telah mengalami degenerasi (kerusakan).

1. Aplikasi Madu pada Reproduksi *Female*

Aplikasi madu merupakan inovasi dalam upaya peningkatan jumlah *stem cell* dari dalam tubuh sendiri termasuk pada organ reproduksi *female*. Aplikasi madu sebagai terapi dalam hal ini dikaitkan dengan teraktivasinya *stem cell* endogen yang ada di dalam tubuh. Aktivasi tersebut menyebabkan terjadinya proses mobilisasi atau tergeraknya *stem cell* dari sumbernya seperti *bone marrow* menuju tempat yang mengalami '*defect*' (kerusakan), dalam hal ini pada ovarium yang merupakan organ reproduksi utama *female.*

a. Aplikasi Madu, Mobilisasi, dan *Stem Cells Homing* pada *Ovary Failure*

Aplikasi pemanfaatan madu dalam hal ini jika dikaitkan dengan mobilisasi *stem cells endogen* yaitu dapat terjadi melalui proses *homing* pada *ovary failure*. Proses *homing* terkait bidang *stem cell* adalah suatu proses di mana *stem cell* dari sumbernya seperti *bone marrow* misalnya bergerak menuju "rumahnya" yaitu menuju jaringan yang mengalami gangguan atau kerusakan. Minat penelitian terkait *stem cell* pada saat ini dan beberapa dekade ke depan cenderung meningkat tajam.[1-3] *Stem cell* seperti diketahui memiliki harapan yang luar biasa, yaitu dapat digunakan sebagai terapi atau pengobatan pada berbagai macam penyakit. Terapi berupa transplantasi *stem cell* memberikan harapan baru dalam pengobatan berbagai penyakit termasuk infertilitas karena kondisi degeneratif ovarium yang tidak dapat disembuhkan melalui pengobatan biasa ataupun tindakan *operatif*.[3-7]

Namun demikian, dikarenakan sangat kompleksnya metode isolasi,[8] maupun tahapan kultur *in vitro*[9] serta mahalnya biaya proses transplantasi *stem cell*,[10] maka diperlukan suatu inovasi untuk terjadinya proses *homing* dari *endogenous stem cell* tanpa harus melakukan transplantasi secara eksogen. Inovasi ini terjadi *melalui* proses *automobilization* dari *stem cell* untuk bergerak menuju pada tempat yang mengalami *defect* atau kerusakan. Selanjutnya bagaimana aplikasi madu dapat meningkatkan respons imun[4,11,12] sehingga disertai juga terinduksinya diferensiasi *endogenous stem cell* menjadi sel yang dibutuhkan[11,13] akan diterangkan lebih lanjut.

Proses terjadinya *automobilisasi* dari *endogenous stem cell* (*stem cell* yang diproduksi di dalam tubuh) dan peningkatan respons imun disertai dengan diferensiasi *stem cells*, salah satunya dapat dicapai melalui konsumsi minuman dan makanan yang berasal dari berbagai bahan alam. Bahan alami tersebut salah satunya yang merupakan produk dari lebah.[3,4,11,14] Beberapa studi terbaru yang dapat diaplikasikan yaitu melalui pemberian madu, yang merupakan salah satu dari produk lebah.[3,4,11,15,16] Melalui pemberian produk lebah, seperti madu dikatakan dapat menyebabkan terjadinya proses *homing* dan diikuti terjadinya diferensiasi *stem cell* dari hewan coba dengan kondisi gangguan pada ovarium.[4,17] Proses *homing* dan diferensiasi *stem cell* yang berasal dari tubuh sendiri ini akan menyebabkan terjadinya proses regenerasi dan berkembangnya folikel-folikel yang ada pada ovarium.

Terjadinya proses regenerasi ovarium dapat dibuktikan, baik secara mikroskopik maupun secara molekuler.[13,18] Pada pengamatan secara histologis akan terlihat terjadinya proses regenerasi pada jaringan ovarium, sedangkan secara molekuler ada beberapa ekspresi secara imunohistokimia yang dapat diobservasi, yaitu seperti ekspresi CD34+ dan CD45+ yang merupakan marker dari *hematopoietic stem cells* (HSC),[4,19] termasuk juga ekspresi faktor *T-growth-factor* ß (TGF-ß),[11] faktor *vaskular endothelial-growthfaktor* (VEGF), *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF),[11,20,21] dan *growth-differentiation factor*-9 (GDF-9) dari ovarium.[20,21]

Suatu penelitian yang telah dilakukan oleh Safitri dkk pada tahun 2016[22] telah membuktikan bahwa penggunaan terapi madu yang diproduksi oleh lebah madu menyebabkan terjadinya *homing* atau tergeraknya *stem cell* menuju tempat yang *defect*. Hasil penelitian tersebut didasarkan pada terekspresinya VEGF dan G-CSF pada hewan coba. Selain itu juga didasarkan pada peningkatan dari jumlah folikulogenesis dan diferensiasi dari *stem cells* berdasarkan pada ekspresi GDF-9. Proses *homing* disertai diferensiasi ini menyebabkan terjadinya proses regenerasi dari ovarium yang mengalami degenerasi (kerusakan) didasarkan pada pengamatan secara histopatologis dengan pewarnaan H & E. Degenerasi ovarium yang terjadi pada penelitian tersebut yaitu dilakukan pada model tikus yang mengalami kekurangan gizi (malnutrisi).

Beberapa metode yang dilakukan pada penelitian Safitri dkk. (2016)[22] tersebut dilakukan melalui beberapa tahapan, seperti: membuat model degenerasi ovarium melalui proses malnutrisi. Malnutrisi sebagai penyebab terjadinya degenerasi ovarium pada betina tikus putih disebutkan pada penelitian tersebut dilakukan dengan cara memberikan pemuasaan terhadap pakan selama 5 hari secara berturut-turut dengan tetap diberikan minuman air *ad libitum* menggunakan botol minum khusus.[23] Hewan coba sebagai hewan model yang digunakan pada penelitian tersebut adalah tikus betina sehat, strain Wistar, umur dewasa kelamin, sekitar 12–14 minggu dan mempunyai berat badan sekitar 250–300 gram.[24] Lebih lanjut kondisi sehat dari hewan coba ditentukan berdasarkan kelincahan mereka dalam bergerak. Setelah tikus ditempatkan pada kandang plastik secara individual pada laboratorium hewan coba, Fakultas Kedokteran Hewan, Kampus C Universitas Airlangga, di mana kondisi laboratorium didukung ventilasi yang baik.

Dikatakan perlakuan pada penelitian tersebut terbagi menjadi 3 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdapat 15 ulangan. Kelompok kontrol negatif (T0–): yaitu tikus dengan *ovary* normal dan tanpa pemuasaan pakan serta tanpa produk *honeybee* (madu);

Kelompok kontrol positif (T0+): yaitu tikus dengan *ovary failure* (melalui pemuasaan selama 5 hari berturut-turut) dan tanpa produk *honeybee* (madu); Kelompok 1 (T1): yaitu tikus dengan *ovary failure* (melalui pemuasakan selama 5 hari), diberi 50% produk *honeybee* (madu) dalam air minum selama 10 hari setelah dipuasakan. Produk *honeybee* berupa madu yang digunakan pada penelitian tersebut berasal dari peternakan lebah yang berada di daerah Batu Malang Jawa Timur, Indonesia.

Pada penelitian tersebut dilakukan beberapa observasi, baik secara molekuler maupun histopatologisnya (HPA) pada jaringan ovarium. Observasi yang dilakukan berupa terjadinya *homing* dari *stem cell*, peningkatan proses folikulogenesis, diferensiasi dari *stem cell*, dan regenerasi dari jaringan ovari. Beberapa marker dari *stem cell* yang mengalami *homing* didasarkan pada ekspresi beberapa protein seperti VEGF dan G-CSF.[11,21] Peningkatan proses folikulogenesis diindikasikan dengan peningkatan ekspresi *follicle dee Graaf*.[25] Diferensiasi dari *stem cell* menjadi sel *progenitor* didasarkan ekspresi dari GDF-9 pada jaringan ovari menggunakan teknik immunohistokimia[20,21] dan regenerasi jaringan ovari diobservasi menggunakan pewarnaan rutin H&E.[26] Metode immunohistokimia (IHC) untuk observasi pada G-CSF, VEGF, dan GDF-9.

Observasi dengan metode IHC adalah untuk menentukan ekspresi dari beberapa marker seperti G-CSF, VEGF, dan GDF-9.[11,21,26] Langkah awal adalah dibuatnya beberapa sayatan pada jaringan ovari secara transversal pada *paraffin blocks*.[26] Teknik menggunakan monoklonal antibodi anti-G-CSF, anti-VEGF, dan anti-GDF-9. Observasi dari ekspresi G-CSF, VEGF, dan GDF-9 dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 200 kali. Ekspresi pada masing-masing variabel adalah diindikasikan dengan jumlah sel yang terwarnai *brownish* (kecoklatan) dengan menggunakan *DAB-chromogen* pada masing-masing *incision*.[26,27]

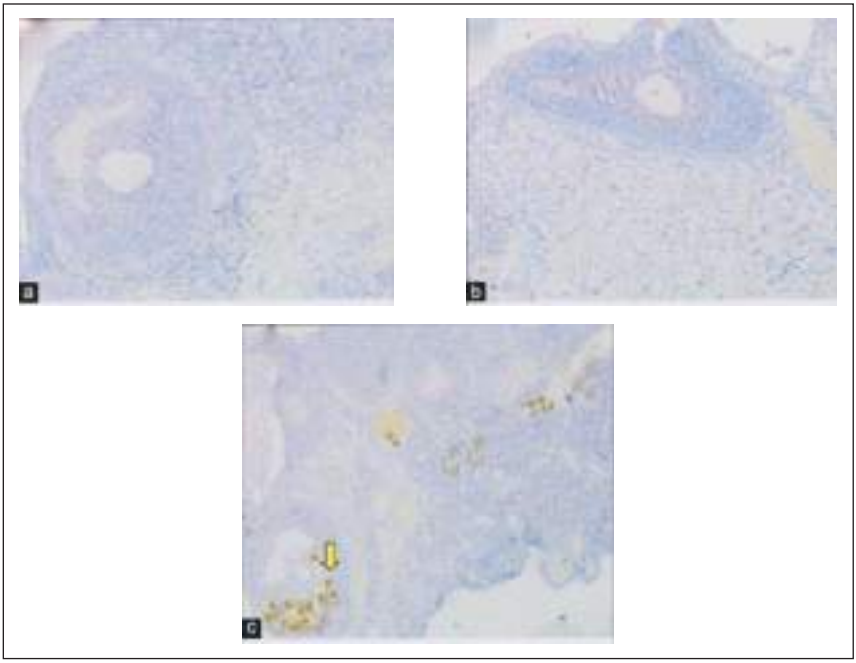
Observasi secara histolopatologi anatomi (HPA) dan perkembangan *follicle de Graaf* dan terjadinya regenerasi dari jaringan ovari dilakukan

dengan menggunakan mikroskop cahaya.[28] Persiapan pemeriksaan secara HPA dilakukan melalui tahapan sebagai berikut. Dilakukan fiksasi pada ovarium dari *rat* dalam 10% buffer formalin. Kemudian dilakukan dehidrasi berturut-turut dengan alkohol, dari prosentase 70, 80, 90, dan 96 (*absolute*). Pada *ovary rat* dilakukan *clearing* dengan cara dimasukkan dalam *xylene solution*. Selanjutnya jaringan diinfiltrasi dengan *embedding agent* (*liquid paraffin*). Dilakukan pemotongan menggunakan *microtome* yang dapat di-*setting* dengan ketebalan 4–6 µ, dan irisan diletakkan pada *object glass*. Kemudian dilakukan proses *embedding* menggunakan *paraffin wax* di luar jaringan dan memungkinkan pewarna larut air untuk menembus jaringan. Oleh karena itu, sebelum pewarnaan dapat dilakukan, *slide* "*deparaffinized*" dengan merendamnya melalui xilena ke alkohol ke air. Pewarnaan yang digunakan adalah dengan pewarnaan rutin H & E. Bagian yang terwarnai kemudian dilakukan *mounted* dengan Canada balsam dan diletakkan *coverslip* di atasnya.[26] Observasi dan identifikasi dari *follicle de Graaf* dan regenerasi ovarium didasarkan pada pengamatan secara histologis pada jaringan.[4,26]

Berdasarkan hasil analisis statistik, hasil penelitian tersebut menunjukkan ekspresi dari *follicle de Graaf* dan beberapa protein seperti G-CSF, VEGF, dan GDF-9 yang secara statistik dianalisis menggunakan SPSS 15 for Windows XP dengan tingkat signifikansi 0.05 (p=0.05) dan pada 99% (α=0.01) *confidence level*. Tahapan hipotesis komparatif tes adalah dilakukan sebagai berikut, uji normalitas data dengan tes Kolmogorof-Smirnov, homogenitas tes varians, analisis faktorial variance, dan tes *post-hoc* (*least significant difference test*) menggunakan Tukey HSD 5%.

Lebih lanjut hasil dan pembahasan pada penelitian tersebut dapat dijelaskan sebagai berikut. Koleksi data dari 45 betina *rat* yang terbagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (T0–) normal ovari tanpa diberi produk *honeybee* (madu); Kelompok kontrol positif (T0+) adalah *ovary failure* tanpa diberi produk *honeybee* (madu); (T1) group adalah *ovary failure* + 50% produk *honeybee* (madu) dalam air minum selama 10 hari. Secara terinci hasil penelitian tersebut adalah sebagai

berikut. Efektivitas dari produk *honeybee* (madu) didasarkan pada: (1) *Homing* dari *stem cells* didasarkan pada ekspresi VEGF dan G-CSF, (2) jumlah *follicle de Graaf*, (3) ekspresi GDF-9, serta (4) terjadinya regenerasi dari jaringan ovarium. *Homing* dari *stem cells* dianalisis dengan metode IHC didasarkan pada peningkatan ekspresi VEGF dan G-CSF. Hasil analisis menunjukkan bahwa: Tidak signifikan (p>0,05) perbedaan dari kelompok kontrol negatif (T0–) dengan kelompok (T0+), yang merupakan kontrol positif di mana *homing* dari *stem cell*, menunjukkan ekspresi VEGF dan G-CSF yang rendah (Gambar 5.1 dan Tabel 5.1).



Gambar 5.1 *Homing* dari *stem cells* didasarkan pada adanya ekspresi dari *vascular endothelial growth factor* (VEGF) pada jaringan ovarium tikus dengan metode immunohistokimia. (a) Kelompok kontrol negatif (T0–), dengan normal *ovary* tanpa produk *honeybee* (madu): Skor dari ekspresi VEGF = $0.45^{a} \pm 0.85$; (b) Kelompok kontrol positif (T0+), dengan ovary failure tanpa produk *honeybee*: Skor dari ekspresi VEGF = $0.25^{a} \pm 0.65$, (c) Kelompok T1, dengan *ovary failure* + 50% produk *honeybee* (madu) dalam air minum selama 10 hari: Skor ekspresi VEGF = $2.75^{b} \pm 0.55$. *Different superscripts* mengindikasikan *significant difference* pada p<0,05.[22]

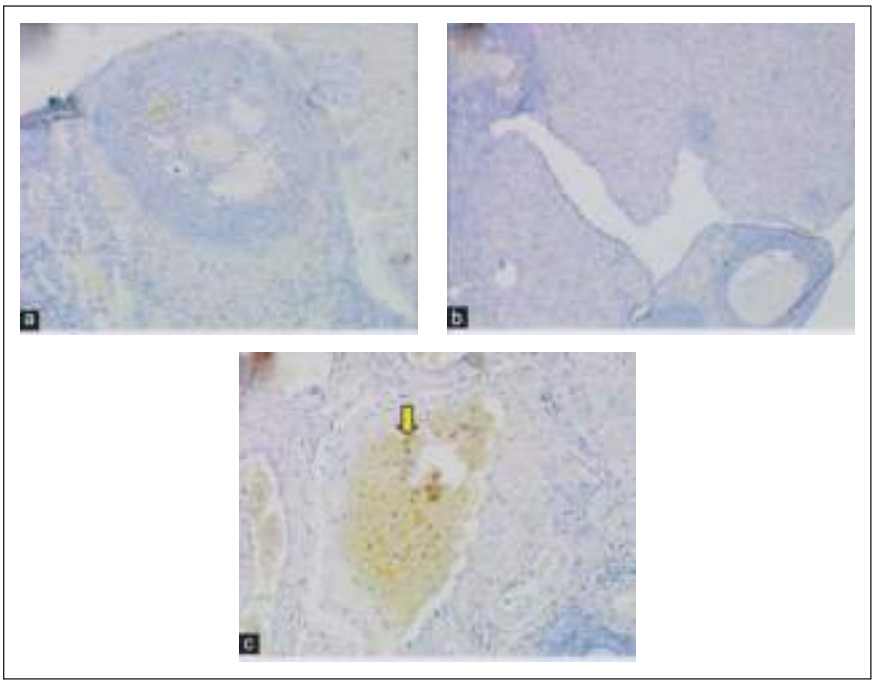
Tabel 5.1 Rerata ekspresi G-CSF, VEGF, and GDF-9 dengan pewarnaan jumlah *Folikel de Graaf*.[22]

Perlakuan	Skor ± SD			Rerata Jumlah Folikel de Graaf ± SD
	Rerata Ekspresi G-CSF	Rerata Ekspresi VEGF	Rerata Ekspresi GDF-9	
Kontrol Negatif (T0-) dengan Normal Ovari tanpa madu	0.75±0.35^{a}	0.45±0.85^{a}	2.95±0.41^{c}	7±0.85^{c}
Kontrol Positif (T0+): *Ovary failure* tanpa madu	0±0^{a}	0.25±0.65^{a}	0±0^{a}	0.75±0.125^{a}
Kelompok T1: *Ovary failure* + 50% madu dalam air minum selama 10 hari	2.95±0.43^{b}	2.75±0.55^{b}	2±0.45^{b}	5.416±0.807^{b}

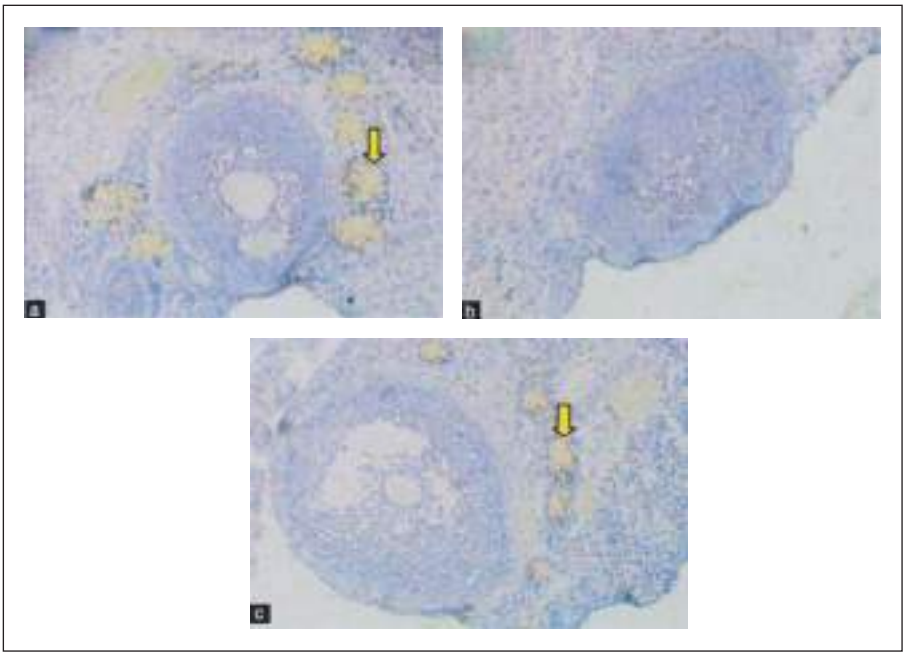
a,b,c *Skor* pada kolom sama dengan *superscripts* berbeda menunjukkan perbedaan signifikan (p<0,05), dengan ulangan sebanyak 15. G-CSF=*Granulocyte colony-stimulating factor*, VEGF=*Vascular endothelial growth factor*, GDF-9 = *Growth differentiation factor*-9.

Selanjutnya, peningkatan folikulogenesis berdasarkan ekspresi *Folikel de Graaf*, pada kelompok kontrol negatif (T0–) mempunyai jumlah = 7±0.845^{c}. Kelompok yang secara signifikan berbeda, tetapi tetap lebih tinggi daripada kelompok kontrol positif (T0+) dengan *ovary failure*, yang sama sekali tidak terkespresi (0±0^{a} dan ekspresi GDF-9 = 0%) (Tabel 5.1 dan Gambar 5.3). Pada penelitian tersebut, regenerasi dari ovari dapat diobservasi secara histologi dengan pewarnaan H & E. Pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa kelompok dengan *ovary failure* + 50% produk *honeybee* (T1) adalah kelompok yang mengalami perbaikan ovari terbaik. Perbaikan jaringan ditentukan dengan adanya regenerasi dari ovari di mana didalamnya terdapat pertumbuhan folikel yang normal. Pada kelompok ini menunjukan perbaikan yang dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (T0–) yang tidak mengalami *ovarian failure* dan tetap dalam kondisi normal dengan pertumbuhan folikel yang normal pula. Kerusakan pada jaringan dapat ditunjukkan pada kelompok kontrol positif (T0+) yang mengalami

degenerasi. Kelompok dengan *ovary failure* (T0+), menunjukkan terjadinya kongesti dan beberapa *hemorrhagie*, pembentukan hemosiderin granules akibat erythrolysis (berwarna *brownish yellow*) disertai adanya fibrosis yang mengindikasikan inflammasi kronis yang telah terjadi[29] (Gambar 5.4). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian 50% madu selama 10 hari pada perlakuan T1 dapat digunakan sebagai *treatment* pada betina tikus model dengan *ovary failure* yang disebabkan oleh malnutrisi.



Gambar 5.2 *Homing* dari *stem cells* didasarkan pada ekspresi *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) pada jaringan *ovary* tikus dengan metode immunohistokimia. (a) Kelompok kontrol negatif (T0–), dengan normal *ovary* tanpa produk *honeybee* : Skor dari ekspresi G-CSF = 0,75±0,35^{a}, (b) Kelompok kontrol positif (T0+), dengan *ovary failure* tanpa produk *honeybee* : Skor dari ekspresi G-CSF = 0±0^{a}, (c) Kelompok T1 = *ovary failure* + 50% produk dari *honeybee* dalam air minum selama 10 hari: Skor dari ekspresi G-CSF = 2,95±0,43^{b}. *Superscript* yang berbeda mengindikasikan *significant difference* pada $p<0.05$.[22]



Gambar 5.3 Ekspresi dari *growth differentiation factor*-9 (GDF-9) pada jaringan *ovary* tikus ditunjukkan dengan metode pewarnaan immunohistokimia pada beberapa perlakuan. (a) Kelompok kontrol negatif (T0–), dengan normal *ovary* tanpa produk *honeybee*: Skor dari ekspresi GDF-9 = 2,95±0,41^{c}, (b) Kelompok kontrol positif (T0+), dengan *ovary failure* tanpa produk dari *honeybee*: Skor pada ekspresi GDF-9 = 0±0^{a}, (c) Kelompok T1, *ovary failure* + 50% produk dari *honeybee* dalam air minum selama 10 hari: Skor dari ekspresi GDF-9 = 2±0.45^{b}. *Superscripts* yang berbeda mengindikasikan perbedaan yang signifikan pada $p<0.05$.[22]

Efektivitas dari produk *honeybee* didasarkan pada: (1) *Homing* dari *stem cells* (didasarkan pada ekspresi VEGF dan G-CSF); (2) Jumlah folikel de Graaf; (3) ekspresi GDF-9; (4) regenerasi jaringan ovari. *Homing* dari *stem cell* (didasarkan pada ekspresi VEGF dan G-CSF) menggunakan metode IHC.[11,21] Peningkatan jumlah folikel de Graaf mengindikasikan peningkatan folikulogenesis.[28] Diferensiasi dari *stem cells* menjadi *progenitor cells* dipresentasikan dengan ekspresi dari GDF-9 menggunakan teknik IHC pada jaringan ovari.[20,21,30] Regenerasi pada jaringan ovari

diobservasi dengan pewarnaan rutin HE.[4] *Homing* dari *stem cells* dapat ditunjukkan dengan terinduksinya *stem cells* untuk termobilisasi menuju area yang mengalami *defect*.[13,31] Mobilisasi dari *stem cell* menuju area yang *defect* untuk memperbaiki jaringan, dan setelah sel mengalami perbaikan, maka sel dari jaringan tersebut dapat berfungsi. Selain itu, sel-sel juga memiliki fungsi seperti sekresi mediator yang terlarut sehingga terjadilah kerja sama antara *stem cell* dengan sel yang termobilisasi dari *stem cell* eksogen yang memiliki efek parakrin.[21] Proses *homing* dapat juga terjadi dalam beberapa cara, di mana salah satunya adalah peningkatan respons imun yang disebabkan oleh reaksi inflamasi karena sinyal injuri *seperti cytokines, nuclear factor* κ*B, Wnt through* β *catenin* yang berasal dari jaringan yang mengalami kerusakan.[22,26] Pada penelitian tersebut, *injury* yang terjadi adalah akibat sinyal malnutrisi menyebabkan peningkatan *cytokines*, sehingga perubahan jaringan ovarium sebagai jaringan utama sistem reproduksi *female* tak bisa terelakkan.[27] Beberapa sitokin yang menginduksi *stem cell* untuk bermigrasi dan *homing* pada area *injury*, pada penelitian tersebut adalah VEGF dan G-CSF.[21]

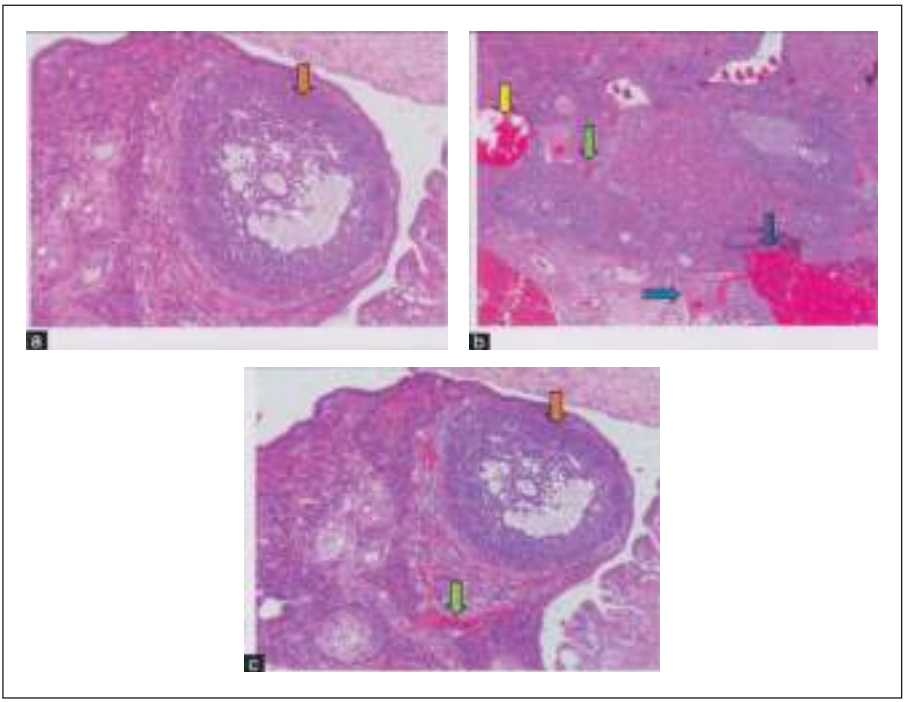
Mekanisme *homing* dimulai dari HSC keluar dari sumsum tulang melalui *chemokine receptor* (CCXR4) untuk menemukan faktor sinyal *homing* dari stromal-derived faktor 1 (SDF1).[4] Selanjutnya, osteoblas (*progenitor* sel) dalam protein adhesi sel (protein adhesi sel), antara lain VICAM. Selanjutnya, G-CSF merangsang peningkatan neutrofil di sumsum tulang dan kemudian meningkatkan sel-sel darah. Peningkatan neutrofil akan menghasilkan *enzim protease* termasuk kerusakan protein *catalase* untuk *homing signal* dari *stem cell* seperti SDF1 dan VICAM yang selanjutnya menyebabkan sel induk keluar dari sumsum tulang. Selanjutnya, *quiescent stem cells* keluar dan menuju ke dalam aliran darah. Peran madu yang diberikan secara oral dalam penelitian tersebut menyebabkan peningkatan G-CSF.[21] Selanjutnya, terjadilah perbaikan jaringan ovarium berdasarkan ekspresi GDF-9 (Tabel 5.1). GDF-9 adalah suatu *progenitor cells* dari *stem cells germline*[22] yang akan menstimulasi proliferasi sel dari korteks ovari.[32] Kelompok T1 dengan *ovary failure*

+50% produk *honeybee* mempunyai *score* ekspresi GDF-9 = 2±0.43^{b}. Meskipun skor tersebut di bawah kelompok egativ egative (T0–) yang secara signifikan berbeda ($p<0.05$) dengan skor 2.95±0.41^{c}, tetapi skor tersebut masih di atas kelompok *ovary failure* tanpa produk *honeybee* (T0+) yang menunjukkan tidak ada ekspresi sama sekali (0±0^{a}) (Tabel 5.1 dan Gambar 5.3). Hasil ini sesuai dengan pendapat beberapa peneliti bahwa produk *honeybee* menyebabkan *stem cell* berkembang dengan cepat dan mengalami diferensiasi menjadi sel yang dibutuhkan sebagai respons dari *injury* dan peningkatan pada respons imun.[33]

GDF-9 adalah *growth factor derived* dari TGF-ß *family* yang diproduksi oleh oosit. GDF-9 adalah faktor krusial pada folikulogenesis dan *fertility*.[34] Selanjutnya, progenitor *germ cells* akan memperbaiki kerusakan *folikel* dan juga dapat memperbaiki *molecular communication* pada *ovarian follicles* melalui peningkatan produksi SCF dan GDF-9, sehingga dapat untuk mengatasi masalah folikulogenesis akibat malnutrisi.[21] Proses *homing* akan mengaktivasi oogenesis baik secara langsung maupun tidak secara langsung. Secara langsung yaitu melalui aktivasi dari sel dan akan secara tidak langsung menstimulasi *microenvironment* (*niche*) dari sel yang mengalami kerusakan.[35]

Regenerasi dari jaringan ovari ditunjukkan pada ovari yang *intact* dengan pertumbuhan folikel yang juga sebagai identifikasi efektivitas dari penggunaan produk *honeybee*. Pada penelitian tersebut, regenerasi dari ovari dapat diamati secara mikroskopis dengan pewarnaan HE.[31,36] Pengamatam mikroskopis menunjukkan bahwa pemberian 50% produk *honeybee* pada kelompok perlakua T1, menyebabkan terjadinya perbaikan jaringan ovarium. Perbaikan dapat diidentifikasi berdasarkan pada regenerasi dari ovari dengan *growing follicles*. Perbaikan ini dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (T0–) yang tidak mengalami *ovarian failure* dan tetap dalam kondisi normal dengan *growing follicles* (Gambar 5.4). Gambaran abnormal dari kerusakan ovari dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (T0+), tikus

dengan degenerasi ovari. Lebih lanjut menunjukkan kongesti dan ada beberapa *hemorrhagie* dan hemosiderosis (*yellow-brown color*) akibat hemolisis dari sel darah merah dengan deposisi fibrin, mengindikasikan kongesti kronis telah terjadi (Gambar 5.4).



Gambar 5.4 Regenerasi dari jaringan *ovary* diamati secara mikroskopis dengan pewarnaan *hematoxylin and eosin* (HE) pada jaringan ovary tikus pada beberapa perlakuan. (a) Kelompok kontrol negatif (T0–), dengan normal *ovary* tanpa produk *honeybee* menunjukkan pertumbuhan *follicles* (⇩); (b) Kelompok *ovary failure* (T0+), kongesti pada *ovary* (⇩), dan beberapa *hemorrhage* (⇩), juga terjadi hemosiderin (⇩) akibat lisisnya sel darah (*brownish yellow color*) dengan deposisi dari fibrin (⇩) mengindikasikan bahwa telah terjadi kongesti yang khronis, (c) Kelompok *ovary failure* +50% produk *honeybee* (T1), *ovary* mulai mengalami regenerasi terlihat *intact*, meskipun masih ada sedikit *hemorrhage* dan kongesti pada beberapa area, tetapi sudah terlihat pertumbuhan *follicles* (⇩).

Kesimpulan dari penelitian tersebut menyatakan bahwa 50% produk *honeybee* selama 10 hari pada betina tikus dengan *ovary failure* berdasarkan: (1) *Homing* dari *stem cell*, berdasarkan ekspresi dari marker VEGF dan G-CSF yang diekspresikan pada jaringan ovari dengan metode IHC; (2) peningkatan dari folikulogenesis diindikasikan dengan peningkatan jumlah *follicle de Graaf*; (3) peningkatan ekspresi GDF-9 pada jaringan ovari dengan pewarnaan IHC; (4) regenerasi dari jaringan ovari diindikasikan dengan *intact*-nya jaringan ovari dengan *growing follicles*; meskipun ada sedikit *hemorrhagie* dan kongesti, namun hemosiderin granules dan deposisi fibrin tidak terjadi.

b. Aplikasi Madu, Regenerasi Intestinal, dan *Ovary* pada Kondisi *Protein Energy Malnutrition* (PEM)

Aplikasi madu dalam hal ini dikaitkan dengan terjadinya proses regenerasi dari jaringan intestinal dan ovari yang mengalami degenerasi berupa kerusakan sel penyusun organ baik intestinal maupun ovari. Degenerasi kedua organ tersebut dapat terjadi akibat kondisi *protein energy malnutrition* atau disingkat PEM. *Protein energy malnutrition* atau PEM merupakan salah satu penyebab terjadinya *immune deficiency*. *Immune deficiency* pada kondisi PEM menyebabkan penurunan jumlah sel imun seperti B-IgA+, populasi dari CD4+, T-CD5+, CD8α+, CD8β+, TCRαβ+, dan TCRyo pada *intraepithelial villi intestine* dan lamina propria.[37] *Protein energy malnutrition* (PEM) dapat menyebabkan *macrophage dysfunction*.[38] Selain itu, kondisi PEM adalah penyebab utama dari *secondary immune deficiency*,[39] sehingga membuka peluang *opportunistic infections incidence* dari intestinal parasit seperti *Cryptosporidium*.[40–45] Di negara *United States* dan *Western Europe*, prevalensi cryptosporidiosis pada pasien dengan *immune deficiency* adalah sekitar 10–20%, dan pada negara sedang berkembang seperti Afrika dan Amerika Latin mencapai 50%.[40] Sampai saat ini, defisiensi pada anak-anak meningkatkan mortalitas akibat *diarrheal diseases*. Jawa Timur, menurut hasil survei Kementerian dan Kesehatan Direktorat Bina Gizi Masyarakat,

menyebutkan bahwa termasuk katagori tertinggi untuk kasus PEM pada tahun 2005. Pada tahun 2009, Jawa Timur menduduki posisi teratas kasus nasional gizi buruk. Tahun 2016, jumlah pasien PEM di bawah 5 tahun di Jawa Timur mencapai 2,5% dari 3,1 juta jiwa, yaitu mencapai 77.500. Bahkan jumlah kekurangan nutrisi anak-anak di bawah 5 tahun jauh lebih tinggi yaitu 17% dari total anak, tepatnya 527.000 anak.[46] Pada hewan coba yang telah mencapai usia pubertas, malnutrisi energi protein menyebabkan terjadinya degenerasi testis dan juga ovarium sehingga menyebabkan hewan menjadi infertil.[47] Sementara itu, ketertarikan pemanfaatan terapi *stem cell* saat ini dan beberapa dekade ke depan sangat meningkat tajam. Hal ini dikarenakan potensi dari *stem cell* sangat menjanjikan penggunaannya sebagai pengobatan pada beberapa kasus penyakit. Transplantasi *stem cell* memberikan harapan baru pada pengobatan berbagai kasus penyakit termasuk *immune deficiency diseases* dan *infertility* akibat kondisi degeneratif dari gonad yang tidak dapat ditangani baik dengan tindakan medis ataupun operatif.[48–51] Namun demikian, akibat kompleksitas dari metode isolasi, kultur *in vitro* disertai proses transplantasi *stem cell* yang membutuhkan biaya yang tinggi, membutuhkan suatu inovasi dalam upaya terjadinya automobilisasi dan peningkatan respons *immune* disertai dengan diferensiasi dari endogen *stem cell* tanpa melalui proses transplantasi. Automobilisasi dan peningkatan respons imun disertai diferentiasi dapat dicapai melalui pemberian minuman atau makanan yang bersumber dari bahan alami.[50]

Pada penelitian yang dilakukan oleh Prasetyo dan Safitri (2016)[52] tercapai ekspekstasi terjadinya *auto-mobilisasi* dan peningkatan repons *immune* disertai diferensiasi dari hewan coba dengan kondisi degenerasi *intestine* dan ovari.[53] Terjadinya *auto-mobilisasi* dan peningkatan respons *immune* dan diferensiasi dari *stem cells* yang berasal dari tubuh sendiri akan menyebabkan terjadinya regenerasi dari lamina propria dan *epithelial intestinal villi* dan *follicle* serta korpus luteum pada *ovary*. Penelitian tersebut membuktikan bahwa penggunaan terapi madu yang

diproduksi oleh lebah menyebabkan terjadinya regenerasi dari ovari. Regenerasi dapat dibuktikan baik secara histopatologi anatomi maupun molekuler. Secara histopathologi terjadi regenerasi dari intestinal dan jaringan ovari. Secara molekuler terbukti melalui beberapa ekspresi protein seperti ekspresi dari CD34+ dan CD45+ yang merupakan penanda dari *hematopoietic stem cells* (HSCs) yang termobilisasi dari sumbernya menuju tempat yang mengalami *defect* (*intestine* dan ovari), HSP70 dan PGE2 dari jaringan intestinal, dan ekspresi dari *growth differentiation factor*-9 (GDF-9) pada jaringan *ovary*.[54]

Metode yang dilakukan pada penelitian tersebut dapat dijelaskan melalui beberapa tahapan, yaitu: PEM Model Kasus Degenerasi Intestinal dan *Ovary***,** penelitian ini dimulai dengan pemodelan PEM pada hewan coba sebagai penyebab degenerasi *intestine* dan *ovary* pada tikus betina, yaitu dengan cara dipuasakan selama 5 hari tanpa diberi makan, hanya air minum setiap 8 jam per sonde.[46] Hewan coba yang digunakan pada penelitian tersebut adalah tikus putih (rat) strain Wistar dengan umur 10–12 minggu dan berat badan sekitar 200–250 g, kondisi sehat dengan karakterisasi bergerak aktif. Tikus putih diletakkan pada kandang plastik individual di laboratorium hewan coba di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dengan ventilasi yang baik dan mendukung.

Perlakuan pada penelitian tersebut dilakukan melalui pembagian menjadi 4 kelompok, dengan banyaknya ulangan masing-masing sebanyak 6 ekor: Kelompok kontrol negatif (T0–): tikus sehat tidak dipuasakan dan juga tanpa diberi madu; Kelompok kontrol positif (T0+): tikus dipuasakan selama 5 hari dan juga tanpa diberi madu; Kelompok perlakuan pertama (T1): adalah tikus dipuasakan selama 5 hari, kemudian diberi madu sebanyak 30% (v/v) di dalam air minum selama 5 hari; Kelompok perlakuan kedua (T2): adalah tikus dipuasakan selama 5 hari, kemudian diberi madu 50% (v/v) dalam air minum selama 5 hari.

Selanjutnya dilakukan observasi terjadinya mobilisasi dari HSCs dengan metode *Flowcytometry* berdasarkan pada ekspresi dari CD34+ dan CD45+. Setelah perlakuan pemodelan PEM pada hewan coba dan dibandingkan dengan pemberian madu, kemudian dilakukan pengukuran *whole blood* dari hewan coba sebagai sampel yang diambil melalui *cardiac puncture* dan dimasukkan dalam *heparin tube* untuk mencegah koagulasi. Kemudian observasi dilakukan pada ekspresi beberapa *cluster differentiation* seperti CD34+ dan CD45+ dengan metode *flowcytometry*. Metoda *Flowcytometry* ini dilakukan dengan diawali preparasi dari sentrifugasi *whole blood* pada temperature 4 derajat Celsius, dengan kecepatan 6 000 r/min selama 15 menit. Hasil sentrifugasi *cell* dalam bentuk *sludge mixed* dengan *cytoperm/cytofix* sebanyak 2 kali, jumlah *cell* kemudian diobservasi. Proses sentrifugasi pencampuran antara *cell* dan *cytoperm/cytofix* didapatkan supernatant dan pellet. BD kemudian ditambahkan untuk mencuci pelet sebanyak 4 kali, selanjutnya jumlah dari sel didapatkan pada centrifugasi pertama. Selanjutnya ditambahkan *lysis buffer* sebanyak 2 kali jumlah sel yang didapatkan. Setelah itu ditambahkan label *antibody conjugate* pada masing-masing sampel, 5 tabung (tube) disiapkan dan diproses secara pararel. (1) *Single staining* atau pewarnaan tunggal dengan CD34 PE ditambahkan pada *wash tube*. (2) *Double staining* yaitu dengan CD34 PE, CD45 PerCP dan CD44 FITC *wash tube*. (3) *Double staining* berikutnya dengan CD34 PE dan CD45 PerCP *trucount tube*. Masukkan sampel kemudian disimpan pada 4°C pada kondisi gelap dan selanjutnya dianalisis menggunakan *flowcytometry* dalam waktu 1 jam.[54]

Berikutnya adalah observasi dari ekspresi HSP70, PGE2, dan GDF-9 dengan metode *Immunohistochemical* (IHC). Sebelum dilakukan metode IHC dibuat preparat histologi, dengan cara dilakukan pembuatan sayatan secara transversal dari jaringan *intestine* dan *ovary* yang sudah dalam bentuk *paraffin blocks*. Kemudian pengamatan dibuat dengan Teknik IHC menggunakan *monoclonal antibodies*. Teknik ini dapat menentukan expresi dari HSP70, PGE2 dan GDF-9. Observasi dari

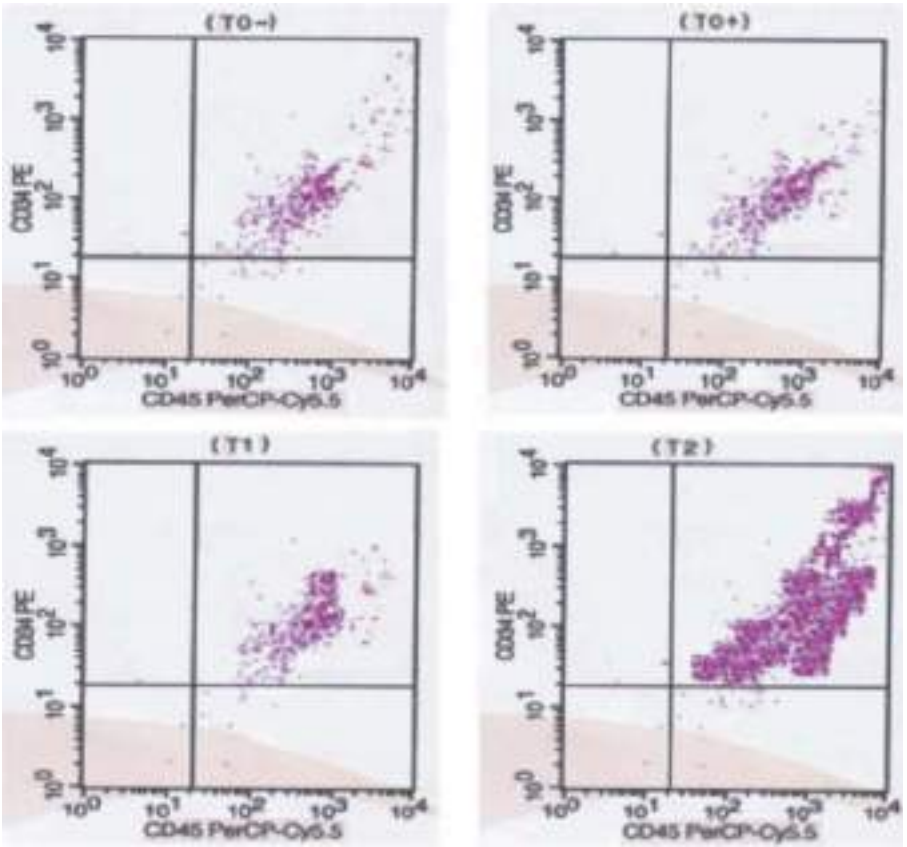
HSP70, PGE2 dan GDF-9 dilakukan dengan menggunakan *microscope* cahaya dengan pembesaran 200 times dan ekspresi masing-masing variabel adalah diindikasikan dengan jumlah dari *cell* dengan *brownish discoloration chromogen* pada masing-masing incisi.[55]

Observasi terjadinya regenerasi dari jaringan intestine dan o*vary* dilakukan secara Histopathology Anatomy (HPA). Pemeriksaan histopathology anatomi (HPA) diawali dengan membuat preparat histologi. Preparat histologi dibuat dengan cara sebagai berikut: jaringan *intestine* dan ovarium difiksasi dalam 10% buffer formalin. Kemudian, jaringan intestine dan *ovary* didehidrasi dalam larutan alkohol dengan konsentrasi meningkat dari 70%, 80%, 90%, 96% (*absolute*). Kemudian dilakukan *clearing* intestine dan ovarium tersebut dalam *xylol solution* atau *chloroform* atau *benzene*. Selanjutnya dilakukan *embedding* menggunakan *liquid paraffin* dan intestine serta ovarium diletakkan dalam *molds containing liquid paraffin*. Sebelum diwarnai dan dilakukan irisan menggunakan *microtome* dan *mounted* pada *glass objects*. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan menghilangkan parafin dengan *xylol* kemudian diletakkan dalam *alcohol solution* dengan konsentrasi menurun dan kemudian diletakkan dalam bahan pewarna. Tahap akhir setelah pewarnaan adalah dilakukan *mounting*, letakkan dalam air atau alkohol untuk menghilangkan kelebihan pewarnaan. Selanjutnya letakkan pada larutan alkohol dengan konsentrasi meningkat, dan dimasukkan dalam xylol. Preparat kemudian ditutup dengan *cover glass* dan *mounted* dengan Canada balsam.[56] Setelah preparat HPA dibuat, pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 200 kali. Observasi mengidentifikasi dari regenerasi jaringan ovarium adalah didasarkan pada deskripsi histologis yang tampak.

Selanjutnya pelaksanaan analisis statistik dari ekspresi CD34, CD45, HSP70, PGE2, dan GDF-9 secara statistik dianalisis menggunakan SPSS 15 Windows XP pada level signifikansi 0.05 dan *confidence level* 99% (α = 0.01). Tahap *test comparative hypothesis* adalah sebagai berikut: *test data normality* dengan *Kolmogorov–Smirnov test* dan *homogensity*

of variance test selanjutnya dilakukan *Analysis of variants* (ANOVA) factorial dan terakhir signifikansi melalui *post hoc test* menggunakan *Least Significant Difference test* yaitu Tukey HSD 5%.

Hasil penelitian yang dapat ditunjukkan adalah berdasarkan data yang telah dikoleksi dari 24 tikus betina yang dibagi menjadi 4 perlakuan: Kelompok kontrol negatif (T0–) adalah normal *intestine* dan *ovary* tanpa pemberian madu; Kelompok kontrol positif (T0+) adalah degeneratif *intestine* dan *ovary* tanpa pemberian madu; (T1) adalah kelompok dengan degeneratif *intestine* dan *ovary* serta diberi 30% (v/v) madu dalam air minum selama 5 hari; (T2) kelompok dengan degeneratif intestine dan *ovary* serta diberi 50% (v/v) madu dalam air minum selama 5 hari. Secara detail, hasil dari penelitian tersebut adalah dapat dijelaskan sebagai berikut: Efektivitas madu sebagai terapi didasarkan pada: mobilisasi dari *endogenous stem cells* (HSCs), dan ekspresi dari HSP70, PGE2 dan GDF-9 serta terjadinya regenerasi dari jaringan intestine dan ovarium. Mobilisasi dari HSCs dianalisis denga *flow cytometry* didasarkan pada peningkatan konsentrasi dari CD34 dan CD45. Hasil Analisa menunjukkan bahwa: masing-masing kelompok kontrol negatif (T0–), kelompok kontrol positif (T0+) atau kelompok (T1) menunjukkan tidak ada mobilisasi dari HSCs, didasarkan pada persentase dari CD34 dan CD45 yang menunjukkan prosentase kurang dari 25% (Gambar 5.5A, B, dan C), di mana pada kelompok (T2) menunjukkan terjadinya mobilisasi dari HSCs didasarkan pada persentase dari CD34 dan CD45 yang mempunyai prosentase lebih dari 70% (Gambar 5.5.B). Berdasarkan perhitungan statistik, kelompok T2 adalah berbeda secara signifikan ($P < 0.05$) dibanding 3 perlakuan yang lain (T0–, T0+ dan T1), di antara ketiga perlakuan tersebut tidak berbeda secara signifikan ($P > 0.05$) (Tabel 5.2). Selanjutnya, peningkatan dari *repons immune* didasarkan pada ekspresi HSP70, pada kelompok normal (T0–) dengan skor 0.17 ± -0.78 (ekspresi HSP70 di antara 1% dan 5%). Pada kelompok degeneratif intestine (T0+) dengan skor 2.83 ± 0.45 (ekspresi HSP70 > 0.50%). Kelompok 30% (v/v) madu (T1) dengan



Gambar 5.5 Analisis *Flowcytometry* dari mobilisasi *stem cell* endogen. A. Kelompok kontrol negatif (T0–): ekspresi CD34 dan CD45 = 22.33 ± 1.35; B. Kelompok kontrol positif (T0+): ekspresi CD34 dnd CD45 = 23.66 ± 1.37; C. Kelompok T1: ekspresi = CD34 dan CD45 = 24.83 ± 1.39; D. Kelompok T2: ekspresi CD34 dan CD45 = 74.83 ± 1.87.

skor 2.33 ± 0.37 (ekspresi HSP70 di antara 25%–50%). Kelompok menggunakan 50% (v/v) madu (T2) dengan skor 0.67 ± –0.18 (ekspresi HSP70 di antara 6% dan 25%) (Tabel 5.2). Lebih lanjut, peningkatan *respons immune* didasarkan pada ekspresi PGE2, pada kelompok normal (T0–) dengan skor 1.00 ± 0.00 (ekspresi PGE2 di antara 6% dan 25%). Kelompok degeneratif intestine (T0+) dengan skor 0.17 ± –0.78 (ekspresi PGE2 di antara 1% dan 5%). Kelompok menggunakan 30% (v/v) madu

(T1) dengan skor 0.33 ± –0.48 (ekspresi PGE2 di antara 1% dan 5%). Kelompok menggunakan 50% (v/ v) madu (T2) dengan skor 2.83 ± 0.45 (ekspresi PGE2 > 50%) (Tabel 5.2). Perlakuan madu pada penelitian tersebut membuktikan peningkatan *respons immune* dan motilitas intestine melalui penurunan ekspresi Hsp70 dan peningkatan ekspresi PGE2 pada jaringan intestine.

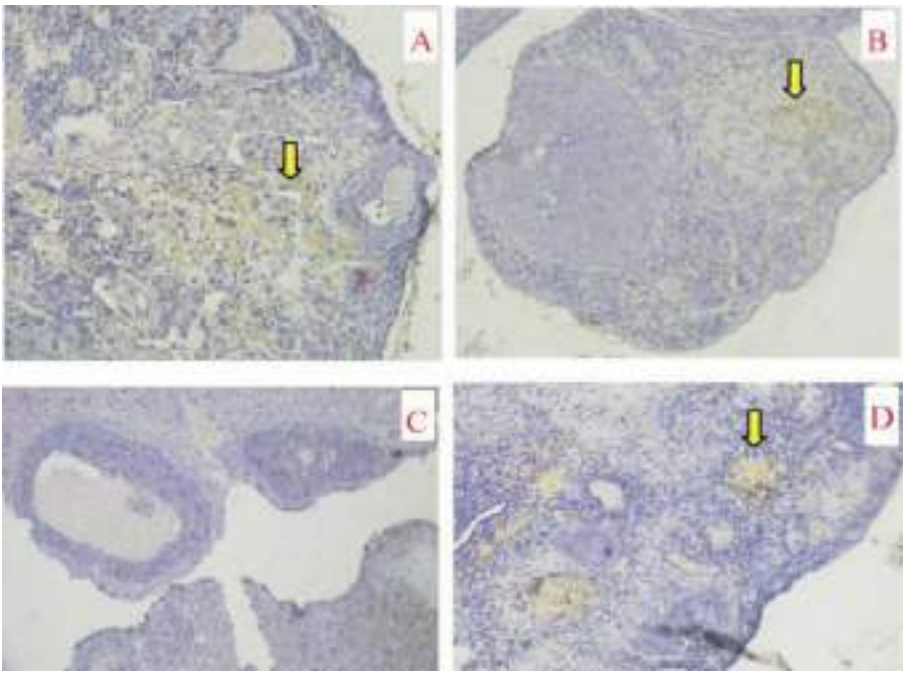
Tabel 5.2 Rerata Persentase CD34 dan CD45 dengan *flocytometry*, ekspresi skor Hsp70, PGE2, dan GDF-9 dengan metode imunohistokimia.

Perlakuan	Rerata CD34 & CD45 (%) ±SD	Rerata Skor Ekspresi HSP70 ±SD	Rerata Skor Ekspresi PGE2 ±SD	Rerata Skor Ekspresi GDF-9 ±SD
Kontrol Negatif (T0-) dengan *intestine* dan ovarium normal, tanpa madu	22.33 ± 1.35[a]	0.17 ± 0.78[a]	1.00 ± 0.00[b]	2.83 ± 0.40[c]
Kontrol Positif (T0+) dengan degeneratif intestine dan ovarium, tanpa madu	23.66 ± 1.37[a]	2.83 ± 0.45[b]	0.17 ± -0.78[a]	0.00 ± 0.00[a]
Kelompok T1 : degeneratif *intestine* & ovarium + 30% madu dalam air minum selama 5 hari	24.83 ± 1.39[a]	2.33 ± 0.37[b]	0.33 ± -0.48[a]	0.33 ± -0.48[a]
Kelompok T21 : degeneratif *intestine* & ovarium + 50% madu dalam air minum selama 5 hari	74.83 ± 1.87[b]	0.67 ± -0.18[a]	2.83 ± 0.45[c]	2.00 ± 0.00[b]

[a,b,c] *Superscript* berbeda pada kolom sama mengindikasikan perbedaan yang signifikan p<0.005.

Efektivitas dari terapi madu juga didasarkan pada ekspresi GDF-9 sebagai hasil dari diferensiasi dari sel *progenitor*. Ekspresi GDF-9 pada kelompok penggunaan 50% (v/v) madu (T2) adalah dengan skor 2.00 ± 0.00 (ekspresi GDF-9 antara 25% dan 50%) (Gambar 5.6.D). Meskipun nilai skor di bawah kelompok kontrol negatif (T0–) yang

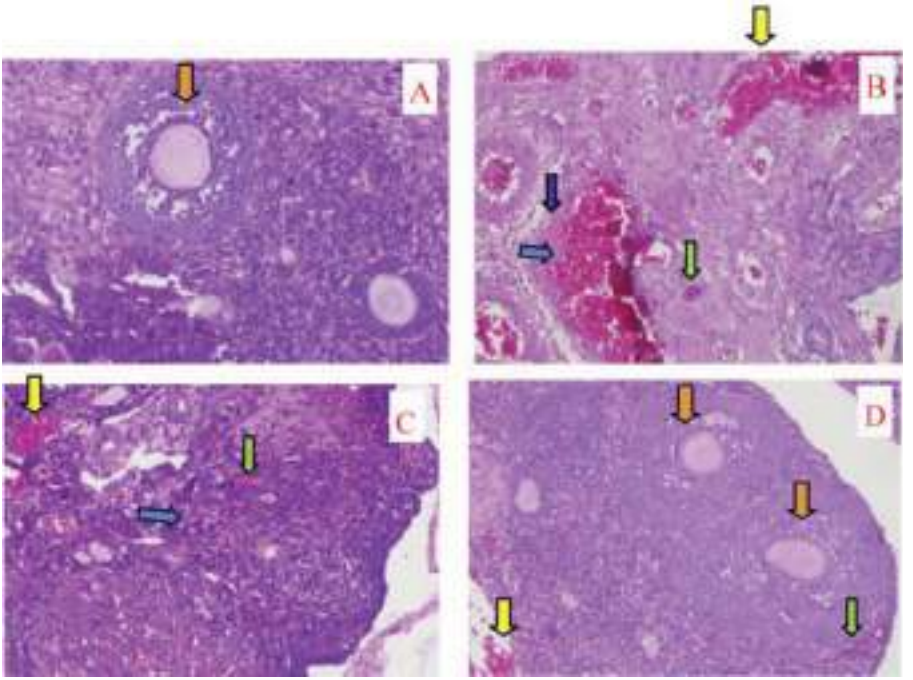
mempunyai skor 2.83 ± 0.43 (ekspresi GDF-9 > 50%) (Gambar 5.6.A), tetapi skor persentasi tersebut masih lebih tinggi dibanding kelompok menggunakan 30% (v/v) madu (T1) yang mempunyai skor 0.33 ± −0.48 (ekspresi GDF-9 antara 1% dan 5%) (Gambar 5.6.C) sedangkan kelompok dengan degeneratif ovarium (T0+) tidak terekspresi = 0.00 ± 0.00 (ekspresi GDF-9 = 0%) (Gambar 5.6 dan Tabel 5.2). Pada penelitian tersebut, regenerasi dari ovarium dapat diobservasi melalui metode *histopathology* dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE). Pengamatan mikroskopik menunjukkan bahwa kelompok 50% madu (T2), menyebabkan terjadinya perbaikan jaringan ovarium. Perbaikan dapat diidentifikasi berdasarkan pada regenerasi dari ovarium disertai



Gambar 5.6 GDF-9 *expression* pada jaringan *ovary* tikus menggunakan metode immunohistokimia pada beberapa perlakuan. A. Normal kontrol group (T0−), skor ekspresi GDF-9 = 2.83 ± 0.43; B. Kelompok menggunakan 30% madu (T1), skor ekspresi GDF-9 = 0.33 ± −0.48; C. Kelompok degenerasi ovarium (T0+), skor ekspresi GDF-9 = 0.00 ± 0.00; D. Kelompok menggunakan madu 50% (T2), skor ekspresi GDF-9 = 2.00 ± 0.00.

dengan ekspresi *growing follicle*. Gambaran umum dari perbaikan ini dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (T0–) yang memang tidak terekspresi degenerasi dari ovarium, dimana memang berada pada kondisi normal dengan ekspresi *growing follicle*. Pada kelompok 30% (v/v) madu (T1) tidak terindikasi terjadinya perbaikan jaringan ovarium. Tidak terjadi perbaikan bentuk ovarium tidak *intact* lagi (*damage*). Gambar kerusakan dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (T0+), di mana terjadi degenerasi ovarium. Kelompok degenerasi ovarium (T0+), terlihat ovarium mengalami kongesti dan hemorrhagi yang *extensive*, juga terjadi hemosiderin akibat lisisnya sel darah (*brownish yellow color*) disertai dengan deposisi fibrin yang mengindikasikan terjadi kongesti yang kronis. Kelompok menggunakan 30% (v/v) madu (T1), *ovary* tidak mengalami regenerasi, menunjukkan ada kongesti dan juga terekspresi hemosiderin dan terdapat hemorrhagi yang luas (Gambar 5.7).

Berdasarkan hasil dari penelitian tersebut dapat dibuktikan bahwa pemberian 50% (v/v) madu selama 5 hari (T2) dapat digunakan untuk terapi pada betina tikus model PEM. Efektivitas dari terapi madu didasarkan pada: mobilisasi dari *stem cell* endogen (HSCs), ekspresi HSP70, PGE2, dan GDF-9, dan regenerasi dari jaringan intestine dan *ovary*. Mobilisasi dari *stem cell* endogen dapat terjadi akibat terinduksinya *stem cell* sehingga terjadi mobilisasi menuju tempat yang *defect*. Proses dari mobilisasi dapat terjadi melalui beberapa cara, salah satunya melalui peningkatan respons *immune* yang terinduksi oleh reaksi inflamasi akibat sinyal *injury* (Cytokines, NFkB, Wnt melalui β catenin) dari jaringan yang rusak.[57] Pada penelitian tersebut, *injury* akibat sinyal malnutrisi menyebabkan peningkatan pada HSP70 dan penurunan PGE2 sehingga kerusakan pada jaringan intestinal tidak dapat dihindari. Kerusakan pada jaringan intestinal adalah penyebab terganggunya penyerapan makanan yang dibutuhkan oleh semua jaringan tubuh termasuk *ovary* sebagai jaringan utama dari reproduksi betina.[58] Kondisi ini membutuhkan perbaikan, khususnya perbaikan pada jaringan intestinal sebagai



Gambar 5.7 Regenerasi dari jaringan ovarium tikus melalui metode *immunohistopathology anatomy* (HPA) dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE) pada beberapa perlakuan. A. Kelompok control normal (T0–), yang menunjukkan *growing follicle* (⇩); B. Kelompok degeneratif ovarium (T0+), terlihat kongesti dari ovarium (⇩) dan hemorrhagi yang luas (⇩), juga terdapat hemosiderin (⇩) akibat lisis nya sel darah (*brownish yellow color*) disertai deposisi dari fibrin (⇩) mengindikasikan terjadinya kongesti yang kronis; C. Kelompok menggunakan 30% madu (T1), tidak terjadi regenerasi dari ovarium, terlihat adanya kongesti juga ekspresi hemosiderin dan masih terdapat hemorrhagi yang meluas; D. Kelompok menggunakan 50% madu (T2), ovarium mulai mengalami regenerasi sehingga terlihat *intact*, meskipun masih terlihat sedikit hemorrhagi dan kongesti pada beberapa area, tetapi sudah terlihat *growing follicles*.

jaringan yang berhubungan untuk absorbs dari makanan atau zat-zat yang dibutuhkan oleh tubuh. PGE2 telah lama dikenal memiliki efek sitoprotektif pada epitel gastrointestinal. Efek sitoprotektif tampaknya hasil dari kemampuan yang kompleks untuk merangsang lendir mukosa

dan sekresi bikarbonat untuk meningkatkan aliran darah mukosa dan khususnya pada bagian *stomach* untuk membatasi difusi kembali asam ke dalam epitel.[59] Selanjutnya, akan menyebabkan *stem cell* endogen yang telah terinduksi untuk memberi *support* secara kontinu pengisian epitel gastrointestinal yang berada di tengah lambung dan di dalam ruang kripta usus kecil dan besar. *Stem cells* berproliferasi secara kontinu untuk mennyuplai sel sehingga berdiferensiasi menjadi enterosit absorptif, sel-sel goblet yang mengeluarkan lendir, sel *enteroendocrine,* dan sel *Paneth*. Kecuali Paneth bermigrasi dari kripta untuk menggantikan sel-sel yang diekstrusi dari ujung vili. Migrasi ini membutuhkan waktu 3–6 hari.[58] Selanjutnya, perbaikan dari intestine akhirnya menyebabkan perbaikan jaringan ovarium melalui ekspresi GDF-9. GDF-9 yang merupakan sel progenitor *stem cell* dari *germ line* akan merangsang proliferasi sel dari korteks ovarium. Hal ini sesuai dengan pendapat, bahwa madu akan menyebabkan *stem cell* berkembang dengan cepat berdiferensiasi menjadi sel-sel yang diperlukan sebagai respons dari *defect* dan peningkatan dari respons imun.[60] Regenerasi dari jaringan ovarium, seperti: *intact*-nya jaringan ovarium dengan ekspresi *growing follicle* adalah identifikasi ketiga dari efektivitas penggunaan madu. Pada penelitan tersebut, regenerasi dari ovarium dapat diobservasi melalui metode *histopathology anatomy* (HPA) dengan pewarnaan HE. Pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa kelompok dengan 50% (v/v) madu (T2), menunjukkan terjadinya perbaikan jaringan ovarium. Perbaikan teridentifikasi berdasarkan regenerasi dari ovarium dengan ekspresi *growing follicle*. Secara ringkas, terjadinya perbaikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (T0–) di mana ovarium tidak mengalami degenerasi, yang masih terkondisi normal dengan ekspresi *growing follicle*. Pada kelompok menggunakan 30% (v/v) madu (T1) tidak mengindikasikan terjadinya perbaikan jaringan ovarium. Tidak terjadinya perbaikan dari ovarium berdasarkan ovarium yang tidak lagi utuh (rusak). Gambaran kerusakan dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (T0+) dengan degenerasi ovarium. Kelompok degenerasi ovarium (T0+), *ovary* terlihat

kongesti dan hemorrhagi yang *extensive*, juga tampak hemosiderin (*baby color pink*) mengindikasikan bahwa telah terjadi kongesti kronis.

Kelompok menggunakan 30% (v/v) madu (T1), tidak terjadi regenerasi dari *ovary*, tampak ada kongesti juga ekspresi hemosiderin dan masih terdapat hemorrhagi yang luas. Perlakuan konsentrasi 50% madu selama 5 hari pada tikus betina dengan degenerasi intestine dan *ovary* terlihat (i) mobilisai *stem cell* endogen (HSCs), dalam bentuk CD34 dan CD45 sebagai marker yang terekspresi dari serum darah; (ii) peningkatan *respons immune* dalam bentuk penurunan ekspresi dari HSP70 dan peningkatan PGE2 secara immunohistokimia pada jaringan intestine dan ekspresi GDF-9 secara immunohistokimia dalam jaringan ovarium; (iii) regenerasi jaringan ovarium, seperti: jaringan ovarium yang terlihat *intact* (utuh) dengan ekspresi *growing follicle*, meskipun masih tampak sedikit adanya hemorrhagi dan kongesti namun ekspresi hemosiderin dan deposisi fibrin sudah tidak tampak.

2. Aplikasi Madu pada Reproduksi *Male*

Aplikasi madu seperti yang diungkapkan di awal tulisan pada bab ini adalah suatu inovasi dalam upaya peningkatan jumlah *stem cell* dari dalam tubuh sendiri, dalam hal ini termasuk juga pada organ reproduksi *male*. Aplikasi madu sebagai terapi dalam hal ini dikaitkan dengan teraktivasinya *stem cell* endogen dari dalam tubuh. Aktivasi tersebut menyebabkan terjadinya proses mobilisasi sehingga *stem cell* tergerak dari sumbernya seperti *bone marrow* menuju tempat yang mengalami '*defect*' (kerusakan), dalam hal ini pada organ testis yang merupakan organ reproduksi utama pada *male.*

a. Aplikasi Madu dan Autoregenerasi Jaringan Testis

Aplikasi madu seperti penelitian yang dilakukan oleh Safitri *et al*. pada tahun 2016,[61] dikaitkan dengan terjadinya autoregenerasi pada jaringan testis dari hewan coba mencit (*Mus musculus*) yang mengalami malnutrisi. Autoregenerasi pada penelitian tersebut didasarkan pada

adanya mobilisasi *stem cell* melalui aplikasi pemberian bahan alam seperti madu secara per oral pada hewan coba.

Seperti diketahui *regenerative-medicine* pada dekade ini dan beberapa dekade ke depan digunakan sebagai basis dari banyak pengobataan berbagai macam penyakit, terutama penyakit degeneratif yang tidak dapat diobati baik melalui *medical therapy* maupun tindakan operatif,[62] khususnya degenerasi testis,[63,64] sebagai penyebab *azoospermia*. *Azoospermia* adalah kondisi di mana *testicular seminiferous tubules* tidak memproduksi spermatozoa, dan menyebabkan *infertility* pada *male* sehingga berakibat tidak dapat dihasilkannya keturunan.[64] Degenerasi testicular adalah penyebab utama *infertility* pada *male*, variasi etiologi seperti *mechanical trauma*, *genetic alteration*, *neoplastic changes,* dan *senility* atau *aging*. Pada saat ini terapi *stem cell* biasanya dilakukan melalui transplantasi *stem cell* yang sebelumnya dilakukan secara kultur *in vitro* terlebih dahulu. Tentu saja hal ini membutuhkan biaya yang tidak sedikit dan sangat mahal. Oleh sebab itulah, dibutuhkan terapi baru didasarkan pada mobilisasi dan diferensiasi dari tubuh sendiri yang berasal dari *stem cell* melalui pemanfaatan bahan alam seperti madu. Mobilisasi *stem cell* akan terjadi secara cepat serta dalam jumlah yang banyak menuju jaringan testis yang mengalami *defect*, pada gilirannya akan menjadi sel-sel tertentu (*seminiferous tubules*) dari jaringan tertentu (testis) dan akan menggantikan sel yang rusak dan apoptosis akibat penyakit degeneratif, pada kasus ini, diferensiasi *seminiferous tubules, sertoli* dan *interstitial cells* atau sel Leydig. Hal ini menjadi penting untuk menemukan sebuah inovasi pada terapi melalui induksi autoregenerasi dari sel *tubulus seminiferous* menggunakan bahan alam yang menguntungkan seperti madu dalam upaya produksi spermatozoa. Regenerasi dari *tubulus seminiferous* dan kemudian sel sertoli akan memberikan suport, nutrisi, dan faktor-faktor lingkungan lain untuk spermatozoa muda dan *male behavior* diikuti proses spermatogenesis dan kemampuan melakukan konsepsi.

Bahan alam madu, adalah nutrisi yang bersumber dari lebah[65,66] yang mempunyai potensi sebagai *antibacterial* dan *antioxidant*.[66–68] *Antioxidant* adalah substansi penting sebagai proteksi bagi individu terhadap agen radikal bebas. Konsumsi antioksidan yang tinggi dapat mengurangi prevalensi dari kanker, penyakit jantung, katarak, gangguan saluran pencernaan, dan penyakit degeneratif yang lain.[69] Pada penelitian tersebut, aplikasi madu pada degenerasi jaringan testikular. Konsumsi madu akan memperbaiki sistem digestif, yaitu sebagai terapi pada *diarrhea*[66] dan demikian juga pada gangguan sistem reproduksi.[70] Solusi secara konseptual, membutuhkan penelitian lebih lanjut untuk meng-*explore* keuntungan dari bahan alam seperti madu untuk menginduksi *auto-regeneration* dari *tubulus seminiferous testicular* yang merupakan salah satu bagian dari jaringan testis sebagai sumber yang berperan untuk memproduksi spermatozoa.

Pada penelitian tersebut degenerasi *testicular* model pada mencit jantan (*Mus musculus*) adalah dilakukan dengan cara pemuasaan terhadap pakan selama 5 hari berturut-turut, tetapi air minum tetap diberikan *ad libitum*.[71,72] Hewan coba yang digunakan pada penelitian tersebut dalam kondisi sehat, berumur 8–10 minggu, strain Balb/C *male mice* dengan berat badan masing-masing 20–25 g. Mencit pada penelitian tersebut diletakkan pada kandang plastik individual pada laboratorium kandang hewan coba pada Fakultas Kedokteran Hewan, Kampus C Universitas Airlangga. Pembagian kelompok pada perlakuan yang diberikan pada mencit dibagi dalam 4 kelompok dengan jumlah masing-masing mencit sebanyak 8 ekor: 1. Kelompok kontrol negatif (T0–): tidak dipuasakan dan tanpa madu; 2. Kelompok kontrol positif (T0+): dipuasakan tetapi tanpa madu; 3. Kelompok perlakuan 1 (T1): dipuasakan + 30% madu dalam air minum selama 5 hari; 4. Kelompok perlakuan 2 (T2): dipuasakan + 50% sadu selama 5 hari.

Selanjutnya dilakukan observasi terjadinya mobilisasi atau bergeraknya *hematopoietic stem cells* (HSCs) berdasarkan tereksepresinya CD34 dan CD45 melalui metode *Flowcytometry*. Metode ini

dilakukan dengan cara mengoleksi *whole blood* dari *cardiac puncture* yang ditempatkam pada *heparin tube* dengan tujuan untuk mencegah terjadinya koagulasi. Observasi *flowcytometry* memungkinkan ekspresi dari CD34 and CD45. Metode *flowcytometry* dimulai dengan melakukan sentrifugasi *whole blood* pada temperature 4°C, 6000 rpm selama 15 menit. Presipitasi seluler sebagai hasil sentrifugasi kemudian dilakukan pencampuran menggunakan *cytoperm* atau *cytofix* sebanyak 2 kali dari jumlah sel yang telah didapat. Selanjutnya campuran tersebut kemudian disentrifugasi lagi sehingga terbentuk supernatan dan pellet. Selanjutnya BD wash ditambahkan pada pellet sebanyak 4 kali dari sel yang didapatkan dari hasil sentrifugasi yang pertama. Hasil sentrifugasi campuran tersebut kemudian ditambahkan *lysis buffer* sebanyak 2 kali dari jumlah sel pertama yang telah didapat sebelumnya. Lebih lanjut dilakukan pelabelan dengan antibodi yang ditambahkan pada masing-masing sampel, 5 *tubes* disusun pararel. (1) *Single staining* atau pewarnaan tunggal dengan menggunakan CD34 PE yang ditambahkan pada *wash tube*. (2) *Double staining* selanjutnya dengan menggunakan CD34 PE dan CD45 PerCP. (3) *Double staining* terakhir dengan menggunakan CD34 PE dan CD45 PerCP dan CD105 FITC *trucount tube*. Semua sampel disimpan dalam 4°C dan dalam ruang gelap dan kemudian dilakukan analisa dengan *flowcytometry* selama 1 jam.[73]

Observasi selanjutnya adalah observasi terhadap *spermatogonial stem cells* (SSCs) dengan Teknik Immunohistokimia (IHC)**.** Sebelum dilakukan metode IHC, dilakukan persiapan preparat histologi, dengan cara membuat irisan secara transversal dari jaringan testicular dari *paraffin blocks*. Selanjutnya pemeriksaan melalui teknik immunohistokimia dilakukan dengan menggunakan monoklonal antibodi (monoklonal antibodies SSCs). Hal ini dilakukan untuk menentukan ekspresi dari SSCs. Observasi dari SSCs dilakukan menggunakan *microscope objective* dengan pembesaran 400 kali dan ekspresi masing-masing variabel diindikasikan dengan jumlah sel dengan terihat warna *brownish chromogen discoloration* pada masing-masing irisan.[74]

Selanjutnya dilakukan juga observasi secara histopatologi anatomi (HPA) dari bagian tubulus seminiferous jaringan testis untuk identifikasi terjadinya regenerasi dari sel tersebut. Observasi dengan metode HPA dimulai dengan membuat sediaan reparate histologi. Preparat histologi dibuat dengan tahapan-tahapan sebagai berikut: *testicular.*

Dari mencit difiksasi dalam 10% formalin, 1 jam kemudian dilakukan injeksi formalin 10% dalam bagian pertengahan testis. Kemudian testis mencit didehidrasi dalam *alcohol solution* dengan konsentrasi meningkat secara bertahap, yaitu dari 70%, 80%, 90%, 96% (*absolute*). Kemudian dilakukan *clearing* pada testes mencit dalam *xylol solution* atau *chloroform* atau *benzene*. Selanjutnya dilakukan *embedding* menggunakan parafin cair dan testis mencit diletakkan dalam *molds* berisi parafin cair. Sebelum diwarnai, pengirisan dilakukan dengan menggunakan *microtome* dan selanjutnya *mounted* (pelekatan) pada *object glass*. Selanjutnya pewarnaan dilakukan penghilangan dari parafin dengan *xylol* kemudian diletakkan dalam alkohol *solution* dengan konsentrasi menurun dan kemudian diletakkan pada prosedur pewarnaan H&E. Tahap akhir setelah pewarnaan selesai dilakukan *mounting*, yaitu letakkan dalam air atau alkohol untuk menghilangkan kelebihan pewarnaan. Kemudian diletakkan ke dalam *alcohol solution* dengan konsentrasi meningkat, dan kemudian dimasukkan dalam *xylol*. Preparat kemudian ditutup dengan *cover glass* dan *mounted* dengan Canada balsam atau *Entellan*.[75] Pemeriksaan histopatologi dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Observasi dan identifikasi regenerasi dari *tubulus seminiferous* adalah didasarkan pada deskripsi histologi yang ada.

Analisis statistik yang diberlakukan pada penelitian tersebut adalah dianalisiis menggunakan SPSS 15 for Windows XP pada level signifikansi 0.01 (P = 0.01) dan *confidence level* 99% (α = 0.01). Analisis terhadap beberapa marker seperti Ekspresi dari CD34 dan CD45 serta SSCs yang diobservasi,. Tahap berikutnya dilakukan *comparative hypothesis testing*, dilakukan sebagai berikut: *Test data normality* dengan *Kolmogorov*

Smirnov test, dilanjutkan *homogenecity* dari *variance test*, kemudian dilakukan analisis menggunakan *Analysis of variance* (ANOVA) *factorial* dan *Post hoc test (Least Significant Difference test)* dengan menggunakan Tukey HSD 5%.

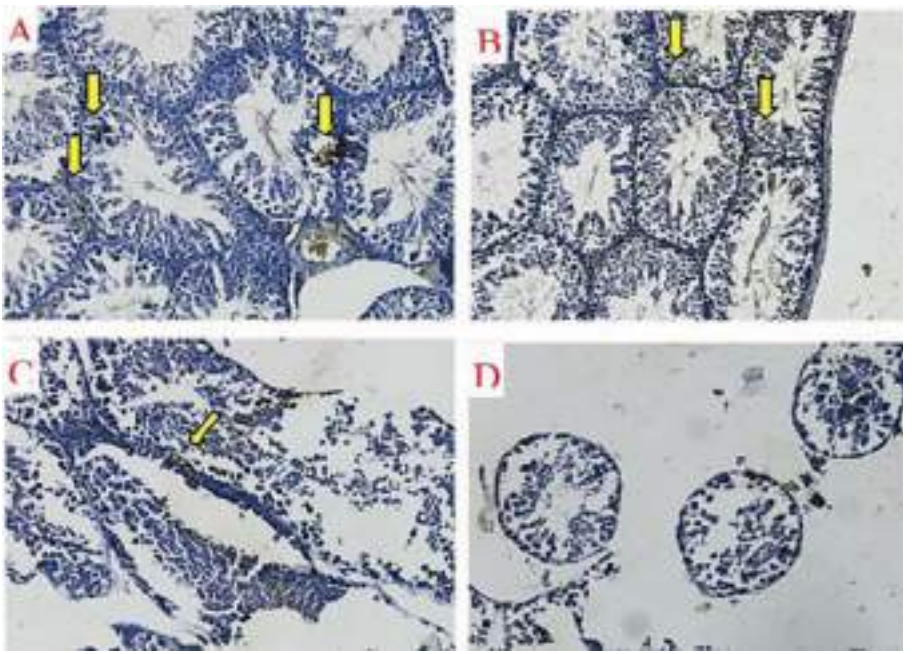
Hasil Penelitian dipaparkan adalah berdasarkan data yang dikoleksi dari 32 *male mice* yang telah dibagi menjadi 4 perlakuan: kelompok kontrol negatif (T0–) adalah testis normal tanpa madu; kelompok kontrol positif (T0+) adalah degeneratif testis tanpa madu; (T1) kelompok degeneratif testis + 30% madu selama 5 hari didalam air minum; (T2) kelompok degeneratif testis + 50% madu selama 5 hari di dalam air minum. Secara detail, hasil penelitian yang didapat tersebut adalah berupa efektivitas dari terapi madu yang diberikan. Efektivitas tersebut didasarkan pada: 1. Mobilisasi dari HSCs, 2. Ekspresi SSCs, 3. Regenerasi jaringan testicular (seperti: tetap *intact*-nya jaringan *tubulus seminiferous*).

Mobilisasi dari HSCs dianalisis dengan *flowcytometry* didasarkan pada peningkatan konsentrasi CD34 dan CD45. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa tidak ada HSCs yang termobilisasi pada ketiga kelompok (T0–, T0+ dan T1) didasarkan pada persentase CD34 dan CD45, yang kurang dari 25%. Pada perlakuan yang lain, persentase pada kelompok T2 adalah lebih dari 70%, terindikasi adanya mobilisasi dari HSCs. Secara statistik, terdapat perbedaan yang significan ($P < 0.05$) antara T2 dengan ketiga perlakuan yang lain (T0–, T0+ and T1), tetapi setelah diobservasi antara ketiga perlakuan itu sendiri tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) T0–, T0+ and T1) (Tabel 5.3). Selanjutnya efektivitas dari terapi madu adalah didasarkan pada terbentuknya SSCs sebagai hasil dari pemberian 50% madu (T2) adalah 48.330 ± 0.226 (80%), persentase masih lebih tinggi daripada kelompok pemberian 30% madu (T1) = $8.330^{c} \pm 0.921$ (<10%) dan kelompok degeneratif testis (T0+) adalah tidak terekspresi sama sekali (Tabel 5.3, Gambar 5.8).

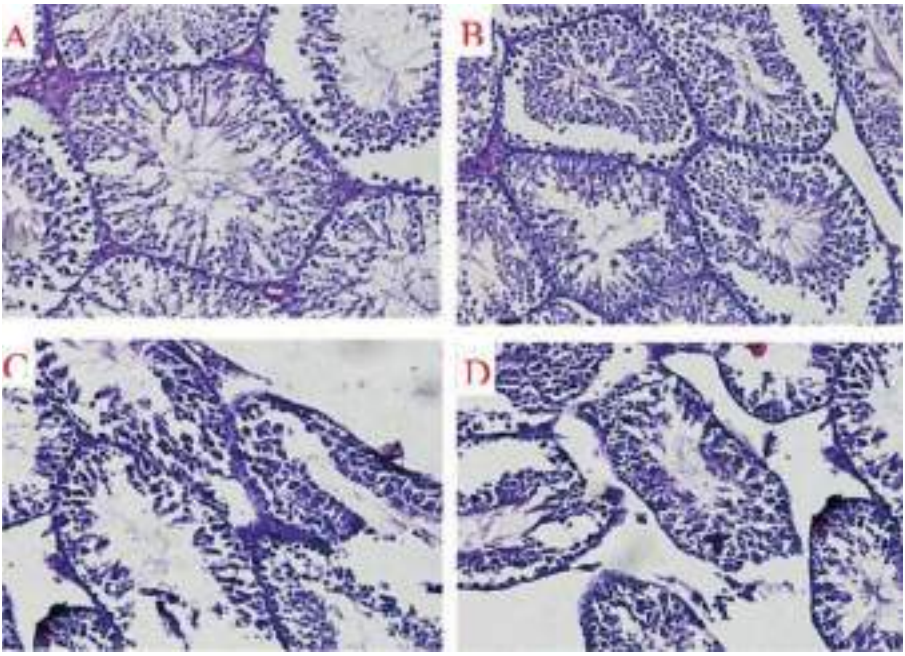
Tabel 5.3 Persentase dari CD34 dan CD45 dengan f*lowcytometry* dan ekspresi SSCs pada jaringan testis dari *mice* pada beberapa perlakuan (rataan ± SD, %).

Perlakuan	Rerata CD34 & CD45 (%) ±SD	Rerata Skor Ekspresi SSCs±SD
Kontrol Negatif (T0-) Testis Normal, Tanpa Madu	21.070 ± 1.320[a]	86.660 ±1.938[a]
Kontrol Positif (T0+) dengan Degeneratif Testis dan, Tanpa Madu	23.010 ± 1.362[a]	0.000 ± 0.000[d]
Kelompok T1 : Degeneratif Testis + 30% madu dalam air minum selama 5 hari	24.360 ± 1.370[a]	8.330 ± 0.921[c]
Kelompok T2 : Degeneratif Testis + 50% madu dalam air minum selama 5 hari	72.180 ± 1.860[b]	48.330 ± 0.226[b]

[a,b,c] *Superscript* berbeda pada kolom sama mengindikasikan perbedaan signifikan p<0.005.



Gambar 5.8 Ekspresi SSCs pada jaringan testis *mice* dengan teknik immunohistokimia. A. Kelompok ontrol negatif (T0–); B. Kelompok 50% madu (T2); C. Kelompok 30% madu (T1); D. Kelompok degeneratif testis (T0+).



Gambar 5.9 Regenerasi *seminiferous tubule* jaringan *testicular* secara mikroskopis dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE) pada jaringan testis *mice* pada beberapa perlakuan. A. Kelompok kontrol normal (T0–), *tubulus seminiferous* terlihat *intact*; B. Kelompok menggunakan 50% madu (T2), *tubulus seminiferous* mengalami regenerasi; C. Kelompok menggunakan 30% madu (T1), tidak ada regenerasi; D. Kelompok degeneratif testis (T0+), tidak ada regenerasi *tubulus seminiferous*.

Pada penelitian tersebut, regenerasi dari testes dapat diobservasi melalui metode histopatologi dengan pewarnaan *hematoxylin* dan *eosin* (H&E). Pemeriksaan mikroskopik menunjukkan bahwa kelompok pemberian 50% madu (T2), menyebabkan terjadinya perbaikan jaringan testikuler. Perbaikan diidentifikasikan berdasarkan pada regenerasi tubulus seminiferus yang terlihat *intact*. Ringkasan dari perbaikan dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif pada mencit normal (T0–) yang tidak mengalami degenerasi *testikuler*, yang tetap dalam kondisi normal (Gambar 5.8). Pada kelompok dengan pemberian 30% madu (T1) tidak terindikasi terjadinya perbaikan jaringan testikuler.

Tidak terjadi perbaikan tubulus seminiferus yang tidak lagi *intact* atau tidak utuh (mengalami kerusakan). Gambaran kerusakan dapat dibandingkan dengan kontrol positif (T0+) mencit denga degenerasi *testicular* (Gambar 5.8)

Berdasarkan laporan dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian 50% madu selama 5 hari adalah efektif untuk terapi degeneratif testes dari *male mice* model. Efek dari madu didasarkan pada: 1. Mobilisasi dari HSCs, 2. Pembentukan spermatogonial *stem cells* (SSCs) dari sel progenitor, dan 3. Regenerasi dari jaringan testikular, seperti jaringan yang *intact* dari *tubulus seminiferous*.

Mobilisasi dari HSCs dapat terjadi karena adanya induksi dari *stem cell* untuk termobilisasi menuju tempat yang mengalami *defect*. Proses dari mobilisasi dapat terjadi melalui beberapa cara: 1. Induksi proteolitik dari *microenvironment* dari bagian dalam *bone marrow* (induksi dari *pharmacological agents* seperti G – CSF atau Cyclophosphamide); 2. *Blockade* dari CXCR4 atau VLA-4 melalui molekul *specific blocking* (AMD3100 atau BIO4860); 3. Efek mediator neural (*dopamine* dan *receptors b2-adrenergic*); 4. Modulasi elemen-elemen dari koagulasi dari *cascade*; 5. Respons imu atau reaksi *inflammatory* akibat induksi dari sinyal *injury* (*cytokines, NFkB,* β *catenin* melalui *Wnt*) dari jaringan yang rusak; 6. *Homing signals* seperti – SDF 1, CXCL12, VEGF, HGF, PDGF, dan integrin yang muncul dan beraksi melakukan *recruitment* pada *stem cell*.[76] Madu dari lebah berisi variasi komponen aktif secara biologi, seperti *melittin* dan *phospholipase*-A2 (PLA2).[77] Observasi sebelumnya menunjukkan bahwa madu mempunyai komponen yang efektif dalam proses proliferasi, *survival,* dan diferensiasi dari sel.[78]

Peran dari madu pada penelitian tersebut dikatakan sebagai *supportive niche,* yaitu melalui proses *trigger* dari *Vascular Endothelial Growth Factor*-1 (VEGF-1) yang merupakan marker dari sinyal *homing*. Selanjutnya, VEGF-1 berikatan dengan VEGF *Receptor*-1 atau VEGFR-1. VEGF adalah termasuk komponen dari *stem cells* pada bagian *Extra Cellular Matrix* (ECM) yang mempunyai peran dalam

mendukung microenvironment yang kondusif bagi *stem cells*.[79] Adanya *trigger* dari VEGF-1–VEGFR-1 akan melewati serangkaian *signaling* yang mengaktivasi *Stem Cell Factor* (SCF) *intersisiel*. SCF adalah suatu mekanisme dalam *niche signaling protein* yang secara fisiologi akan menyebabkan komunikasi lebih lanjut antar sel.[80] Kehadiran dari SCF *intersisiel* akan direkognisi oleh SCF *receptor complex* dan masuk ke dalam inti sel sehingga akan terekspresi *nuclear* β1–integrin yang akan mengaktivasi Octamer4 (OCT4). OCT4 adalah anggota dari POU *family* dari *transcription factors*, yang mempunyai peran utama dalam proses proliferasi dari *stem cells*, *self-renewal,* dan diferensiasi. Eksistensi dari proliferasi ini menyebabkan HSCs berubah bentuk dari *quiescent* menjadi *cycling state*, sehingga HSCs terlokasi pada sentral dari endosteum yaitu area menuju *marrow*. Hal ini menunjukkan bahwa *cycling* dari HSCs terjadi keluar dari *niche* mereka dan termobilisasi menuju sirkulasi *peripheral*.[81] Selanjutnya efektivitas dari madu adalah didasarkan pada pembentukan SSCs sebagai hasil dari diferensiasi dari *stem cells* yang termobilisasi. SSCs dalam *progenitors* dari *germline stem cells* terbentuk oleh diferensiasi dari *stem cell*. Pada penelitian tersebut terbentuknya SSCs dapat diidentifikasi melalui metode immunohistokimia. Ekspresi dari SSCs pada kelompok yang diberikan 50% madu (T2) adalah sekitar 50%. Meskipun prosentase lebih rendah daripada kelompok kontrol (P0–) (> 80%), tetapi persentase tersebut masih lebih tinggi daripada kelompok dengan degenerasi testis + 30% madu (T1) (<10%) dan kelompok degenerasi testis tanpa pemberian madu (P0+) yang tidak terekspresi sama sekali (0%). Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang lain,[82] yang menyebutkan bahwa madu dapat menyebabkan terjadinya proliferasi dari *stem cells* dengan cepat dan kemudian ber diferensiasi menjadi sel yang dibutuhkan sebagai respons dari *defect*. Regenerasi dari jaringan testikuler, seperti: jaringan *tubulus seminiferous* yang *intact* adalah indikasi ketiga dari efektivitas penggunaan madu. Pada penelitian tersebut, regenerasi dari testes dapat diobservasi melalui metode *histopathology anatomy* (HPA) dengan pewarnaan *hematoxylin*

and eosin (HE). Pemeriksaan mikroskopis menunjukkan bahwa pemberian 50% madu (T2), menyebabkan terjadinya perbaikan jaringan testikuler. Identifikasi perbaikan didasarkan pada regenerasi dari sel tubules seminiferous yang terlihat *intact*. Secara ringkas perbaikan dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol normal testis (T0–) yang memang tidak mengalami degenerasi testicular, yang memang dalam kondisi normal. Pada kelompok degenerasi testis + 30% madu (T1) tidak ada indikasi terjadinya perbaikan jaringan testikuler. Tidak adanya perbaikan dari sel yang mengalami degenerasi tubulus seminiferous tidak lagi utuh (masih rusak). Gambaran kerusakan dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dengan degenerasi testis degeneratif tanpa pemberian madu (T0+) mencit dengan degenerasi testikuler.

b. Aplikasi Madu, Produksi Testosteron, dan Peningkatan Libido

Salah satu kasus utama rendahnya libido dari *male* dapat disebabkan oleh kondisi malnutrisi dengan jaringan testis yang mengalami degenerasi.[61,83] Terapi untuk degenerasi jaringan testis menggunakan *stem cells* pada saat ini dan beberapa dekade ke depan adalah sangat menarik dan meningkat dengan tajam, karena potensi stem cells yang sangat menjanjikan dalam upaya pemanfaatannya sebagai pengobatan.[84] Namun demikian, kompleksitas dari metode isolasi, proses kultur *in vitro* dan prosedur transplantasi dengan program *booster* dari *treatment* adalah sangat mahal.[85] Oleh karena itu, diperlukan terapi yang inovatif sebagai suatu usaha untuk mengatasi degeneratif dari jaringan testis pada *male*. Madu sebagai hasil dari *bee product* merupakan bahan alam berupa nutrisi yang berasal dari lebah.[86,87] Madu yang juga dapat digunakan sebagai antioksidan dan sebagai antibakterial.[88] Antioksidan adalah substansi penting yang melindungi individu dari radikal bebas yaitu seperti *reactive oxygen species* (ROS). Mengonsumsi antioksidan dapat menurunkan prevalensi dari *cardiovascular failure*, kanker, gangguan *tractus digestive*, katarak, dan penyakit degenerasi yang lainnya.[89,90] termasuk juga degenerasi jaringan testikuler.[91] Konsumsi dari madu

juga efektif pada pengobatan *diarrhea* dengan rendah *respons immune*[92] dan juga terapi pada gangguan sistem reproduksi.[91,93] Secara konseptual penelitian dari Safitri dkk. (2019)[83] adalah mengeksplorasi manfaat penggunaan madu dari lebah hutan (*Apis dorsata*), dalam menginduksi sel induk endogen sebagai alternatif pengganti terapi *stem cell*.

Lebih lanjut penelitian tersebut didasarkan pada observasi kondisi libido yang rendah akibat malnutrisi. Model libido rendah dilakukan pada hewan coba tikus jantan dapat terjadi melalui pemuasaan terhadap pakan selama 5 hari secara berturut-turut, tetapi tetap diberikan air minum *add libitum*.[91] Hewan coba sebagai model tikus infertil yang digunakan pada penelitian tersebut adalah tikus sehat, umur 8–10 minggu, tikus jantan (*Rattus norvegicus*), strain Wistar dengan berat badan masing-masing 250–300g. Tikus ditempatkan pada kandang plastik individual di laboratorium hewan coba yang berada di Fakultas Kedokteran Hewan, Kampus C Universitas Airlangga. Tikus selanjutnya dibagi menjadi 4 kelompok, di mana masing-masing kelompok terdiri dari 10 tikus. Kelompok kontrol negatif (C-: normal tikus jantan tanpa diberi madu, Kelompok kontrol positif (C+): jantan tikus dengan libido rendah tanpa diberi madu, Kelompok T1 dan T2: tikus dengan libido rendah diberi 30% (v/v) dan 50% (v/v) madu yang digunakan berasal dari lebah hutan atau *bee forest* (*Apis dorsata*) selama 10 hari.

Observasi berikutnya berupa identifikasi dari ekspresi *testosterone*, pada penelitian tersebut dilakukan dengan menggunakan metode *immunohistochemical* (IHC). Sebelum observasi IHC, terlebih dulu dibuat sediaan berupa preparat histologis, dengan cara melakukan incisi yang dibuat secara transversal dari jaringan testicular yang sebelumnya sudah disiapkan dalam *paraffin block*. Selanjutnya, pemeriksaan dilakukan melalui metode IHC menggunakan *antibody monoclonal testosterone* (Monoclonal, P2G1, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Hal tersebut dilakukan untuk menentukan ekspresi dari *testosterone*. Pengamatan terhadap IHC dari *testosterone* dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 200x (spec: Nikkon H 600L

Mikroskop; digital camera DS Fi2 300 megapixel), dan ekspresi dari masing-masing variabel dindikasikan dengan skor dari sel dengan *brownish discoloration* pada masing-masing incisi.[85]

Observasi, terakhir dari tahapan penelitian tersebut adalah pengamatan terhadap libido dari *male rat*. Pengamatan dilakukan melalui *single mating* dengan *female rat*. Sebelumnya dilakukan sinkronisasi estrus terlebih dahulu pada *female rat* menggunakan hormon PMSG-hCG (Bioworld, 220606401-MIH9827, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA), hal ini dilakukan agar didapatkan kondisi yang sama pada organ reproduksi yaitu pada fase estrus. Deteksi dari kemampuan libido *male rat* dilakukan dengan pemantauan yang ketat pada *female rat*. Deteksi dari libido dilakukan setelah 1 kali proses siklus spermatogenesis yang terjadi selama 48 hari dan tikus telah mendapatkan pakan secara normal. Data libido didapatkan berdasarkan observasi pada *male* dan *female rat* di dalam kandang.[94,95] Tingkat libido didasarkan pada 3 kategori dari libido: 1. Jumlah berapa kali terjadi kopulasi; 2. waktu reaksi pertama kali menaiki betina dan berapa lama waktu periode melakukan kopulasi. Observasi dilakukan selama 4 hari, setelah 1 jam perkawinan, *male rats* dipisahkan dari *female rats*.

Skor ekspresi dari *testosterone* dan *male rat* libido yang diklasifikasikan dalam 3 kategori (jumlah kopulasi, waktu reaksi, dan periode dari kopulasi), secara statistik dilakukan analisis dengan menggunakan SPSS 15 for Windows XP pada level signifikasi 0.05 (=0.05) dan tingkat kepercayaan 99% (α=0.01). Data tes normalitas dengan menggunakan *Kolmogorof Smirnov test* dan *homogenecity* dari *variance test s*erta dianalisis dengan Anova dan kemudian terakhir *post-hoc test* menggunakan Tukey HSD 5%.

Selanjutnya pemaparan hasil dari penelitian tersebut yang berupa perbaikan libido didasarkan pada *immunoreactivities* dari *testosterone* yang terdeteksi pada jaringan testis. Ekspresi *testosterone* sebagai *respons immune* untuk *signal* regenerasi dari *Leydig cells* pada testis pada kelompok: C-, C+, T1 dan T2 secara berturut-turut adalah C- = 2.95^{c} ±

0.15; C+ = 0.19[a] ± 0.55; T1 = 0.27[a] ± 0.45 dan T2 = 2.05[bc] ± 0.35 (Tabel 5.4, Gambar 5.10). Observasi pada libido *male rat* diklasifikasikan dalam 3 kategori:[94,95] Jumlah dari *mating* per unit waktu, waktu reaksi, dan periode *mating* (waktu antara satu *mating* dengan *mating* berikutnya). Hasil dari tes libido setelah dilakukan pengamatan berdasarkan perhitungan statistik dapat dilihat pada Tabel 5.5.

Tabel 5.4 Skor dari ekspresi testosterone pada testis *rat* dengan metode IHC pada beberapa perlakuan.

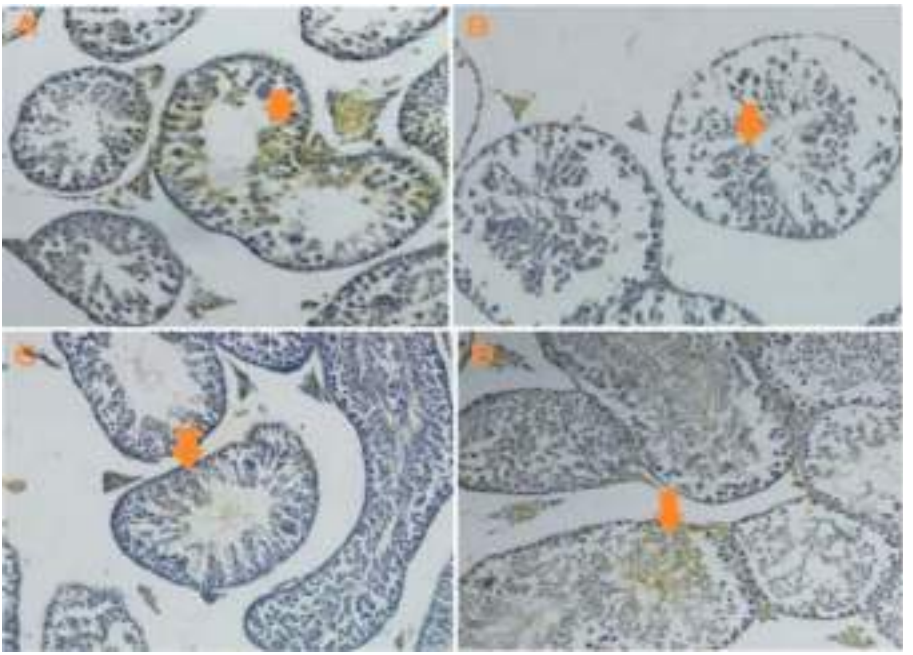
Perlakuan	Rerata Skor Testosteron ±SD
Kontrol Negatif (C-) Tidak puasa, Tanpa Madu	2.95 ± 0.15[c]
Kontrol Positif (C+) Puasa selama 5 hari, Tanpa Madu	0.19 ± 0.55[a]
Kelompok T1 : Puasa selama 5 hari + 30% madu (v/v) selama 10 hari	0.27 ± 0.45[a]
Kelompok T2 : Puasa selama 5 hari + 50% madu (v/v) selama 10 hari	2.05 ± 0.35[bc]

[a,b,c] *Superscript* berbeda pada kolom sama mengindikasikan perbedaan signifikan p<0.005.

Tabel 5.5 *Libido test* didasarkan pada tiga kategori dari libido.

Perlakuan	3 Kategori Libido		
	Berapa kali terjadi / Jumlah perkawinan selama 60 menit ±SD	Waktu Reaksi atau Waktu *introduce* jantan dan betina sampai terjadinya pekawinan pertama kali (60 menit observasi)±SD	Periode Perkawianan atau waktu perkawinan pertama dengan perkawinan berikutnya (Rerata menit)±SD
Kontrol Negatif (C-) Tidak puasa, Tanpa Madu	5.2 ± 0.6[c]	2.495 ± 0.37[b]	13.176 ± 1.102[b]
Kontrol Positif (C+) Puasa selama 5 hari, Tanpa Madu	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]
Kelompok T1 : Puasa selama 5 hari + 30% madu (v/v) selama 10 hari	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]	0 ± 0[a]
Kelompok T2 : Puasa selama 5 hari + 50% madu (v/v) selama 10 hari	3.1 ± 0.497[b]	5.56 ± 1.75[c]	18.64 ± 1.245[c]

[a,b,c] *Superscript* berbeda pada kolom sama mengindikasikan perbedaan signifikan p<0.005.



Gambar 5.10 Analisis immunohistokimia dari sinyal respons imun jaringan testikular didasarkan pada ekspresi Testosterone (*brown chromogen*) pada beberapa perlakuan dengan pembesaran 200× (Nikkon Microscope H600L; DS Fi2 digital camera 300 megapixel). *Superscript* yang berbeda mengindikasikan perbedaan signifikan ($p < 0.05$). A. Kelompok control negatif (C–) dengan skor $2.95^{c}\pm0.15$; B. Kelompok control positif (C+) dengan skor $0.19^{a}\pm0.55$; C. Kelompok 30% (v/v) madu (T1) dengan skor $0.27^{a}\pm0.45$; D. Kelompok 50% (v/v) madu (T2) dengan skor $2.05^{bc}\pm0.35$.

Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian 50% (v/v) dosis madu dari *Apis dorsata* dalam air minum selama 10 hari pada kelompok T2 dapat digunakan sebagai terap libido rendah pada *male rat*. Observasi pada libido dari *male rat*, adalah dibagi dalam tiga kategori:[94.95] jumlah *mating* per unit waktu, waktu reaksi atau waktu pertama kali *male* mendekati *female* sampai akhirnya terjadi *mating* untuk yang pertama kali; dan *mating period* atau waktu pertama *mating* dengan *mating* berikutnya. Kelompok kontrol positif (C+) mengalami penurunan libido, hal ini dikarenakan kelenjar korteks adrenal menjadi

ineffective dalam memproduksi *dehydroepiandrosterone* (DHEA) akibat kondisi malnutrisi. Rendahnya kadar DHEA dalam darah dapat menjadi penyebab turunnya stamina dari tubuh, *fatigue* (kelelahan), dan juga penurunan libido. DHEA yang diproduksi korteks adrenal renal[96] dan *Leydig cells*[97] adalah precursor yang sangat penting dari hormon steroid seperti *testosterone.* Hal ini juga dapat terjadi pada kelompok degenerasi testes yang diberi 30% madu (T1) selama 10 hari. Hal ini menunjukkan bahwa 30% dosis dari madu belum cukup mampu untuk mengembalikan libido seperti pada kelompok kontrol negatif (C-).

DHEA yang meningkat merupakan prekursor dari hormon steroid (testosteron), yang juga bertanggung jawab untuk metabolisme lemak dan berperan sebagai *enzyme inhibitor* pada *glucose 6-phosphat dehydrogenase,* yang juga berperan sebagai biokatalisator yang mengubah glukosa menjadi lemak. Peningkatan DHEA memungkinkan peningkatan jumlah ATP bebas di dalam tubuh, sehingga, terjadi peningkatan juga pada stamina tubuh,[98] libido, dan *fertility*.[97] Proses libido dimulai dari stimulasi pada hypothalamus, di mana dopamin yang diproduksi sebagai *neurotransmitters* dan *neurohormones* yang berefek pada aktivitas dan *sexual behavior* pada individu. Rangsangan yang diterima oleh *nervus sensory* menjadi *triggers* dari *acetaminoline* dalam mestimulasi pada sekresi *nitric oxide* dari sel endotelial untuk mengaktivasi cGMP. Aktivasi dari cGMP menyebabkan muskulus dari *corpus cavernosus*, dan penis menjadi relaksasi. Hal ini menyebabkan terjadinya dilatasi dari arteri penis sehingga terjadi peningkatan aliran darah yang menyebabkan jaringan *erectile* penis meregang (ereksi). Ereksi dari jaringan *erectile* dari penis terisi penuh oleh darah akan menyebabkan pembuluh darah vena menjadi tertekan dan menghambat pelepasan darah dan air sehingga terjadilah peningkatan tugor pada penis, yang berujung pada terjadinya ereksi.[99]

Kekurangan glukosa pada tikus dengan kondisi malnutrisi dan degeneratif testikuler, yang ditemukan pada kelompok kontrol positif (C+) dan kelompok 30% madu (T1). Hal ini menyebabkan lebih sedikit sumber

bahan bakar dan energi. Glukosa adalah secara umum untuk proliferasi pada semua sel termasuk proses spermatogenesis. Ketidaktersediaannya glukosa menjadi penyebab tidak adanya sumber karbon untuk proses sintesis sebagian besar senyawa yang lain seperti asam amino, asam nukleat, asam lemak, kolesterol, dan hormon steroid seperti *testosterone*. Selain itu, glukosa juga diperlukan sebagai prekursor untuk berbagai glukosa lain seperti laktosa, *glycosaminoglycans* dan nukleotida.[100] Bagaimanapun, eksistensi dari malnutrisi pada kelompok kontrol positif (C+) berarti ada defisiensi dari vitamin B kompleks dan tidak tersedianya glukosa dari pakan ransum, ditambah tidak sempurnanya proses metabolisme, hal ini dapat diasumsikan sebagai energi bebas atau ATP di dalam tubuh. Hal ini juga akan menurunkan stamina dari *male rat* sehingga akan menjadi manifestasi dari turunnya libido. Efektivitas dari madu dari lebah hutan (*Apis dorsata*) untuk meregenerasi produksi *testosterone* melalui induksi *stem cells* endogen dari tikus dengan libido rendah akibat malnutrisi dan peningkatan dari libido tikus didasarkan pada tiga kategori tersebut sehingga dapat terjadi perbaikan.

Penelitian tersebut meberikan kesimpulan bahwa 50% (v/v) madu dari lebah hutan (*Apis dorsata*) dapat digunakan untuk regenerasi produksi dari *testosterone* melalui induksi *stem cells* endogen dan perbaikan libido dari *male rat* didasarkan pada tiga kategori yaitu jumlah kopulasi, waktu reaksi, dan period dari kopulasi.

c. Aplikassi Madu, Deteksi Molekuler, dan Respons Imun dari *Male*

Seperti diketahui, testis adalah organ utama yang penting dari reproduksi *male* yaitu dengan fungsinya untuk memproduksi spermatozoa dan *testosterone*. Spermatozoa adalah sel benih jantan, sedangkan testosteron adalah hormon utama reproduksi dan ekspresi libido. Salah satu kasus utama dari infertilitas pada *male* dapat disebabkan karena terjadinya degenerasi dari jaringan testikuler, khususnya akibat kondisi malnutrisi. Terapi pemanfaatan *stem cell* saat ini dan beberapa dekade ke depan sangat menarik dan meningkat tajam, dikarenakan potensi *stem*

cells sangat menjanjikan untuk dimanfaatkan sebagai pengobatan.[101] *Stem cells* terapi dapat mengatasi berbagai variasi penyakit[102] termasuk kasus infertilitas yang disebabkan oleh kondisi degeneratif dari jaringan testis.[103] Namun demikian, kompleksitas dari metode isolasi, prosedur *in vitro culture* maupun prosedur transplantasi dengan beberapa kali pengulangan *treatment* (*booster*) adalah membutuhkan biaya yang sangat mahal.[104] Dibutuhkan inovasi untuk mendapatkan alternatif bagaimana dapat melakukan induksi dari *stem cell* endogen. Inovasi terapeutika yang telah dilakukan menggunakan induksi *stem cell* sehingga terjadi auto-regenerasi pada testis dari *mice* (*Mus musculus*), khususnya sel tubulus seminiferus sebagai tempat memproduksi spermatozoa dengan menggunakan *bee products* seperti madu telah dilakukan.[103] Seperti diketahui madu adalah nutrisi yang berasl dari lebah.[105] Berperan juga sebagai antioksidan dan antibakterial.[106]

Antioksidan adalah substansi penting yang dapat mencegah individu dari suatu radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS). Mengonsumsi antioksidan dalam jumlah yang cukup dapat menurunkan angka prevalensi *cardiovascular failure*, kanker, gangguan saluran pencernaan, katarak, dan penyakit egenerative yang lain,[105,107] termasuk juga degeneratif pada jaringan testiculer. Mengkonsumsi madu juga efektif untuk mengatasi *diarrhea* pada kondisi *low immune response*[108] dan juga pada gangguan sistem reproduksi.[103,109] Berdasarkan beberapa penelitian lain, pemberian madu dapat menyebabkan terjadinya auto-mobilisasi dan peningkatan *immune response*.[105] Hal ini juga dapat menyebabkan diferensiasi dari folikel dan ephitelial dari intestine dari *female* mice (*Mus musculus*) dan regenerasi dari ovari dan intestines.[108] Peningkatan respons imun,[107] menyebabkan terjadinya automobilisasi dan diferensiasi dari *stem cells* terjadi di dalam tubuh yang mengarah ke regenerasi lamina propria, epithelial villi dari intestines, folikel, dan corpus luteum dari ovari.[108] Kejadian auto-mobilisasi dan diferensiasi dari *stem cells* terjadi di dalam tubuh yang mengarah pada terjadinya autoregenerasi dan mengembalikan keutuhan tubulus seminiferus

yang terdapat pada jaringan testikuler dari mencit sebagai akibat dari malnutrisi dapat diatasi dengan pemanfaatan madu.[103]

Sebagai solusi konseptual, penelitian dari Safitri (2020)[110] yang bertujuan untuk meng-*explore* keuntungan dari pemanfaatan *bee product* dari lebah hutan (*Apis dorsata*), untuk menginduksi dari *stem cells* endogen dari *male rat* sebagai sebuah alternatif untuk mengganti terapi *stem cells* (tanpa injeksi *stem cell* dari luar). Induksi *stem cells* endogen dapat meregenerasi *testikuler* dan *sertoli cells* dan kemudian memberikan support, *nutrients,* dan faktor-faktor *environment* faktor lain untuk spermatozoa muda dan memungkinkan terjadinya proses spermatogenesis dan konsepsi dapat terjadi. Penelitian Safitri (2020)[110] tersebut dilakukan untuk membuktikan bahwa produk lebah dari *Apis dorsata* efektif untuk pengobatan, yaitu digunakan untuk menginduksi *stem cell* endogen dan regenerasi tubulus seminiferus serta sel Leydig tikus (*Rattus norvegicus*) jantan.

Selanjutnya penelitian tersebut menjelaskan bagaimana tahapan dari penelitian yang dilakukan. Tahap awal yaitu dengan penggunaan hewan model tikus jantan yang mengalami degeneratif pada jaringan testikuler yang diberikan treatment berupa pemberian madu dan kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol. Model degeneratif pada jaringan testikuler dilakukan pada *male rat*, yaitu dengan cara dipuasakan tanpa diberi pakan selama 5 hari berturut-turut tetapi tetap diberi air minum.[103] *Rat* yang digunakan sebagai hewan coba pada penelitian tersebut adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar, kondisi sehat dan berumur 8-10, berjenis kelamin jantan, berat badan 250-300g. Tikus diletakkan pada kandang plastik individual pada Laboratorium Hewan Coba di Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Tikus dibagi menjadi 4 kelompok, yang masing-masing kelompok terdiri atas 10 *rat*. Kelompok pertama disebut kelompok kontrol negatif (T-); diberi pakan normal tanpa diberi madu. Kelompok kedua disebut kelompok kontrol positif (T+); Tikus tidak diberi pakan selama 5 hari dan juga tidak diberi madu. Kelompok ketiga disebut kelompok

perlakuan 1 (T1); Tikus tidak diberi pakan selama 5 hari tetapi diberi madu 30% (v/v) selama 10 hari. Kelompok keempat disebut kelompok perlakuan 2 (T2); Tikus tidak diberi pakan selama 5 hari tetapi diberi madu 50% (v/v) selama 10 hari.

Tahap berikutnya dilakukan identifikasi terjadinya regenerasi dari sel tubulus seminiferous dari jaringan testikuler melalui pemeriksaan histopatologi dimulai dengan membuat sediaan preparat histologi. Preparat histologi dibuat sebagai berikut: testikuler dari mencit difiksasi dalam 10% formalin, 1 jam kemudian dilakukan injeksi formalin 10% dalam bagian pertengahan testis. Kemudian testis mencit didehidrasi dalam *alcohol solution* dengan konsentrasi meningkat secara bertahap, yaitu dari 70%, 80%, 90%, 96% (*absolute*). Kemudian dilakukan *clearing* pada testes mencit dalam *xylol solution* atau *chloroform* atau *benzene*. Selanjutnya dilakukan *embedding* menggunakan parafin cair dan testis *mice* diletakkan dalam *molds* berisi parafin cair. Sebelum diwarnai dan dilakukan pengirisan, pengirisan dilakukan dengan menggunakan *microtome* dan *mounted* pada *glass objects*. Selanjutnya pewarnaan dilakukan penghilangan dari parafin dengan *xylol* kemudian diletakkan dalam *alcohol solution* dengan konsentrasi menurun dan kemudian diletakkan pada prosedur pewarnaan H&E. Tahap akhir setelah pewarnaan selesai dilakukan *mounting*, diletakkan dalam air atau alkohol untuk menghilangkan kelebihan pewarnaan. Kemudian diletakkan ke dalam *alcohol solution* dengan konsentrasi meningkat, dan kemudian dimasukkan ke dalam xylol. Preparat kemudian ditutup dengan *cover glass* dan *mounted* dengan Canada balsam atau *Entellan*. Pemeriksaan histopatologi dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 200 kali. Observasi dan identifikasi regenerasi dari tubulus seminiferus adalah didasarkan pada deskripsi histologi yang ada.[103]

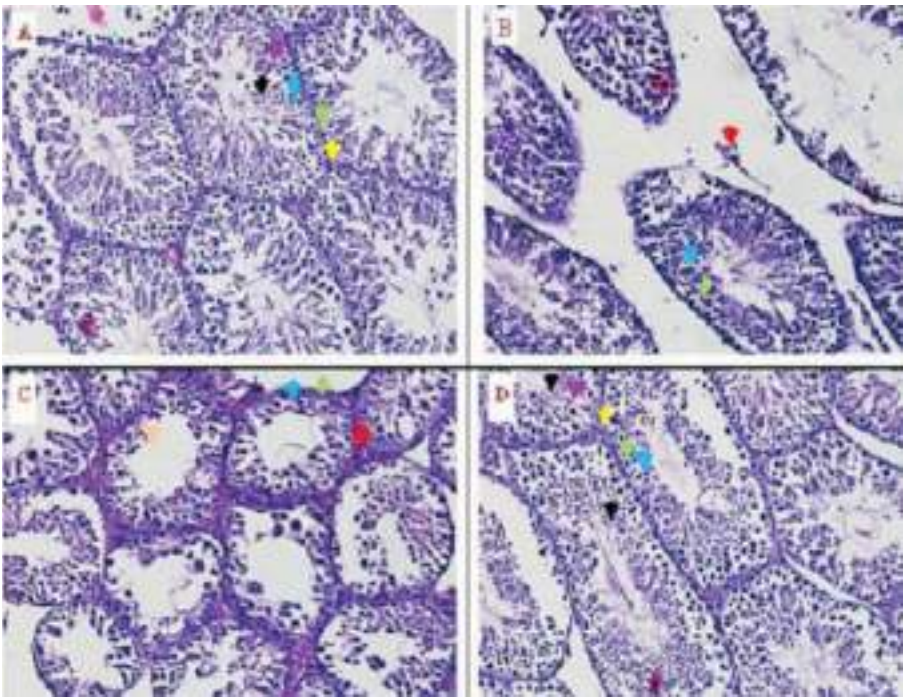
Observasi berikutnya adalah berupa pengamatan pada ekspresi HSP70 and PGE2 secara *Immunohistochemical* (IHC), yaitu didasarkan pada penentuan terekspresinya *Heat shock protein* 70 (HSP70) dan

Prostaglandine E2 (PGE2). Langkah awal sebelum proses IHC dibuat preparat histologi terlebih dahulu, dengan cara melakukan incise yang dibuat secara transversal dari jaringan testikuler dari *paraffin blocks*. Selanjutnya pengamatan dilakukan melalui teknik IHC menggunakan *monoclonal antibody* dari HSP70 (Catalog#MA3-006 50µl, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) dan PGE2 (Catalog#PTGER3 *Polyclonal Antibody* PGE2 for IHC 50µl, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Hal ini dilakukan untuk penentuan ekspresi dari HSP70 dan PGE2 yang secara regular menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 200 kali dan ekspresi pada masing-masing variabel adalah diindikasikan dengan jumlah sel dengan *brownish discoloration chromogen* pada masing-masing incisi[111] observasi regular menggunakan Nikon H600L *equipped luminescence microscope* dengan DS Fi2 digital camera 300 megapixels dan *cell count* Nikon *Image System* dan *image processing software*.

Adapun langkah terakhir adalah melakukan analisis statistik terhadap jumlah sel Leydig, *spermatogonia, spermatocyte primary-secondary* dan sel spermatid serta skor dari ekspresi HSP70 dan PGE2 pada jaringan testikuler dari *male rat*. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS 17 for windows XP dengan tingkat kepercayaan 99% (α = 0.01) dengan *level significance* 0.05 (p=0.05).

Secara detail, hasil penelitian tersebut memapaparkan efektivitas dari terapi madu didasarkan pada: terekspresinya HSP70 dan PGE2 serta terjadinya regenerasi dari jaringan testikuler. Regenerasi diobservasi berdasarkan perbaikan dari jumlah dari *Leydig* dan sel *spermatogenik (spermatogonia, spermatocyte primer-secondary* dan spermatid). Regenerasi tersebut diobservasi melalui metode histopatologi anatomi (HPA) dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE). Observasi mikroskopis menunjukkan bahwa ada perbaikan pada tubulus seminiferous dengan 50% (v/v) terapi madu (T2). Perbaikan ini didasarkan pada regenerasi dari tubulus seminiferous, *leydig, sertoli*, sel *spermatogonia, primary-secondary spermatocyte*, dan spermatid (Gambar 5.11D, Tabel 5.6).

Selanjutnya, perbaikan dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (T-) yang tidak mengalami degenerasi, hal ini mengindikasikan kondisi normal (Gambar 5.11A). Pada kelompok degenerasi testis dengan 30% (v/v) terapi madu (T1), tidak menunjukkan perbaikan dari jaringan testikuler (Gambar 5.11C). Tidak adanya perbaikan tubulus seminiferous, adalah mengindikasikan bahwa terjadi kerusakan pada *tubulus seminiferous*. Gambaran kerusakan dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (T+), tikus jantan dengan degeneratif testikular (Gambar 5.11B).



Gambar 5.11 Identifikasi dari jaringan tubulus seminiferous dan sel Leydig dari testikuler tikus melalui metode histopatologi anatomi (HPA) dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE) pada beberapa perlakuan. Panah kuning (⇩) = normal sel Leydig, panah merah (⇩) = nekrosis sel Leydig, panah hijau (⇩) = sel *spermatogonia*, panah biru (⇩) = *spermatocyte primary-secondary*, panah hitam (⇩) = sel spermatid normal, panah oranye (⇩) = nekrosis sel spermatid, panah ungu (⇩) = sel Sertoli.

Pada kelompok kontrol positif (T+) ada penurunan yang significant pada jumlah dari keempat sel (*Leydig, spermatogonia, primary-secondary spermatocytes* dan *spermatids*) ($p<0,05$) dibandingkan dengan tiga kelompok yang lain (T-, T1, and T2) (Tabel 5.6, Gambar 5.11). Pada Tabel 5.6 menunjukkan bahwa 30% (v/v) terapi madu (T1) masih menunjukkan perbedaan signifikan ($p<0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif maupun kelompok 50% (v/v) terapi madu (T- and T2).

Berdasarkan Tabel 5.6, perlakuan 50% (v/v) madu (T2) menurun yang tidak berbeda secara signifikant ($p>0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (T-) berdasarkan pada jumlah dari sel *spermatogonia, primary-secondary* dan *spermatid*. Bagaimanapun, perlakuan 50% (v/v) madu (T2) tetap menunjukkan penurunan yang signifikan ($p<0,05$) dibanding dengan kelompok kontrol negatif (T-) pada keduanya, baik jumlah sel Leydig maupun sel *spermatid*.

Selanjutnya, peningkatan respons *immune* untuk *regenerative signal* didasarkan pada ekspresi HSP70, pada kelompok kontrol normal (T–) dengan skor $0.15^{a} \pm 0.5$. Kelompok kontrol positif (T+) dengan skor $3.15^{c} \pm 0.4$. Kelompok 30% (v/v) madu (T1) dengan skor $2.95^{c} \pm 0.35$. Kelompok 50% (v/v) madu (T2) dengan skor $1.75^{b} \pm 0.15$ (Tabel 5.7)

Selain hal tersebut, peningkatan respons *immune*, juga didasarkan pada ekspresi PGE2, pada kelompok kontrol normal (T–) dengan skor $1.15^{b} \pm 0.00$. Kelompok kontrol positif (T+) dengan skor $0.19^{a} \pm 0.53$. Kelompok 30% (v/v) madu (T1) dengan skor $0.27^{a} \pm 0.39$. Kelompok 50% (v/v) madu (T2) dengan skor $2.95^{c} \pm 0.45$ (Tabel 5.7).

Tabel 5.6 Jumlah sel Leydig, *spermatogonia, spermatocyte primary-secondary,* dan *spermatid* pada beberapa perlakuan.

Perlakuan	Rerata Sel Leydig ±SD	Rerata *Spermatogonia* ±SD	Rerata *Spermatocyte Pri-Sec* ±SD	Rerata *Spermatid* ±SD
Kontrol Negatif (T0-) Tikus Normal, Tanpa Madu	15.75 ± 0.50^{d}	34.25 ± 2.45^{d}	65.25 ± 1.60^{d}	75.50 ± 1.40^{d}
Kontrol Positif (T0+) Tikus *Infertile*, Tanpa Madu	4.25 ± 1.85^{a}	13.55 ± 1.57^{a}	30.44 ± 1.73^{a}	13.15 ± 1.70^{a}
Kelompok T1 : Tikus *Infertile* diberi 30% madu dalam air minum selama 10 hari	6.85 ± 1.60^{b}	23.53 ± 1.34^{b}	42.35 ± 1.40^{b}	26.53 ± 1.34^{b}
Kelompok T2 : Tikus *Infertile* diberi 50% madu dalam air minum selama 10 hari	10.75 ± 0.50^{c}	39.75 ± 1.35^{cd}	58.75±1.54^{cd}	49.65 ± 1.75^{c}

^{a,b,c} *Superscript* berbeda pada kolom sama mengindikasikan perbedaan signifikan p<0.005.

Tabel 5.7 Skor dari HSP70 dan PGE2 pada beberapa perlakuan.

Perlakuan	Rerata Skor HSP70±SD	Rerata Skor Ekspresi PGE2 ±SD
Kontrol Negatif (T0-) Tikus Normal, Tanpa Madu	0.15 ± 0.5^{a}	1.15 ± 0.00^{b}
Kontrol Positif (T0+) Tikus *Infertile*, Tanpa Madu	3.15 ± 0.4^{c}	0.19 ± 0.53^{a}
Kelompok T1 : Tikus *Infertile* diberi 30% madu dalam air minum selama 10 hari	2.95 ± 0.35^{c}	0.27 ± 0.39^{a}
Kelompok T2 : Tikus *Infertile* diberi 50% madu dalam air minum selama 10 hari	1.75 ± 0.15^{b}	2.95 ± -0.45^{c}

^{a,b,c} Superscript berbeda pada kolom sama mengindikasikan perbedaan signifikan p<0.005

Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian madu dengan dosis 50% (v/v) dari lebah *Apis dorsata* pada air minum selama 10 hari pada kelompok T2 dapat digunakan sebagai terapi pada *male rat* dengan

degenerasi pada tubulus seminiferous dan sel Leydig. Efektivitas dari madu lebah *Apis dorsata* pada penelitian tersebut didasarkan pada beberapa hal seperti identifikasi dari *tubulus seminiferous* dan sel Leydig yang mengalami regenerasi. Termasuk jumlah sel Leydig*, spermatogonia, primary-secondary spermatocyte, spermatid,* dan peningkatan respons *immune* seperti HSP70 dan PGE2 untuk menginduksi *stem cells* endogen.

Regenerasi dari *tubulus seminiferous* dan sel Leydig ditandai dengan jaringan yang menjadi *intact* (utuh). Hasil penelitian tersebut, regenerasi diobservasi melalui metode *histopathology anatomy* (HPA) dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE). Observasi mikroskopis menunjukkan bahwa ada perbaikan pada tubulus seminiferous dengan 50% (v/v) madu (T2). Perbaikan ini didasarkan pada regenerasi dari tubulus seminiferous, sel Leydig*, sel sertoli, sel spermatogonia, sel primary-secondary spermatocyte,* dan *sel spermatid* (Gambar 5.11D, Tabel 5.6). Selanjutnya, perbaikan tersebut dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (T-) yang tidak mengalami degenerasi, hal ini mengindikasikan kondisi yang normal (Gambar 5.11A). Pada kelompok degenerasi testis dengan pemberian 30% (v/v) madu (T1), tidak menunjukkan perbaikan dari jaringan testis (Gambar 5.11C). Tidak adanya perbaikan tubulus seminiferus adalah sebuah indikasi kerusakan pada tubulus seminiferous. Gambaran kerusakan dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (T+), *male rat* dengan degenerasi testikuler (Gambar 5.11B).

Kerusakan juga terjadi pada sel Leydig, sel Sertoli, dan sel spermatid, di samping hal tersebut ada penurunan jumlah dari sel *spermatogonia*, *primary,* dan *secondary spermatocyte* (Gambar 5.11B, Tabel 5.6). Pada kelompok 30% (v/v) madu (T1), *tubulus seminiferous* masih terlihat kerusakan, sel Leydig, sel sertoli dan sel spermatid masih rusak dan ada penurunan dari jumlah, baik sel spermatogonia, sel *primary-secundary spermatocyte* menunjukkan hal yang sama (Gambar 5.11C, Tabel 5.6).

Regenerasi dari jaringan testis diobservasi berdasarkan jumlah dari sel Leydig*, spermatogonia, primary-secondary spermatocyte*, dan *spermatid*. Berdasarkan Tabel 5.6, dapat disimpulkan bahwa perlakuan pemberian

50% (v/v) madu (T2) lebih rendah tidak signifikan (p>0,05) dibandingkan kelompok kontrol negatif (T-) berdasarkan pada jumlah dari sel *spermatogonia, primary* dan *secondary*. Tetapi pada perlakuan pemberian 50% (v/v) madu (T2) masih menunjukkan penurunan dan secara *signifikan* berbeda (p <0.05) daripada kelopok kontrol negatif (T-) pada jumlah sel Leydig dan sel spermatid. Hal ini berarti bahwa 50% (v/v) madu (T2) telah menunjukkan hasil regenerasi jaringan tubulus seminiferous, tetapi jumlah sel Leydig belum sama dengan kelompok normal (T-). Efek ini berakibat pada levels dari produksi *testosterone*, menunjukkan bahwa sel Leydig adalah sel yang berperan pada produksi hormon *testosterone* dari *male*.[112] Demikian pula, jumlah dari sel *spermatid* tidak sama dengan kelompok normal (T-). Hal ini akan memengaruhi jumlah sel spermatozoa yang terbentuk dari perubahan morfologi sel *spermatid* menjadi sel spermatozoa.

Selanjutnya, peningkatan respons *immune* seperti HSP70 dan PGE2 untuk induksi *stem cells* endogen dapat memobilisasi *stem cells* menuju tempat yang *defect*. Proses mobilisasi dapat terjadi melalui beberapa cara, salah satunya adalah peningkatan respons *immune* yang menginduksi reaksi *inflammatory* akibat *signal injury* seperti NFkB, Wnt melalui *beta-catenin* dan *Cytokines* dari jaringan yang rusak.[113] Pada penelitian tersebut, *injury* terjadi akibat signal malnutrisi menyebabkan peningkatan HSP70 dan penurunan PGE sehingga kerusakan pada jaringan testikuler tidak dapat dihindari. Kerusakan pada jaringan testikuler adalah menyebabkan terganggunya penyerapan makanan yang dibutuhkan oleh jaringan testikuler termasuk tubulus seminiferus sebagai tempat sumber utama dari proses spermatogenesis.[114]

Kondisi membutuhkan bantuan, khususnya perbaikan pada jaringan testikuler sebagai jaringan utama organ reproduksi dari jantan. PGE2 telah diketahui mempunyai efek *cytoprotective* pada testikuler *epithelium*. Efek *cytoprotective* muncul sebagai hasil kemampuan kompleks untuk menstimulasi *mucus* dari mucosal sehingga meningkatkan aliran darah pada mucosal, sehingga menghambat penyerapan asam agar tidak kembali masuk dalam epithelium.[115] Selanjutnya, *stem cells* berproliferasi secara kontinu untuk menyuplai sel sehingga berdiferensiasi menjadi sel Leydig, sertoli, dan

spermatocyte. Hal ini sesuai dengan opini, bahwa madu dari *Apis dorsata* akan menyebabkan *stem cells* berkembang dengan cepat dan berdiferensiasi menjadi sel yang dibutuhkan sebagai sebuah respons dari *defect* dan peningkatan respons *immune*.[116] Regenerasi dari jaringan testikuler, seperti: *intact* atau utuhnya jaringan testikular dan dapat diobservasi melalui metode histopatologi anatomi (HPA) dengan pewarnaan HE. Pemeriksaan mikroskopis menunjukkan bahwa kelompok 50% (v/v) madu (T2), menyebabkan terjadinya perbaikan jaringan testikuler. Perbaikan adalah diidentifikasikan berdasarkan regenerasi dari jaringan testikuler dengan disertai terjadinya proses spermatogenesis. Gambaran perbaikan dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (T–) yang tidak mengalami degenerasi testikuler, yang masih pada kondisi normal dengan jaringan testikuler yang *intact*. Pada kelompok 30% (v/v) madu (T1) tidak terindikasi terjadinya perbaikan jaringan testikuler. Tidak adanya perbaikan pada jaringan testikulear yang tidak *intact* lagi (*broken*). Gambaran dari kerusakan dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (T+) dengan degenerasi testikuler. Kelompok kontrol positif (T+), testikuler mengalami kongesti dan hemorhagi yang ekstensif, juga terlihat hemosiderin (*yellow brown*) akibat lisisnya sel darah merah disertai dengan deposisi dari fibrin (*baby color pink*) mengindikasikan bahwa kongesti yang kronis telah terjadi. Kelompok dengan 30% (v/v) madu (T1), testikuler tidak mengalami regenerasi, tampak adanya kongesti sepanjang terekspresi hemosiderin dan hemorhagi yang meluas. Perlakuan 50% (v/v) konsentrasi madu selama 10 hari pada *male rat* dengan degenerasi testikuler menunjukkan (a) mobilisasi *stem cells* endogen (HSCs), (b) peningkatan respons *immune* dalam bentuk sedikit peningkatan pada ekspresi dari HSP70 dan peningkatan yang tinggi dari PGE2 secara imunohistokimia pada jaringan testikuler; (c) regenerasi dari jaringan testikuler, seperti: jaringan testikuler yang *intact*, meskipun masih ada sedikit hemorhagi dan kongesti tetapi ekspresi hemosiderin dan deposisi fibrin tidak terlihat kembali.

Selanjutnya, kelompok kontrol positif (T+) mengalami penurunan libido (didasarkan pada penurunan sel *Leydiq*), karena korteks adrenal menjadi *ineffective* dalam memproduksi *dehydroepiandrosterone* (DHEA) akibat

malnutrisi. Rendahnya *levels* dari DHEA di dalam darah dapat menyebabkan penurunan stamina tubuh, *fatigue* (kelelahan), dan juga penurunan libido. DHEA dproduksi oleh korteks adrenal dari renal[117] dan sel Leydig[112] adalah potensi utama sebagai prekursor dari hormon steroid seperti *testosterone*. Hal ini juga terjadi pada kelompok degenerasi testis yang diberi 30% (v/v) madu (T1) selama 10 hari. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian 30% dosis madu tidak mampu mengembalikan libido seperti pada kelompok kontrol negatif (T-).

DHEA yang meningkat sebagai sebuah precursor dari hormon steroid seperti *testosterone*, juga *responsible* untuk aktivitas sebagai *inhibitor enzyme* dari metabolisme lemak melalui inhibisi dari *glucose 6-phosphat dehydrogenase*, yang berperan sebagai biokatalisator yang mengubah glukosa menjadi lemak. Peningkatan DHEA diikuti peningkatan sejumlah ATP bebas di dalam tubuh, dan kemudian meningkatkan stamina tubuh,[118,119] Libido, dan fertilitas.[112]

Selanjutnya hasil penelitian tersebut memberikan kesimpulan bahwa efektivitas dari madu lebah *Apis dorsata* sebagai terapi didasarkan pada: deteksi molekuler dan *respons immune* yang ditimbulkan. Deteksi molekuler tersebut berupa peningkatan yang tinggi dari PGE2 dan sedikit peningkatan dari HSP70 yang terekspresi pada jaringan testikuler. Kedua protein tersebut, yaitu PGE2 dan HSP70 dapat membantu regenerasi dari tubulus seminiferous dan sel Leydig, perbaikan jumlah sel Leydig, sel *spermatogonia,* sel *primary-secondary spermatocytes,* dan sel *spermatid.*

APLIKASI MADU PADA BIDANG YANG LAIN

Beberapa komponen bioaktif madu berkhasiat untuk berbagai kehidupan manusia, seperti: sebagai antioksidan, antiosteoporosis, dan antibiotika alami.

1. Madu sebagai Antioksidan

Madu adalah suatu zat alami yang dihasilkan atau diproduksi oleh lebah madu memiliki aktivitas antioksidan enzimatik dan nonenzimatik. Madu adalah

merupakan larutan gula yang teramat jenuh, yang mengandung protein, vitamin, mineral, asam organik, flavonoid, senyawa fenolik, dan enzim seperti peroksidasa, katalase, glukosa oksida, dan juga fitokimia termasuk asam fenolik dan polifenol yang berfungsi sebagai antioksidan.[120]

Sifat antioksidan madu adalah berasal dari zat-zat enzimatik seperti, *glukosa oksidase, katalase,* dan *peroksidase* serta zat non-enzimatik seperti α-tokoferol, karotenoid, asam askorbat, asam amino, protein, produk reaksi *maillard*, asam fenolat, dan flavonoid. Jenis dan jumlah dari antioksidan ini tergantung pada sumber nektar bunga dan varietas dari madu. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara kandungan total dari fenol yang terdapat di dalam madu terhadap aktivitas antioksidan.[121] Selain daripada itu, madu adalah merupakan larutan gula yang sangat jenuh serta mengandung vitamin, asam organik, mineral, protein, flavonoid, senyawa fenolik, dan enzim seperti peroksida, glukosa oksidasi, katalase, dan fitokimia lainnya. Kondisi iklim dan geografis dari berbagai jenis madu memengaruhi kandungan berbagai fitokimia termasuk juga polifenol dan asam fenolik yang mempunyai peran penting sebagai antioksidan.

Flavonoid adalah polifenol utama dan terpenting ddalam madu dengan kandungan yang berbeda, yaitu berkisar antara 60 sampai 460 µg per 100 gram madu.[122] Madu hutan (*Apis dorsata*) memiliki kandungan *fenolic* dan flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan madu jenis lainnya, yaitu dengan nilai total fenolik 352,73 mg/kg dan total flavonoid 65,65 mg/kg, sedangkan madu *Apis melifera* memiliki total fenolik dan total flavonoid yang lebih rendah, yaitu dengan nilai 226,33 mg/kg dan 37,39 mg/kg, sedangkan madu *Apis cerana* mempunyai nilai total fenolik dan total flavonoid dengan kisaran nilai 206,33 mg/kg dan 25,81 mg/kg,[123] sehingga dapat disimpulkan bahwa antioksidan dari madu hutan (*Apis dorsata*) adalah lebih tinggi dibandingkan dengan madu jenis lain.

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghentikan reaksi berantai, baik melalui penangkapan maupun pengikatan terhadap radikal bebas.[124] Sifat antioksidan madu tergantung sumber nektar dan variasi jenis

tanaman.[121] Kandungan antioksidan pada madu hutan lebih tinggi daripada madu ternak. Hal ini dikarenakan madu hutan termasuk madu multiflora, dimana sumber nektarnya bervariasi berasal dari berbagai jenis tanaman yang dihinggapi lebah.[125] Aktivitas antioksidan berbanding lurus antara warna madu. Madu yang berwarna semakin gelap, mempunyai nilai total senyawa fenol dan flavonoid yang lebih tinggi, yang berarti mempunyai aktivitas antioksidan juga lebih tinggi.[126] Analisis warna madu menurut standar warna USDA menunjukkan bahwa nilai intensitas madu hutan (*Apis dorsata*) lebih tinggi daripada madu *Apis mellifera* yaitu 113,00 : 76,00.[123]

Kandungan senyawa antioksidan yang terkandung di dalam madu hutan *Apis dorsata* meliputi asam askorbat, asam fenolat, fenolik, flavonoid, asam organik, asam amino, enzim glukosa oksidase dan katalase, protein dan turunan karotenoid.[127] Antioksidan utamanya adalah senyawa fenolik dan flavonoid.[128] Flavonoid berikatan dengan radikal bebas akan membentuk senyawa yang lebih stabil seperti oksigen dan air dengan mendonorkan atom hidrogennya, sedangkan senyawa fenolik memiliki gugus hidroksil yang dapat menangkap radikal peroksida dan berperan sebagai inhibitor proses oksidasi radikal bebas.[129]

Dalam menangkal radikal bebas, pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa cara seperti *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC), *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH), *Cupric Ion Reducing Antioxidant* (CUPRAC) dan *Ferric Reducing Ability of Plasma* (FRAP). Di antara metode tersebut, metode DPPH yang paling banyak digunakan.[130]

Analisis sifat antioksidan senyawa fenol diketahui menggunakan metode *spectrophotometric Folin-Ciocalteu*, dibaca dengan T60 spektrofotometer UV Vis menunjukkan hasil sebesar 352,73 ± 0,81 mg asam galat/kg. Analisis senyawa flavonoid diketahui menggunakan *colorimetric assay* menunjukkan hasil sebesar 65,65 ± 0,74 mg katekin/kg. Analisis kandungan senyawa asam askorbat diketahui dengan mengukur *Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity* (AEAC) menunjukkan hasil sebesar 276,96 mg/kg.[123]

Tabel 5.8 Kandungan Antioksidan pada Beberapa Madu [123].

Madu dari	Fenol mg asam galat/kg	Flavonoid mg katekin/kg	Asam askorbat mg AEAC/kg
Apis mellifera	186,70	21,98	244,10
Apis cerana	206,33	25,81	270,40
Apis dorsata	352,73	65,65	276,96

Efek antioksidan yang dimiliki madu dikarenakan kandungan vitamin C, polifenol, flavonoid, betakaroten, mangan, dan masih banyak zat aktif lain yang mampu menjadi pelindung bagi sel tubuh termasuk sel gamet jantan spermatozoa. Madu adalah merupakan salah satu antioksidan yang mampu menetralisir keberadaan radikal bebas, baik dari segi kerusakan DNA yang diinduksi maupun akibat yang ditimbulkan seperti produksi *reaktif oxygen species* (ROS) yang berlebihan. Melalui pemberian madu terbukti dapat memperbaiki kualitas dari sel yang mengalami kerusakan. Antioksidan yang terkandung didalam madu mampu menetralisir dan dapat bereaksi mengeliminasi radikal bebas, yaitu baik dari segi kerusakan DNA yang diinduksi maupun akibat produksi ROS yang berlebihan, dengan demikian pemberian madu dapat memperbaiki kualitas dari jaringan atau tulang bahkan sel.

Madu yang juga berperan sebagai antioksidan bagi tulang. Madu seperti diketahui memiliki komposisi berupa bahan bioaktif yang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat tinggi.[131] Osteoporosis yang merupakan gangguan pada tulang dapat dihubungkan dengan *oxidative stress* (OS) yang diakibatkan oleh ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan aktivitas protektif antioksidan.[132] Ketika tubuh mengalami OS dan bersamaan terjadi penurunan hormon estrogen pada wanita *menopause*, maka akan terjadilah akumulasi dari lemak. Akumulasi dari lemak yang berlebih ini dapat menginduksi terjadinya apoptosis *osteoblast* dan secara simultan akan mengatur peningkatan produksi ROS, hidrogen peroksida dan anion superoksida.[133] Mitokondria memproduksi ROS dan menginduksi *a series of retrogadrade signaling,* sehingga merubah potensi transmembran mitokondria,

mengaktivasi *calcineurin* dan *Ca^{2+} dependent kinase* kemudian pada akhirnya menginduksi diferensiasi dari *osteoclast*.[134]

Senyawa ROS juga dapat mengaktivasi NF-κB yang merupakan molekul pro inflamasi sehingga dapat meningkatkan *osteoclastogenesis* dan selanjutnnya menginduksi *signalling* RANK sehingga terjadilah diferensiasi dari *osteoclast.*[133] Secara tidak langsung ROS menginduksi *osteoclast* melalui *osteoblast/osteoclast coupling* dan selanjutnya diferensiasi *osteoclast* melalui RANKL.[134]

Pada tikus yang diberi perlakuan *ovariectomy* terdapat penurunan enzim antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroxidase* (GPx), *glutathione-s-transferase* (GST), dan *Catalase* (Cat) akibat peningkatan *lipid peroksidase* dan *hidrogen peroksidase*.[133,134] Hidrogen peroksida dan lipid peroksida yang meningkat menyebabkan ketergantungan sel yang membebaskan ROS diperlukan suplementasi bahan yang memiliki antioksidan yang tinggi.[133]

Suplementasi madu yang memiliki kandungan gula tinggi selain juga memiliki komponen minor yang tinggi seperti flavonoid, senyawa fenol dan asam organik. Selanjutnya selain flavonoid, kandungan asam organik dari madu juga diketahui memiliki aktivitas antioksidan, yaitu melalui *metal chelation,* sehingga terjadi peningkatan pengaruh flavonoid melalui enzim *glucose oxidase* dan *catalase*.[135]

Mekanisme bagaimana madu dalam upaya meningkatkan absorbsi *Calsium* (Ca) yang dibutuhkan oleh tulang agar osteoporosis dapat dicegah dapat dijelaskan sebagai berikut, bahwa mekanisme madu dalam melawan osteoporosis dapat terjadi melalui beberapa cara kerja baik secara langsung maupun secara tidak langsung. Secara tidak langsung, yaitu dengan cara madu melakukan mekanisme penurunan pH dari lumen usus. Mekanisme tersebut dijalankan oleh bakteri pembentuk asam yang ada di dalam lumen usus seperti *Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium bifidum,* dan *Lactobacillus delbrukeii sub. sp. Bulgaricus*.[136]

Hasil penelitian menunjukkan bahwa madu dapat meningkatkan produksi asam laktat, sehingga menyebabkan terjadinya penurunan pH pada lumen usus.[136] Bakteri yang ada di dalam pencernaan akan menerima *nondigestible*

carbohydrate[137] dan asam glukonat yaitu asam organik mayor yang terkandung di dalam madu.[138] Selanjutnya asam glukonat akan difermentasi oleh bakteri dan diolah menjadi asam laktat dan asam asetat.[138] Bakteri pencernaan di dalam hal ini juga didukung oleh sifat madu yang bertindak sebagai prebiotik yang menguntungkan bagi usus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi asam laktat dan asam asetat sebanding dengan frukto oligosakarida, galakto oligosakarida atau inulin. Oligosakarida yang ada di dalam madu menujukkan aktivitas prebiotic, sehingga terjadi peningkatan populasi bakteri non patogen, seperti *lactobacilli* dan *bifidobacteria.* Pertumbuhan, aktivitas, dan viabilitas mikroorganisme tidak dipengaruhi oleh jenis oligosakarida atau sumber nektar yang berbeda pada madu.[136] Aktivitas bakteri juga dipengaruhi adanya *nondigestible carbohydrate* yang ada di dalam madu. Senyawa tersebut tidak tercerna oleh enzim yang ada di lumen usus. Bakteri yang ada di dalam *caecum* dan *colon* akan menggunakan *nondigestible carbohydrate* menjadi *short-chain fatty acid* (SCFA) yang dapat meningkatkan keasaman di dalam lumen usus.[137] Selain *nondigestible carbohydrate, acid-utilizing bacteria* seperti *Megasphaera elsdenii* dan *Mitsuokella multiacida,* akan mengubah senyawa tersebut menjadi bentuk butirat. Bentuk butirat ini merupakan salah satu jenis SCFA yang cepat diabsorbsi oleh usus.[138]

Peningkatan akumulasi senyawa asam tentu saja akan meningkatkan keasaman di dalam usus. Hal inilah yang menyebabkan kelarutan mineral terabsorbsi di dalam lumen usus, salah satunya seperti peningkatan Ca yang dibutuhkan untuk tulang.[136,138] Penelitian *in vitro* juga menunjukkan CaCo-2 *cells* memberikan sugesti bahwa *nondigestible carbohydrate* secara tidak langsung akan membuka *tight junction* pada sel epitel melalui peningkatan konsentrasi ion Ca intrasel. Lebih lanjut, *Nondigestible carbohydrate* juga meningkatkan transport Ca secara aktif melalui aktivasi calbindin-D9k.[137]

2. Madu sebagai Antiosteoporosis

Madu merupakan suatu substansi yang juga berperan sebagai anti-osteoporosis. Madu dalam hal ini berfungsi untuk memberikan terapi dalam rangka mempertahankan atau meningkatkan massa tulang dan kekuatan tulang

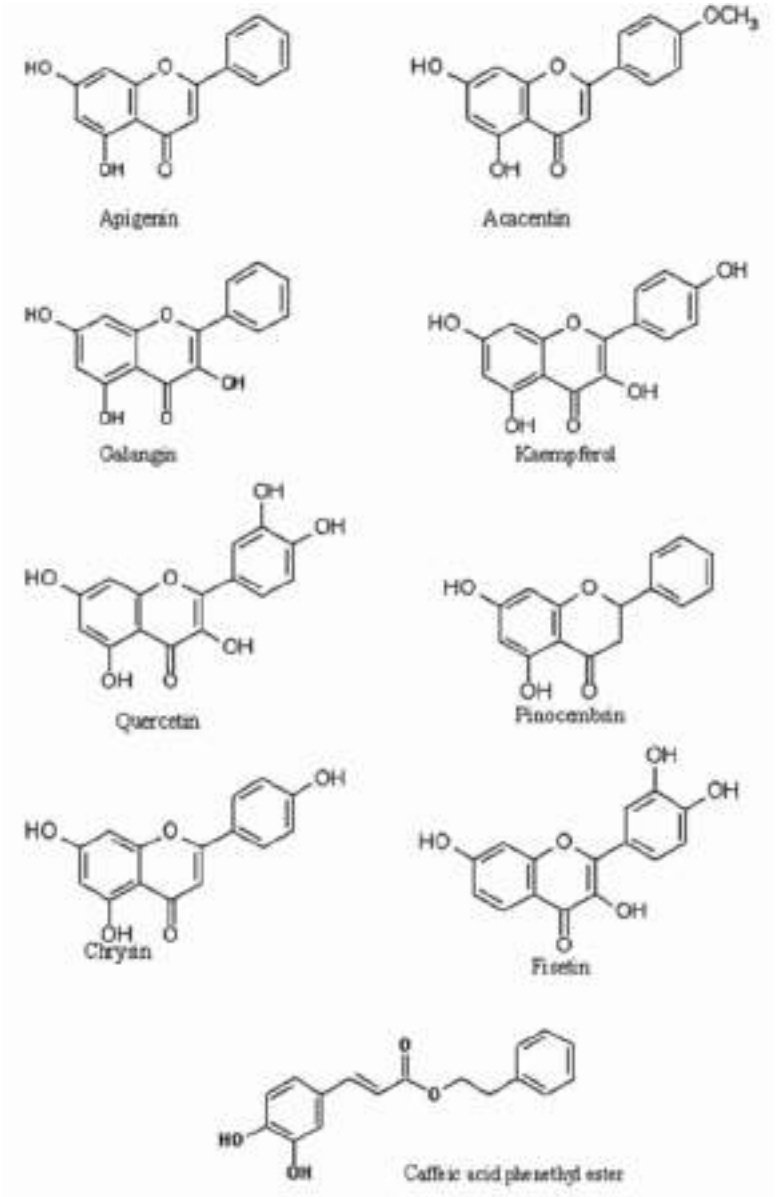
dengan cara sedemikian rupa sehingga dapat menurunkan risiko terjadinya fraktur. Anti-osteoporosis sendiri terbagi dalam dua golongan. Golongan yang pertama adalah golongan yang bersifat *anti-resorptif*, yaitu mempertahan jaringan tulang. Golongan kedua merupakan agen yang bersifat *restorative* tulang atau agen anabolik. Terapi Anti-resorptif memiliki target mengurangi *turnover* dari jaringan tulang. Medikasi yang bersifat restorasi pada jaringan tulang akan mengurangi terjadinya risiko fraktur, yaitu dengan jalan melalui restorasi hingga tingkat osteopenia. *Anti-resorptif* merupakan suatu upaya pencegahan sedangkan restorasi jaringan tulang merupakan medikasi atau tindakan pengobatan terhadap osteoporosis.[139]

Mekanisme Madu sebagai Antiosteoporosis

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa madu memiliki efek sebagai anti-osteoporosis.[133,138,140] Pemberian madu yang dikombinasikan dengan *exercise* terbukti dapat meningkatkan *serum total calcium concentration*.[141] Madu yang dikombinasikan dengan α-*Cyclodextrin* menunjukkan penurunan aktivitas RANKL dan *nuclear factor-activated T-cells c1* (NFATc1) sebagai penginduksi osteoporosis.[142] Madu juga dapat meningkatkan absorbsi Ca di lumen usus melalui peningkatan keasaman dan peningkatan ion Ca intrasel dari epitel usus sehingga membuka *tight junction* yang berperan dalam fisiologi absorbsi dari Ca.[137]

Mekanisme madu sebagai anti-osteoporosis juga didukung adanya senyawa polifenol yang terkandung di dalam madu. Sebanyak 8000 polifenol yang diketahui, 500 di antaranya adalah senyawa bioaktif. Polifenol yang paling banyak tersedia dan banyak dikaji adalah flavonoid.[134] Namun demikian madu memiliki kandungan senyawa polifenol yang lain seperti asam protokatekuat, *p*-OH asam benzoat, asam klorogenat, asam vanilat, asam *caffeic*, asam siringat, epicatechin, *p*-asam kumarat, asam ferulat, rutin, apigenin, ishoramnetin,[143] kaempferol, quercetin, *ellagic acid,* asam gallat, hesperetin, catechin,[133] myricetin, pinobanksin, galangin, luteolin, chrysin, pinocembrin, genistein,[127] *synapic acid* dan asam klorogenat.[144] Semua senyawa polifenol tersebut dapat dideskripsikan menggunakan kromatografi, seperti pada Gambar

4.2. Perhitungan besaran senyawa fenol dan flavonoid satuan yang digunakan adalah equivalent asam gallat dan equivalent quercetin.[131]



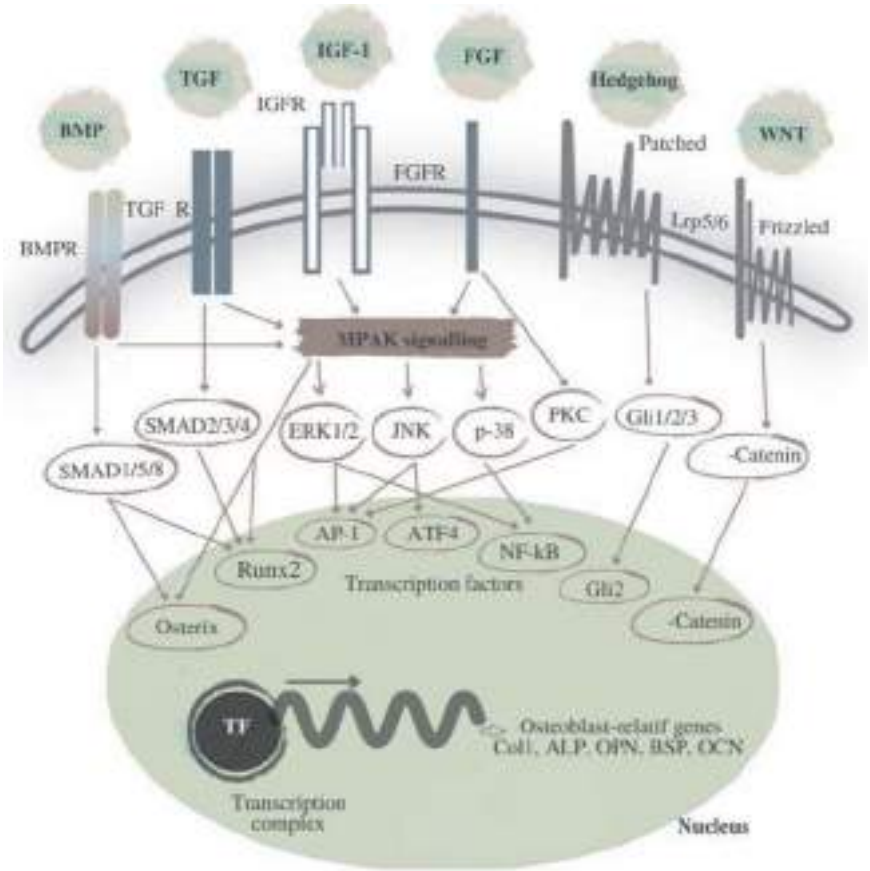
Gambar 5.12 Kromatografi Flavonoid pada Madu.[135]

Kandungan flavonoid pada madu memiliki peran dalam melindungi osteoporosis melalui lima mekanisme. Mekanisme tersebut antara lain, mengurangi *bone loss* melalui aksi antioksidan, mengurangi *bone loss* melalui aksi antiinflamasi, meningkatkan *osteoblastogenesis*, menekan *osteoclastogenesis*, dan bekerja pada *osteoimmunological action*.[134]

Mekanisme Kerja Madu dalam Meningkatkan *Osteoblastogenesis*

Osteoblast adalah berasal dari *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs). MSCs untuk menuju derivat osteoprogenitor membutuhkan beberapa ekspresi dari gen spesifik.[145] Osteoblastogenesis terjadi melalui beberapa tahapan yang harus dilalui, seperti proses proliferasi, sintesis dari matriks ekstraseluler, maturasi dan disertai mineralisasi. Diferensiasi menjadi *osteoblast* distimulasi oleh beberapa hormon dan *local factor* yang bertindak pada *signalling pathway* di dalam sel pada *osteoprogenitor lineage.* Beberapa jalur seperti BMP, *fibroblast growth factor,transforming growth factor*-β*, insulin-like growth factor,* WNT (*wingless-type MMTV integration site family*), *hedgehog,* dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) juga terlibat pada proses diferensiasi tersebut.[146] Jalur bagaimana sinyal transduksi pada *osteoblast* dapat terjadi, ditunjukkan pada Gambar 5.13.

Lebih lanjut pada fase proliferasi setelah *osteoblast progenitor pool* memberikan ekspresi *Runt-related transcription factor-2* (Runx2), maka *ColIA1* telah berada pada proses diferensiasi *osteoblast*. Pada fase ini *osteoblast progenitor* menunjukkan aktivitas ALP dan menjadi *preosteoblast*. Selanjutnya proses maturasi melalui *binding* pada protein matriks ektraseluler dari tulang, *osteoblast,* dan sel lain yang memiliki pengaruh diferensiasi menghasilkan sitokin dan *growth factor*.



Gambar 5.13 Jalur transduksi sinyal dalam fungsi regulasi osteoblas modifikasi.[146]

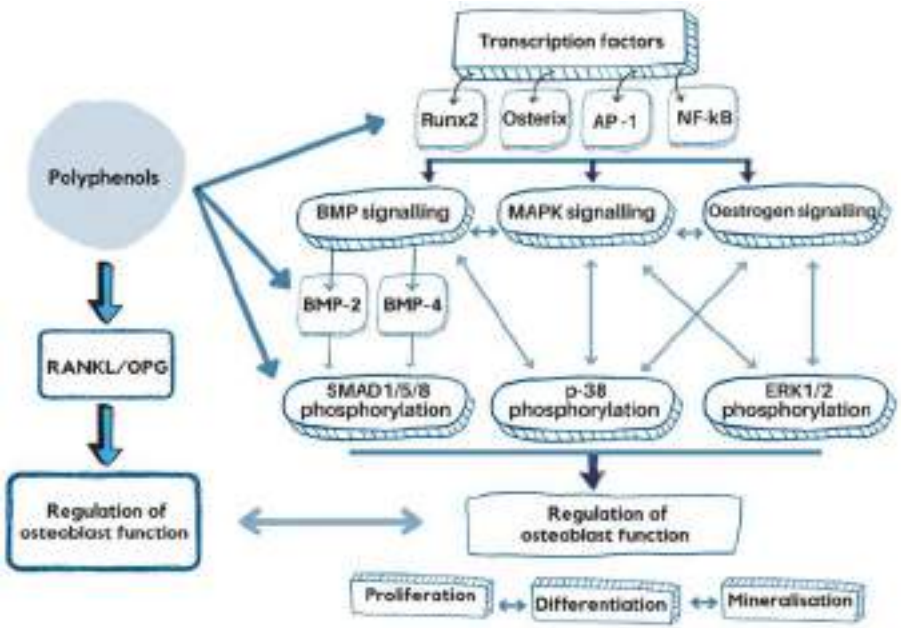
Karakteristik *osteoblast* transisi dari *preosteoblast* menjadi *osteoblast* terjadi karena adanya peningkatan ekspresi *Osterix* (Osx) dan sekresi matriks jaringan tulang seperti *Osteocalcin* (OSC), *bone sialoprotein* (BSP) dan kolagen tipe I. Tahap selanjutnya *osteoblast* akan mengalami perubahan baik morfologi maupun ukurannya, perubahan bentuk yang terjadi adalah bentukan kuboid, sedangkan ukurannya menjadi lebih besar.[145] *Osteoblast* yang *mature* akan dikelilingi oleh *bone* matriks agar menjadi osteosit sebagai hasil akhir.[146]

Osteoblast dalam melakukan beberapa tahap seperti proliferasi, diferensiasi, dan mineralisasi tersebut melalui modulasi yang diinduksi oleh

polifenol. Polifenol secara selektif dapat bertindak pada protein kinase dan lipid kinase sebagai *signalling cascade osteoblast* seperti protein kinase B (PKB/Akt) (*serine/threonine kinase*), protein kinase C, MAPK, *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K), dan *tyrosine kinase*. Flavonoid juga dapat memengaruhi molekul *activator protein-1* (AP-1) dan NF-κB yang terdiri atas kompleks *c-jun/c-fos* yang juga dapat memengaruhi jalur MAPK. *Signalling* sel dapat diaktivasi melalui interaksi baik pada permukaan sel atau melalui protein ekstraseluler.[146]

Aktivasi faktor transkripsi seperti *Runx2* dan *Osx* adalah efektif dan esensial dalam meregulasi fungsi *osteoblast.* Kedua faktor transkripsi *Runx2* dan *Osx* dapat menginduksi terjadinya proses diferensiasi melalui aktivasi beberapa gen yang terlibat di dalamnya. Peningkatan regulasi ekspresi faktor transkripsi *Runx2* dan *Osx* dapat terjadi melalui regulasi catechin pada konsentrasi dan durasi pemaparan tertentu. Peningkatan regulasi ekspresi faktor transkripsi *Runx2* dan *Osx* secara signifikan dapat dengan terjadi melalui *marker* ALP dan OSC pada sel. Kaempferol juga dapat menurunkan aktivasi NF-κB. Adapun *Quercetin* dapat meningkatkan translokasi JunD, c-jun dan aktivitas ikatan AP-1 DNA. Regulasi osteoblas oleh polifenol terdapat pada Gambar 4.4.

Flavonoid yang terkandung dalam madu mempunyai mekanisme melalui aktivasi ER dan menstimulasi *ER-dependent transcriptional response* pada model sel yang berbeda. Sebanyak lima macam senyawa flavonoid menunjukkan aktivitas AChE yang kuat serta *anchor protein PriMA*. Induksi aktivasi AChE oleh flavonoid berbeda dari regulasi estrogen pada kultur *osteoblast* [147] (Tabel 4.7). Beberapa laporan menyatakan bahwa senyawa flavonoid seperti *quercetin* dan *rutin* [131] dapat menginduksi proliferasi, diferensiasi dan mineralisasi pada *osteoblast* melalui peningkatan yang simultan pada produksi *osteoprogenitor*.[148] Flavonoid dapat menginduksi fungsi *osteoblast* dan sebaliknya dapat menghambat *osteoclast*. Induksi diferensiasi terjadi pada *osteoblast like MG-63 cell line* dan sebaliknya menghambat *tumor necrosis factor* (TNF) yang merupakan *signalling* pada MC3T3-E1 mencit *osteoblast cell line*.[149]



Gambar 5.14 Regulasi osteoblas oleh polifenol modifikasi.[146]

Quercetin dan *Rutin* meningkatkan diferensiasi, proliferasi, maturasi, mineralisasi *bone marrow mesenchymal stem cells* (BMMSCs). Studi menunjukkan peningkatan ALP sehingga disebut memiliki efek anabolik. Isoflavon, flavonol seperti *epigallocatechin* dan *icariin* juga telah diteliti dan dilaporkan menunjukkan aktivitas osteogenik yang mencolok secara *in vitro* dan *in vivo*. *Genistein (isoflavone)* menyebabkan *cell cycle arrest* dan apoptosis sel leukemik yang dapat menstimulasi proliferasi dan diferensiasi *osteoblast.* Di antara isoflavonoid, genistein dengan kelompok gugus OH- memiliki affinitas ikatan lebih tinggi pada ER dibanding daidzein atau formonetin yang juga kelompok gugus OH-.[148]

Tabel 5.9 Jenis senyawa flavonoid yang menunjukkan aktivitas ALP dan AChE.[147]

Flavonoid	ALP	AchE
Alpinetin	++	+
Farrerol	+	-
Naringenin	+	-
Neohespedin		+
Baicalin	+	++
Luteolin	+	-
Calycosin	+	++
Daidzein	+	-
Daidzin	+	-
Genistein	+	-
Genistin	+	++
Pratensein	++	++
4',7-$OCOCH_3$ puerain	+	-
Tectorigenin	+	+
Galangin	+	-
Hyperin	+++	+++
Icariin	+	+
Kaempferol	++	+
Kaempferol-3-Oglucoside	+	-
Quercetin	+	+
Dex + Vit C	++	+

Peningkatan mineralisasi *osteoblast* merupakan tujuan utama dari terapi anabolik tulang. Kaempferol berperan dalam menstimulasi formasi nodul termineralisasi. Kaempferol menunjukkan aktivitas kerja *anti-resorptive* dan produksi ALP pada MG-63 *osteoblast-like cells* melalui jalur ER *pathway*. Pengaruh kaempferol pada tikus ovariektomi memiliki perbandingan yang sama dengan kelompok SHAM (sebagai kontrol), yang menunjukkan bahwa kaempferol menghambat *bone turnover* akibat defisiensi estrogen misal pada kondisi wanita menopause akan meningkatkan diferensiasi *osteoblast* dengan *marker* produksi ALP dan diferensiasi nodul termineralisasi. Penurunan

kapasitas BMCs untuk berdiferensiasi menjadi adiposit oleh kaempferol menunjukkan kemungkinan penurunan osteoclastogenesis akibat formasi adiposit yang lebih sedikit.[149]

Mekanisme Madu dalam Menekan *Osteoclastogenesis*

Osteoclast merupakan akhir dari diferensiasi *multinucleated cell* yang berasal dari sel mononuklear *Hematopoietic Stem Cell* (HSCs). Faktor-faktor yang memengaruhi osteoclastogenesis adalah *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) yang disekresikan oleh osteoprogenitor MSCs dan *osteoblast*, serta RANKL yang disekresi oleh *osteoblast* dan sel stroma. Faktor-faktor tersebut menginduksi aktivasi faktor transkripsi dan ekspresi gen. Sitokin M-CSF berikatan dengan reseptornya, cFMS, menunjukkan prekursor yang akan menstimulasi proliferasi dan inhibisi apoptosis *osteoclast*. Senyawa RANKL merupakan faktor krusial yang apabila berikatan dengan RANK akan menginduksi formasi *osteoclast.* Lawan dari RANKL adalah OPG. Apabila OPG berikatan dengan RANKL maka proses induksi melalui sistem RANK terhambat. OPG diproduksi oleh *osteoblast,* sel stroma, sel fibroblas ginggiva, dan periodontal.[145]

Polifenol dapat berikatan dengan ER-α dan ER-β.[138,147,150] Kedua reseptor ER-α dan ER-β terdapat di *osteoblast* dan *osteoclast*.[151] ER yang berikatan dapat memberikan efek *pre-osteoclast* apoptosis melalui produksi *Fas Ligand* (FasL).[152] Flavonol seperti *kaempferol* dan *quercetin* dapat menginduksi apoptosis *osteoclast* secara langsung yang dilakukan dengan uji *in vitro*.[150,138] Asam *caffeic* yang merupakan polifenol dapat menghambat RANKL melalui mekanisme modulasi Ca^{2+} *signalling pathways*. Genistein yang merupakan isoflavone mampu menghambat RANKL yang berikatan dengan reseptornya pada pembentukan ROS yang berfungsi seperti sitokin sebagaimana TNF-α pada osteoclast. *Galangin* mampu menghambat formasi *osteoclast*.[132] *Quercetin* dapat menurunkan deferensiasi *osteoclast* melalui RANKL.[148] Senyawa kaempferol dan quercetin mampu menurunkan aktivitas sTRAP yang merupakan marker pada aktivitas *osteoclast,* $TRAP_{5b}$, dan inflamasi, $TRAP_{5a}$.[153]

Mekanisme Madu sebagai Antiinflamasi Osteoporosis

Produksi beberapa sitokin inflammasi, seperti IL-6, IL-7, IL-1, *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) dan TNF-α oleh sel imun dapat meningkat pada keadaan defisiensi estrogen, seperti pada kondisi wanita *menopouse*.[154] Sitokin inflamasi pada osteoporosis dapat bertindak sebagai faktor yang memperparah kondisi osteoporosis.[155] Hal tersebut dapat terjadi dikarenakan efek yang diberikan secara sinergetik pada pembentukan RANKL oleh *osteoblast*.[156] Sitokin proinflamasi IL-1 dan TNF-α mengaktifkan jalur *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) pada sel-sel tulang dan pada akhirnya menginduksi *bone loss*.[134]

Efek antiinflamasi dari madu dapat secara ringkas dijelaskan melalui beberapa mekanisme kerja. Mekanisme kerja tersebut antara lain, hambatan pada pembentukan atau formasi dari ROS, hambatan infiltrasi dari leukosit, hambatan pada *cyclooxygenase-2* (COX-2) dan hambatan produksi MMP9. Salah satu flavonoid seperti *Chrysin* yang terkandung dalam madu, menekan ekspresi *lipopolisakarida-induced* COX-2 melalui inhibisi aktivitas faktor nuklear IL-6 *DNA-binding* sehingga menghambat pelepasan NO dan sitokin proinflammasi seperti TNF-α dan IL-1β. Adapun *apigenin* dan *kaempferol* dari madu mampu menekan TNF-α dan menginduksi ekspresi MMP9. Mekanisme tersebut dapat terjadi melalui modulasi Akt *signalling*. Apigenin juga secara efektif mampu menghambat IL-1β-*induced* MMP9 mRNA *expression* pada osteoblast.[157] Polifenol yang terdapat di dalam madu bertindak sebagai anti inflammasi yang berhubungan pada inhibisi enzim proinflamasi seperti COX-2, LOX, dan iNOS, inhibisi juga terjadi pada NF-κB dan AP-1 serta terjadi aktivasi fase II dari enzim *detoxifying antioxidant*, MAPK, *Nuclear factor erythroid 2 related factor 2,* dan protein kinase C.[134] Efek antiinflammasi juga terjadi melalui TLR1/TLR2 *signalling pathway.* Pengaruh tersebut menunjukkan korelasi antara kandungan senyawa fenol madu. Tingginya kandungan senyawa fenol menghasilkan produksi efek antiinflamasi yang tinggi pula.[158]

Mekanisme Kerja Madu terhadap *Osteoimmunological Action*

Beberapa penyakit yang menyerang tulang juga telah dihubungkan dengan aktivitas sel imun, seperti pelepasan sitokin proinflamasi dengan konsekuensi lanjutan produksi RANKL oleh *osteoblast*. Sel inflamasi seperti sel limfosit T yang berperan menstimulasi terjadinya osteolisis, dan juga aktivasi serta kejadian yang dimediasi diferensiasi *osteoclast*. Limfosit T yang terativasi akan menstimulasi osteoclastogenesis secara in vitro. Makrofag yang teraktivasi juga mensekresikan sitokin proinflamasi seperti interleukin (IL)-1, TNF-α, dan IL-6 yang memiliki efek sinergis dengan RANKL yang dilepaskan oleh *osteoblast. Macrophage inflammatory protein-1*α dan β tidak hanya menginduksi proliferasi sel tumor namun juga menginduksi peningkatan formasi *osteoclast* yang memediasi resorpsi jaringan tulang. IFN-γ, IL-1 dan TNF-α juga dapat menghambat sintesis kolagen oleh *osteoblast*.[156]

Madu dalam hal ini dapat bertindak sebagai imunomodulator. Polifenol yang terkandung di dalam madu diketahui dapat bertindak sebagai modulasi sistem imun.[159] Data menunjukkan senyawa polifenol dapat menurunkan jumlah *commited monocyte* $CD115^+$ atau reseptor sel positif M-CSF dibandingkan tikus yang di*ovariectomy* sebagai kelompok kontrol.[160]

Madu sebagai Antibakteri dan Antibiotika Alami

Madu juga dapat bertindak sebagai antibiotika, yaitu dalam upaya mencegah terjadinya pertumbuhan bakteri seperti *Shigela, S. coli, Salmonela* dan *V. chlorerae* sebagai penyebab terjadinya diare. Pada penelitian di mana madu sebagai antibiotika dengan menghilangkan kadar gulanya. Ternyata hasil penelitian menunjukkan bahwa madu tanpa gula mempunyai efektivitas yang sama seperti antibiotika sintetik streptomisin. Sehingga dapat dikatakan bahwa madu dapat bertindak sebagai bakteriolisis (menghilangkan) maupun bakteriosid (mematikan) terhadap agen bakteri.

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa madu juga dapat menjadi menghambat pertumbuhan mikroba yang bersifat patogen seperti *Staphylococcus aerus, Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes, Escherecia coli* dan *Bacillus aereus*. Hal tersebut didasarkan hasil penelitian yang

menunjukkan terbentuknya zona atau area penghambatan yang dihasilkan oleh madu terhadap kultur media yang telah ditanami oleh berbagai bakteri tersebut.[161]

Penelitian yang lain menyebutkan bahwa madu dapat menghambat terjadinya kerusakan pada daging kalkun yang telah dikemas. Potongan dari daging kalkun yang telah dikemas tersebut serta yang telah ditambahkan madu pada konsentrasi tertentu. Hal ini menyebabkan masa simpan potongan daging kalkun lebih lama daripada yang tanpa penambahan madu.[162]

Bagaimana cara pengawetan daging yang dilakukan oleh orang zaman dahulu, yaitu dengan cara mencelupkan potongan-potongan daging tersebut ke dalam madu dan selanjutnya disimpan di dalam lubang-lubang kayu yang terdapat pada pepohonan dengan jarak beberapa puluh sentimeter dari permukaan tanah. Selanjutnya lubang tersebut ditutup dengan ranting pohon hingga penuh dan kemudian dibiarkan untuk beberapa lama. Bahkan bisa mencapai sampai 1 tahun, dan terbukti nyata bahwa kondisi daging tersebut masih dalam keadaan baik dengan cita rasa yang baik pula.

Sifat antibakteri pada madu dikarenakan ada suatu senyawa kimia *lysozyme*, jadi bukan karena kadar gula yang tinggi di dalam madu. Senyawa tersebut berperan sebagai *inhibine*, yaitu penghambat pertumbuhan bakteri, terutama pertumbuhan bakteri negatif dibandingkan bakteri gram positif. Namun demikian peran sebagai *inhibine* dari madu ditentukan oleh jenis, umur, dan kondisi madu.

Satuan kemampuan *inhibine* dinyatakan dengan bilangan *inhibine*, yang berkisar antara 0–5. Contoh jika diujikan pada bakteri tertentu seperti *Staphylococcus aereus*, di mana ditambahkan 4% madu di dalam agar padat, bila bilangan *inhibine* adalah 1, artinya madu dalam keadaan encer dan tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Madu dikatakan dapat menghambat pertumbuhan bakteri jika mempunyai bilangan *inhibine* 5, artinya madu lebih pekat, di mana pada penelitian tersebut 20% madu di dalam media agar padat. Bahkan dalam penelitian tersebut selain mencegah bahkan memusnahkan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aereus*. Dengan demikian, dapat diambil kesimpulan bahwa semakin tinggi bilangan *inhibine*,

maka semakin tinggi pula daya antibiotiknya. Namun demikian jumlah bilangan *inhibine* yang terdapat di dalam madu tergantung pada kondisi dari madu, umur, maupun jenisnya. Salah satu kelemahan dari bilangan *inhibine* adalah mudahnya mengalami kerusakan pada suhu 60°C dalam waktu 15 menit.

Sebenarnya meski telah disebutkan banyak khasiat dari madu, namun masih banyak lagi kandungan senyawa yang lainnya di dalam madu yang masih belum terungkap secara ilmiah. Beberapa senyawa bioaktif di dalam madu terdapat pada Tabel 5.10.

Tabel 5.10 Senyawa Bioaktif pada Madu.[163]

Nama Senyawa	Rumus Kimia	Sumber
Abscisic acid	5-(1-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxocyclohex-2-en-1-yl)-3-methyl pentadienoic acid	2
8-methoxy-kaempferol	3,5,7,4′-Tetrahydroxy-8-methoxyflavone	1
Caffeic acid	*3(3,4-Dihydroxyphenyl)-prop-2-enoic acid*	3
Apigenin	*5,7,4′-Trihydroxyflavone*	1
Chrysin	*5,7-Dihydroxyflavone*	1,4,5
Chlorogenic acid	*3-Caffeoylquinic acid*	3
p-Coumaric acid	*3(4-Hydroxyphenyl)-prop-2-enoic acid*	3
Ellagic acid	*4,4′,5,5′,6,6′-Hexahydroxydiphenic acid 2,6,2′,6′-dilactone*	3
Ferulic acid	*3(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)-prop-2-enoic acid*	3 & 5
Gallic acid	*3,4,5-Trihydroxybenzoic acid*	3
Galangin	*3,5,7-Trihydroxyflavone*	1
Isorhamnetin	*3,5,7,4′-Tetrahydroxy-3′methoxyflavone*	1
Hesperetin	*5,7,3′-Trihydroxy-4′-methpxyflavanone*	3
Kaempferol	*3,5,7,4′-Tetrahydroxyflavone*	1,3
Luteolin	*5,7,3′,4′-Tetrahydroxyflavone*	1
Quarcetin	*3,5,7,3′,4′-Pentahydroxyflavone*	1,3,4
Pinocembrin	*5,7-Dihydrixyflavone*	4

Keterangan:
1. Lab. of Phytochemikstry, Dep.of Food Sci & Tech. CEBAS (CSIS), Murcia-Spain.
2. The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia. Lab. of Plant Physiology, Dep. Of Botany,
3. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO-USA.
4. Extrasynthese, 69726-Genay Cedex-France.
5. Alderich Chemical-Co., Milwaukee, WI-USA

Sifat aktivitas sebagai antibiotika alami dari madu disebabkan oleh beberapa efek atau faktor seperti di bawah ini:

1. Efek Osmotik

   Madu dapat dikatakan sebagai media hiperosmotik. Hal ini dikarenakan madu mengandung komponen gula yang terdiri atas glukosa dan fruktosa, sehingga dapat disebut juga sebagai *supersaturated solution* (larutan lewat jenuh). Larutan *supersaturated solution* yang bersifat hiperosmotik akan menyebabkan organisme bersel satu akan mati terbunuh. Terbunuhnya organisme bersel satu tersebut dikarenakan larutan hiperosmotik akan menarik cairan dari tubuh organisme, sehingga organisme tersebut menjadi kehilangan cairan pada tubuhnya sebagai akibat dari adanya perbedaan tekanan osmosis yang sangat besar, yaitu yang lebih besar dari 2000 milliosmols.

   Lebih lanjut adanya interaksi yang sangat kuat antara molekul air dengan molekul gula akan menyebabkan molekul air bebas yang tersedia bagi mikroorganisme menjadi sangat sedikit. Molekul air bebas ini terukur sebagai aktivitas air atau *water activity* (Aw), dengan nilai antara 0.56−0.62. Hal inilah yang menjadi penyebab organisme bersel satu akan mengalami hambatan pada pertumbuhannya dengan aktivitas air yang terlalu rendah.

2. Faktor Fitokimia

   Beberapa senyawa fitokimia pada madu yang telah terdentifikasi diduga juga dapat berperan sebagai antibakteri. Senyawa tersebut antara lain: 3,5-*dimethoxy*-4-*hydroxybenzoic* (*syringic acid*), *pinocembrin*, *benzyl alcohol*, *terpene*, *methyl* 3,5 *dimethoxy*-4-*hydroxybenzoate* (*methyl syringate*), 3,4,5-*trimethoxybenzoic acid*, 1,4-*dihydroxybenzene,* 2-*hydroxy*-3-*phenylpropionic acid* dan 2-*hydroxybenzoic acid*. Namun demikian, dikarenakan rendahnya kadar tersebut di dalam madu maka peran fitokimia sebagai antimikroba juga rendah.

3. Efek Keasaman

   pH dari madu adalah cukup rendah yaitu berkisar antara 3,4 sampai 6,1, sehingga madu dapat dikelompokkan dalam makanan asam. Asam utama yang terkandung di dalam madu adalah asam glukonat yang dihasilkan oleh dextrose melalui keberadaan enzim *glukosa oksidase* yang berada pada madu. Rendahnya pH dari madu ini yang menjadikan madu dapat menjadi penghambat dari pertumbuhan bakteri. Madu yang memiliki keasaman rendah biasanya didapatkan pada madu yang belum diencerkan atau madu yang masih kental.

4. Faktor Hidrogen Peroksida

   Salah satu agen antibakteri yang lain adalah hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida ini dihasilkan melalui proses enzimatis. Enzim tersebut adalah *glukosa oksidase* yang dihasilkan oleh lebah pada kelenjar hipofaring yang berperan membantu pembentukan madu. Adapun reaksi hidrogen peroksida serta keasaman yang dibentuk adalah sebagai berikut:

   Glukosa + H_2O (air) + O_2 → asam glukonat + H_2O

DAFTAR PUSTAKA

1. Trounson A. and McDonald C. 2015. Stem cell therapies in clinical trials: Progress and challenges. Cell Stem Cells, 17(1): 11-22.
2. Watt FM. and Driskell RR. 2010. Review: The therapeutic potential of stem cells. Philos. Trans. R. Soc., 365: 155-163.
3. Safitri E, Utama S, Widiyatno TV, Sandhika W. and Prasetyo RH. 2016. Autoregeneration of mice testicle seminiferous tubules due to malnutrition based on stem cells mobilization using bee honey. Asian Pac. J. Reprod. 5(1): 30-34.
4. Prasetyo RH. and Safitri E. 2016. Effects of honey to mobilize endogenous stem cells in efforts intestinal and ovarian tissue regeneration in rats with protein energy mal nutrition. Asian Pac. J. Reprod. 5(3): 198-203.
5. Caplan AI. and Correa D. 2011. The MSC: An injury drugstore. Cell Stem Cells. 8: 11-15.

6. Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML. and Srojkovic M. 2011 Concise review: Mesenchymal stem cells treatment of the complications of diabetes mellitus. Stem cells regenerative medicine. Stem Cells. 29(1): 5-10.
7. Halim DH, Murty F, Sandra A, Boediono T, Djuwantono, B. and Setiawan, B. 2010. Stem Cell Dasar Teori dan Aplikasi Klinis. 1st ed. Penerbit Erlangga, Jakarta. p1-10.
8. De-Souza N. 2014. Self-organizing stem cells. Nat. Methods, 11(31): 29-37.
9. Hu C. and Li L. 2015. Review: In vitro culture of isolated primary hepatocytes and stem cell-derived hepatocyte-like cells for liver regeneration. Protein Cell. 6(8): 562-574.
10. van-Agthoven M, Groot MT, Verdonck LF, Lo-Wenberg B, Schattenberg AV, Oudshoorn M, Hagenbeek A, Cornelissen JJ, Uyl-de-Groot CA. and Willemze R. 2012. Economic study cost analysis of HLA-identical sibling and voluntary unrelated allogeneic bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation in adults with acute myelocytic leukaemia or acute lymphoblastic leukaemia. Bone Marrow Transplant. 30(4): 243-251.
11. Hozzein W. 2016. Bee venom accelerates diabetic wound healing by suppressing the activating transcription factor-3 and inducible nitric oxid synthase-ediated oxidative stress and by recruiting bone marrow-derived endothelial progenitor cells in diabetic mice. Proceeding 13th Asian Apicultural Association Conference. April, 2016. Jeddah, Kingdom of Saudi Arabia. p134-135.
12. Aggarwal S. and Pittenger MF. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 10(4): 1815-1822.
13. Najm F, Madhavan M, Zaremba A, Shick E, Karl RT, Factor DC, Miller TE, Nevin ZS, Kantor C, Sargent A, Quick KL, Schlatzer DM, Tang H, Papoian R, Brimacombe KR, Shen MN, Boxer MB, Jadhav A, Robinson AP, Podojil JR, Miller SD, Miller RH. and Tesar PJ. 2015. Drug-based modulation of endogenous stem cells promotes functional remyelination in vivo. Nature, 522(7555): 216-220.
14. Macey MG. 2007. Flow Cytometry, Principle and Aplications. 1st ed. Human Press, Totowa, NJ. p1-31.
15. Sakri FM. 2012. Madu dan Khasiatnya, Suplemen Sehat Tanpa Efek Samping. 1st ed. Diandra Pustaka Indonenesia. Yogyakarta. p20-25.
16. Nabiuni M, Azimi E, Shiravi A. and Nazari Z. 2012. Honey bee venom will differentiate mesenchymal stem cells in to the osteocyte. International

Conference on Applied Life Sciences, (ICALS 2012), Turkey. September. 10-12. p247-250.
17. Kumar GL. and Rudbeck L. 2009. Immunohistochemical Staining Methods. 5th ed. Dako North America, Carpinteria, California. p11-14.
18. Caplan AI. 2007. Adult mesenchymal stemcells for tissue engineering versus regenerative medicine. Mini review. J. Cell Physiol. 213(2): 341-347.
19. Wendy WP, Priceb EA, Sahooa D, Beermanc I, Maloneyd WJ, Rossic DJ, Schrierb SL. and Weissmana IL. 2011. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. PNAS, 108(50): 20012-20017.
20. Santoro NF. and Cooper AR. 2016. Primary Ovarian Insufficiency - Clinical Guide to Early Menopause. e-Book. 1st ed. Springer, Switzerland. p82-83.
21. Rantam FA, Ferdiansyah M. and Purwati A. 2014. Stem Cell Mesenchymal, Hematopoetik dan Model Aplikasi. 2nd ed. Airlangga University Press, Surabaya. p45-50, 145-155.
22. Safitri E, Widiyatno TV. and Prasetyo RH. 2016. Honeybee product therapeutic as stem cells homing for ovary failure. Vet World., 9(11): 1324-1330.
23. Eckmann L. 2006. Animal models of inflammatory bowel disease, lesson from enteric infections. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1072: 28-38.
24. Sengupta P. 2013. The Laboratory rat: Relating its age with human's. Int. J. Prev. Med. 4(6): 624-630.
25. Harrington AM, Olteanu H. and Kroft SH. 2012. A dissection of the CD45/side scatter "Blast Gate". Am. J. Clin. Pathol. 137(5): 800-804.
26. Rantam FA, Ferdiansyah M, Nasronudin and Purwati A. 2009. Stem Cell Exploration. Methods of Isolation and Culture. 1st ed. Airlangga University Press, Surabaya.
27. Crosby K, Simendinger J, Grange C, Ferrante M, Bernier T. and Stanen C. 2016. Immunohistochemistry protocol for paraffin-embedded tissue section-advertisement. Cell Signal. Technol., Available from: https://www. jove.com/immunohistochemistry-protocol-for. Accessed on 15-06-2016.
28. Palermo R. 2007. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. Reprod. Biomed. Online. 5(3): 326-337.
29. Barker N. 2014. Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15(1): 19-33.

30. Vander-Flier LG. and Clevers H. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. Annu. Rev. Physiol. 71: 241-260.
31. Hermann M, Varrier S. and Mauro A. 2015. Strategies to stimulate mobilization and homing of endogenous stem and progenitor cells for bone tissue repair. Front. Bioeng. Biotechnol. 2(3): 79.
32. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TJ, Lu N. and Matzuki MM. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature. 383(6600): 531-535.
33. Dussaubat C, Brunet JL, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, Choi JH, Martın-Herna R, Botias C, Cousin M, McDonnell C, Bonnet M, Belzunces LP, Moritz RFA, Conte YL. and Alaux CD. 2012 Gut pathology and responses to the microsporidium nosemaceranae in the honey bee Apis mellifera. PLoS One. 7(5): 1-12.
34. Filho FLT. Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang J, Shimasaki S. and Erickson GF. 2001. Abberant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of polycystic ovary syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 87: 1337-1344.
35. Lee HJ, Salesniemi K, Niikura Y, Niikura T, Klein R, Dombkowski DM. and Tilly JL. 2007. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. J. Clin. Oncol. 25: 198-204.
36. Dan S, Haibo L. and Hong L. 2014. Review: Pathogenesis and stem cell therapy for premature ovarian failure. OA Stem Cells. 2(1): 1-8.
37. Vidueiros SM, Fernandez I, Slobodianik N, Roux ME, Pallaro A. 2008. Nutrition disorder and immunologic parameters: study of the intestinal villi in growing rats. J Nutr. 24(6): 575-581.
38. Nahed M, Hassanein A, Hamed MR. 2008. Impact of protein malnutrition on susceptibility to experimentally-induced testicular macrophage dysfunction. J Appl Sci Res. 4(12): 2161-2168.
39. Chinen J. and Shearer WT. 2010Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. J Allergy Clin Immunol. 125(2): 195-203.
40. Costa LB, JohnBull EA, Reeves JT, Sevilleja JE, Freire RS, Hoffman PS, *et al*. 2011. Cryptosporidium-malnutrition interactions: mucosal disruption, cytokines, and TLR signaling in a weaned murine model. J Parasitol. 97(6): 1113-1120.

41. Costa LB, Noronha FJ, Roche JK, Sevilleja JE, Warren CA, Oria R, *et al*. 2012. Novel ´in vitro and in vivo models and potential new therapeutics to break the vicious cycle of Cryptosporidium infection and malnutrition. J Infect Dis. 205(9): 1464-1471.
42. Rodrigues RS, Oliveira RA, Li Y, Zaja-Milatovic S, Costa LB, Braga Neto MB, *et al*. 2013. Intestinal epithelial restitution after TcdB challenge and recovery from Clostridium difficile infection in mice with alanyl-glutamine treatment. J Infect Dis. 207(10): 1505-1515.
43. Castro IC, Oliveira BB, Slowikowski JJ, Coutinho BP, Siqueira FJ, Costa LB, et al. 2012. Arginine decreases Cryptosporidium parvum infection in undernourished suckling mice involving nitric oxide synthase and arginase. J Nutr. 28(6): 678-685.
44. Roche JK, Rojo AL, Costa LB, Smeltz R, Manque P, Woehlbier U, et al. 2013. Intranasal vaccination in mice with an attenuated Salmonella enterica Serovar 908htr A expressing Cp15 of Cryptosporidium: impact of malnutrition with preservation of cytokine secretion. J Vaccine. 31(6): 912-918.
45. Gatei W. Unique Cryptosporidium population in HIV-infected person Jamaica. Emerg Infect Dis. 2008. 31(3): 208-217.
46. Prasetyo RH. 2010. Perubahan ekspresi CD4, IgA, PGE2 dan Hsp70 mukosa usus Mus musculus Balb C kurang energy protein yang diinfeksi Cryptosporidium [Dissertation]. 1st ed. Surabaya: Airlangga University Press. p. 1-10.
47. Safitri E, Utama S, Bumi C, Mulyani SWM, Susilowati H, Retnowati E, *et al*. 2013. The role of adaptive MSCs an attempt regeneration of spermatogenesis process using by hypoxia precondition in vitro. J Anim Prod Adv. 3(11): 318-322.
48. Song H, Song BW, Cha MJ, Choi IG, Hwang KC. 2010. Expert opinion modification of mesenchymal stem cells for cardiac regeneration. Expert Opin Biol Ther. 10(3): 309-319.
49. Halim DH, Murty F, Sandra A, Boediono T, Djuwantono B, dan Setiawan B. 2010. Stem cell dasar teori dan aplikasi klinis. 1st ed. Bandung: Universitas Padjadjaran. p. 1-10.
50. Caplan AI, Correa D. 2011. The MSC: an injury drugstore. Cell Stem Cell. 6(8): 11-15.

51. Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Srojkovic M. 2011. Concise review: mesenchymal stem cells treatment of the complications of diabetes mellitus. Stem Cells. 29(1): 5-10.
52. Prasetyo RH. and 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 Pac. J. Reprod. 5(3); 198-203.
53. Sakri FM. 2012 Madu dan khasiatnya, suplemen sehat tanpa efek samping. 1st ed. Diandra Pustaka Indonenesia Yogyakarta. p. 11-15.
54. Macey MG. 2007. Flowcytometry, principle and applications. 3rd ed. Totowa: Humana Press. p. 1-31.
55. Kumar GL. and Rudbeck L. 2009. Immunohistochemical staining methods. 5th ed. Carpinteria, California: Dako North America. p. 11-14.
56. Eckmann L. 2007. Animal models of inflammatory bowel disease, lesson from enteric infections. Ann N Y Acad Sci. 1072: 28-38.
57. Rantam F, Nasronudin P. 2009 and Poerwati. Stem cell exploration. Methods of isolation and culture. 1st ed. Surabay: Airlangga University Press. p. 20-25.
58. Barker N. 2014. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. Nat Rev Mol Cell Biol. 10(15): 19-33.
59. Flier van der LG, Clevers H. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. Annu Rev Physiol. 71: 241-260.
60. Dussaubat C, Brunet JL, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, Choi JH, et al. 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium nosema ceranae in the honey bee Apis mellifera. PLoS One. 7(5): 1-12
61. Safitri
62. Halim DH, Murty F, Sandra A, Boediono T, Djuwantono B, dan Setiawan B. 2010. Stem cell dasar teori dan Aplikasi Klinis. 1st ed. Jakarta: Penerbit Erlangga. p. 1-10.
63. Safitri E, Utama C, Bumi C, Mulyani SWM, Susilowati H, Purwati, et al. 2013. Stem cells through an adaptation in low oxygen tension as an attempt to increase cellular transplantation efficacy for spermatogenesis process. J Anim Prod Adv. 3(11): 318-322.
64. Hafez ESE. 2010. Reproduction in farm animal. 7th ed. New York: Lippincot William & Wilkins. p.48–p.52; 59–62; 68–80; 90–94.
65. Bhaskara AW. 2008. Khasiat dan Keajaiban Madu untuk kesehatan dan kecantikan. 1st ed. Yogyakarta: Smile-Books-Yogyakarta. p. 15-33.

66. Sakri FM. 2012. Madu dan khasiatnya, suplemen sehat tanpa efek samping. 1st ed. Diandra: Pustaka. p. 11-15.
67. Fikri. 2009. Lebah, anugerah sang Pencipta. 1st ed. Indonesia: Herbal. p. 9-25.
68. Naqvi SAR, Mahmood N, Naz S, Hussain Z, Sherazi TA, Khan ZA, et al. 2013. Antioxidant and antibacterial evaluation of honey bee hive extracts using in vitro models. Mediterr J Nutr Metab. 6(1): 247-253.
69. Silva TMS, Santos FPD, Evangelista-Rodrigues 2013. A. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. J Food Chem. 1141(4): 3552-3558.
70. Parwata IMOA, Ratnayani K, dan Listya A. 2010. Aktivitas aantiradikal bebas serta kadar beta karoten pada madu randu (Ceiba pentandra) dan Madu Kelengkeng (Nephelium longana L.). J Kim; 4(1): 54-62.
71. Prasetyo RH. 2010. Perubahan ekspresi CD4, IgA, PGE2 dan Hsp70 mukosa usus Mus musculus Balb C kurang energy protein yang diinfeksi cryptosporidium. 1st ed. Surabaya: Airlangga University Press; 2010, p. 1-10.
72. Safitri E, Utama S, Prasetyo RH, Hariadi M, Rantam HA. 2014. Quiescence stem cells (qscs) fo the treatment of infertility in male mice. Asian Acad Res J Multidisc. 1(28): 123-127.
73. Macey MG. 2007. Flowcytometry, principle and applications. 3rd ed. Jakarta: Human Press. p. 1-31.
74. Kumar GL, Rudbeck L.2009. Immunohistochemical staining methods. 5th ed. California: Dako North America: Carpinteria. p. 11-14.
75. Eckmann L. 2007. Animal models of inflammatory bowel disease, lesson from enteric infections. Ann N Y Acad Sci. 1072: 28-38.
76. Rantam Ferdiansyah, Nasronudin Purwati. 2009. Stem cell exploration. Methods of isolation and culture. 1st ed. Surabaya: Airlangga University Press. p. 20-25.
77. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song SH, Lee CK, Hong JT. 2007. Therapeutic application of anti arthritis, pain-releasing and anti cancer effects of bee venom and its constituent compounds. Pharmacol Ther. 115: 361-763.
78. Nabiuni M, Hoveizi E, Parivar K, Azarnia M, Khodadadi S. 2012. Neural differentiation and developmental effects of honey bee venom on PC12 cells: a comparison to nerve growth factor (NGF). J Adv Lab Res Bio. 34(1): 213-219.

79. Dennis EA. 2011. Bradshaw RA. Intercellular signaling in development and disease. 1st ed. San Diego: Elsevier Inc. p. 121-129.
80. Jones DL and Wagers AJ. 2008 No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. Nat Rev Mol Cell Biol. 1(9): 11-21.
81. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, *et al*. 2007. Tie2/Angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cells quiescence in the bone marrow niche. Cell. 118(3): 149-161.
82. Shalaby, Kamal A, Saleh EM. 2011. Ameliorative effect of honey bee propolis on the nonylphenol induced-reproductive toxicity in male albino rats. Aust J Basic Appl Sci. 5(11): 918-927.
83. Safitri E, Widiyatno TV, Sandhika W. and Prasetyo RH. 2019. Effectivity of honey to regenerate the production of testosterone by induction of endogenous stem cells of rat with low libido due to malnutrition. Biocell. 43(4-1): 235-239 239.
84. Caplan AI, Correa D. 2011. The MSC: An injury drugstore. Cell Stem Cell. 6, 11-15.
85. Safitri E. and Hariadi M, 2019. Comparison of biotechnological culture of hypoxia-conditioned rat mesenchymal stem cells with conventional in vitro culture of normoxia-conditioned rat mesenchymal stem cells for testicular failure therapy with low libido in rats. Vet. World. 12, 916-924.
86. Safitri E, Widiyatno TV, Prasetyo RH. 2016. Honeybee product therapeutic as stem cells homing for ovary failure. Vet. World. 9: 1324-1330.
87. Hasib A, Muhamad R, Reksa TY, Artha AU, Safitri E. 2017. Utilization of Sumbawa tropical forest honey Apis dorsata to improve fertility of Indonesai oriental magpie robin (Copsyhus saularis). KnE Life Sci. 619- 626.
88. Naqvi SAR, Mahmood N, Naz S, Hussain Z, Sherazi TA, Khan ZA, 2013. Antioxidant and antibacterial evaluation of h
89. oney bee hive extracts using in vitro models. Mediterr. J. Nutr. Metab. 6, 247-253.
90. Silva TMS, Santos FPD, Evangelista-Rodrigues. 2013. A phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas. Northern Braz. J. Food Chem. 1141(4), 3552-3558.
91. Prasetyo RH. and Hestianah EP. 2017. Honey can repair damage of liver tissue due to protein energy malnutrition through induction of endogenous stem cells. Vet. World. 10, 711-715.

92. Safitri E, Utama S, Widiyatno TV, Sandhika W, Prasetyo RH. 2016. Auto-regeneration of mice testicle seminiferous tubules due to malnutrition based on stem cells mobilization using honey. Asian Pac. J. Reprod. 5:31-35.
93. 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 Pac. J. Reprod. 5:198-203.
94. Parwata IMOA, Ratnayani K, Listya A. 2010. Aktivitas aantiradikal bebas serta kadar beta karoten pada madu randu (Ceiba pentandra) dan madu kelengkeng (Nephelium longata L.). J. Kim. 4, 54-62
95. Safitri E, Utama S, Prasetyo RH, Hariadi M, Rantam H.A. 2014. Quiescence stem cells for the treatment of infertility in male mice. Asian Acad. Res. J. Multidisc. 1:123-127.
96. Canale D, Postonia S. 2000. Libido and Hormones. 21-23pp. CNS Spectrum. East Melbourne
97. Heckbert L, Heian JR. 2002. Acute the dehydroepiandrosteron (DHEA) effect on sexual arousal in post menopusal women in: Women Health Gend. Base. Med. 2:155-162.
98. Hafez ESE, Hafez B. 2013. Reproduction in farm animals. Wiley-Blackwel, Philadelphia, Pensylvania. USA. 221-232.
99. Joshi K, Hassan SS, Ramaraj P. 2018. Differential biological effects of dehydroepi androsterone (DHEA) between mouse (B16F10) and human melanoma (BLM) cell lines. Dermato-Endocrin. 9:1-10.
100. Guyton A, Hall JE. 1997. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Editor Iraati Setiawan, E.G. Jakarta, Indonesia. 1283- 1288.
101. Marks DB, Allan DM, Collen MS. 2000. Biokmia Kedokteran Dasar. Sebuah Pendekatan Klinis. 165-177pp. Alih Bahasa Braun UP, Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta, Indonesia.
102. Lee CY, Kim R, Ham O, Lee J, Kim P, Lee S, Oh S, Lee H, Lee M, Kim J, Chang W. 2016. Therapeutic potential of stem cells strategy for cardiovascular diseases. Stem Cells Inter. 2016: 1-10
103. Bali P, Lahiri DK, Banik A, Nehru B, Anand A. 2017. Potential for stem cells therapy in alzheimer's disease: do neurotrophic factors play critical role? Curr. Alzheimer Res., 14(2): 208– 220. https://doi.org/10.2174/1567205013666160 31414534 7

104. Safitri E, Utama S, Widiyatno TV, Sandhika W, Prasetyo RH. 2016b. Auto-regeneration of mice testicle seminiferous tubules due to malnutrition based on stem cells mobilization using honey. Asian Pac. J. Reprod. 5: 31-35. https:// doi. org/10.1016/j.apjr.2015.12.005
105. Safitri E, Hariadi M, Prasetyo RH. 2019. Stem Cells. Kultur Kondisi Hipoksia Upaya Peningkatan Viabilitas dan Pemeliharaan Jangka Lama Sel Punca Diam. 1st Ed. Airlangga University Press. Surabaya. Indonesia.
106. Hasib A, Muhamad R, Reksa TY, Artha AU, Safitri E. 2017. Utilization of Sumbawa tropical forest honey Apis dorsata to improve fertility of Indonesai oriental magpie robin (Copsyhus saularis) as effort animal population increasement. The Veterinary Medicine International Conference. Surabaya. Indonesia. KnE Life Sci., pp. 619–626. https:// doi.org/10.18502/kls. v3i6.1190
107. Denga J, Liua R, Lua Q, Haoa P, Xua A, Zhanga J, Tan J. 2018. Biochemical properties, antibacterial and cellular antioxidant activities of buckwheat honey in comparison to manuka honey. Food Chem. 252: 243–249. https://doi. org/10.1016/j.foodchem.2018.01.115
108. Prasetyo RH, Hestianah EP. 2017. Honey can repair damage of liver tissue due to protein energy malnutrition through induction of endogenous stem cells. Vet. World. 10(6): 711- 715. https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.711-715
109. 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 Pac. J. Reprod. 5(3): 198-203. https://doi. org/10.1016/j. apjr.2016.04.008
110. Safitri E, Widiyatno TV, Prasetyo RH 2016a. Honeybee product therapeutic as stem cells homing for ovary failure. Vet. World, 9(11): 1324-1330. https:// doi.org/10.14202/ vetworld.2016.1324-1330.
111. Safitri E. 2020. Molecular Detection and Immune Response of Bee Product Therapy for Induction of Endogenous Mesenchymal Stem Cells of Infertile Male Wistar Rat's (Rattus norvegicus). Adv. Anim. Vet. Sci. 8(12): 1388-1393.
112. Kumar GL, Rudbeck L 2009. Immunohistochemical staining methods. 5th edition. Carpinteria, California: Dako North America. pp. 11-14.
113. Hafez ESE. 2013. Reproduction in farm animals 7th edition. Wiley-Blackwel, Philadelphia. Pensylvania. USA. pp. 221- 232.

114. Eleotério RB, Sepúlveda RV, Reis ECC, Valente FL, Borges APB. 2016. Isolation, expansion and differentiation of mesenchymal stromal cells from rabbits' bone marrow. Pesq. Vet. Bras. 36(5): 423-430. https://doi.org/10.1590/ S0100- 736X2016000500012
115. Tripathi UK, Chhillar S, Kumaresan A, Aslam MKM, Rajak SK, Nayak S, Manimaran A, Mohanty TK, Yadav S. 2015. Morphometric evaluation of seminiferous tubule and proportionate numerical analysis of Sertoli and spermatogenic cells indicate differences between crossbred and purebred bulls. Vet. World. 8(5): 645-650. https://doi. org/10.14202/vetworld.2015.645-65
116. Barker N. 2014. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 10(15): 19-33. https:// doi.org/10.1038/nrm3721
117. Dussaubat C, Brunet JL, Higes M, Colbourn JK, Lopez J, Choi JH. 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium nosema ceranae in the honey bee Apis mellifera. PLoS One. 7(5): 1-12. https://doi.org/10.1371/ journal. pone.0037017
118. Heckbert L, Heian JR. 2002. Acute the dehydroepiandrosteron (DHEA) effect on sexual arousal in post menopusal women in Women Health. Gend Based Med. 2: 155-162. https:// doi.org/10.1089/152460902753645290
119. Joshi K, Hassan SS, Ramaraj P. 2018. Differential biological effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) between mouse (B16F10) and human melanoma (BLM) cell lines. Dermato-Endocrin. 9(1): 1-10.
120. Maggio M, De-Vita F, Lauretani F, Nouvenne A, Meschi T, Ticinesi A, Dominguez LJ, Barbagallo M, Dall'Aglio E, Ceda GP. 2014. Review article the interplay between magnesium and testosterone in modulating physical function in men. Int. J. Endocrin. 2014:1-9. https://doi. org/10.1155/2014/525249
121. Saputri DS dan Putri YE. (2017). "Aktivitas Antioksidan Madu Hutan di Beberapa Kecamatan di Kabupaten Sumbawa Besar. J. Tambora 2: 3.
122. Khalil MDI, Sulaiman SA, Alam N, Ramli N, Mohamed M, Bai'e S. and Hua GS. (2012). Content and antioxidant properties of processed Tualang honey (AgroMas®) collected from different regions in Malaysia. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 4(3): 214-219.
123. Sime D, Atlabachew M, Abshiro MR. and Zewde T. 2015. Total Phenols and Antioxidant Activities of Natural Honeys and Propolis Collected from

Different Geographical Regions of Ethiopia. Bull Chem. Soc. Ethiop. 29(2): 163-172
124. Moniruzzaman M, Khalil MI, Sulaiman SA. and Gan SH. 2013. Physicochemical and Antioxidant Properties of Malaysian Honeys Produced by *Apis cerana*, *Apis dorsata* and *Apis mellifera*. Bmc Compl. Alter. Med. 13(1): 43.
125. Hamza R. and AL-Harbi M. 2014. Monosodium Glutamate Induced Testicular Toxicity and The Possible Ameliorative Role of Vitamin E or Selenium in Male Rats. Toxicol. Rep. 1: 1037-1045.
126. Idris NA. 2017. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Sarang Lebah Masu Hutan dari Luwu Utara dengan Metode DDPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) [Skripsi]. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Alaudin. Makassar.
127. Kek S, Chi, N, Yusof Y, Tan S. and Chua L. 2017. Classification of Entomological Origin of Honey Based on its Physicochemical and Antioxidant Properties. Inter. J. of Food Prop. 20(3): 2723-2738.
128. Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E. and Battino M. 2010. Contribution of Honey in Nutrition and Human Health: a review. Mediterr J Nutr Metab. 3: 15-23.
129. Mokosuli YS. Kaunang ES. dan Manoppo JS. 2019. Buku: Potensi Bioaktif dari *Apis dorsata* binghami, Lebah Madu Endemik Sulawesi.
130. Budiman J, Istiadi H, dan Amravati S. 2015. Pengaruh Madu Terhadap Gambaran Mikroskopis Testis pada Tikus Wistar yang Diinduksi Monosodium Glutamat. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.
131. Salamah N. dan Widyasari E. 2015. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kelengkeng (Euphoria (L) Steud) dengan Metode Penangkalan Radikal 2,2'-Difenil-1-Pikrilhidrazil. Pharmaciana. 5(1): 25-34.
132. Attanzio A, Tesoriere L, Allegra M. and Livrea MA. 2016. Monofloral Honeys by Sicilian Black Honeybee (*Apis mellifera ssp. sicula*) Have High Reducing Power and Antioxidant Capacity. J Heliyon. 2(e00193): 1-18
133. An J, Yang H, Zhang Q, Liu C, Zhao J, Zhang L. and Chen B. 2016. Natural Products for Treatment of Osteoporosis: The Effects and Mechanisms on Promoting Osteoblast-Mediated Bone Formation. J Life Sciences. 147: 46-58.
134. Effendy NM, Norazlina M, Norliza M, Isa NM. and Shuid AN. 2012. The effects of tualang honey on bone metabolism of postmenopausal women. Evide-Based Complement. Alt. Med: 1-7.

135. Đudarić L, Ariana FS, Muhvić D. and Giacometti J. 2015. The Role of Polyphenols on Bone Metabolism in Osteoporosis. J Food Res. 77: 290-298.
136. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajaz Y, Fernández-López J. and Pérez-Álvarez JA. 2008. Functional Properties of Honey, Propolis and Royal Jelly. J. Food Sci. 73(9): R117-R124.
137. Erejuwa OO, Sulaiman SA. and Wahab MSA. 2012. Honey - A Novel Antidiabetic Agent. J Bio Sci. 8(6): 913-948.
138. Ariefdjohan MW, Martin BR, Lachick PJ. and 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.
139. Zaid SSM, Sulaiman SA, Othman NH, Soelaiman IN, Shuid AN, Mohamad N. and Muhamad N. 2012. Protective Effects of Tualang Honey on Bone Structure in Experimental Postmenopausal Rats. J Clinics. 67(7): 779-784.
140. Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, Wallace RB, Robbins J, Lewis CE, Bassford T, Beresford SAA, Black HR, Blanchette P, Bonds DE, Brunner RL, Brzyski RG, Caan B, Cauley JA, Chlebowski RT and Cummings SR. 2006. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. N Engl J Med. 354:669-83
141. Zaid SS, Sulaiman SA, Sirajudeen KN and Othman NH. 2010. The Effects of Tualang Honey on Female reproductive organs, tibia bone and hormonal profile in ovariectomised rats - animal model for menopause. J. Compl. Altv. Med. 10(82): 1-7.
142. Tavafzadeh SS, Ooi FK, Chen CK and Sulaiman, SA. (2015). Changes in Bone Metabolism and Antioxidant Status with Combined Exercise and Honey Supplementation in Young Female Rats. J Excs, Sport Orthop. 2(2): 1-8
143. Katsumata S, Wolber FM, Tadaishi M, Tousen Y, Ishimi Y. and Kruger MC. 2015. Effects of Manuka Honey Combined with α-Cyclodextrin on Bone Metabolism and Caecal Bacterial Contents in Ovariectomized Mice. Int J Food Nutr Sci. 2(3): 1-6.
144. Can Z, Yildiz O, Sahin H, Turumtay EA, Silici S. and Kolayli S. 2015. .An Investigation of Turkish Honeys: Their Physico-Chemical Properties, Antioxidant Capacities and Phenolic Profiles. J Food Chem. 180: 133-141.
145. Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Gałkowska, D., Fortuna, T. and Witczak, T. 2011. Phenolic Profile and Antioxidant Properties of Polish Honeys. Int J Food Sci Tech. 46: 528-534.

146. Florencio-Silva R, Sasso GRS, Sasso-Cerri E, Simões MJ. and Cerri PS. 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. J BioMed Res. 2015: 1-17.
147. Trzeciakiewicz A, Habauzit V. and Horcajada MN. 2009. When Nutrition Interacts with Osteoblast Function: Molecular Mechanisms of Polyphenols. J Nut Res. 22: 68-81.
148. Xu ML, Bi CWC, Kong AYY, Dong TTX, Wong YH. and Tsim KK. 2016. Flavonoids Induce the Expression of Acetylcholinesterase in Cultured Osteoblast. J Chem-Bio Interac. 259: 296-300.
149. Srivastava S, Bankar R. and Roy P. 2013. Assessment of the Role of Flavonoids For Inducing Osteoblast Differentiation in. J Phytomed. 20: 683– 690.
150. Trivedi R, Kumara S, Kumara A, Siddiquia JA, Swarnkara G, Gupta V, Kendurker A, Dwivedi AK, Romerod JR. and Chattopadhyaya N. 2008. Kaempferol Has Osteogenic Effect in Ovariectomized Adult Sprague–Dawley Rats. J Mol Cell Endoc. 289: 85-93.
151. Watel A, Kamel S, Mentaverri R, Lorget F, Prouillet C, Petit JP, Fardelonne P. and Brazier, M. 2003. Potent Inhibitory Effect of Naturally Occuring Flavonois Quercetin and Kaempferol on in vitro Osteoclastic Bone Resorption. J Biochem Pharm. 65: 35-42.
152. Khalid AB and Krum SA. 2016. Estrogen Receptors Alpha and Beta in Bone. J Bone. 87: 130-135.
153. Krum SA and Brown M. 2008. Unraveling Estrogen Action in Osteoporosis. J Cell Cycle. 7(10): 1348-1352.
154. Wu YW, Chen SC, Lai WFT, Chen YC. and Tsai YH. 2013. Screening of Flavonoids for Effective Osteoclastogenesis Suppression. J Anal Biochem. 433: 48–55.
155. Komori T. 2015. Animal Models for Osteoporosis. J Pharmacology. 759: 287-294.
156. Weitzmann MN. 2013. The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/ OPG Axis, and the Immunoskeletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. J Scientifica. 2013: 1-29.
157. Abdelmagid SM, Barbe MF and Safadi FF. 2015. Role of Inflammation in the Aging Bones. J Life Sci. 123: 25-34.
158. Hadagali,MD and Chua LS. 2014. The Anti-Inflammatory and Wound Healing Properties of Honey. Eur J Food Res Technol. 239: 1003-1014.

159. Tomblin V, Ferguson LR, Han DY, Murray P. and Schlotauer R. 2014. Potential Pathway of Anti-Inflammatory Effect by New Zealand Honeys. Int J Gen Med. 7: 149-158.
160. Timm M, Bartelt S. and Hansen EW. 2008. Immunomodulatory Effects of Honey Cannot be Distinguished. J Cytokine. 42: 113-120.
161. Rendina E, Lim YF, Marlow D, Wang Y, Clarke SL, Kuvibidila S, Lucas EA. and Smith BJ. 2012. Dietary Supplementation with Dried Plum Prevents Ovariectomy-Induced Bone Loss While Modulating the Immune Response in C57BL/6J Mice. J Nut Biochem. 23: 60-68.
162. TTaormina PJ, Niemira BA, Beuchat LR. 2001. Inhibitory Activity of Honey Againts Foodborne Pathogens as Influenced by tha Presence of Hydrogens Peroxide and Level of Antioxidant Power. Int.J. Food Microbiol. 69: 217-225.
163. Antony S, Rieck JR, Acton JC, Han LY, Halpin EL, Dawson PL. 2006. Effect of Dry Honey on the Self Life of Packaged Turkey Slice. Poult. Sci. 85: 1811-1820.
164. D'Arcy B. 2013. High power Ultrasound to Central Honey Crystallisation RIRDC. 7(145): 1-12.

INDEKS

Symbols

5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) 26

A

Abdomen 9, 17, 18, 92, 246
Adiposit stem cell (ASC) 122
Adult stem cell 112, 118, 119, 121, 122, 137, 142, 144, 146, 249
Alergi 74, 75, 83, 86, 90, 92, 96, 98, 99, 101
Alergi 74
Alkaloid 24
Alzheimer 1
Anatomi Lebah 10
Animalia 10, 17, 24, 32
Antibiotika 6, 207, 222, 225
Antibody conjugate 171
Antioksidan 3, 8, 47, 80, 190, 197, 207–210, 236, 237, 245, 246
Antiosteoporosis 212, 213
Antiseptik 16, 63, 68
Antitumor 16
Apis andreniformis 16, 29, 30
Apis cerana 5, 11, 16, 20, 27, 28, 30, 31, 35, 41, 48, 102, 208, 210, 237
Apis dorsata xiv, 5, 10–12, 16–24, 28, 35–37, 48, 102, 154, 191, 194, 196, 198, 203, 204, 206–210, 233, 235, 237
Apis dorsata binghami 10, 21
Apis florae 16
Apis indica 27
Apis koschevnikovi 11, 16, 30
Apis melifera 93, 103, 208
Apis nigrocicta 11
Apis nuluensis x, xv, 16, 31
Apitoxin 5, 42, 75, 80, 85, 87, 92, 96, 98

Aplikasi Madu pada Reproduksi 156, 180
Apoptosis 3, 130, 133, 134, 136, 138–140, 142–144, 146, 151, 153, 181, 210, 218, 220, 246, 249
Arthropoda 17, 24, 32
Auto-regenerasi 147, 156, 197

B

Bee bread 13, 82, 85, 87
Bee pollen 12, 16, 41, 81, 83, 85–88, 100, 254
Bee product 3, 5, 40, 42, 75, 80, 85, 87, 92, 96, 147, 156, 190, 198
Bee Venom x, xv, 96, 97, 98, 100, 104
Bioteknologi *stem cell* 107
BMSC 140
Bone marrow 106, 113, 118–125, 128, 129, 145, 148–150, 153, 155, 156, 180, 188, 218, 227, 228, 233, 236, 248, 250, 251
Booster 2, 146, 190, 197, 255
Borok 43, 46, 47, 63

C

Cascade 140, 188, 217
Caspase 138, 139, 140
CD 34+ (*cluster of differentiation*) 4
Comparative Spesies Apis 32
Confluent 123
Cytokine 240

D

Degeneratif 1–4, 107, 108, 111, 114–116, 122, 124, 147, 156, 169, 173–176, 178, 181, 182, 185–188, 190, 195, 197, 198, 201, 247, 252
Deteksi Molekuler 6, 196
Dextrose 226
Diabetes melitus 1, 109, 147
Diferensiasi xv, 4, 120, 159, 164, 215
Diferensiasi *stem cell* 3, 5, 6, 113, 114, 144, 147, 157
DMEM 128, 129
DNA 130, 137, 139, 152, 210, 217, 221, 253
Diare 4, 43, 74, 75, 92, 222

E

Efek Samping Madu 74
Eksplorasi *stem cell* endogen 2, 146, 147, 155
Ektoderm 142, 143, 145, 252
Embrionic *Stem Cell* x, 115
Endoderm 106, 108, 121, 142, 143, 145, 251, 252, 255
Endogenous stem cell 2, 3, 147, 155, 157
Enzim amilase 47
Enzim glukosa oksidase 47, 62, 209, 226
Enzim invertase 46, 47, 61, 72
Enzim lipase 47
ESC x, 112, 115, 122
Exosceleton 9

F

Fauna 16
Female rat 192
Fenol 11, 46, 77, 208, 209, 211, 214, 221
Fertil 10, 14, 249
Ficol-Hypaque 124
Flavonoid xiii, 17, 23, 24, 33, 47, 77, 79, 80, 86, 91, 208–211, 213–215, 217, 219, 221

Flora 16, 43, 53, 79
Flowcytometry xiii, 125, 126, 127, 171, 183, 185, 186
Folikel 113, 132, 157, 162, 164, 166, 197
Fruktosa 26, 42, 46, 47, 51, 54, 58, 60–62, 64, 68, 69, 71, 72, 102, 225, 247, 248

G

G1/S/G2/M 135, 141
Gangguan reproduksi 2, 4, 43
GDF-9 xiii, xv, xvi, 4, 157–162, 164–166, 168, 170–173, 175–177, 179, 180, 247, 248
Genomic 117
Growth factor xv, 114, 142, 144, 161, 162, 166, 215, 232, 256
Gula fruktosa 26
Gula glukosa 26
Gula karamel 56
Gula sukrosa 26

H

Healing system 6
Hematopoietic stem cell (HSCs) 113
Histopatologi 4
HIV 1, 7, 99, 229, 230
Homing System 4
Honey bee 10
Hsp70 xiii, 4, 175, 230, 232
HSP90β 4
Hymenoptera 10, 17, 25, 32, 36, 37, 39
Hypoxia Precondition 4
Hypoxic Niche xi, 130, 249

I

IgA 4, 168
IMadu-ndustri Pangan 69
Imunitas 5, 11, 16
Imunohistokimia 4
Imunomodulator 17, 83, 90, 222
Induce Purypotency Stem Cells (iPS) 4, 249
Industri Pangan 69
Infark miokard 1
Injury 165, 166, 177, 188
Inovasi 2, 5, 105, 106, 146, 155–157, 169, 180, 181, 197
Insecta 17, 24, 32, 39
Irreversible 2, 111, 114, 138, 247, 254

J

Jaringan Hati 4

K

Kanker 4, 47, 83, 182, 190, 197
Karakteristik Madu 51
Kardiovaskuler 4
Katarak 4, 46, 182, 190, 197
Komposisi madu 53
Komposisi madu 50, 59
Kotak atau box lebah (stup) 28
Kristalisasi madu 54
Kurang Energi Protein 4

L

Larva lebah 13, 77, 88, 251
Lebah ix, x, xiii, xiv, xv, 9–22, 24–36, 39, 77, 82, 85, 87, 88, 92–96, 103, 104, 232, 237, 246, 249
Lebah hutan 11, 16, 17, 18, 21, 36, 48, 191, 196, 198, 247

Lebah jantan 10, 14, 20, 21, 77
Lebah liar 11, 44, 48
Lebah madu 11, 16, 18, 27, 28, 33, 34, 36, 39–42, 45, 46, 61, 71, 75, 77, 81, 88, 89, 158, 207, 246, 250, 252
Lebah pekerja xiv, 10, 13–15, 17, 20–22, 36, 71, 82, 85, 86, 88, 89, 91, 97, 249, 251, 254
Lebah ratu 13, 17
Lebah ratu 14, 15
Libido xiii, 6, 190, 193, 207, 234
Lilin lebah 33
Logam Berat 73, 74
Long Term Maintenance (LTM) 134, 135, 152
Long-term repopulation 133
Luka 16
Luka bakar 41, 43, 46, 47, 68
Luka infeksi 43, 46, 47, 63
Luka pascaoperasi 47

M

Madu 3, 4, 5, 6
Madu ekstrak floral 49, 250
Madu ekstraksi 48
Madu embun (*Honeydaw*) 49, 250
Madu-Industri Pangan 69
Madu Kaliandra 49
Madu kapuk 73
Madu kelengkeng 43, 48, 102, 234
Madu manga 48
Madu monoflora 44, 48, 250
Madu multiflora 44, 250
Madu organik 50
Madu paksa 48
Madu rambutan 43, 48
Madu randu 44, 48, 102, 232, 234
Madu set 54
Male rat 192–194, 196, 198, 200, 203, 204, 206
Malnutrisi 1, 43, 158, 163, 165, 166, 169, 177, 180, 190, 191, 195, 196, 198, 205, 207
Mata majemuk 17
Mating (kopulasi) 6
Medical Material Plant (MMI) 24
Mencit 180, 182, 184, 187, 188, 190, 198, 199, 217
Mesenchymal stem cell (MSCs) 113
Mesoderm 106, 108, 121, 142, 143, 145, 251, 252, 255
Microenvironment 129–131, 137, 141–144, 166, 188, 189, 251
Minyak esensial 57, 77
Mitokondria 139, 140, 210, 246
Mobilisasi *stem cells* 3, 156, 206
Mukosa Usus Halus 4
Multipotent 106, 107, 110, 122, 151, 252, 254

N

Nektar 49, 71, 251
Niche stem cell 251
Nourishing Jelly 251
Nurse bee 13

O

OCT4 189
Osteoblast 129, 210, 211, 215–222
Ovary failure 156, 159, 160

P

Paracrine Effect 4
Parkinson 1, 113
Pathway 139, 143, 215, 219, 221, 246

Periode mating 6
Peripheral blood 118, 227, 248
PGE2 xiii, 4, 170–175, 177, 178, 180, 199, 200, 202–207, 230, 232, 253
pH dari madu 226
Plastisitas 252
Pluripoten 116, 122, 141, 142, 249
Polen 16, 81, 82, 252
Proliferasi 3, 90, 110, 111, 116, 121–123, 132–136, 138, 166, 179, 188, 189, 196, 215–218, 220, 222, 247, 249, 251–253
Prolyl hydroxylases (PHDs) 133
Propolis xii, 5, 11, 12, 16, 33, 41, 75–80, 85, 87, 92, 94–96, 100, 103, 233, 246, 253
Protein Energy Malnutrition (PEM) 4, 6, 168, 252

Q

Quen bee 249
Quiescence cell 253

R

Radikal bebas 3, 90, 139, 182, 190, 197, 208–210, 245, 246, 251
Rapid Self-renewing/RS *cell* 123
Ratu lebah 10, 13, 21, 41, 88, 89, 254
Reactive oxygen species 137, 190, 197
Regeneratif 3, 137, 147, 156, 254
Reproduksi *Female* xi, 156
Reproduksi *Male* xi, 180
Resin 75, 76, 78, 79
Respons imun 6, 100, 101
Retina mosaic 12
Roti lebah 5, 13, 16, 82, 85–87, 91, 92, 96
Royal jelly 3, 5, 12, 13, 15, 16, 21

S

Saliva lebah 24, 71
Saponin 24
Sarang lebah *Apis dorsata* 12
Self-renewal 133, 142–144, 152, 154, 189, 229, 231
Sel mononuklear 124, 125, 220, 252, 256
Sel punca 106–108
Serangga 9, 10, 34, 39, 42, 46, 49, 50, 76, 247, 250, 254
Serbuk sari 12, 17, 21, 61, 78, 79, 81–83, 85, 86, 252, 254
Sistem pencernaan 4, 46, 86, 96
Slow proliferation 134, 135, 136, 253
Spermatogonoal stem cells (SSCs) 129
Stem cell 105–110
*Stem cell endoge*n xvi, 2, 3, 6, 146, 147, 155, 156, 174, 177, 179, 180, 197, 198, 247, 255
Stroke 1, 6, 7, 109
Sukrosa 24, 26
Sweet tart sensation 70

T

Tawon gadang 18
Tawon gung 18
Tawon odeng 18
Testis *failure* 2
Testosteron 190
Thorax 9
TNF α 139

Totipotent 107, 252
Transdiferensiasi *stem cell* 255
Transplantasi 2, 108, 109, 111, 118, 119, 124, 133, 134, 141, 146, 156, 157, 169, 181, 190, 197
Trigona sp. 11, 16, 103
Triterpenoid 24
Tubulus seminiferous xvi, 181, 182, 184, 185, 187–190, 199–201, 204, 205, 207

U

Ultrafulration 71
Umbilical cord blood (UMCB) 123
Unipotent 142

V

VEGF-1 4, 188, 189
Vitamin B1, B2, B6 43, 79
Vitamin E 36, 43, 47
Volatile 47, 49, 57, 79, 93, 98

W

waktu reaksi 192–194, 196, 255

GLOSARIUM

A

***Adult Stem Cell* (ASCs) atau *Stem cell* dewasa** *Stem cell* yang dapat ditemukan di antara sel-sel lain di dalam suatu jaringan atau organ yang telah *mature*, namun *stem cell* tersebut belum berdiferensiasi

Antioksidan Senyawa yang dapat menghentikan reaksi berantai, baik melalui penangkapan maupun pengikatan terhadap radikal bebas

Anti-osteoporosis Terbagi dua golongan. Golongan yang pertama adalah bersifat *anti-resorptif*, yaitu mempertahankan jaringan tulang. Golongan kedua merupakan agen yang bersifat *restorative* tulang atau agen anabolik.

Azoospermia Kondisi di mana *testicular seminiferous tubules* tidak memproduksi spermatozoa dan menyebabkan *infertility* pada *male* sehingga berakibat tidak dihasilkannya keturunan

Allogeneic Sel punca yang didapat dari orang lain

Autologous Sel punca yang berasal dari tubuh manusia itu sendiri

Apoptosis Kematian terprogram dari sel, merupakan perkembangan normal/apoptosis fisiologis, namun jika terjadi akibat suatu penyakit disebut apoptosis patologis. Apoptosis dapat terjadi melalui dua jalur utama, yakni melalui jalur ekstrinsik dan intrinsik. Jalur ekstrinsik atau dikenal juga jalur *death receptor* (*DR*) *pathway*, sedangkan jalur intrinsik diketahui merupakan jalur mitokondria

B

Bee product produk yang dihasilkan lebah, seperti madu, propolis, *royal jelly, Pollen*/Tepung Sari, Lilin/ malam lebah/ *Bee wax*, dan Racun Lebah atau *Apitoxin*

Bee bread merupakan *pollen* dari bunga kemudian digunakan lebah untuk membuat makanan

***Bee venom*/ Racun lebah/ Apitoxin/ Sengatan Lebah** Merupakan enzim terdiri atas asam amino dan protein. Berupa cairan bening manis sedikit pahit, larut dalam air, tidak larut dalam alkohol & ammonium sulfat. Jika kontak dengan udara, membentuk kristal buram atau kelabu-putih

***Bee wax*/Lilin/Malam lebah** Lilin digunakan lebah madu untuk membangun sarang mereka. Lilin lebah dihasilkan dari sekresi sepasang kelenjar yang berada pada ruas-ruas bagian abdomen. Lilin dihasilkan bergantung polen dan madu yang dikonsumsi. Lebah menghabiskan madu 7–15 kg, untuk menghasilkan 1 kg lilin.

C

Clarifying agent Kemampuan madu sebagai penggumpal dan penjernihan pada berbagai minuman penyegar atau sari buah tanpa menurunkan kadar pektin yang diinginkan

Combless cluster* atau *bivouacs Konstruksi sarang lebah hutan

Confluent *Stem cells* yang dikultur sudah memenuhi >80% *plate* pada kultur *in vitro.*

D

Degenerasi testis Kerusakan pada testis yang bersifat degeneratif sehingga bersifat *irreversible*.

Dekstrosa gula yang biasanya ditemukan pada tanaman

Dark Amber Karakteristik warna madu intensitas absorbansi ABS_{450} 585,33 mAU, aktivitas antioksidan tinggi

DHEA *dehydroepiandrosterone* Diproduksi korteks adrenal renal dan *Leydig cells,* adalah precursor penting dari hormon steroid seperti *testosterone*. Rendahnya kadar DHEA dalam darah dapat menjadi penyebab turunnya stamina dari tubuh, *fatigue* (kelelahan), dan juga penurunan libido

Dormant Sifat *inactive* dari *stem cell* dan baru berfungsi dalam waktu dan kondisi tertentu, misalnya karena terjadinya *defect.* Hal ini dimaksudkan untuk menjaga kontinuitas dan regenerasi dari populasi sel penyusun jaringan atau organ tubuh

E

Exosceleton Struktur kulit luar keras yang dimiliki serangga

Eksplorasi *stem cell* endogen Upaya peningkatan jumlah *stem cells* dari dalam tubuh sendiri, salah satunya melalui pemanfaatan bahan alam seperti madu

Enzim invertase Enzim yang ada di perut lebah yang mengubah sukrosa (disakarida) menjadi glukosa dan fruktosa yang keduanya adalah merupakan monosakarida

F

Folicle de Graaf Folikel yang telah mature dan siap untuk terjadinya ovulasi

G

GDF-9 G*rowth factor derived* dari TGF-ß *family* yang diproduksi oleh oosit. GDF-9 merupakan sel progenitor *stem cell* dari *germ line* yang akan merangsang proliferasi sel dari korteks ovarium. Oleh karena itu, GDF-9 adalah faktor krusial folikulogenesis dan *fertility.*

G-CSF atau *granulocyte colony-stimulating factor* Terekspresi secara IHC, menjadi identifikasi terjadinya *homing* dari *stem cells* yang terekspresi akibat induksi *cytokines* dikarenakan adanya *injury*

H

***Heat Shock protein 70* (HSP70)** Protein intersisiel yang berperan sebagai pelindung terhadap sel

***Hematopoietic stem cell* (HSCs)** Induk dari segala jenis sel darah, spesifikasi = progenitor sel endotel, dapat bersumber dari darah tali pusar (*umbilical cord blood*), darah tepi (*peripheral blood*) dan sumsum tulang (*bone marrow*)

Hemosiderosis Terwarnai *yellow-brown color* pada preparat histopatologi anatomi akibat proses hemolisis dari sel darah merah disertai dengan deposisi fibrin, mengindikasikan kongesti kronis telah terjadi

Higroskopis Kemampuan madu untuk menyerap uap air dari udara sekitarnya sampai mencapai keseimbangan, sehingga sebabkan madu menjadi lebih encer.

Hiperosmotik Medium Madu Sifat medium larutan madu ini menyebabkan organisme bersel satu akan mati terbunuh jika berada di dalam nya. Hal ini dikarenakan organisme akan kehilangan cairan tubuh sebagai akibat terjadinya perbedaan tekanan osmosis yang sangat besar.

Homing proses di mana *stem cell* dari sumbernya seperti *bone marrow* misalnya bergerak menuju "rumahnya" yaitu menuju jaringan yang mengalami gangguan atau kerusakan

***Hydroxyl methyl furfural* (HMF)** Produk pemecahan fruktosa dan glukosa, indikasi kualitas madu. Peraturan Codex=max15 mg/Kg peningkatan HMF karena telah dipalsukan dengan air gula atau pemanasan terlalu tinggi. SNI 2004, menentukan madu palsu dengan jumlah maksimal adalah 50 kg per mg.

Hypoxic Niche *Microenvironment* yang kondusif menyebabkan *stem cell* berada pada kondisi G0 yang disebut sebagai *dormant cells* atau dikenal *Quiescence cells.*

Hypoxia In Vitro mencegah apoptosis, *senescence cells,* dan *stem cells* yang dikultur tetap berproliferasi, tetapi tidak berdiferensiasi dan tetap terpelihara dalam bentuk *dormant/ quiescence cells.*

I

***Induce Purypotency Stem Cells* (iPS)** Upaya agar sifat *pluripoten* dapat diinduksi pada kultur *in vitro* dari *adult stem cell.*

K

Kekentalan/ Viskositas Turun jika kadar air dan suhu yang meningkat. Visikositas madu dapat dimanfaatkan sebagai zat pengental atau pengikat atau *coating*

L

Late passage Perubahan angka proliferasi dari sel secara perlahan- selama pertumbuhan, dan pada akhirnya tidak berkembang lagi setelah 4-5 kali pasase.

Lebah jantan atau Drone Lebah yang bertugas membuahi telur dari lebah ratu. Mempunyai ukuran sedang yaitu antara lebah ratu dan lebah pekerja.

Lebah pekerja atau Worker Lebah yang bertugas memenuhi kebutuhan koloni, baik menyediakan makan, membuat, dan memperbaiki sarang, serta pengumpul madu. Merupakan betina *infertile* dengan ukuran paling kecil

Lebah ratu atau *Quen bee* Lebah betina fertil yang hanya terdapat 1 ekor dalam 1 koloni dan bertugas sebagai penghasil telur sepanjang hidupnya, mempunyai ukuran paling besar

M

Madu merupakan cairan alami dan juga merupakan substansi *liquida* manis yang diproduksi oleh lebah madu dari sari bunga tanaman (floral nektar), atau sekresi bagian lain dari tumbuhan (ekstra floral nektar) yang kemudian diolah, disekresi, dan diekskresi dari serangga.

Madu ekstraksi (*filtered honey*) Madu didapatkan melalui proses ekstraksi, dengan menggunakan alat ekstraktor sehingga tidak merusakkan sarang lebah

Madu paksa (*strained honey*) Madu didapatkan melalui metode pengepresan, sehingga merusakan sarang lebah

Madu set Madu tidak jernih

Madu monoflora Madu yang bersumber dari satu jenis nektar

Madu multiflora Madu yang bersumber dari beberapa jenis nektar bunga

Madu floral Madu yang diproduksi atau dihasilkan dari nektar bunga

Madu embun (*Honeydaw*) produk sekresi dari serangga seperti kumbang kecil dari famili *Psyllidae, Lechnidae,* atau *Lechanidae,* di mana eksudat yang dihasilkan diletakkan pada beberapa bagian tanaman dalam bentuk embun dan kemudian dikumpulkan oleh lebah untuk kemudian diproses di dalam sarang.

Madu organik Madu yang diproduksi oleh peternak lebah dari tumbuh-tumbuhan organik tanpa pestisida.

Madu ekstrak floral madu yang diproduksi atau dihasilkan dari nektar selain bagian dari tanaman atau bunga, yaitu seperti bagian dari cabang, daun, dan batang

Malnutrisi Kekurangan gizi

***Mesenchymal Stem Cell* (MSCs)** *Stem cell* yang bersumber dari *bone marrow* atau sumsum tulang

***Medical Material Plant* (MMI)** Fitokimia madu mengacu pada MMI

***Mesenchymal stem cell* (MSCs)** Bersumber dari beberapa jaringan, yaitu *umbilical cord matrix*, *adipose tissue* dan *bone marrow. MSCs* ditandai terekspresinya CD105, CD90, dan CD73 serta tidak mengekspresikan CD45, CD34, dan CD14, ketiga *marker* terakhir terekspresi positif pada permukaan HSCs.

Mobilisasi *stem cells* Tergeraknya *stem cell* dari sumbernya seperti *bone marrow* menuju tempat yang mengalami '*defect*' (kerusakan).

Multipotent Dapat berkembang menjadi beberapa jenis sel yang segolongan, seperti *endoderm*, *mesoderm* atau *ectoderm*.

N

Niche stem cell *microenvironment* sekitar *stem cells* yang kondusif (hipoksia), mampu seimbangkan antara *self renewal* & diferensiasi, yang dikontrol oleh faktor intrinsik & ekstrinsik yang mengintegrasi dan mendukung keberadaannya

Nektar larutan gula yang dihasilkan kelenjar tanaman dan merupakan sumber karbohidrat.

Nourishing Jelly Makanan yang dibuat oleh lebah pekerja untuk larva lebah di dalam sel heksagonal

O

Osteoporosis Gangguan pada tulang yang dihubungkan dengan kejadian *oxidative stress* (OS) sebagai akibat ketidakseimbang an antara produksi radikal bebas & aktivitas protektif antioksidan

Osteoblast berasal dari *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) yang menuju derifat osteoprogenitor dibutuhkan beberapa ekspresi dari gen spesifik. Osteoblastogenesis terjadi melalui beberapa tahapan yang harus dilalui, seperti proses proliferasi, sintesis dari matriks ekstraseluler, maturasi, dan disertai mineralisasi.

Osteoclast Akhir dari diferensiasi *multinucleated cell* berasal dari sel mononuklear *Hematopoietic Stem Cell* (HSCs).

Ovary failure Kerusakan ovarium melalui pemuasaan terhadap pakan selama lima hari berturut-turut.

***Overheating*/kelebihan terhadap panas** Sifat madu yang mampu menghantarkan panas dengan kekentalan yang tinggi

P

Penyakit degeneratif Penyakit penyebab kerusakan sel sebagai penyusun jaringan atau organ, sehingga jaringan atau organ tersebut tidak berfungsi sesuai dengan kebutuhan tubuh

Plastisitas Kemampuan diferensiasi menjadi lebih dari satu tipe/jenis sel baik bersifat *multipotent/ pluripotent*

Pluripotent potensi untuk dapat mengalami diferensiasi menjadi sel tubuh manapun yang berasal dari ketiga lapisan embrional, baik ektoderm, mesoderm, maupun endoderm, tetapi diferensiasi lebih terbatas dibandingkan *totipotent*

***Protein Energy Malnutrition* (PEM)** Kekurangan gizi terutama protein dan karbohidrat sebagai sumber energi. PEM merupakan salah satu penyebab terjadinya *immune deficiency*.

Proboscis Lidah dari lebah yang berfungsi untuk memindahkan madu dari perut lebah madu ke dalam sarang

Pollen serbuk sari dari bunga merupakan sumber protein yang dikumpulkan dan digabungkan oleh lebah madu untuk digunakan sebagai sumber makanan bagi koloni. Polen yang menempel pada kaki lebah yang berambut pada saat lebah datang menghisap nektar bunga.

Pollinator Fungsi penyerbukan pada bunga

Premature exhaustion Kelelahan dari sel bawah kondisi berbagai variasi stres yang mengenai jaringan tubuh.

Premature senescence Terhentinya proliferasi yang lebih awal pada saat kultur *in vitro*.

Propolis Resin lengket, bersifat termoplastik, warna kecoklatan, dari Bahasa Yunani kuno, *Pro* = sebelum/ awal/ benteng, *Polis* = kota, sehingga propolis berarti sebelum kota = benteng = pertahanan kota = terdepan pada sarang lebah

PGE2 Prostaglandin E2 memiliki efek sitoprotektif pada epitel gastrointestinal. Efek sitoprotektif yang merangsang lendir mukosa dan sekresi bikarbonat untuk meningkatkan aliran darah mukosa khususnya pada bagian *stomach*, untuk membatasi difusi kembali asam ke dalam epitel

Propolis merupakan lapisan lilin yang digunakan untuk melindungi koloni lebah dari gangguan luar atau predator

Q

Quiescence cell* atau *Dormant cell *Stem cell* yang tidak mengalami siklus dalam pembelahan sel (*cycling state*), sehingga tidak terjadi proses yang merupakan 4 fase dalam siklus pembelahan sel, seperti G1, S, G2, dan M. Tahap G1 (Gap 1) adalah jeda atau jarak antara akhir fase M (Mitosis) dengan awal fase S. Fase S (Sintesis) merupakan fase penggandaan DNA, G2 (Gap 2) merupakan jeda antara akhir fase S dengan awal fase M (Mitosis) atau dikenal sebagai fase penggandaan sel. *Maintenance* dari *quiescence cells,* melalui *slow proliferation, viable*, *pluripotency,* dan hambatan *differentiation* dari *stem cell* yang dikultur *in vitro*

R

Replicative senescence Pertumbuhn *in vitro* terhenti permanen pada proses kultur sel, hal ini karena sel dirangsang untuk terus-menerus berproliferasi melalui serangkaian beberapa kali pasase sampai proliferasi sel menjadi terbatas dan pada akhirnya akan masuk pada keadaan pertumbuhan terhenti permanen.

Royal jelly Cairan kental putih seperti susu dihasilkan oleh lebah muda, makanan bagi larva muda dan makanan khusus bagi ratu lebah sepanjang hidupnya. *Royal jelly* dihasilkan lebah muda yang mengkonsumsi *bee pollen* dan madu selanjutnya kemudian dikeluarkan melalui kelenjar *hypopharyngeal* lebah pekerja yang berada pada kedua sisi, yaitu kepala dan bagian leher, biasanya ratu lebah langsung meminum *Royal jelly* dari kelenjar tersebut.

Roti lebah atau *Bee bread* Hasil fermentasi dihasilkan oleh lebah yang berasal dari penggabungan air liur dari lebah pekerja ditambah serbuk sari tanaman atau nektar. Roti lebah ini digunakan sebagai makanan bagi larva maupun lebah muda untuk menghasilkan produk *royal jelly*

S

Self renewal Kemampuan untuk memperbanyak diri sendiri menghasilkan sel-sel dengan karasteristik yang sama dengan sel induknya **dan** berdiferensiasi menjadi lebih dari satu tipe atau jenis sel baik yang bersifat *multipotent* maupun *pluripotent*

Senescence Penuaan pada *stem cells* ditandai dengan bentuk sel yang besar dan *flat*, *irreversible*, dan berpotensi kehilangan sifat regeneratif sehingga berhenti berproliferasi

Standar kualitas mutu madu Mengacu SNI No 01-3545-1994 dimana kadar air dari madu maksimal 22% dan kadar sukrosa maksimal 10%

Supersaturated solution Larutan gula yang kelewat jenuh

Spiracles Organ pernapasan dari serangga/lebah

Stem cell Sel awal mula yang mengawali pertumbuhan dari sel lain penyusun jaringan tubuh suatu organisme, baik tumbuhan binatang, maupun manusia

Stem cell culture in vitro *Stem cell* yang diproduksi secara *in vitro*

Stem cell endogen *Stem cell* yang diproduksi dari dalam tubuh sendiri

***Stem cell endogen* eksplorasi** Peningkatan jumlah *stem cell endogen* dengan jalan menginduksi aktivitas *stem cell* yang diproduksi oleh tubuh.

Stem cell homing *Stem cell* menuju "rumahnya: atau tempat yang mengalami *defect/injury*

***Stem cell* mobilisasisi** *Stem cell* dari sumbernya bergerak menuju tempat yang *defect/injury*

***Stem cell* diferensiasi** *Stem cell* yang mengalami perubahan sesuai di mana tempat yang mengalami *defect/injury*.

Stem cell pool Mempertahankan keberadaan *stem cell in vivo*

Stingless bee Sengat lebah

Stup Kotak atau box lebah yang mudah dipindah-pindahkan.

T

Testosterone Hormon steroid yang dihasilkan oleh jantan

Tingkat libido Didasarkan pada 3 katategori: 1. Jumlah berapa kali terjadi kopulasi; 2. waktu reaksi pertama kali menaiki betina dan berapa lama waktu periode melakukan kopulasi.

Tegangan Permukaan (*surface tension*) dari madu adalah rendah, sehingga banyak digunakan untuk bahan kosmetik. Jika rendah namun kekentalan tinggi, maka pada madu akan terbentuk busa.

Titik Beku Salah satu sifat fisik madu mempunyai titik beku lebih rendah dari larutan yang lain

Transplantasi stem cell Injeksi *stem cell* yang telah dikultur *in vitro*

Transdiferensiasi Kemampuan berdiferensiasi menjadi berbgai macam jenis sel segolongan misal *mesoderm*

saja, juga lintas golongan, misal golongan **endoderm**, bisa berdiferensiasi menjadi sel hepatosit, ataupun golongan *ectoderm*, seperti neuron bahkan *germline cells (spermatogonial, sertoli, Leydig)*

Transplantasi *booster* Injeksi *stem cell* yang dilakukan secara berulang untuk beberapa kali

Totipotent dapat berkembang menjadi semua jenis/tipe sel yang ada di dalam tubuh Transdiferensiasi *stem cell*

U

Undifferentiation Karakteristik spesifik dari *stem cell* yaitu sel tersebut belum berdiferensiasi

Uji *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) Uji terhadap aktivitas antioksidan, yang dikenal juga sebagai *radical scavenging acivity* (RSA)

V

VEGF *vascular endothelial growth factor* Terekspresi secara IHC, menjadi identifikasi terjadinya *homing* dan *stem cells* yang *viable,* terekspresi akibat induksi dari cytokines dikarenakan adanya *injury.* VEGF termasuk komponen *Extra Cellular Matrix* (ECM) dari *stem cells* yang berperan dalam mendukung mikro *environment* yang kondusif.

Z

Zero cells pasage Tahap awal kultur sel *in vitro* pada *tissue culture plastic* yaitu setelah isolasi sel *mononuclear* kemudian diaspirasi, dilanjutkan proses sentrifugasi dan didapatkan sel mononuklear yang siap untuk dikultur.

TENTANG PENULIS

Dr. Erma Safitri, M.Si., DVM. merupakan Doktor di bidang Reproduksi Veteriner, Devisi Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Dosen Program Studi S-1 dan PPDH Fakultas Kedokteran Hewan, Ketua Satuan Penjaminan Mutu FKH Unair (2016–2020), Koordinator Program Studi (KPS) Magister Biologi Reproduksi (2020–sekarang), Dosen Prodi Doktoral Sains Veteriner pada mata kuliah pilihan terkait *Stem Cells* Reproduksi Veteriner. Lulus DVM pada tahun 1995, lulus S-2 pada tahun 2005, dan lulus S-3 pada tahun 2014, memiliki *h*-index scopus 5 dan lebih dari 157 *scientific paper*, 4 buku, dan proyek penelitian terkait *Stem Cells* pada Reproduksi Veteriner. Penelitian tersebut sudah dimulai sejak tahun 2010 pada saat menyelesaikan program Doktor, di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian selanjutnya terkait Aplikasi Madu sebagai Aktivator *Stem Cells* Endogen pada bidang Reproduksi Veteriner baik jantan maupun

betina dan juga Kombinasi Terapi Madu dan Transplantasi *Stem Cells* untuk Reproduksi Veteriner.

Prof. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D. adalah Guru Besar Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, dan mitra senior pada Grup Perhimpunan Biologi Indonesia. Penulis memiliki *h*-index Scopus 6 dan lebih dari 60 *scientific paper*, 5 buku, dan proyek yang telah disajikan atau diterbitkan. Penulis merupakan seorang ahli yang diakui secara internasional di bidang struktur dan pengembangan tanaman terutama pada tanaman mangrove.

Penulis pernah menjabat sebagai Kepala Lembaga Riset dan Inovasi Universitas Airlangga (2015–2020). Kemudian tahun 2020 hingga saat ini sebagai Kepala Lembaga Inovasi, Pengembangan Jurnal, Penerbitan, dan Hak Kekayaan Intelektual (LIPJPHKI) Universitas Airlangga. Publikasi terbaru yaitu seputar akar tanaman mangrove dan tentang hubungan faktor lingkungan dengan pengembangan tanaman. Penelitian selanjutnya terkait Aplikasi Madu sebagai Aktivator *Stem Cells* Endogen dan juga Kombinasi Terapi Madu dan *Stem Cells.* Penulis diakui oleh rekan-rekannya sebagai ahli Anatomi Ilmiah dan Tanaman yang mengintegrasikan pandangan baru tentang pengetahuan tanaman. Penulis menyandang gelar S.Si dalam Biologi dari Universitas Airlangga dan M.Si Biologi dengan penghargaan tertinggi dari Institut Teknologi Bandung, serta menyelesaikan residensinya di Struktur dan Pengembangan Tanaman sebagai Ph.D dari Universitas Tohoku di Jepang.

Aplikasi Madu sebagai Aktivator *STEM CELL*

APLIKASI MADU SEBAGAI AKTIVATOR *STEM CELL* membuka cakrawala ilmu pengetahuan terbaru, betapa MADU bukan sekedar untuk kesehatan dan kecantikan ragawi semata, namun sudah menyentuh pada tingkatan sel sebagai penyusun tubuh, bahkan sel yang paling spesial seperti *STEM CELL* (Sel Punca). Tahukah anda apakah itu *Stem Cell*? Dalam dunia kedokteran medis dan bioteknologi, *stem cell* pada abad milenial dan ke depan merupakan suatu fenomena yang sangat menakjubkan. *Stem cell* mempunyai potensi sangat luar biasa dan memberikan harapan sangat meyakinkan bagi penderita pada tingkatan *"hopeless"* untuk kesembuhan terutama pada kasus penyakit degeneratif sebagai penyebab kerusakan pada organ, seperti *Alzheimer, Stroke, Parkinson*, Diabetes Mellitus, HIV, maupun *Infark Miocard* dan malnutrisi berat yang berakibat pada gangguan reproduksi seperti *testis failure* ataupun *ovary failure*.

Namun demikian, dikarenakan program terapi transplantasi *stem cell* harus dilakukan beberapa kali pengulangan (*booster*) sebanyak 6-10 kali tergantung tingkat keparahan penyakit agar dapat dicapai kesembuhan, maka hal ini menyebabkan seseorang berpikir beberapa kali untuk menjalani terapi *stem cell* dikarenakan membutuhkan biaya yang tidak sedikit tentunya.

Oleh karena itu, diperlukan suatu inovasi dalam upaya **AKTIVASI *STEM CELL*** dari dalam tubuh sendiri (*endogenous stem cell*) yaitu bahan yang dapat mengaktivasi *stem cell* dari luar tubuh, salah satunya melalui pemberian bahan alam, seperti MADU. Melalui pemanfaatan madu akan terjadi autoregenerasi pada sel-sel dari jaringan yang mengalami kerusakan (degeneratif) sehingga akan terjadi perbaikan (regeneratif) pada jaringan tersebut. Buku ini membuka khazanah pengetahuan madu dari hilir hingga hulu dalam terapi medis melalui pendekatan *stem cell*. Selain informasi yang didasarkan pada pengetahuan umum dan data empiris ilmiah, buku ini juga disertai ilustrasi yang mempermudah pemahaman.

Airlangga University Press

ISBN 978-602-473-830-3
9 786024 738303