

**AKTIVITAS IMUNOMODULATOR SEDIAAN *SELF NANO
EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS)
PROPOLIS TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS
MAKROFAG PADA TIKUS *WISTAR* JANTAN**

SKRIPSI



Oleh:

DWI AMALIA WEUANGGI

16613040

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
JUNI 2020**

AKTIVITAS IMUNOMODULATOR SEDIAAN *SELF NANO EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS) PROPOLIS TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PADA TIKUS *WISTAR JANTAN*

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia Yogyakarta



Oleh:

DWI AMALIA WEUANGGI

16613040

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
JUNI 2020**

SKRIPSI

AKTIVITAS IMUNOMODULATOR SEDIAAN *SELF NANO EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS) PROPOLIS TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PADA TIKUS *WISTAR* JANTAN



Pembimbing utama,

Cynthia Astiti Putri, S.Farm.,M.Si.,Apt

Pembimbing Pendamping,

Annisa Fitria, S.Farm., M.Sc., Apt

SKRIPSI

AKTIVITAS IMUNOMODULATOR SEDIAAN *SELF NANO EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS) PROPOLIS TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PADA TIKUS *WISTAR* JANTAN

Oleh:

DWI AMALIA WEUANGGI

16613040

Telah lolos uji etik penelitian

Dan telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi Program Studi

Farmasi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 22 Juni 2020

Ketua Penguji : Dr. Yandi Syukri, M.Si., Apt

Anggota Penguji : 1. Cynthia Astiti Putri, S.Farm., M.Si., Apt

2. Annisa Fitria, S.Farm., M.Sc., Apt

3. Dr. Arba P. Ramadani, S.Farm., M.Sc., Apt

()

()

()

()

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia



Prof. Riyanto, S.Pd., M.Sc. Ph.D.

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi yang berjudul “**Aktivitas Imunomodulator Sediaan *Self Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) Propolis Terhadap Akitivitas Fagositosis Makrofag pada Tikus *Wistar Jantan***” tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 22 Juni 2020

Penulis,



Dwi Amalia Weuanggi

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Assalamu'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh.

Alhamdulillah rabbil 'aalamiin, segala puji dan syukur kepada Allah SWT atas rahmat, hidayah dan karunia yang tidak terhingga sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Aktivitas Imunomodulator Sediaan Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Propolis Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag pada Tikus Wistar Jantan**” sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia. Oleh karena itu, penulis menghaturkan terimakasih banyak yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Cynthia Astiti Putri, S.Farm.,M.Si.,Apt dan Ibu Annisa Fitria, S.Farm., M.Sc., Apt selaku dosen pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, dorongan, dan saran-saran selama penelitian dan penyusunan skripsi ini berlangsung.
2. Kedua orang tua saya Bapak Armansyah dan Ibu Sadria, Kakak dan Adik-adik saya Magnalia Minaula Gamoro, Sri Rezkyka Cahyani dan Muhammad Bima Iqrahim serta keluarga besar saya yang selalu mendoakan dan memberikan motivasi dan semangat kepada saya.
3. Bapak Dr. Yandi Syukri, M.Si., Apt selaku dosen penguji sekaligus Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
4. Ibu Dr. Arba Pramundita R.,S.Farm.,M.Sc., Apt selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan perbaikan untuk penyusunan skripsi hingga skripsi ini dapat diselesaikan.
5. Bapak Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.

6. Bapak Saepudin, S.Si., M.Si., Apt., Ph.D. selaku ketua Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
7. Ibu Sista Werdyani S.Farm.,Apt.,M.Biotech. selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing dan memberikan motivasi serta nasehat dari awal perkuliahan sampai saat ini.
8. Sindy Vellayanti, Hodijatul Munawwaroh, Nur atsil, Hendry Aditya Pohara, Muhammad Bayu Prasetyo Aji dan teman-teman seperjuangan yang selalu membantu dengan tulus di setiap proses pembelajaran saya.
9. Segenap laboran laboratorium farmasi dan civitas akademik Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia dan berbagai pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu, yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis memohon maaf sebesar-besarnya jika dalam penulisan skripsi ini terdapat kekhilafan dan penulis berharap semoga skripsi ini dapat membawa manfaat bagi pembaca.

Wassalamu'alaikum Warohmatullahi Wabarokatuh.

Yogyakarta, 22 Juni 2020

Penulis,

Dwi Amalia Weuanggi

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DARTAR LAMPIRAN	xii
INTISARI	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	2
BAB II STUDI PUSTAKA	3
2.1 Tinjauan Pustaka	3
2.1.1 Propolis	3
2.1.2 <i>Self Nano-Emulsifying Drug Delivery System</i> (SNEDDS).....	4
2.1.3 Imunomodulator.....	5
2.1.4 Aktivitas Fagositosis Makrofag	6
2.2 Landasan Teori	8
2.3 Hipotesis	8
2.4 Kerangka Konsep	9

BAB III METODE PENELITIAN	10
3.1. Bahan dan Alat	10
3.1.1. Bahan	10
3.1.2. Alat.....	10
3.1.3. Subjek Uji	10
3.2. Cara Penelitian	11
3.2.1 Skema Penelitian.....	11
3.2.2 Pengajuan <i>Ethical Clereance</i>	12
3.2.3 Persiapan Hewan Uji	12
3.2.4 Perhitungan Penentuan Sampel Hewan Uji.....	12
3.2.5 Penentuan Dosis Pemberian.....	12
3.2.6 Pembuatan Sediaan SNEDDS Propolis	13
3.2.7 Kelompok dan Perlakuan Hewan Uji	13
3.2.8 Persiapan Isolasi Makrofag.....	14
3.2.9 Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag.....	14
3.3. Analisis Hasil	15
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	16
4.1 Pengajuan <i>Ethical Clearance</i>	16
4.2 Hasil Perhitungan Indeks Fagositosis dan Rasio Sel Makrofag.....	16
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	19
5.1 Kesimpulan	19
5.2 Saran	19
DAFTAR PUSTAKA	20
LAMPIRAN.....	24

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Senyawa CAPE (<i>Caffeic Acid Phenyl Ester</i>).....	4
Gambar 2. 2 Morfologi Makrofag	6
Gambar 2. 3 Proses Fagositosis Makrofag	7
Gambar 2. 4 Kerangka Konsep	9



DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Pembagian kelompok dan perlakuan hewan uji.....	13
Tabel 4. 1 Hasil Indeks dan Rasio Fagositosis Makrofag	16



DARTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan <i>Ethical Clearance</i>	24
Lampiran 2. Tabel Hasil Perhitungan Indeks dan Rasio Fagositosis Makrofag .	25
Lampiran 3. Tabel hasil uji <i>One Way</i> ANOVA Indeks Fagositosis dan Rasio Fagositosis Makrofag	26



Aktivitas Imunomodulator Sediaan *Self Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) Propolis terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Pada Tikus *Wistar* Jantan

**Dwi Amalia Weuanggi
Prodi Farmasi**

INTISARI

Propolis adalah zat resin dari lebah yang mengandung flavonoid dan memiliki efek farmakologis sebagai imunomodulator. Flavonoid diketahui sukar larut dengan air yang menyebabkan bioavailabilitas propolis rendah. Oleh karena itu, propolis diformulasi dalam sediaan *self nano-emulsifying drug delivery system* (SNEDDS) untuk meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas zat aktif propolis. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek imunomodulator sediaan SNEDDS propolis terhadap aktivitas fagositosis makrofag pada tikus *Wistar* jantan secara *in vivo*. Sebanyak 24 ekor tikus jantan digunakan dalam penelitian ini dan dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol normal, kontrol positif (levamisol dosis 0,9 mg/g BB tikus/hari), suspensi propolis dosis 200 mg/g BB tikus/hari, dan SNEDDS propolis dosis 200 mg/g BB tikus/hari selama 13 hari. Pada hari ke-14 tikus dikorbankan dengan cara dislokasi leher dan dilakukan uji aktivitas fagositosis makrofag menggunakan lateks. Data antar kelompok dianalisis dengan statistika menggunakan metode *One Way ANOVA*. Hasil indeks fagositosis dan rasio sel makrofag SNEDDS propolis yaitu $1,78 \pm 0,25$ dan $37,67 \pm 7,56$ lebih tinggi dibandingkan dengan suspensi propolis yaitu $1,55 \pm 0,31$ dan $32,50 \pm 15,40$. Dapat disimpulkan bahwa SNEDDS propolis dengan dosis 200 mg/200g dapat meningkatkan indeks fagositosis dan rasio sel makrofag dibandingkan dengan suspensi propolis meskipun secara statistik tidak signifikan ($p < 0,05$).

Kata Kunci: Propolis, Imunomodulator, SNEDDS, Fagositosis Makrofag.

Immunomodulator Activity of *Self Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) Propolis on The Macrophage Phagocytic Activity using Male *Wistar* Rats

ABSTRACT

Propolis is a resinous substance from bees that contains flavonoids and possess immunomodulator activity. Flavonoids are hardly dissolve in water thus reduce its bioavailability. Therefore, in this study, propolis was formulated in a self nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) preparation to increase its solubility and bioavailability. This study aimed to examine the immunomodulatory effects of SNEDDS propolis preparations on the phagocytic activity of macrophages in male *Wistar* rats *in vivo*. About 24 *Wistar* male rats were employed and distributed into 4 groups : normal control group, positive control group (0,9 mg/200g/day), propolis suspension dose of 200 mg/200g/day, and SNEDDS propolis dose of 200 mg/200g/day for 13 days. On 14th day all animals study was terminated by neck dislocation with prior anesthesia administration followed by investigation of phagocytic activity of macrophages using latex. The data were analyzed statistically using the *One Way* ANOVA. The phagocytosis index of SNEDDS propolis on macrophage cell ratio was is 1.78 ± 0.25 and 37.67 ± 7.56 higher than propolis suspension which is 1.55 ± 0.31 and 32.50 ± 15.40 . Hence, it was concluded that SNEDDS propolis at a dose of 200 mg/200g increased the phagocytosis index and macrophage cell ratio compared to propolis suspension although it was not statistically significant ($p < 0.05$).

Keyword : Propolis, Immunomodulator, SNEDDS, Macrophage Phagocytosis

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Indonesia dan hampir seluruh dunia sedang mengalami pandemi covid-19 atau *corona virus*. Covid-19 disebabkan oleh virus SARS-CoV-2 dan belum ditemukan pengobatan efektif yang dapat membunuh virus tersebut, sehingga sistem pertahanan tubuh menjadi benteng untuk melawan dan mencegah *corona virus* (Kannan *et al.*, 2019). Imunomodulator adalah senyawa yang dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh manusia (Afolayan *et al.*, 2018). Propolis menjadi salah satu bahan herbal yang dapat digunakan sebagai imunomodulator (Kalsum *et al.*, 2017).

Propolis diproduksi oleh lebah untuk melindungi sarang umumnya berwarna coklat kehitaman, berbentuk pekat dan lengket (Conti *et al.*, 2013; Kalsum, 2017; Kusnul *et al.*, 2017; Orsatti *et al.*, 2009; Sampietro *et al.*, 2016; Syamsudin *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2014; Wolska *et al.*, 2019). Propolis mengandung senyawa kimia yang sangat kompleks antara lain flavonoid, fenilpropanoid, terpenoid, stilbena, lignan, kuramin, dan turunan prenilasi. Senyawa flavonoid dari propolis diketahui memiliki efek imunomodulator, tetapi flavonoid memiliki kelarutan dengan air yang rendah sehingga ketika digunakan peroral bioavailabilitas propolis rendah (Kalsum *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2014).

Efektivitas produk herbal akan maksimal ketika diformulasi menghasilkan sediaan yang dapat meningkatkan kelarutan, stabilitas dan bioavailabilitas sehingga penggunaan produk lebih efektif (Pratiwi *et al.*, 2018). *Self Nano-Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) merupakan campuran larutan isotropic dari minyak, co-surfaktan dan surfaktan yang membentuk suatu nanoemulsi minyak dalam air sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas zat aktif propolis. SNEDDS memiliki ukuran partikel yang sangat kecil yaitu kurang dari 100 nm sehingga dapat meningkatkan luas permukaan dan meningkatkan absorpsi suatu obat (Darmawan, 2017; Tran *et al.*, 2014).

Penelitian terkait SNEDDS yang dilakukan Beandrade, (2018) menunjukkan bahwa sediaan SNEDDS jinten hitam dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dibandingkan dengan ekstrak jinten hitam tanpa formulasi, sedangkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Kalsum *et al.*, (2017) menunjukkan pemberian ekstrak etanol propolis dapat meningkatkan sistem imun berdasarkan peningkatan aktivitas fagositosis makrofag. Penelitian terkait propolis sebagai imunomodulator telah banyak dilakukan tetapi belum ada penelitian propolis dalam bentuk sediaan SNEDDS sehingga SNEDDS menjadi keterbaruan dalam penelitian ini. Berdasarkan hal tersebut maka dalam penelitian ini sediaan *Self Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) propolis diharapkan dapat meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas zat aktif propolis sebagai imunomodulator berdasarkan aktivitas fagositosis makrofag dibandingkan dengan suspensi propolis.

1.2 Perumusan Masalah

Bagaimana aktivitas imunomodulator sediaan *self nano-emulsifying drug delivery system* (SNEDDS) propolis terhadap aktivitas fagositosis makrofag pada tikus *Wistar* jantan ?

1.3 Tujuan Penelitian

Mampu mengkaji efek imunomodulator sediaan *self nano-emulsifying drug delivery system* (SNEDDS) propolis terhadap aktivitas fagositosis makrofag pada tikus *Wistar* jantan.

1.4 Manfaat Penelitian

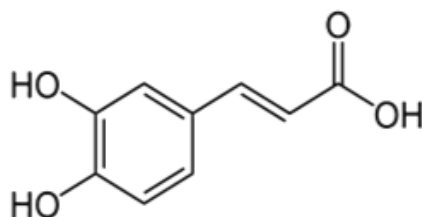
- 1.4.1 Bagi masyarakat umum dapat memberikan pengetahuan tentang aktivitas imunomodulator SNEDDS propolis yang dapat digunakan sebagai produk herbal
- 1.4.2 Bagi pengembangan ilmu dapat menambah kekayaan informasi dan menjadi rujukan penelitian mengenai sediaan SNEDDS propolis sebagai imunomodulator.
- 1.4.3 Bagi mahasiswa dapat dimanfaatkan untuk menambah wawasan serta digunakan dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

BAB II
STUDI PUSTAKA
2.1 Tinjauan Pustaka

2.1.1 Propolis

Propolis adalah produk resin yang dihasilkan dan dikumpulkan oleh lebah dari kuncup tanaman yang menempel pada bunga, pucuk dan kulit kayu untuk melindungi sarang bersifat pekat, bergetah dan berwarna coklat kehitaman mempunyai bau yang khas serta rasa pahit (Syamsudin *et al.*, 2009). Lebah menggunakan bahan propolis untuk pertahanan sarang, mengkilatkan bagian dalam sarang dan menjaga suhu lingkungan. Propolis mengandung 50% resin yang terdiri dari flavonoid dan asam fenolik, umumnya disebut sebagai fraksi polifenol, lilin (30%), minyak atsiri (10%), serbuk sari (5%), dan senyawa organik lainnya (5%) (Toreti *et al.*, 2013). Kandungan polifenol yang tinggi di dalam propolis digunakan sebagai pengobatan tradisional karena memiliki banyak manfaat yaitu antibakteri, antijamur, antioksidan, antitumor, dan imunomodulator tetapi propolis memiliki bioavailabilitas yang rendah karena sukar larut dengan air (Jing Wu, 2013; Sampietro *et al.*, 2016; Sforcin and Bankova, 2011; Siheri *et al.*, 2016; Syamsudin *et al.*, 2009; Wolska *et al.*, 2019).

Aktivitas fagositosis makrofag dapat ditingkatkan dengan zat imunomodulator seperti propolis (Kalsum *et al.*, 2017). Aktivasi makrofag dapat terjadi karena propolis dapat meningkatkan aktivitas LAF (*Lymphocyte Activating Factor*) yang dapat langsung mengaktifkan makrofag dan menjadikan makrofag lebih responsif terhadap mikroorganisme fagosit karena propolis memiliki aktivitas seperti sitokin IFN- γ yang dapat mengaktifkan makrofag (Kalsum *et al.*, 2017). Senyawa aktif dari propolis adalah *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE) dan limonene memiliki efek farmakologi sebagai antioksidan, antikanker dan imunomodulator (Kusnul *et al.*, 2017). Penelitian lain telah menunjukkan bahwa beberapa bahan dalam propolis seperti *caffeic acid phenethyl ester*, asam cinnamic, dan artemisin C juga mampu mengaktifkan makrofag secara *in vitro* dan *in vivo* (Kalsum, 2017; Kalsum *et al.*, 2016).



Gambar 2. 1 Senyawa CAPE (*Caffeic Acid Phenyl Ester*) (Chan *et al.*, 2013)

2.1.2 *Self Nano-Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS)

Self nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) merupakan campuran homogen dari minyak, surfaktan, ko-surfaktan dan zat aktif yang membentuk nanoemulsi minyak dalam air (*o/w*) (Date *et al.*, 2010). Nanoemulsi diketahui dapat meningkatkan stabilitas fisik dan kimia suatu obat, beberapa tahun terakhir nanoemulsi menjadi perhatian karena memiliki ukuran partikel yang sangat kecil yaitu ≤ 200 nm sehingga dapat meningkatkan luas permukaan dan meningkatkan absorpsi suatu obat (Balakumar *et al.*, 2013; Darmawan, 2017; Lovelyn and Attama, 2011; Tran *et al.*, 2014). Pembawa SNEDDS menjadi salah satu formulasi yang dapat digunakan untuk obat-obat hidrofobik atau senyawa yang sukar larut dengan air (Afolayan *et al.*, 2018; Baloch *et al.*, 2019).

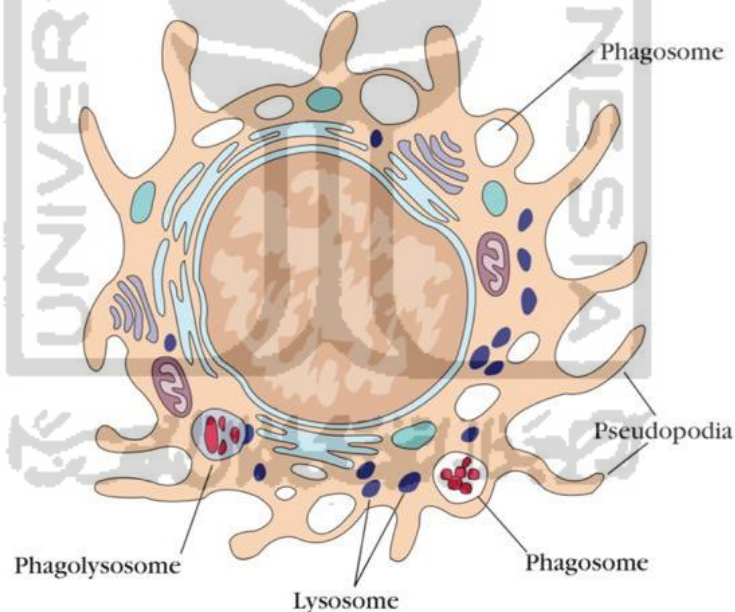
Kelebihan nanoemulsi minyak dalam air yaitu dapat membawa obat yang bersifat hidrofobik di dalam minyak dan dapat teremulsi di dalam air sehingga mampu meningkatkan kelarutan, stabilitas dan bioavailabilitas obat ketika diberikan secara peroral (Beandrade, 2018; Date *et al.*, 2010; Weerapol *et al.*, 2015). *Self nano-emulsifying drug delivery system* (SNEDDS) mampu menjadi sistem penghantaran obat yang baik ketika masuk ke saluran *gastrointestinal* dalam tubuh, agitasi diperlukan untuk pembentukan nanoemulsi yang disediakan oleh motilitas saluran *gastrointestinal* (Balakumar *et al.*, 2013). Sediaan SNEDDS juga dapat mengandung *coemulsifier* atau *cosurfactant* dan atau *solubilizer* untuk memfasilitasi nanoemulsifikasi atau meningkatkan penggabungan obat dalam SNEDDS (Date *et al.*, 2010).

2.1.3 Imunomodulator

Sistem imun adalah sistem pertahanan tubuh manusia pertama untuk perlindungan dan pertahanan terhadap mikroorganisme patogen yang menyerang tubuh seperti bakteri, virus dan parasit (Kalsum, 2017). Terdapat dua jenis sistem imun yaitu sistem imun bawaan dan adaptif dimana sistem imun bawaan merupakan pertahanan pertama yang melawan mikroorganisme patogen, ketika sistem imun bawaan tidak dapat melawan patogen tersebut maka sistem imun adaptif akan diaktifkan (Tao *et al.*, 2014). Sistem imun bawaan terdiri dari respon kimia yang disebut komplemen, sistem endositik dan fagosit yang melibatkan makrofag untuk mendeteksi dan menelan mikroorganisme patogen (Kusnul *et al.*, 2017). Ketika patogen menyerang tubuh maka sistem imun tubuh yang akan mendeteksi dan mematikan mikroorganisme patogen tersebut (Owen *et al.*, 2013). Imunomodulator adalah suatu substansi yang mampu memodifikasi sistem imun bawaan dan adaptif dengan cara meningkatkan sistem imun yang biasa disebut imunostimulan atau menekan sistem imun yang biasa disebut immunosupresan (Wolska *et al.*, 2019). Imunostimulan merupakan zat yang bekerja menjaga sistem kekebalan tubuh untuk mencegah penyakit dan meningkatkan daya tahan tubuh terhadap berbagai infeksi virus dan bakteri patogen (Chan *et al.*, 2013). Sistem imun ada yang bersifat spesifik (proliferasi sel T, sel B yang memproduksi antibodi) dan non spesifik (makrofag dan NK sel). Sistem imun non spesifik dapat meningkatkan respon makrofag terhadap infeksi karena adanya sekresi sitokin atau limfokin oleh limfosit T misalnya IFN- γ dan TNF- α (Kusnul *et al.*, 2017). Imunomodulator digunakan untuk mengurangi dampak patologis dari beberapa penyakit yang berkaitan dengan kekebalan tubuh seperti asma, kanker, radang sendi dan radang usus (Afolayan *et al.*, 2018). Beberapa obat imunostimulan telah dikembangkan untuk menginduksi respon imun terhadap infeksi bakteri, virus, penyakit defisiensi imun dan kanker. Levamisol adalah salah satu obat imunostimulan sintesis yang merangsang limfosit B dan T, monosit dan makrofag (Oladele *et al.*, 2012; Wolska *et al.*, 2019).

2.1.4 Aktivitas Fagositosis Makrofag

Makrofag berasal dari kata makro yang berarti “besar” dan *faga* berarti “pemakan” (Sherwood, 2013). Fungsi utama makrofag yaitu sebagai sel fagosit yang mampu fagositosis organisme patogen atau benda-benda asing (Kalsum *et al.*, 2017). Makrofag merupakan produsen sitokin yang kuat dan memainkan peran penting dalam berbagai proses, termasuk presentasi antigen dan penyembuhan luka. Sum-sum tulang belakang menghasilkan promonosit yang kemudian bermigrasi ke pembuluh darah menjadi monosit lalu berdiferensiasi menjadi makrofag ketika berada di jaringan (Wolska *et al.*, 2019). Ukuran makrofag 10 kali lipat lebih besar dari monosit dan mengandung lebih banyak organel-organel terutama lisosom, berbentuk tidak beraturan dan melekat pada permukaan rongga peritoneum dalam jumlah yang sangat banyak sekitar 50% (Abbas *et al.*, 2012; Owen *et al.*, 2013; Sherwood, 2013).

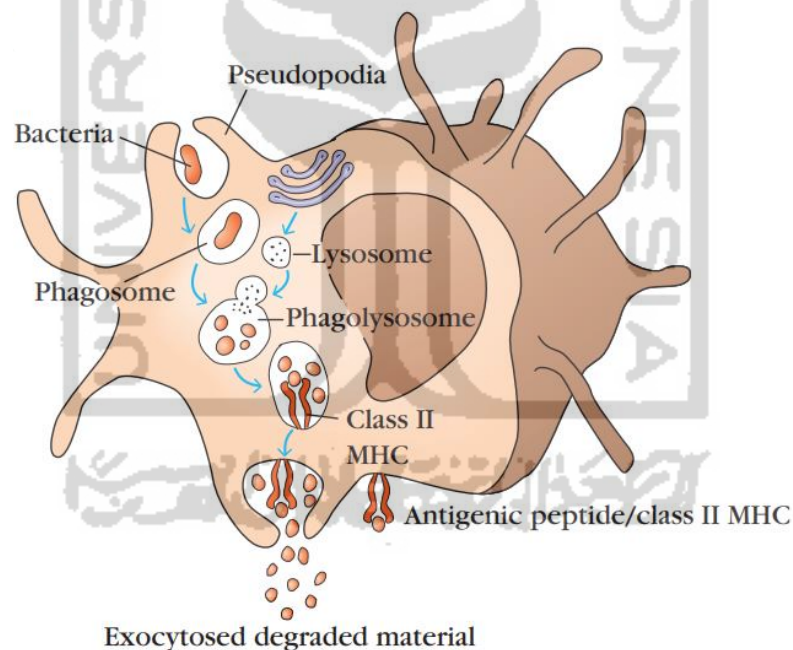


Gambar 2. 2 Morfologi Makrofag (Owen *et al.*, 2013)

Aktivasi makrofag menyebabkan produksi sitokin, nitrit oksida (NO) dan mediator inflamasi (Fan *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019). Sitokin adalah molekul kecil protein yang disekresikan oleh sel-sel imun memiliki efek menguntungkan dalam sistem imun tubuh dan saat terjadi peradangan. Makrofag memberikan dampak imunomodulator dengan mengeluarkan berbagai sitokin seperti IL-1 β (interleukin-

1 β), IL-6 (interleukin-6), TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) dan IFN- γ (interferon- γ) (Kusnul *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Wolska *et al.*, 2019).

Lateks adalah benda asing berbahan dasar karbohidrat yang dapat memicu aktivitas fagositosis makrofag, sehingga makrofag akan memfagosit lateks karena makrofag memiliki salah satu reseptor yaitu manose reseptor yang dapat mengenali karbohidrat pada lateks dan permukaan mikroba (Abbas *et al.*, 2012; Lestari *et al.*, 2012). Aktivitas fagositosis makrofag dilihat dari indeks fagositosis dan rasio sel makrofag. Indeks fagositosis adalah kemampuan sel makrofag aktif dalam memfagositosis lateks, semakin banyak lateks yang difagositosis maka kapasitas makrofag memfagositosis semakin tinggi sedangkan rasio fagositosis makrofag adalah persentase makrofag aktif yang memakan lateks dari 100 makrofag (Beandrade, 2018).



Gambar 2. 3 Proses Fagositosis Makrofag (Owen *et al.*, 2013)

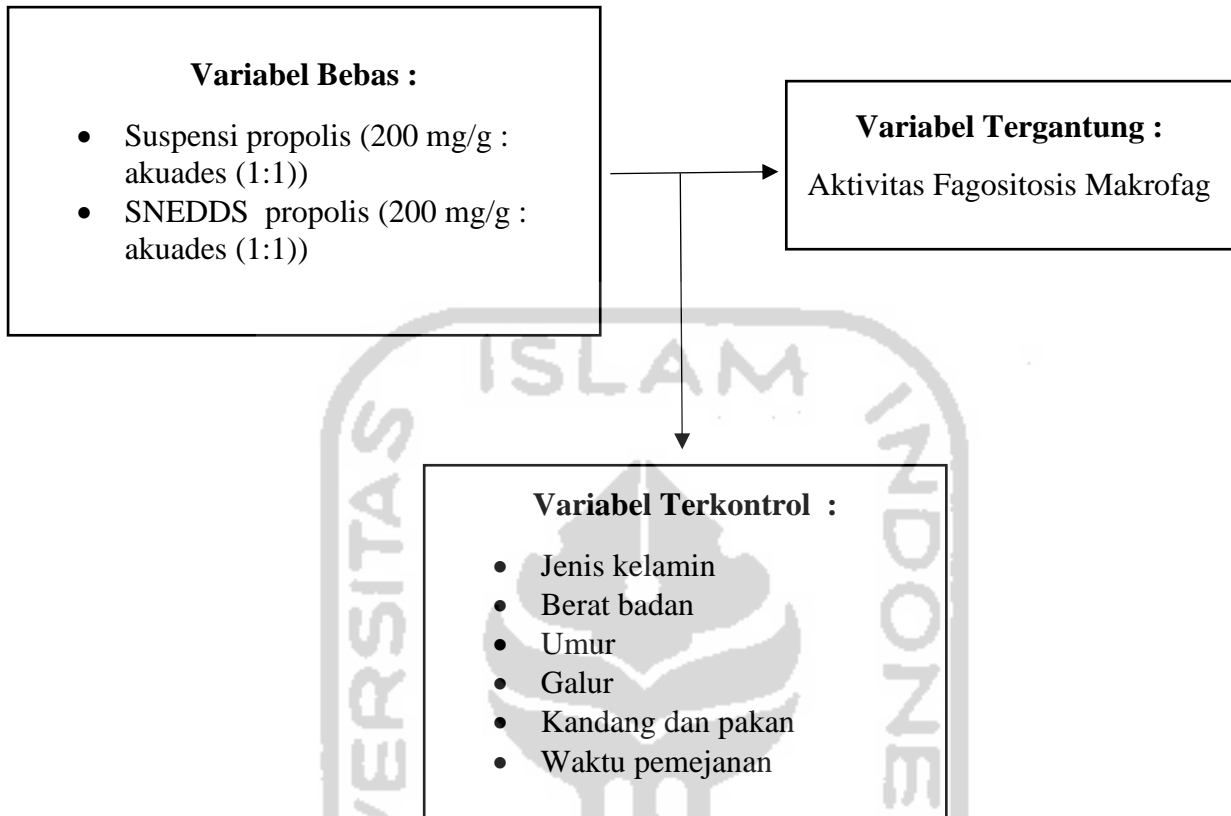
2.2 Landasan Teori

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Kalsum *et al.*, (2017) secara *in vivo* menggunakan tikus *Sprague Dawley* menunjukkan bahwa ekstrak etanol propolis cair *Trigona spp.* memiliki efek imunomodulator berdasarkan aktivitas fagositosis makrofag. Pada penelitian Tao *et al.*, (2014) telah dilakukan pengujian secara *in vivo* dan *in vitro* menggunakan formulasi liposom propolis dibandingkan dengan propolis tanpa liposom menunjukkan bahwa formulasi liposom propolis secara signifikan dapat meningkatkan fagositosis makrofag, sedangkan pada penelitian Beandrade, (2018) menunjukkan bahwa formulasi SNEDDS jinten hitam dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dibandingkan dengan jinten hitam tanpa formulasi. Pada penelitian Balakumar *et al.*, (2013) menunjukkan bahwa formulasi SNEDDS dapat meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas zat aktif dibandingkan dengan suspensi.

2.3 Hipotesis

Sediaan SNEDDS propolis memiliki aktivitas imunomodulator yang lebih baik dibandingkan dengan suspensi propolis terhadap aktivitas fagositosis makrofag pada tikus *Wistar* jantan.

2.4 Kerangka Konsep



Gambar 2. 4 Kerangka Konsep

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Bahan dan Alat

3.1.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah propolis (diperoleh dari CV. Rumah Lebah, Jawa Timur), minyak kesturi, minyak kesturi, *cremophor* RH40 (BASF, Indonesia), PEG 400 (Brataco Indonesia Ltd.), levamisol (Askamex), akuades (LPMOK Universitas Islam Indonesia), alkohol 70%, *yellow tip*, *blue tip*, syringe 10 ml (Terumo®), conical tube 15 ml (Greiner), mikrotube 1,5 ml, media RPMI 1650 (Gibco), media RPMI komplet (Gibco), *ketamine*, *xylaxine*, metanol p.a, fetal bovine serum (PBS) (Gibco), giemsa (Merck), latex beads polystyrene (Sigma).

3.1.2. Alat

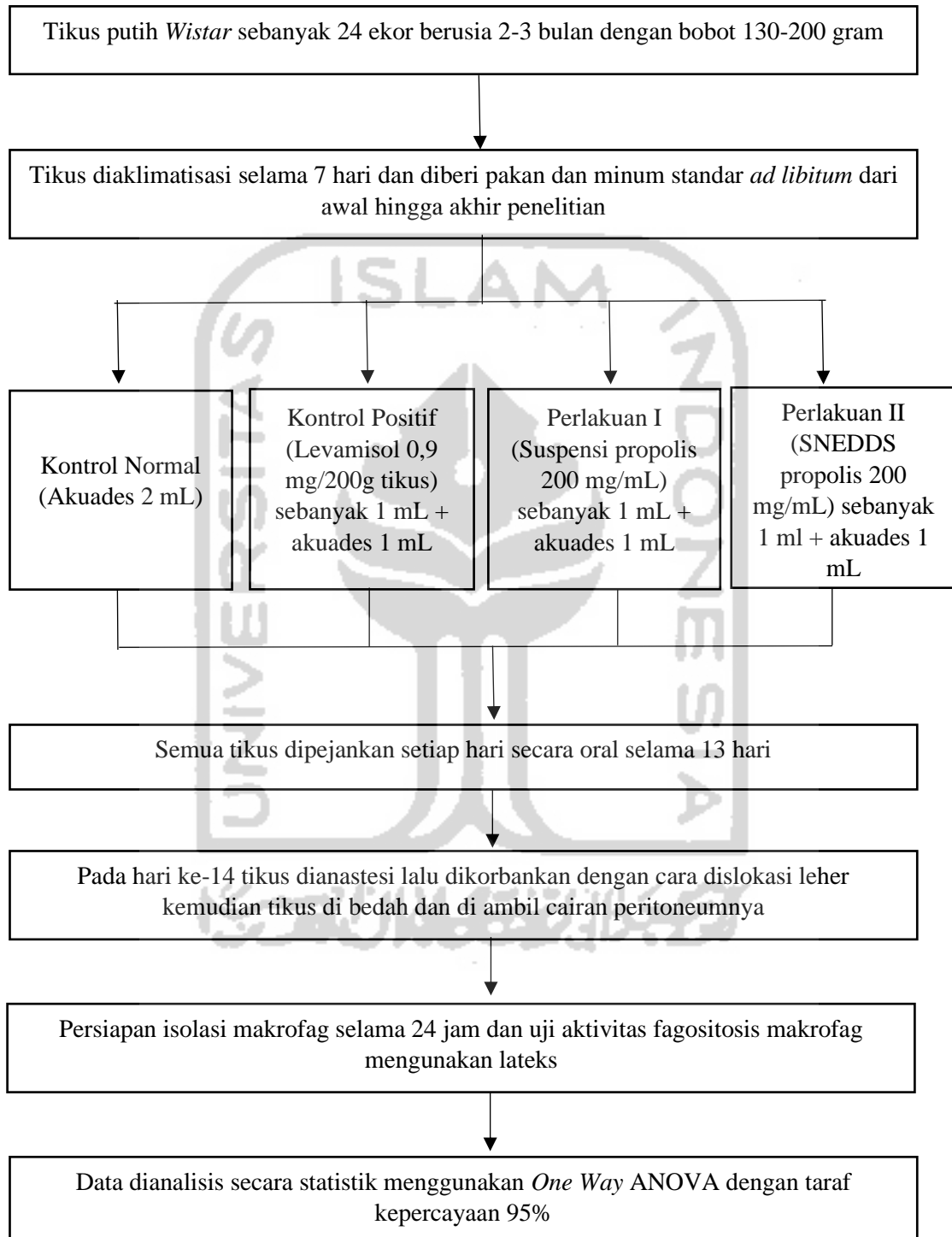
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah LAF (*Laminar Air Flow*) (Labconco, Fort Scott, KS, USA), mikroskop *inverted*, sentrifugator (Nuve-NF 400), mikropipet (Thermoscientific Finn pipette), mikroplate 24-well (Nunc, Saint Neots, England), hemocytometer (BD FACS Calibur), incubator CO₂ 5% (Mettler®), *light microscope* (Olympus, Hamburg, Germany), dan seperangkat alat gelas (Pyrex).

3.1.3. Subjek Uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Terdapat 4 kelompok yang terdiri dari 6 ekor setiap kelompok sehingga total hewan uji yang digunakan sebanyak 24 ekor dipelihara di kotak plastik tertutup kawat. Adapun kriteria inklusi penggunaan hewan uji pada penelitian ini yaitu tikus *Wistar* jantan, umur 2-3 bulan, berat badan 130-200 gram, sehat, tidak ada abnormalitas yang tampak dan bergerak aktif, sedangkan kriteria eksklusi yaitu adanya penurunan badan yang signifikan pada berat badan subjek uji ataupun terjadinya cacat, sakit dan kematian subjek uji selama masa penelitian berlangsung.

3.2. Cara Penelitian

3.2.1 Skema Penelitian



3.2.2 Pengajuan *Ethical Clearance*

Pengajuan *Ethical Clearance* bertujuan agar perlakuan yang diberikan kepada subjek uji sesuai etika. Pengajuan ini diajukan kepada Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam.

3.2.3 Persiapan Hewan Uji

Tikus jantan galur Wistar berumur 2-3 bulan dengan berat badan sekitar 130-200 gram. Hewan uji diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari pada kondisi standar laboratorium, diberi pakan dan minum *ad libitum*. Sepanjang percobaan tikus-tikus tersebut telah diperlakukan sesuai dengan kelayakan etik.

3.2.4 Perhitungan Penentuan Sampel Hewan Uji

Jumlah hewan uji pada penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus Federer $(n-1)(t-1) \geq 15$, dimana t adalah jumlah perlakuan dan n adalah jumlah pengulangan untuk tiap perlakuan sehingga diperoleh jumlah minimal tikus yaitu 6 ekor setiap kelompok. Sehingga total jumlah tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 24 ekor tikus *Wistar* jantan.

3.2.5 Penentuan Dosis Pemberian

Bahan yang digunakan berupa propolis yang di formulasi dalam sediaan SNEDDS dan suspensi. Produk SNEDDS propolis tersebut dari Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Islam Indonesia yang sudah di optimasi pada penelitian sebelumnya.

a) Perhitungan Dosis Propolis

Pada penelitian ini dosis propolis yang digunakan adalah 200 mg/g dalam 1 mL propolis yang kemudian ditambahkan 1 mL akuades sehingga volume pemberian yang diberikan yaitu sebanyak 2 mL baik pada SNEDDS maupun suspensi. Jumlah tikus yang digunakan 6 ekor dan stok yang dibutuhkan untuk 13 hari sebanyak 78 mL. Stok dibuat setiap 3 hari yang diperlukan sebanyak 3.600 mg/18 mL. Volume stok dilebihkan menjadi 25 mL sehingga dibuat stok 4.000 mg/20 mL setiap 3 hari selama 13 hari.

b) Perhitungan Dosis Levamisol

Dosis levamisol yang diberikan yaitu 50 mg/kgBB manusia kemudian dikonversi ke dalam dosis tikus menjadi 0,9 mg/200 gram dalam 1 mL levamisol yang kemudian ditambahkan 1 mL akuades sehingga volume pemberian yang diberikan yaitu sebanyak 2 mL. Jumlah tikus yang digunakan 6 ekor dan stok yang dibutuhkan untuk 13 hari sebanyak 78 mL. Stok dibuat setiap 3 hari yang diperlukan sebanyak 16,2 mg/18 mL. Volume stok dilebihkan menjadi 20 mL sehingga dibuat stok sebanyak 18 mg/20 mL setiap 3 hari selama 13 hari.

3.2.6 Pembuatan Sediaan SNEDDS Propolis

SNEDDS mengandung minyak, surfaktan, ko-surfaktan dan zat aktif. Pembuatan sediaan SNEDDS dilakukan dengan mencampurkan minyak kesturi (20%), *cremophor* RH40 (70%), PEG 400 (10%) dan 200 mg propolis ke dalam tabung reaksi kemudian dihomogenkan dengan *vortex* sampai homogen (Syukri *et al.*, 2019).

3.2.7 Kelompok dan Perlakuan Hewan Uji

Tabel 3. 1 Pembagian kelompok dan perlakuan hewan uji

Kelompok	Perlakuan
Kontrol Normal	Akuades sebanyak 2 mL secara oral selama 13 hari.
Kontrol Positif	Levamisol (imunostimulan) 0,9 mg/200 g/hari : akuades (1:1) sebanyak 2 mL diberikan secara oral selama 13 hari.
Perlakuan I	Suspensi propolis 200 mg/ 200g/hari : akuades (1:1) sebanyak 2 mL secara oral selama 13 hari.
Perlakuan II	SNEDDS propolis 200 mg/ 200g/hari : akuades (1:1) sebanyak 2 mL diberikan secara oral selama 13 hari.

3.2.8 Persiapan Isolasi Makrofag

Persiapan isolasi makrofag dilakukan secara aseptik seluruh alat yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu. Pada hari ke-14 hewan uji di anastesi menggunakan *ketamine* + *xylazine* melalui injeksi intramuskular dan dikorbankan dengan cara dislokasi leher. Tikus diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%, kemudian disuntikan 10 mL medium RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum ditunggu selama 3-5 menit sambil ditepuk-tepuk perlahan. Cairan peritoneum dikeluarkan dari rongga peritoneum menggunakan syringe kemudian aspirat disentrifugasi pada 1200 rpm selama 10 menit yang dilakukan di *grey area*. Setelah itu isolasi makrofag dilakukan di *Laminar Air Flow* untuk menghindari kontaminasi dimana supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 3 mL medium RPMI komplet yang mengandung PBS 10%. Jumlah sel dihitung dengan *haemocytometer* kemudian ditambahkan dengan medium komplet sehingga didapatkan suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ sel. Suspensi sel ditumbuhkan dalam mikropate 24-well yang telah diberikan *cover slip*, lalu ditambahkan medium RPMI komplet hingga 1 mL kemudian sel diinkubasi dalam *incubator* CO₂ 5% pada suhu 37°C 24 jam (Hertiani *et al.*, 2018).

3.2.9 Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag

Uji aktivitas fagositosis makrofag dilakukan di *red area* menggunakan *Laminar air flow*. Makrofag yang telah diisolasi dan diinkubasi selama 24 jam dicuci 2 kali dengan medium RPMI dan ditambahkan suspensi lateks 200 µL (5×10^6 /mL) pada masing-masing sumuran lalu diinkubasi selama 60 menit dalam *incubator* CO₂ 5% pada suhu 37°C. Setelah 60 menit sel dicuci tiga kali dengan PBS lalu dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol p.a selama 30 detik. Kemudian setelah *cover slip* kering sel dipulas giemsa 10% (v/v). Pengamatan makrofag dilakukan dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x untuk memudahkan pengamatan sel diwarnai menggunakan pewarna giemsa sehingga makrofag akan berwarna ungu dan lateks berwarna bening. Indeks fagositosis ditentukan dengan membagi keseluruhan lateks yang difagositosis oleh

100 sel makrofag terhitung dan rasio sel makrofag dihitung dari total sel makrofag aktif dibagi oleh 100 makrofag terhitung kemudian dikalikan 100% (Beandrade, 2018).

3.3. Analisis Hasil

Data indeks fagositosis dan rasio sel makrofag yang diperoleh dianalisis menggunakan *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan antara kelompok dinyatakan signifikan dengan taraf kepercayaan 95%.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas *Self Nano Emulsifying Drug Delivery System* propolis sebagai imunomodulator pada tikus *Wistar* jantan berdasarkan aktivitas fagositosis makrofag dengan membandingkan aktivitas SNEDDS propolis dengan suspensi propolis.

4.1 Pengajuan *Ethical Clearance*

Penelitian ini telah memenuhi syarat etik dan dinyatakan layak oleh Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia untuk melaksanakan perlakuan pada hewan uji tikus *Wistar* jantan dengan Nomor 3/Ka.Kom.Et/70/KE/II/2020 pada lampiran 1.

4.2 Hasil Perhitungan Indeks Fagositosis dan Rasio Sel Makrofag

Hasil perhitungan indeks fagositosis dan rasio sel makrofag disajikan pada tabel berikut :

Tabel 4. 1 Hasil Indeks dan Rasio Fagositosis Makrofag (n=6)

Kelompok	Indeks Fagositosis	Rasio Sel Makrofag (%)
Kontrol Normal (Akuades)	$1,46 \pm 0,26$	$28,33 \pm 12,61$
Kontrol Positif (Levamisol)	$1,75 \pm 0,30$	$40,67 \pm 16,58$
Suspensi Propolis	$1,55 \pm 0,31$	$32,50 \pm 15,40$
SNEDDS Propolis	$1,78 \pm 0,25$	$37,67 \pm 7,56$

Makrofag adalah salah satu sel yang berperan dalam sistem imun dapat melawan organisme patogen seperti bakteri dan virus dengan cara memfagositosis serta berperan ketika terjadi peradangan dan infeksi (Wang *et al.*, 2018). Hasil perhitungan indeks fagositosis menunjukkan bahwa rata-rata indeks fagositosis SNEDDS propolis paling tinggi dengan nilai $1,78 \pm 0,25$, sedangkan kontrol normal (akuades) paling rendah dengan nilai $1,46 \pm 0,26$. Pada kontrol positif (levamisol)

diperoleh rata-rata yaitu $1,75 \pm 0,30$ lebih tinggi dibandingkan dengan suspensi propolis yaitu $1,55 \pm 0,31$. Hal tersebut menunjukkan sediaan SNEDDS propolis lebih baik dibandingkan suspensi propolis, kontrol normal (akuades) dan kontrol positif (levamisol) karena SNEDSS mampu meningkatkan kelarutan, bioavailabilitas dan absorpsi karena memiliki ukuran partikel yang sangat kecil (Balakumar *et al.*, 2013; Pratiwi *et al.*, 2018). Hasil uji *One Way* ANOVA indeks fagositosis menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok ($p < 0,05$). Pada hasil perhitungan rasio fagositosis makrofag menunjukkan bahwa rata-rata rasio sel makrofag pada kontrol positif (levamisol) paling tinggi dengan nilai $40,67 \pm 16,58$ dibandingkan dengan SNEDDS propolis yaitu $37,67 \pm 7,56$ yang memiliki nilai rata-rata indeks fagositosis lebih tinggi. Hal tersebut menunjukkan makrofag pada kontrol positif lebih aktif memfagositosis karena menurut penelitian Wolska *et al.*, (2019) levamisol merupakan obat imunostimulan sintesis yang dapat merangsang makrofag sehingga makrofag lebih aktif memfagosit. Rata-rata rasio sel makrofag pada kontrol normal (akuades) lebih kecil dibandingkan dengan suspensi propolis, SNEDDS propolis dan kontrol positif. Akuades sebagai kontrol normal tidak memberikan efek farmakologis karena kontrol normal berfungsi sebagai pembanding rentang normal pada hewan uji tanpa perlakuan. Hasil uji *One Way* ANOVA rasio sel makrofag menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok ($p < 0,05$).

Pada penelitian yang dilakukan Sampietro *et al.*, (2016) menunjukkan bahwa ekstrak propolis dapat merangsang aktivitas kemotaksis neutrofil dengan berbagai konsentrasi sehingga memungkinkan untuk digunakan pada pasien yang menderita disfungsi neutrofil diketahui neutrofil adalah salah satu elemen seluler sistem imun. Neutrofil berfungsi sebagai sel fagositik yang memiliki mobilitas tinggi untuk menelan dan menghancurkan benda-benda asing. Sedangkan penelitian Orsatti *et al.*, (2009) menggunakan mencit menunjukkan propolis dapat meningkatkan produksi sitokin proinflamasi dan ekspresi TLR-2 dan TLR-4 oleh makrofag dari cairan peritoneum, menunjukkan bahwa propolis mengaktifkan respon imun awal dan memodulasi mekanisme sistem imun bawaan. Berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian agen imunomodulator seperti

propolis dapat meningkatkan respon imun non spesifik melalui peningkatan aktivitas fagositosis makrofag.

Pada penelitian ini berdasarkan indeks fagositosis dan rasio sel makrofag SNEDDS propolis lebih tinggi dengan nilai sebesar $1,78 \pm 0,25$ dan $37,67 \pm 7,56$ dibandingkan dengan suspensi propolis yaitu $1,55 \pm 0,31$ dan $32,50 \pm 15,40$. Hal tersebut menunjukkan formulasi SNEDDS propolis dapat meningkatkan absorpsi dan bioavailabilitas sehingga dapat meningkatkan efektivitas propolis sebagai imunomodulator dibandingkan dengan suspensi propolis. Formulasi SNEDDS mengandung kosurfaktan yang dapat memperkecil ukuran partikel, semakin kecil ukuran partikel maka semakin mudah zat aktif diabsorpsi serta semakin baik bioavailabilitas dan efektivitas propolis sehingga dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Balakumar *et al.*, 2013; Syukri *et al.*, 2019). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Beandrade, (2018) menunjukkan bahwa sediaan SNEDDS jinten hitam dapat meningkatkan indeks fagositosis dan rasio sel makrofag dibandingkan dengan ekstrak jinten hitam tanpa formulasi. Pada penelitian Kalsum *et al.*, (2017) menyatakan indeks fagositosis meningkat secara signifikan ($p < 0,05$) pada berbagai konsentrasi dosis propolis menunjukkan ekstrak etanol propolis *Trigona spp.* dapat mengaktifkan makrofag dengan pemberian propolis dosis kecil lebih berpotensi meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag. Selain itu Kalsum *et al.*, (2016) juga mengatakan bahwa senyawa kimiawi propolis sangat bervariasi karena perbedaan waktu pengumpulan, vegetasi, geografis, dan iklim suatu wilayah sehingga dapat mempengaruhi kuantitas dan kualitas komponen kimia propolis dan dapat mempengaruhi aktivitas farmakologi propolis tersebut.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Sediaan SNEDDS propolis dengan dosis 200 mg/kgBB dapat meningkatkan indeks fagositosis dan rasio sel makrofag dibandingkan dengan suspensi propolis sehingga SNEDDS propolis mampu meningkatkan sistem imun berdasarkan aktivitas fagositosis makrofag pada tikus *Wistar* jantan meskipun tidak signifikan secara statistik ($p < 0,05$).

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait dosis SNEDDS propolis yang lebih bervariasi dikarenakan belum ada penelitian tentang dosis SNEDDS propolis sebagai imunomodulator
2. Perlu dilakukan pengulangan percobaan atau replikasi agar mendapatkan data dan hasil perhitungan yang lebih akurat
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait kandungan dari propolis yang memiliki efek sebagai imunostimulan

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2012. Cellular and Molecular Immunology, 7th ed. Elsevier Science, United States.
- Afolayan, F.I.D., Erinwusi, B., Oyeyemi, O.T., 2018. Immunomodulatory activity of curcumin-entrapped poly d,l -lactic- co -glycolic acid nanoparticles in mice. *Integr. Med. Res.* 7, 168–175.
- Balakumar, K., Raghavan, C.V., selvan, N.T., prasad, R.H., Abdu, S., 2013. Self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of Rosuvastatin calcium: Design, formulation, bioavailability and pharmacokinetic evaluation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 112, 337–343.
- Baloch, J., Sohail, M.F., Sarwar, H.S., Kiani, M.H., Khan, G.M., Jahan, S., Rafay, M., Chaudhry, M.T., Yasinzai, M., Shahnaz, G., 2019. Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) for Improved Oral Bioavailability of Chlorpromazine: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Medicina (Mex.)* 55, 210.
- Beandrade, M.U., 2018. Formulasi dan Karakterisasi SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam (*Nigella Sativa*) dengan Fase Minyak Ikan Hiu Cucut Botol (*Centrophorus Sp*) serta Uji Aktivitas Immunostimulan. *JPSCR J. Pharm. Sci. Clin. Res.* 3, 50.
- Chan, G.C.-F., Cheung, K.-W., Sze, D.M.-Y., 2013. The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 44, 262–273.
- Darmawan, K.H., 2017. Utilization Of Nano Ethanolic Extract Combination Chamber Bitter (*Phyllanthus Niruri L.*) And Garlic (*Allium Sativum L.*) As A Natural Immunomodulator In Nanoherbal Development, In Silico And In Vitro Study. *JPSCR J. Pharm. Sci. Clin. Res.* 2, 110.
- Date, A.A., Desai, N., Dixit, R., Nagarsenker, M., 2010. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. *Nanomed.* 5, 1595–1616.


- Fan, R., Zhu, C., Qiu, D., Mao, G., Zeng, J., 2019. Activation of RAW264.7 macrophages by an acidic polysaccharide derived from *Citrus grandis* 'Tomentosa.' *Int. J. Biol. Macromol.* S0141813019367662.
- Hertiani, T., Yuswanto, A., Utami Tunjung Pratiwi, S., Muthma'innah Mashar, H., 2018. Effect of *Massoia* (*Massoia aromatica* Becc.) Bark on the Phagocytic Activity of Wistar Rat Macrophages. *Sci. Pharm.* 86, 19.
- Jing Wu, M.K., 2013. Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Modulate breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action. *J. Cancer Sci. Ther.* 05.
- Kalsum, N., 2017. Preliminary Studies of the Immunomodulator Effect of the Propolis *Trigona* spp. Extract in a Mouse Model. *IOSR J. Agric. Vet. Sci.* 10, 75–80.
- Kalsum, N., Sulaeman, A., Setiawan, B., 2017. Preliminary Studies of the Immunomodulator Effect of the Propolis *Trigona* spp. Extract in a Mouse Model. *IOSR J. Agric. Vet. Sci.* 10, 75–80.
- Kalsum, N., Sulaeman, A., Setiawan, B., Wibawan, I.W.T., 2016. Phytochemical Profiles of Propolis *Trigona* Spp. from Three Regions in Indonesia Using GC-MS. *J. Biol.* 7.
- Kannan, S., Ali, P.S.S., Sheeza, A., Hemalatha, K., 2019. COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) – recent trends 6.
- Kusnul, Z., Rahayu, P., Rifai, M., Widjajanto, E., 2017. Immunomodulatory Effect of Propolis Extract on Granzyme Expression in CD8⁺ and CD4⁺CD25⁺ T Cells. *Turk. J. Immunol.*
- Lee, S., Song, I.H., Park, Y.-S., 2019. In Vivo and In Vitro Study of Immunostimulation by *Leuconostoc lactis*-Produced Gluco-Oligosaccharides. *Molecules* 24, 3994.
- Lestari, L.A., Soesatyo, M.H.N.E., Irvati, S., Harmayani, E., 2012. Peningkatan aktivitas fagositosis dan produksi nitrit oksida pada makrofag peritoneum tikus Sprague Dawley yang diberi *Lactobacillus plantarum* Mut7 dan ekstrak serat ubi jalar. *J. Gizi Klin. Indones.* 9, 64.

- Lovelyn, C., Attama, A.A., 2011. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. *J. Biomater. Nanobiotechnology* 02, 626–639.
- Oladele, O., Emikpe, B., Adeyefa, C., Enibe, F., 2012. Effects of levamisole hydrochloride on cellular immune response and flock performance of commercial broilers. *Rev. Bras. Ciênc. Avícola* 14, 259–265.
- Orsatti, C.L., Missima, F., Pagliarone, A.C., Bachiega, T.F., BÃºfalo, M.C., AraÃºjo, J.P., Sforcin, J.M., 2009. Propolis immunomodulatory action *in vivo* on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother. Res.* n/a-n/a.
- Owen, J.A., Punt, Stranford, S.A., Jones, P., 2013. *Kuby Immunology*, 7th edition. ed. W.H Freeman and Company, United States of America.
- Pratiwi, L., Fudholi, A., Martien, R., Pramono, S., 2018. Physical and Chemical Stability Test of SNEDDS (Self-nanoemulsifying Drug Delivery System) and Nanoemulsion Ethyl Acetate Fraction of *Garcinia mangostana* L. *Maj. Obat Tradis.* 23, 84.
- Sampietro, D.A., Sampietro Vattuone, M.M., Vattuone, M.A., 2016. Immunomodulatory activity of *Apis mellifera* propolis from the North of Argentina. *LWT* 70, 9–15.
- Sforcin, J.M., Bankova, V., 2011. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 133, 253–260.
- Sherwood, L., 2013. *Introduction to Human Physiology*, 8th Edition. ed. Brooks cole, Canada.
- Siheri, W., Zhang, T., Ebiloma, G.U., Biddau, M., Woods, N., Hussain, M.Y., Clements, C.J., Fearnley, J., Ebel, R.E., Paget, T., Muller, S., Carter, K.C., Ferro, V.A., De Koning, H.P., Watson, D.G., 2016. Chemical and Antimicrobial Profiling of Propolis from Different Regions within Libya. *PLOS ONE* 11, e0155355.
- Syamsudin, ., Rita Marleta dewi, Kusmardi, 2009. Immunomodulatory and *In vivo* Antiplasmodial Activities of Propolis Extracts. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 4, 75–79.

- Syukri, Y., Kholidah, Z., Chabib, L., 2019. Formulasi dan Studi Stabilitas Self-Nano Emulsifying Propolis menggunakan Minyak Kesturi, Cremophor RH 40 dan PEG 400 sebagai Pembawa 06, 9.
- Tao, Y., Wang, Deqing, Hu, Y., Huang, Y., Yu, Y., Wang, Deyun, 2014. The Immunological Enhancement Activity of Propolis Flavonoids Liposome *In Vitro* and *In Vivo*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014, 1–8.
- Toreti, V.C., Sato, H.H., Pastore, G.M., Park, Y.K., 2013. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, 1–13.
- Tran, T.H., Guo, Y., Song, D., Bruno, R.S., Lu, X., 2014. Quercetin-Containing Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for Improving Oral Bioavailability. *J. Pharm. Sci.* 103, 840–852.
- Wang, Y., Tian, Y., Shao, J., Shu, X., Jia, J., Ren, X., Guan, Y., 2018. Macrophage immunomodulatory activity of the polysaccharide isolated from *Collybia radicata* mushroom. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 300–306.
- Weerapol, Y., Limmatvapat, S., Kumpugdee-Vollrath, M., Sriamornsak, P., 2015. Spontaneous Emulsification of Nifedipine-Loaded Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System. *AAPS PharmSciTech* 16, 435–443.
- Wolska, K., Gorska, A., Antosik, K., Lugowska, K., 2019. Immunomodulatory Effects of Propolis and its Components on Basic Immune Cell Functions. *Indian J. Pharm. Sci.* 81.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan *Ethical Clearance*



UNIVERSITAS
ISLAM
INDONESIA

FAKULTAS
KEDOKTERAN

Gedung Dr. Soekiman Wirjosandjojo
Kampus Terpadu Universitas Islam Indonesia
Jl. Kaluraning km 14,5 Yogyakarta 55584
T. (0274) 898444 ext. 2096, 2097
F. (0274) 898459 ext 2007
E. fku@uii.ac.id
W. fku.iui.ac.id

Nomor : 3/ Ka.Kom.Et/70/KE/II/2020

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran dan kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia, with regards of the protection of human rights and welfare in medical and health research, has carefully reviewed the research protocol entitled :

“Uji Aktivitas Sediaan Self Nano Emulsifying Drugs Delivery System (SNEDDS) Propolis Sebagai Immunostimulan pada Tikus Wistar Jantan”

Peneliti Utama : Annisa Fitria, M.Sc., Apt
Principal Investigator

Nama Institusi : Program Studi Farmasi FMIPA UII
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
and approved the above-mentioned protocol.

Yogyakarta, 10 Februari 2020
Ketua
Chairman
Idris Rahma Dantari, M.Sc, Sp.PK



***Ethical Approval** berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan
****Peneliti berkewajiban**

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila :
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*

Lampiran 2. Tabel Hasil Perhitungan Indeks dan Rasio Fagositosis Makrofag

kelompok	Hewan Uji	Hasil	
		Indeks Fagositosis	Rasio Fagositosis (%)
Kontrol Normal	1	1,98	43
	2	1,23	19
	3	1,27	24
	4	1,6	14
	5	1,37	22
	6	1,29	48
rata-rata		1,46	28,33
SD		0,26	12,61
Kontrol Positif	1	1,69	41
	2	1,95	32
	3	2,2	37
	4	1,87	72
	5	1,24	17
	6	1,57	45
rata-rata		1,75	40,67
SD		0,30	16,58
Suspensi Propolis	1	2,06	54
	2	1,54	33
	3	1,19	13
	4	1,15	15
	5	1,69	49
	6	1,65	31
rata-rata		1,55	32,50
SD		0,31	15,40
SNEDDS Propolis	1	1,53	46
	2	1,84	31
	3	1,68	43
	4	1,88	44
	5	1,52	25
	6	2,25	37
rata-rata		1,78	37,67
SD		0,25	7,56

Lampiran 3. Tabel hasil uji *One Way* ANOVA Indeks Fagositosis dan Rasio Fagositosis Makrofag

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Indeks_Fagositosis	.108	24	.200*	.958	24	.408

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

	Perlakuan Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Indeks Fagositosis	Kontrol Normal (Akuades)	,285	6	,140	,814	6	,078
	Kontrol Positif (Levamisol)	,137	6	,200*	,990	6	,989
	Kontrol Suspensi Propolis	,186	6	,200*	,933	6	,603
	Kontrol SNEDDS Propolis	,195	6	,200*	,904	6	,396

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Indeks Fagositosis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,109	3	20	,954

ANOVA

Indeks Fagositosis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,454	3	,151	1,573	,227
Within Groups	1,923	20	,096		
Total	2,376	23			

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rasio_Fagositosis	,088	24	,200*	,957	24	,381

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

	Kelompok Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rasio sel makrofag (%)	Kontrol Normal (Akuades)	,290	6	,126	,869	6	,220
	Kontrol Positif (Levamisol)	,239	6	,200*	,940	6	,656
	Kontrol Suspensi Propolis	,184	6	,200*	,915	6	,467
	Kontrol SNEDDS Propolis	,240	6	,200*	,911	6	,440

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Rasio sel makrofag (%)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,630	3	20	,604

ANOVA

Rasio sel makrofag (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	538,458	3	179,486	,822	,497
Within Groups	4369,500	20	218,475		
Total	4907,958	23			