









Mengetahui,  
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Islam Indonesia



  
**Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D.**

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh oranglain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.



Yogyakarta, .....

Penulis,

NUR ATSIL

*“Barang siapa yang datang dengan (membawa) kebaikan, maka dia akan mendapat (pahala) yang lebih baik daripada kebaikan itu; dan barang siapa datang dengan (membawa) kejahatan, maka orang-orang yang telah mengerjakan kejahatan itu hanya diberi balasan (seimbang) dengan apa yang dahulu mereka kerjakan”*

(QS. Al-Qasas: 84)

Dengan izin Allah SWT, kupersembahkan karya sederhana ini kepada semua orang yang kusayangi

Bapak dan ibu tercinta

**Ngatman dan Sukarti, S.Pd**

Sebagai tanda bakti, sayang dan rasa terimakasih yang tiada terhingga kupersembahkan karya kecil ini untuk kedua orangtua tercinta. Semoga bisa menjadi langkah awal untuk membuat kalian bahagia.

Aamiin yaRabbal’alamiin

Adikku tercinta

**Arifah Atsil**

Tidak ada yang paling menyenangkan kecuali bisa berkumpul bersamamu.

Tetap jadi adik yang selalu merindukan dan menjahiliku ya

Love you

## KATA PENGANTAR



### *Assalamu'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh*

Alhamdulillah rabbil'alamiin puji syukur saya ucapkan setinggi-tingginya atas kehadiran Allah SWT sehingga atas izin-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh SNEDDS Propolis Sebagai Imunostimulan terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar Nitrit Oksida pada Sel RAW 264.7 secara *In Vitro*”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat bagi mahasiswa untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) pada Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam di Universitas Islam Indonesia. Dalam penyusunan skripsi ini, dari awal hingga akhir telah banyak pihak yang memberikan bantuan dan saran baik berupa moril maupun materiil. Oleh karena itu, saya menghaturkan terimakasih banyak yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Annisa Fitri, M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing utama yang telah berjasa dan bersedia memberikan ilmu serta waktunya untuk membimbing, mengarahkan, mendukung, memberikan saran dan memberikan kemudahan kepada saya selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini. Bapak Dr. Yandi Syukri, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing pendamping dan juga telah membiayai seluruh penelitian ini dari awal hingga selesai.
2. Ibu Dr. Arba Pramundita Ramadani, S.Farm., M.Sc., Apt dan bapak Bambang Hernawan Nugroho, M.Sc., Apt selaku dosen penguji yang telah bersedia memberikan waktunya untuk menguji dan memberikan arahan pada saya demi terciptanya naskah skripsi yang baik.
3. Bapak Arde Toga Nugraha S.Farm., M.Sc., Apt selaku dosen pembimbing akademik yang telah berjasa memberikan bantuan dan dukungan selama proses perkuliahan dan penyelesaian skripsi ini.
4. Bapak Hartanto dan Mbak Nangim selaku laboran di Program Studi Farmasi Universitas Islam Indonesia serta Ibu Rumbiwati, ST., M.Sc selaku laboran di Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada yang telah

memberikan dukungan berupa fasilitas dan arahan selama penelitian hingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.

5. Hodijatul Munawwarah, Dwi Amalia Weuangi, dan Hendry Aditya Pohara atas segala sabar dan ikhtiarnya sebagai rekan satu tim selama proses penelitian hingga menyelesaikan skripsi ini.
6. Hardika Rahmadani Sutejo atas kesabaran dan petuah demi petuah yang mendewasakan.
7. Semua pihak yang tidak dapat dituliskan satu persatu, saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya atas doa serta dukungan yang tiada henti. Saya menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu dengan senang hati saya menerima kritik dan saran sebagai saran perbaikan. Akhir kata, saya berharap semoga Allah SWT membalas kebaikan semua pihak yang turut membantu dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

***Wassalamu'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh***

Yogyakarta, .....

Penulis,

NUR ATSIL



## DAFTAR ISI

<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>INTISARI</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	2
<b>BAB II STUDI PUSTAKA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Tinjauan Pustaka .....	3
2.1.1 Aktivitas Propolis sebagai Imunostimulan.....	3
2.1.2 SNEDDS ( <i>Self nano-emulsifying drug delivery system</i> ).....	4
2.1.3 Aktivitas Imunostimulan.....	5
2.1.4 Sel RAW 264.7 .....	7
2.2 Landasan Teori .....	9
2.3 Hipotesis.....	9
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	<b>10</b>
3.1 Alat dan Bahan .....	10
3.1.1 Alat.....	10
3.1.2 Bahan.....	10
3.2 Cara Penelitian .....	10
3.2.1 Skema Penelitian.....	10
3.2.2 Pengajuan <i>Ethical Clearance</i> .....	11
3.2.3 Pembuatan Formulasi SNEDSS Propolis .....	11
3.2.4 Kultur Sel RAW 264.7.....	11

3.2.5 Uji Aktivitas Fagositosis.....	12
3.2.6 Pengukuran Kadar Nitrit Oksida (NO).....	13
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>14</b>
4.1 Uji Stabilitas Formulasi SNEDDS Propolis .....	14
4.2 Uji Aktivitas Fagositosis .....	15
4.2 Kadar Nitrit Oksida (NO) .....	18
<b>BAB V.....</b>	<b>20</b>
<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>20</b>
5.1 KESIMPULAN .....	20
5.2 SARAN .....	20
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>21</b>



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 3.1</b> Skema Penelitian .....	<b>10</b>
<b>Gambar 4.1</b> Hasil Uji Aktivitas Fagositosis .....	<b>13</b>
<b>Gambar 4.2</b> Kerusakan Sel RAW 264.7.....	<b>14</b>



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 4.1</b> Hasil Uji Indeks dan Kapasitas Fagositosis Inkubasi Sel 24 Jam .....	<b>15</b>
<b>Tabel 4.2</b> Hasil Uji Indeks dan Kapasitas Fagositosis Inkubasi Sel 48 Jam .....	<b>15</b>
<b>Tabel 4.3</b> Hasil Kadar Nitrit Oksida (NO) .....	<b>18</b>



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1</b> Data Aktivitas Fagositosis Percobaan 1 .....	22
<b>Lampiran 2</b> Data Aktivitas Fagositosis Percobaan 2 .....	23
<b>Lampiran 3</b> Indeks Dan Kapasitas Fagositosis Percobaan 1 dan 2 (24 Jam) .....	24
<b>Lampiran 4</b> Indeks Dan Kapasitas Fagositosis Percobaan 1 dan 2 (48 Jam) .....	24
<b>Lampiran 5</b> <i>Microplate</i> Pengujian Kadar Nitrit Oksida .....	25
<b>Lampiran 6</b> Hasil Uji Statistika Aktivitas Fagositosis.....	28
<b>Lampiran 7</b> Data Kadar Nitrit Oksida Waktu Inkubasi Sel 24 Jam.....	28
<b>Lampiran 8</b> Data Kadar Nitrit Oksida Waktu Inkubasi Sel 48 Jam.....	29



# **PENGARUH SNEDDS PROPOLIS SEBAGAI IMUNOSTIMULAN TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS DAN KADAR NITRIT OKSIDA SEL RAW 264.7 SECARA *IN VITRO***

**Nur Atsil**

**Program Studi Farmasi**

## **INTISARI**

Propolis memiliki tingkat kelarutan kurang baik dan bioavailabilitasnya yang rendah sehingga perlu dibuat dalam bentuk sediaan nanopartikel seperti SNEDDS (*Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System*). Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas farmakologi SNEDDS propolis secara *in vitro* dengan mengukur aktivitas fagositosis dan kadar nitrit oksida yang dihasilkan oleh sel RAW 264.7 terhadap lateks. Metode perhitungan aktivitas fagositosis dilakukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop untuk menghitung jumlah sel yang memfagosit dan jumlah lateks yang terfagosit sedangkan kadar nitrit oksida berdasarkan pembacaan absorbansi menggunakan ELISA *reader*. Indeks fagositosis pada inkubasi sel 24 dan 48 jam menunjukkan hasil yang sama pada semua sampel uji dan semua konsentrasi ( $p > 0,05$ ). Kapasitas fagositosis pada inkubasi sel 24 dan 48 jam menunjukkan SNEDDS propolis lebih unggul dibanding sampel uji lainnya pada semua konsentrasi ( $p < 0,05$ ). Kadar nitrit oksida (NO) pada inkubasi sel 24 dan 48 jam menunjukkan hasil SNEDDS propolis lebih baik antar semua sampel uji pada semua konsentrasi ( $p < 0,05$ ). Kesimpulan penelitian ini yaitu SNEDDS propolis mampu meningkatkan aktivitas fagositosis dan menstimulus produksi NO pada sel RAW 264.7 dengan waktu inkubasi sel 48 jam sebelum diberi perlakuan.

Kata Kunci : Propolis, Imunostimulan, SNEDDS, RAW 264.7

# **THE INFLUENCE OF SNEDDS PROPOLIS AS AN IMUNOSTIMULANT ON PHAGOCYtic ACTIVITY AND LEVELS OF NITRIC OXIDE RAW 264.7 CELL *IN VITRO***

**NUR ATSIL  
DEPARTMENT OF PHARMACY**

## **ABSTRACT**

Propolis needs to be made in the form of nanoparticles such as SNEDDS (Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System) to increase its bioavailability. This research aims to study the pharmacology activity of SNEDDS propolis *in vitro* by measuring the activity of phagocytosis of RAW 264.7 cells against latex and its nitrite oxide production levels. The calculation method of phagocytosis activity is carried out by observation under microscope to calculate the number of cells that are phagocytes the latex and the amount of latex which is phagocyte by cell. The nitrite oxide production calculate based on its absorbancy using microplate reader. The phagocytosis index for 24 and 48 hours cell incubation showed the same results in all treatment ( $p > 0.05$ ). In the other hand, the phagocytic capacity of 24 and 48-hour cell incubation showed SNEDDS propolis has greater compared to propolis extract and control ( $p < 0.05$ ). Nitric oxide (NO) levels in 24 and 48 hours cell incubation showed SNEDDS propolis has greater compared to propolis extract and control ( $p < 0.05$ ). The conclusion of this study shows that SNEDDS propolis can increase phagocytic activity and stimulate the production of NO in RAW 264.7 cells with 48 hours incubation time before treatment.

*Keywords* : Propolis, Immunostimulant, SNEDDS, RAW 264.

**BAB I**  
**PENDAHULUAN**  
**1.1 Latar Belakang Masalah**

Sistem imun merupakan lini pertama pertahanan tubuh terhadap patogen dan apabila sistem imun lemah akan membuat tubuh mudah terserang penyakit sehingga perlu dilakukannya peningkatan sistem imun tubuh (Abbas *et al.*, 2012). Salah satu cara dalam peningkatan sistem imun tubuh adalah dengan menggunakan agen imunomodulasi terutama imunostimulan yaitu peningkatan sistem imun menggunakan material atau bahan alami seperti propolis (Shruthi and Suma, 2012). Propolis mengandung beberapa senyawa kimia yang salah satunya adalah flavonoid. Flavonoid terbukti memiliki beberapa manfaat dalam bidang kesehatan diantaranya dapat dijadikan sebagai zat aktif dalam antimikroba, antitumor, antikanker, antijamur, antivirus, antiinflamasi, antioksidan dan imunostimulan (Barlak *et al.*, 2011) (Omene *et al.*, 2014). Efek imunostimulan ditandai diantaranya dengan adanya peningkatan aktivitas fagositosis dan kadar nitrit oksida (NO) (Kalsum *et al.*, 2017).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Yuan (2012) menunjukkan bahwa kandungan flavonoid pada propolis justru mengakibatkan propolis memiliki kelarutan yang rendah serta *bioavailabilitas* yang kurang baik (Yuan, 2012) sehingga perlu adanya perubahan bentuk sediaan propolis. Sediaan nanopartikel seperti SNEDDS (*Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System*) cocok digunakan untuk memperbaiki kelemahan dari propolis karena sediaan nanopartikel dapat meningkatkan kelarutan serta mengoptimalkan *bioavailabilitas* dari propolis (Pierro *et al.*, 2016). Beberapa keunggulan bentuk sediaan SNEDDS adalah dapat melarutkan zat aktif yang sukar larut air; dapat memperbaiki peningkatan ketersediaan hayati obat di dalam tubuh karena semakin kecil partikel dari zat aktif maka akan meningkatkan luas permukaan zat aktif tersebut sehingga mampu menaikkan tingkat kelarutan, laju disolusi dan absorpsi dari zat aktif tersebut di dalam tubuh (Kazi and Hussain, 2019). Berdasarkan hasil penelitian dari Yuan (2012) dan Pierro *et al* (2016) maka keterbaruan penelitian ini adalah mengubah



bentuk propolis menjadi bentuk sediaan SNEDDS dengan tujuan untuk melihat tingkat kemampuan SNEDDS dalam meningkatkan kelarutan, dan absorpsi propolis terutama dalam aktivitas fagositosis dan produksi nitrit oksida.

### **1.2 Perumusan Masalah**

Bagaimana aktivitas imunostimulan propolis dalam bentuk sediaan SNEDDS dengan parameter aktivitas fagositosis dan kadar Nitrit Oksida (NO) sel RAW 264.7 terhadap lateks?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Melakukan kajian aktivitas imunostimulan propolis dalam bentuk sediaan SNEDDS dengan parameter aktivitas fagositosis dan kadar Nitrit Oksida (NO) sel RAW 264.7 terhadap lateks.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

1. Bagi perkembangan ilmu pengetahuan, penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan dan penambahan wawasan terkait aktivitas farmakologi propolis dalam bentuk sediaan SNEDDS sehingga dapat dilanjutkan pengembangan yang lebih baik terkait nanoherbal dari propolis.
2. Bagi industri farmasi, penelitian ini diharapkan dapat menjadi alternatif baru dalam memformulasikan propolis dalam bentuk sediaan SNEDDS sehingga dapat dipatenkan menjadi obat yang dapat memberikan manfaat bagi kesehatan manusia dengan syarat dilakukan uji klinik terlebih dahulu.

## BAB II STUDI PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Pustaka

#### 2.1.1 Aktivitas Propolis sebagai Imunostimulan

Propolis atau lem lebah adalah campuran resin alami yang diproduksi oleh lebah madu (*Apis mellifera*) dari zat yang dikumpulkan dari bagian tanaman, kuncup dan eksudat. Zat tersebut kemudian dicampur dengan beberapa senyawa hasil metabolisme dari lebah diantaranya enzim saliva ( $\beta$ -glucosidase), lilin lebah maupun senyawa lain. Lebah memanfaatkan propolis tersebut sebagai senyawa perlindungan dari predator atau mikroorganisme disarangnya, sebagai isolasi panas, menghindari dekomposisi, dan untuk membangun lokal aseptik demi mencegah infeksi akibat mikroorganisme pada larva (Fokt *et al.*, 2010).

Senyawa kimia yang terdapat pada propolis diantaranya adalah asam fenolik, terpen, *cinnamic acid*, ester dan flavonoid. Kandungan flavonoid menjadi bagian terpenting dan mewakili sekitar 50% komponen propolis (Yuan, 2012). Kandungan flavonoid pada propolis tersebut terbukti memiliki aktivitas biologis diantaranya sebagai antibakteri, antikanker, antifungi, antivirus, antiinflamasi, antioksidan (Barlak *et al.*, 2011), antioksidan dan imunostimulan (Omene *et al.*, 2014).

Penelitian sebelumnya yaitu semakin tinggi konsentrasi pemberian ekstrak etanol propolis cair *Trigona spp.* secara *in vivo* menunjukkan adanya peningkatan yang semakin tinggi pula pada parameter aktivitas fagositosis, produksi nitrit oksida dan antibodi. Hasil untuk aktivitas fagositosis diperoleh secara berurutan adalah 80,7%; 88,4%; dan 90,1%; produksi nitrit oksida adalah 187,104; 195,866; dan 198,034  $\mu\text{M/L}$ ; dan produksi antibodi (IgG) adalah 10,717; 13,733; 11,853 ng/mL sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak tersebut memiliki efek imunostimulan (Kalsum *et al.*, 2017).

### 2.1.2 SNEDDS (*Self nano-emulsifying drug delivery system*)

*Self nano-emulsifying drug delivery system* (SNEDDS) merupakan bentuk sediaan yang tersusun dari fase minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan yang secara spontan membentuk *nanoemulsion* transparan (Shahba *et al.*, 2012). Ukuran partikel untuk sediaan SNEDDS berkisar 20-200 nm dan dengan ukuran tersebut menjadi keunggulan SNEDDS karena semakin kecil ukuran partikel akan meningkatkan luas permukaan sehingga akan semakin baik pula absorpsi obat dalam tubuh. Berdasarkan komponen penyusunnya, sediaan SNEDDS terbukti dapat menstabilkan zat aktif pada proses absorpsi dan mengoptimalkan sifat disolusi dari zat aktifnya. Formulasi SNEDDS lebih banyak digunakan untuk beberapa zat aktif yang sukar larut dalam air (Kazi and Hussain, 2019).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kassem *et al* (2016), dengan formulasi SNEDDS adalah asam oleat sebagai fase minyak; tween 20 dan 40 sebagai surfaktan; serta DMSO (N50 mg/g) dan PG ( $4,697 \pm \text{mg /g}$ ) sebagai co-surfaktan. Penelitian tersebut menunjukkan hasil bahwa kelarutan dari asam oleat adalah  $2.111 \pm 0.042$  (mg/g) dan dilaporkan dengan hasil tersebut maka asam oleat sebagai fase minyak dapat meningkatkan penyerapan obat di usus. Tween 20 dan Tween 40 sebagai surfaktan menunjukkan kelarutan tertinggi (Tween 20:  $1.792 \pm 0.053$ ; Tween: 40  $1.987 \pm 0.039$ ) serta efisiensi emulsifikasi atau menghasilkan nanoemulsi bening yang membutuhkan waktu lebih singkat untuk proses emulsifikasi. Proses emulsifikasi dan efisiensi SNEDDS dikendalikan oleh beberapa variabel diantaranya adalah afinitas antara lipid dan surfaktan, keseimbangan hidrofilik dan lipofilik. Nilai HLB dari suatu surfaktan mempengaruhi spontanitas emulsifikasi dan ukuran tetesan emulsi. DMSO (N50 mg/g) dan PG ( $4,697 \pm \text{mg/g}$ ) dipilih sebagai co-surfaktan karena efisien dan efek pelarutan sedang. Berdasarkan formulasi tersebut, sediaan SNEDDS nistatin memiliki keunggulan dibanding sediaan dengan pembawa lipid lainnya diantaranya dapat menurunkan tegangan permukaan dan antarmuka antara fase minyak dan fase air sehingga sediaan ini mampu melarutkan zat aktif yang sulit larut pada air secara cepat (Kassem *et al.*, 2016).

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya mendapatkan hasil formula terbaik untuk SNEDDS pada jinten hitam (*Nigella Sativa*) dengan formula yaitu minyak ikan hiu cucut botol sebagai fase minyak (15%); surfaktan (67,34%) yang terbuat dari campuran Croduret 50 ss (10,10%) dan Tween 80 (57,24%); serta ko-surfaktan PEG 400 (17,66%). Setelah dilakukan uji imunostimulan didapat hasil berupa terjadi peningkatan rasio sel makrofag dan indeks fagositosis (IF) pada ekstrak jinten hitam yang telah diubah dalam bentuk sediaan SNEDD dibandingkan dengan ekstrak jinten hitam tanpa dibuat formulasi SNEDD ( $p < 0,05$ ) (Beandrade, 2018).

### 2.1.3 Aktivitas Imunostimulan

Mikroba atau patogen dapat menyerang inang dengan menembus barrier epitelial mukosa dan kulit yang kemudian sel pada *innate immunity* akan melakukan tugasnya dalam menyerang dan mengeradikasi patogen yang masuk. *Innate immunity* disebut juga sel imun asli/bawaan, merupakan sel imun yang pertama kali akan mengenali dan mengeliminasi mikroba yang masuk dengan cara menghambat invasi mikroba melalui pertahanan epitel seperti kulit dan mukosa, mengontrol bahkan mengeradikasi mikroba serta memberikan intruksi ke *adaptive immunity*. Sel-sel *innate immunity* seperti sel fagosit, sel dendritik, NK sel, dan sel mast akan menyambut mikroba yang berhasil menembus barrier utama. Reaksi pertahanan dari *innate immunity* terbatas dibandingkan dengan *adaptive immunity* yang bersifat lebih bervariasi dan khusus. Bentuk respon dari *innate immunity* berupa inflamasi dan pertahanan/efek antivirus. Sistem imun alami tidak mempunyai ingatan terhadap pertemuannya dengan antigen, kemampuan tersebut hanya dimiliki oleh imun adaptif karena menghasilkan sel memori dari proses *clonal selection*. Reseptor pada sel imun memiliki pola pengenalan yang bersifat non-klonal yaitu reseptor yang sama diekspresikan pada semua sel dari tipe tertentu seperti makrofag. Maka, banyak sel imun alami yang dapat mengenali dan memberi respon terhadap mikroba yang sama (Abbas *et al.*, 2012).

Mikroba memiliki molekul yang dapat menstimulasi *innate immunity*, disebut sebagai *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) yang ketika

mikroba masuk ke dalam tubuh atau sampai pada jaringan subepitelial (jaringan di bawah epitel) maka PAMPS akan berikatan dengan reseptor dari sel *innate immunity* yang disebut dengan *patterns recognition receptors* (PRRs). Ketika terjadi ikatan antara ligan PAMPS dengan PRRs sel imun alami tersebut maka akan terjadi proses pengaktifan sel fagosit dan terjadi pelepasan sejumlah sitokin proinflamasi yang memicu proses inflamasi dalam tubuh. Pada saat terjadi infeksi, maka sel fagosit dari darah akan direkrut untuk menghancurkan mikroba dan mengeliminasi sel yang rusak. Sel inang yang sudah rusak juga mengeluarkan molekul yang disebut dengan *damage-associated molecular patterns* (DAMPS) yang akan dikenali oleh sel imun alami. Respon yang diberikan oleh sel imun alami terhadap DAMPS adalah terjadi proses eliminasi sel yang rusak dan inisiasi proses perbaikan jaringan (Abbas *et al.*, 2012).

Sel fagosit dari darah diantaranya adalah neutrofil dan monosit yang akan mengenali dan memakan mikroba yang masuk. Neutrofil memiliki reseptor yang apabila berikatan dengan mikroba maka akan terjadi transduksi sinyal untuk peningkatan sifat fagosit dari neutrofil. Tetapi, kemampuan neutrofil bertahan di jaringan sangatlah rendah sehingga neutrofil tidak dapat menjadi penolong utama sel inang dalam hal pertahanan diri. Berbeda dengan neutrofil, monosit yang berhasil masuk ke jaringan ekstraseluler dan berdiferensiasi menjadi sel yang disebut dengan makrofag, mampu bertahan lama di jaringan saat terjadi inflamasi. Dalam pertahanan sel inang, makrofag memiliki peran diantaranya dapat mengeluarkan sitokin yang dapat mencetuskan dan meregulasi inflamasi (misal TNF- $\alpha$ ), memfagosit mikroba, pembersihan jaringan yang rusak dan mengawali proses penyembuhan jaringan dengan mengekspresikan berbagai reseptor diantaranya TLR (*Toll-Like Receptors*) dan NLRs (*NOD-like receptors*). Mikroba akan masuk pada suatu vesikel yang terikat membran yang disebut dengan fagosom. Fagosom yang berfusi dengan lisosom akan membentuk fagolisosom. Ketika sel fagosit memakan mikroba, dengan secara bersamaan akan terjadi transport sinyal dari berbagai reseptor yang akan mengaktifkan enzim pada fagolisosom. Enzim tersebut diantaranya yaitu *phagocyte oxidase*, *inducible nitric oxidase synthase* (iNOS), *protease lisosomal*. *Phagocyte oxidase* berperan

dalam proses perubahan oksigen molekuler menjadi *superoxide anion* dan radikal bebas (disebut dengan proses *oxidative burst* atau *respiratory burts*). Radikal bebas tersebut adalah *reactive oxygen species* (ROS) dan zat toksik bagi mikroba yang ditelan. *Inducible nitric oxidase synthase* (iNOS) dapat mempercepat perubahan arginine menjadi *nitric oxide* (NO) yang merupakan substansi mikrobisidal. *Protease lisosomal* mampu memecah protein dari 7ontrol7/mikroba. Kemudian sel dendritik melakukan tugasnya sebagai sel APC (*antigen presenting cell*) yaitu melakukan proses penyerahan sampel hasil fagositosis ke *adaptive immunity* (Abbas *et al.*, 2012).

Aktivitas fagositosis sel dan kadar NO dapat menjadi bentuk respon tubuh ketika terjadi penyerangan oleh antigen (Abbas *et al.*, 2012). Adanya peningkatan pada aktivitas fagositosis dan kadar Nitrit Oksida (NO) maka menunjukkan bahwa terjadi peningkatan pada respon imun tubuh. Sehingga aktivitas fagositosis dan pengukuran kadar NO dapat dijadikan parameter pengukuran imunostimulan.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan secara *in vivo* pada tikus *Sprague Dawley* diberikan propolis cair *Trigona* spp. dengan dosis yang berbeda yakni 0,16%; 0,48%; dan 1,44%, semakin tinggi dosis propolis cair yang diberikan maka semakin tinggi pula angka fagositosis makrofag dari peritoneal tikus. Begitupula dengan hasil kadar nitrit oksida, semakin tinggi dosis propolis cair yang diberikan maka semakin tinggi pula hasil kadar nitrit oksida yang dihasilkan (Kalsum *et al.*, 2017).

#### 2.1.4 Sel RAW 264.7

Sel RAW 264.7 merupakan sel monosit (sel seperti makrofag) yang berasal dari kultur sel (*cell-line*) dari virus leukimia-Abelson yang berasal dari tikus BALB/c. Sel RAW 264.7 menggambarkan model makrofag yang tepat karena dapat melakukan pinositosis dan *phagocytosis*. Dengan adanya stimulasi LPS, sel RAW 264.7 mampu meningkatkan produksi nitrit oksida (NO) dan mekanisme fagositosis sel. Sel ini juga mampu membunuh sel target atau patogen dengan sitotoksitas yang tergantung pada antibodi (Bartøomiej *et al.*, 2018).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya yang bertujuan untuk mengevaluasi stabilitas fungsi berupa aktivitas fagositosis dan produksi nitrit oksida (NO) dan stabilitas secara fenotip dari sel RAW 264.7 dilakukan dengan menguji bagian sel RAW 264.7 (*passages*) nomor 1-50. Penelitian tersebut mendapatkan hasil berupa *passages* nomor 10-30 menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam ekspresi tiga faktor transkripsi yang penting untuk makrofag. Tetapi stabilitas sel RAW 264.7 terhadap aktivitas fagositosis, produksi NO maupun ekspresi gen lebih baik digunakan (stabil) pada bagian tidak lebih dari nomor 30 karena *passages* nomor >30 dapat mempengaruhi data (Bartøomiej *et al.*, 2018).



## 2.2 Landasan Teori

Propolis memiliki banyak kandungan senyawa yang dapat dimanfaatkan dalam pengobatan, salah satunya adalah senyawa flavonoid. Flavonoid memiliki beberapa manfaat diantaranya dapat dijadikan sebagai antibakteri, antivirus, antifungal, antioksidan, antiinflamasi, antikanker, dan aktivitas imunostimulan (Omene *et al.*, 2014). Kandungan flavonoid pada propolis mengakibatkan propolis memiliki kelarutan dan *bioavailabilitas* yang kurang baik sehingga perlu dilakukan perubahan bentuk sediaan yakni salah satunya adalah bentuk nanopartikel seperti *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) (Kassem *et al.*, 2016).

*Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) merupakan bentuk sediaan nanopartikel yang tersusun dari fase minyak, surfaktan dan ko-surfaktan dan memiliki keunggulan yaitu dengan ukuran partikelnya yang kecil mampu meningkatkan disolusi dan sifat absorpsi obat pada tubuh, karena dengan ukuran partikel yang kecil maka akan meningkatkan luas permukaan sehingga meningkat pula *bioavailability* obat (Kassem *et al.*, 2016)

## 2.3 Hipotesis

Formulasi SNEDDS propolis sebagai imunostimulan dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dan kadar Nitrit Oksida (NO) pada sel RAW 264.7 terhadap lateks yang dilakukan secara *in vitro*.



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Alat dan Bahan**

##### **3.1.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah vortex, sentrifugator, oven, seperangkat alat gelas (Pyrex), timbangan analitik (Metler Toledo), *micropipette*, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV Spectrophotometer, UV-1800), ultrasonikator, *particle size analyzer* (HORIBA Scientific Nano Partica SZ 100), haemositometer, *climatic chamber*, *microplate well*, *hand tally counter*, inkubator CO<sub>2</sub>, lemari asam, *inverted microscope*, dan *ELISA reader* (BIO-RAD Model 595). Semua peralatan tersebut tersedia di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

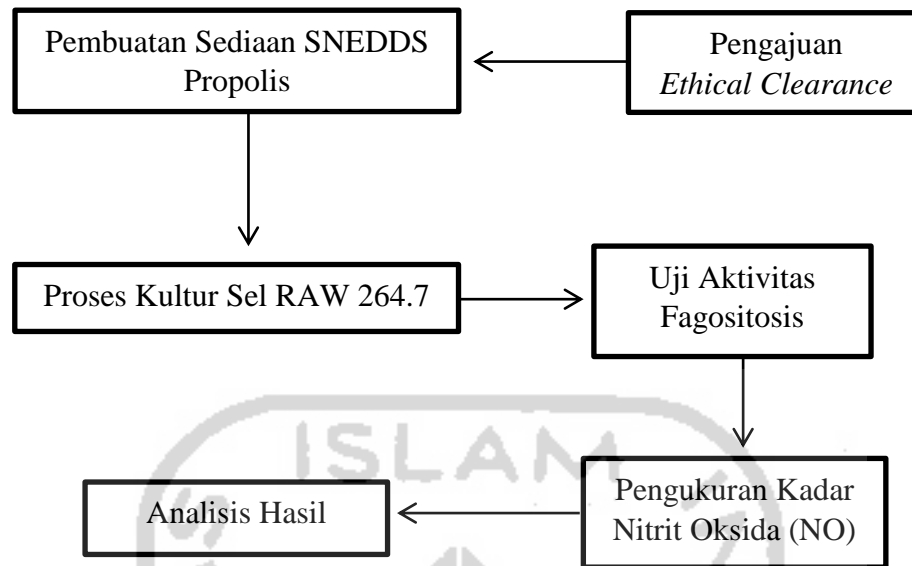
##### **3.1.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah propolis (diperoleh dari Jawa Timur), minyak kesturi, cremophor RH-40, PEG 400, sel RAW 264.7, PBS, RPMI, media DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium), metanol, giemsa, aquabides, *blue tip*, *yellow tip*, *coverslip* bulat, reagent Griess untuk NO, serta lateks. Semua bahan tersebut tersedia di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

#### **3.2 Cara Penelitian**

##### **3.2.1 Skema Penelitian**

Sistematika kerja pada penelitian ini berisi urutan proses mulai dari pengajuan *Ethical Clearance* (EC); pembuatan sediaan SNEDDS; proses kultur sel RAW 264.7; uji aktivitas fagositosis dan pengukuran kadar Nitrit Oksida (NO). Skema penelitian dapat dilihat pada gambar berikut.



**Gambar 3.1.** Skema Penelitian

### 3.2.2 Pengajuan *Ethical Clearance*

*Ethical Clearance* penelitian diajukan oleh peneliti ke Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan mengumpulkan beberapa dokumen yang dibutuhkan.

### 3.2.3 Pembuatan Formulasi SNEDSS Propolis

Proses pembuatan formulasi SNEDDS propolis dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia dengan mencampurkan minyak kesturi sebagai fase minyak sebanyak 20%, cremophor RH-40 sebagai surfaktan sebanyak 70% dan PEG 400 sebagai ko-surfaktan sebanyak 10%. Propolis sejumlah 750mg dilarutkan pada campuran yang telah dibuat dengan bantuan *ultrasonic homogenizer* (model 300 131 V/T, USA).

### 3.2.4 Kultur Sel RAW 264.7

Proses kultur sel RAW 264.7 dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dengan menumbuhkan sel pada *petridisk* menggunakan media pada inkubator CO<sub>2</sub> 5% (suhu 37°C) pada waktu 24

jam sebelumnya. Media pada *petridisk* hasil inkubasi dibuang lalu dilakukan pembilasan menggunakan PBS. Kemudian larutan tripsin dituang pada *petridisk* dilanjutkan diinkubasi selama 5-10 menit untuk melepaskan selnya. Selanjutnya *petridisk* tersebut dibaca menggunakan *inverted microscope* untuk melihat dan memastikan selnya sudah terlepas. Media DMEM ditambahkan untuk membilas *petridisk* apabila selnya sudah benar-benar terlepas, kemudian sel yang terlepas ditampung pada konikel. Sel hasil panen dituang pada *counting chamber* kemudian dihitung melalui pengamatan menggunakan *inverted microscope* dengan bantuan *hand tally counter*.

### 3.2.5 Uji Aktivitas Fagositosis

Uji aktivitas fagositosis dari sel RAW 264.7 dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dengan mengambil sejumlah sel hasil panen sebanyak hasil perhitungan lalu di add media 10mL. Hasil campuran sel dan media tersebut dimasukkan sebanyak 500  $\mu$ L pada masing-masing sumuran *microplate* 24 yang telah diberi *coverslip* bulat lalu diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C selama 24 jam untuk 1 *microplate* dan 48 jam untuk 1 *microplate*. Media pada *microplate* hasil inkubasi dibuang kemudian dimasukkan sediaan berupa propolis dan SNEDDS propolis dengan konsentrasi masing-masing adalah 25; 12,5; dan 6,25  $\mu$ g/mL pada tiap sumuran, tetapi sumuran untuk kontrol media dan kontrol sel dikosongkan atau tidak diberi sediaan. Sumuran untuk kontrol media diisi dengan media DMEM sebanyak 1mL dan untuk kontrol sel tidak diberi perlakuan dan dilanjutkan dengan proses inkubasi selama 4 jam. Setelah inkubasi selesai, media dibuang dan dilakukan pembilasan menggunakan RPMI komplit untuk membuang sel yang tidak menempel pada *coverslip*. Lateks sebanyak 200  $\mu$ L dimasukkan pada sumuran dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian *petridisk* dibilas menggunakan PBS dan akuabides sebanyak 3 kali bilasan. Metanol dimasukkan pada *petridisk* selama 5 menit sebagai tahap fiksasi dan dilanjutkan pewarnaan giemsa 20% selama 15 menit.

*Petridisk* dibilas menggunakan akuades sebanyak 2x dan dilanjutkan pengamatan preparat menggunakan mikroskop untuk melihat aktivitas fagositosis (jumlah lateks yang difagosit) dengan perbesaran 40 kali.

### 3.2.6 Pengukuran Kadar Nitrit Oksida (NO)

Pengukuran kadar NO dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dengan bantuan ELISA *reader* dengan mengambil hasil panen sel sesuai perhitungan kemudian ad media 10mL. Campuran tersebut diambil sebanyak 500  $\mu$ L untuk dimasukkan kedalam tiap sumuran lalu diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C selama 24 jam dan 48 jam dengan jumlah *microplate* yang digunakan adalah 1 *microplate* untuk inkubasi 24 jam dan 1 *microplate* untuk waktu inkubasi 48 jam. Media pada *microplate* hasil inkubasi dibuang dan dimasukkan sediaan (propolis dan SNEDDS propolis) sebanyak 1000  $\mu$ L pada masing masing sumuran kecuali sumuran untuk kontrol media dan sel tetap dikosongkan atau tidak diberi sediaan. Konsentrasi yang digunakan adalah 25; 12,5; dan 6,25  $\mu$ g/mL. Sumuran untuk kontrol media diisi dengan media sebanyak 1mL dan untuk 13 kontrol sel tidak diberi perlakuan. Kemudian proses inkubasi dilakukan selama 4 jam. Supernatan dari masing-masing sampel hasil inkubasi diambil dan diletakkan pada *microtube*. Larutan standar NO dibuat lalu dimasukkan dalam *microplate well* 96 sebanyak 100 $\mu$ L. Sediaan berupa propolis dan SNEDDS propolis dimasukkan pada masing masing sumuran sebanyak 100 $\mu$ L (5 kali replikasi untuk masing-masing konsentrasi). Larutan reagen NO dibuat dengan perbandingan griess A dan griess B adalah 1:1 lalu dimasukkan sebanyak 100 $\mu$ L pada sumuran yang telah berisi standar NO dan sampel. Kemudian dilakukan pembacaan menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) sebagai imunostimulan terhadap aktivitas fagositosis dan kadar nitrit oksida sel RAW 264.7 secara *in vitro*. Penelitian ini telah memperoleh kelayakan etik dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia pada 28 September 2019 dengan No. 172/25/D/IX/19.

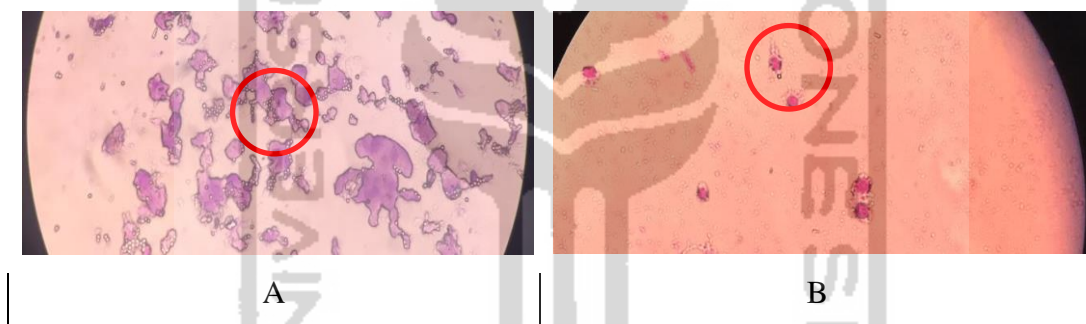
#### **4.1 Uji Stabilitas Formulasi SNEDDS Propolis**

Berdasarkan uji stabilitas pada penelitian yang dilakukan oleh Syukri, *et al* (2019) dihasilkan formula yang baik dan optimal untuk sediaan SNEDDS yaitu formula 5 yang berisi minyak kesturi sebagai fase minyak sebanyak 20%; cremophor RH-40 sebagai surfaktan sebanyak 70%; serta PEG 400 sebagai kosurfaktan sebanyak 10%. Semakin rendah rasio fase minyak yang digunakan akan menghasilkan nilai transmittansi yang mendekati 100% sehingga kejernihan suatu sediaan tergolong optimal secara visual (Senapati *et al.*, 2016). Ukuran partikel suatu SNEDDS berada pada rentang nanometer apabila diperoleh nilai transmittansi mendekati 100% dengan tujuan untuk menilai tingkat kejernihan sistem dispersi berdasarkan absorbansi. Nilai transmittansi untuk formula 5 diperoleh  $98,65 \pm 0,00$  serta kejernihannya tetap optimal pada 24 jam setelah pengenceran yang bermakna bahwa tidak terjadi peningkatan ukuran partikel. Ukuran partikel yang diperoleh masuk dalam rentang nanometer (10-40nm) yaitu 12-20 nm. PEG 400 sebagai kosurfaktan dapat memperkecil ukuran partikel SNEDDS dengan mekanisme melarutkan surfaktan hidrofilik maupun obat hidrofobik. Pengujian stabilitas dipercepat juga dilakukan untuk mengetahui tingkat ketahanan dari formula SNEDDS yang telah dibuat dengan suhu percobaan  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$  dan formula 5 adalah formula SNEDDS yang paling stabil karena nilai ukuran partikel yang konstan. Berdasarkan formula tersebut menunjukkan hasil bahwa minyak kesturi sebagai fase minyak dapat membantu peran surfaktan (cremophor RH-40) untuk

menyatukan partikel minyak secara spontan dan seragam dan senyawa *ricinoleic acid* (RA) dapat mencegah terbentuknya peroksida dan meningkatkan stabilitas oksidatif minyak, sedangkan kosurfaktan yang diwakilkan oleh PEG 400 membantu dalam meningkatkan kelarutan dan meminimalisir polaritas dari suatu larutan (Syukri *et al.*, 2019). Penelitian ini menggunakan formula sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Syukri *et al* (2019) dengan penambahan propolis sebagai zat aktif.

#### 4.2 Uji Aktivitas Fagositosis

Aktivitas fagositosis menjadi parameter untuk melihat kemampuan sel dalam mengeliminasi antigen yang masuk ke dalam tubuh (Abbas *et al.*, 2012). Aktivitas fagositosis dapat diukur berdasarkan kemampuan makrofag dalam memakan lateks seperti yang terlihat pada **Gambar 4.1**.



**Gambar 4.1.** Aktivitas fagositosis makrofag dalam memakan lateks (A) Salah satu penampang kemampuan fagositosis sel RAW 264.7 pada sampel dengan pengamatan mikroskop perbesaran 40x; (B) dan salah satu sel RAW 264.7 yang tidak mampu memfagosit lateks pada konsentrasi 25 µg/mL

Pada gambar **4.1 (A)** terlihat sel RAW 264.7 yang berwarna ungu sedangkan lateks berupa lingkaran bulat sempurna dan berwarna terang. Berdasarkan gambar tersebut terlihat kemampuan sel RAW 264.7 dalam memakan lateks terbukti dengan banyak lateks yang berhasil terfagosit oleh sel RAW 264. Berdasarkan gambar 4.1 (B), ada beberapa penampang dari sampel uji dengan semua konsentrasi yang menunjukkan sel RAW 264.7 tidak mampu memfagosit lateks tetapi kegagalan sifat fagositosis sel RAW 264.7 terhadap lateks tersebut hanya sedikit terjadi sekitar 0,03% karena sebagian besar hasil pengamatan

menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x menunjukkan hasil bahwa sel RAW 264.7 mampu mamfagosit lateks seperti pada gambar 4.1 sebelumnya karena sel RAW 264.7 mirip dengan makrofag yang diproduksi pada sumsum tulang belakang dan banyak dilakukan pada penelitian secara *in vivo* maupun *in vitro* (Bartøomiej *et al.*, 2018).

Waktu inkubasi sel bermakna bahwa sel diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam dan 48 jam sebelum diberikan perlakuan/pemberian sampel uji, tujuannya adalah untuk mempersiapkan sel untuk bisa menerima perlakuan/pemberian sampel uji. Tujuan waktu inkubasi yang berbeda adalah untuk melihat waktu yang tepat bagi sel dalam mempersiapkan diri (sel sudah dalam keadaan matang) sehingga bisa diberikan perlakuan antara waktu inkubasi 24 atau 48 jam. Pengukuran aktivitas fagositosis dilakukan dengan menghitung indeks dan kapasitas fagositosis. (Beandrade, 2018). Perhitungan didapatkan hasil pada **Tabel 4.1** dan **4.2**

**Tabel 4.1** Rata-rata  $\pm$  SD untuk indeks dan kapasitas fagositosis dengan waktu inkubasi sel selama 24 jam (N=3)

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Propolis		SNEDDS		Kontrol	
	Indeks	Kapasitas	Indeks	Kapasitas	Indeks	Kapasitas
25	1.13 $\pm$ 0.01	16.33 $\pm$ 1.89	0	0	0.72 $\pm$ 0.02	13.95 $\pm$ 2.76
12.5	1.15 $\pm$ 0.01	17.34 $\pm$ 1.89	1.22 $\pm$ 0.03	14.67 $\pm$ 0.94	0.93 $\pm$ 0.01	17.15 $\pm$ 1.63
6.25	5.27 $\pm$ 0.04	55.17 $\pm$ 1.65	2.22 $\pm$ 0.03	41.67 $\pm$ 0.48	0.60 $\pm$ 0.01	15 $\pm$ 1.41

**Tabel 4.2** Rata-rata  $\pm$  SD untuk indeks dan kapasitas fagositosis dengan waktu inkubasi sel selama 48 jam

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Propolis		SNEDDS		Kontrol	
	Indeks	Kapasitas	Indeks	Kapasitas	Indeks	Kapasitas
25	1.53 $\pm$ 0.01	37.67 $\pm$ 0.47	2.06 $\pm$ 0.04	52.84 $\pm$ 1.65	1.05 $\pm$ 0.04	10.67 $\pm$ 0.47
12.5	1.62 $\pm$ 0	41 $\pm$ 1.41	2.22 $\pm$ 0.01	53 $\pm$ 0.47	1.15 $\pm$ 0.01	33.84 $\pm$ 1.12
6.25	3.24 $\pm$ 0.06	80.5 $\pm$ 0.71	3.31 $\pm$ 0.01	82.17 $\pm$ 0.71	0.56 $\pm$ 0.02	18.01 $\pm$ 1.89

Berdasarkan tabel 4.1 diatas dapat terlihat bahwa dengan waktu inkubasi sel 24 jam pada semua konsentrasi uji (25;12,5 dan 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ), sampel propolis menunjukkan hasil indeks dan kapasitas fagositosis lebih tinggi dibandingkan dengan sampel uji lain yaitu SNEDDS propolis dan kontrol. Tetapi pada sampel

SNEDDS propolis dengan konsentrasi 25 µg/mL tidak didapatkan hasil aktivitas fagositosis dikarenakan pada pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x, sel RAW 264.7 mengalami kerusakan (sel pecah) dan lateks pada sampel tersebut tidak muncul sehingga tidak dapat dihitung nilai indeks dan kapasitas fagositosisnya seperti yang terlihat pada **Gambar 4.2**



**Gambar 4.2** Penampang sampel SNEDDS propolis konsentrasi 25 µg/mL pada mikroskop (sel pecah dan lateks tidak terlihat)

Untuk pengujian pada sel RAW 264.7 dengan waktu inkubasi 48 jam, SNEDDS propolis menunjukkan keunggulan dibandingkan sampel propolis dan kontrol karena nilai indeks dan kapasitas fagositosis SNEDDS propolis lebih tinggi. Sediaan SNEDDS propolis lebih mampu menstimulus sel RAW 264.7 dalam konteks aktivitas fagositosis setelah sel diinkubasi selama 48 jam dibandingkan 24jam.

Analisis kapasitas fagositosis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada semua sampel uji dan semua konsentrasi antara waktu inkubasi sel 24 jam dan 48 jam ( $p < 0,05$ ). Untuk nilai indeks fagositosis tidak berbeda signifikan pada sel RAW 264.7 antara waktu inkubasi 24 dan 48 jam pada semua sampel uji dan semua konsentrasi karena diperoleh nilai  $p > 0,05$  (0.552). Hasil tersebut dikarenakan sel RAW 264.7 merupakan sel epitel yang mirip dengan sel makrofag, sehingga mampu dalam melakukan aktivitas fagositosis (Bartømiej *et al.*, 2018). Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kalsum *et al* (2017) bahwa propolis mampu meningkatkan aktivitas fagositosis dengan konsentrasi 0,16%; 0,46% dan 1,44% dengan hasil aktivitas fagositosis secara berurut adalah



80,7%; 88,4%; dan 90,1%. Aktivitas fagositosis terjadi karena propolis mampu mengaktifasi LAF (*Lymphosite Activating Factors*) yang secara langsung dapat meningkatkan respon dari makrofag terhadap mikroorganismenya seperti antigen (Kalsum *et al.*, 2017). Kemampuan tersebut juga karena adanya bantuan dari bentuk SNEDDS propolis karena sediaan SNEDDS mampu meningkatkan kelarutan, *bioavailability* dari propolis sehingga senyawa-senyawa dari propolis terutama flavonoid menunjukkan kemampuannya dalam meningkatkan sistem imun (senyawa imunostimulan) (Omene *et al.*, 2014).

#### 4.2 Kadar Nitrit Oksida (NO)

Pengukuran kadar nitrit oksida (NO) dihitung berdasarkan nilai absorbansi dari pembacaan menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Kadar NO diperoleh dengan membuat regresi linear antara absorbansi dan konsentrasi dari nilai absorbansi standar NO yang dapat dilihat pada **Tabel 4.3** untuk waktu inkubasi 24 jam dan pada **Tabel 4.4** untuk waktu inkubasi 48 jam.

**Tabel 4.3** Rata-rata  $\pm$  SD nilai kadar NO ( $\mu\text{mol/L}$ ) dengan waktu inkubasi sel selama 24 dan 48 jam

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Propolis		SNEDDS		Kontrol	
	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
25	19.71 $\pm$ 16.72	2.95 $\pm$ 0.16	12.48 $\pm$ 10.03	7.44 $\pm$ 0.18	3.16 $\pm$ 2.74	1.29 $\pm$ 0.18
12.5	8.77 $\pm$ 4.56	0.97 $\pm$ 0.04	3.8 $\pm$ 2.43	2.44 $\pm$ 0.13	1.14 $\pm$ 0.21	0.83 $\pm$ 0.16
6.25	4.81 $\pm$ 1.15	0.22 $\pm$ 0.22	2.31 $\pm$ 0.81	1.05 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.06

Berdasarkan tabel 4.3 terlihat pada masa inkubasi sel selama 24 jam didapatkan hasil bahwa sampel propolis untuk semua konsentrasi uji (25;12,5 dan 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) memiliki kadar NO yang lebih tinggi dibandingkan sampel SNEDDS propolis dan kontrol. Sedangkan untuk masa inkubasi sel 48 jam didapatkan hasil bahwa sampel SNEDDS propolis memiliki kadar NO yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel propolis dan kontrol. Sediaan SNEEDDS propolis lebih mampu membantu peningkatan produksi NO pada sel RAW 264.7 setelah sel diinkubasi selama 48 jam dibanding 24 jam dengan uji stabilitas yang telah dilakukan sebelumnya terhadap basis SNEDDS propolis yaitu diperoleh nilai transmittan  $98,65 \pm 0,00$  serta kejernihannya tetap optimal pada 24 jam setelah

pengenceran yang bermakna bahwa tidak terjadi peningkatan ukuran partikel. PEG 400 sebagai kosurfaktan dapat memperkecil ukuran partikel. Minyak kesturi sebagai fase minyak dapat membantu peran surfaktan (cremophor RH-40) untuk menyatukan partikel minyak secara spontan dan seragam dan senyawa *ricinoleic acid* (RA) dapat mencegah terbentuknya peroksida dan meningkatkan stabilitas oksidatif minyak, sedangkan kosurfaktan yang diwakilkan oleh PEG 400 membantu dalam meningkatkan kelarutan dan meminimalisir polaritas dari suatu larutan sehingga partikel propolis dapat ditingkatkan efektivitasnya dengan bantuan basis SNEDDS tersebut (Syukri *et al.*, 2019)

Sel RAW 264.7 mampu menstimulus produksi NO karena bentuk sel RAW 264.7 merupakan sel makrofag, yaitu sel yang mampu melakukan aktivitas fagositosis dan produksi kadar NO. Pada penelitian sebelumnya sel RAW 264.7 mampu melakukan fagositosis pada sel target/antigen dan menstimulus produksi NO secara signifikan dalam respon aktivasi dari LPS (Bartøomiej *et al.*, 2018). Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kalsum *et al* (2017) juga menunjukkan bahwa propolis mampu meningkatkan produksi NO pada makrofag dengan konsentrasi 0,16%; 0,46%; dan 1,44% dengan kadar NO secara berurutan adalah 187,104; 195,866; dan 198,034  $\mu\text{M/L}$  (Kalsum *et al.*, 2017). Sesuai dengan pengamatan yang juga dilakukan oleh Wu *et al* (2013) bahwa sel RAW 264.7 mampu memproduksi NO setelah ada stimulasi oleh *Viili Exopolysaccharides* (VEPS) dengan konsentrasi 50; 100; dan 200 $\mu\text{g/mL}$  (Wu *et al.*, 2013). Aktivitas fagositosis dan produksi NO tersebut menjadi respon yang baik untuk dijadikan parameter dalam pengukuran imunostimulan (Abbas *et al.*, 2012).

## **BAB V**

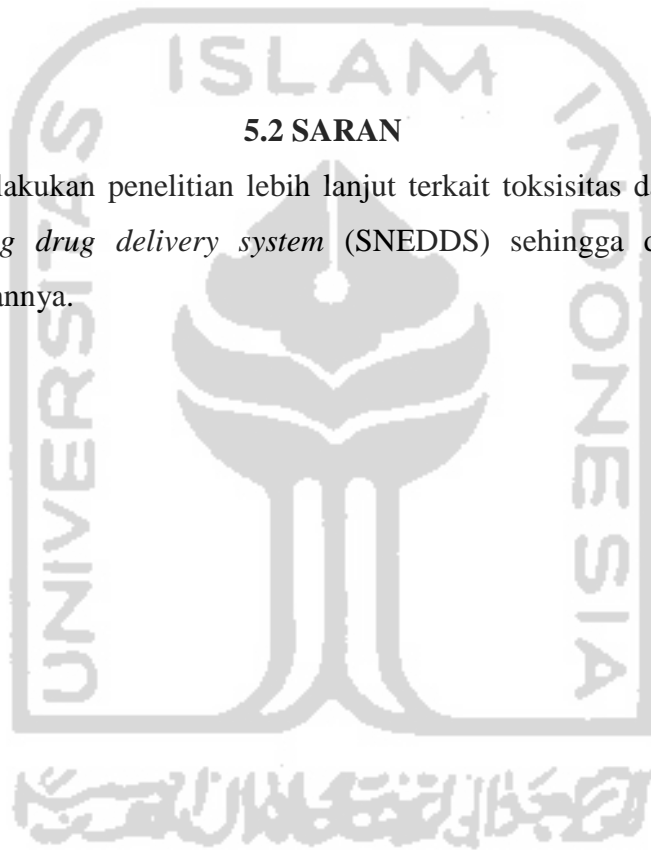
### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 KESIMPULAN**

Sediaan *Self nano-emulsifying drug delivery system* (SNEDDS) lebih mampu meningkatkan aktivitas fagositosis dan menstimulus produksi nitrit oksida (NO) pada sel RAW 264.7 dengan masa inkubasi sel 48 jam dibanding 24 jam ( $p < 0,05$ ).

#### **5.2 SARAN**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait toksisitas dari sediaan *Self nano-emulsifying drug delivery system* (SNEDDS) sehingga dapat diketahui tingkat keamanannya.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2012. Cellular and molecular immunology, 7th ed. Philadelphia : Elsevier Saunders.
- Barlak, Y., Değer, O., Çolak, M., Karataylı, S., Bozdayı, A., Yücesan, F., 2011. Effect of Turkish Propolis Extracts on Proteome of Prostate Cancer Cell Line. *Proteome Sci* (9), 74. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-74>
- Bartøomiej, T., Maciej, B., Agata, B., Zuzanna, S., Paulina, S., Lèukasz, K., Tomasz, R., Magdalena, K., 2018. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLOS ONE* (6), 2–5.
- 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 Imunostimulan. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. (01), 50–61. <https://doi.org/10.20961/jpscr.v3i1.15506>
- Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A.M., Cunha, A., Aguiar, C., 2010. How do Bees Prevent Hive Infections? The Antimicrobial Properties of Propolis. *Technology and Education Topics in Applied Microbiology Biotechnology* 481–493.
- Kalsum, N., Sulaeman, A., Setiawan, B., Wibawan, I.W.T., 2017. Preliminary Studies of the Immunomodulator Effect of the Propolis *Trigona spp.* Extract in a Mouse Model. *IOSR JAVS* (10), 75–80. <https://doi.org/10.9790/2380-1002027580>
- Kassem, A.A., Mohsen, A.M., Ahmed, R.S., Essam, T.M., 2016. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced solubilization of nystatin for treatment of oral candidiasis: Design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Molecular Liquids* 218 219–232.
- Kazi, M., Hussain, M.D., 2019. Evaluation of Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) for Poorly Water-Soluble Talinolol: Preparation, in vitro and in vivo Assessment. *Frontiers in Pharmacology* (10), 13.
- Omene, C., Kalac, M., Wu, J., Marchi, E., Frenkel, K., O'Connor, O.A., 2014. 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* 5 (10), 18.
- Pierro, F.D., Zanvit, A., Colombo, M., 2016. Role of a proprietary propolis-based product on the wait-and-see approach in acute otitis media and in preventing evolution to tracheitis, bronchitis, or rhinosinusitis from nonstreptococcal pharyngitis. *International Journal of General Medicine*. (6), 409–414.
- Senapati, P.C., Sahoo, S.K., Sahu, A.N., 2016. Mixed surfactant based (SNEDDS) self-nanoemulsifying drug delivery system presenting efavirenz for enhancement of oral bioavailability. *Biomedicine & Pharmacotherapy* (80), 42–51.

- Shahba, A.A.-W., Mohsin, K., Alanazi, F.K., 2012. Novel Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) for Oral Delivery of Cinnarizine: Design, Optimization, and In-Vitro Assessment. *AAPS PharmSciTech* 3 (13), 11.
- Shruthi, E., Suma, B.S., 2012. Health from the Hive: Potential Uses of Propolis in General Health. *IJCM* (3), 159–162.
- 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. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis* (06), 9.
- Wu, J., Li, Mengxian, Liu, L., An, Q., Zhang, Jinlu, Zhang, Jingkai, Li, Meiling, Duan, W., Liu, D., Li, Z., Luo, C., 2013. Nitric Oxide and Interleukins are Involved in Cell Proliferation of RAW264.7 Macrophages Activated by Viili Exopolysaccharides. *Inflammation Research* 360–367.
- Yuan, J., 2012. The immunological activity of propolis flavonoids liposome on the immune response against ND vaccine. *IJBM* (51), 400–405.



## LAMPIRAN

**Lampiran 1.** Tabel data aktivitas fagositosis percobaan 1 dengan masa inkubasi sel 24 jam

Sampel	Rep	Indeks Fagositosis		Kapasitas Fagositosis	
		Lateks terfagosit	Makrofag memfagosit	Jumlah sel	Makrofag Aktif
Propolis 6,25	1	552	100	100	60
	2	523	100	100	56
	3	513	100	100	46
	Rata-rata	529.3333333	100	100	54
Propolis 12,5	1	112	100	100	17
	2	111	100	100	13
	3	118	100	100	18
	Rata-rata	113.6666667	100	100	16
Propolis 25	1	123	100	100	18
	2	105	100	100	13
	3	109	100	100	14
	Rata-rata	112.3333333	100	100	15
SNEDDS 6,25	1	219	100	100	41
	2	233	100	100	47
	3	208	100	100	38
	Rata-rata	220	100	100	42
SNEDDS 12,5	1	119	100	100	14
	2	111	100	100	11
	3	130	100	100	17
	Rata-rata	120	100	100	14
SNEDDS 25	1	Sel pecah dan lateks tidak muncul			
	2				
	3				
	Rata-rata				
Kontrol 6,25	1	43	100	100	13
	2	62	100	100	13
	3	72	100	100	16
	Rata-rata	59	100	100	14
Kontrol 12,5	1	89	100	100	17
	2	95	100	100	17
	3	92	100	100	14
	Rata-rata	92	100	100	16
Kontrol 25	1	71	100	100	11
	2	73	100	100	15
	3	69	100	100	10
	Rata-rata	71	100	100	12
		74	100	100	14

**Lampiran 2.** Tabel data aktivitas fagositosis percobaan 2 dengan masa inkubasi sel 24 jam

Sampel	Rep	Indeks Fagositosis		Kapasitas Fagositosis	
		Lateks terfagosit	Makrofag memfagosit	Jumlah sel	Makrofag Aktif
Propolis 6,25	1	555	100	100	62
	2	500	100	100	58
	3	517	100	100	49
Rata-rata		524	100	100	56.33333333
Propolis 12,5	1	118	100	100	19
	2	112	100	100	16
	3	118	100	100	21
Rata-rata		116	100	100	18.66666667
Propolis 25	1	115	100	100	15
	2	118	100	100	17
	3	109	100	100	21
Rata-rata		114	100	100	17.66666667
SNEDDS 6,25	1	222	100	100	40
	2	239	100	100	45
	3	211	100	100	39
Rata-rata		224	100	100	41.33333333
SNEDDS 12,5	1	122	100	100	15
	2	117	100	100	13
	3	132	100	100	18
Rata-rata		123.6666667	100	100	15.33333333
SNEDDS 25	1	Sel pecah dan lateks tidak muncul			
	2				
	3				
Rata-rata					
Kontrol 6,25	1	47	100	100	14
	2	61	100	100	15
	3	73	100	100	19
Rata-rata		60.33333333	100	100	16
Kontrol 12,5	1	91	100	100	20
	2	94	100	100	18
	3	94	100	100	17
Rata-rata		93	100	100	18.33333333
Kontrol 25	1	72	100	100	12
	2	75	100	100	16
	3	73	100	100	12
Rata-rata		73.33333333	100	100	13.33333333
		75.55555556	100	100	15.88888889

**Lampiran 3.** Tabel hasil indeks dan kapasitas fagositosis percobaan 1 dan 2 dengan masa inkubasi sel 24 jam

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Propolis		SNEDDS		Kontrol	
	Indeks	Kapasitas (%)	Indeks	Kapasitas (%)	Indeks	Kapasitas (%)
25	1.12	15			0.74	14
12.5	1.14	16	1.2	14		
6.25	5.3	54	2.2	42		

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Propolis		SNEDDS		Kontrol	
	Indeks	Kapasitas (%)	Indeks	Kapasitas (%)	Indeks	Kapasitas (%)
25	1.14	17.67			0.75	15.89
12.5	1.16	18.67	1.24	15.33		
6.25	5.24	56.33	2.24	41.33		

**Lampiran 4.** Tabel hasil nilai indeks dan kapasitas fagositosis percobaan 1 dan 2 dengan masa inkubasi sel 48 jam

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Propolis		SNEDDS		Kontrol	
	Indeks	Kapasitas (%)	Indeks	Kapasitas (%)	Indeks	Kapasitas (%)
25	1.53	38	2.03	51.67	0.91	20
12.5	1.62	42	2.22	52.67		
6.25	3.28	81	3.32	82.67		

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Propolis		SNEDDS		Kontrol	
	Indeks	Kapasitas (%)	Indeks	Kapasitas (%)	Indeks	Kapasitas (%)
25	1.52	37.33	2.08	54	0.92	21.67
12.5	1.62	40	2.21	53.33		
6.25	3.2	80	3.3	81.67		

**Lampiran 5.** *Microplate* Pengujian Kadar Nitrit Oksida





**Lampiran 6.** Hasil uji statistika perbandingan aktivitas fagositosis sel RAW 264.7 dengan masa inkubasi sel 24 jam dan 48 jam pada semua sampel uji untuk semua konsentrasi

Indeks fagositosis ( $p > 0,05$ ), tidak berbeda signifikan

### Oneway

#### Test of Homogeneity of Variances

Hasil

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.648	1	10	.228

#### ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.744	1	.744	.378	.552
Within Groups	19.671	10	1.967		
Total	20.415	11			

### T-Test

#### Group Statistics

Percobaan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Hasil 24 Jam	6	1.8308333	1.82417919	.74471804
Hasil 48 Jam	6	2.3288889	.77883650	.31795867

#### Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-Test for Equality of Means								
		Levene's Test for Equality of Variances		t-Test for Equality of Means		95% Confidence Interval of the Difference				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Hasil	Equal variances assumed	1.648	.228	-.615	10	.552	-.49805556	.80975470	-2.30230146	1.30619035
	Equal variances not assumed			-.615	6.764	.559	-.49805556	.80975470	-2.42643254	1.43032143

Kapasitas fagositosis ( $p < 0,05$ ), berbeda signifikan

### Oneway

#### Test of Homogeneity of Variances

Hasil

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.009	1	10	.927

#### ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3400.333	1	3400.333	8.733	.014
Within Groups	3893.880	10	389.388		
Total	7294.213	11			

### T-Test

#### Group Statistics

Percobaan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Hasil 24 Jam	6	24.1944444	20.24637599	8.26554839
Hasil 48 Jam	6	57.8611111	19.20573313	7.84070772

#### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Hasil	Equal variances assumed	.009	.927	-2.955	10	.014	-33.66666667	11.39280421	-59.05141635	-8.28191698
	Equal variances not assumed			-2.955	9.972	.014	-33.66666667	11.39280421	-59.06098243	-8.27235090

**Lampiran 7.** Tabel kadar Nitrit Oksida (NO) percobaan 1 dan 2 pada waktu inkubasi sel 24 jam

<b>Konsentrasi (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Propolis</b>	<b>SNEDDS</b>	<b>Kontrol</b>
25	7.89	5.38	1.22
12.5	5.54	2.08	0.99
6.25	3.99	1.73	0.009

<b>Konsentrasi (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Propolis</b>	<b>SNEDDS</b>	<b>Kontrol</b>
25	31.53	19.57	5.09
12.5	11.99	5.51	1.29
6.25	5.62	2.88	0.01

**Lampiran 7.** Tabel kadar Nitrit Oksida (NO) percobaan 1 dan 2 pada waktu inkubasi sel 48 jam

<b>Konsentrasi (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Propolis</b>	<b>SNEDDS</b>	<b>Kontrol</b>
25	2.84	7.31	1.16
12.5	0.94	2.34	0.71
6.25	0.063	1.01	0.11

<b>Konsentrasi (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Propolis</b>	<b>SNEDDS</b>	<b>Kontrol</b>
25	3.06	7.57	1.42
12.5	0.99	2.53	0.94
6.25	0.38	1.08	0.2

**Lampiran 8.** Hasil uji statistika perbandingan produksi nitrit oksida (NO) sel RAW 264.7 dengan masa inkubasi sel 24 jam dan 48 jam pada semua sampel uji untuk semua konsentrasi ( $p < 0,05$ ), berbeda signifikan

### Oneway

#### Test of Homogeneity of Variances

Hasil

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.605	1	16	.021

#### ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	92.925	1	92.925	4.367	.053
Within Groups	340.433	16	21.277		
Total	433.357	17			

### Mann-Whitney Test

#### Ranks

	Percobaan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	24 Jam	9	12.44	112.00
	48 Jam	9	6.56	59.00
	Total	18		

#### Test Statistics<sup>a</sup>

	Hasil
Mann-Whitney U	14.000
Wilcoxon W	59.000
Z	-2.350
Asymp. Sig. (2-tailed)	.019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.019 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Percobaan.

b. Not corrected for ties.