

**AKTIVITAS SNEDDS GAMAVUTON-0 SEBAGAI ANTI
ARTRITIS REMATOID DENGAN PARAMETER PENURUNAN
KADAR SITOKIN IL-1 β DAN TNF- α PADA JARINGAN SENDI
TIKUS *WISTAR* JANTAN TERINDUKSI *COMPLETE FREUND'S*
*ADJUVANT***

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



**VIREN RAMADHAN
12613163**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
SEPTEMBER 2016**

SKRIPSI

**AKTIVITAS SNEDDS GAMAVUTON-0 SEBAGAI ANTI
ARTRITIS REMATOID DENGAN PARAMETER PENURUNAN
KADAR SITOKIN IL-1 β DAN TNF- α PADA JARINGAN SENDI
TIKUS *WISTAR* JANTAN TERINDUKSI *COMPLETE FREUND'S*
*ADJUVANT***



Yang diajukan oleh:

VIREN RAMADHAN

12613163

Telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Lutfi Chabib, M.Sc., Apt

Pembimbing Pendamping,

Dimas Adhi Pradana, M.Sc., Apt

SKRIPSI

AKTIVITAS SNEDDS GAMAVUTON-0 SEBAGAI ANTI ARTRITIS REMATOID DENGAN PARAMETER PENURUNAN KADAR SITOKIN IL-1 β DAN TNF- α PADA JARINGAN SENDI TIKUS *WISTAR* JANTAN TERINDUKSI *COMPLETE FREUND'S* *ADJUVANT*

Oleh:

VIREN RAMADHAN

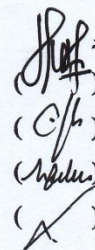
12613163

Telah lolos uji etik penelitian dan dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas

Islam Indonesia

Tanggal: 13 September 2016

Ketua Penguji : Lutfi Chabib, M.Sc., Apt
Anggota Penguji : 1. Dimas Adhi Pradana, M.Sc., Apt
2. Annisa Fitria, M.Sc., Apt
3. Dr. Ika Puspitasari, M.Si., Apt



(C/A)
(M/S)
(A)

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia



Drs. Alwat, M.Sc., Ph.D.

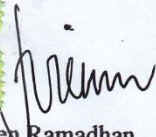
PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang berjudul “**Aktivitas SNEDDS Gamavuton-0 sebagai Anti Arthritis Rematoid dengan Parameter Penurunan Kadar Sitokin IL-1 β dan TNF- α Pada Jaringan Sendi Tikus *Wistar Jantan Terinduksi Complete Freund's Adjuvan***” 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 orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 13 September 2016

Penulis,




Viren Ramadhan

KATA PENGANTAR



Alhamdulillah, puji syukur dipanjatkan atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi “**Aktivitas SNEDDS Gamavuton-0 sebagai Anti Arthritis Rematoid dengan Parameter Penurunan Kadar Sitokin IL-1 β dan TNF- α Pada Jaringan Sendi Tikus Wistar Jantan Terinduksi *Complete Freund's Adjuvant*” dalam rangka menyelesaikan studi di Universitas Islam Indonesia sehingga dapat meraih gelar Sarjana Farmasi. Sholawat serta salam selalu tercurah pada junjungan kita Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabat yang telah memperjuangkan agama Allah SWT.**

Penulisan skripsi ini dapat terlaksana atas doa, dukungan dan nasehat dari banyak pihak, untuk itu penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. Bapak Lutfi Chabib, M.Sc., Apt selaku dosen pembimbing utama dan Bapak Dimas Adhi Pradana, M.Sc., Apt. selaku dosen pendamping yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, dorongan, dan saran-saran selama penelitian dan penyusunan skripsi ini berlangsung.
2. Orang tua saya tercinta Bapak Aisrin Syaufi dan Ibu Nora Yenni yang senantiasa selalu memberikan doa, nasihat, dan kasih sayangnya sehingga saya dapat menyelesaikan studi di program studi Farmasi Universitas Islam Indonesia.
3. Adik-adik saya tersayang Diyah Dwi Maharani dan Alliqah Maghfirah yang selalu memberikan dukungan dan semangat sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini dengan lancar.
4. Ibu Endang Sulistyowati, M.Sc., Apt selaku dosen pembimbing akademik saya yang selalu membimbing dari awal semester sampai sekarang hingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini dengan lancar.

5. Ibu Annisa Fitria, M.Sc., Apt dan Ibu Dr,Ika Puspitasari, M.Si., Apt selaku dosen penguji yang memberikan saran dan perbaikan hingga skripsi ini dapat diselesaikan.
6. Bapak Drs. Allwar, M.Sc., Ph.D, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
7. Bapak Pinus Jumaryantno, S.Si., M.Phil., Ph.D., Apt selaku ketua Program Studi Farmasi
8. Seluruh dosen Program Studi Farmasi Farkultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang telah memberikan ilmu selama kuliah di Universitas Islam Indonesia.
9. Seluruh staf Laboratotorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia yang telah memberikan bantuan selama proses penelitian berlangsung.
10. Nadya Aqliyah, Tisa Helga, Zilfa Sofi Ibrani selaku teman seperjuangan dalam penelitian ini. Terimakasih atas dukungan, kerjasama dan kesabarannya sehingga seluruh rangkaian penelitian ini dapat berjalan dengan lancar.
11. Sahabat-sahabat Ulil Albab Andika Wiratama, Asep Awaludin, Wildan Khairi, Ridho Maksudi, Jaka, dan Safar yang selalu memberikan nasehat-nasehat yang bermanfaat selama proses perkuliahan hingga selesainya skripsi ini.
12. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah banyak membantu selama proses pembuatan skripsi ini. Semoga dinilai suatu kebaikan oleh Allah SWT.

Penulis mohon maaf apabila terdapat kesalahan dan kekeliruan dalam penulisan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi masyarakat pada umumnya serta perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan pada khususnya, Amin.

Wassalamualaikum Wr.Wb

Yogyakarta, 13 September 2016

Penulis,



Viren Ramadhan

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
INTISARI	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB II STUDI PUSTAKA	4
2.1. Tinjauan pustaka	4
2.1.1. Arthritis Rematoid	4
2.1.2. <i>Complete Freund's Adjuvant</i>	6
2.1.3. <i>Tumor Necrosis Factor-α</i> (TNF- α)	7
2.1.4. <i>Interleukin -1β</i> (IL-1 β)	8
2.1.5. Metotreksat	9
2.1.6. Gamavuton-0	10
2.1.7. <i>Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System</i> (SNEDDS)	11
2.1.8. <i>ELISA</i>	12
2.2. Landasan Teori	14
2.3. Hipotesis	15
2.4. Kerangka Konsep	16

BAB III METODE PENELITIAN	17
3.1. Alat dan Bahan	17
3.1.1. Alat.....	17
3.1.2. Bahan.....	17
3.1.3. Subyek uji.....	17
3.2. Cara Penelitian	18
3.2.1. Pengajuan <i>Ethical Clearance</i>	18
3.2.2. Persiapan Hewan Uji.....	18
3.2.3. Penyiapan Bahan dan Pembuatan Sediaan Uji.....	18
3.2.4. Perlakuan Hewan Uji.....	19
3.2.5. Pengamatan Mikroskopik dan Penegakan Diagnosis.....	20
3.2.6. Penetapan ekspresi kadar IL-1 β dan TNF- α menggunakan metode <i>Sandwich ELISA</i> langsung.....	21
3.3. Analisis Data	23
3.4. Skema Penelitian.....	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	38
5.1. Kesimpulan	38
5.2. Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Perbedaan jaringan tulang normal dan tulang artritis rematoid.....	4
Gambar 2.2 Mekanisme TNF- α	7
Gambar 2.3 Patogenesis AR dari ekspresi sitokin IL-1 β dan TNF- α	8
Gambar 2.4 Struktur Kurkumin.....	10
Gambar 2.5 Struktur Gamavuton-0.....	10
Gambar 2.6 <i>Plate Sandwich ELISA</i> yang berisi antibodi.....	13
Gambar 3.1 Skema penelitian.....	25
Gambar 4.1 SNEDDS GVT-0.....	28
Gambar 4.2 Indeks AR ≥ 1 pada tikus <i>Wistar</i> jantan.....	30
Gambar 4.3 Kurva baku standar IL-1 β menggambarkan hubungan linier antara seri kadar IL-1 β standar dengan absorbansi setelah pembacaan dengan <i>ELISA reader</i>	31
Gambar 4.4. Histogram kadar IL-1 β	32

Gambar 4.5	Histogram persentase penurunan kadar IL-1 β	34
Gambar 4.6	Kurva baku standar TNF- α menggambarkan hubungan linier antara seri kadar TNF- α standar dengan absorbansi setelah pembacaan dengan <i>ELISA reader</i>	35
Gambar 4.7	Histogram kadar TNF- α	36
Gambar 4.8	Histogram persentase penurunan kadar TNF- α	37

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Indeks keparahan AR.....	22
Tabel 4.1.	Tabel hasil pengujian rerata ukuran partikel, PDI \pm SD dan hasil uji Transmitan (%).....	27
Tabel 4.2.	Rata-rata indeks artritis hari ke-15 dan hari ke-30.....	29
Tabel 4.3.	Rata-rata kadar IL-1 β dan harga SE (ng/L).....	31
Tabel 4.4.	Rata-rata kadar TNF- α dan harga SE (ng/L).....	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel data absorbansi standar IL-1 β dan TNF- α dengan beberapa seri kadar untuk pembuatan kurva baku IL-1 β dan TNF- α	42
Lampiran 2. Tabel data absorbansi IL-1 β sampel yang diambil dari jaringan sendi kaki tikus dengan metode <i>ELISA</i>	42
Lampiran 3. Tabel data kadar IL-1 β sampel (ng/L).....	43
Lampiran 4. Tabel-tabel hasil ANAVA dan Uji <i>Turkey</i> kadar sampel IL-1 β ...	43
Lampiran 5. Tabel data absorbansi TNF- α sampel yang diambil dari jaringan sendi kaki tikus dengan metode <i>ELISA</i>	45
Lampiran 6. Tabel data kadar TNF- α sampel (ng/L).....	45
Lampiran 7. Tabel-tabel hasil ANAVA dan Uji <i>Turkey</i> kadar sampel TNF- α ...	46
Lampiran 8. Tabel skoring artritis.....	48
Lampiran 9. Dokumentasi alat, bahan dan perlakuan hewan uji.....	49
Lampiran 10. Surat <i>Ethical Clearance</i>	51

Lampiran 11. Hasil uji PSA.....	52
Lampiran 12. Surat keterangan hewan uji.....	53
Lampiran 13. Tabel-tabel hasil ANAVA dan Uji <i>Turkey</i> persentase penurunan kadar IL-1 β dan TNF- α	54



**Aktivitas SNEDDS Gamavuton-0 Sebagai Anti Arthritis Rematoid dengan
Parameter Penurunan Kadar Sitokin IL-1 β dan TNF- α Pada Jaringan Sendi
Tikus *Wistar Jantan* Terinduksi *Complete Freund's Adjuvant***

**Viren Ramadhan
Prodi Farmasi**

INTISARI

Arthritis Rematoid adalah penyakit inflamasi sistemik yang bersifat kronik dan terdapat pada struktur articular persendian. Banyak ahli berpendapat bahwa mekanisme penyakit arthritis rematoid ini berhubungan dengan sistem imun yang ditandai terutama oleh ekspresi dua sitokin yaitu Interleukin-1 β (IL-1 β) dan *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh SNEDDS GVT-0 terhadap penurunan kadar sitokin IL-1 β dan TNF- α serta perbedaannya terhadap suspensi GVT-0 pada hewan uji tikus *Wistar jantan* terinduksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA). Setelah diinduksi CFA pada hari ke-0 dan ditunggu selama 14 hari serta dilakukan skoring arthritis menggunakan parameter indeks arthritis. Pada hari ke-15 kelompok tikus kontrol negatif diberi aquades peroral. Kontrol positif diberi metotreksat (p.o) dan kelompok perlakuan diberi SNEDDS GVT-0 (p.o) serta suspensi GVT-0 (p.o) dengan dosis 40 mg/kg BB tikus. Hari ke-31 tikus dikorbankan dan dilumatkan jaringan sendinya. Penetapan kadar TNF- α dan IL-1 β dilakukan dengan metode *Sandwich* ELISA langsung. Perbedaan antar perlakuan dianalisis secara statistik menggunakan metode ANAVA satu jalan dan dilanjutkan dengan uji *Turkey*. Hasil yang diperoleh SNEDDS GVT-0 memiliki aktivitas menurunkan kadar sitokin IL-1 β dan TNF- α dengan persentase penurunan kadar berturut turut sebesar 65,8 % dan 61,5 %. SNEDDS GVT-0 mampu menurunkan kadar IL-1 β dan TNF- α secara signifikan, sedangkan suspensi hanya mampu menurunkan kadar IL-1 β tanpa diikuti penurunan kadar TNF- α . Sehingga SNEDDS GVT-0 lebih baik dibandingkan suspensi GVT-0 dalam menurunkan kadar keduanya.

Kata kunci: Arthritis rematoid, SNEDDS, Gamavuton-0, sitokin IL-1 β dan TNF- α .

Activity of Gamavuton SNEDDS as Anti Rheumatoid Arthritis on Male Wistar Rats Induced by Complete Freund's Adjuvant with Parameter Suppression of cytokine IL-1 β and TNF- α in Joints Tissue

**Viren Ramadhan
Department of Pharmacy**

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammation disease in joints that it's unclearly known. In the some recently study has proven that there is elevation of cytokines level including IL-1 β and TNF- α in RA joints synovium. Gamavuton-0 has the effect of anti-arthritis. This study was undertaken to know in vivo activity of SNEDDS GVT-0 in RA with joints level of IL-1 β and TNF- α as parameter. the reaserch has done by inducing male Wistar rats with Complete Freund's Adjuvant (CFA) to get arthritic rats. After the CFA-induced, a negative control group of mice was given distilled water orally. Positive controls were given methotrexate orally and the treatment group was given a dose level of 40 mg/kg weight of rat SNEDDS GVT-0 and suspense GVT-0 orally. Assay of IL-1 β and TNF- α was conducted using a direct sandwich ELISA. Differences between treatments were statistically analyzed using ANOVA and Turkey Test method was compared to normal rats. The research resulting that SNEDDS of GVT-0 decrease IL-1 β and TNF- α in a row of 65,8 % and 61,5 %. SNEDDS GVT-0 could reduce levels of IL-1 β and TNF- α significantly, while the suspension GVT-0 only able to reduce the levels of IL-1 β without TNF- α . So SNEDDS GVT-0 is better than suspension GVT-0 in the lower of both.

Key Words: Rheumatoid arthritis, SNEDDS, Gamavuton-0, Cytokines IL-1 β and TNF- α

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit artritis rematoid (AR) merupakan salah satu penyakit autoimun dengan timbulnya inflamasi artritis pada pasien dewasa⁽¹⁾. Jenis rematik ini merupakan bentuk artritis yang paling serius karena dapat mengakibatkan kerusakan sendi yang berat⁽²⁾. Rasa nyeri yang ditimbulkan pada bagian sinovial sendi, sarung tendo, dan bursa akan menebal akibat peradangan yang diikuti oleh destruksi tulang disekitar sendi⁽³⁾.

Banyak ahli berpendapat bahwa mekanisme penyakit AR berhubungan dengan sistem imun yang ditandai dengan ekspresi dua sitokin *Interleukin 1 β* (IL-1 β) dan *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α)⁽⁴⁾. Ekspresi sel yang memproduksi IL-1 β paling tinggi pada fase aktif. Meningkatnya jumlah sitokin ini sesuai dengan tingkat keparahan dari penderita penyakit AR^(5,6). Peningkatan kadar TNF- α telah diamati dalam cairan sinovial dan sinovium pasien AR, peningkatan tersebut menyebabkan peradangan lokal dan pembentukan pannus sehingga terjadi erosi pada tulang⁽⁷⁾. Oleh karena itu pengukuran kadar kedua sitokin ini dapat dijadikan sebagai parameter keparahan AR. Semakin banyak jumlah kadar IL-1 β dan TNF- α yang ditemukan pada jaringan sekitar sendi, maka penyakit AR yang diderita juga semakin parah⁽⁶⁾.

Prevalansi AR di Indonesia pada tahun 2009 adalah 23,6%- 31,3%, melihat angka tersebut membuat penatalaksanaan AR harus agresif dan sedini mungkin. Penderita AR memulai pengobatannya dengan DMARDs (*Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs*) seperti metotreksat, sulfasalazine dan leflunomid. Setiap DMARDs memiliki toksisitas masing-masing sehingga diperlukan persiapan dan monitor terapi dengan cermat. Pemberian kortikosteroid oral dengan dosis rendah juga bagian dari pengobatan AR namun perlu diperhatikan efek samping yang ditimbulkannya seperti hipertensi, hiperglikemi dan retensi cairan, sedangkan penggunaan OAINS (Obat Anti-Inflamasi Non-Steroid) memiliki efek samping pengikisan lambung pada penggunaan jangka panjang. Selain itu OAINS tidak

mempengaruhi perjalanan penyakit ataupun mencegah kerusakan sendi. OAINS hanya mampu menghilangkan gejala nyeri pada penderita AR⁽⁸⁾. Oleh sebab itu perlu alternatif pengobatan yang dapat dijadikan salah satu pilihan dalam penanganan AR.

Gamavuton-0 (GVT-0) merupakan senyawa analog kurkumin yang telah banyak dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi termasuk pada penanganan AR. Pasca pemberian GVT-0 dalam sediaan suspensi pada hewan uji terjadi penurunan nilai IL-1 β , TNF- α dan indeks rematik serta kerusakan tulang rawan juga menurun secara signifikan sedangkan pada uji toksisitas menunjukkan bahwa senyawa ini aman⁽⁹⁾. Namun GVT-0 memiliki kekurangan yaitu kelarutannya yang sangat kecil didalam air. Sifat ini menjadi kendala dalam pengembangan GVT-0 menjadi obat yang dapat digunakan secara peroral. Kelarutan dalam air yang rendah tersebut berdampak pada penghambatan proses absorpsi yang menyebabkan jumlah obat yang masuk dalam sirkulasi sistemik semakin sedikit sehingga efek farmakologinya lemah.

SNEDDS (*Self-Nano Emulsifying Drug Delivery Systems*) merupakan salah satu sistem nanopartikel yang mampu memperbaiki kelarutan suatu senyawa sehingga meningkatkan penetrasi obat untuk mencapai target aksi. Peningkatan proses absorpsi GVT-0 dalam formula SNEDDS diharapkan mampu meningkatkan ketersediaan hayati obat sehingga lebih efektif sebagai anti AR serta menguntungkan secara komersial.

1.2 Perumusan Masalah

- 1.2.1 Bagaimana pengaruh SNEDDS GVT-0 sebagai anti artritis rematoid dengan parameter penurunan kadar sitokin IL-1 β dan TNF- α pada jaringan sendi tikus *Wistar* jantan?
- 1.2.2 Bagaimana perbedaan antara SNEDDS GVT-0 dan suspensi GVT-0 terhadap respon penurunan kadar sitokin IL-1 β dan TNF- α pada jaringan sendi tikus *Wistar* jantan?

1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Mengetahui pengaruh SNEDDS GVT-0 sebagai anti artritis rematoid dengan parameter penurunan kadar sitokin IL-1 β dan TNF- α pada jaringan sendi tikus *Wistar* jantan?
- 1.3.2 Mengetahui perbedaan antara SNEDDS GVT-0 dan suspensi GVT-0 terhadap respon penurunan kadar sitokin IL-1 β dan TNF- α pada jaringan sendi tikus *Wistar* jantan.

1.4 Manfaat Penelitian

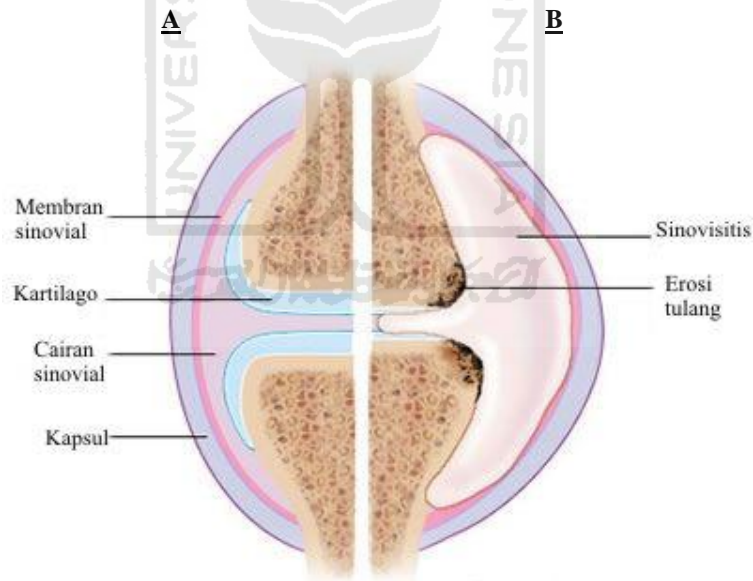
- 1.4.1 Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai informasi, saran, dan pertimbangan bagi para peneliti lainnya khususnya bidang industri farmasi untuk dilakukan pengujian lebih lanjut.
- 1.4.2 Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai informasi bagi tenaga kesehatan lainnya terkait khasiat GVT-0 dalam bentuk SNEDDS sebagai anti artritis rematoid.

BAB II STUDI PUSTAKA

2.1 Tinjauan Pustaka

2.1.1 Arthritis Rematoid

Arthritis rematoid (AR) adalah penyakit autoimun yang menyebabkan peradangan kronis pada sendi. Penyakit autoimun merupakan penyakit yang terjadi ketika jaringan-jaringan tubuh diserang oleh sistem imunnya sendiri yang keliru⁽¹⁰⁾. Patofisiologi AR akibat reaksi autoimun dalam jaringan sinovial yang melibatkan proses fagositosis, proses tersebut menghasilkan enzim yang mampu memecah kolagen sehingga terjadi edema. Gerak sendi akan terganggu akibat dari proliferasi membran sinovial dan akhirnya membentuk pannus yang mampu menghancurkan tulang rawan dan menimbulkan erosi tulang⁽¹¹⁾.



Gambar 2.1 Perbedaan jaringan tulang normal (A) dan tulang arthritis rematoid (B)

Proses inflamasi yang disebabkan oleh senyawa belum diketahui secara pasti, namun terdapat beberapa senyawa spesifik yang berperan terhadap respon kekebalan tubuh dipercaya memiliki peran dalam perkembangan AR. Diantaranya:

1. Sel T, yang dapat berupa CD4 + (T-helper) maupun CD8 + (sitotoksik). Ada 2 sub tipe sel T-helper yaitu TH1 yang berfungsi mempromosikan peradangan dengan memproduksi interferon- γ , *tumor necrosis factor* (TNF), dan interleukin-2 (IL-2). Selain TH1, terdapat pula TH2 yang berfungsi menghasilkan sitokin anti inflamasi IL-4, IL-5 dan IL-10. CD8 + (Sitotoksik) Merupakan pembunuh sel yang memiliki efek regulasi pada proses kekebalan tubuh dengan menekan aktivitas CD4 + sel melalui pelepasan sitokin antiinflamasi dan mempromosikan apoptosis (kematian sel). Sel T yang diaktifkan memproduksi sitotoksin yang beracun bagi jaringan dan sitokin, sehingga merangsang proses inflamasi dan menarik sel ke daerah yang mengalami inflamasi. Makrofag terstimulus untuk melepaskan prostaglandin dan sitotoksin ke jaringan.
2. Sel B, Merupakan respon imunologi spesifik humoral. Sel B dapat berupa IgG, IgA, IgM, IgE, dan IgD. Sel B yang aktif menghasilkan sel plasma dalam bentuk antibodi. Antibodi ini mengakibatkan akumulasi leukosit polimorfonuklear (PMN), yang berfungsi melepaskan sitotoksin dan radikal bebas. Hal ini menginisiasi kerusakan pada jaringan sinovial dan tulang. Sel B juga memproduksi sitokin yang dapat mengubah fungsi sel-sel kekebalan tubuh lainnya untuk bekerja sebagai antigen yang berinteraksi dengan sel T untuk mengaktifkan sistem kekebalan tubuh⁽¹²⁾.

Sel CD4+ didalam membran sinovial yang berlimpah akan berkomunikasi dengan makrofag, osteoklas, fibroblas dan kondrosit baik melalui interaksi langsung menggunakan reseptor pada permukaan sel atau melalui sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL- 1, dan IL-6. Sel-sel ini menghasilkan metaloproteinase dan zat sitotoksik lain yang dapat menyebabkan erosi pada tulang dan kartilago.

Hasil akhir dari inflamasi kronis adalah hilangnya kartilago yang dapat mengakibatkan hilangnya ruang sendi. Pembentukan granulasi kronis atau jaringan parut dapat menyebabkan hilangnya gerak sendi (ankilosis). Lemahnya struktur

tendon dapat muncul akibat hilangnya kemampuan menopang tulang pada sendi sehingga menyebabkan deformitas kronis⁽¹²⁾.

Tujuan terapi pengobatan AR bukan hanya mengontrol gejala penyakit, tetapi juga penekanan aktivitas penyakit untuk mencegah kerusakan permanen⁽¹³⁾. Pemberian terapi AR dilakukan untuk mengurangi nyeri sendi dan bengkak, serta meringankan kekakuan dan mencegah kerusakan sendi sehingga mampu meningkatkan kualitas hidup pasien dan juga memperlambat kemajuan penyakit⁽⁸⁾. Golongan-golongan obat yang sering digunakan untuk terapi AR diantaranya ialah Obat Anti Inflamasi Non-Steroid (OAINS), *Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs* (DMARDs), Kortikosteroid dan obat-obat *biological agent*⁽¹³⁾.

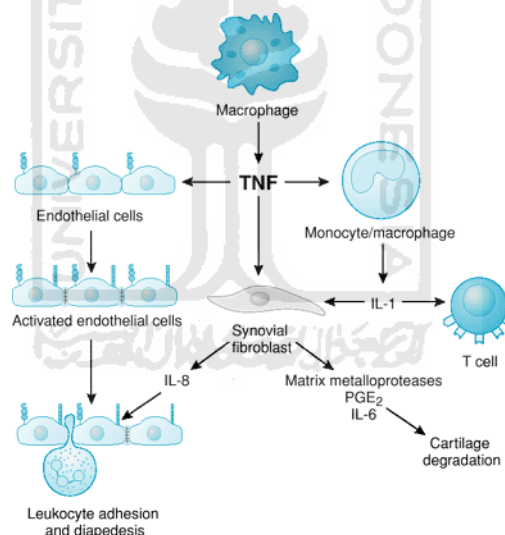
2.1.2 Complete freund's adjuvant (CFA)

Complete freund's adjuvant (CFA) adalah salah satu yang paling umum digunakan adjuvant dalam penelitian yang berupa emulsi air dalam minyak yang terdiri dari komponen dinding sel *mycobacteria* (*Mycobacterium tuberculosis* atau *Mycobacterium butyricum*) atau bakteri yang telah terinaktivasi⁽¹⁴⁾. Karena CFA mengandung bakteri maka dapat berikatan dengan makrofag. Makrofag yang telah mengikat antigen berinteraksi dengan sel T yang ada di sekitarnya. sel T memiliki reseptor yang cocok dengan antigen bakteri. Makrofag dan sel T akan berikatan dengan bantuan LFA- 1/ICAM-1 dan kostimulator B7. Ikatan antara Makrofag dan sel T akan teraktivasi untuk memproduksi sitokin seperti IL-1 dan TNF- α , lalu bermigrasi menuju ke tempat inflamasi⁽¹⁴⁾.

Induksi CFA menyebabkan respons inflamasi berupa pembengkakan, nyeri parah, ulserasi, polyarthritis bahkan pada pemakaian jangka panjang bisa memicu pembentukan tumor⁽¹⁴⁾. Untuk mengurangi inflamasi dan nekrosis jika digunakan konsentrasi lebih tinggi maka volume maksimum CFA yang direkomendasikan untuk injeksi pada tikus sebesar 0,1 ml dan 0,05-0,1 ml pada mencit. CFA harus dihomogenkan terlebih dahulu agar emulsi tercampur baik dan bakteri terdistribusi merata⁽¹⁵⁾.

2.1.3 Tumor Necrosis Factor- Alpha (TNF- α)

TNF- α merupakan sitokin proinflammatory *cascade* yang memodulasi respon imun dengan berefek kuat pada banyak aspek seluler dan humoral. Peningkatan kadar TNF- α telah diamati dalam cairan synovial dan sinovium pasien penderita AR⁽⁷⁾. TNF- α diproduksi terutama oleh makrofag dan monosit, tetapi sel-B dan sel-T juga dapat memproduksi TNF- α . Sel-sel tersebutlah yang menyebabkan inflamasi pada AR. TNF- α mampu menjadi stimulator dalam menginduksi sitokin lainnya seperti interleukin-1, interleukin-6, interleukin-8 dan *granulosit monocyte-colony stimulating factor* (GM-CSF). TNF- α juga dikenal mampu merangsang fibroblast untuk mengekspresikan molekul adesi sehingga sel-sel inflamasi dapat bermigrasi ke daerah sendi⁽¹⁶⁾. Peningkatan kadar TNF- α telah diamati dalam cairan synovial dan sinovium pada pasien penderita AR, semakin tinggi kadar yang ditemukan menunjukkan keparahan AR yang diderita⁽⁷⁾.



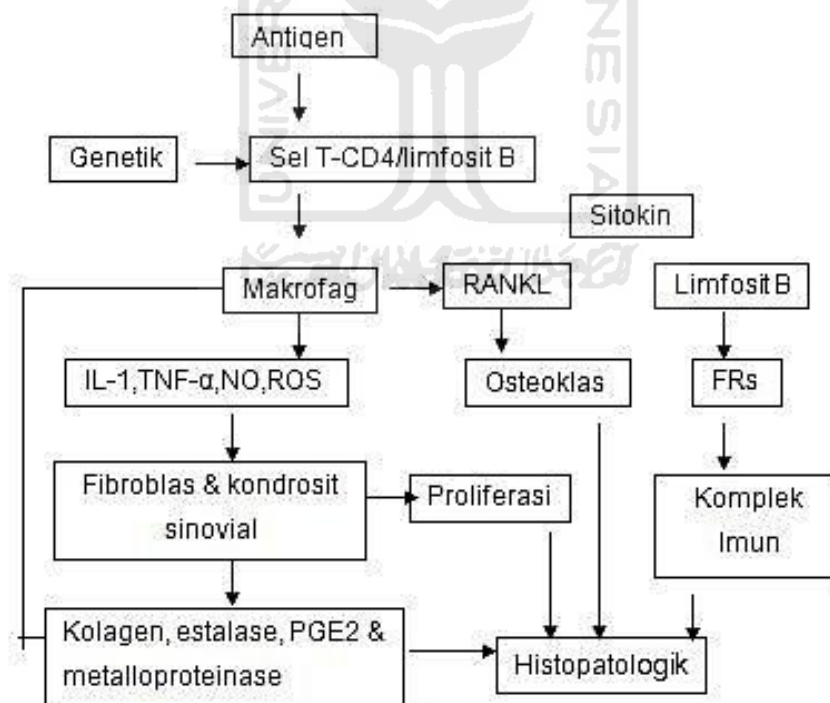
Gambar 2.2 Mekanisme TNF- α ⁽³⁶⁾

Dalam mekanismenya TNF- α mengaktifkan sel endotel, monosit dan sinovial fibroblast. Aktifnya sel endotelial menghasilkan molekul adesi yang membuat sel-sel leukosit direkrut menuju persendian sedangkan aktivasi monosit berefek pada aktifnya sinovial fibroblast yang juga mensekresikan interleukin dan membuat inflamasi tambahan. Seiring dengan itu, sinovium mengalami *hipertrofi* atau kematian

sel secara berlebihan yang mampu membentuk pannus dan mengarah pada penghancuran tulang rawan didaerah persendian. Oleh karena itu, mekanisme tersebut diyakinkan menjadi penyebab dirasakan nya nyeri pada penderita AR dan dapat dijadikan sebagai parameter untuk mengetahui sejauh mana penyakit autoimun ini dapat berkembang⁽³⁶⁾.

2.1.4 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Perkembangan AR juga dapat dikaitkan dengan peningkatan kadar IL-1 yang diprduksi oleh makrofag maupun sel dendritik. IL-1 yang banyak ditemukan disirkulasi darah ialah IL-1 β . Ketidakseimbangan produksi makrofag oleh antigen spesifik membuat efek biologis yang ditimbulkan IL-1 β mirip dengan TNF- α tergantung pada jumlah sitokin yang diproduksi. Ketika IL-1 β disekresikan dalam jumlah yang rendah maka IL-1 β berfungsi sebagai mediator inflamasi lokal serta memediasi adesi leukosit pada jaringan.



Gambar 2.3 Patogenesis AR dari ekspresi sitokin IL-1 dan TNF- α ⁽⁴⁾

Stimulasi oleh antigen menyebabkan sel-T, CD4/ limfosit B menginduksi makrofag untuk menghasilkan IL-1. IL-1 berperan mengaktifkan fibroblast sinovial dan kondrosit sehingga proliferasi sel tersebut terjadi, sehingga meningkatkan produksi enzim *metalloproteinase* (MMP). MMP ialah suatu enzim yang mampu merusak jaringan sehingga menyebabkan kerusakan kartilago maupun menghambat perbaikan kartilago melalui penghambatan sintesis matriks protein. Osteoklas atau resorpsi tulang terjadi akibat peran IL-1 β sebagai osteoklastogenik yang meningkatkan produksi *receptor-activator of nuclear factor kappa B ligand* (RANKL). Meningkatnya RANKL membuat proliferasi osteoklas bertambah sehingga kejadian AR semakin parah⁽⁴⁾.

Ketika IL-1 disekresikan dengan jumlah yang banyak maka IL-1 akan masuk kedalam sirkulasi darah (khususnya IL-1 β yang paling banyak ditemui). Jumlah IL-1 β diketahui meningkat dalam jaringan sendi, semakin tinggi jumlah IL-1 β tersebut maka semakin tinggi tingkat kejadian AR yang membuat sitokin ini dapat dijadikan parameter terjadinya AR⁽³⁵⁾.

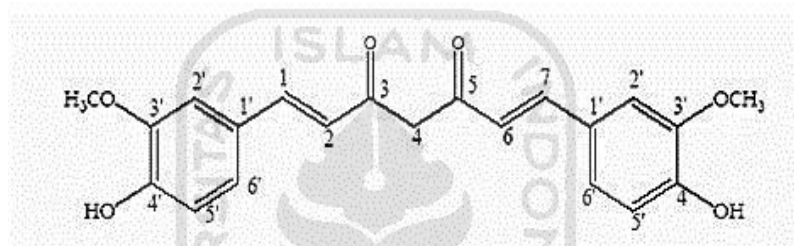
2.1.5 Metotreksat

Metotreksat termasuk obat golongan DMARD yang merupakan sitostatika golongan antagonis asam folat, bersifat sebagai immunosupresif. Mekanisme kerja metotreksat dengan menghambat proliferasi sel T⁽¹⁷⁾. Biasanya digunakan untuk terapi AR yang progresif dan tidak memberikan respon terhadap terapi DMARD standar lainnya. Dosis efektif metotreksat sangat bervariasi, yakni dosis awal peroral 2,5 mg perminggu, kemudian bisa dinaikkan secara bertahap hingga 15 mg sampai 20 mg perminggu⁽¹⁸⁾. Pada artritis rematoid, interleukin-1 (IL-1) dan TNF- α dihasilkan oleh makrofag pada jaringan sinovial dan memegang peranan penting dalam perkembangan patologi penyakit ini. Metotreksat dilaporkan dapat menghambat produksi IL-1 dan menyebabkan akumulasi adenosin, dan diketahui bahwa adenosin dapat berperan menghambat produksi TNF- α . Metotreksat juga meningkatkan produksi interleukin-4 (IL-4) dan interleukin-10 (IL-10) yaitu kelompok sitokin yang

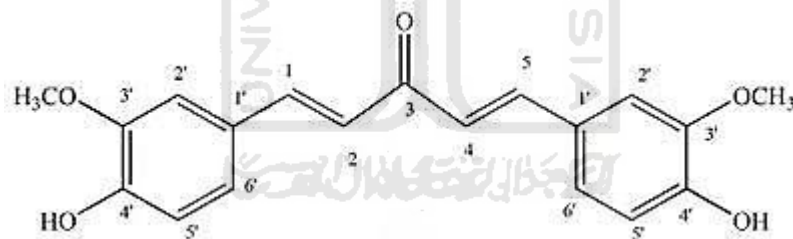
berperan dalam menghambat respon inflamasi. Metotreksat juga dilaporkan secara tidak langsung mampu menghambat enzim siklooksigenase dan lipooksigenase⁽¹⁹⁾.

2.1.6 Gamavuton-0

Gamavuton atau GVT-0 memiliki nama kimia 1,5-bis (4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,4-pentadien-3-on. GVT-0 merupakan senyawa analog kurkumin karena memiliki kesamaan dalam kepemilikan gugus hidroksi dan metoksi sebagai substituen rantai aromatik. Perbedaan GVT-0 dari kurkumin adalah kerangka 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-on yang dimiliki GVT-0 sementara pada kurkumin kerangkanya adalah 1,7-difenil-1,6-heptadien-3,5-dion⁽²⁰⁾.



Gambar 2.4 Struktur Kurkumin⁽²²⁾



Gambar 2.5 Struktur Gamavuton-0⁽²²⁾

Struktur dasar Gamavuton-0 berupa diena simetris pada bagian tengah yang menghubungkan dua cincin aromatik. Sintesis senyawa GVT-0 dapat diperoleh dengan mereaksikan vanillin dan aseton dengan katalis asam. Mekanisme reaksi terjadi melalui reaksi kondensasi *Claisen-Schmidt*. Modifikasi bagian tengah kurkumin menghasilkan 1,4-pentadien-3-on (GVT-0) masih tetap mempertahankan bagian hidroksi pada cincin aromatik yang bertanggung jawab untuk aktivitas biologisnya⁽²¹⁾.

Kelarutan GVT-0 yaitu praktis tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik seperti aseton, dimetil sulfoksida, etanol, etil asetat hal ini sama dengan kurkumin. Kurkumin yang awalnya berwarna kuning pada larutan dengan pH asam akan berubah menjadi kemerahan atau merah tua dalam larutan basa. Degradasi ini dipicu oleh adanya gugus metilen pada kurkumin dan juga dipengaruhi oleh cahaya. Namun GVT-0 sudah tidak memiliki gugus metilen lagi sehingga diharapkan memiliki kestabilan yang lebih tinggi terhadap cahaya dan pH daripada kurkumin.

Menurut penelitian Ikawati pada tahun 2008 tentang uji toksisitas akut dan subakut GVT-0, tidak terdapat efek toksik GVT-0 dalam jangka waktu pemaparan selama 24 jam hingga dosis 270 mg/ kg BB. Hasil yang sama juga diperoleh untuk pemakaian selama 30 hari dengan tinjauan parameter hematologi, kimia darah dan urin, dan pemeriksaan makroskopik organ⁽²³⁾.

2.1.7 Self- Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS)

Salah satu metode formulasi nanoemulsi yang berupa campuran isotropik minyak, surfaktan dan ko-surfaktan yang secara cepat dan mudah membentuk nanoemulsi pada pencampuran dengan air disebut SNEDDS⁽²⁴⁾. Proses *self-nano-emulsifying* terjadi secara spontan karena tidak memerlukan tambahan perlakuan atau energi dari luar. Nanoemulsi yang terbentuk memiliki ukuran tetesan kurang dari 200 nm. Ukuran nanoemulsi yang sangat kecil memungkinkan obat dapat melewati membran sepanjang saluran *gastrointestinal* dengan cepat dan meminimalisir iritasi akibat adanya kontak antara kristal obat dengan dinding saluran *gastrointestinal*⁽²⁵⁾. Selain itu, dengan diformulasikan dalam bentuk SNEDDS, tidak ada kontak langsung antara obat atau zat aktif dengan dinding lambung sehingga iritasi dapat dikurangi⁽²⁶⁾. SNEDDS memiliki komponen utama berupa minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan. Minyak sebagai fase pembawa obat, surfaktan sebagai pengemulsi minyak ke dalam air, dan ko-surfaktan untuk membantu tugas surfaktan sebagai pengemulsi.

Surfaktan nonionik lebih sering digunakan mengingat sifatnya yang kurang terpengaruh oleh pH, aman, dan biokompatibel sehingga penggunaan surfaktan nonionik lebih sering daripada ionik dan umumnya surfaktan nonionik diizinkan

untuk penggunaan melalui rute oral⁽²⁴⁾. Kemampuan SNEDDS terdispersi secara cepat dalam kondisi pengadukan ringan lebih disebabkan oleh kemampuan emulsifikasi surfaktan⁽²⁴⁾. Struktur rantai alkil surfaktan memiliki efek dalam penetrasi minyak ke lapisan surfaktan yang memungkinkan pembentukan nanoemulsi seperti yang dimiliki oleh tween, suatu turunan polioksi sorbitol dan asam oleat⁽²⁷⁾.

Ko-surfaktan berupa senyawa ampifilik yang memiliki afinitas terhadap fase air dan minyak. Ko-surfaktan yang dipilih umumnya berupa alkohol rantai pendek karena mampu mengurangi tegangan antarmuka dan meningkatkan fluiditas antarmuka. Alkohol juga mampu meningkatkan pencampuran air dan minyak karena kemampuan partisipasinya di antara dua fase tersebut⁽²⁸⁾.

Dalam formulasi SNEDDS beberapa hal yang harus dipertimbangkan diantaranya kelarutan obat diberbagai minyak, surfaktan dan ko-surfaktan. Pemilihan minyak, surfaktan dan ko-surfaktan berdasarkan kelarutan obat serta pembuatan diagram fase.

2.1.8 Enzym-Linked Immunosorbant Assay (ELISA)

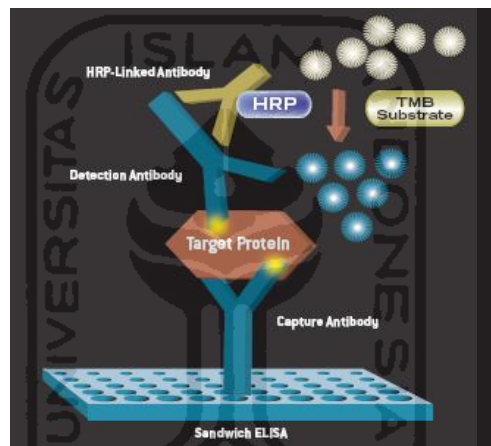
Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) merupakan suatu teknik biokimia yang digunakan terutama dalam bidang imunologi untuk mendeteksi adanya antibodi atau antigen dalam sampel. Prinsip dasar *ELISA* adalah bahwa suatu antibodi dapat mengenali satu epitop tertentu secara spesifik. Ikatan kovalen kompleks antigen-antibodi tersebut kemudian divisualisasikan dengan cara penambahan antibodi kedua yang dikonjugasikan dengan enzim ataupun senyawa *fluoresens*, kemudian kompleks tadi dipaparkan pada substrat tertentu sehingga akan terbentuk warna yang dapat diukur menggunakan kolorimetri maupun spektrofotometri⁽²⁹⁾. Metode *ELISA* terbagi menjadi 2 teknik, yaitu:

1. Teknik Kualitatif adalah Berdasarkan bahwa tiap antibodi berikatan pada antigen yang spesifik.
2. Teknik Kuantitatif adalah berdasarkan jumlah ikatan antigen-antibodi yang ditentukan dengan nilai absorbansi. Teknik ini menggabungkan spesifitas

antibodi dengan kepekaan uji enzimatik dengan spektrofotometer biasa atau antigen dilekatkan pada enzim yang mudah tertera.

Sedangkan beberapa tipe *ELISA* ialah sebagai berikut:

1. *Direct ELISA*, biasanya digunakan dengan kompetisi dan *inhibisi ELISA*. Dapat digunakan untuk deteksi antigen.
2. *Indirect ELISA*, terdapat antigen terikat pada *plate*. Dapat digunakan untuk deteksi antibodi.
3. *Sandwich ELISA*, terdapat antibodi terikat pada *plate*. Dapat digunakan untuk deteksi antigen.



Gambar 2.6 *Plate Sandwich ELISA* yang berisi antibodi⁽³⁰⁾.

Sandwich ELISA merupakan jenis *ELISA* yang dapat digunakan untuk mengukur antigen maupun antibodi,. Karakteristik khas dari *sandwich ELISA* adalah menggunakan antibodi penangkap atau primer antibodi. Antigen (IL-1 β dan TNF- α) yang akan dideteksi dan diukur konsentrasinya berikatan terlebih dahulu dengan antibodi penangkap. Antigen akan berikatan kembali dengan antibodi sesuai jenis *sandwich ELISA* yang digunakan. *Sandwich ELISA* dibagi menjadi dua jenis yaitu *sandwich direct ELISA* dan *sandwich indirect ELISA*⁽³⁰⁾.

Sandwich direct ELISA menggunakan dua antibodi yaitu antibodi penangkap dan antibodi yang dilabeli enzim. Antigen yang telah berikatan dengan antibodi penangkap akan berikatan kembali dengan antibodi yang dilabeli

enzim. Sedangkan *Sandwich indirect ELISA* menggunakan tiga antibodi yaitu antibodi penangkap, antibodi detektor, dan anti-antibodi yang dilabeli enzim. Antigen yang telah berikatan dengan antibodi penangkap akan berikatan dengan antibodi detektor dan anti-antibodi yang dilabeli enzim⁽³⁰⁾. Antigen dalam *sandwich ELISA* tidak perlu dimurnikan sebelum digunakan. *Sandwich ELISA* sangat spesifik sehingga tidak semua antibodi dapat digunakan.

2.2. Landasan Teori

Arthritis reumatoid merupakan penyakit peradangan pada daerah persendian yang terjadi akibat gangguan autoimun yang berarti bahwa sel-sel pada sendi dikenali sebagai antigen sehingga sistem imun tubuh akan menghancurkan sel-sel tersebut. Perkembangan AR berhubungan dengan peningkatan kadar sitokin TNF- α dan IL-1 β yang diproduksi oleh makrofag dan sel dendritik. TNF- α dan IL-1 β memiliki aksi pada banyak tipe sel imun dan sel inflamasi. Kedua sitokin tersebut dapat menyebabkan resorpsi tulang oleh osteoklas, perusakan kartilago oleh kondrosit, dan proliferasi pada fibroblas dan sel sinovial. Peningkatan kadar TNF- α dan IL-1 β ditemukan pada cairan sendi inflamasi dan dapat menyebabkan fibrosis serta perusakan dari sendi arthritis. Adanya peningkatan kadar IL-1 β dan TNF- α pada jaringan sendi AR dapat digunakan sebagai parameter untuk menentukan keparahan pada penyakit ini.

Terapi AR meliputi pengobatan farmakologis dan mekanis. Obat-obatan yang selama ini digunakan untuk AR meliputi OAINS, kortikosteroid, DMARD dan *biological agent*. DMARD bekerja dengan memperlambat proses destruksi dan erosi kartilago, namun tidak analgetis seperti OAINS, sedangkan OAINS sendiri memiliki efek samping pada pengikisan lambung yang cukup tinggi bila digunakan jangka panjang. Sedangkan kortikosteroid dan *biological agent* sudah jarang digunakan dalam pengobatan AR, selain biaya pengobatan yang cukup mahal serta efek sampingnya yang juga terlalu berisiko.

Berdasarkan penelitian Sardjiman (2000), GVT-0 mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi (yang diinduksi karagenin) dengan ED50 sebesar 36,6 mg/kg

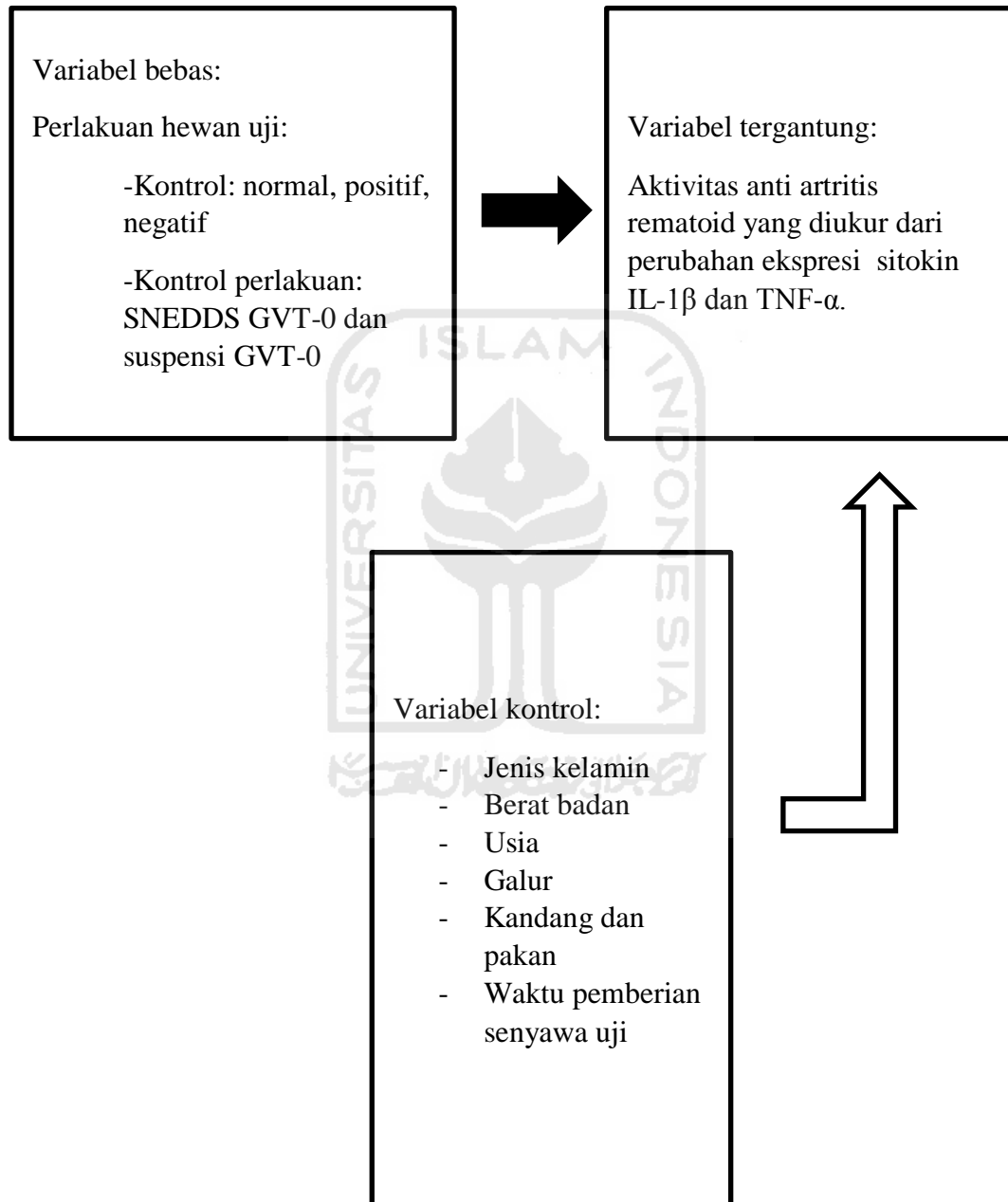
BB. Yuniarti (2006) melaporkan bahwa GVT-0 dalam sediaan suspensi mempunyai daya antiinflamasi pada model tikus yang diinduksi CFA dengan ED50 sebesar 74,62 mg/kg BB. Penelitian Mayasari (2008) melaporkan bahwa GVT-0 memiliki selektivitas penghambatan yang lebih poten terhadap COX-2 dibanding COX-1. Dalam penekanan kadar sitokin IL-1 β suspensi GVT-0 optimal pada dosis 40 mg/Kg BB. Sedangkan penekanan kadar TNF- α suspensi GVT-0 optimal diberikan dengan dosis 80 mg/Kg BB.

Hal tersebut mendasari pemikiran bahwa SNEDDS GVT-0 juga memiliki aktivitas menurunkan indeks artritis yang menggambarkan tingkat keparahan artritis. Selain itu, apabila GVT-0 diformulasi dalam sediaan SNEDDS akan lebih poten dibanding suspensi GVT-0 dalam meningkatkan respon penurunan kadar sitokin IL-1 β dan TNF- α pada jaringan sendi tikus *Wistar* jantan terinduksi CFA. Hasil penelitian ini diharapkan menjadi informasi dalam penggunaan dan pengembangan SNEDDS GVT-0 sebagai alternatif terapi artritis rematoid.

2.3. Hipotesis

- 2.3.1. SNEDDS GVT-0 berpotensi sebagai anti artritis rematoid dengan penurunan kadar sitokin IL-1 β dan TNF- α .
- 2.3.2. SNEDDS GVT-0 lebih baik dalam menurunkan kadar sitokin IL-1 β dan TNF- α dibandingkan dengan suspensi GVT-0.

2.4.Kerangka Konsep



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Alat dan bahan

3.1.1. Alat

Timbangan elektrik, gelas beker, erlenmeyer, pengaduk, labu takar, pipet tetes, tabung reaksi, vorteks, pipet volum, *particle size analyzer* (PSA), Sentrifugator, *waterbath*, Sonikator, *Stirer*, effendorf, oven, *incubator*, lemari pendingin, *ELISA reader*, *yellow tip* (Kan Jian), *blue tip* (LPI), pH meter.

3.1.2. Bahan

a. Preparasi bahan uji

Gamavuton-0 yang diperoleh dari hasil sintesis CCRC (*Curcumin Research Centre*) Fakultas Farmasi UGM, etanol 96% (General), metotreksat, aquades, *aqua pro injection*, minyak myritol, Tween 20, Cremophor RH, Propilenglikol, *Complete Freund's Adjuvant* (CFA), Na-CMC, NaCl 0,9%.

b. Reagen *ELISA* kit rat IL-1 β and TNF- α .

Standard solution, *coated ELISA olate*, *standard dilution*, *streptavidin-HRP*, *stop solution*, *chromogen solution A*, *chromogen solution B*, *washing concentrate*, anti IL-1 β dan anti TNF- α .

3.1.3 Subyek Uji

1) Kriteria inklusi

Tikus jantan galur *Wistar*, sehat, usia 2 bulan, berat badan berikisar 110-210 gram.

2) Kriteria eksklusi

Yang termasuk dalam kriteria inklusi namun terlihat sakit atau mati selama penelitian berlangsung.

a. Pemeliharaan hewan uji

Aklimatisasi hewan uji selama 10 hari dilakukan sebelum pembagian kelompok pada tikus. Hal ini bertujuan untuk mengadaptasikan tikus dengan lingkungan yang baru. Disimpan pada suhu kamar ($20-24^{\circ}$ C) dengan siklus gelap terang 12 jam, kelembapan 40-70%, diberi makan dan minum dengan jumlah yang seragam dan rutin dilakukan pengamatan berat badan serta keadaan umumnya. Tikus dinyatakan sehat memiliki ciri-ciri bulu bersih, mata sehat dan berat badan tidak berkurang. Tikus yang sehat tersebut dikelompokkan secara acak dengan jumlah 5 ekor tiap kelompoknya. Sedangkan tikus yang sakit tidak dikutsertakan dalam pengujian ini.

b. Perlakuan pasca penelitian

Setelah penelitian berakhir, sisa tikus dimatikan dengan cara mendislokasi pada bagian lehernya.

3.2. Cara Penelitian

3.2.1 Pengajuan *Ethical Clearance*

Ethical clearance (Kelayakan Etik) merupakan surat keterangan tertulis yang dikeluarkan oleh Komite Etik Penelitian. Berisi tentang pernyataan bahwa penelitian yang dirancang layak untuk dilakukan pada makhluk hidup (hewan, manusia, tumbuhan). Kelayakan etik pada pengujian ini diajukan kepada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

3.2.2 Persiapan hewan uji

Tikus jantan galur *Wistar* usia 2 bulan dengan berat badan sekitar 110-210 gram. Diaklimatisasi terlebih dahulu selama 10 hari. Sepanjang percobaan tikus-tikus tersebut telah diperlakukan sesuai dengan kelayakan etik yang diperoleh oleh komisi etik FK UII.

3.2.3 Penyiapan bahan dan pembuatan sediaan uji

- a) Pembuatan larutan Na-CMC 0,5%; sejumlah 500 gram Na-CMC ditimbang kemudian dilarutkan didalam 100 ml aquades yang telah dipanaskan. Proses ini dilanjutkan dengan ultrasonifikasi agar Na-CMC terlarut sempurna.

- b) Pembuatan suspensi metotreksat 2,5 mg didalam 140 Na-CMC 0,5%
Sejumlah 2,5 mg metotreksat digerus lalu dilarutkan didalam 140 ml Na-CMC 0,5%. Proses ini dilanjutkan dengan ultrasonifikasi agar metotreksat terlarut sempurna.
- c) Pembuatan suspensi GVT-0 dosis 40 mg/kg BB
Sebanyak 320 mg GVT-0 ditimbang lalu dilarutkan didalam 100 ml larutan Na-CMC 0,5%. Proses ini dilanjutkan dengan ultrasonifikasi agar GVT-0 terlarut sempurna.
- d) Pembuatan SNEDDS GVT-0 dosis 40 mg/kg BB
Formulasi SNEDDS GVT-0 berdasarkan penelitian sebelumnya dengan beberapa pembawanya seperti minyak myritol, ko-surfaktan propilenglikol dan kombinasi surfaktan Tween 20:Cremophor RH (3:1)⁽³³⁾. Untuk SNEDDS GVT-0 dosis 40 mg/kg BB dilakukan penimbangan GVT-0 sebanyak 533,4 mg dilarutkan didalam 12 ml pembawa. Proses pencampuran beberapa pembawa maupun pembawa dengan zat aktifnya dilakukan ultrasonifikasi.

3.2.4 Perlakuan hewan uji

Penelitian ini akan menggunakan 25 ekor tikus jantan galur *Wistar* berat 110-210 gram dan dibagi menjadi 5 kelompok hewan uji. Kelompok tersebut dibagi secara acak yaitu kelompok normal, kontrol negatif, kontrol positif, kelompok perlakuan I dan kelompok perlakuan II. Bagian ekor pada setiap tikus yang terinduksi diberi tanda. Secara umum, hewan uji dibagi menjadi beberapa kelompok sebagai berikut:

a. Kelompok normal

Kelompok tikus tidak diberi perlakuan apapun hingga hari ke-30. Kemudian tikus dikorbankan, sendi lutut dan jari kaki sebelah kanan dipotong dan dilumatkan. Lisat jaringan yang terbentuk dilakukan pembacaan IL-1 β dan anti TNF- α dengan metode *ELISA*.

b. Kelompok kontrol negatif

Kelompok tikus diinduksi CFA sebanyak 0,1 ml secara subplantar pada hari ke-0. Lisat jaringan dari sendi lutut dan jari kaki tikus diamati

ekspresi kadar IL-1 β dan anti TNF- α menggunakan metode *ELISA* pada hari ke-31.

c. Kelompok kontrol positif

Kelompok tikus diinduksi CFA sebanyak 0,1 ml secara suplantar pada hari ke-0. Perlakuan diawali dengan pemberian metotreksat dosis 0,223 mg/kg BB tikus sehari sekali secara oral dimulai pada hari ke-15 selama 14 hari. Lisat jaringan dari sendi lutut dan jari kaki tikus diamati ekspresi kadar IL-1 β dan anti TNF- α menggunakan metode *ELISA* pada hari ke-31.

d. Kelompok perlakuan I (suspensi GVT-0)

Kelompok tikus diinduksi CFA sebanyak 0,1 ml secara suplantar pada hari ke-0. Perlakuan diawali dengan pemberian suspensi GVT-0 dosis 40 mg/kg BB tikus sehari sekali secara oral dimulai pada hari ke-15 selama 14 hari. Lisat jaringan dari sendi lutut dan jari kaki tikus diamati ekspresi kadar IL-1 β dan anti TNF- α menggunakan metode *ELISA* pada hari ke-31.

e. Kelompok perlakuan II (SNEDDS GVT-0)

Kelompok tikus diinduksi CFA sebanyak 0,1 ml secara subplantar pada hari ke-0. Perlakuan diawali dengan pemberian SNEDDS GVT-0 dosis 40 mg/kg BB tikus sehari sekali secara oral dimulai pada hari ke-15 selama 14 hari. Lisat jaringan dari sendi lutut dan jari kaki tikus diamati ekspresi kadar IL-1 β dan TNF- α menggunakan metode *ELISA* pada hari ke-31.

3.2.5 Pengamatan makroskopik dan skoring artritis

Terjadinya edema dan pembengkakan pada kaki tikus akan diskoring menggunakan skala 0,25 – 2,00, dengan skor maksimum 2,00 untuk setiap kaki. Skoring dilakukan oleh dua orang peneliti yang sama mulai hari ke-1 pasca induksi CFA hingga hari ke-15 yang sudah menandakan tikus model AR dan hari ke 30 (setelah diberi perlakuan). Jumlah tikus dalam kelompok yang memiliki skoring artritis ≥ 1 dibagi dengan total jumlah tikus dalam kelompok tersebut dan diperoleh persentase nya. Adapun skoringnya adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1. Indeks keparahan AR⁽³¹⁾

NO	Gejala	Nilai
1.	Kemerahan dan bengkak pada salah satu jari kaki	0,25
2.	Kemerahan dan bengkak pada minimal dua jari kaki	0,50
3.	Bengkak pada telapak kaki	0,75
4.	Kemerahan dan bengkak pada jari jari kaki dan perubahan bentuk pada telapak kaki	1,00
5.	Kemerahan dan bengkak pada jari jari dan telapak kaki	1,25
6.	Kemerahan dan bengkak pada jari jari dan sedikit bengkak pada telapak kaki dan sendi	1,50
7.	Kemerahan dan bengkak pada jari jari dan bengkak sekali pada telapak kaki dan sendi	1,75
8.	Kemerahan dan bengkak pada jari jari, telapak kaki dan sendi	2,00

3.2.6 Penetapan ekspresi kadar IL-1 β dan anti TNF- α menggunakan metode *Sandwich ELISA* langsung

a. Preparasi jaringan

Pada hari ke-31, sendi lutut dan persendian jari kaki sebelah kanan dipotong dan dilumatkan sekaligus dihomogenkan menggunakan alat *homogenizer* dengan penambahan larutan NaCl 0,9%. Lisat jaringan dipisahkan dengan cara sentrifugasi 6000 rpm, selama 15 menit. Lisat tersebut digunakan sebagai sampel pengukuran kadar IL-1 β dan TNF- α menggunakan metode *sandwich ELISA* langsung

b. Penetapan kadar IL-1 β dan TNF- α

Standard solution diencerkan dengan *standard dilution*. Pada sumuran standard dimasukkan 50 μ l *standard solution* yang sudah diencerkan tersebut sesuai dengan jumlah pengencerannya masing-masing. Pada sumuran sampel dimasukkan 40 μ l sampel. Pada sumuran blanko dimasukkan 40 μ l NaCl 0,9% dan salah satunya dibiarkan kosong. Sumuran sampel dan blanko ditambahkan

10 µl antibodi IL-1β dan TNF-α. Seluruh sumuran ditambahkan 50 µl *streptavidin-HRP* ditutup lalu diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 1 jam. Setelah diinkubasi, sumuran dicuci dengan wash buffer 350 µl sebanyak 5x secara berulang. Seluruh sumuran dimasukkan 50 µl *chromogen A* dan 50 µl *chromogen B* lalu ditutup dan diinkubasi pada suhu 37⁰ C, selama 10 menit. Ditambahkan 50 µl *stop solution* (akan berwarna kuning) dan kemudian dibaca pada 450 nm dengan *plate reader* (dalam 10 menit). Data yang diperoleh merupakan data absorbansi yang kemudian dimasukkan dalam kurva baku (standar) yang merupakan hasil pembacaan absorbansi standar melalui metode *ELISA* dan dibuat regresi linier.

c. Perhitungan nilai persentase penurunan kadar IL-1β dan TNF-α

Parameter yang digunakan untuk menetapkan aktivitas obat dalam penekanan kadar IL-1β dan TNF-α dalam jaringan sendi adalah % Penurunan, yang dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Penurunan} = \frac{(kkn - kkp)}{kkn} \times 100\%$$

Keterangan :

Kkn = Rata-rata kadar nilai IL-1β atau TNF-α kontrol negatif

Kkp = Kadar IL-1β atau TNF-α kelompok perlakuan

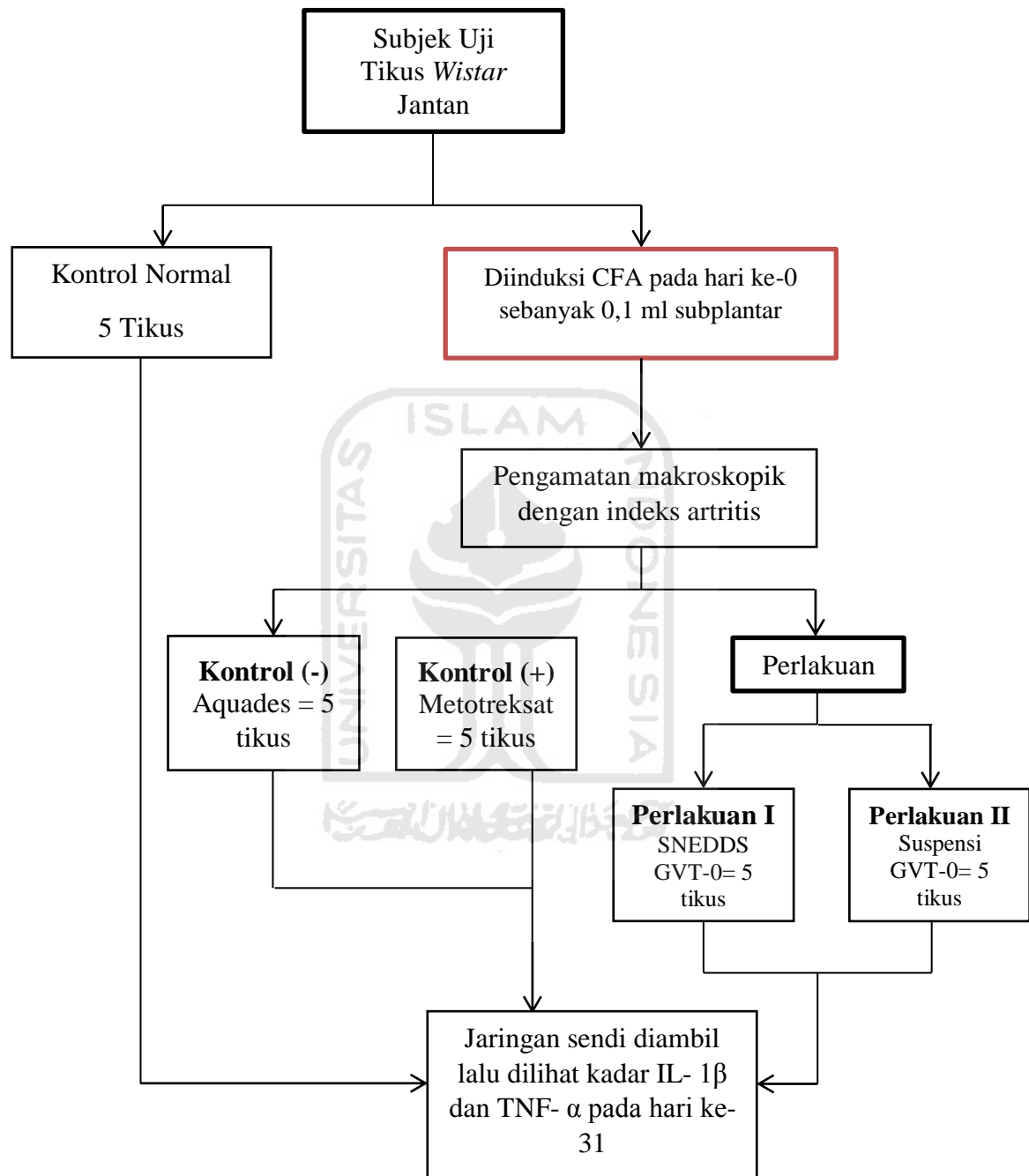
% Penurunan = Penurunan kadar interleukin dan TNF

3.3 Analisis Data

Data yang berupa kadar IL-1 β dan TNF- α dari tiap perlakuan dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan metode *Shapiro Wijk* dan uji homogenitas data. Jika terbukti bahwa data yang diuji terdistribusi normal dan homogen maka selanjutnya data-data tersebut dapat diolah dengan metode statistik parametrik (ANAVA) satu jalan yang dilanjutkan dengan uji *Tukey* dengan taraf kepercayaan 95%. Jika terbukti data kadar IL-1 β dan TNF- α terdistribusi tidak normal dan tidak homogen atau salah satu di antara keduanya tidak terpenuhi, maka metode statistik parametrik tidak dapat digunakan sehingga data diolah dengan menggunakan metode statistik non parametrik dengan uji *Kruskall-Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* taraf kepercayaan 95%.



3.4 Skema Penelitian



Gambar 3.1. Skema penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery Systems* Gamavuton-0 (SNEDDS GVT-0) sebagai anti artritis rematoid dengan parameter penurunan kadar IL-1 β dan TNF- α . Untuk menginduksi terjadinya AR dilakukan dengan pemaparan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) secara subplantar pada telapak kaki tikus sebelah kanan. Aktivitas SNEDDS GVT-0 dibandingkan dengan suspensi GVT-0 dan kontrol positif obat metotreksat yang juga diketahui mampu menurunkan kadar IL-1 β dan TNF- α .

4.1. Pengajuan *Ethical Clearance*

Penelitian ini telah dinyatakan layak untuk dilaksanakan dan dapat dilakukan perlakuan pada hewan uji tikus *Wistar* jantan sesuai dengan disetujuinya *Ethical Clearance* oleh Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta dengan nomor 06/Ka.Kom.Et/70/KE/V/2016 (Lampiran 10).

4.2. Pembuatan SNEDDS GVT-0

Formula SNEDDS merupakan campuran isotropik antara minyak, surfaktan dan ko-surfaktan yang telah dilakukan pemilihan formulasi terbaik pada penelitian sebelumnya. Fase minyak yang digunakan adalah myritol dicampurkan dengan propilenglikol sebagai ko-surfaktan lalu disonikasi dengan *pulse* 40 selama 6 menit. Kombinasi surfaktan cremophor RH dan tween 20 dengan perbandingan (1 : 3) dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan molekul GVT-0 lebih banyak dibanding surfaktan lainnya. kombinasi ini akan dicampurkan pada campuran sebelumnya (minyak dan ko-surfaktan) dengan penambahan zat aktif pada akhir proses pencampuran, lalu campuran tersebut disonikasi *pulse* 40 selama 15 menit. Pemilihan minyak myritol sebagai pembawa zat aktif GVT-0 juga berdasarkan hasil tingginya jumlah GVT-0 yang dapat larut dalam minyak myritol yaitu sejumlah

7 mg/ml. sedangkan minyak-minyak yang lain seperti *canola oil*, *Soya oil*, *sesame oil*, *oleum ricini*, *virgine coconut oil* (VCO), *olive oil* dan *corn oil* hanya mampu melarutkan GVT-0 kurang dari 1 mg/ml. berdasarkan kemampuan melarutkan GVT-0 yang sangat tinggi serta kemampuannya dalam membentuk nanoemulsi, maka myritol merupakan pilihan yang tepat sebagai fase minyak dalam formulasi SNEDDS GVT-0⁽³³⁾.

Proses pembuatan SNEDDS GVT-0 ini dilakukan berdasarkan pilihan formula terbaik pada penelitian sebelumnya oleh Bagiana (2014) yang telah melakukan beberapa pengujian seperti *drug loading*, *emulsification time*, uji stabilitas dan karakteristik formula SNEDDS⁽³³⁾. Namun, untuk memastikan bahwa formula yang dibuat telah memenuhi persyaratan terbentuknya SNEDDS, maka peneliti mengkonfirmasi dengan menguji SNEDDS GVT-0 tersebut sehingga dapat diketahui ukuran partikel, harga *Polydispersity Index* (PDI) dan Transmitan (%) dengan melarutkan SNEDDS GVT-0 sebanyak 1 ml dalam aquades 250 ml lalu diuji pada *instrument* yang tersedia. Pengenceran tersebut dilakukan karena pada hakekatnya metode SNEDDS akan membentuk nanoemulsi pada pencampuran dengan cairan didalam tubuh. Berikut hasil pengujian yang diperoleh:

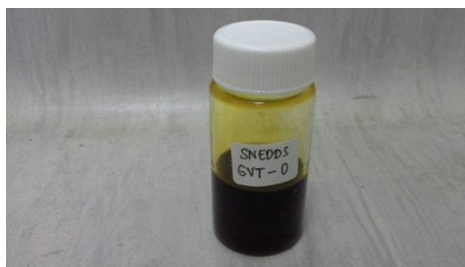
Tabel 4.1. Tabel hasil pengujian rerata ukuran partikel, PDI \pm SD dan hasil uji Transmitan (%)

Formula	Ukuran partikel (nm)	PDI	Transmitan (%)
250x	101,4 \pm 2,33	0,43 \pm 0,04	96,37 %

Keterangan :
 Kriteria SNEDDS:
 Ukuran partikel < 200 nm
 PDI 0,2- 0,7
 Transmitan 100%

Uji transmittan (%) dilakukan untuk melihat kemampuan larutan sampel dalam meneruskan cahaya yang ditembakkan dari spektrofotometri UV dan nilai transmittan (%) suatu formula dapat menggambarkan kemampuan proses emulsifikasi dari suatu surfaktan. Tingkat kejernihan emulsi dapat digunakan untuk memprediksi besarnya ukuran droplet yang terbentuk⁽³³⁾. Formula yang mampu menghasilkan emulsi yang jernih diyakini akan menghasilkan emulsi dengan droplet yang berukuran nanometer. Semakin jernih emulsi yang terbentuk maka akan menghasilkan ukuran droplet yang semakin kecil⁽³³⁾. SNEDDS GVT-0 memiliki nilai transmittan 96,37%. Nilai tersebut telah mendekati angka transmittan terbaik yaitu 100%. Semakin tinggi nilai transmittan (%) maka semakin baik kemampuan surfaktan dalam proses emulsifikasi serta semakin kecil juga ukuran droplet yang terbentuk. Namun, untuk memastikan proses emulsifikasi yang terjadi dalam membentuk partikel berukuran *nano* maka perlu dilakukan analisis lanjutan dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) untuk dapat melihat ukuran partikel serta nilai PDI. Ukuran partikel yang diperoleh dari SNEDDS GVT-0 yaitu 101,4 nm yang menunjukkan bahwa sediaan ini termasuk dalam ukuran nanoemulsi. Suatu formula nanoemulsi dikatakan stabil apabila ukuran partikel ≤ 200 nm⁽²⁵⁾.

Nilai PDI menunjukkan nilai sebaran normal distribusi ukuran partikel atau dengan kata lain nilai PDI menggambarkan keseragaman ukuran partikel yang terukur dari suatu emulsi serta ketahanan nanoemulsi terhadap pengaruh pengenceran. Distribusi ukuran partikel yang ideal berkisar antara 0,20-0,70. Berdasarkan tabel 4.1 Nilai PDI yang diperoleh $0,43 \pm 0,04$ menunjukkan bahwa sampel memiliki distribusi ukuran partikel yang seragam. PDI 0,20-0,70 dengan ketahanan terhadap pengaruh pengenceran^(25,32).



Gambar 4.1. SNEDDS GVT-0

4.3 Uji aktivitas anti artritis rematoid

Penelitian ini dilakukan selama 31 hari, pada hari ke-0 sampai hari ke-14 adalah masa induksi arthritis, hari ke-15 sampai hari ke-29 adalah masa pemberian perlakuan positif (metotreksat), perlakuan 1, perlakuan 2. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus *wistar* jantan yang dibagi kedalam 5 kelompok uji yaitu kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif (metotreksat), perlakuan 1 (tikus diberi suspensi GVT-0 dosis 40 mg/kgBB), perlakuan 2 (tikus diberi SNEDDS GVT-0 dosis 40 mg/kgBB).

4.3.1. Penegakan diagnosis artritis rematoid

Untuk menentukan apakah hewan uji sudah mengalami artritis rematoid atau belum, dilakukan skoring indeks artritis pada hari ke-15. Indeks artritis merupakan skala yang digunakan untuk menilai tingkat keparahan dari kejadian AR dilihat dari gejala yang timbul. Hewan uji dikatakan sudah mengalami AR jika skala indeks artritisnya ≥ 1 dimana ditandai dengan adanya gejala kemerahan dan bengkak pada jari kaki dan perubahan bentuk pada telapak kaki. Terjadinya AR pada masing-masing kelompok dilihat dari skoring nilai indeks artritis dengan menghitung ada berapa tikus tiap kelompok yang indeks artritisnya ≥ 1 dan dibagi dengan total jumlah tikus tiap kelompok. Maka diperoleh persentase indeks artritis setiap kelompok seperti pada tabel 4.2

Tabel 4.2. Rata-rata indeks artritis hari ke-15 dan hari ke-30

Kelompok (n=5)	% Indeks Artritis _{hari ke 15} ≥ 1 ($\bar{X} \pm SE$)	% Indeks Artritis _{hari ke 30} ≥ 1 ($\bar{X} \pm SE$)
Normal	0 \pm 0	0 \pm 0
Negatif	100 \pm 0	100 \pm 0
Positif	100 \pm 0	80 \pm 6,7
Suspensi GVT-0	100 \pm 0	80 \pm 6,7
SNEDDS GVT-0	100 \pm 0	40 \pm 7,4

Keterangan : Indeks ≥ 1 menandakan telah AR

Berdasarkan tabel 4.2 semua kelompok perlakuan berhasil diinduksi dengan CFA karena telah mengalami artritis pada hari ke-15, dengan persentase indeks artritis dari tiap kelompok yang ≥ 1 sebesar 100%. Pada hari ke-30 dilakukan pengamatan kembali untuk melihat progresivitas kejadian AR pada hewan uji tiap kelompok. Terdapat penurunan nilai indeks artritis pada kelompok kontrol positif,

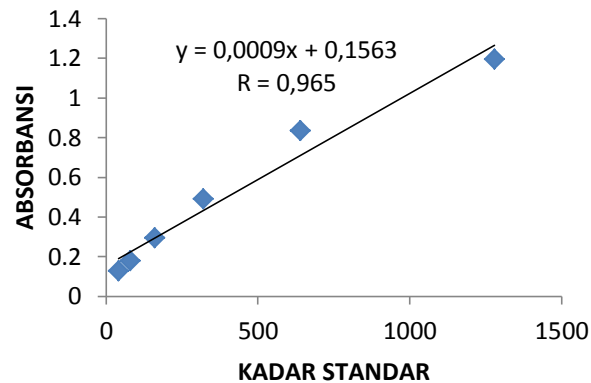
kelompok perlakuan suspensi GVT-0 dan SNEDDS GVT-0 sedangkan pada kelompok negatif persentase indeks artritis masih sebesar 100%. Hal ini dikarenakan kelompok kontrol negatif tidak memperoleh terapi farmakologi pada penelitian ini. Penurunan rata-rata persentase indeks artritis terbesar terjadi pada kelompok SNEDDS GVT-0 yaitu dari angka 100% menjadi 40%. Namun, penurunan tersebut tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan nilai persentase indeks artritis kelompok perlakuan suspensi GVT-0 dan kontrol positif.



Gambar 4.2. Indeks AR ≥ 1 pada tikus *Wistar* jantan

4.3.2. Penetapan kadar IL-1 β

Penetapan kadar IL-1 β pada jaringan persendian tikus perlakuan memerlukan suatu kurva baku seri kadar IL-1 β standar yang ditetapkan dengan metode *ELISA*. Prinsip penetapan kadar IL-1 β dengan metode *ELISA* berdasarkan yang spesifik antara antigen (IL-1 β) dengan antibodi anti IL-1 β yang dilanjutkan dengan pembentukan warna oleh enzim. Hasil serapan diperoleh dari *ELISA* yang dilakukan terhadap seri kadar standar IL-1 β (ng/L) yaitu $y = 0,0009x + 0,1563$ dengan harga $r = 0,965$. Nilai $r_{\text{tabel}}(6; 5\%) = 0,811$. Sedangkan nilai $r_{\text{hitung}} = 0,965 > 0,811$ sehingga menandakan bahwa nilai r dapat diterima. Koefisien determinasi (kekuatan serapan (x) menjelaskann kadar standar IL-1 β (y)) antara serapan (x) dengan kadar standar IL-1 β (y) ditunjukkan dengan harga R^2 sebesar 96,5 %. Data absorbansi standar IL-1 β dapat dilihat pada lampiran 1 dan gambar kurva baku dilihat pada gambar 4.3



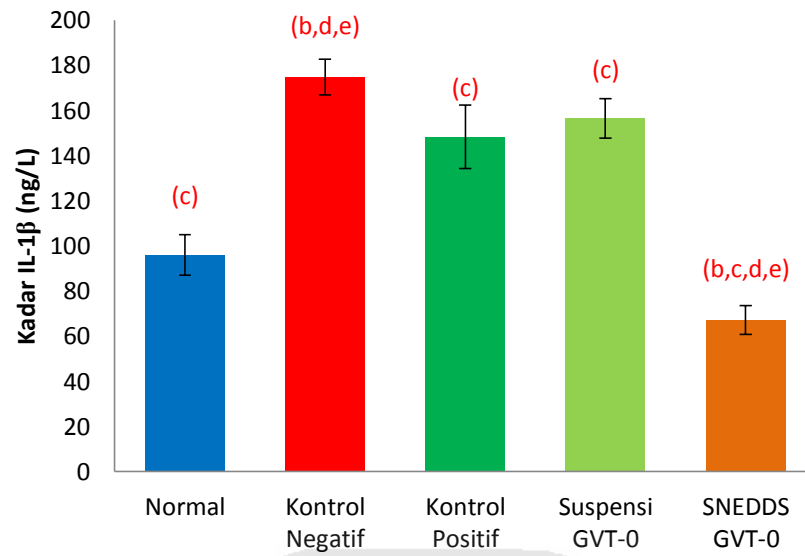
Gambar 4.3. Kurva baku standar IL-1 β menggambarkan hubungan linier antara seri kadar IL-1 β standar dengan absorbansi setelah pembacaan dengan *ELISA reader*.

Dari persamaan kurva baku dapat dihitung kadar IL-1 β yang terdapat di dalam sampel, yaitu dengan memasukkan serapan sampel ke dalam persamaan kurva baku. Kadar IL-1 β yang didapat memiliki satuan ng/L. data serapan sampel disajikan dalam Lampiran 2, sedangkan data kadar IL-1 β dapat dilihat pada Lampiran 3. Data kadar IL-1 β rata-rata disajikan dalam Tabel 4.3. Gambar histogram kadar IL-1 β dari masing-masing kontrol dan perlakuan ditunjukkan Gambar 4.4

Tabel 4.3. Rata-rata kadar IL-1 β \pm SE

Sampel	Kadar IL-1B (ng/L)
Normal	131,33 \pm 12,28 ^c
Kontrol negatif	204,00 \pm 6,38 ^{b,d,e}
Kontrol positif	111,11 \pm 4,75 ^c
Suspensi GVT-0	138,00 \pm 5,26 ^c
SNEDSS GVT-0	69,78 \pm 6,97 ^{b,c,d,e}

Keterangan (tabel & histogram) : (a) berbeda signifikan dengan seluruh kelompok, (b) berbeda signifikan dengan kelompok kontrol normal, (c) berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif, (d) berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif, (e) berbeda signifikan dengan suspensi GVT-0 (NSG).



Gambar 4.4. Histogram kadar IL-1 β

Dari gambar 4.4 terlihat bahwa pada keadaan normal, didalam jaringan sendi tikus terdapat sitokin IL-1 β dengan kadar yang kecil yaitu $131,33 \pm 12,28$ ng/L. Tikus tersebut masih dapat dikatakan normal jika kadarnya masih dibawah kadar tikus yang diinduksi CFA. Kadar sitokin IL-1 β pada jaringan sendi tikus kontrol negatif (diinduksi CFA) yaitu $204,00 \pm 6,38$ ng/L ini menunjukkan kadar tersebut 2 kali lebih tinggi dari tikus normal dan menandakan bahwa metode yang dipakai untuk menginduksi AR menggunakan CFA telah berhasil.

Penurunan kadar sitokin IL-1 β terjadi pada tikus dengan perlakuan metotreksat (kontrol positif) dibandingkan dengan kontrol negatif yaitu sebesar $111,11 \pm 4,75$ ng/L. Hal ini dapat disimpulkan bahwa metotreksat pada kontrol positif mampu menurunkan kadar IL-1 β pada tikus yang terinduksi CFA. Diduga aktivitas metotreksat dalam menurunkan kadar IL-1 β berhubungan dengan penghambatan kompetitif metotreksat terhadap enzim hidrofolat reduktase sehingga mampu menekan proliferasi sel-sel imun penghasil IL-1 β .

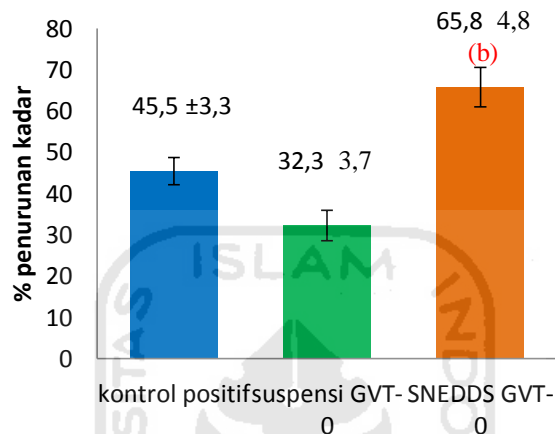
Hasil analisis varian (ANOVA) dan uji *Turkey* dari kadar IL-1 β sampel yang ada menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna kadar rata-rata antara kontrol positif dan kontrol negatif pada taraf kepercayaan 95% (Tabel 4.3 dan

Lampiran 4). Hal ini menandakan bahwa kontrol positif yang digunakan terbukti mampu menurunkan kadar IL-1 β . Sehingga aktivitas suspensi dan SNEDDS GVT-0 dapat dibandingkan terhadap metotreksat dalam menurunkan kadar IL-1 β . Kadar IL-1 β dalam jaringan sendi tikus yang diberi perlakuan Suspensi GVT-0 dosis 40 mg/kgBB menunjukkan penurunan kadar yaitu sebesar $138,00 \pm 5,26$ ng/L. Perbedaan signifikan antara kontrol negatif dengan suspensi GVT-0 tersebut menandakan bahwa suspensi GVT-0 juga mampu menurunkan kadar IL-1 β . Aktivitas antiinflamasi yang dimiliki GVT-0 diduga berhubungan dalam menurunkan kadar sitokin IL-1 β yaitu dengan menangkap radikal bebas sehingga menghambat pembentukan prostaglandin dari asam arakidonat oleh enzim *siklooksigenase-2* (COX-2). Penghambatan stimulasi inflamasi melalui COX-2 mampu menurunkan kadar IL-1 β . Sedangkan IL-1 β juga mampu menginduksi transkripsi COX-2 pada sel inflamasi⁽³⁵⁾. Dapat disimpulkan bahwa GVT-0 yang dibuat suspensi mampu menekan kadar IL-1 β terutama oleh aktivitasnya dalam menghambat COX-2⁽³⁵⁾.

Pada kelompok kontrol perlakuan yang diberikan SNEDDS GVT-0 jauh lebih baik dalam menurunkan kadar IL-1 β sebab menunjukkan perbedaan secara signifikan dengan suspensi GVT-0 maupun dengan kontrol positif, yaitu dengan kadar IL-1 β sebesar $69,78 \pm 6,97$ ng/L. Kadar tersebut 2x lipat lebih kecil dibandingkan kadar IL-1 β yang mendapatkan suspensi GVT-0 sehingga dapat disimpulkan bahwa SNEDDS GVT-0 mampu menurunkan kadar IL-1 β lebih banyak dibanding suspensi GVT-0. Hal ini dikarenakan SNEDDS mampu meningkatkan aktivitas dari GVT-0 sebab SNEDDS memiliki kemampuan menembus membran yang lebih besar dibandingkan suspensi GVT-0.

Hilangnya proses disolusi oleh sediaan SNEDDS sesaat sebelum GVT-0 menembus membran, membuat GVT-0 akan terdispersi cepat dalam saluran cerna. Ukuran droplet hasil dispersi berada pada ukuran nanometer sehingga droplet tersebut akan mudah menembus dinding usus yang dianalogikan dengan kemampuan difusi GVT-0 menembus membran selapan. Sediaan SNEDDS GVT-0 mempunyai kemampuan difusi lebih besar dibanding suspensi GVT-0.

Penetapan aktivitas SNEDDS GVT-0 terhadap penurunan kadar IL-1 β dinyatakan sebagai persentase penurunan kadar IL-1 β yang menunjukkan penurunan kadar IL-1 β pada jaringan sekitar sendi tikus. Perlakuan tersebut dibandingkan terhadap persentase aktivitas penurunan kadar IL-1 β oleh suspensi GVT-0 dan kontrol positif. Histogram persen penurunan kadar IL-1 β disajikan pada gambar 4.5



Keterangan: (a) berbeda signifikan dengan kontrol positif, (b) berbeda signifikan dengan suspensi GVT-0

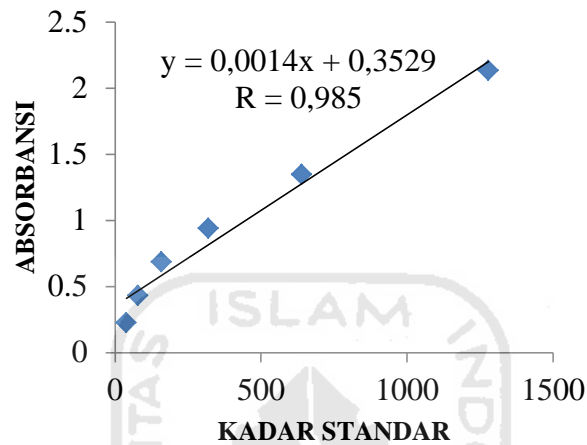
Gambar 4.5 Histogram persentase penurunan kadar IL-1 β

Harga persentase penurunan kadar IL-1 β dari SNEDDS GVT-0 yaitu sebesar 65,8% lebih tinggi dibanding suspensi GVT-0 (32,3%) maupun kontrol positif (45,5%). Perbedaan secara signifikan terjadi antara SNEDDS GVT-0 dengan suspensi GVT-0 ($p < 0,05$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa desain formula SNEDDS pada GVT-0 mampu meningkatkan aktivitasnya serta lebih baik dibanding suspensi GVT-0 dalam menurunkan kadar IL-1 β didalam jaringan sendi tikus *wistar* jantan terinduksi CFA.

4.3.3. Penetapan kadar TNF- α

Hasil serapan diperoleh dari *ELISA* yang dilakukan terhadap seri kadar standar TNF- α (ng/L) yaitu $y = 0,0014x + 0,352$ dengan harga $r = 0,985$. Nilai r_{tabel}

$(6; 5\%) = 0,811$. Sedangkan nilai $r_{hitung} = 0,985 > 0,811$ sehingga menandakan bahwa nilai r dapat diterima. Koefisien determinasi (kekuatan serapan (x)) menjelaskan kadar standar TNF- α (y) antara serapan (x) dengan kadar standar TNF- α (y) ditunjukkan dengan harga R^2 sebesar 98,5 %. Data absorbansi standar kurva baku dilihat pada gambar 4.6



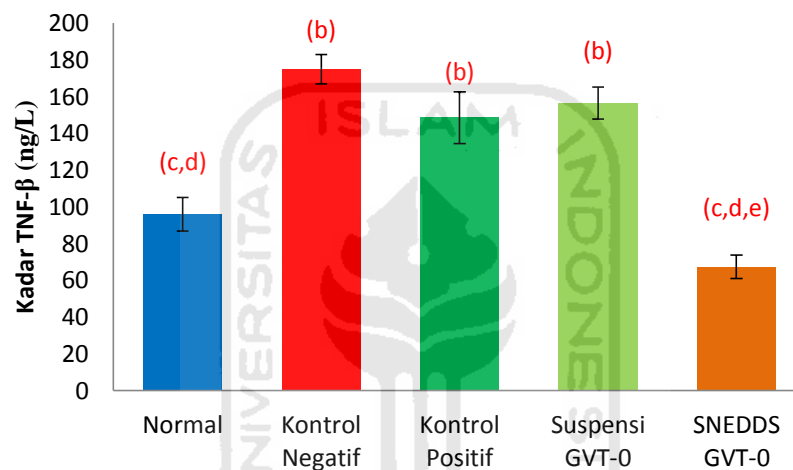
Gambar 4.6. Kurva baku standar TNF- α menggambarkan hubungan linier antara seri kadar TNF- α standar dengan absorbansi setelah pembacaan dengan *ELISA reader*

Dari persamaan kurva baku dapat dihitung kadar TNF- α yang terdapat di dalam sampel, yaitu dengan memasukkan serapan sampel ke dalam persamaan kurva baku. Kadar TNF- α yang didapat memiliki satuan ng/L. data serapan sampel disajikan dalam Lampiran 5, sedangkan data kadar TNF- α dapat dilihat pada Lampiran 6. Data kadar TNF- α rata-rata disajikan dalam Tabel 4.5. Gambar histogram kadar TNF- α dari masing-masing kontrol dan perlakuan ditunjukkan Gambar 4.7.

Tabel 4.5. Rata-rata kadar TNF- α \pm SE

SAMPEL	Kadar TNF- α (ng/L)
Normal	96,00 \pm 9,04 ^{c,d}
Kontrol negatif	174,86 \pm 7,88 ^b
Kontrol positif	148,43 \pm 14,07 ^b
Suspensi GVT-0	156,57 \pm 8,70 ^b
SNEDSS GVT-0	67,29 \pm 6,38 ^{c,d,e}

Keterangan (tabel & histogram) : (a) berbeda signifikan dengan seluruh kelompok, (b) berbeda signifikan dengan kelompok kontrol normal, (c) berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif, (d) berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif, (e) berbeda signifikan dengan suspensi GVT-0.

**Gambar 4.7.** Histogram kadar TNF- α

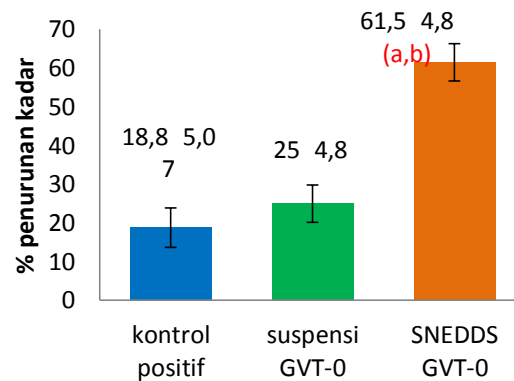
Dari gambar 4.6 terlihat bahwa kontrol positif (metotreksat) dan suspensi GVT-0 tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif, hal ini dikarenakan dalam mekanisme metotreksat tidak menghambat langsung dari produksi TNF- α . Metotreksat dilaporkan secara langsung menghambat produksi IL-1 dan menyebabkan akumulasi *adenosine*. Sedangkan pada suspensi GVT-0 dosis 40 mg/kgBB masih belum optimal untuk menurunkan kadar TNF- α secara signifikan.

GVT-0 dalam sediaan SNEDDS mampu menurunkan kadar TNF- α secara signifikan ditandai dengan kadar TNF- α pada jaringan sendi tikus *Wistar* jantan terinduksi CFA dengan pemberian SNEDDS GVT-0 sebesar 67,29 \pm 6,38 ng/L. Kadar TNF- α pada pemaparan SNEDDS GVT-0 2x lipat lebih kecil

dibandingkan kadar TNF- α jika GVT-0 hanya diberikan dalam bentuk suspensi. Hal tersebut menandakan terjadi perbedaan signifikan antara SNEDDS GVT-0 dan suspensi GVT-0 dalam menurunkan kadar TNF- α pada taraf kepercayaan 95%.

Penurunan kadar TNF- α yang signifikan antara sediaan SNEDDS dengan suspensi ini tidak lepas juga dari meningkatnya ketersediaan hayati GVT-0 dalam tubuh hewan uji. Ada dua faktor yang mempengaruhi ketersediaan hayati GVT-0 dalam tubuh yaitu absorpsi dan metabolisme. Kelarutan yang rendah dari GVT-0 dalam lingkungan fisiologis membuat penyerapan obat menjadi kurang maksimal. Pada formula SNEDDS kali ini, proses pelarutan GVT-0 dalam saluran cerna digantikan oleh proses dispersi myritol yang membawa molekul GVT-0. Ukuran nanometer pada hasil dispersi myritol tersebut akan langsung mengalami permeasi menembus dinding usus. Proses kerusakan GVT-0 akibat metabolisme oleh enzim pencernaan disaluran cerna mampu dikurangi karena molekul GVT-0 terlindungi oleh lapisan pembawanya. Lapisan pembawa yang melindungi molekul GVT-0 tersebut akan menghambat interaksi langsung antara molekul GVT-0 dengan molekul enzim pencernaan, sehingga efek samping yang kemungkinan muncul dari penggunaan GVT-0 dapat dikurangi.

Penetapan aktivitas SNEDDS GVT-0 terhadap penurunan kadar TNF- α dinyatakan sebagai persen penurunan kadar TNF- α yang menunjukkan penurunan kadar TNF- α pada jaringan sekitar sendi tikus. Perlakuan tersebut dibandingkan terhadap persentase aktivitas penurunan kadar TNF- α oleh suspensi GVT-0 dan kontrol positif. Histogram persen penurunan kadar TNF- α disajikan pada gambar 4.8



Keterangan: (a) berbeda signifikan dengan kontrol positif, (b) berbeda signifikan dengan suspensi GVT-0

Gambar 4.8 Histogram persentase penurunan kadar TNF- α

Harga persentase penurunan kadar TNF- α dari SNEDDS GVT-0 yaitu sebesar 61,5%. Angka tersebut lebih tinggi dibanding suspensi GVT-0 (25%) maupun kontrol positif (18,2%), perbedaan signifikan terjadi antara sediaan SNEDDS GVT-0 dengan suspensi GVT-0 maupun kontrol positif ($p < 0,05$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa desain formula SNEDDS pada GVT-0 mampu meningkatkan aktivitasnya serta lebih baik dibanding suspensi GVT-0 dalam menurunkan kadar TNF- α didalam jaringan sendi tikus *wistar* jantan terinduksi CFA. Namun, pengembangan formulasi SNEDDS perlu dikaji lebih lanjut dari segi negatifnya sebab peningkatan kecepatan absorpsi akan berdampak langsung dengan meningkatnya kadar obat dalam darah. Jika kadar tersebut melewati ambang toksik minimum maka dimungkinkan muncul efek samping yang tidak dikehendaki.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

- 5.1.1. Aktivitas SNEDDS GVT-0 mampu menurunkan kadar IL-1 β dan TNF- α dengan persentase penurunan kadar IL-1 β sebesar 65,8% dan persentase penurunan kadar TNF- α sebesar 61,5% pada jaringan sendi tikus *Wistar* jantan terinduksi *Complete Freund's Adjuvant*.
- 5.1.2. SNEDDS GVT-0 mampu menurunkan kadar IL-1 β dan TNF- α secara signifikan, sedangkan suspensi GVT-0 hanya mampu menurunkan kadar IL-1 β tanpa diikuti penurunan kadar TNF- α . Sehingga SNEDDS GVT-0 lebih baik dibandingkan suspensi GVT-0 dalam menurunkan kadar keduanya.

5.2. Saran

- 5.2.1. Perlu dilakukan uji efek samping dan toksisitas sediaan SNEDDS GVT-0 sehingga diketahui tingkat keamanannya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Singh, J. et al. 2015. American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Care & Research DOI 10.1002/acr.22783, VC 2015, American College of Rheumatology.
2. Muchid A. 2006. *Pharmaceutical Care untuk Pasien Penyakit Arthritis Rematik. Izkafiz*. Direkloral Bina Farmasi Komunitas dan Klinik, Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, Jakarta.
3. Wijayakusuma, H. 2006. *Atasi Asam Urat & Rematik ala Hembing*. Jakarta: Puspa Swara.
4. Abbas, A. K., et al. 2005. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Elsevir Saunders. 253-254.
5. Darwin dan Eryati. 2006. Kajian Molekul Adesi (Icam-L Dan Selektin- L) Pada kejadian Arthritis Reumatoid fase Inisiasi, Aktif dan Kronik (Penelitian Eksperimental 2laboratories Pada Tikus Putih Rattus Norvegicus). <http://adln.lib.unair.ac.id/go.php?id>.
6. Kresno, S.B., 1996, *Imunologi; Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, Fak.Kedokteran UI, Jakarta.
7. Radner, H., et al. 2015. Anti-TNF in rheumatoid arthritis: an overview. *Wien Med Wochenster*. DOI 10.1007/s10354-015-0344-y.
8. Chabib, L., et al. 2016, Review Rheumatoid Arthritis: Terapi Farmakologi, Potensi Kurkumin dan Analognya, serta pengembangan Sistem Nanopartikel, *Jurnal Pharmascience.*, **3**.No 1.
9. Ikawati, Z., et al. 2014, The Analgesic Effect of a Curcumin Analogue 1,5-bis (4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-on (Gamavuton-0) in acute and persistent pain, *J. Pharm. Sci.*, **4** (08) : 048-051
10. Aletaha D., et al. 2010. *Rheumatoid Arthritis Collaborative Initiative*. *Arthritis Rheum.* **62**: 2569 – 2581
11. Smeltzer. et al. 2002. *Buku Ajar Keperawatan Medikal Bedah Brunner dan Suddarth* Ed.8. EGC, Jakarta.
12. Dipiro, JT. 2009. *Pharmacotherapy Handbook 7th edition Chapter Rheumatoid Arthritis*. Mc Graw Hill. New York. P: 1505-1507.
13. American College of Rheumatology Subcommittee Rheumatoid Arthritis. 2012. Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis. *46*: 328-46
14. Claassen E, et al. 1992. Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula. *Res Immunol.* **143**(5):478–83.
15. Hanly, W.C., et al. 2008. Overview of Adjuvant. [internet]. [diakses 3 Maret 2016]. Dari <http://nal.usda.gov/awicupbs/antibody/overview.htm>
16. Vashanti, P., et al. 2007. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. *APLAR Journal of Rheumatology.* **10**: 270-274
17. Cronstein, B.N., 2005, Low-Dose Methotrexate: A Mainstay in the Treatment of Rheumatoid Arthritis, *Pharmacology Review.* **57**, 163-172.

18. Darmansjah, I., et al. 2000, *Informatorium Obat Nasional Indonesia 2000*, 367-368, Departemen Kesehatan Republik Indonesia Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
19. Cutolo, B.M., et al. 2001, Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis.*, **60**;729–735.
20. Nugroho, A. E., et al. 2007. Penghambatan Reaksi Anafilaksis Kutaneus Aktif Oleh Kalium Gamavuton-0 (K-Gvt-0). *Majalah Farmasi Indonesia*. **18** (2), 63-70.
21. Sardjiman, et al. 1997. 1,5-diphenyl-1,4-Pentadiene-3-One and Cyclic Analogues as Antioxydant Agent. Syntesis and Structure Relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **32**; 625 – 630.
22. Sardjiman. 2000. Syntesis of Some New Series of Curcumin Analogues, Antioksidative, Antiinflamatory, Antibacterial Activity Relationship, [Dissertasion]. Yogyakarta: Gadjah Mada University.
23. Ikawati, Z., et al. Sistesis, Aktivitas dan Toksisitas Gamavuton-0 Sebagai anti Artritis Rematoid, *Laporan Penelitian*, Kementrian Negara Riset dan Teknologi. Jakarta, 2008.
24. Patel, J., et al. 2011. Design and Development of a Self-Nanoemusifying Drug Delivery System for Telmisartan for Oral Drug Delivery. *Int J Pharm Investig*, **1** (2), 112-118.
25. Makadia H, et al. 2013. Self-nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDs): Future Aspect, *Asian J. Pharm. Res.*, **3**(1). 21-27.
26. Pol A, Patel P and Hedge D. 2013. Peppermint Oil Based Drug Delivery System of Aceclofenac with Improved Anti-inflammatory Activity and Reduced Ulcerogenecity, *Int. J. Pharm. Biosci. Technol*, **1** (2), 89-101.
27. Rao, S. V. and Shao, J. 2008. Self Nano-Emulsifying Drug Delivery Systems (Snedds) for Oral Delivery of Protein Drugs: I. Formulation Development, *Int J Pharm*, **362** (1-2), 2-9
28. Azeem, A., et al. 2009. Nanoemulsion Component screening and Selection : A Technical Note, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **10** (1), 69-76
29. Anonim.2007.ELISA.[diakses tanggal 25 Februari 2016] . Diambil dari URL:<http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>
30. Crowther, J.R. 2001. *The ELISA guidebook*. Humana Press, New Jersey: xi
31. Smit, F. 2000. Picorhiza scrophulariiflora from Traditional Use to Immunomodulatory. [dissertation]. Utrecht: Rijksuniversiteit Utrech.
32. Mao, L. et al. 2009. Effects of small and large molecule emulsifiers on the characteristics of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization. *Food Technology Biotechnology*, **47** (3). p. 336-342.
33. Bagiana, K. Pengembangan Nanogamavuton-0 dengan Formulasi SNEDDS Sebagai Kandidat Obat Analgetik dan Antiinflamasi [Tesis]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada; 2014
34. Yuniarti, Nunung. Aktivitas Antiinflamasi *invivo* dan *invitro* 1,5-bis(4' – hidroksi-3' –metoksifenil)- 1,4- pentadien-3-on dan turunannya, [tesis] Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 2006

35. Rosyidi, V. Aktivitas Gamavuton-0 sebagai anti artritis rematoid pada Tikus *Wistar* Betina diinduksi *Complete Freund's Adjuvant* dengan Parameter penekanan kadar sitokn IL-1 β pada Jaringan Sendi [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada; 2008.
36. Guzman, F. 2002. Mechanism of Action, Indication and Adverse effects of: etanercept, indliximab and adalimumab. [internet]. [diakses tanggal 21 September 2016]. Dari <http://pharmacologycorner.com>



Lampiran 1. Tabel data absorbansi standar IL-1 β dan TNF- α dengan beberapa seri kadar untuk pembuatan kurva baku IL-1 β dan TNF- α .

a. Standar IL-1 β

Kadar standar IL-1 β (ng/L)	Absorbansi
1280	1,195
640	0,836
320	0,492
160	0,294
80	0,180
40	0,127

b. Standar TNF- α

Kadar standar TNF- α (ng/L)	Absorbansi
1280	2,133
640	1,347
320	0,938
160	0,683
80	0,432
40	0,226

Lampiran 2. Tabel data absorbansi IL-1 β sampel yang diambil dari jaringan sendi kaki tikus dengan metode *ELISA*.

Replikasi sampel	Normal	Kontrol negatif	Kontrol positif	Suspensi GVT-0	SNEDDS GVT-0
1	0,512	0,344	0,287	0,271	0,186
2	0,120	0,366	0,247	0,292	0,267
3	0,245	0,311	0,263	0,307	0,263
4	0,183	0,286	0,250	0,289	0,173
5	0,239	0,391	0,233	0,242	0,205

Lampiran 3. Tabel data kadar IL-1 β sampel (ng/L)

Replikasi sampel	Normal	Kontrol negatif	Kontrol positif	Suspensi GVT-0	SNEDDS GVT-0
1	395,56	208,89	145,56	127,78	33,33
2	40,00	233,33	101,11	151,11	123,33
3	98,89	172,22	118,89	167,78	118,89
4	30,00	144,44	104,44	147,78	18,89
5	92,22	261,11	85,56	95,56	54,44
Rata-rata	131,33	204,00	111,11	138,00	69,78

Lampiran 4. Tabel-tabel hasil ANAVA dan Uji *Turkey* kadar sampel IL-1 β **Tests of Normality**

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IL.1B Normal	.279	5	.200 [*]	.883	5	.322
Negatif	.152	5	.200 [*]	.979	5	.928
Positif	.216	5	.200 [*]	.954	5	.767
NSG	.238	5	.200 [*]	.940	5	.666
SG	.246	5	.200 [*]	.946	5	.707

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

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

IL.1B

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.531	4	20	.025

ANOVA

IL.1B

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	72481.243	4	18120.311	24.345	.000
Within Groups	14886.523	20	744.326		
Total	87367.766	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IL1B

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	Negatif	-107.55400 [*]	17.25487	.000	-159.1870	-55.9210
	Positif	-14.66800	17.25487	.911	-66.3010	36.9650
	NSG	-41.55800	17.25487	.154	-93.1910	10.0750
	SG	57.11200 [*]	17.25487	.026	5.4790	108.7450
Negatif	Normal	107.55400 [*]	17.25487	.000	55.9210	159.1870
	Positif	92.88600 [*]	17.25487	.000	41.2530	144.5190
	NSG	65.99600 [*]	17.25487	.008	14.3630	117.6290
	SG	164.66600 [*]	17.25487	.000	113.0330	216.2990
Positif	Normal	14.66800	17.25487	.911	-36.9650	66.3010
	Negatif	-92.88600 [*]	17.25487	.000	-144.5190	-41.2530
	NSG	-26.89000	17.25487	.539	-78.5230	24.7430
	SG	71.78000 [*]	17.25487	.004	20.1470	123.4130
NSG	Normal	41.55800	17.25487	.154	-10.0750	93.1910
	Negatif	-65.99600 [*]	17.25487	.008	-117.6290	-14.3630
	Positif	26.89000	17.25487	.539	-24.7430	78.5230
	SG	98.67000 [*]	17.25487	.000	47.0370	150.3030
SG	Normal	-57.11200 [*]	17.25487	.026	-108.7450	-5.4790
	Negatif	-164.66600 [*]	17.25487	.000	-216.2990	-113.0330
	Positif	-71.78000 [*]	17.25487	.004	-123.4130	-20.1470
	NSG	-98.67000 [*]	17.25487	.000	-150.3030	-47.0370

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 5. Tabel data absorbansi TNF- α sampel yang diambil dari jaringan sendi kaki tikus dengan metode *ELISA*

Replikasi sampel	Normal	Kontrol negatif	Kontrol positif	Suspensi GVT-0	SNEDDS GVT-0
1	0,452	0,669	0,567	0,514	0,443
2	0,411	0,527	0,448	0,496	0,336
3	0,458	0,654	0,553	0,675	0,448
4	0,423	0,654	0,629	0,697	0,443
5	0,688	0,480	0,602	0,474	0,529

Lampiran 6. Tabel data kadar TNF- α sampel (ng/L)

Replikasi sampel	Normal	Kontrol negatif	Kontrol positif	Suspensi GVT-0	SNEDDS GVT-0
1	71,43	226,43	153,57	115,71	65,00
2	42,14	125,00	68,57	102,86	11,43
3	75,71	215,71	143,57	230,71	68,57
4	50,71	215,71	197,86	246,43	65,00
5	240,00	91,43	178,57	87,14	126,43
<i>Rata-rata</i>	<i>96,00</i>	<i>174,86</i>	<i>148,43</i>	<i>138,00</i>	<i>67,29</i>

Lampiran 7. Tabel-tabel hasil ANAVA dan Uji *Turkey* kadar sampel TNF- α **Tests of Normality**

Perlakuan		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TNF.A	Normal	.210	5	.200 [*]	.953	5	.758
	Negatif	.332	5	.074	.784	5	.060
	Positif	.275	5	.200 [*]	.879	5	.306
	NSG	.329	5	.082	.845	5	.179
	SG	.297	5	.172	.898	5	.397

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

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

TNF.A

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
10.086	4	20	.000

ANOVA

TNF.A

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	70475.982	4	17618.996	12.215	.000
Within Groups	28847.312	20	1442.366		
Total	99323.294	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TNF.A

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	Negatif	-123.14400 [*]	24.01971	.000	-195.0200	-51.2680
	Positif	-98.14400 [*]	24.01971	.005	-170.0200	-26.2680
	NSG	-103.43000 [*]	24.01971	.003	-175.3060	-31.5540
	SG	-2.43000	24.01971	1.000	-74.3060	69.4460
Negatif	Normal	123.14400 [*]	24.01971	.000	51.2680	195.0200
	Positif	25.00000	24.01971	.833	-46.8760	96.8760
	NSG	19.71400	24.01971	.921	-52.1620	91.5900
	SG	120.71400 [*]	24.01971	.001	48.8380	192.5900
Positif	Normal	98.14400 [*]	24.01971	.005	26.2680	170.0200
	Negatif	-25.00000	24.01971	.833	-96.8760	46.8760
	NSG	-5.28600	24.01971	.999	-77.1620	66.5900
	SG	95.71400 [*]	24.01971	.006	23.8380	167.5900
NSG	Normal	103.43000 [*]	24.01971	.003	31.5540	175.3060
	Negatif	-19.71400	24.01971	.921	-91.5900	52.1620
	Positif	5.28600	24.01971	.999	-66.5900	77.1620
	SG	101.00000 [*]	24.01971	.004	29.1240	172.8760
SG	Normal	2.43000	24.01971	1.000	-69.4460	74.3060
	Negatif	-120.71400 [*]	24.01971	.001	-192.5900	-48.8380
	Positif	-95.71400 [*]	24.01971	.006	-167.5900	-23.8380
	NSG	-101.00000 [*]	24.01971	.004	-172.8760	-29.1240

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 8. Tabel skoring artritis

Kontrol negatif

Hari ke	Indeks artritis				
	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5
15	2,00	1,50	1,75	1,75	1,50
30	2,00	1,75	2,00	1,75	2,00

Kontrol positif

Hari ke	Indeks artritis				
	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5
15	1,50	1,25	1,50	1,75	2,00
30	1,25	0,75	1,50	1,50	1,50

Suspensi GVT-0

Hari ke	Indeks artritis				
	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5
15	1,75	1,50	2,00	1,50	1,75
30	0,75	1,25	1,75	1,25	1,50

SNEDDS GVT-0

Hari ke	Indeks artritis				
	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5
15	2,00	1,75	1,50	1,25	1,50
30	1,25	1,00	0,75	0,75	0,75

Lampiran 9. Dokumentasi alat, bahan, dan perlakuan hewan uji



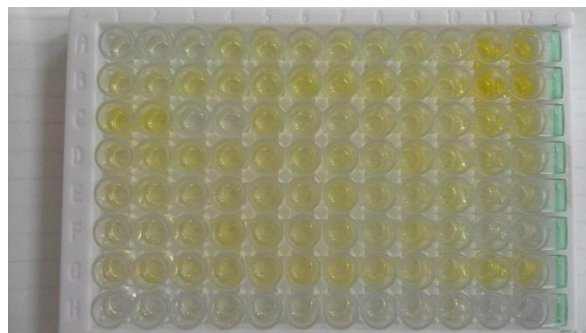
Gambar 1. Sediaan yang digunakan untuk pengujian anti AR



Gambar 2. Ultrasonifikasi



Gambar 3. ELISA reader



Gambar 4. ELISA plate



Gambar 5. Induksi CFA



Gambar 6. Pemberian obat per oral

Lampiran 10. Surat Ethical Clearance




UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMITE ETIK PENELITIAN KEDOKTERAN DAN KESEHATAN
 Sekretariat : Jl. Kaliurang Km. 14,5 YOGYAKARTA 55584
 Telp. (0274) 898444 ext. 2060 Fax. (0274) 898444 ext. 2007; E-mail : ke.fkuii@yahoo.co.id

Nomor : 06/Ka.Kom.Et/70/KE/V/2016

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 SNEDDS Gamavuton sebagai Anti Arthritis Rematoid dengan Parameter Penurunan Kadar Sitokin IL-1 β dan TNF- α pada Jaringan Sendi Tikus Wistar Jantan."

Peneliti Utama : Viren Ramadhan

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 Mei 2016

Ketua
Chairman

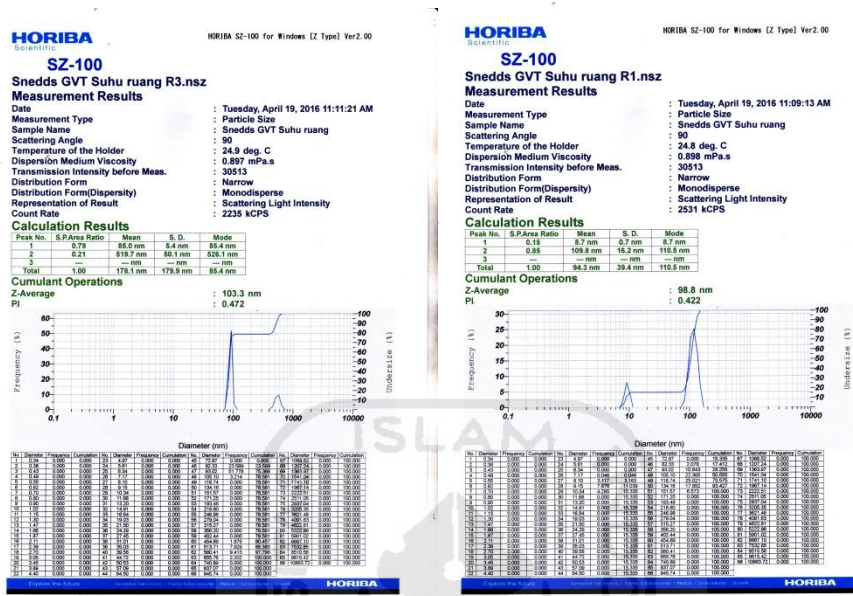
Prof. Dr. Dra. Wiryatun Lestariyana, Apt

***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 11. Hasil uji PSA



Lampiran 12. Surat keterangan hewan uji



PEMERINTAH KOTA YOGYAKARTA
 DINAS PERINDUSTRIAN, PERDAGANGAN, KOPERASI DAN PERTANIAN
UPT PELAYANAN KEHEWANAN
 Jl. Tegalturi Giwangan Yogyakarta Telp 0274 371080
 EMAIL : perindagkoptan@jogjakota.go.id EMAIL INTRANET : perindagkoptan@intra.jogjakota.go.id
 WEBSITE : www.jogjakota.go.id

Surat Keterangan Kesehatan Hewan

No. 524 / SKS / IV. 482 / 2016

Yang bertandatangan dibawah ini dokter hewan Poliklinik Hewan Kota Yogyakarta, UPT Pelayanan Kehewananan, Dinas Perindustrian Perdagangan Koperasi dan Pertanian Kota Yogyakarta, menerangkan bahwa :

No	Jenis hewan	Umur	Warna	Jenis kelamin	Keterangan
1.	RAT WISTAR	2-3 BULN	PUTIH	JANTAN	21 EKOR

Hewan/ Satwa tersebut milik :


Nama : M. ROZIKIN
 Alamat : SURYOPINRATAN MJ 21636 YK

Pada waktu dilakukan pemeriksaan hewan tersebut dinyatakan sehat secara klinis.

Disampaikan bahwa hewan tersebut rencana akan dikirim dengan tujuan sebagai berikut:

Kota tujuan : YOGYAKARTA UII
 d/a VIREN RAMADHAN
 Alat Angkut : DARAT
 Hari/tanggal : RABU, 20 APRIL 2016

Demikian harap yang berkepentingan maklum.

Yogyakarta, 20 APRIL 2016
 Dokter hewan pemeriksa

 Drh. Drs. ROHAYAT
 NIP. 19801003 2009 02 2004

Lampiran 13. Tabel-tabel hasil ANAVA dan Uji *Turkey* persentase penurunan kadar IL-1 β dan TNF- α .

Tests of Normality

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IL.1B Positif	.222	5	.200 [*]	.941	5	.670
Suspensi	.239	5	.200 [*]	.940	5	.664
Sneeds	.244	5	.200 [*]	.860	5	.227

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

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

IL.1B

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.531	4	20	.025

ANOVA

IL.1B

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2849.733	2	1424.867	4.805	.029
Within Groups	3558.100	12	296.508		
Total	6407.833	14			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IL.1B

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Positif	Suspensi	12.82600	10.89052	.488	-16.2284	41.8804
	Sneeds	-20.63400	10.89052	.183	-49.6884	8.4204
Suspensi	Positif	-12.82600	10.89052	.488	-41.8804	16.2284
	Sneeds	-33.46000 [*]	10.89052	.024	-62.5144	-4.4056
Sneeds	Positif	20.63400	10.89052	.183	-8.4204	49.6884
	Suspensi	33.46000 [*]	10.89052	.024	4.4056	62.5144

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tests of Normality

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TNF.A Positif	.303	5	.150	.797	5	.076
Suspensi	.256	5	.200*	.843	5	.172
Sneeds	.288	5	.200*	.901	5	.414

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

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

TNF.A

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
10.086	4	20	.000

ANOVA

TNF.A

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5425.641	2	2712.821	4.721	.031
Within Groups	6895.068	12	574.589		
Total	12320.709	14			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TNF.A

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Positif	Suspensi	-6.82000	15.16033	.895	-47.2657	33.6257
	Sneeds	-43.32000*	15.16033	.036	-83.7657	-2.8743
Suspensi	Positif	6.82000	15.16033	.895	-33.6257	47.2657
	Sneeds	-36.50000	15.16033	.079	-76.9457	3.9457
Sneeds	Positif	43.32000*	15.16033	.036	2.8743	83.7657
	Suspensi	36.50000	15.16033	.079	-3.9457	76.9457

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.