

SKRIPSI

**UJI EFEK MIKROKAPSUL BROMELIN TERHADAP LEUKOSIT DAN
TNF- α PADA MENCIT PUTIH JANTAN YANG DIINDUKSI VAKSIN
H5N1**

Oleh :

SARAH FADHILA HS

NIM : 1811011029

Pembimbing 1 : Prof. Dr. apt. Yufri Aldi, M.Si
Pembimbing 2 : Dr.apt. Salman, M.Si.



FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2022

PERNYATAAN ORISINALITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Sarah Fadhila HS

NO.BP : 1811011029

Judul : Uji Efek Mikrokapsul Bromelin Terhadap Leukosit dan TNF- α Pada Mencit Putih Jantan Yang Diinduksi Vaksin H5N1

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi yang saya tulis merupakan hasil karya saya sendiri,terhindar dari unsur plagiarism, dan data beserta seluruh isi skripsi tersebut adalah benar adanya
2. Saya menyerahkan hak cipta dari skripsi tersebut kepada Fakultas Farmasi Universitas Andalas untuk dapat dimanfaatkan dalam kepentingan akademis

Padang,15 Maret 2022



Sarah Fadhila HS

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menempuh ujian
Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi**

Disetujui oleh

Pembimbing 1



Prof.Dr.appt. Yufrialdi,M.Si
NIP. 196511231991031002

Pembimbing II



Dr.appt. Salman,M.Si
NIP.196611261992031002

Skripsi ini telah dipertahankan di depan Pembahas seminar hasil penelitian

Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Pada tanggal :

No	Nama	Jabatan	Tanda tangan
1.	apt. Najmiatul Fitria, M.Farm,Ph.d	Ketua	
2	Prof. apt. Armenia, MS, Ph.D	Pembahas	
3.	apt. Fitri Rachmaini, S.Farm, M.Si	Pembahas	
4	Prof. Dr. apt. Yufri Aldi, M.Si	Pembimbing I	
5	Dr. apt. Salman, M.Si	Pembimbing II	

KATA PENGANTAR

Bismillahirrohmaanirrohiim

Alhamdulillahirabbil'aalamiin, Puji syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan berkah, rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “ **Uji Efek Mikrokapsul Bromelin Terhadap Leukosit dan TNF- α Pada Mencit Putih Jantan Yang Diinduksi Vaksin H5N1**”. Skripsi ini disusun oleh penulis sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang.

Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari doa, bimbingan serta dukungan dari berbagai pihak yang telah membantu dan memotivasi kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan terimakasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. apt. Yufri Aldi, M.Si selaku pembimbing I dan Bapak Dr. apt. Salman, M.Si selaku pembimbing II yang telah banyak meluangkan waktu dalam memberikan arahan kepada penulis dalam menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Ibu Prof. Dr. apt. Fatma Sri Wahyuni selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Andalas
3. Bapak/Ibu dosen staf pengajar Fakultas Farmasi yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat kepada penulis selama menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi, Universitas Andalas
4. Bapak/ibu analis laboratorium teknologi sediaan padat, laboratorium imunologi dan serologi, laboratorium Biomedik dan laboratorium farmakologi yang telah mendukung saranan dan prasarana dalam penelitian ini.
5. Bapak Syafril Anuir, S.Pd, M.M dan Ibu Herlinda, Pebi Eldio HS, Harsa Dinata HS selaku orang tua beserta kakak dan abang penulis yang sangat penulis sayangi, yang telah mendukung penulis sehingga bisa menyelesaikan Strata 1 ini.

6. Sahabat terbaik ani, ina, dilun, adip, duwik, egin dan hari yang telah banyak memberikan doa dan dukungan.
7. Teman terbaik di farmasi haura, feren dan sist,hasbi,liza dan sahaatku yang lainnya
8. Dan terimakasih kepada diri ini yang telah kuat dan semangat dan tidak pantang menyerah mengerjakan semuanya atas rahmat Allah SWT yang Mahakuasa.

Semoga Allah membalas kebaikan kepada pihak yang telah membantu dan menjadi berkah dalam kehidupan dunia dan amal jariyah di akhirat kelak, Aamiin yaa Rabbal'alam.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kesempurnaan dan masih banyak kekurangan. Maka dari itu,penulis menerima kritik dan saran yang membangun untuk kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan informasi yang bermanfaat dalam ilmu pengetahuan bagi kita semua.

Padang, 15 Maret 2022



Penulis

ABSTRAK

UJI EFEK MIKROKAPSUL BROMELIN TERHADAP LEUKOSIT DAN TNF- α PADA MENCIT PUTIH JANTAN YANG DIINDUKSI VAKSIN H5N1

Oleh :

SARAH FADHILA HS

NIM : 1811011029

(Program Studi Sarjana Farmasi)

Bromelin merupakan enzim hasil ekstrak dari tanaman nanas (*Ananas comosus*. L) yang memiliki khasiat tradisional yaitu dapat meningkatkan sistem imun. Penelitian ini bertujuan untuk melihat uji efek mikrokapsul bromelin terhadap leukosit dan kadar TNF- α pada mencit putih jantan yang diinduksi Vaksin H5N1. Hewan coba dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (Na CMC 0,5%,) kelompok II (pembanding) enzim bromelin 200 mg/kgbb, kelompok III (Uji) mikrokapsul bromelin 200 mg/kgbb. Sediaan uji diberikan peroral selama tujuh hari berturut-turut. Pada hari kedelapan, dihitung jumlah total dan persentase leukosit dan kadar TNF- α . Penentuan jumlah total dan persentase leukosit langsung dihitung dengan mengambil darah dari vena ekor. Hasil pengamatan jumlah total sel leukosit dari ketiga kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (yang hanya diberikan suspensi NaCMC), kelompok pembanding (Bromelin) dan kelompok Uji (Mikrokapsul bromelin) secara berturut-turut adalah 10.720 sel/mm³, 8.550 sel/mm³, 4490 sel/mm³ dan hasil pengukuran kadar TNF- α dari ketiga kelompok secara berturut-turut adalah 323,338 ng/L, 273,836 ng/L dan 266,718 ng/L. Hasil analisa statistik ANOVA satu arah dan uji lanjut Duncan, menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) terhadap jumlah total sel leukosit dan kadar TNF- α . Dari analisa di atas dapat disimpulkan bahwa pemberian mikrokapsul bromelin dosis 200 mg/kgbb dapat menurunkan jumlah total leukosit dan kadar TNF- α mencit putih jantan yang diinduksi Vaksin H5N1.

Kata kunci : Mikrokapsul Bromelin, TNF- α , leukosit

ABSTRACT

THE EFFECT OF BROMELIN MICROCAPSUL FORMULATION ON LEUCOCYTES AND TNF- IN MALE WHITE MICULES INDUCED TO H5N1

BY :

SARAH FADHILA HS

Student ID Number : 1811011029

(Bachelor of Pharmacy)

Bromelain is an enzyme extracted from pineapple plant (*Ananas comosus*. L) which has traditional properties, that is improve the immune system. This study intends to see the effect of bromelain microcapsule formulation on leukocytes and the levels of TNF- α in male white mice that exposed by the H5N1 Vaccine. Experimental animals were divided into three groups, specifically a negative control group (Na CMC 0.5%), group II (comparison) 200 mg/kgbw bromelain enzyme, group III (test) 200 mg/kgbw bromelain microcapsules. The test preparation was given orally for seven consecutive days. On the eighth day, the total amount and the percentage of leukocytes and the levels of TNF- α were counted. Determination of the total amount and the percentage of leukocytes were directly calculated by taking blood from the tail vein. The observation results of the total amount of leukocytes on the three groups, specifically the negative control group (which was only given NaCMC suspension), the comparison group (bromelain) and the test group (bromelain microcapsules), respectively were 10,720 cells/mm³, 8,550 cells/mm³, 4,490 cells/mm³ and the measurement result of the levels of TNF- α on the three groups respectively were 323,338 ng/L, 273,836 ng/L and 266.718 ng/L. The statistical analysis results of the one-way ANOVA and Duncan test showed a significant difference ($p < 0.05$) on the total amount of leukocytes and the levels of TNF- α . As the above analysis it can be concluded that the providing of bromelain microcapsules at a dose of 200 mg/kgbb can reduce the total amount of leukocytes and the levels of TNF- α in male white mice that exposed by the H5N1 Vaccine. Key words : Bromelain microcapsules, TNF-, leukocytes

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN PEMBIMBING	iii
LEMBAR PENGESAHAN PENGUJI	iv
KATAPENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tinjauan Umum	6
2.1.1. Klasifikasi nanas	6
2.1.2. Karakteristik Enzim Bromelin	7
2.1.3. Aktivitas Enzim Bromelin	7
2.1.4. Struktur Enzim Bromelin	8
2.1.5. Bioaktivitas Enzim Bromelin	9
2.1.6. Khasiat bromelin	10
2.2. tinjauan imunologi	10
2.2.1. Sistem imun	10
2.2.2. sel fagosit	11
2.2.3. fagositosis	12
2.2.4. leukosit	14
2.2.5. Neutrofil	14

2.2.6.	eosinofil	15
2.2.7.	basofil	16
2.2.8.	limfosit	16
2.2.9.	monosit	17
2.3.	inflamasi	18
2.3.1	Tanda-tanda inflamasi	18
2.3.2	tipe inflamasi	19
2.3.3.	mediator inflamasi	21
2.3.4	mekanisme inflamasi	23
2.4.	Virus Avian Inluenza (H5N1)	24
2.5	Mikroenkapsulasi	26
2.7.	Elisa	31
III.	PELAKSANAAN PENELITIAN	36
3.1.	Waktu dan Tempat Penelitian	36
3.2.	Metode penelitian	36
3.3.	Alat, Bahan dan Rancangan Penelitian	36
3.3.1.	Alat	36
3.3.2.	Bahan	37
3.4.	Prosedur Kerja	37
3.4.1.	Pemeriksaan Bahan	37
3.4.2.	Pembuatan sediaan uji	37
3.4.3.	Pembuatan mikrokapsul	38
3.4.4.	Evaluasi Mikrokapsul	38
3.4.5.	Penyiapan hewan percobaan	39
3.4.6.	Penentuan dosis	40
3.4.7.	Penyiapan suspensi mikrokapsul	40
3.4.8.	Pemberian sediaan uji	40
3.4.9.	Perhitungan persentase Sel Leukosit	41
3.4.10.	Menghitung jumlah sel leukosit	52
3.4.11.	Pengukuran kadar TNF- α	42

3.5. Analisis Data	42
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	43
V. KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1 Kesimpulan	51
5.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Mekanisme terjadinya fagositosis (28)	13
Gambar 2. (a) Neutrofil segmen dan (b) neutrofil batang(40)	15
Gambar 3. Eosinofil(40)	16
Gambar 4. Basofil(40)	16
Gambar 5. Limfosit (40)	17
Gambar 6. Monosit(40)	17
Gambar 7. Metabolisme asam arakidonat dan perannya dalam proses inflamasi (13)	24
Gambar 8. Spektroskopi FT-IR Sampel dan Mikrokapsul Brmelin	43
Gambar 9. Grafik jumlah leukosit mencit putih jantan yang diinduksi Vaksin H5N1 dan setelah pemberian sediaan mikrokapsul bromelin	47
Gambar 10. Grafik persentase total sel leukost mencit putih jantan yang diinduksi Vaksin H5N1 setelah pemberian sediaan mikrokapsul bromelin	49
Gambar 11. Grafik kadar TNF α mencit putih jantan yang diinduksi Vaksin H5N1 setelah pemberian sediaan mikrokapsul bromelin	49
Gambar 12. Grafik kadar TNF- α mencit putih jantan setelah pemberiaan sediaan mikrokapsul bromelin	Error! Bookmark not defined.
Gambar 13. Proses pembuatan mikrokapsul	70
Gambar 14 mikrokapsul bromelin	70
Gambar 15 sediaan suspensi bromelin	70
Gambar 16. Moisture balance	70
Gambar 17. Magnetik Stirrer	70
Gambar 18 Mencit diberi sediaan uji	70
Gambar 19 Gambar leukosit mencit putih jantan dibawah mikroskop optilab	71
Gambar 20. Limfosit B. Neutrofil segmen C. Neutrofil batang D. Monosit E. Eusinofil	71
Gambar 21. Skema kerja pengaruh formulasi mikrokapsul bromelin terhadap leukosit dan TNF- α Pada mencit yang diinduksi Vaksin H5N1	73

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Rancangan formula mikrokapsul enzim bromelain	37
Tabel 2 pemberian sediaan uji	41
Tabel 3 Hasil pemeriksaan mikrokapsul secara organoleptis	59
Tabel 4 Hasil evaluasi berat mikrokapsul	59
Tabel 5 data hasil evaluasi FT-IR	59
Tabel 6. Data Evaluasi Distribusi Ukuran Partikel dengan PSA	59
Tabel 7. Hasil pemeriksaan kandungan air dengan moisture balance	60
Tabel 8. Hasil % loading, % yield	60
Tabel 9. Jumlah leukosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang diinduksi vaksin H5N1	61
Tabel 10. Persentase jenis leukosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	61
Tabel 11. Kadar TNF- α Mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin	62
Tabel 12. uji normalitas jumlah leukosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	63
Tabel 13. Uji Anova satu arah jumlah leukosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	63
Tabel 14. Uji lanjut duncan jumlah leukosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	63
Tabel 15. Uji normalitas persentase eosinofil mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1	64
Tabel 16. Uji Anova satu arah persentase eosinofil mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	64
Tabel 17. Uji lanjut duncan persentase eosinofil mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	64
Tabel 18. Uji normalitas persentase neutrofil batang mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	65
Tabel 19. Uji ANOVA persentase neutrofil batang mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	65

Tabel 20. uji lanjut duncan persentase neutrofil batang mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	65
Tabel 21. Uji normalitas persentase neutrofil segmen mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	66
Tabel 22. uji ANOVA persentase neutrofil segmen mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	66
Tabel 23. uji lanjut duncan persentase neutrofil segmen mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	66
Tabel 24. uji normalitas persentase Limfosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	67
Tabel 25. uji ANOVA persentase Limfosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	67
Tabel 26. uji lanjut duncan persentase Limfosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1	67
Tabel 27. uji normalitas persentase monosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1	68
Tabel 28. uji Anova satu arah persentase monosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1	68
Tabel 29. uji lanjut duncan persentase monosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1	68
Tabel 30. uji normalitas kadar TNF- α mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1	69
Tabel 31. uji ANOVA kadar TNF- α mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1	69
Tabel 32. uji lanjut duncan kadar TNF- α mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1	69

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil evaluasi mikrokapsul bromelin	59
Lampiran 2. Tabel hasil uji parameter antiinflamasi	61
Lampiran 3. Hasil analisis statistik	63
Lampiran 4. Dokumentasi penelitian	70

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sistem pertahanan tubuh atau disebut juga dengan sistem imun merupakan suatu sistem yang bertanggung jawab melindungi tubuh dari benda-benda asing yang masuk sehingga tubuh tidak terganggu. Sistem kekebalan tubuh terdiri dari sistem kekebalan tubuh alamiah dan sistem kekebalan tubuh buatan yang dapat diperoleh dari imunisasi. Sistem kekebalan alamiah saja tidak cukup untuk melawan infeksi yang masuk ke tubuh, dengan bantuan sistem kekebalan tubuh buatan dapat meningkatkan fungsi pertahanan tubuh terhadap infeksi (1). Pertahanan tersebut terdiri dari sistem imun spesifik (adaptive/acquired) dan sistem imun nonspesifik (natural/innate)(2). Sistem imun spesifik membutuhkan waktu untuk mengenal antigen tersebut sebelum meresponnya. Sedangkan sistem imun nonspesifik memberikan respons secara langsung dan merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan dari berbagai mikroorganisme (2).

Sel sistem imun yang penting dalam hubungannya dengan inflamasi dan pertahanan tubuh adalah neutrofil, eosinofil, basofil, sel mast, sel histiosit, sel dendrit perifer (DC), monosit/makrofag, sel T, sel B, dan sel NK. Sel-sel ini mempunyai reseptor yang merupakan molekul pada permukaan sel yang mampu membuat sel berinteraksi dengan molekul atau sel lain. Reseptor ini akan merefleksikan fungsi sel, contohnya sel mast yang berperan dalam radang imediat. Sel mast memiliki reseptor untuk komplemen (C3a dan C5a) dan untuk bagian Fc dari molekul antibodi IgE dan IgG. Permeabilitas dan dilatasi pembuluh darah meningkat yang disebabkan oleh aktivasi dan sekresi substansi dari stimulasi reseptor yang merupakan awal dari respon inflamasi (3)

Inflamasi adalah mekanisme pertahanan yang sangat penting bagi tubuh. Inflamasi atau peradangan merupakan respon tubuh terhadap rangsangan yang berbahaya, seperti patogen, sel-sel yang rusak, atau senyawa beracun(4). Proses inflamasi diawali saat adanya kerusakan pada sel atau jaringan sehingga

menyebabkan membran fosfolipid dikonversi oleh fosfolipase A2 menjadi asam arakidonat. Asam arakidonat kemudian dikonversi menjadi prostaglandin, prostasiklin, dan tromboksan melalui jalur COX(5). Jika sistem imun mengalami gangguan maka diperlukannya senyawa berupa imunomodulator. Imunomodulator merupakan substansi yang dapat memperbaiki sistem imun (6). Mekanisme imunomodulator adalah dengan cara mengembalikan fungsi imun yang terganggu (imunorestorasi), memperbaiki fungsi sistem imun (imunostimulasi), dan menekan respon imun (imunosupresi). Oleh sebab itu, senyawa bioaktif dibutuhkan untuk meningkatkan aktivitas sistem imun dalam mengatasi penurunan sistem imun dan senyawa itu diperoleh dari tanaman (7).

Senyawa yang meningkatkan sistem imun dapat diperoleh dari tanaman yang memiliki aktivitas imunomodulator. Tanaman yang memiliki aktivitas imunomodulator juga dapat digunakan sebagai obat alergi, malnutrisi dan inflamasi (6). Enzim bromelin adalah enzim proteolitik sulfhidril yang diperoleh dari tanaman *Ananas Comosus* L. Buah nanas adalah tanaman yang mengandung aktivitas imunodulator tersebut yang terkandung di dalam enzim bromelin. Enzim bromelin bisa didapatkan dari batang dan buah nanas. Batang nanas merupakan salah satu bagian tanaman nanas yang jarang dimanfaatkan. Padahal dalam batang nanas terdapat banyak kandungan enzim bromelin yang tinggi(8)

Bromelin terdiri dari beberapa enzim seperti, sistein protease, peroksidase, asam fosfatase, amylase, dan kolagenase. Enzim ini mampu menguraikan protein sehingga memecah protein menjadi asam amino sehingga lebih mudah diserap oleh tubuh (9). Dalam antiinflamasi, keterkaitan enzim bromelin dengan antiinflamasi adalah dengan cara mengurangi sekresi IL-1 β , IL-6 dan TNF- α ketika sel-sel imun sudah distimulasi dalam kondisi peradangan akibat produksi sitokin(10). Cara kerja enzim proteolitik untuk tujuan terapi yaitu agen penyebab inflamasi, zat toksis dipecah serta gumpalan darah sehingga nyeri-nyeri yang dimediasi agen antiinflamasi dapat dihilangkan dengan cepat dan edema berkurang(11).

Enzim bromelin bekerja dengan cara meguraikan protein serta memutus ikatan protein sehingga didapatkan hasil berupa protein yang lebih sederhana. Proteolitik sulfhidril merupakan komponen utama dari enzim bromelin. Selain itu, peroksidase, asam fosfat, dan beberapa inhibitor protease lainnya merupakan bagian dari komponen enzim bromelin(12).

Senyawa ini menunjukkan beberapa aktivitas seperti fibrinolitik, antiedematosa, antiinflamasi, antitrombotik. Senyawa bromelin juga dapat menghambat agregasi trombosit yang reversible, sinusitis,angina ektoris, bronchitis, tromboflebitis, dan peningkatan penyerapan obat terutama antibiotik(13). Eropa dan Amerika Serikat menggunakan enzim ini sebagai obat alternative atau komplementer sebagai antirematik nonsteroid, glukokortikoid, dan agen imunomodulator. Enzim ini juga cocok digunakan untuk mengendalikan penyakit radang kronis karena toksisitasnya yang rendah.

Selain itu, salah satu cara yang tepat dilakukan untuk meningkatkan sistem imun tubuh adalah dengan vaksinasi. Vaksinasi adalah memasukkan antigen kedalam tubuh organisme. Diharapkan muncul antibodi sehingga akan kebal terhadap suatu penyakit tertentu seperti jenis Vaksin H5N1 yang dipakai untuk vaksinasi unggas.

Dalam mengobati inflamasi, pada umumnya masyarakat menggunakan obat antiinflamasi dari golongan NSAID atau obat non steroid dan juga obat antiinflamasi steroid(14). Selain itu masyarakat juga banyak menggunakan obat antiinflamasi kimia yang memiliki efek yang cepat namun memiliki efek samping yang dapat membahayakan. Produksi mukosa lambung dan fungsi kardiovaskular dan ginjal dapat dipengaruhi oleh obat antiinflamasi non steroid ini (NSAID).Sedangkan obat antiinflamasi steroid terbatas dikarenakan resiko dan efek sampingnya tinggi apalagi digunakan dalam perawatan jangka panjang. Oleh sebab itu, untuk pengobatan alternatif dengan efek samping yang kecil, tumbuhan dengan kandungan antiinflamasi dapat dimanfaatkan (15).

Bromelin memiliki aktivitas enzim yang baik pada pH optimal 4,0 hingga 8,0. Aktivitas proteolitik bromelin menurun dalam cairan lambung buatan, namun relatif stabil selama 4 jam pertama. Penurunan aktivitas proteolitik bromelin diikuti deaktivasi dan degradasi cairan asam lambung dan enzim lambung. Menurut chobotova et al (2010) setelah bromelin dienkapsulasi sebagai sistem penghantaran obat yang terkendalkan, bromelin diserap kedalam usus manusia tanpa kehilangan aktivitas. Bromelin tidak stabil pada lambung, dimana lambung mempunyai pH asam berkisar 1-3 yang dapat menyebabkan protein bromelin terkoagulasi.(16).

Salah satu cara untuk menjaga stabilitas dari enzim bromelin dengan menggunakan metoda mikroenkapsulasi. Mikroenkapsulasi adalah proses dimana tetesan atau partikel yang sangat kecil dari bahan cair atau padat dikelilingi atau dilapisi dengan film kontinu dari bahan polimer. Salah satu keunggulan mikro kapsul adalah melindungi material yang tidak stabil dan sensitif dari lingkungan sebelum digunakan. Metoda yang digunakan dalam pembuatan mikro kapsul salah satunya adalah metoda emulsifikasi penguapan pelarut, serta alat-alat yang digunakan lebih sederhana dibandingkan dengan metoda yang lain.(17) Berdasarkan penelitian Ordesi *et.al* (2014), terapi bromelin yang diberikan kepada pasien pembedahan mulut terbukti mampu memberikan efek mengurangi nyeri dan pembengkakan pasca operasi (18).

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian untuk melihat pengaruh formulasi mikro kapsul bromelin terhadap leukosit dan TNF- α pada mencit pada pemberian secara oral. Parameter yang dilihat pada aktivitas antiinflamasi adalah dengan melihat pengaruh bromelin yang telah diformulasi terhadap TNF- α , mengamati pengaruh terhadap jumlah total sel leukosit dan persentase sel leukosit pada mencit.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah mikro kapsul bromelin memberikan pengaruh terhadap jumlah total leukosit mencit ?

2. Apakah mikrokapsul bromelin memberikan pengaruh terhadap persentase jenis sel leukosit mencit ?
3. Apakah formulasi mikrokapsul bromelin berpengaruh terhadap TNF- α pada mencit ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui jumlah total leukosit setelah pemberian mikrokapsul bromelin secara oral pada mencit
2. Untuk mengetahui persentase jenis sel leukosit setelah pemberian mikrokapsul bromelin secara oral pada mencit
3. Untuk mengetahui pengaruh formulasi mikrokapsul bromelin terhadap TNF- α pada mencit

1.4 Hipotesis Penelitian

1. Mikrokapsul bromelin mampu menurunkan jumlah total sel leukosit pada mencit
2. Mikrokapsul bromelin mampu menurunkan persentase jenis sel leukosit pada mencit
3. Mikrokapsul bromelin mampu menurunkan kadar TNF- α pada mencit

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani Nanas

2.1.1 Klasifikasi Nanas

Kingdom	: Plantae
Ordo	: Poales
Famili	: Bromeliaceae
Subfamili	: Beomelioideae
Genus	: Ananas
Spesies	: <i>Ananas comosus</i> L

Tanaman nanas (*Ananas comosus* (L) Merr) berasal dari family bromeliaceae. Nenas mengandung karbohidrat, lemak, protein, fosfor, zat besi, vitamin (A, B, dan C) serta enzim bromelin. Hampir semua bahagian dari tanaman nenas ini memiliki manfaat bagi manusia. Bromelin adalah suatu enzim protease sulfhidril yang tersebar pada jaringan tanaman nenas (*Ananas comosus* (L) Merr) dengan pH optimum 7 dan suhu optimum 55° C. (16)

Bromelin secara kimia ditemukan pada tahun 1875 dan digunakan secara tradisional. Bromelin tidak hanya digunakan dalam bidang medis, tapi juga digunakan dalam bidang kosmetik, makanan dan juga dalam bidang farmasi. Bromelin tergolong dalam enzim proteolitik atau disebut enzim pencerna protein yang mengkatalisa penguraian protein menjadi asam amino. Bromelin berkhasiat sebagai antiradang, mengganggu pertumbuhan sel kanker dan juga membantu melancarkan pencernaan. (16)

2.1.2 Karakteristik enzim bromelin

Bromelin memiliki titik isoelektrik dan berat molekul sebesar 10 dan 38 kDa. Bromelin ini bersifat tidak stabil dan mengalami penurunan aktivitas serta menghambat efek farmakologi yang dihasilkan pada kondisi tertentu dan memiliki aktivitas pada pH 5,5-8. Bromelin memiliki beberapa sifat yang terdiri dari terbentuknya larutan koloidal terhadap air, sangat sukar larut dalam NaCl 0,1 N dan aseton serta praktis tidak larut dalam alkohol. (16)

Suhu optimum enzim bromelin yaitu pada temperature 65° C. Enzim Bromelin mengalami degradasi jika terjadi peningkatan suhu. Perubahan warna menjadi gelap disebabkan oleh suhu yang tinggi dan lamanya penyimpanan sehingga juga menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas enzim bromelin. Bromelin harus disimpan ditempat tertutup dan tidak terkena cahaya matahari. (16)

2.1.3. Aktivitas Enzim Bromelin

Aktivitas enzim bromelin sangat ditentukan oleh beberapa kondisi seperti suhu, pH, dan konsentrasi. Peningkatan kecepatan reaksi dan inaktivasi enzim disebabkan oleh meningkatnya suhu. Sedangkan pH akan memberikan aktivitas enzim maksimum jika berada pada pH optimum (20). Menurut Kamaunang dan Kamu (2011), aktivitas enzim meningkat ketika berada pada suhu 55 -65°C. Pada suhu 65°C aktivitas enzim menunjukkan nilai 0,071 unit/menit, sedangkan peningkatan aktivitas enzim mulai teramati dari pH 5,0-6,5 yaitu sebesar 0,101 unit/menit dan merupakan nilai pH optimum (19).

Aktivitas suatu enzim dalam upaya mengkatalis reaksi dipengaruhi beberapa faktor, yaitu :

a. Konsentrasi enzim

Kecepatan reaksi enzimatik bertambah pada saat bertambahnya konsentrasi enzim pada suatu konsentrasi substrat tertentu. (20)

b. Konsentrasi substrat

Pada konsentrasi enzim konstan bertambahnya konsentrasi substrat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik. Pada konsentrasi tertentu terjadi peningkatan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat bertambah.(20)

c. Suhu

Reaksi kimia akan berlangsung lambat ketika suhu rendah sedangkan pada suhu tinggi reaksi kimia akan berlangsung dengan cepat. Denaturasi enzim terjadi ketika suhu melewati batas optimum sehingga terjadi penurunan kecepatan reaksi. Menurut hasil penelitian Maureen, enzim bromelin memiliki suhu optimum pada temperature 65°C dengan aktivitas 0,071 unit/ menit, sedangkan pada temperature 70-80°C terjadi penurunan aktivitas enzim. Hal ini disebabkan karena terjadinya denaturasi enzim dengan cepat pada rentang tempertur 70-80°C.(21)

d. Derajat keasaman (pH)

Perubahan pH yang dipengaruhi oleh lingkungan akan mempengaruhi aktivitas sisi aktif dari suatu enzim. pH lingkungan juga mempengaruhi struktur suatu enzim.suatu enzim dapat bermuatan positif, negatif maupun bermuatan ganda yaitu positif dan negatif.(20) Enzim bromelin memiliki aktivitas pH yaitu 5,5-8.(13)

e. Inhibitor

Inhibitor dapat menurunkan kecepatan reaksi enzimatik. Dengan adanya kompleks enzim inhibitor aktivitas akan menurun terhadap substratnya. (20)

2.1.4. Struktur enzim bromelin

Senyawa enzim bromelin (Gambar 1) termasuk kedalam golongan sulfhidril yang didalamnya terkandung enzim proteolitik. Selain itu, terdapat senyawa yang dapat mengikat kalsium , peroksida, asam fosfat dan beberapa protease inhibitor. Enzim bromelin menghidrolisis Protein yang mengandung ikatan peptida menjadi asam amino yang lebih sederhana.Maka endopeptidase secara khusus memotong ikatan peptida pada gugus karbonil seperti ditemukan dalam ariginine atau asam amino aromatik yaitu fenilalanin atau tirosin. Senyawa bromelin termasuk golongan glikoprotein yaitu

protein yang mengandung satu bagian oligosakarida pada tiap molekul, yang akan berikatan secara kovalen dengan rantai polipeptida enzim (22).

Bromelin memiliki geometri dan reaktifitas sisi aktif yang berbeda disebabkan oleh Cys-25 yang berfungsi sebagai high saddle point. High saddle point akan membagi sisi aktif menjadi dua bagian sisi lengkungan yang mengakibatkan bromelin lebih sulit untuk diinaktivasi oleh inhibitor E-64 (23). Untuk penghambatan dan rantai samping Leu-13 mengikat ke celah aktif dalam target proteinase diperlukan struktur kimia residu leusin. Sedangkan Pro-12 berfungsi untuk mengatur sisi samping leusin. Faktor paling penting pada penghambatan bromelin adalah Pro-12 dan Leu-7 13 yang berasal dari bromelin. Hasil analisa tersebut berbeda dengan mekanisme protease sistein pada umumnya yaitu sisi aktif terdapat pada sistein. Bromelin menghidrolisis protein pada sisi karbonil dari lisin, alanin, tirosin dan glisin (24).

2.1.5 Bioaktivitas Enzim Bromelin

Enzim bromelin memiliki khasiat sebagai antiinflamasi dengan cara pembentukan prostaglandin proinflamasi diperlambat, reseptor permukaan sel seperti hyaluronan CD44 dan kadar fibrinogen plasma dikurangi. Aktivitas fibronolitik yang akan menginduksi proinflamasi Azdan prostaglandin antiinflamasi juga dapat ditingkatkan oleh bromelin(25).

Bromelin memiliki sifat antitrombotik dan antikoagulan dan juga mengurangi agregasi trombosit(25). Terhambatnya apoptosis sel yang disebabkan oleh meningkatnya fosforilasi AKT yang berasal dari bromelin. Penggumpalan trombosit dan juga pembentukan thrombus dihambat oleh bromelin(25). Bromelin dapat sebagai anti hipertensi dan dapat mengurangi angina(26).

Enzim bromelin juga memiliki sifat sebagai antikanker dengan mematikan sinyal gen esensial NF KappaB, menekan ekspresi Cox-2, meningkatkan regulasi p53(27). Bromelin juga menunjukkan aktivitas anti-metastatis dengan cara mengecilkan ukuran tumor dan mengurangi kerusakan sel(28)(29).

2.1.6 Khasiat Bromelin

Bromelin memiliki aktivitas farmakologis antara lain, sebagai antiinflamasi, antibiotik, anti kanker, antikoagulan, dan antitrombotik. Beragam industri juga menggunakan bromelain dalam industri makanan, tekstil dan kosmetik(30). Manfaat terapi lainnya dari bromelin adalah penghambatan agregasi platelet, trauma bedah, tromboflebitis, pyelonefritis, angina pectoris mengatasi sinusitis, dan bronkitis(13). Enzim bromelin juga mengatur aktivitas berbagai sel imun dan produksi sitokin, memodulasi fungsi darah dan molekul yang terlibat dalam adhesi sel endotel(9). Bromelin bisa diserap di usus manusia tanpa mengalami degradasi dan kehilangan aktivitas biologisnya. Bromelin di Amerika dan Eropa telah dipertimbangkan sebagai suplemen kesehatan dan tersedia untuk umum di toko makanan sehat maupun apotek(13). Bromelin direkomendasikan untuk mencegah pembentukan edema, penyembuhan luka bakar dan pengurangan edema. Dalam kosmetik, bromelin digunakan sebagai bahan aktif dalam produk perawatan kulit, karena sifat pengelupasannya yang dapat mengurangi ketebalan stratum korneum sehingga efektif dalam pencegahan dan pengobatan selulit(16). Dalam kaitannya dengan antiinflamasi, bromelin berperan dengan cara mengurangi sekresi IL-1 β , IL-6 dan TNF- α ketika sel-sel imun sudah distimulasi dalam kondisi peradangan akibat produksi sitokin. Bromelin juga mengurangi ekspresi INF- γ dan TNF- α pada penyakit radang usus(10). Sebagai enzim proteolitik bromelin bekerja dengan memecah zat toksik dan agen penyebab inflamasi serta memecah gumpalan darah sehingga nyeri yang dimediasi agen inflamasi dihilangkan lebih cepat dan terjadi pengurangan edema(11).

2.2 Tinjauan Imunologi

2.2.1 Sistem Imun

Sistem imun merupakan kumpulan mekanisme dalam suatu makhluk hidup yang melindunginya terhadap infeksi dengan mengidentifikasi dan membunuh substansi patogen. Sistem imun terdiri dari jejaring kompleks, berupa sel, sitokin, jaringan limfoid, dan organ, yang bekerja sama dalam mengeliminasi bahan infeksius

dan antigen lain. Antigen yang merupakan substansi yang menimbulkan respon imun antara lain, bakteri, virus, serbuk sari, dan jaringan transplantasi(3).

Respon imun berdasarkan mekanismenya dapat dikategorikan menjadi dua tipe yaitu, respon imun alami (non-spesifik) dan respon imun adaptif (spesifik). Respon imun alami atau bawaan dianggap sebagai garis pertahanan pertama tanpa antigen khusus. Komponen imunitas utamanya terdiri dari komplemen, neutrofil, makrofag, dan sel pembunuh alami (NK). Sedangkan respon imun adaptif atau spesifik ditandai dengan adanya antigen spesifik. Respon imun adaptif akan meningkat sesudah terpapar oleh suatu bahan patogen dan meningkat pada tiap paparan selanjutnya oleh antigen yang sama. Pada respon imun adaptif komponen dasar yang terpenting adalah sel B yang memproduksi antibodi dan sel T sebagai sistem imunitas seluler(31).

Sel sistem imun yang penting dalam kaitannya dengan inflamasi dan pertahanan tubuh. Sel tersebut adalah neutrofil, eosinofil, basofil, sel mast, sel histiosit, sel dendritik perifer (DC), neutrofil, monosit/makrofag, sel T, sel B dan sel NK. Sel-sel ini mempunyai reseptor yang merupakan molekul pada permukaan sel yang mampu membuat sel berinteraksi dengan molekul atau sel lain. Reseptor ini akan merefleksikan fungsi sel, contohnya sel mast yang berperan dalam radang imediat (segera). Sel mast memiliki reseptor untuk komplemen (C3a dan C5a) dan untuk bagian Fc dari molekul antibodi IgE dan IgG. Stimulasi reseptor ini menyebabkan aktivasi dan sekresi substansi yang meningkatkan permeabilitas dan dilatasi pembuluh darah, yang merupakan awal dari respon inflamasi(3).

2.2.2 Sel Fagosit

Fagosit adalah salah satu sel sistem imun yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh dengan cara fagositosis yang dapat mencerna mikroba patogen seperti bakteri dan virus. Organel yang paling banyak menyusun fagosit adalah lisosom. Sel profesional fagosit terdiri dari, monosit, makrofag, neutrofil, sel dendritik, osteoklas, dan eosinofil. Sel-sel ini berperan dalam menelan mikroorganisme dan menyerahkannya ke sel-sel pada sistem imun adaptif (32).

Sel fagosit berasal dari sel punca (stem) pluripoten dalam sumsum merah tulang. Neutrofil, monosit, dan makrofag merupakan sel yang cukup efisien dalam fagositosis(3). Neutrofil adalah sel efektor penting dalam respon imun alami. Sel neutrofil akan menanggapi setiap tanda-tanda infeksi mikroorganisme dan dengan cepat merespons untuk membunuh patogen yang menyerang. Neutrofil memiliki tiga fungsi utama yaitu, berperan dalam fagositosis, degranulasi, dan pelepasan ekstraseluler neutrofil (NET) (33).

Sementara itu, makrofag juga bekerja sebagai sel efektor dari respons imun dengan cara memfagosit mikroorganisme, terutama bila telah diselubungi dengan IgG, atau dengan IgM, dan komponen C3b dari komplemen. Makrofag sangat penting pada stadium inisiasi dan efektor dari respons imun. Peran makrofag lainnya adalah pada efek sistemik dari inflamasi, misalnya demam yakni melalui pelepasan interleukin-1 (pirogen)(34).

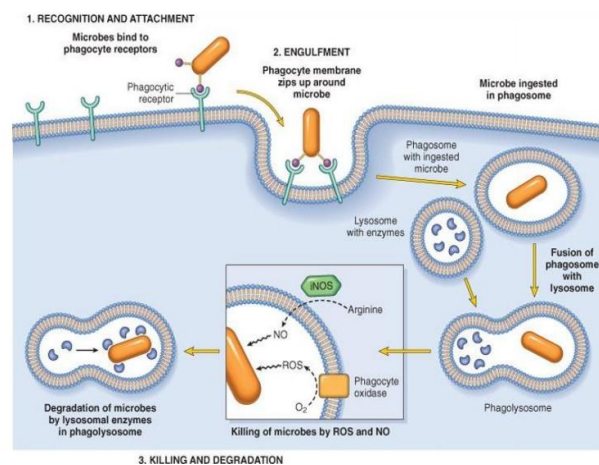
2.2.3 Fagositosis

Fagositosis didefinisikan sebagai proses mencerna sel-sel partikel berukuran $\geq 0,5\text{-}\mu\text{m}$. Proses fagositosis melibatkan pengikatan agen infeksius oleh reseptor di permukaan sel. Benda asing seperti bakteri atau jamur dapat dihilangkan pada lokasi infeksi oleh fagosit profesional seperti neutrofil, makrofag, dan sel dendritik (35).

Fagositosis dilakukan dalam fagosom, suatu vakuola yang struktur membrannya tidak jelas dan berisi bahan patogen. Pada plasma membran sel fagosit terdapat reseptor, yang dibedakan menjadi reseptor non-opsionik dan opsionik (32). Oponisasi ini adalah sebuah mekanisme untuk melapisi patogen dengan suatu molekul antibodi atau protein komplemen yang membuat fagosit dapat mengikat dan mencerna patogen tersebut(3). Reseptor non-opsonik dapat mengenali langsung kelompok molekuler pada permukaan target fagositosis, sebagai contoh yaitu Dectin-1, yang merupakan reseptor untuk jamur beta-glukan. Sedangkan reseptor opsonik mengenali opsonin yang diturunkan dari inang yang terikat pada partikel asing dan

menargetkannya untuk dicerna. Oponin termasuk antibodi, komplemen, fibronektin, manosa binding lectin, dan globulin lemak susu (lactadherin) (32).

Saat sistem imun telah melakukan opsonisasi, selanjutnya proses fagositosis dilanjutkan dengan penyatuan membran plasma sel fagosit dengan permukaan mikroorganisme. Kemudian terjadi perluasan membran plasma (pseudopodia) dan sel fagosit menelan patogen. Terbentuk fagosom yang menyatu dengan lisosom sehingga patogen dapat dicerna oleh enzim pencernaan yang sesuai (misalnya lisosim) dan bahan kimiawi bakterisidal. Saat mikroba dapat dicerna, mikroba ini akan dapat dibunuh. Fagosit membunuh bakteri dengan dua mekanisme, yaitu mekanisme berdasarkan reduksi oksigen yang dinamakan mekanisme oksidatif dan mekanisme non-oksidatif. Mekanisme oksidatif membutuhkan keberadaan oksigen, potensi oksidasi reduksi. Sedangkan mekanisme non-oksidatif membutuhkan penyatuan fagosom dan lisosom membentuk fagolisosom yang menghasilkan sekresi komponen lisosom ke dalam fagolisosom. Neutrofil mempunyai dua macam lisosom atau granula. Granula yang pertama adalah granula spesifik untuk sekresi ekstraseluler dan intrafagolisosom dan yang kedua adalah granula azurofil terutama untuk sekresi intrafagolisosom. Bahan yang dicerna dikeluarkan dari sel (eksositosis) (3). Mekanisme terjadinya fagositosis dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Mekanisme terjadinya fagositosis (28)

2.2.4 Leukosit

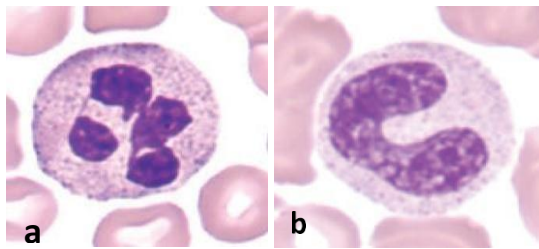
Sel-sel darah terdiri dari sel darah merah, sel darah putih, dan keping darah atau trombosit. Jenis sel darah yang digunakan sebagai mediator respons imun terhadap infeksi atau rangsangan peradangan lainnya adalah leukosit. Leukosit atau sel darah putih memiliki ciri khas sel yang berbeda-beda, ukurannya lebih besar dari eritrosit, tidak berwarna dan dapat melakukan pergerakan dengan bantuan kaki semu (pseudopodia) dengan masa hidup 13-20 hari(36). Jumlah total leukosit dalam darah normal adalah 5000-10000 sel/mm darah. Leukosit berfungsi melindungi tubuh terhadap invasi bakteri atau benda asing lainnya (37).

Leukosit dibagi menjadi dua kelompok utama yaitu granulosit yang memiliki butiran/granula yang khas (basofil, neutrofil, eosinofil) dan agranulosit yang tidak memiliki butiran/granula (limfosit dan monosit) (38). Jumlah leukosit dapat memberikan informasi terkait infeksi dan proses penyakit. Neutrofil adalah salah satu sel leukosit yang berperan pada reaksi peradangan, namun relatif berumur pendek. Selanjutnya eosinofil dan basofil berfungsi sebagai tempat penyimpanan berbagai material biologis seperti histamin, serotonin, dan heparin. Pelepasan senyawa tersebut akan mempengaruhi suplai darah ke jaringan, seperti yang terjadi saat peradangan. Sel eosinofil juga membantu mekanisme pertahanan tubuh. Sedangkan monosit yang merupakan leukosit terbesar berperan sebagai fagositosis. Pada limfosit fungsi utamanya adalah menghasilkan substansi yang membantu penyerangan benda asing. Limfosit terbagi menjadi dua jenis, yaitu limfosit T yang membunuh secara langsung atau dengan menghasilkan berbagai limfokin (substansi yang memperkuat aktivitas sel fagosit) dan limfosit B yang menghasilkan antibodi (protein fagosit) yang akan menghancurkan benda asing(39)

a. Neutrofil

Neutrofil ditemukan 65-75% pada leukosit dalam darah manusia. Neutrofil adalah fagosit aktif dan menghancurkan organisme kecil, terutama

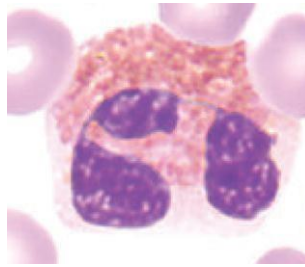
bakteri. Sel ini ditemukan dalam bentuk butiran kecil padat di dalam sitoplasma. Neutrofil memiliki nukleus memanjang dan biasanya terdiri dari tiga hingga lima lobus (inti polimorfik). Terdapat dua jenis granula ditemukan dalam neutrofil, yaitu azurophilic dan spesifik granula. Granula azurophilic berinti padat adalah lisosom, sedangkan granula spesifik berukuran lebih kecil, lebih banyak, dan memiliki fungsi antibakteri. Gambar neutrofil segmen dan neutrofil batang dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. (a) Neutrofil segmen dan (b) neutrofil batang(40)

b. Eosinofil

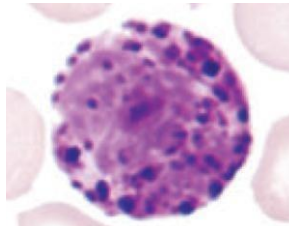
Eosinofil atau asidofil ditemukan 2-5% dari leukosit dalam darah manusia. Granula eosinofil terdapat di sitoplasma. Nukleus tampak seperti kacang atau berlobus. Latar belakang sitoplasma biasanya bernoda ringan. Eosinofil membantu menghancurkan parasit dan memodulasi alergi respon inflamasi. Granula dari eosinofil adalah membran terbatas dan merupakan lisosom. Ukuran diameternya lebih dari $1\ \mu\text{m}$ dan biasanya berbentuk cakram bikonveks dengan karakteristik inti kristalin yang padat (38). Gambar eosinofil dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Eosinofil(40)

c. Basofil

Basofil hanya 0,5-1,0% pada leukosit manusia. Sel ini terbungkus oleh granula basofilik besar. Nukleus memiliki bentuk bulan sabit atau berlobus dan sebagian tertutup oleh granula berwarna. Granula basofil dibatasi membran, struktur internalnya bervariasi dari spesies ke spesies seperti berserat, kristal, atau padat seragam. Basofil berbeda dari sel mast atau "basofil jaringan" pada jaringan ikat. Basofil mensekresi histamin yang meningkatkan permeabilitas kapiler akibat penurunan tekanan darah (38). Basofil dapat dilihat pada Gambar 4.

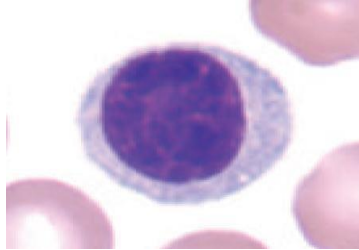


Gambar 4. Basofil(40)

d. Limfosit

Limfosit ditemukan 20-25% pada leukosit dalam darah manusia. Sel ini terdapat nodula, berbentuk besar, nukleus berbentuk bulat mengandung massa kromatin yang besar. Limfosit terbagi menjadi tiga ukuran, yaitu limfosit kecil berdiameter 6- 8 μ m, sitoplasma membentuk lapisan tipis di sekitar inti yang besar dan terdapat nodula. Limfosit ukuran sedang memiliki jumlah sitoplasma yang relatif lebih besar daripada limfosit kecil dan berukuran diameter 8-10 μ m. Sedangkan, limfosit besar hanya muncul dalam

pembentukan darah organ tetapi dapat ditemukan dalam darah yang beredar dalam kondisi patologis. Ukuran diameternya 10-12 μm . Inti berbentuk oval



atau bundar dikelilingi oleh sejumlah besar sitoplasma. Sitoplasma sedikit vakuolar dan mengandung beberapa granula azurofilik (38). Gambar limfosit dapat dilihat pada Gambar 5.

Gambar 5. Limfosit (40)

e. Monosit

Monosit adalah sel terbesar dalam aliran darah normal dan merupakan 3-6% dari leukosit. Monosit memiliki diameter 12 dan 15 μm pada manusia. Nukleus berbentuk eksentrik dan oval seperti kacang dengan pewarnaan pucat, kromatin berbentuk granular halus. Sitoplasma samar-samar basofilik, terdapat vakuola, dan granular lebih banyak daripada limfosit. Monosit meninggalkan aliran darah menjadi makrofag ke seluruh tubuh. Monosit merupakan fagosit aktif yang ditandai oleh adanya banyak vesikel dan lisosom di sitoplasma(38). Monosit dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Monosit(40)

2.3 Inflamasi

Inflamasi adalah respons lokal terhadap kerusakan jaringan akibat berbagai agen penyebab. Beberapa agen penyebab inflamasi antara lain, agen penginfeksi (bakteri, virus, dan toksin), agen imunologis (reaksi antigen-antibodi), agen fisik (panas, dingin, radiasi, trauma mekanik), dan agen kimia (racun organik dan anorganik)(31). Proses inflamasi ditandai oleh keluarnya beberapa mediator dan tanda-tanda peradangan seperti tumor (pembengkakan), calor (panas), rubor (kemerahan) dan dolor (nyeri) (34). Kemerahan yang muncul pada kulit atau disebut juga dengan eritema merupakan reaksi awal peradangan, seperti halnya dengan edema dan hiperplasia. Edema dapat diamati berupa pembengkakan, terjadi akibat akumulasi cairan yang berlebihan di bawah kulit(41).

Inflamasi terjadi akibat pelepasan mediator kimiawi dari jaringan yang rusak dan migrasi sel. Kerusakan sel yang terjadi akibat inflamasi pada membran sel menyebabkan leukosit melepaskan enzim lisosom dan siklooksigenase (COX) dalam metabolisme asam arakhidonat sehingga menghasilkan prostaglandin yang memiliki berbagai efek pada pembuluh darah, ujung saraf, dan pada sel yang terlibat dalam peradangan (42).

2.3.1 Tanda-tanda inflamasi

1. Rubor (kemerahan) terjadi pada tahap awal proses inflamasi yang terjadi karena terdapat darah yang terkumpul di daerah jaringan yang cedera akibat dari pelepasan mediator kimia seperti prostaglandin, histamin, dan kinin. Saat reaksi radang muncul maka pembuluh darah mengalami pelebaran (vasodilatasi pembuluh darah) sehingga lebih banyak darah yang mengalir ke dalam jaringan cedera (42)

2. Tumor (pembengkakan) merupakan tahap kedua dari inflamasi yang ditandai adanya aliran ke daerah jaringan yang cedera (42).

3. Kalor (panas) muncul bersamaan dengan adanya kemerahan karena disebabkan oleh bertambahnya pengumpulan darah atau akibat pirogen yang mengganggu pusat pengaturan panas di hipotalamus (42)

4. Dolor (nyeri) terjadi melalui berbagai cara, perubahan lokal ion-ion tertentu dapat merangsang ujung saraf, timbulnya keadaan hiperglasia akibat pengeluaran zat mediator kimia tertentu seperti histamin atau zat kimia bioaktif lainnya dapat merangsang saraf, pembengkakan jaringan yang meradang mengakibatkan peningkatan tekanan lokal juga dapat merangsang saraf (42).

5. *Functio laesa*, adanya perubahan, gangguan, kegagalan fungsi telah diketahui, daerah yang bengkak dan sakit disertai adanya sirkulasi yang abnormal akibat penumpukan dan aliran darah yang meningkat juga menghasilkan lingkungan lokal yang abnormal sehingga jaringan yang mengalami inflamasi tersebut tidak berfungsi secara normal (42).

2.3.2 Tipe Inflamasi

Inflamasi berdasarkan waktu kejadiannya diklasifikasikan menjadi dua yaitu :

1) Inflamasi Akut

Inflamasi akut adalah reaksi jaringan yang segera terhadap terhadap berbagai agen penyebab dan dapat berakhir dalam beberapa jam sampai beberapa hari (34). Inflamasi akut ditandai dengan adanya akumulasi cairan dan plasma di lokasi yang terdampak, aktivasi trombosit secara intravaskular, dan keluarnya sel inflamasi (neutrofil polimorfonuklear)(31). Respon inflamasi akut melalui tiga proses yaitu, perubahan diameter pembuluh darah, peningkatan permeabilitas vaskuler dan pembentukan cairan eksudat, serta pembentukan eksudat seluler berupa migrasi neutrofil polimorfonuklear ke dalam rongga ekstrasvaskular. Adanya komponen seluler yaitu neutrofil polimorfonuklear, merupakan bagian penting untuk histopatologi radang akut (34).

2) Inflamasi kronis

Inflamasi kronis adalah suatu proses yang telah berlangsung lama dimana kerusakan jaringan dan inflamasi terjadi pada saat yang bersamaan. Inflamasi kronis disebabkan oleh tiga hal yaitu, radang yang muncul setelah peradangan akut akibat kerusakan jaringan meluas, serangan berulang peradangan akut (misalnya, infeksi akut kandung empedu berulang yang menyebabkan kolesistitis kronis), dan peradangan kronis sejak awal akibat organisme patogen (contohnya, *Mycobacterium tuberculosis*)(31).

Beberapa hal yang menandakan suatu peradangan kronis antara lain, infiltrasi sel mononuklear seperti fagosit, limfosit, sel plasma, eosinofil, dan sel mast. Pada inflamasi kronis, limfosit dan makrofag saling mempengaruhi dan melepaskan mediator inflamasi. Selain itu, nekrosis jaringan juga terjadi pada inflamasi kronis. Hal ini terjadi akibat makrofag aktif dan melepaskan berbagai molekul biologis seperti protease, sitokin, dan angiogenesis growth factor. Sebagai akibat dari nekrosis, proliferasi pembuluh darah kecil dan fibroblas terstimulasi dan mengakibatkan pembentukan jaringan granulasi radang. Oleh karena itu, penyembuhan oleh fibrosis dan kolagen terjadi(31).

Inflamasi mewakili suatu mekanisme yang terorganisir dan respon dinamis dari bagian seluler maupun vaskular dengan sekresi humoral spesifik. Jalur ini melibatkan perubahan fisik lokasi sel darah putih (monosit, basofil, eosinofil, dan neutrofil), plasma, dan cairan pada situs radang. Sekelompok mediator dan molekul pemberi sinyal lain (mis., histamin, prostaglandin, leukotrien, oksigen dan nitrogen yang diturunkan dari radikal bebas, dan serotonin) dilepaskan oleh sel sistem kekebalan tubuh terutama dalam mekanisme yang bisa berkontribusi terhadap peradangan (39)

2.3.3 Mediator Inflamasi

a. Histamin

Histamin (β -imidazolyethylamine) merupakan vasodilator, konstriktor otot polos, stimulant kuat pada permeabilitas pembuluh darah, *mucus* (lendir) pernafasan, dan sekresi asam lambung. Histamin ini memiliki beragam efek pada berbagai sel termasuk otot polos, kelenjar sel (endokrin dan eksokrin) darah, neuron, dan sistem kekebalan tubuh. Histamin juga dapat menggerakkan reseptor H₂ yang dimediasi aktivitas anti-inflamasi termasuk penghambatan pelepasan histamin yang dimediasi IgE dari leukosit perifer, dan aktivasi *suppressor lymphocytes* T(43)

b. Leukotrien

Leukotriene (LT) C₄ dan produk-produknya yang dikenal sebagai zat anafilaksis bereaksi lambat seperti LTD₄ dan LTE₄. Leukotrien dihasilkan oleh sebagian besar tipe sel yang berpartisipasi dalam reaksi peradangan termasuk sel mast, basofil, eosinofil, neutrofil, dan monosit. Leukotrien memiliki aktivitas biologis mirip dengan histamin dan leukotriene juga sebagai bahan kimia mediator peradangan. Leukotrien berasal dari asam arakidonat, yang berasal dari membran sel fosfolipid oleh aksi fosfolipase A₂ atau secara berurutan aksi fosfolipase C dan diasilgliserol lipase(43).

c. Prostaglandin

Kelompok lain dari molekul yang diturunkan asam arakidonat yang memediasi reaksi alergi adalah prostaglandin. Prostaglandin merupakan produk cyclooxygenase paling melimpah yang dihasilkan oleh aktivasi imunologis sel mast paru manusia yakni PGD₂. PGD₂ dihasilkan oleh sel mast manusia setelah diaktifkan melalui reseptor IgE atau oleh calcium ionophore. Efek biologis prostaglandin termasuk diantaranya, modulasi kontraktilitas otot polos, permeabilitas vaskular, sensasi pruritus dan nyeri, agregasi dan degranulasi trombosit. Prostaglandin dihasilkan oleh cyclooxygenase, suatu enzim yang terkait dengan retikulum endoplasma sel mast. Mirip dengan 5-lipoxygenase, cyclooxygenase mengkatalisasi pembentukan zat antara yang relatif

tidak stabil PG2 dan PGH2. Zat intermediet ini kemudian dikonversi secara nonenzimatik atau enzimatik dengan isomerase/peroksidase spesifik atau enzim sintase untuk menghasilkan prostaglandin primer PGD2, PGE2, dan PGFa (43)

d. Sitokin

Dalam peristiwa inflamasi pada fase akhir sitokin memainkan peranan penting yang terkait dengan asma dan rhinitis alergi dan sel mast adalah sumber dari banyak sitokin multifungsi. Sitokin seperti IL-1, -2, -4, -5, -6 dan TNF- α , dan GM-CSF mempengaruhi jalannya peradangan alergi dengan memodulasi aktivitas sel inflamasi termasuk sel T, makrofag, sel B dan eosinophil.

Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) adalah salah satu sitokin pleiotropik yang memiliki peran dalam proses inflamasi, menginisiasi polymorphonuclear (PMN) dan mengaktifkannya sehingga PMN dapat mencapai tempat infeksi (44). TNF disebut TNF- α atas dasar historis dan untuk membedakannya dengan TNF- β atau limfotoksin. Fagosit mononuclear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK, dan sel mast merupakan sumber utama dari TNF- α (45).

TNF- α memiliki beberapa fungsi dalam proses inflamasi, yaitu dapat meningkatkan peran pro trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, berperan dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan merangsang factor pertumbuhan dan sitokin lain, berfungsi sebagai regulator dari hematopoetik serta komitogen untuk sel T dan sel B serta aktivitas sel neutrofil dan makrofag. TNF- α juga memiliki fungsi tambahan yang menguntungkan termasuk peranannya dalam respon imun terhadap bakteri, virus, jamur dan invasi parasit (44).

Sistem Imun berpengaruh terhadap tinggi dan rendahnya kadar TNF- α . Ketika sistem imun menurun maka tubuh akan lebih mudah terserang penyakit. Hal ini disebabkan oleh kemampuan imunitas tubuh yang lemah untuk melawan infeksi sehingga menyebabkan TNF- α diproduksi secara berlebihan dan kadar TNF- α meningkat (44).

Sitokin dalam hipotalamus menstimulasi pelepasan hormone yang mengeluarkan corticotropic dan menginduksi demam. TNF- α menginduksi vasodilatasi dan hilangnya permeabilitas vaskuler yang menyebabkan infiltrasi sel limfosit, neutrofil dan monosit. Sekresi sitokin pro-inflamasi yang berlebihan berpengaruh pada keparahan gejala klinis yang ditimbulkan oleh virus HPAI antara lain menyebabkan peradangan pada paru-paru (46).

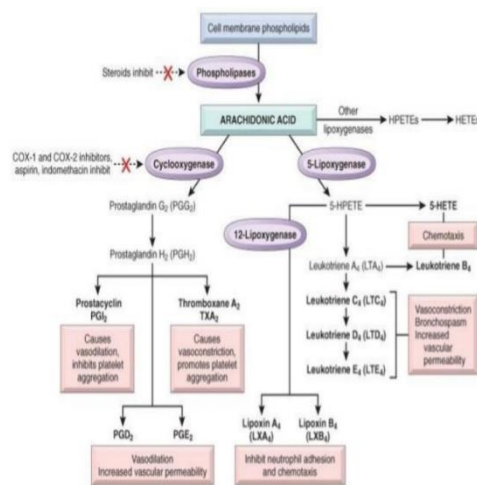
Eksresi sitokin TNF- α ditemukan dalam jumlah besar pada hari ke 3-5 hari pasca-infeksi virus LPAI atau HPAI, tetapi ekspresi sitokin menurun pada lebih dari lima hari pasca-infeksi virus HPAI sehingga ekspresi TNF- α berkontribusi terhadap patogenitas yang ditimbulkan virus HPAI pada awal infeksi. Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) dikarakterisasi menjadi death receptor ligands (DRLs), TNF- α dan fas and (FasL). Death receptor dan ligannya berperang penting dalam respon kekebalan bawaan dan dapat melawan pathogen dengan mengatur kematian survival sel. Infeksi virus H5N1 dapat meningkatkan kepekaan sel T terhadap apoptosis yang diinduksi oleh TNF- α , TRAIL, dan FasL (46).

2.3.4 Mekanisme Inflamasi

Inflamasi terbagi dalam tiga fase, yaitu fase inflamasi akut, fase respons imun (sejumlah sel aktif dan menimbulkan kekebalan untuk merespons organisme asing) dan fase inflamasi kronis (47). Pada fase inflamasi akut, proses inflamasi dimulai dengan keluarnya granulosit darah dengan segera, biasanya neutrofil, kemudian monosit yang berproliferasi menjadi makrofag inflamasi yang mempengaruhi fungsi makrofag jaringan sekitar (48). Selama respons inflamasi akut, biasanya interaksi seluler dan molekuler efisien meminimalkan cedera atau infeksi yang akan datang. Proses ini berkontribusi pada pemulihan jaringan homeostatis dan inflamasi akut. Namun, inflamasi akut yang tidak terkontrol dapat menjadi kronis, yang berkontribusi terhadap berbagai penyakit peradangan kronis(2).

Proses inflamasi atau peradangan dimulai dengan biosintesis prostanoide, yang meliputi PG dan tromboksan. Senyawa ini memiliki peranan penting dalam respons

inflamasi. Yang mana terdiri dari tiga langkah utama, yang diawali dengan mobilisasi substrat asam lemak, asam arakidonat yang disimpan dalam fosfolipid yang terikat membran dan dilepaskan oleh enzim fosfolipase A2. Selanjutnya, biotransformasi asam arakidonat oleh COX, dalam aksi bifungsional yang mengarah pada pembentukan PGG2 yang tidak stabil oleh reaksi COX, dan konversi langsung menjadi PGH2 ke prostanoid spesifik melalui aksi sintase dan isomerase spesifik jaringan. Kedua COX-1 dan COX-2 menggunakan asam arakidonat untuk menghasilkan produk yang sama, PGH2. Beberapa enzim spesifik jaringan (isomerase) selanjutnya memodifikasi PGH2 untuk dihasilkan lipid bioaktif (prostanoid) seperti prostasiklin, tromboksan A2, PGD2, dan PGE2 (48). Prostaglandin E2 (PGE2) berperan dalam proses inflamasi seperti edema, nyeri dan vasodilatasi pembuluh darah (35). Mekanisme inflamasi lihat pada gambar 7.



Gambar 7. Metabolisme asam arakidonat dan perannya dalam proses inflamasi (13)

2.4 Virus Avian Influenza (H5N1)

Virus Avian Influenza (VAI) Merupakan virus influenza A terdiri atas 8 potongan RNA berpilin negatif dan termasuk dalam family Orthomyxoviridae. Virus ini pada permukaannya diselubungi oleh sekitar 500 glikoprotein. Kedelapan RNA virus tersebut berukuran 13,5 kilobasa(kb) yang diselubungi oleh protein nukleokapsid, dengan panjang segmen berkisar sampai 890 sampai dengan 2341 nukleotida dan

terdiri dari 20-45 nukleotida non coding pada ujung 3' dan 23-61 nukleotida pada ujung 5'. Tiap-tiap segmen yang ada akan mengkode suatu protein fungsional yang penting terdiri dari atas protein polymerase B2 (PB2), protein polymerase B1 (PB1), Protein polymerase A (PA) , hemaglutinin (HA), Protein nukleokapsid , Neuraminidase (NA), Proteon Matriks (M) dan protein non-struktural (NS). Dari seluruh komponen yang ada, kemudian bersama-sama akan membentuk ribonukleoprotein (RNP) (49).

Pada manusia , infeksi penyakit ini dimulai dengan infeksi virus pada sel epitel saluran napas. Virus ini kemudian memperbanyak diri dengan sangat cepat, sehingga akan dapat mengakibatkan lisis sel epitel dan terjadi deaskuamasi lapisa epitel pada saluran napas. Dengan terjadinya replikasi virus tersebut, maka dapat merangsang pembentukan *proinflammatory cytokine* . termasuk IL-3, IL-6, dan TNF- α yang kemudian masuk ke sirkulasi sistemik dan pada gilirannya akan dapat menyebabkan gejala sistemik influenza seperti demam, malaise , myalgia, dll. Pada kondisi system imun yang menurun, virus akan dapat lulus dan masuk ke dalam sirkulasi darah dan ke organ tubuh lainnya. (49).

Apabila virus subtype baru mempunyai tingkat virulensi atau patogenitas yang sangat tinggi seperti virus H5, imunitas terhadap virus tersebut sama sekali belum terbentuk dan dapat menyebabkan keadaan klinis yang lebih berat. Hal ini disebabkan oleh system imunitas tubuh manusia belum memiliki immunological memory terhadap viru baru(49).

Pada infeksi virus influenza A H5N1, pembentukan sitokin terjadi secara berlebihan (*cytokine storm*) untuk menekan replikasi virus, namun hal ini justru dapat menyebabkan kerusakan jaringan paru yang lebih berat. Tahap selanjutnya, terjadi pneumonia virus berupa *pneumonia interstitial*. Selanjutnya, terjadi eksudasi dan edema *intra alveolar*, mobilisasi sel-sel radang dan juga eritrosit dari kapiler sekitar, pembentukan membrane hyaline dan juga fibroblast. Kemudian sel radang memproduksi banyak sel mediator peradangan, yang mana secara klinis keadaan ini disebut sebagai ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome). Difusi oksigen akan terganggu , terjadi hipoksia/anoksia yang dapat merusak organ lain (anoxic multiorgan

disfunction). Proses ini terjadi begitu cepat dan dapat menyebabkan kematian dalam waktu yang singkat disebabkan oleh proses yang irreversible(49).

Akibat infeksi virus influenza A H5N1 menimbulkan gejala yang pada dasarnya sama dengan flu biasa, yang membedakan hanya cenderung lebih sering dan cepat menjadi parah. Masa inkubasi dari mulai tertular sampai menimbulkan gejala adalah selama 3 hari, sementara itu masa infeksi pada manusia adalah sekitar 1 hari sebelum sampai 3-5 hari sesudah gejala timbul. Pada anak dapat sampai 21 hari (49).

Pada awal penyakit yang awal atau ringan, gejala sulit dibedakan dengan penyakit ISPA (infeksi Saluran Pernapasan Akut) lainnya atau ILI (influenza like illness), sedangkan pada keadaan berat sulit dibedakan dari pneumonia tipikal/bakteri ataupun ARDS pada umumnya. Sumber penularan lainnya seperti riwayat kontak dengan unggas yang sakit, spesimen maupun sumber penularan lainnya (49).

2.5 Mikroenkapsulasi

Mikroenkapsulasi adalah proses dimana partikel kecil atau tetesan dikelilingi oleh lapisan untuk menghasilkan mikrokapsul. Mikroenkapsulasi memiliki konsep untuk memungkinkan bahan inti atau sel-sel probiotik itu dipisahkan dari lingkungannya yang dilakukan oleh lapisan pelindung. Bagian dalam dari mikrokapsul itu disebut dengan inti, fase internal, atau isi. Sedangkan dinding disebut dengan shell, coating, atau selaput (50). Bentuk mikrokapsul dapat berupa agregat atau bentuk partikel tunggal dan biasanya memiliki rentang umum 1- 5000 μ m.(51)

2.5.1. Kelebihan Mikroenkapsul

Menurut: (agnihotri et al,2012) kelebihan formulasi dalam bentuk mikroenkapsulasi, diantaranya :

1. Teknik ini dapat mengkonversi obat cair dalam bentuk serbuk mengalir bebas
2. Obat-obatan yang tidak stabil terhadap oksigen, kelembaban atau cahaya, dapat distabilkan dengan mikroenkapsulasinya
3. Inkompatibilitas antara obat dapat dicegah dengan mikroenkapsulasi

4. Obat yang mudah menguap misalnya metal salisilat dan minyak peppermint dapat dicegah penguapannya dengan mikroenkapsulasi
5. Banyak obat dibuat dalam bentuk mikrokapsul untuk mengurangi toksisitas dan iritasi gi dan termasuk sulfat kcl
6. Perubahan ditempat penyerapan juga dapat dicapai dengan mikroenkapsulasi
7. Bahan kimia beracunseperti insektisida dapat dibuat dalam bentuk mikrokapsul untuk mengurangi kemungkinan timbulnya reaksi negatif oleh orang yang sensitif terhadap zat kimia tersebut.(52)

Menurut State (2013), kelebihan dari mikrokapsul adalah

1. Dapat mengantarkan obat ketarget yang diinginkan dengan mempertahankan konsentrasi dan tanpa efek yang tidak diinginkan
2. Mikrosfer biodegradable padat memiliki potensi di seluruh matriks partikel untuk pelepasan obat terkontrol
3. Microspheres menerima banyak perhatian tidak hanya untuk rilis yang berkepanjangan, tetapi juga untuk penargetan obat antikanker ke tumor
4. Ukuran, muatan permukaan memiliki hidrofilisitas mikrosfer ditemukan penting dalam menentukan nasib partikel di vivo
5. Studi tentang penggunaan makrofag mikrosfer telah menunjukkan potensi merka dalam menargetkan obat untuk pathogen yang berada intraseluler
6. Imonibilisasi mikroorganisme dan enzim, dimana enzim yang dienkapsulasi dilindungi dari ph rendah dan ion tinggi, enkapsulasi mikroorganisme telah digunakan untuk meningkatkan stabilitas
7. Melindungi terhadap UV, panas, oksidasi, asam, basa (mis, pewarna dan vitamin)
8. Meningkatkan umur simpan karena mencegah reaksi degradatif(dehidrasi,oksidasi)
9. Menutupi rasa dan bau

10. Memperbaiki pemrosesan, tekstur, dan mengurangi pemborosan bahan.(53)

2.5.2. Kekurangan mikroenkapsul

Mikroenkapsulasi memiliki kelemahan, diantaranya :

1. Biasanya penyalutan bahan inti oleh polimer kurang sempurna atau tidak merata sehingga akan mempengaruhi pelepasan bahan inti dari mikropartikel
2. Dibutuhkan teknologi mikroenkapsulasi
3. Harus dilakukan pemilihan polimer sebagai penyalut dan pelarut yang sesuai dengan bahan inti agar diperoleh hasil mikropartikel yang baik(54)

2.5.3. Tujuan Mikroenkapsulasi

Tujuan dari mikroenkapsul adalah

1. Mengubah bentuk cairan menjadi padatan
2. Melindungi inti dari pengaruh lingkungan
3. Memperbaiki aliran serbuk
4. Menutupi rasa dan bau yang tidak enak
5. Menyatukan zat-zat yang tidak tersatukan secara fisika kimia
6. Menurunkan sifat iritasi inti terhadap saluran cerna
7. Mengatur pelepasan bahan inti
8. Memperbaiki stabilitas bahan inti(52)

2.5.4. Metode Pembuatan Mikroenkapsul

a. Penguapan pelarut

Bahan penyalut dalam pelarut yang mudah menguap yang mana tidak bercampur dengan larutan pembawa. Bahan inti akan dienkapsulasi atau terdispersi di dalam larutan polimer penyalut. Campuran ini kemudian

ditambahkan ke fase cairan pembawa, disertai dengan pengadukan sampai pelarutnya menguap dan terbentuk mikrokapsul.(55)

b. Suspensi udara (Air-Suspensi)

Mikroenkapsulasi dengan teknik suspensi udara terdiri dari penyebaran bahan padat partikulat inti dalam aliran udara pendukung dan penyemprotan bahan pelapis di udara partikel. Dalam ruang lapisan, partikel tersuspensi diudara bergerak ke atas. Dalam wadah penyalutan, larutan penyalut yang biasanya berupa polimer disemprotkan pada partikel yang bergerak. Selama setiap melewati zona pelapis, bahan inti menerima kenaikan bahan pelapis. Proses siklus ini diulang, mungkin beberapa ratus kali selama pengolahan, tergantung pada tujuan dari mikroenkapsulasi seperti ketebalan lapisan .(55)

c. Semprot kering (spray drying)

Mikroenkapsulasi menggunakan spray drying paling banyak digunakan dalam industry pangan karena biasanya relatif lebih rendah. Proses ini fleksibel, dapat digunakan untuk variasi bahan dalam mikroenkapsulasi karena peralatannya mudah diterapkan dalam pengolahan bermacam bahan dan ,menghasilkan partikel-partikel yang berkualitas baik dengan distribusi ukuran partikel yang konsisten. (55)

Bahan makanan yang dikemas dengan cara ini meliputi lemak, minyak, dan penyedap rasa. Pelapisnya dapat berupa karbohidrat, seperti dekstrin, gula, pati dan gum, atau protein , seperti gelatin dan protein kedelai. Proses mikroenkapsulasi meliputi pembentukan emulsi atau suspensi antara bahan aktif dan pelapis, dan pengkabutan emulsi ke sirkulasi udara kering panas dalam ruang pengering menggunakan atomizer ataupun nozzle. Kadar air dalam droplet emulsi diuapkan akibat kontak dengan udara panas. Padatan yang tersisa dari bahan pelapis menjebak bahan inti.(55)

Spray drying berguna untuk bahan makanan yang sensitif terhadap panas karena proses pengeringan berlangsung sangat cepat. Bagaimanapun masih terdapat kehilangan bahan aktif yang memiliki titik didih rendah. Sifat

fisik dari mikrokapsul tergantung pada suhu udara panas (sekitar 150°-200° C), derajat dalam pengkabutan emulsi, kadar kepadatan dari emulsi (30-70%), dan suhu emulsi.(56)

d. Spinning disk

spining disk merupakan modifikasi proses dray cooling/chilling dengan menggunakan metode atomisasi. Spray cooling/chilling memiliki prinsip yang mirip dengan spray drying, akan tetapi pada proses pengeringan menggunakan udara dingin. Spinning disk melibatkan pembentukan inti suatu suspensi di lapisan cairan dan suspensi ini terletak diatas disk yang berputar dalam kondisi yang mengakibatkan lapisan film jauh lebih tipis daripada ukuran partikel inti. (53)

e. Koaservasi

Sebuah pemisahan fase cair/cair secara spontan yang terjadi ketika dua polimer yang bermuatan berlawanan (misalnya protein dan polisakarida) dicampur dalam media berair kemudian mengarah ke pemisahan menjadi dua fase. Fase yang lebih rendah disebut (kompleks) coacervate dan memiliki konsentrasi yang tinggi dari kedua polimer. Fase atas disebut sebagai supernatant atau fase keseimbangan yang merupakan larutan polimer encer. Coacervate digunakan sebagai bahan makanan, misalnya pengganti lemak atau pemberi rasa yang mirip daging dan biomaterial, seperti lapisantipis (film) yang dapat dimakan. Metode ini sangat efisien dan menghasilkan mikrokapsul dengan ukuran yang lebih bervariasi daripada teknik mikroenkapsulasi yang lain.(53)

f. Enkapsulasi molekul

Enkapsulasi molekuler yang dikenal juga dengan nama pemasukan kompleksasi. Dimana proses ini dinamakan silodekstrin (cyclodextrin) untuk membuat kompleks dan imobilisasi molekul. Untuk menstabilkan emulsi dan melindungi bahan makanan yang sensitif dari cahaya , oksigen, dan panas. Siklodextrin dapat meningkatkan kelarutan bahan yang bersifat hidrofobik,

mengurangi penguapan dari penyedap rasa pada makanan, dan menutupi rasa, aroma, atau warna makanan yang tidak diinginkan.(52)

g. Ekstruksi (Extraction)

Merupakan I akan sebuah metode mikroenkapsulasi yang bisa dikategorikan sebagai metode yang masih baru dan terus dikembangkan. Pada proses ekstruksi, bahan inti yang didispersikan pada karbohidrat cair yang kemudian bahan inti akan ditangkap dan dikeraskan oleh bahan penyalut selama kontak terjadi. Stabilitas bahan yang terenkapsulasi dapat mencapai 6 bulan lamanya. Namun metode ini memiliki kelemahan yaitu biaya operasinya yang mahal dan diperikrakan dua kali lipat dibandingkan dengan metode spray drying(17).

h. Kokristalisasi

Sebuah metode yang mana menggunakan sukrosa sebagai bahan penyalut. Dalam kokristalisasi, enkapsulasi terjadi akibat kristalisasi spontan dari sukrosa yang menghasilkan bentuk yang mengelompok dengan jarak ukuran 3-300 μ m yang diantaranya akan tersalut dengan bahan inti.(17)

i. Gelasi ion

Metode gelasi ion melibatkan campuran dua fase aqueous yang menghasilkan interaksi ionic antara muatan yang berada dari kedua fase. Metode ini melibatkan bahan yang mengalami transisi dari cairan menjadi gel tergantung pada kondisi interaksi ionic pada temperatur ruang (55).

2.6. Enzyme Linked Immunosorbant assay

2.6.1 Pengertian Elisa

Immunoanalytical adalah metode yang saat ini banyak digunakan untuk mendeteksi antibodi dalam tubuh, diantaranya adalah enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), merupakan suatu metode diagnosa laboratorium yang digunakan untuk mengukur antibodi, antigen, protein, dan glikoprotein dalam sampel biologis. Metode ini juga telah banyak digunakan untuk deteksi akurasi dan kuantifikasi agen biologis (terutama protein dan polipeptida) dalam industri bioteknologi dan menjadi semakin penting dalam aplikasi klinis, keamanan pangan, dan lingkungan (57).

Dibandingkan metode lainnya, ELISA bersifat lebih sensitif dan spesifik. Sensitivitas dari teknik ini disebabkan oleh karena adanya amplifikasi enzim. Spesifisitas terjadi dari pendekatan penggandaan antibodi-antigen, yang terjadi melalui cara yang sangat spesifik ketika paratope antibodi terikat dengan epitop antigen. Ketersediaan reagen, kinerja yang kuat dan aksesibilitas yang baik juga menjadi keunggulan ELISA dibandingkan metode lainnya (58)

Antigen yang digunakan dalam metode ELISA terikat pada suatu fase padat. Tube dan microplate terbuat dari polystyrene yang kaku, polypropylene polyvinylidene digunakan sebagai fase padat. Mikroplate yang digunakan harus dapat mengadsorpsi antigen dan antibodi, tetapi tidak menyerap komponen dalam fase lain (59)

Enzim yang dapat digunakan dalam ELISA seperti beta galactosidase, glukosa oksidase, peroksidase, dan alkali fosfatase. Alkali fosfatase dan P- nitro-fenil fosfat digunakan sebagai substrat, dan menghasilkan warna kuning dalam reaksi positif. Untuk peroxidaseconjugate, 5 asam amino salisilat dan orthophenylenediamine digunakan sebagai substrat dan produksi warna coklat dianggap sebagai reaksi positif. Jika beta galactosidase digunakan, sampel ini harus dibaca dalam fluorometer. Efek katabolik enzim menentukan percepatan dan spesifisitas reaksi imunologis selama reaksi enzim-substrat. Reaksi enzim- substrat biasanya selesai dalam 30-60 menit. Reaksi dapat dihentikan dengan menggunakan natrium hidroksida (NaOH), asam hidroklorat (HCl) atau asam sulfat (H₂SO₄). Hasilnya dibaca pada spektrofotometer dan pada 400-600 nm tergantung pada karakteristik konjugat yang digunakan (60)

2.6.2 Komponen ELISA

Komponen utama perangkat ELISA terdiri atas Ab, Ag, imunoprob, substrat, reagen penghenti reaksi (blocking reagent), bufer, dan cawan ELISA. Dijabarkan sebagai berikut (61) :

1. Antibodi

Antibodi adalah immunoglobulin (Ig) yang diperoleh dari hewan yang diimunisasi antigen patogen sasaran (AgP). Berdasarkan teknik produksi dan spesifisitas reaksinya,

antibodi dibedakan menjadi antibodi poliklonal (PAb) dan antibodi monoklonal (MAb). Berdasarkan sumbernya antibodi dapat dibedakan menjadi antibodi primer (AbP) dan antibodi sekunder (AbS). AbP adalah antibodi yang homolog atau bereaksi dengan AgP, diproduksi dengan mengimunisasi hewan dengan AgP. AbS atau anti-AbP adalah antibodi yang diproduksi dengan mengimunisasi hewan lain dengan AbP.

2. Antigen

Antigen yang digunakan sebagai AgP pada teknik ELISA adalah partikel virus, sel bakteri, propagul jamur, atau senyawa protein dan polisakarida pathogen antigenik yang dapat merangsang timbulnya antibodi pada hewan yang diimunisasi. AgP digunakan sebagai kontrol positif pada uji ELISA.

3. Imunoprob

Imunoprob digunakan untuk mengkonjugasikan antibodi dengan suatu enzim menjadi 'konjugat antibodi-enzim'. Konjugat ini dapat dibuat dengan mengkonjugasikan AbP atau AbS dengan enzim tertentu. Enzim yang digunakan untuk membuat konjugat beragam, yang paling umum adalah Alkaline Phosphatase (AP) dan Horse-radish Peroxidase (HRP).

4. Substrat dan bahan kimia lain

Bahan kimia dalam reaksi enzimatik yang digunakan sebagai substrat berbeda-beda, bergantung pada enzim yang digunakan. Enzim Alkaline Phosphatase memerlukan p-nitrophenyl phosphate (PNPP) yang dilarutkan dalam diethanolamine 10%. Substrat ini dihidrolisis oleh enzim menjadi p-nitrophenyl (PNP) yang berwarna kuning. Enzim HRP menggunakan substrat tetramethyl benzidine (TMB) yang dilarutkan dalam dimethylsulfoxide (DMSO), substrat ini dihidrolisis menjadi enzim menjadi produk berwarna biru.

5. Cawan ELISA

Prosedur ELISA dilakukan pada cawan polystyrene dengan 96 well yang disebut cawan ELISA (ELISA plate) atau cawan mikrotiter (microtiter plate). Cawan ELISA

yang diproduksi oleh berbagai perusahaan dengan bahan dan merek berbeda memiliki kualitas pengikatan Ab (Ab binding capacity) yang bervariasi, sehingga pengguna perlu melakukan uji coba untuk memperoleh hasil optimal.

2.7.3 Tipe ELISA

Metode enzymatic immunoassay umumnya dibagi menjadi metode homogen dan heterogen. Dalam metode enzymatic immunoassay homogen, enzim menjadi tidak aktif ketika mereka terikat pada antibodi, sehingga perlu dilakukan pencucian untuk memisahkan antigen dari medium. Enzymatic immunoassay heterogen lebih umum digunakan karena lebih sensitif dalam pengujian (59). Dalam metode ini, setelah pengikatan antigen dan antibodi, komponen lain dikeluarkan melalui prosedur pencucian. ELISA adalah teknik immunoassay heterogen yang digunakan untuk mendeteksi antibodi spesifik dan antigen terlarut, dan karena struktur dan karakteristik zat yang diukur tidak selalu sama, berbagai jenis ELISA telah dikembangkan untuk meningkatkan kekhususan pengukuran (62)

Metode ELISA terbagi menjadi beberapa tipe, yaitu sebagai berikut (59) :

1. Direct ELISA (antigen screening)

Metode ini dapat digunakan untuk menentukan jumlah antigen berbobot molekul tinggi. Permukaan plate dilapisi langsung dengan antibodi atau antigen. Antibodi atau antigen lalu diberi enzim, diinkubasi dan diikuti oleh pencucian untuk menghilangkan antigen atau antibodi yang tidak terikat dari medium. Kemudian substrat yang sesuai ditambahkan ke media untuk menghasilkan sinyal melalui warna. Sinyal diukur untuk menentukan jumlah antigen atau antibodi.

2. Indirect ELISA

Metode ini disebut indirect (tidak langsung) karena dalam penentuan dan pemisahan antigen yang dipakai bukan antibodi primer, tetapi antibodi lain yang ditempatkan dalam medium. Dalam metode ini, serum ditambahkan ke dalam plate yang dilapisi oksigen lalu diinkubasi. Selama proses ini menghasilkan kompleks antigen-antibodi.

Antibodi sekunder ditambahkan untuk mengenali antibodi dalam serum kemudian substrat enzim ditambahkan ke media untuk menghasilkan warna dan konsentrasi ditentukan. Metode ini digunakan untuk mengidentifikasi antigen yang digunakan lebih umum dalam endokrinologi.

3. Sandwich ELISA (antibody screening)

Dalam metode ini, plate dilapisi dengan antibodi pada bagian dasarnya. Sampel ditambahkan ke microplate kemudian diinkubasi selama beberapa waktu dan dicuci. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan antigen yang tidak terikat. Antibodi ditandai dengan enzim khusus yang ditambahkan dan diinkubasi dan dicuci kembali. Untuk mendeteksi aktivitas enzim, ditambahkan substrat enzim sebagai pewarnaan.

4. Competitive ELISA (antigen/antibodi screening)

Permukaan plate dilapisi dengan antibodi spesifik antigen atau antigen spesifik antibodi. Sampel yang akan diukur dan marker antigen atau antibodi ditandai dengan enzim yang ditempatkan ke dalam plate secara bersamaan. Molekul akan saling bersaing untuk mengikat antibodi atau antigen di dalam plate. Setelah dicuci dan ditambahkan substrat enzim, warna dihasilkan untuk mengukur konsentrasi. Ada proporsi terbalik antara konsentrasi analisis dan intensitas warna yang dihasilkan. Dengan kata lain, ketika jumlah antigen atau antibodi dianalisis dalam konsentrasi yang rendah akan menghasilkan absorbansi yang tinggi, sementara konsentrasi yang lebih besar menghasilkan absorbansi yang rendah.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama lima bulan dari bulan September 2021 sampai Februari 2022 di Laboratorium Teknologi Farmasi sediaan padat Fakultas Farmasi, Laboratorium imunologi dan serologi, Laboratorium Penelitian Fakultas Farmasi, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian ini bersifat eksperimental. Rancangan percobaan yang dilakukan adalah :

- 1) Pembuatan mikrokapsul senyawa uji
- 2) Penentuan dosis
- 3) Penyiapan hewan percobaan
- 4) Pemberian senyawa uji
- 5) Perlakuan terhadap hewan percobaan
- 6) Evaluasi hasil percobaan
- 7) Analisis data

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : alat-alat gelas standar laboratorium, *magnetic stirrer*, centrifuse, alat spektrofotometer inframerah (Perkin Elmer FT-IR Spektrofotometer Frontier),timbangan analitik (*Ohaus PA214*), hemositometer (*Assistant-Germany*),object dan cover glass, moisture balance, mikroskop dengan optilap.

3.3.2 Bahan

Bahan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Serbuk enzim bromelin (Shaanxi Feng (FH) Biotechnology Co.,Ltd, China.), Hidroxypropyl methylcellulose (HPMC), aseton, Paraffin Liquid, Tween 80 dan Aquadest, larutan giemsa, larutan turk, vaksin H5N1 (PT.Caprifarmindo Laboratories)

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Pemeriksaan bahan

Sebelum dilakukan pembuatan sediaan mikro kapsul bromelin, dilakukan pemeriksaan bahan baku yaitu enzim bromelin (Focuserb,FH20180715) yang diperoleh dari Shaanxi Feng (FH) Biotechnology Co.,Ltd, China.

3.4.2. Pembuatan Sediaan uji

Sediaan uji yang dibuat dalam bentuk mikro kapsul yang mengandung enzim bromelin murni.

Tabel 1.Rancangan formula mikro kapsul enzim bromelain

Bahan	Formula		
	F1	F2	F3
Serbuk enzim bromelin	1	1	1
Hidroxypropyl methylcellulose (HPMC) (g)	0,5	1	1.5
Aseton (ml)	15	15	15
Paraffin liquid (ml)	30	30	30
Tween 80 (ml)	0,6	0,6	0,6
N-Heksan (ml)	30	30	30

3.4.3. Pembuatan Mikrokapsul

HPMC dilarutkan dengan pelarut aseton dalam beaker glass (M1). Serbuk bromelain murni dilarutkan kedalam larutan. HPMC (M1). Didalam beaker glass lain masukkan paraffin liquid dan tween 80 (M2). Emulsi diaduk dengan magnetic stirrer dengan kecepatan 700 rpm pada temperatur ruangan selama 4 jam. Mikrokapsul yang terbentuk dikumpulkan dengan cara enap tuang, kemudian dicuci dengan n-heksan sebanyak 2 kali sampai semua paraffin tercuci. Mikrokapsul yang telah dicuci dengan n-heksan dikeringkan dalam oven pada suhu 40-50 °C selama 2 jam.(63)

3.4.4. Evaluasi Mikrokapsul bromelin

Evaluasi mikrokapsul yang dilakukan meliputi berat mikrokapsul yang diperoleh, analisis spektroskopi FT-IR, distribusi ukuran partikel, penentuan kandungan air, penentuan kandungan serbuk bromelain dalam mikrokapsul, penentuan persen loading obat, entrapment efisiensi, dan profil disolusi.

1) Evaluasi Mikrokapsul Secara Organoleptis

Evaluasi mikrokapsul secara organoleptis meliputi evaluasi dari segi bentuk, warna dan bau

2) Evaluasi Berat Mikrokapsul Yang Diperoleh

Berat mikrokapsul yang diperoleh ditimbang dengan timbangan analitik pada setiap formula.

3) Evaluasi Spektroskopi FT-IR

Mikrokapsul bromelain standar dalam bentuk serbuk, diukur serapan inframerahnya dengan menggunakan alat Fourier Transform Infrared (FT-IR). Mikrokapsul bromelain dikempa dalam wadah peled diletakkan di atas transparent disk kemudian dilakukan pembacaan (scan) oleh alat FT-IR.

4) Evaluasi Distribusi Ukuran Partikel

Ukuran partikel dapat dianalisis menggunakan analisis PSA. Dimana menggunakan teknik dynamic light scattering. Teori dynamic scattering teknik

yang dipakai untuk mengukur ukuran partikel dengan rentang beberapa nanometer sampai beberapa mikron. Konsepnya adalah partikel kecil dalam suspensi bergerak dengan pola secara acak.

5) Evaluasi Penentuan Kandungan Air

Mikrokapsul diukur kandungan airnya dengan menggunakan alat pengukur kadar lembab (*moisture balance*). Dimana masing masing mikrokapsul dengan formula yang berbeda ditimbang sebanyak 1 g kemudian diletakkan pada pan sampel, kemudian suhu diatur pada angka 105 °C lalu lakukan pengukuran kadar air.

6) Evaluasi Penentuan Loading Obat dan Faktor Perolehan Kembali

Dapat dihitung persentase zat aktif yang tersalut dengan menggunakan rumus

$$\% \text{ loading} = \frac{\text{berat zat aktif enzim bromelain}}{\text{berat mikrokapsul}} \times 100 \%$$

Persentase mikrokapsul yield/factor perolehan kembali dihitung menggunakan rumus

$$\% \text{ yield} = \frac{M}{M_0} \times 100 \%$$

Keterangan :

M = Berat mikrokapsul

M₀ = berat awal dari enzim bromelain+berat awal HPMC

3.4.5 Penyiapan Hewan Percobaan

Hewan yang digunakan adalah mencit putih jantan sebanyak 15 ekor yang berumur 2-3 bulan dengan berat 20-30 g dan belum pernah mengalami perlakuan terhadap obat. Sebelum digunakan sebagai hewan percobaan, mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari untuk penyesuaian lingkungan dan mengontrol kesehatan serta menyeragamkan makanan. Hewan percobaan ini

dikelompokkan menjadi 3 kelompok yang terdiri dari 5 ekor mencit dalam satu kelompok.

3.4.6 Penentuan Dosis

Dosis mikrokapsul bromelin yang digunakan untuk penelitian ini diberikan dalam 1 varian dosis yaitu dosis 200 mg/kgbb.

3.4.7 Penyiapan suspensi mikrokapsul bromelin

1. Pembuatan Suspensi Na CMC 0,5%

Na-CMC dibuat dengan perbandingan 1 : 20. Na CMC ditimbang sebanyak 0,5 g lalu ditaburkan pada 10 ml air panas dalam lumpang panas , dibiarkan selama 15 menit. Kemudian digerus sampai homogen lalu ditambahkan aquadest sampai volume 100 ml.

2. Pembuatan Suspensi Mikrokapsul Bromelin

Mikrokapsul bromelin ditimbang sesuai dengan dosis yang direncanakan, disuspensikan dengan 10 ml Na CMC, lalu digerus sampai homogen. Masing-masing sediaan diambil sebanyak 0,2 ml dengan jarum sonde, diberikan ke mencit secara per oral

3.4.8 Pemberian Sediaan Uji

Mencit sebanyak 15 ekor dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan yang terdiri dari 5 ekor dimana masing-masing kelompok diberikan perlakuan yang berbeda sesuai table 2 dibawah ini.

Tabel 2 pemberian sediaan uji

Kelompok	Jumlah Hewan Uji	Perlakuan	Lama Perlakuan
I (kontrol negatif)	5	Mencit diinduksi vaksin H5N1 0,05 ml/ekor secara intraperitoneal pada hari ke-1 kemudian diberi Na CMC 0,5 % yang sudah dikembangkan dengan air	7 hari
II (Bromelin) Dosis 200 mg/kgbb)	5	Mencit diinduksi vaksin H5N1 0,05 ml/ekor secara intraperitoneal pada hari ke-1 kemudian mencit diberikan suspensi enzim bromelin dengan dosis 200 mg/kgbb	7 hari
III (mikrokapsul bromelin) Dosis 200 mg/kgbb)	5	Mencit diinduksi Vaksin H5N1 secara intraperitoneal 0,05ml/ekor pada hari ke-1 kemudian Mencit diberi mikrokapsul bromelin dengan dosis 200 mg/kgbb	7 hari

3.4.9 Menghitung persentase sel leukosit

Pada hari ke delapan, ekor mencit dipotong dan dibuat hapusan darah lalu dikeringkan. Setelah kering ditetesi dengan metanol, sehingga melapisi seluruh hapusan darah, dibiarkan selama 5 menit. Diwarnai dengan giemsa dan biarkan selama 20 menit. Cuci dengan air suling, keringkan dan tambahkan minyak

emersi dan amati dibawah mikroskop. Dihitung jumlah sel eosinofil, neutrofil batang, neutrofil segmen, limfosit, dan monosit pada perbesaran 1000 x.

3.4.10 Menghitung jumlah sel leukosit

Darah segar dihisap dengan pipet leukosit sampai angka 0,5 kemudian dihisap larutan struk sampai tanda 11 selanjutnya dikocok selama 3 menit, dari dalam pipet leukosit 1-2 tetes dibuang dan pada kamar hitung hemositometer ditetaskan satu tetes. Cairan dibiarkan selama 2 menit agar leukosit mengendap. Jumlah leukosit dihitung pada keempat sudut kamar hitung(2)

$$\text{Jumlah sel leukosit} = \text{jumlah sel leukosit} \times \frac{20}{0,4}$$

3.4.11 Pengukuran Kadar TNF- α

Darah diambil dengan cara guillotine (arteri leher). Kemudian darah dikumpulkan lalu disentrifus selama 30 menit dan kecepatan 3000 rpm hingga didapat serum. Kemudian serum digunakan untuk pengukuran kadar TNF- α dengan metode ELISA.

3.4.12 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara statistic menggunakan metode Analisa Varian (ANOVA) satu arah dan dilanjutkan dengan analisis Duncan menggunakan *Software statistic SPSS*

BAB IV

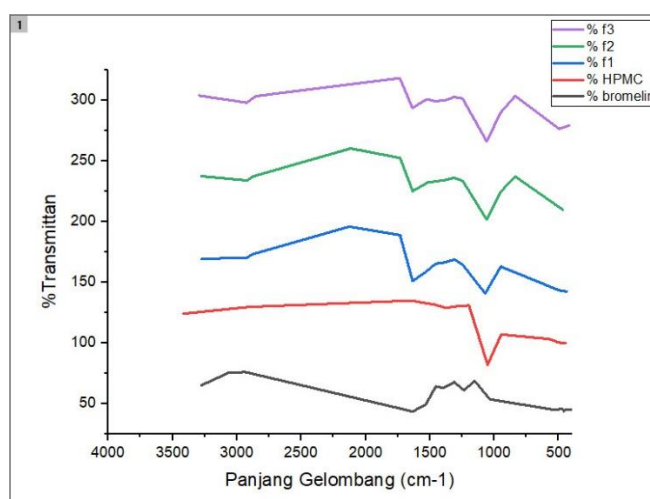
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian kali ini melakukan uji untuk melihat pengaruh formulasi mikrokapsul bromelin terhadap sel leukosit dan TNF- α pada mencit dengan menggunakan sampel enzim bromelin. Dalam membuat sediaan farmasi dilakukan pemeriksaan sampel bromelin seperti mengamati organoleptis, spektroskopi FT-IR, distribusi ukuran partikel, kandungan air. Pemeriksaan organoleptis bertujuan untuk memberikan pengenalan dan mengetahui kebenaran enzim melalui panca indra berupa bentuk, warna dan bau. Hasil dari pengamatan organoleptis menunjukkan bahwa serbuk enzim bromelin berwarna kuning dan berbau khas. Hal ini sesuai dengan Nur(2017) yang berpendapat bahwa serbuk enzim bromelin memiliki warna putih bening sampai kekuningan dan berbau khas (64).

Hasil evaluasi berat mikrokapsul yang diperoleh dengan menggunakan timbangan analitik. Didapatkan berat mikrokapsul pada formula 1, formula 2 dan formula 3 masing-masing adalah 1,501 g, 2,470 g, dan 3.020 gr. Berat formula 1 memenuhi syarat terbentuknya mikrokapsul sedangkan pada formula 2 dan formula 3 berat yang didapat bertambah dari jumlah berat dalam formula yang seharusnya, hal ini disebabkan oleh masih adanya bahan lain (paraffin cair) yang masih terjebak didalam mikrokapsul.

Hasil evaluasi analisis spektroskopi fourier transform infrared (FTIR) dilakukan untuk mengidentifikasi gugus fungsi pada suatu senyawa. Analisa spektroskopi FT-IR merupakan teknik yang handal untuk mendeteksi adanya interaksi antara senyawa obat dengan pembawa pada mikrokapsul. Adanya puncak transmittan yang baru atau terjadi pergeseran posisi suatu puncak transmittan pada bilangan gelombang tertentu, seringkali mengindikasikan adanya interaksi seperti ikatan hydrogen (65). Hasil pada serbuk enzim bromelin menunjukkan pita regangan N-H pada $3.275,13 \text{ cm}^{-1}$, gugus fungsi C-H membentang pada $2.935,66 \text{ cm}^{-1}$, intensitas kuat pita regangan pada C=O dengan ketinggian $1.663,71 \text{ cm}^{-1}$, dan gugs fungsi C-N renggangan pita pada ketinggian $1.531,48 \text{ cm}^{-1}$. Pada HPMC menunjukkan hasil

renggangan pita O-H (Ikatan hidrogen intermolekular) pada 3.448 cm^{-1} , gugus fungsi C-H renggangan pita pada ketinggian $2.904,80\text{ cm}^{-1}$, gugus fungsi C=O pada regangan pita pada ketinggian $1.654,28\text{ cm}^{-1}$, dan gugus C-O-C berada pada puncak $1.051,20\text{ cm}^{-1}$, pada hasil karakterisasi FTIR dari formula 1, formula 2, dan formula 3 yang merupakan campuran fisik antara enzim bromelin dengan HPMC, menunjukkan adanya kesamaan pita gugus fungsi meskipun terjadi sedikit pergeseran bilangan gelombang namun masih dalam rentang gugus fungsinya. Hal ini membuktikan tidak terjadi interaksi secara kimiawi antara senyawa enzim bromelin dan polimer HPMC.



Gambar 8. Spektroskopi FT-IR Sampel dan Mikorkapsul Brmelin

Hasil evaluasi distribusi ukuran partikel mikrokapsul pada masing-masing formula dilakukan menggunakan Particle size analyzer (PSA), hasil pengukuran memperlihatkan bahwa rata-rata ukuran partikel dan nilai tengah pada F1 ialah $0,118\text{ }\mu\text{m}$ dan $0,122 \pm 0,221\text{ }\mu\text{m}$, F2 $0,148\text{ }\mu\text{m}$ dan $0,154 \pm 0,220\text{ }\mu\text{m}$, F3 $0,097\text{ }\mu\text{m}$ dan $0,101 \pm 0,225\text{ }\mu\text{m}$. Distribusi ukuran partikel Mikrokapsul dipengaruhi oleh HPMC yang digunakan sebagai pembentuk dinding mikrokapsul. Semakin besar jumlah HPMC yang digunakan maka terjadi peningkatan ketebalan dinding mikrokapsul yang terbentuk sehingga semakin besar pula ukuran mikrokapsul yang dihasilkan

Hasil evaluasi penentuan kandungan air mikrokapsul pada masing-masing formula dilakukan menggunakan alat pengukur kadar lembab yaitu moisture balance,

penetapan ini dilakukan untuk mengetahui kandungan air mikrokapsul enzim bromelain yang dibuat sehingga jika dilanjutkan dengan proses pembuatan sediaan tertentu dapat disesuaikan dengan ketetapannya masing-masing. Kadar air yang didapat dari formula 1, formula 2 dan formula 3 masing-masing adalah 4,28%, 5,75 %, dan 6,08%. Pada penetapan kadar air seharusnya semakin besar penyalut yang digunakan maka semakin besar pula kadar air dalam mikrokapsul. Hal ini disebabkan oleh kadar air HPMC lebih besar dibandingkan kadar air zat aktif. Persyaratan kadar air suatu matrik yang baik adalah 3-5%. Jadi untuk formula 1 kadar airnya memenuhi syarat karena kurang dari 5%, sedangkan pada formula 2 dan 3 kadar airnya 5,75 % dan 6,08% hal ini mungkin terjadi karena proses pemanasan yang kurang sempurna

Hasil evaluasi penentuan kandungan bromelin dalam mikrokapsul pada masing masing formula, didapatkan hasil % loading pada F1 = 66,62 %, F2=40,48%, F3= 33,11%. Data formula 1 lebih besar dari formula 2,3 dikarenakan adanya perbedaan jumlah HPMC yang digunakan maka semakin kecil % loadingnya. Sedangkan faktor perolehan kembali (% yield) pada F1= 100%, F2=123,5 %, F3=120,8%. Data dari formula 2,3 menunjukkan bahwa perolehan kembalinya melebihi 100%. Hal ini disebabkan karena adanya bahan cair (paraffin cair) yang masih terjebak di dalam mikrokapsul, sedangkan pada formula 1 menunjukkan perolehan kembalinya 100% yang artinya proses mikroenkapsulasi mendapatkan hasil yang bagus.

Setelah formulasi mikrokapsul dibuat dan dilakukan evaluasi, mikrokapsul dengan hasil evaluasi terbaik dipilih dan dilanjutkan dengan uji ke mencit, yaitu mikrokapsul dengan formula 1, mikrokapsul diujikan kepada mencit putih jantan yang diaklimatisasi selama 7 hari.

Pada penelitian ini dilakukan pengujian mikrokapsul bromelin dalam memberikan efek sebagai antiinflamasi, yaitu sebagai imunostimulan dalam meningkatnya TNF- α pada mencit yang dipapar antigen H5N1. Pada penelitian ini juga dilakukan perhitungan total jenis sel leukosit dan perhitungan persentase jenis sel leukosit sampel yang digunakan serbuk enzim bromelin, mikrokapsul bromelin.

Pada penelitian ini digunakan hewan percobaan mencit putih jantan yang berumur 2-3 bulan, hewan ini mudah ditangani, ekonomis dan mempunyai kemiripan fisiologi dan anatominya dengan manusia. Sebelum perlakuan, mencit diaklimatisasi terlebih dahulu, sebelum dilakukan perlakuan pada penelitian ini selama 7 hari supaya mencit dapat membiasakan diri dengan lingkungannya yang baru agar tidak stress serta untuk memilih mencit yang sehat. Mencit yang digunakan adalah mencit yang tidak mengalami perubahan berat badan sebesar 10% serta menunjukkan perilaku normal. Selain itu, alasan pemilihan hewan percobaannya mencit putih jantan disebabkan karena sistem imun mencit jantan tidak dipengaruhi oleh hormon esterogen seperti halnya pada mencit betina. Untuk mengurangi penyimpangan hasil penelitian, maka dipilih mencit dengan galur dan jenis kelamin yang sama, usia dan berat badan relatif sama.

Hewan percobaan yang digunakan telah memenuhi persetujuan etik oleh Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas dengan nomor persetujuan 627/UN.16.2/KEP-FK/2022.

Hewan percobaan dibagi menjadi 3 kelompok, yang tiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Kelompok pertama yaitu kelompok yang hanya diberikan vaksin H5N1 secara intraperitoneal 0,05 ml/ekor pada hari ke-1 dan suspensi Na CMC 0,5% secara oral. Kelompok kedua yaitu kelompok yang hanya diiduksikan vaksin H5N1 secara intraperitoneal 0,05 ml/ekor pada hari ke-1, kemudian diberikan suspensi bromelin dengan dosis 200 mg/kgbb secara oral. Kelompok ketiga dengan vaksin H5N1 secara intraperitoneal 0,05 ml/ekor pada hari ke-1 kemudian diberikan suspensi mikrokapsul bromelin dengan dosis setara dengan 200 mg/kgbb bromelin secara oral. Pemeriksaan dilakukan dengan melihat pengaruh pemberian variasi sediaan suspensi bromelin terhadap TNF- α mencit pada hari ke-8 dan menghitung jumlah total leukosit serta persentase jenis sel leukosit.

Enzim bromelin tidak larut sempurna dalam air sehingga sediaan uji dibuat dalam bentuk koloidal dengan menggunakan Na CMC. Na CMC memiliki sifat inert, menghasilkan larutan stabil, tidak toksik, tidak iritasi dan tidak mempengaruhi zat aktif

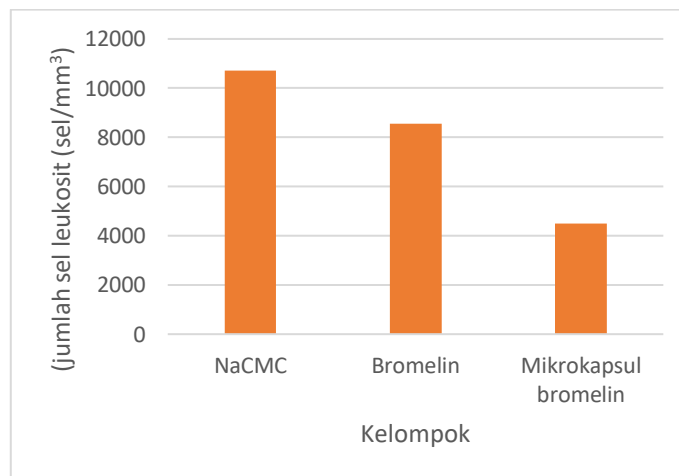
(66). Sediaan uji dibuat sesuai dengan yang ditetapkan dan diberikan selama 7 hari agar sediaan uji dapat meningkatkan sistem imun mencit. Vaksin H5N1 diberikan pada hari pertama dan dilanjutkan dengan memberikan sediaan dimulai dari hari pertama hingga hari ke 7. Pada hari ke delapan, ekor mencit dipotong dan dibuat hapusan darah lalu dikeringkan. Setelah kering ditetesi dengan metanol, sehingga melapisi seluruh hapusan darah, dibiarkan selama 5 menit. Diwarnai dengan giemsa dan biarkan selama 20 menit. Cuci dengan air suling, keringkan dan tambahkan minyak emersi dan amati dibawah mikroskop. Dihitung jumlah sel eosinofil, neutrofil batang, neutrofil segmen, limfosit, dan monosit pada perbesaran 1000 x. Alasan pemilihan vaksin H5N1 sebagai zat penginduksi respons imun dikarenakan menurut penelitian yang dilakukan oleh Nakayana, et.al (2012). Vaksin inaktif H5N1 terbukti dapat merangsang respons imun salah satunya yaitu meningkatkan kadar TNF- α . Setelah 24 jam mencit dikorbankan dengan cara dekapitasi lalu ditentukan jumlah leukosit, persentase masing-masing jenis leukosit dan kadar TNF- α . Kemudian semua data hasil penelitian diuji dengan ANOVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

Pengujian efek antiinflamasi yang dilakukan dalam penelitian ini menyangkut respon imun spesifik dan non spesifik yang dilakukan dengan melihat TNF- α pada mencit, jumlah total sel leukosit yang menggunakan alat haemositometer dan perhitungan persentase jenis sel leukosit dengan metode hapusan darah. TNF- α berperan dalam pertahanan pejamu untuk infeksi bakteri, virus dan parasit. TNF- α diproduksi oleh makrofag dan diaktifkan oleh sel T limfosit, antigen, sel NK, dan sel mast^{12,14}. TNF- α biasanya tidak terdeteksi pada individu sehat tapi sering ditemukan dalam kondisi inflamasi dan infeksi dalam serum.

Pada penelitian ini rata-rata TNF- α kelompok mencit yang diberikan dengan variasi sediaan mengalami peningkatan angka TNF- α pada sediaan yang hanya diberikan NaCMC saja dan mengalami penurunan angka TNF- α pada mencit kelompok uji dengan sediaan bromelin dan mikrokapsul bromelin. Masing-masing sel yang dapat diamati pada penentuan persentase jenis leukosit yaitu eosinophil, neutrophil batang, neutrophil segmen, limfosit dan monosit, sedangkan

basophil tidak dapat diamati karena basophil bersifat basa sehingga menyebabkan sel ini larut saat pemberian pewarna giemsa (2)

Sediaan bromelin yang terdiri dari serbuk enzim bromelin dan mikrokapsul broemelin dapat menurunkan jumlah leukosit mencit secara nyata ($p < 0,05$). Dalam hal ini, mencit yang diberi sediaan bromelin menunjukkan jumlah leukosit yang lebih rendah dibandingkan dengan mencit kelompok NaCMC. Penurunan jumlah leukosit yang lebih besar ditunjukkan oleh mikrokapsul bromelin . Rata-rata jumlah leukosit mencit kelompok NaCMC, kelompok bromelin dan kelompok mikrokapsul bromelin masing-masing adalah $10720 \pm 201,86$, 8550 ± 375 , $4490 \pm 138,74$. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi (2020), dimana bromelin dapat menurunkan jumlah leukosit mencit.



Gambar 9. Grafik jumlah leukosit mencit putih jantan yang diinduksi Vaksin H5N1 dan setelah pemberian sediaan mikrokapsul bromelin

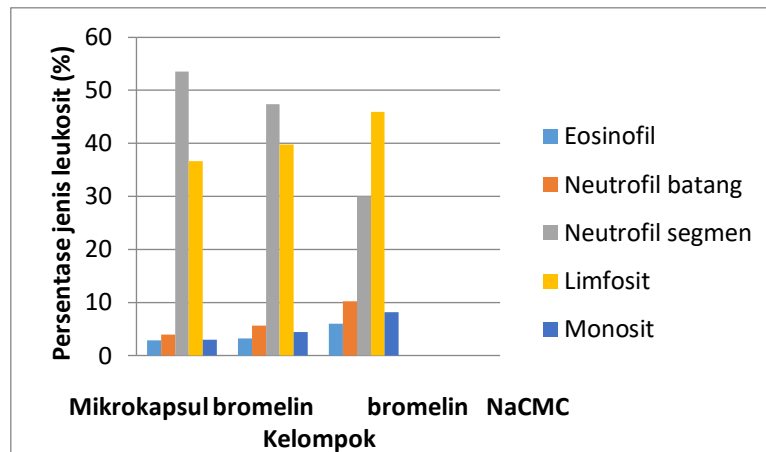
Mikrokapsul bromelin dapat menurunkan eosinofil mencit secara nyata ($P < 0,05$). Dalam hal ini, persentase eusinofil yang diberi mikrokapsul bromelin dan bromelin saja tidak berbeda nyata, kecuali mencit yang diberi mikrokapsul bromelin lebih rendah dibandingkan dengan mencit kelompok NaCMC. Rata-rata persentase eusinofil mencit kelompok kontrol, kelompok bromelin dosis 200 mg/kgbb dan kelompok mikrokapsul bromelin dosis 200 mg/kgbb berturut-turut adalah 5,8% ; 3,2% dan 2,8 % (lampiran 2. Tabel 10)

Mikrokapsul bromelin dapat menurunkan persentase neutrofil batang secara nyata ($p < 0,05$). Dalam hal ini, mikrokapsul bromelin dapat menurunkan persentase neutrofil batang mencit secara nyata dibandingkan dengan mencit kelompok NaCMC. Rata-rata persentase neutrofil batang mencit kelompok kontrol, kelompok bromelin dosis 200 mg/kgbb, dan mikrokapsul bromelin dosis 200 mg/kgbb berturut-turut adalah 10% ; 5,4%; 4% (lampiran 2. Tabel 10).

Mikrokapsul bromelin meningkatkan persentase neutrofil segmen mencit secara nyata ($p < 0,05$). Dalam hal ini, mencit yang diberikan mikrokapsul bromelin menunjukkan persentase neutrofil segmen lebih tinggi dibandingkan dengan mencit kelompok kontrol. Peningkatan persentase neutrofil segmen sejalan dengan variasi sediaan. Rata-rata persentase neutrofil segmen mencit kelompok kontrol, kelompok bromelin dosis 200 mg/kgbb, dan mikrokapsul bromelin dosis 200 mg/kgbb berturut-turut adalah 30,2 % ; 47,6% ; 53,6 % (lampiran 2. Tabel 10). Menurut literatur , neutrofil merupakan lini pertama pertahanan tubuh apabila terdapat jaringan yang rusak atau benda asing masuk kedalam tubuh. Neutrofil merupakan spesialis fagositik yang sangat mudah bergerak dan memakan serta menghancurkan bahan bahan yang tidak diperlukan.

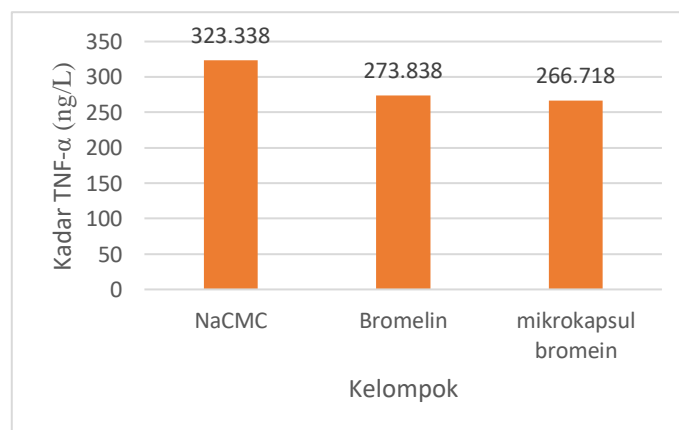
Mikrokapsul bromelin dapat menurunkan persentase limfosit secara nyata ($p < 0,05$). Rata-rata persentase limfosit kelompok kontrol, kelompok broemelin dosis 200 mg/kgbb, dan mikrokapsul bromelin dosis 200 mg/kgbb berturut-turut adalah 45,8 % ; 39,6% ; 36,6% (lampiran 2. Tabel 10). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi (2020) dimana bromelin dapat menurunkan persentase limfosit mencit (67).

Mikrokapsul bromelin dapat menurunkan persentase monosit mencit secara nyata ($p < 0,05$). Rata-rata persentase monosit mencit kelompok bromelin dosis 200 mg/kgbb, dan mikrokapsul bromelin dosis 200 mg/kgbb berturut-turut adalah 8,2 % ; 4,2 % ; 1,22% (lampiran 2. Tabel 10). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi (2020) dimana bromelin dapat menurunkan persentase limfosit mencit(67)



Gambar 10. Grafik persentase total sel leukosit mencit putih jantan yang diinduksi Vaksin H5N1 setelah pemberian sediaan mikrokapsul bromelin

Mikrokapsul bromelin dapat menurunkan kadar TNF- α mencit secara nyata ($p < 0,05$). Dalam hal ini, mencit yang diberi mikrokapsul bromelin menunjukkan kadar TNF- α yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol, yaitu yang hanya diberikan sediaan suspensi NaCMC. Kadar TNF- α yang lebih rendah ditunjukkan pada sediaan mikrokapsul bromelin dengan dosis 200 mg/kgbb. Rata-rata kadar TNF- α mencit kelompok bromelin dosis 200 mg/kgbb, dan mikrokapsul bromelin dosis 200 mg/kgbb berturut-turut adalah 323,338 ng/L ; 273,836 ng/L ; 266,718 ng/L (lampiran 2. Tabel 10).



Gambar 11. Grafik kadar TNF- α mencit putih jantan yang diinduksi vaksin H5N1 setelah pemberian sediaan mikrokapsul bromelin

Hasil yang sama juga diperoleh pada penelitian sediaan gel. Dimana enzim bromelin menunjukkan efek antiinflamasi. Dalam hal ini, pemberian sediaan gel bromelin dengan dosis 0.1%,0,5%, dan 1% secara topikal mampu menurunkan volume eksudat mencit putih jantan, dimana variasi konsentrasi dan waktu memberikan pengaruh signifikan terhadap volume eksudat mencit yang diinduksi karagenan.(68) Antigen virus ataupun zat penginduksi inflamasi akan mengaktifkan sel makrofag. Sel makrofag yang aktif akan memproduksi berbagai sitokin salah satunya TNF- α untuk menunjang fungsinya dalam memfagositosis dan sebagai *anti presenting cell (APC)*. TNF- α akan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah sehingga menyebabkan molekul adhesi,neutrofil,makrofag dan protein plasma bergerak menuju tempat terjadinya infeksi untuk melawan antigen yang masuk (45). Penumpukan sel-sel fagosit dan protein plasma tersebut akan menyebabkan edema. Pada penelitian yang saya lakukan, mikrokapsul bromelin terbukti dapat menurunkan kadar TNF- α mencit putih jantan yang diinduksi dengan Vaksin H5N1. Selain meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, TNF- α dalam kadar yang rendah memiliki efek yang menguntungkan, tetapi dalam kadar yang sangat besar dapat memperparah kondisi inflamasi hingga menyebabkan kerusakan jaringan(49). Berdasarkan hasil penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa mikrokapsul bromelin memiliki efek antiinflamasi.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan mengenai uji efek mikrokapsul bromelin terhadap jumlah leukosit dan TNF- α , pada mencit yang diinduksi vaksin H5N1, dapat disimpulkan bahwa :

1. Mikrokapsul bromelin dapat menurunkan jumlah leukosit mencit putih jantan yang diinduksi Vaksin H5N1
2. Mikrokapsul bromelin dapat menurunkan persentase eosinofil, neutrofil batang, limfosit dan monosit mencit putih jantan yang diinduksi Vaksin H5N1
3. Mikrokapsul bromelin dapat menurunkan kadar TNF- α .mencit putih jantan yang diinduksi Vaksin H5N1

5.2 Saran

1. Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk meneliti pengaruh mikrokapsul bromelin dengan menggunakan antigen virus SARS-CoV-2.
2. Disarankan untuk peneliti selanjutnya untuk meneliti pengaruh mikrokapsul bromelin dengan melihat parameter lain, seperti interleukin 1 (IL-1) dan interleukin 10 (IL-10).

DAFTAR PUSTAKA

1. Aldi Y, Rarsyadi Y HD. Immunodulatory activity of meniran extracts(*phyllanthus niruri* linn). Immunodulatory Act meniran Extr *phyllanthus niruri* linn). 2014;1(1):20–6.
2. Aldi Y, Dewi ON UR. Uji imunomodulator dan jumlah sel leukosit dari ekstrak daun kemangi (*Ocimum basilicum* L) Pada Mencit Putih Jantan. *Sci J Farm dan Kesehat*. 2016;6(2):139.
3. Sudiono J. Sistem Kekebalan tubuh. Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2014.
4. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J Z z. Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases in Organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204–18.
5. Sylvester J. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Anaesthesia*. 2019;1–5.
6. Sukmayadi AE, Sumiwi SA, Berliana MI AA. The Immunomodulatory Activity of Ethanol Extract of Tempuyung Leaves (*Sonchus arvensis* Linn). *Indones J Pharm Sci Technol*. 2014;1(2):65–72.
7. Puspitaningrum I, Kusmita L FY. Aktivitas Immunomodulator Fraksi Etil Asetat Daun Som Jawa (*Talinum triangulare* (Jacq) Willd) Terhadap Respin Imun Spesifik. *Sekol tinggi Ilmu Farm*. 2017;15(2):24–9.
8. Muntari Bala, Nurul Azila ismail, Maizirwan Mel, Mohamed Saedi Jami, Hamzah Mohd.Saleh AA. Bromelain Production: Current Trends and Perspective. *Arch Des Sci*. 65:ISSN 1661-464X.
9. Das S BD. Bromelain from pineapple: Its Stability and therapeutic potentials. *Trop fruits From Cultiv to Consum Heal Benefits, Pineapple*. :43–100.
10. Rathnavelu V, Alitheen NB, Sohila S, Kanagesan S RR. Potential role of

- bromelain in clinical and therapeutic applications(Review). *Biomed Reports*. 2016;5(3):283–8.
11. Rakte A NB. Proteolytic Enzymes Delivery Systems. *A Rev Int J Pharm Res Sch*. 2014;3(2):671–7.
 12. Silaban I RS. Pengaruh enzim bromelin buah nanas (*Ananas comosus L*) terhadap awal kehamilan effect of bromelin in pineapple(*Ananas comosus L*) on early pregnancy. *Majority*. 2016;5(4):80–5.
 13. Pavan R, Join S, Shradda KA. Properties and Therapeutic Application of Bromelain. *A Rev Biotechnol Res Int*. 2012;2012:1–6.
 14. Wijaya L, Irsan S, Theodorus S. Efek Antiinflamasi Fraksi Daun ANdong (*Cordyline Fruticosa L*) Pada Tikus Putih Jantan (*Rattua Norvegicus*) Galur Sparaque Dawley. *Biomed J Indones*. 2015;1(1):16–24.
 15. Pramitaningastuti A Setyopuspito AE. Uji Efektivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Srikaya (*Annona squamosa L*) Terhadap Edema Kaki Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *J Ilm Farm*. 2017;13(1).
 16. Lourenco CB, Ataide JA, Cefali LC, Novaes LC d. L, Moriel P, Silveira E et al. Evaluation of the enzymatic activity and stability of commercial bromelain incorporated in topical formulations. *Int J Cosmet Sci*. 2016;38(5):535–40.
 17. Yeol Y., Baek N., & Park K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. In: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2001.
 18. Ordesi P, Pisoni L, Nannei P, Macchi M, Borloni R SS. Therapeutic efficacy of bromelain in impacted third molar surgery: A randomized controlled clinical study. *Quintessence int*. 2014;45(8):679–84.
 19. Murachi T, Yasui M YY. Purification and physical Characterization Of Stem Bromelain. *Biochemistry*. 1964;3(1):48–55.
 20. Wuryanti. Isolasi dan penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Bromelin Dari Buah

- Nanas (*Ananas comosus* L). *J Kim Sains Apl.* 2004;VII(3):78–82.
21. Kumaunang M K V. aktivitas enzim bromelin dari ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*). *J ilm sains.* 2011;15(1):198.
 22. Sultan J, Samata A GK. Isolasi dan Pengukuran Aktivitas Enzim Bromelin dari Ekstrak Kasar Bonggol Nanas (*Ananas comosus*) pada Variasi Suhu dan pH. *Biog J Ilm Biol.* 2014;2(2):119–25.
 23. Ritonja A, Rowan AD, Buttle DJ, Rawlings ND, Turk V BA. Stem bromelain: Amino Acid sequence and Implications for weak binding of cystatin. *FEBS Lett.* 1989;247(2):419–24.
 24. Sawano Y, Hatano KI, Miyakawa T TM. Absolute Side-chain structure at position 13 is required for the inhibitory activity of bromelain. *J Biol Chem.* 2008;283(52):36338–43.
 25. manzor Z, Nawaz A, Mukhtar H, Haq I NA. Bromelain; methods of extraction, purification and therapeutic applications human and animal health. *Brazilian arch Biol Technol Biol Technol v.* 2016;59(1):1–16.
 26. HR Maurer. Bromelain : Biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(9):1234–4.
 27. Bhui K, Tyagi S, Prakash B SY. Pineapple bromelain induces autophagy, facilitating apoptotic response in mammary carcinoma cells. *BioFactors.* 2010;36(6):478–82.
 28. Bhui K, Prasad S, George J SY. bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-Kappa B Against skin tumor-imitating triggering mitochondrial death pathway. *Cancer Lett.* 2009;282(2):167–76.
 29. Amini A, Masoumi-Moghaddam S, Ehteda A MD. Bromelain and N-acetylcysteine inhibit proliferation and survival of gastrointestinal cancer cells

- in vitro: Significance of combination therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33(1):1–15.
30. Misran E, Idris A, Mat Sarip SH YH. Properties of Bromelain extract from different parts of the pineapple variety morris. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2019;18.
 31. H M. *Textbook of Pathology.* 6th editio. 2010.
 32. Rosales C U-QE. *Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity.* *Biomed Res Int.* 2017;
 33. Rosales C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types. *Front Physiol.* 2018;9:1–17.
 34. Underwood J. *Patologi umum dan sistematik.* Sarjadi, editor. Penerbit Buku Kedokteran EGC; 1994.
 35. Flannagan RS, Jaumouille V GS. NoRhe Cell Biology of Phagocytosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2012;61–98.
 36. Sadikin M. *Biokimia Darah.* Jakarta: Widya Medika; 2002.
 37. Desmawati. *Sistem Hematologi dan Imunologi.* Bogor: Penerbit IN Media; 2017.
 38. McMillan DB HR. *An Atlas of Comparative Vertebrate Histology.* Elsevier Inc. 2018;171-201 p.
 39. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R HM. The Crucial Roles of Inflammatory Mediators in Inflammation : A review. *Vet World.* 2018;11:627–35.
 40. Rodak BF CJ. *Clinical Hematology atlas.* Fourth Edi. Elsevier; 2013.
 41. Wulansari ED, Wahyuono S WS. Aktivitas Antiinflamasi Topikal Ekstrak Etanolik Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb .*) pada Mencit yang

- Diinduksi Karagenin. *Trad MedJ* 8. 2018;23(2):122–6.
42. Riansyah Y, Lanny M CR. Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas* (L.) Lamk) terhadap Tikus Wistar Jantan. *Pros Penelit Spes Unisba*. 2015;630–6.
 43. White M. Mediators of Imflammation and the inflammatory Process. *J Allergy Clin immunol*. 1999;103:378–81.
 44. Supit IA, Pangemanan DHC, Marunduh SR. Profil Tumor Necrosis Factor (Tnf-A) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (Imt) Pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran Unsrat Angkatan 2014. *J e-Biomedik*. 2015;3(2).
 45. Baratawidjaya KG RI. *Imunologi Dasar* (Edisi ke 9). 0 ed. Jakarta: FKUI; 2010. P. 226.
 46. Ayu D DN. Disregulasi Sitokin Pada Unggas dan Mamalia yang Terinfeksi Virus Avian Influenza(Cytokines Disregulation in Birds and Mammals Infected by Avian Influenza Virus). 2016;26(1):27–38.
 47. Putzu L RC Di. white blood cells identification and counting from microscopic blood image. *int Sch Sci Res Innov*. 2013;7(1):20–7.
 48. P BM. Diagnosis Laboratorik Flu Burung (H5N1). *J Indones* [internet]. 2006;21(3):261–5.
 49. Garjito T. Virus Avian Influenza H5N1 : Biologi molekuler dan potensi penularannya. *J Vektora*. 2013;V No.2:85–97.
 50. L.S.K J. Microencapsulation And The Food Industry. *Food Sci Technol*. 1991;4(24):289–97.
 51. Soottitanwat A, Yoshii, H & Furuta T. Effect of Water Activity on the Release Characteristics of Encapsulated Flavor. In water properties in food. In: *IHealth, Pharmaceutical and Biological System ISOPOW* 10. 2010. p. (pp.499-505).
 52. Agnihotri N, Mishra R, Goda C& AM. Microencapsulation a novel approach in

- drug delivery. *A Rev indo Glob J Pharm care*. 2012;
53. State P. *IJPRBS Microencapsulation. A New Era Noval Drug Deliv*. 2013;2(2):456–68.
 54. Lachman L. *Teori dan Praktek Farmasi Iindustri*. Edisi keti. 1994.
 55. Jyothi Sri.S, Seethadevii, A., Suria Prabha, P. Muthuprasanna I and P. *international journal of pharma and bio sciences microencapsulation*. *Int J Pharma Bio Sci*. 2012;3(1):509–31.
 56. Jackson L S. *Microencapsulation and The Food Industry*. *Food Sci Technol*. 1991;4(24):289–97.
 57. Hasseini S, Villegar PV, Palomares MR MS. *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA): From A to Z*. Switzerland. Springe. 2018;
 58. Mikulskis A, Yeung D, Subramanyam M AL. *Solution ELISA as a platform of choice for development of robust , drug tolerant immunogenicity assays in support of drug development*. *J Immunol Methods [Internet]*. 2011;365(1–2):38–49.
 59. Aydin S. *A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA*. 2017;72(4):4[– 5.
 60. Engvall E. *The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay*. *Clin Chem*. 2010;56(2):319–20.
 61. Suryadi Y, Manzila I MM. *Tinjauan Potensi Pemanfaatan Perangkat Diagnostik ELISA serta Variannya untuk Deteksi Patogen Tanaman*. 2009;5(1):39–48.
 62. Gonzalez A, Gaines M, Gallegos LY, Guevara R GF. *Thread- paper , and fabric enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)*. *Methods [Internet]*. 2018;
 63. Deviarny C, Rahmadhani D. *MIKROENKAPSULASI BROMELAIN KASAR DARI BATANG NENAS (Ananas comosus (L) Merr) DENGAN PENYALUT ETILSELULOSA*. 2016;6(2):127–32.

64. Nur, Surahman, Surarti RR. Aktifitas enzim bromelin terhadap peningkatan protein tepung ampas kelapa. *J Biol Sci Educ*. 2017;6(1):84– 93.
65. Wu,K.e.,Li, j., wang.,& winstead D. Formation and characterization of solid dispersions of piroxicam and polyvynylpyrrolidone using spray drying and precipitations with compressed antisolvent. *J Pharm Sci* [Internet]. 2009; Available from: <https://doi.org/10.1002/jps.21598>
66. Rowe RC, Sheskey PJ QM. handbook of Pharmaceutical Excipients 6th edition. London Pharm Press. 2009;
67. Annisa R adella. uji efek enzim bromelin terhadap aktivitas dan kapaitas fagositosis sel makrofag dan persentase sel leukosit mencit putih jantan. 2020;
68. Pratiwi A revina. Aktivitas antiinflamasi dari bromelin secara topikal. *Pharmakognosi journal*. 2020.

Lampiran 1. Hasil evaluasi mikrokapsul bromelin

Tabel 3 Hasil pemeriksaan mikrokapsul secara organoleptis

Sampel	Bentuk	Warna	Bau
Formula 1	Granul	Kuning	Khas
Formula 2	Granul	Kuning	Khas
Formula 3	Granul	Kuning	Khas
Serbuk enzim Bromelin	Granul	Kuning	Khas

Tabel 4 Hasil evaluasi berat mikrokapsul

Sampel	Berat (g)
Formula 1	1,51 g
Formula 2	2,47g
Formula 3	3.02 g

Tabel 5 data hasil evaluasi FT-IR

NO	Sampel	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)					
		N-H	C-H	C=O	C-N	C-O-C	O-H
1	Enzim bromelin	3275,13	2935,66	1633,71	1531,48	-	-
2	HPMC	-	2904,80	1645,28	-	1051,20	3448
3	Formula 1	3275,13	2872,01	1633,71	1531,48	-	-
4	Formula 2	3275,13	2922,16	1633,71	1516,48	-	-
5	Formula 3	3290,56	2922,16	1635,64	1525,69	-	-

Tabel 6. Data Evaluasi Distribusi Ukuran Partikel dengan PSA

Formula	Median	Mean ±SD
Formula 1	0,118	0,122 ± 0,221
Formula 2	0,148	0,154 ± 0,220
Formula 3	0,097	0,101 ± 0,225

Tabel 7. Hasil pemeriksaan kandungan air dengan moisture balance

Sampel	Kandungan air
Formula 1	4,28%
Formula 2	5,75%
Formula 3	6.08%

Tabel 8. Hasil % loading, % yield

Mikrokapsul	% loading	% yield
Formula 1	66,62%	100 %
Formula 2	40,48 %	123,5 %
Formula 3	33.11 %	120,8 %

Lampiran 2. Tabel hasil uji parameter antiinflamasi

Tabel 9. Jumlah leukosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang diinduksi Vaksin H5N1

Kelompok	Jumlah leukosit (sel/mm ³) mencit ke-					Rata-rata ± SD
	1	2	3	4	5	
NaCMC	10700	10750	10800	10400	10950	10720 ± 201,86
bromelin	8600	8750	8500	7950	8950	8550± 375
Mikrokapsul bromelin	4700	4550	4350	4400	4450	4490 ± 138,74

Tabel 10. Persentase jenis leukosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi vaksin H5N1

Kelompok	Mencit ke-	Persentase leukosit(%)				
		eosinofil	Neutrophil batang	Neutofil segmen	limfosit	monosit
NaCMC	1	5	11	28	47	9
	2	7	9	29	48	7
	3	6	10	31	45	8
	4	5	12	31	43	9
	5	6	8	32	46	8
Rata-rata		5,8	10	30,2	45,8	8,2
SD		0,84	1,58	1,64	1,92	0,84
Bromelin dosis 200 mg/kgbb	1	3	5	47	40	5
	2	3	7	48	38	4
	3	2	4	51	37	6
	4	4	6	47	40	3
	5	4	5	45	43	3

Rata-rata		3,2	5,4	47,6	39,6	4,2
SD		0,84	1,14	2,19	2,30	1,14
Mikrokapsul Bromelin dosis 200 mg/kgbb	1	2	3	53	37	5
	2	3	5	55	35	2
	3	4	3	51	40	2
	4	2	5	52	38	3
	5	3	4	57	33	3
Rata-rata		2,8	4	53,6	36,6	3
SD		0,83	1	2,15	2,70	1,22

Tabel 11. Kadar TNF- α Mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

Kelompok	Kadar TNF-Alfa(ng/L) Mencit ke-					Rata-rata \pm SD
	1	2	3	4	5	
NaCMC	338,67	324,09	320,32	321,32	312,29	323,338 \pm 9,62
Bromelin	289,52	296,39	249,77	273,83	259,67	273,836 \pm 19,59
Mikrokapsul Bromelin	252,30	263,14	257,72	270,91	289,52	266,718 \pm 14,5

Lampiran 3. Hasil analisis statistik

Tabel 12. uji normalitas jumlah leukosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

	Sediaan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Leukosit	NaCMC	,261	5	,200*	,932	5	,608
	Bromelin	,247	5	,200*	,930	5	,598
	Mikrokapsul	,213	5	,200*	,939	5	,656
	Bromelin						

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

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 13. Uji Anova satu arah jumlah leukosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	100009000,000	2	50004500,000	745,409	,000
Within Groups	805000,000	12	67083,333		
Total	100814000,000	14			

Tabel 14. Uji lanjut duncan jumlah leukosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

Sediaan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Mikrokapsul Bromelin	5	4490,00		
Bromelin	5		8550,00	
NaCMC	5			10720,00
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 3 (lanjutan)

Tabel 15. Uji normalitas persentase eusinofil mencit putih jantan setelah pemberian sediaan mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1

	Sediaan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
eusinofil	Mikrokapsul Bromelin	,231	5	,200*	,881	5	,314
	Bromelin	,241	5	,200*	,821	5	,119
	NaCMC	,300	5	,161	,883	5	,325

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

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 16. Uji Anova satu arah persentase eusinofil mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi a Vaksin H5N1

Eusinofil	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30,400	2	15,200	24,000	,000
Within Groups	7,600	12	,633		
Total	38,000	14			

Tabel 17. Uji lanjut duncan persentase eusinofil mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

Sediaan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Mikrokapsul Bromelin	5	2,80	
Bromelin	5	3,20	
NaCMC	5		6,00
Sig.		,442	1,000

Lampiran 3. (Lanjutan)

Tabel 18. Uji normalitas persentase neutrofil batang mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

	sediaan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Neutrofil batang	Mikrokapsul Bromelin	,241	5	,200 [*]	,821	5	,119
	Bromelin	,273	5	,200 [*]	,852	5	,201
	NaCMC	,287	5	,200 [*]	,914	5	,490

Tabel 19. Uji ANOVA persentase neutrofil batang mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

neutrofil	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	103,600	2	51,800	28,255	,000
Within Groups	22,000	12	1,833		
Total	125,600	14			

Tabel 20. uji lanjut duncan persentase neutrofil batang mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

Sediaan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Mikrokapsul Bromelin	5	4,00	
Bromelin	5	5,60	
NaCMC	5		10,20
Sig.		,086	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 3 (Lanjutan)

Tabel 21. Uji normalitas persentase neutrofil segmen mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

	sediaan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Neutrofil segmen	NaCMC	,198	5	,200*	,957	5	,787
	Bromelin	,197	5	,200*	,943	5	,685
	Mikrokapsul						
	Bromelin	,136	5	,200*	,987	5	,967

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

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 22. uji ANOVA persentase neutrofil segmen mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1496,933	2	748,467	165,103	,000
Within Groups	54,400	12	4,533		
Total	1551,333	14			

Tabel 23. uji lanjut duncan persentase neutrofil segmen mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

sediaan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
NaCMC	5	30,00		
Bromelin	5		47,40	
Mikrokapsul Bromelin	5			53,60
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 3 (Lanjutan)

Tabel 24. uji normalitas persentase Limfosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

	sediaan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Limfosit	Mikrokapsul Bromelin	,159	5	,200*	,990	5	,980
	Bromelin	,175	5	,200*	,974	5	,899
	NaCMC	,300	5	,161	,908	5	,453

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

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 25. uji ANOVA persentase Limfosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

Limfosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	228,400	2	114,200	20,764	,000
Within Groups	66,000	12	5,500		
Total	294,400	14			

Tabel 26. uji lanjut duncan persentase Limfosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari yang telah diinduksi Vaksin H5N1

Sediaan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Mikrokapsul Bromelin	5	36,60	
Bromelin	5	39,80	
NaCMC	5		46,00
Sig.		,052	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 3 (Lanjutan)

Tabel 27. uji normalitas persentase monosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1

	Sediaan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Monosit	Mikrokapsul Bromelin	,300	5	,161	,833	5	,146
	Bromelin	,237	5	,200*	,961	5	,814
	NaCMC	,231	5	,200*	,881	5	,314

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

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 28. uji Anova satu arah persentase monosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1

monosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	72,400	2	36,200	31,029	,000
Within Groups	14,000	12	1,167		
Total	86,400	14			

Tabel 29. uji lanjut duncan persentase monosit mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1

Sediaan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Mikrokapsul Bromelin	5	3,00	
Bromelin	5	4,40	
NaCMC	5		8,20
Sig.		,063	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 3 (Lanjutan)

Tabel 30. uji normalitas kadar TNF- α mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1

	Sediaan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TNF- α	NaCMC	,269	5	,200*	,917	5	,512
	Bromelin	,188	5	,200*	,950	5	,740
	Mikrokapsul	,198	5	,200*	,929	5	,590
	Bromelin						

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

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 31. uji ANOVA kadar TNF- α mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9511,564	2	4755,782	20,794	,000
Within Groups	2744,542	12	228,712		
Total	12256,106	14			

Tabel 32. uji lanjut duncan kadar TNF- α mencit putih jantan setelah pemberian mikrokapsul bromelin selama 7 hari setelah diinduksi vaksin H5N1

Sediaan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Mikrokapsul Bromelin	5	266,72	
Bromelin	5	273,84	
NaCMC	5		323,34
Sig.		,471	1,000

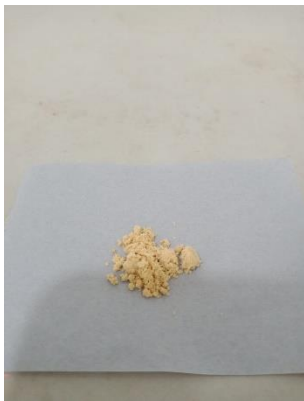
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 4. Dokumentasi penelitian



Gambar 12. Proses pembuatan mikro kapsul



Gambar 13 mikro kapsul bromelin



Gambar 14 sediaan suspensi bromelin



Gambar 15. Moisture balance

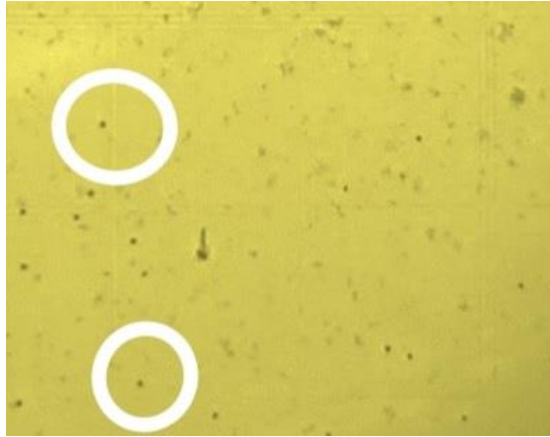


Gambar 16. Magnetic Stirrer

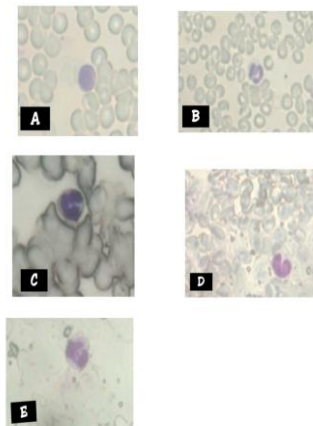


Gambar 17 Mencit diberi sediaan uji

Lampiran 4 (Lanjutan)

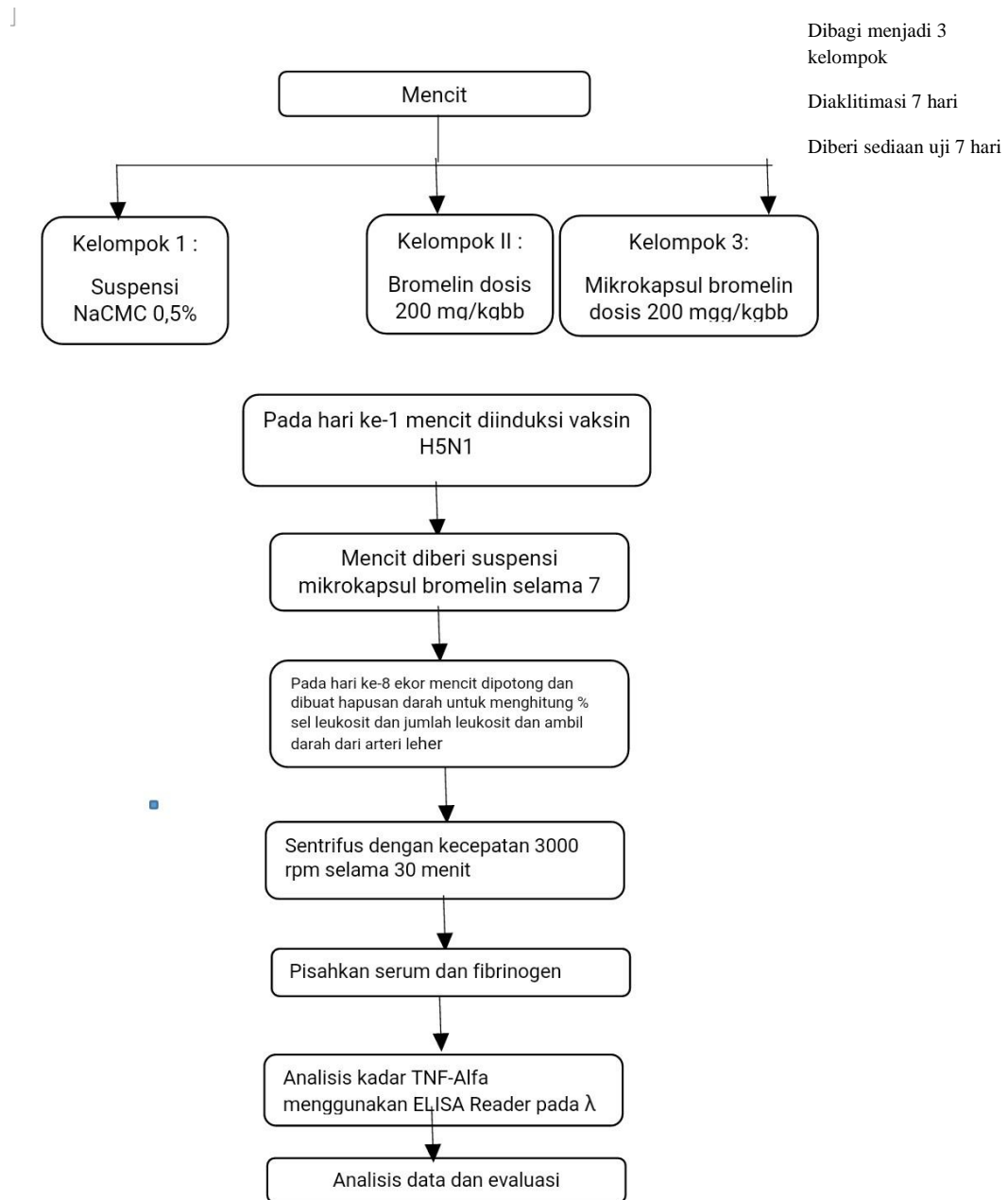


Gambar 18 Gambar leukosit mencit putih jantan dibawah mikroskop optilab



Gambar 19. Limfosit B. Neutrofil segmen C. Neutrofil batang D. Monosit E. Eusnofil

Lampiran 4 (Lanjutan)



Gambar 20. Skema kerja uji efek mikrokapsul bromelin terhadap leukosit dan TNF- α Pada mencit yang diinduksi Vaksin H5N1



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ANDALAS
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN

Alamat : Kampus Universitas Andalas, Limau Manis Padang Kode Pos 25163
Telepon : 0751-31746, Faksimile : 0751-32838, Dekan : 0751-39844
Laman : <http://fk.unand.ac.id> e-mail : dekanat@fk.unand.ac.id

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL

No : ~~627~~ /UN.16.2/KEP-FK/2022

Tim Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, dalam upaya melindungi Hak Azazi dan Kesejahteraan Subjek Penelitian kedokteran/kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian dengan judul :

The Research Ethics Committee of Medical Faculty Andalas University, in order to protect human rights and welfare of medical/health research subject, has carefully reviewed the research protocol entitled :

Pengaruh Formulasi Mikrokapsul Bromelin terhadap TNF- α Pada Mencit

Nama Peneliti Utama : Sarah Fadhila HS
Principal Researcher

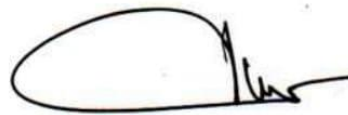
Nama Institusi : Fakultas Farmasi Universitas Andalas
Institution

Protokol Penelitian tersebut dapat disetujui pelaksanaannya.
and approved the research protocol.


Padang, 08 Maret 2022

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
Dean of Medical Faculty Andalas University

Ketua
Chairman


Dr. dr. Afriwardi, SH. Sp.KO, MA
NIP 196704211997021001




Dr. dr. Yuliarni Syafrita, SpS (K)
NIP 196407081991032001

Keterangan/notes:

Keterangan lolos kaji etik ini berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.
This ethical approval is effective for one year from the due date.

Jika ada kejadian serius yang tidak diinginkan (KTD) harus segera dilaporkan ke Komisi Etik Penelitian.
If there are Serious Adverse Events (SAE) should be immediately reported to the Research Ethics Committee.

Lampiran 4. (Lanjutan)

Dosis 200 mg/kgbb

$$\begin{aligned} & \frac{BB}{1000} \times Dosis \\ &= \frac{20}{1000} \times 200 \text{ mg/kgbb} \\ &= 4 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$VAO = \frac{Dosis \times BB}{Konsentrasi}$$

$$VAO = \frac{200 \text{ mg/kgbb} \times 0,02 \text{ Kg}}{20}$$

$$VAO = 0,2$$

% loading

$$\begin{aligned}\text{Formula 1} &= \frac{\text{berat zat aktif bromelin}}{\text{berat mikrokapsul}} \times 100 \% \\ &= \frac{1 \text{ gr}}{1,501 \text{ gr}} \times 100 \% \\ &= 66,62 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Formula 2} &= \frac{\text{berat zat aktif bromelin}}{\text{berat mikrokapsul}} \times 100 \% \\ &= \frac{1 \text{ gr}}{2,47 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 40,48 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Formula 3} &= \frac{\text{berat zat aktif bromelin}}{\text{berat mikrokapsul}} \times 100 \% \\ &= \frac{1 \text{ gr}}{3,02 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 33,11 \%\end{aligned}$$

% Yield

$$\begin{aligned}\text{Formula 1} &= \frac{\text{berat mikrokapsul}}{\text{berat zat aktif bromelin} + \text{berat HPMC}} \times 100 \% \\ &= \frac{1,501 \text{ g}}{1 \text{ g} + 0,5 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 100 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Formula 2} &= \frac{2,47 \text{ g}}{1 \text{ g} + 1 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 123,5 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Formula 3} &= \frac{3,02}{1 \text{ gr} + 1,5 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 120,8 \%\end{aligned}$$

