

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



**MEKANISME KERJA NANOPARTIKEL EKSTRAK DAUN
SINGAWALANG (*PETIVERIA ALLIACEAE*)
PADA REGULASI GLUKOSA
MELALUI Glut-2, IRS-1, INSULIN, TNF- α , IL-6, SIRT-1 DAN PGC1 α
PADA MODEL TIKUS DIABETES MELLITUS**

TAHUN KE - 2 DARI RENCANA 3 TAHUN

Dr. ARIFA MUSTIKA dr.,M.Si	0015097006
NURMAWATI FATIMAH,dr.,M.Si	0017088008
Dr. GADIS MEINAR SARI,dr.,M.Kes	0004056612

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**

KKA
KK
LP 13/19
Mus
m



**MEKANISME KERJA NANOPARTIKEL EKSTRAK DAUN
SINGAWALANG (*PETIVERIA ALLIACEAE*)
PADA REGULASI GLUKOSA
MELALUI Glut-2, IRS-1, INSULIN, TNF- α , IL-6, SIRT-1 DAN PGC1 α
PADA MODEL TIKUS DIABETES MELLITUS**

TAHUN KE - 2 DARI RENCANA 3 TAHUN

Dr. ARIFA MUSTIKA dr.,M.Si	0015097006
NURMAWATI FATIMAH,dr.,M.Si	0017088008
Dr. GADIS MEINAR SARI,dr.,M.Kes	0004056612

DIBIYAI OLEH:

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

Judul : MEKANISME KERJA NANOPARTIKEL EKSTRAK
DAUN SINGAWALANG (PETIVERIA ALLIACEAE)
PADA REGULASI GLUKOSA MELALUI Glut-2, IRS-
1, INSULIN, TNF-, IL-6, SIRT-1 DAN PGC1PADA
MODEL TIKUS DIABETES MELLITUS

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr ARIFA MUSTIKA, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0015097006
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Ilmu Kedokteran
Nomor HP : 087851540939
Alamat surel (e-mail) : arifa-m@fk.unair.ac.id

Anggota (1)
Nama Lengkap : NURMAWATI FATIMAH
NIDN : 0017088008
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : Dr. Dr GADIS MEINAR SARI
NIDN : 0004056612
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 570,000,000

Mengetahui,
Dekan FK UNAIR



(Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U(K))
NIP/NIK 195606081986121001

Kota Surabaya, 11 - 11 - 2018
Ketua,



(Dr ARIFA MUSTIKA, M.Si)
NIP/NIK 197009151998022001

Menyetujui,
Ketua LPI UNAIR



(Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs. M.Si. Ph.D)
NIP/NIK 196705071992021001

RINGKASAN

Hasil penelitian yang dilakukan Kementerian Kesehatan RI menunjukkan angka harapan hidup masyarakat Indonesia dari tahun ke tahun terus meningkat. Pada tahun 2014 umur harapan hidup masyarakat Indonesia rata-rata akan mencapai 72 tahun, angka ini meningkat bila dibandingkan dengan data pada tahun 2004, umur harapan hidup 66,2 tahun. Peningkatan angka harapan hidup itu menyebabkan bertambahnya populasi penduduk berusia lanjut atau usia di atas 60 tahun. Pada tahun 2000, jumlah penduduk usia lanjut di Indonesia sekitar 5,3 juta. Pada tahun 2010, jumlah itu meningkat tajam menjadi 24 juta. Makin besar jumlah penduduk usia lanjut, maka tantangan di bidang kesehatan juga semakin besar karena penyakit degeneratif termasuk diabetes melitus tipe 2 juga akan meningkat dan tentunya akan menambah beban pada sektor kesehatan. Untuk mengatasi hal tersebut, maka perlu penatalaksanaan terapi yang tepat. Penatalaksanaan terapi DMT2 adalah pengaturan makanan, pemberian obat dan perubahan gaya hidup. Oleh karena itu, penelitian penemuan obat baru dan penemuan bahan pangan yang mempunyai khasiat mengatur regulasi gula darah terutama pengembangan bahan alam yang ada di Indonesia perlu ditingkatkan.

Singawalang adalah tumbuhan yang ada di Indonesia dan mudah dibudidayakan. Ekstrak etanol tumbuhan tersebut dilaporkan mempunyai khasiat untuk menurunkan kadar gula darah sehingga diduga ekstrak tersebut mengandung bahan aktif yang berpotensi untuk mengatur regulasi glukosa di dalam tubuh (Domínguez *et al.*, 2002, Barbosa-Filho *et al.*, 2005) Untuk menjadikan tumbuhan tersebut menjadi obat fitofarmaka dalam terapi DM, maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh dan mekanismenya dalam mengatur regulasi glukosa di dalam tubuh. Mustika *et al.*, 2015, juga menunjukkan bahwa Ekstrak daun singawalang menurunkan kadar gula darah pada tikus model DM tipe 2 dengan dosis optimum 360 mg/kgbb dan juga meningkatkan ekspresi AMPK pada liver (Mustika *et al.*, 2015). Berbagai penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun singawalang tidak menunjukkan tanda toksisitas pada hewan coba sehingga memungkinkan untuk digunakan pada manusia.

Fenomena ini menimbulkan harapan bahwa ekstrak tersebut dapat digunakan sebagai obat fitofarmaka dalam penatalaksanaan DMT2. Untuk sampai pada tahap fitofarmaka, maka perlu dilakukan penelitian baik tentang mekanisme kerja pada tahap uji pre klinik maupun uji klinik.

Penelitian tahap awal yang telah dilakukan adalah menghasilkan produk berupa formulasi nanoemulsi ekstrak daun singawalang. Telah dilakukan penelitian untuk pembuatan formulasi nanoemulsi ekstrak daun singawalang. Pada penelitian ini menghasilkan enam

formulasi dengan berbagai macam komposisi. Fase minyak yang sesuai untuk ekstrak daun singawalang adalah migliol dan VCO, komponen surfaktan yang sesuai adalah Tween 80 dan kosurfaktan yang sesuai adalah PEG 400

Sampai saat penelitian tentang formulasi nanopartikel ekstrak daun singawalang, khasiat maupun mekanisme kerjanya untuk meregulasi glukosa pada penyakit DMT2 belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, peneliti akan melakukan penelitian tentang efek dan mekanisme kerja nanopartikel ekstrak daun singawalang (*Petiveria Alliaceae*) pada regulasi glukosa melalui Insulin, TNF- α , dan IL-6 pada model tikus diabetes mellitus tipe 2.

Model tikus DM tipe 2 dibuat dengan menginduksi tikus tersebut dengan Streptozotocin (STZ). Dosis STZ adalah 50 mg/kgBB. Larutan STZ dibuat dengan mengencerkan STZ dengan larutan dapar sitrat sesuai dengan dosis yang ditentukan. Larutan STZ yang diinjeksikan sebanyak 0,2 mL. Larutan STZ dibuat 20 menit sebelum induksi. Tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 4 jam sebelum induksi dimulai untuk mengosongkan lambung dan mengurangi resiko aspirasi.

Sebanyak 35 tikus DMT2 dibagi secara acak menjadi 5 kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok tikus DMT2 yang memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 50mg/kgbb, kelompok ke-2 adalah kelompok tikus DMT2 yang memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 100mg/kgbb, kelompok ke-3 adalah kelompok tikus DMT2 yang memperoleh SNEEDS ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 200mg/kgbb, kelompok ke-4 adalah kelompok tikus DMT2 yang memperoleh metformin dengan dosis 18mg/tikus dan kelompok ke-5 adalah kelompok tikus yang tidak memperoleh terapi dan hanya memperoleh formula SNEEDS

Ekstrak etanol diberikan ke tikus dalam bentuk nanoemulsi (SNEEDS). Formulasi SNEDDS Ekstrak daun Singawalang terdiri dari fase minyak yang sesuai untuk ekstrak daun singawalang adalah VCO, komponen surfaktan yang sesuai adalah Tween 80 dan kosurfaktan yang sesuai adalah PEG 400. Perbandingan antara M:S:KS adalah 1:7:2

SNEEDS Ekstrak etanol daun Singawalang dan metformin diberikan sehari sekali, peronde selama 14 hari. Sebelum dan sesudah perlakuan tikus ditimbang bobot badannya. Pada hari ke-15 setelah terapi, tikus dikorbakan nyawanya untuk diambil darah, organ hepar, dan otot skeletal untuk dilakukan pemeriksaan. Pengukuran kadar gula darah sebelum dan sesudah pemberian SNEDDs ekstrak daun Singawalang pada berbagai dosis. Pengukuran kadar IL 6, TNF α dan insulin serum darah tikus dengan menggunakan metode ELISA. Nilai HOMA IR untuk menilai resistensi reseptor ditentukan dengan rumus kadar insulin (mIU/L) dikalikan kadar gula darah puasa (mmol/L) dibagi 22.5. Hasil penelitian menunjukkan bahwa

injeksi dengan STZ dapat meningkatkan kadar gula darah tikus > 200 mg/dL sehingga bisa dijadikan model hewan coba. SNEED ekstrak etanol daun Singawalang menurunkan kadar gula darah, menurunkan kadar TNF α serum darah, menurunkan kadar IL-6 serum darah, tidak mempengaruhi kadar Insulin serum darah tetapi dapat menurunkan resistensi reseptor insulin pada tikus model DMT2.

PRAKATA

Alhamdulillah Robbil 'Alamin segala puja dan puji penulis panjatkan kehadirat Allah Subhanawata'ala, karena hanya dengan rahman dan rahim-Nya laporan kemajuan penelitian ini bisa diselesaikan

Pada kesempatan ini saya menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof.Dr.Nasich yang telah memberikan ijin dan berkenan memberikan kepercayaan kepada saya untuk memperoleh pendanaan penelitian unggulan perguruan tinggi di Universitas Airlangga

Dekan Fakultas Kedokteran Prof.Dr. Soetojo,dr.,Sp.BU (K) telah memberikan ijin dan kesempatan pada saya melaksanakan penelitian ini.

Prof. H. Hery Purnobasuki,Drs.,M.Si.Ph.D selaku ketua lembaga penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas untuk mengikuti PUPT di Universitas Airlangga

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr.rer.nat Ronny Martien M,Si ari Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada yang telah bersedia memimbing saya dalam pembuatan formulasi serta seluruh staf departemen farmaseutika yang telah membantu saya.

Saya berharap penelitian ini dapat memberikan kontribusi pada kesejahteraan umat manusia khususnya dalam bidang kesehatan.

Surabaya, November 2018

Ketua Peneliti

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT	22
BAB 4 METODE PENELITIAN	23
BAB 5 HASIL DAN LUARAN PENELITIAN	28
BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	42
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	
Lampiran 1	Determinasi tanaman
Lampiran 2	Sertifikat laik etik
Lampiran 3	Bukti submit
Lampiran 4	Draft artikel ke 2
Lampiran 5	HKI : No pendaftaran dan bukti uji substantif
Lampiran 6	Analisis statistik
Lampiran 7	Sertifikat presentasi oral internasional



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Rencana Target Capaian Tahunan	4
Tabel 5.1. Kadar gula darah tikus sebelum (GDA 1) dan 3 hari setelah induksi dengan STZ (GDA 2)	30
Tabel 5.2 Kadar gula darah tikus sebelum (GDA 2) dan 3 hari setelah induksi dengan STZ (GDA 3)	32
Tabel 5.3. berat badan dan kadar gula darah puasa sebelum dan sesudah perlakuan	34
Tabel 5.4. Rerata kadar gula darah puasa tikus sebelum dan sesudah perlakuan serta perbedaan (delta) antara kadar awal dan akhir perlakuan	36
Tabel 5.5. Nilai p Kadar TNF- α dari hasil analisis statistik	39
Tabel 5.6. Nilai p Kadar IL-6 dari hasil analisis statistik	40
Tabel 5.8. Nilai p Kadar gula darah dari hasil analisis statistik	40
Tabel 5.9 Nilai p HOMA IR dari hasil analisis statistik	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Singawalang	7
Gambar 4.1. Bagan rancangan penelitian	23
Gambar 5.1. Daun singawalang yang siap dipanen	28
Gambar 5.2. Bak pencucian daun Singawalang	28
Gambar 5.3. Daun singawalang dikeringkan diatas rak	28
Gambar 5.4. Ruang tempat pengeringan daun singawalang	28
Gambar 5.5. Ekstrak etanol 70% daun Singawalang	29
Gambar 5.6. Formulasi SNEEDs	30
Gambar 5.7. Homogenisasi formula SNEEDs dengan stirrer	30
Gambar 5.8. Pemeriksaan kadar gula darah	33
Gambar 5.9. Induksi streptozotocin	33
Gambar 5. 10. SNEDDS ekstrak daun singawalang siap disonde ke tikus	33
Gambar 5.11. Proses penyondean ekstrak ke tikus	33
Gambar 5.12. Kadar gula darah sebelum dan sesudah perlakuan pada setiap kelompok	35
Gambar 5.13. Berat badan sebelum dan sesudah perlakuan pada setiap kelompok	36
Gambar 5.14. Rerata kadar IL-6 pada serum darah tikus	37
Gambar 5.15 Rerata kadar Insulin pada serum darah tikus	38
Gambar 5.16. Rerata Nilai HOMA IR pada serum darah tikus	38
Gambar 5.17. Rerata kadar Insulin pada serum darah tikus	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Determinasi tanaman	45
Lampiran 2	Sertifikat laik etik	46
Lampiran 3	Bukti submit artikel 1	47
Lampiran 4	HKI : No pendaftaran dan bukti uji substantif	48
Lampiran 5	Draft artikelke 2	49
Lampiran 6	Analisis statistik	59
Lampiran 7	Sertifikat presentasi oral international	

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) adalah penyakit sindroma metabolik karena multifaktorial dan termasuk dalam penyakit degeneratif. Indonesia kini telah menduduki peringkat keempat jumlah penyandang diabetes terbanyak setelah Amerika Serikat, China dan India. Berdasarkan data dari Badan Pusat Statistik (BPS) jumlah penyandang diabetes pada tahun 2003 sebanyak 13,7 juta orang dan berdasarkan pola pertumbuhan penduduk diperkirakan pada 2030 akan ada 20,1 juta penyandang diabetes dengan tingkat prevalensi 14,7 persen untuk daerah urban dan 7,2 persen di rural

Diabetes mellitus (DM) terbagi menjadi 2 macam, diabetes mellitus tipe 1 (DMT1) dan diabetes mellitus tipe 2 (DMT2). DMT1 disebut juga diabetes mellitus tergantung insulin dan DMT2 yang disebut dengan diabetes mellitus tidak tergantung insulin. Angka kejadian DMT2 sebesar 90% jauh lebih besar bila dibandingkan dengan DMT1 sebesar 10%.

Penatalaksanaan DMT2 yang paling utama adalah pengendalian kadar gula darah, karena memegang peranan sangat penting dalam mencegah komplikasi DM. Komplikasi DM baik makro maupun mikrovaskular merupakan penyebab utama terjadinya penyakit seperti hipertensi, kebutaan, gagal ginjal, dan akhirnya menyebabkan kematian (Yadav et al., 2008, Ahmed et al., 2010). Kontrol glikemia secara ketat merupakan prioritas utama dalam penatalaksanaan DM namun kenyataannya selama ini hanya sebagian kecil pasien yang mencapai target glikemik jangka panjang (Syahbuddin, 2010).

Untuk mengatasi hal tersebut, maka perlu penatalaksanaan terapi yang tepat. Penatalaksanaan terapi DMT2 adalah pengaturan makanan, pemberian obat dan perubahan gaya hidup. Oleh karena itu, penelitian penemuan obat baru dan penemuan bahan pangan yang mempunyai khasiat mengatur regulasi gula darah terutama pengembangan bahan alam yang ada di Indonesia perlu ditingkatkan.

Singawalang (*Petiveria alliaceae*) adalah tumbuhan yang banyak ditemukan di Indonesia dan secara empiris digunakan oleh penduduk untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti kencing manis, batuk berdarah dan juga digunakan untuk melindungi tanaman dari hama. Ekstrak etanol daun singawalang mempunyai kemampuan untuk menurunkan kadar gula darah (Barbosa-Filho et al., 2005, Dominguez et al., 2002). Mustika et al., 2015, juga menunjukkan bahwa Ekstrak daun singawalang menurunkan

kadar gula darah pada tikus model DM tipe 2 dengan dosis optimum 360 mg/kgbb dan juga meningkatkan ekspresi AMPK pada liver (Mustika et al., 2015).

Fenomena ini menimbulkan harapan bahwa ekstrak tersebut dapat digunakan sebagai obat fitofarmaka dalam penatalaksanaan DMT2. Untuk sampai pada tahap fitofarmaka, maka perlu dilakukan penelitian baik tentang mekanisme kerja pada tahap uji pre klinik maupun uji klinik. Selain itu, juga perlu dilakukan penelitian tentang formulasi bentuk sediaan ekstrak daun singawalang. Hal ini disebabkan karena, ekstrak tersebut mengandung berbagai macam senyawa sehingga kemungkinan bisa terjadi kompetisi pada proses absorpsi dan akan menyebabkan absorpsi bahan aktif di gastrointestinal menurun. Salah satu cara untuk meningkatkan absorpsi dan disposisi bahan aktif pada target organ adalah dengan menggunakan formulasi nanopartikel (Martien et al., 2012). Oleh karena formulasi bentuk sediaan obat dan sistem penghantaran bahan aktif memegang peranan penting dalam menentukan efek terapeutiknya. Berbagai riset telah dikembangkan untuk memperbaiki formulasi dan sistem penghantaran yang bertujuan untuk meningkatkan kadar bahan aktif sampai ke target organ, salah satunya adalah dengan penghantaran bahan aktif dalam sistem nanopartikel (Ober and Gupta, 2011, Meena et al., 2011)

Penelitian tahap awal yang telah dilakukan adalah menghasilkan produk berupa formulasi nanoemulsi ekstrak daun singawalang. Sampai saat penelitian tentang formulasi nanopartikel ekstrak daun singawalang, khasiat maupun mekanisme kerjanya untuk meregulasi glukosa pada penyakit DMT2 belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, peneliti akan melakukan penelitian tentang efek dan mekanisme kerja nanopartikel ekstrak daun singawalang (*Petiveria Alliaceae*) pada regulasi glukosa melalui IRS-1, Insulin, TNF- α , IL-6, SIRT-1 Dan PGC1 α pada model tikus diabetes mellitus.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah pemberian formulasi nanoemulsi ekstrak etanol daun Singawalang mempengaruhi kadar gula darah, interleukin 6, TNF α , insulin pada tikus model DM ?
2. Bagaimanakah hubungan antara dosis formulasi nanoemulsi ekstrak etanol daun Singawalang dengan kadar gula darah tikus model DM ?

1.3. Urgensi Penelitian

Hasil penelitian yang dilakukan Kementerian Kesehatan RI menunjukkan angka harapan hidup masyarakat Indonesia dari tahun ke tahun terus meningkat. Pada tahun 2014 umur harapan hidup masyarakat Indonesia rata-rata akan mencapai 72 tahun, angka ini meningkat bila dibandingkan dengan data pada tahun 2004, umur harapan hidup 66,2 tahun. Peningkatan angka harapan hidup itu menyebabkan bertambahnya populasi penduduk berusia lanjut atau usia di atas 60 tahun. Pada tahun 2000, jumlah penduduk usia lanjut di Indonesia sekitar 5,3 juta. Pada tahun 2010, jumlah itu meningkat tajam menjadi 24 juta. Makin besar jumlah penduduk usia lanjut, maka tantangan di bidang kesehatan juga semakin besar karena penyakit degeneratif termasuk diabetes melitus tipe 2 juga akan meningkat dan tentunya akan menambah beban pada sektor kesehatan. Untuk mengatasi hal tersebut, maka perlu penatalaksanaan terapi yang tepat. Penatalaksanaan terapi DMT2 adalah pengaturan makanan, pemberian obat dan perubahan gaya hidup. Oleh karena itu, penelitian penemuan obat baru dan penemuan bahan pangan yang mempunyai khasiat mengatur regulasi gula darah terutama pengembangan bahan alam yang ada di Indonesia perlu ditingkatkan.

Singawalang adalah tumbuhan yang ada di Indonesia dan mudah dibudidayakan. Ekstrak etanol tumbuhan tersebut dilaporkan mempunyai khasiat untuk menurunkan kadar gula darah sehingga diduga ekstrak tersebut mengandung bahan aktif yang berpotensi untuk mengatur regulasi glukosa di dalam tubuh (Domínguez *et al.*, 2002, Barbosa-Filho *et al.*, 2005) Untuk menjadikan tumbuhan tersebut menjadi obat fitofarmaka dalam terapi DM, maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh dan mekanismenya dalam mengatur regulasi glukosa di dalam tubuh.

Penelitian ini memiliki aspek strategis didalam pengembangan bahan alam Indonesia. Dampak dari penelitian ini tidak saja pada bidang ilmu pengetahuan, kesehatan tetapi juga pada bidang ekonomi dengan tumbuhnya industri fitofarmaka. Selain itu, pengembangan obat fitofarmaka juga akan mengurangi kebutuhan import bahan obat dan lambat laun akan menuju kemandirian dalam bidang kesehatan.

Penelitian tentang Efek ekstrak daun Singawalang (*Petiveria alliacea*) pada penurunan kadar gula darah dan peningkatan sensitivitas jaringan terhadap insulin juga terkait langsung dengan rencana induk penelitian (RIP) Universitas Airlangga (UA). Salah satu tema riset UA adalah pengembangan bahan obat alam. Hal ini disebabkan karena bahan obat alam Indonesia masih kurang berperan dalam penanganan penyakit dan standarisasi obat/bahan obat asli Indonesia yang belum banyak diungkap melalui penelitian ilmiah, sehingga penelitian untuk eksplorasi potensi khasiat obat dalam bahan alam asli Indonesia yang berindikasi memiliki

potensi khasiat obat dilakukan penelitian ilmiah aplikasi, sosialisasi dan industrialisasi bahan sangat didukung.

Tabel 1.1 Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian		
			1)	TS+1	TS+2
1	2) Publikasi ilmiah	Internasional		submiitte	accept
		Nasional Terakreditasi			
2	Pemakalah dalam temu ilmiah ³⁾	Internasional			
		Nasional	draf		
3	<i>Invited speaker</i> dalam temu	Internasional			
		Nasional			
4	<i>Visiting Lecturer</i> ⁵⁾	Internasional			
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI) ⁶⁾	Paten			
		Paten sederhana	draf	terdaftar	
		Hak Cipta			
		Merek dagang			
		Rahasia dagang			
		Desain Produk Industri			
		Indikasi Geografis			
		Perlindungan Varietas Tana Perlindungan Topografi Sirk			
6	Teknologi Tepat Guna ⁷⁾				
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/ Rekayasa Sosia				
8	Buku Ajar (ISBN) ⁹⁾				
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT) ¹⁰⁾	3	4	4	

BAB2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *State of the art* bidang penelitian

Barbosa-Filho *et al.*, 2005 melaporkan bahwa Singawalang (*Petiveria alliaceae*) mempunyai aktivitas menurunkan kadar gula darah. Pada tahun 1990, Lores *et al.*, menunjukkan bahwa tumbuhan tersebut memiliki aktifitas hipoglikemik dan hal ini diperkuat dengan penelitian tentang efek hipoglikemik ekstrak tersebut secara invitro pada eritrosit (Domínguez *et al.*, 2002). Penelitian tersebut mengindikasikan bahwa ekstrak daun Singawalang bahan aktif yang berpotensi sebagai antidiabetik.

Penelitian terhadap efek toksik tanaman ini pernah dilakukan pada hewan tikus di laboratorium Universitas Illionis, Chicago. Tes perlakuannya dimulai dari rebusan daun kering singawalang dengan dosis tepat disesuaikan dengan bobot tikus. Hasil pengamatan yang dilakukan, ternyata dengan dosis 6,25 g/kgbb Singawalang menghalangi timbunan cairan dan gas dalam jaringan (edema) pada kaki tikus. Pada dosis 10g/kgbb terjadi pengurangan asam asetat yang mengakibatkan menggeliatnya tikus-tikus tersebut. Selain itu, hasil yang diperoleh dari uji coba dengan dosis 360 mg/kg terhadap 100 ekor tikus, yang pada akhirnya separuh jumlah tikus tadi mati (LD50). Berdasarkan analisis dan uji coba tersebut diperoleh gambaran, tanaman obat singawalang sedikit beracun (Cifuentes, 2009).

Peneliti juga sudah melakukan studi pendahuluan terutama untuk uji toksisitas. Ekstrak daun singawalang juga telah dilakukan uji toksisitas akut pada mencit. Pada penelitian tersebut mencit diberi ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 90 mg/kgbb, 180 mg/kgbb dan 360mg/kgbb. Ekstrak diberikan dalam bentuk suspensi diberikan dalam dosis tunggal sesuai dengan berat badan mencit secara peroral. Mencit diamati selama 24 jam dan pada periode tersebut tidak terjadi kematian pada mencit (Zakaria *et al.*, 2010). Uji toksisitas dilanjutkan untuk mengetahui toksisitas jangka pendek (subkronik), penelitian dilakukan dengan memberikan ekstrak etanol daun Singawalang secara berulang, setiap hari atau lima kali seminggu dalam jangka waktu kurang lebih 10% dari masa hidup hewan coba, yaitu tiga bulan untuk tikus. Pada penelitian ini, ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 90 mg/kgbb, 180 mg/kgbb dan 360mg/kgbb, diberikan dalam bentuk suspensi dengan dosis sesuai dengan berat badan mencit secara peroral, sehari sekali selama 21 hari. Efek toksik ekstrak tersebut dilihat pada fungsi liver, fungsi ginjal dan kerusakan jaringan ginjal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, pemberian ekstrak etanol daun singawalang pada dosis 90 mg/kgbb, 180 mg/kgbb dan 360mg/kgbb selama tiga bulan, tidak meningkatkan kadar

SGOT, SGPT, BUN, dan SK serum darah mencit bila dibandingkan dengan . Pemeriksaan pada jaringan ginjal juga tidak menunjukkan nekrosis pada tubulus ginjal (Naibaho *et al.*, 2013, Pratiwi *et al.*, 2013, Mustika, 2014).

Berbagai penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun singawalang tidak menunjukkan tanda toksisitas pada hewan coba sehingga memungkinkan untuk digunakan pada manusia.

2.2. Riset yang sudah dilakukan

Pada tahun 2011-2014 :

1. Riset tentang formulasi ekstraksi daun singawalang dengan eluen etanol 96% dan menggunakan metode maserasi.
2. Uji aktivitas ekstrak etanol daun singawalang terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara *in vitro* pada media Lowenstein Jennsen
3. Uji aktivitas ekstrak etanol daun singawalang terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara *in vitro* pada media 7H10.
4. Uji toksisitas akut dan sub akut ekstrak etanol daun singawalang pada tikus
5. Uji toksisitas ekstrak etanol daun singawalang pada liver dan ginjal tikus

Pada tahun 2015-2016

Uji aktivitas ekstrak etanol daun singawalang terhadap kadar gula darah dan ekspresi AMPK dan GLUT 4 pada liver dan otot skeletal tikus model diabetes.

Pada tahun 2017

Telah dilakukan penelitian untuk pembatan formulasi nanoemulsi ekstrak daun singawalang. Pada penelitian ini menghasilkan enam formulasi dengan berbagai macam komposisi. Fase minyak yang sesuai untuk ekstrak daun singawalang adalah migliol dan VCO, komponen surfaktan yang sesuai adalah Tween 80 dan kosurfaktan yang sesuai adalah PEG 400

2.2. Singawalang (*Petiveria alliaceae*)

Singawalang merupakan salah satu tanaman dalam famili *Phytolaccaceae* (gandola-gandolaan), tanaman tersebut masuk ke Indonesia melalui India. Tanaman tersebut berbentuk semak, merunduk, tingginya bisa mencapai 1 meter, berdaun jorong dengan panjang 6-19 cm, meruncing atau lancip, serta ujungnya tajam. Buahnya berbentuk garis sepanjang 6 mm, ciri khasnya berbau seperti marga bawang ((Taylor, 2004))

Taksonomi

- Divisi : *Spermatophyta*
 Sub Divisi : *Angiospermae*
 Kelas : *Dicotyledonae*
 Bangsa : *Caryophyllales*
 Famili : *Phytolaccaceae*
 Genus : *Petiveria*
 Spesies : *Petiveria alliacea*
 Nama umum : Singawalang
 Nama daerah : Daun tangguh
 Nama Inggris : *Guinea hen weed, Anamu*



Gambar 2.1 Tanaman Singawalang

Singawalang dapat tumbuh subur di kebun daerah panas. Tanaman tersebut dapat memberikan aroma yang khas pada susu dan daging dari ternak yang memakannya (Taylor, 2004, Setiawati et al., 2008)

Khasiat (*Petiveria alliacea*).

Tanaman ini dimanfaatkan sebagai obat tradisional penderita muntah darah akibat tuberkulosis, kanker, peluruh kencing (diuretik), peluruh dahak (ekspektoran), peluruh keringat (sudofirik), peluruh cacing (vermifuga), pereda kekejangan (antipasmodik), dan obat bagi penderita saraf (Setiawati et al., 2008). Tanaman juga mempunyai khasiat sebagai

menurunkan kadar gula darah (Domínguez et al., 2002). Tanaman singawalang (*Petiveria alliacea*) secara luas telah disarankan untuk terapi kanker, tetapi mekanisme molekuler pada aktivitas anti tumornya masih belum dapat dijelaskan (Cifuentes, 2009). Singawalang mengandung bahan aktif yang mampu melawan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan jamur *Histoplasma capsulatum* yang diketahui pada pengamatan in vitro. Senyawa tersebut juga merangsang aktivitas leukosit disistem limpa, butiran getah bening dan tulang belakang (Taylor,2004;(Kim et al., 2006).

2.3. Nano Partikel Sebagai Sistem Penghantaran Obat ((Martien et al., 2012)

Dasar pertimbangan pada pengembangan teknologi untuk terapi farmasetis terdiri dari tiga faktor utama yaitu menciptakan sistem yang efektif (*effectiveness*), menekan efek bahaya pada sistem jika diaplikasikan (*safety*), dan membuat agar sistem dapat diterima dengan baik oleh pasien (*acceptability*). Tiga pertimbangan ini mengantarkan usaha pengembangan teknologi penghantaran obat hingga pada kemajuan yang pesat. Saat ini telah banyak teknologi penghantaran obat diperkenalkan sebagai upaya melahirkan obat baru dengan sifat yang ideal, mulai dari penemuan struktur obat baru hasil sintesis origin maupun hasil modifikasi, kuantifikasi hubungan struktur-aktivitas secara komputasional (*quantitative structure-activity relationship, QSAR*), hingga pada pengembangan teknologi formulasinya. Penelusuran aktivitas obat juga telah mencapai pemahaman pada aras molekuler dengan telah diperkenalkannya berbagai instrumen dan metode analisis molekuler.

Teknologi formulasi sediaan farmasi dan sistem penghantaran obat memegang peranan penting dalam proses penemuan terapi farmasetis baru pada publik. Pertimbangan fisikokimia dan molekuler meliputi kesetimbangan ion-molekul, kesetimbangan hidrofilik-lipofilik, proses biofarmasetika, metabolisme dan biodegradasi, afinitas obat-reseptor, pertimbangan fisiologis, serta biokompatibilitas dari sistem menjadi faktor utama yang umum diperhatikan dalam melakukan penelitian pada bidang ini. Meskipun demikian, semakin majunya pemahaman terhadap mekanisme yang terjadi di dalam tubuh membuat berbagai masalah yang pada mulanya kurang diperhatikan menjadi bahan pertimbangan yang harus dicarikan solusinya. Pada beberapa kasus, misalnya pada tahap awal, sebuah molekul obat yang poten tidak dapat menembus sistem pertahanan tubuh dengan baik sehingga ketersediaan hayati senyawa dalam sirkulasi sistemik maupun jaringan yang sakit menjadi sangat rendah. Berbagai penelitian dikembangkan untuk meningkatkan kadar senyawa tersebut di dalam darah, baik dengan meningkatkan efektivitas dan kecepatan absorpsi, menghindari biodegradasi oleh enzim, maupun modifikasi molekuler untuk meningkatkan

absorpsi seluler. Namun demikian permasalahan timbul setelah usaha-usaha yang dilakukan mencapai keberhasilan yaitu ditemukan gejala ketoksikan atau munculnya efek samping maupun efek balik pada studi keamanan secara *in vivo* karena jumlah obat yang mencapai kadar yang tidak dapat ditoleransi oleh tubuh. Permasalahan tersebut mengubah cara pandang para peneliti farmasi dalam pengembangan teknologi formulasi yaitu untuk lebih fokus pada peningkatan efektivitas penghantaran obat pada jumlah yang tepat. Fakta ini membawa berbagai penelitian pada kecenderungan untuk melakukan berbagai modifikasi pada sistem terbaik yang ada.

Penghantaran nanopartikel dideskripsikan sebagai formulasi suatu partikel yang terdispersi pada ukuran nanometer atau skala per seribu mikron. Batasan ukuran partikel yang pasti untuk sistem ini masih terdapat perbedaan karena nanopartikel pada sistem penghantaran obat berbeda dengan teknologi nanopartikel secara umum. Pada beberapa sumber disebutkan bahwa nanopartikel baru menunjukkan sifat khasnya pada ukuran diameter di bawah 100 nm, namun batasan ini sulit dicapai untuk sistem nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat. Nanopartikel obat secara umum harus terkandung obat dengan jumlah yang cukup di dalam matriks pada tiap butir partikel, sehingga memerlukan ukuran yang relatif lebih besar dibanding nanopartikel non-farmasetik. Meskipun demikian secara umum tetap disepakati bahwa nanopartikel merupakan partikel yang memiliki ukuran di bawah 1 mikron (Tiyaboonchai, 2003; Buzea *et al.*, 2007). Ukuran ini dapat dikarakterisasi secara sederhana dan secara visual menghasilkan dispersi yang relatif transparan, serta perpanjangan lama pengendapan disebabkan karena resultan gaya ke bawah akibat gravitasi sudah jauh berkurang. Hal tersebut sebagai akibat dari berkurangnya massa tiap partikel dan peningkatan luas permukaan total yang signifikan menghasilkan interaksi tolak menolak antar partikel yang besar dan muncul fenomena gerak Brown sebagai salah satu karakter spesifik partikel pada ukuran koloidal (Gupta dan Kompella, 2006).

Beberapa kelebihan nanopartikel adalah kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal (Buzea *et al.*, 2007), kemampuan untuk menembus dinding sel yang lebih tinggi, baik melalui difusi maupun opsonifikasi, dan fleksibilitasnya untuk dikombinasi dengan berbagai teknologi lain sehingga membuka potensi yang luas untuk dikembangkan pada berbagai keperluan dan target. Kelebihan lain dari nanopartikel adalah adanya peningkatan afinitas dari sistem karena peningkatan luas permukaan kontak pada jumlah yang sama (Kawashima, 2000). Pembentukan nanopartikel dapat dicapai dengan berbagai teknik yang sederhana. Nanopartikel pada sediaan farmasi dapat berupa sistem obat dalam matriks seperti nanosfer

dan nanokapsul, nanoliposom, nanoemulsi, dan sebagai sistem yang dikombinasikan dalam perancah (*scaffold*) dan penghantaran transdermal.

Kemampuan nanopartikel untuk meningkatkan ketersediaan hayati obat dengan kelarutan yang rendah dalam sirkulasi sistemik telah banyak dibuktikan (Bhatia *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2005). Kemampuan ini berlaku umum pada berbagai aplikasi penghantaran (Gelperina *et al.*, 2005): oral (Martien *et al.*, 2006), intravena (Li *et al.*, 2009), pulmonar (Tonnis *et al.*, 2012; Muttill *et al.*, 2010), dan transdermal (Ravichandran, 2009). Peningkatan jumlah obat dalam darah pada penghantaran sistemik juga akan meningkatkan resiko munculnya efek samping maupun efek balik, hingga pada resiko tercapainya batas kadar toksik (Poelstra *et al.*, 2012). Pada banyak kasus, peningkatan kadar obat dalam darah ini sangat diperlukan bagi obat untuk dapat menimbulkan efek farmakologis. Oleh karena itu, nanopartikel memberikan solusi yang baik karena dapat memberikan efek farmakologis pada dosis yang lebih kecil (efisien) (Hu dan Li, 2011; Wu *et al.*, 2005). Kesesuaian bentuk sediaan nanopartikel dengan jaringan target dan penyakit diperlukan untuk memperoleh sistem yang dapat memberikan hasil terapi yang optimal. Jaminan akan tercapainya tujuan terapi merupakan syarat mutlak yang diperlukan untuk dapat memperkenalkan produk sistem penghantaran obat baru yang dapat diandalkan.

Nanopartikel Berbasis Biopolimer

Polimer merupakan molekul rantai dengan molekul gabungan monomer yang berulang. Keberulangan monomer ini membuat polimer memiliki sifat kimiawi khas yang kuat. Sifat kimiawi dari satu buah monomer utamanya gugus fungsi spesifik yang berperan pada berbagai keperluan interaksi kimiawi, tersedia dalam jumlah yang banyak dan membuka peluang untuk dimanfaatkan pada banyak keperluan yang membutuhkan interaksi kimiawi spesifik dalam jumlah yang melimpah, misalnya sebagai fase diam dalam pemisahan pada kromatografi, serta dalam pengembangan sediaan farmasi sebagai eksipien dalam formulasi dan sebagai matriks.

Biopolimer dideskripsikan sebagai molekul polimer yang memiliki biokompatibilitas pada sistem biologis. Biopolimer telah digunakan secara luas sebagai biomaterial pada produk-produk biomedis, dalam hal ini utamanya sebagai bahan sistem penghantaran obat. Penggunaan biopolimer sebagai bahan dalam formulasi obat ini secara umum karena beberapa alasan yaitu bersifat inert terhadap bahan aktif namun kompatibel untuk dilakukan kombinasi dan memiliki karakter khusus misalnya pada penggunaan berbagai derivat polimer gula (Schellenkens *et al.*, 2012), memiliki kemampuan membentuk jaringan sehingga dapat dikembangkan sebagai sistem pembawa berupa matriks partikel (Bisht *et al.*, 2007; Rafeeq *et*

al., 2010), manik (*beads*) (Mi *et al.*, 2002; Avadi *et al.*, 2004), atau *patch* (Ravichandran, 2009) misalnya HPMC, PLGA, pektin, alginat dan kitosan, serta memiliki gugus fungsi yang melimpah sehingga memungkinkan pengikatan molekul obat dalam jumlah yang memadai pada sistem secara keseluruhan atau dapat disebut memiliki efisiensi penyerapan yang tinggi. Banyaknya jenis biopolimer yang dapat dijadikan alternatif dalam penentuan bahan yang paling tepat dengan kebutuhan memberikan pilihan yang tak terbatas bagi formulator. Polimer yang paling sesuai dapat ditentukan dengan berbagai cara dan pertimbangan, yaitu dengan penentuan jenis ikatan yang paling optimal antara gugus fungsi dengan molekul obat, kelebihan spesifik polimer dalam proses biofarmasetis, dengan pendekatan optimasi beberapa alternatif polimer, maupun dengan menggunakan kombinasi beberapa pertimbangan tersebut. Kitosan merupakan polimer yang telah cukup populer digunakan dalam sistem nanopartikel. Hal ini disebabkan karena kitosan memiliki beberapa sifat khas yang tidak dimiliki oleh polimer lain. Kitosan dilaporkan memiliki kemampuan untuk membuka kait antar sel (*tight junction*) pada membran usus secara sementara (Bhardwaj dan Kumar, 2006; Martien *et al.*, 2008) melalui mekanisme translokasi protein Claudin-4 (*Cldn4*), Zonula occludens-1 (*ZO-1*), dan Occludin dari membran sel ke sitosol (Smith *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2011), sehingga sangat potensial untuk dikembangkan sebagai bahan utama pembuatan nanopartikel yang ditujukan untuk aplikasi per oral. Hal ini didukung kelebihan lain dari kitosan yaitu muatan pada gugus amonium yang positif dapat mengadakan interaksi ionik dengan asam sialat pada membran intestinal saluran cerna (Vllasaliu *et al.*, 2010). Biokompatibilitas kitosan dikarenakan kitosan merupakan polimer yang diperoleh dari hidrolisis polimer kitin yang berasal sumber alam yang sudah menjadi konsumsi umum pada cangkang hewan laut, sehingga cenderung tidak menimbulkan ketoksikan pada dosis terapi, selain dari sifatnya yang sekaligus biodegradabel (Tiyaboonchai, 2003).

Salah satu metode sederhana pembuatan nanopartikel kitosan dilakukan dengan metode ionik gelasi. Kitosan dilarutkan pada larutan dengan pH asam untuk mengubah gugus amina ($-NH_2$) menjadi terionisasi positif ($-NH_3^+$). Gugus yang telah terionisasi positif ini selanjutnya mampu membentuk interaksi ionik dengan obat yang bermuatan negatif (Bhumkar dan Pokharkar, 2006). Secara keseluruhan, sistem yang terbentuk cenderung menyisakan gugus amonium bebas yang akan saling tolak-menolak sehingga melemahkan kompleks nanopartikel yang telah terbentuk. Oleh karena itu, perlu ditambahkan adanya suatu pengikat silang (*crosslinker*) yang mampu menstabilkan muatan positif yang tersisa. Pengikat silang ini harus berupa poli-anion, dan salah satu yang banyak digunakan adalah anion tripolifosfat (TPP) (Bhumkar dan Pokharkar, 2006; Kafshgari *et al.*, 2011). Meskipun

demikian, sistem ini memiliki kelemahan yaitu stabilitasnya sangat dipengaruhi oleh tingkat keasaman, di mana variasi pH akan mempengaruhi ionisasi kitosan yang pada akhirnya mempengaruhi kekuatan ikatan pada kompleks (Lopez-Leon et al., 2005).

Kitosan dapat digunakan dalam formulasi nanopartikel berbagai molekul, baik obat maupun gen (Bowman dan Leong, 2006). Kemampuan kitosan untuk dijadikan alternatif yang cocok pada banyak senyawa obat ditunjukkan pada berbagai penelitian, di antaranya dapat digunakan pada formulasi nanopartikel paclitaxel, suatu obat antikanker pada ukuran 116 nm (Li et al., 2009), ampisilin trihidrat (Saha et al., 2010), kombinasi 5-fluorourasil dan leucovorin, suatu antikanker kolon, dengan ukuran partikel bervariasi mulai dari 40,73-78-53 nm (Li et al., 2011), deksametason natrium fosfat, suatu obat antiinflamasi, dengan ukuran 250-350 nm (Dustgani et al., 2008), dan model protein seperti bovine serum albumin (BSA) (Kafshgari et al., 2011).

Pengembangan kitosan sebagai biopolimer pembentuk nanopartikel masih sangat terbuka karena mekanismenya yang bersifat umum dan metodenya yang sederhana. Suatu metode sederhana lain dalam pembuatan nanopartikel kitosan yang telah dipatenkan dilakukan oleh Masotti et al (2007), yaitu metode dialisis, di mana kitosan digunakan dalam formulasi nanopartikel DNA. Dalam penelitian ini biopolimer kationik secara umum dapat digunakan sebagai matriks nanopartikel menggunakan metode yang telah dikembangkan. Pemilihan kitosan sebagai matriks DNA adalah karena sifatnya yang dapat melepas obat secara bertahap dalam waktu yang cukup lama, sehingga dapat meminimalkan pemberian berulang. Metode dialisis ini dapat menghasilkan nanopartikel kitosan-DNA pada ukuran 38 nm.

Penggunaan biopolimer lain dipresentasikan oleh Bisht et al (2007) yang telah berhasil memformulasikan nanokurkumin menggunakan N-isopropilakrilamid (NIPAAm) yang dikopolimerisasikan sebagai pengikat silang dengan N-vinil-2-pirrolidon (VP) dan Polietilenglikol-monoakrilat (PEG-A). Sistem nanopartikel kombinasi ini telah berhasil disintesis dengan cukup homogen pada distribusi ukuran partikel pada selisih yang sempit yaitu sebesar 50 nm. Sistem nanopartikel ini mampu menunjukkan potensi sebagai kandidat antitumor yang potensial secara *in vitro*. Selain itu Xie dan Smith (2010) melaporkan telah dapat menghasilkan sistem nanopartikel berbasis poly(lactic co-glycolic acid) (PLGA) dengan distribusi ukuran partikel yang homogen. Senyawa PLGA telah dilaporkan dapat dimanfaatkan untuk fabrikasi nanopartikel sebagai penghantaran DNA dengan metode evaporasi-difusi emulsi, menghasilkan suatu nanosfer dengan polivinil alkohol sebagai stabilisator. Pada metode ini, campuran formula dalam etil asetat dihomogenisasi, dan ditetesi

dengan air untuk menghasilkan suatu nano-presipitat (Kumar et al., 2004). Nanopartikel PLGA-PEG juga telah terbukti mempunyai peran dalam membentuk sistem penghantaran obat dengan pelepasan terkontrol, di mana sistem nanopartikel ini melepaskan obat dengan lambat hingga 7 hari (*in vitro*) dan 11 hari (*in vivo*) dengan biodegradasi gradual (Vij et al., 2010).

Konsep gelasi ionik atau kompleksasi ionik juga memungkinkan untuk penggunaan dua macam biopolimer dalam satu sistem formulasi. Kedua biopolimer yang digunakan harus memiliki muatan yang berlawanan, sehingga dapat membentuk matriks yang fleksibel untuk menjerap obat dengan sifat yang lebih luas, misalnya kombinasi kitosan-alginat (Li et al., 2008) atau kitosan-karagenin (Grenha et al., 2009), yang dapat digunakan sebagai matriks berbagai obat dengan sifat yang lebih umum karena penjerapan berlangsung secara fisik. Grenha *et al* (2008) melaporkan bahwa kompleks nanopartikel kitosan-karagenin dapat digunakan sebagai pembawa bagi ovalbumin sebagai protein model dengan kapasitas penjerapan sebesar 4-17%. Kompleks kitosan-alginat juga dilaporkan bermanfaat dalam meningkatkan stabilitas obat dalam cairan biologis (Gazori *et al.*, 2009).

Beberapa permasalahan yang sering timbul pada preparasi nanopartikel adalah terjadinya agregasi yang cepat dan ukuran partikel yang tidak merata, sehingga stabilitas sistem dispersi menjadi sulit dikontrol. Permasalahan dapat dipahami dengan melakukan karakterisasi secara menyeluruh pada nanopartikel, selain dari ukuran partikel, perlu diketahui karakter morfologi partikel dan nilai potensial zeta. Morfologi nanopartikel dapat dikarakterisasi menggunakan piranti *scanning electron microscopy* (SEM) maupun *transmission electron microscopy* (TEM), sedangkan potensial zeta dapat diukur menggunakan *zetasizer* (Bowman dan Leong, 2006; Martien *et al.*, 2006; Bisht *et al.*, 2007). Morfologi partikel penting karena bentuk partikel yang kurang sferis akan mempermudah kontak antar partikel menjadi berujung pada agregasi. Potensial zeta partikel akan memberikan gambaran gaya tolakan antar partikel dan menyebabkan semakin besar potensial zeta maka sistem dispersi akan semakin stabil (Couvreur *et al.*, 2002). Besarnya potensial zeta ini perlu disesuaikan dengan kompatibilitasnya dengan sel sebagai target biologis. Berbagai permasalahan yang timbul pada formulasi nanopartikel dapat dicarikan solusinya yaitu menggunakan modifikasi permukaan partikel (Kamiya dan Iijima, 2010).

Nanoliposom dan Nanoemulsi

Efektivitas nanoliposom dalam penghantaran obat salah satunya ditunjukkan pada formulasi nanoliposom ticarcillin sebagai obat antibiotika, yang diproduksi dengan

menggunakan metode tekanan (ekstrusi) (Gharib *et al.*, 2012). Metode ini menggabungkan pembentukan liposom melalui metode pencampuran dan penguapan biasa, dilanjutkan tahap pencampuran obat, dan pembentukan nanoliposom dengan dilewatkan menggunakan tekanan melalui membran polikarbonat 100 nm (Maestrelli *et al.*, 2009). Nanoliposom ticarcillin ini dengan muatan permukaan positif (kationik) telah dibuktikan mampu secara signifikan meningkatkan aktivitas antibiotika ticarcillin pada *Pseudomonas aeruginosa* (Gharib *et al.*, 2012). Hal ini disebabkan karena kemampuan liposom yang lebih mudah diterima oleh membran lipid, termasuk membran sel bakteri. Sebagai hasilnya, selain berpengaruh besar pada proses biofarmasetiknya, untuk kasus bakterisida ini nanoliposom juga secara efektif meningkatkan aktivitas farmakologinya.

Teknik sederhana lain untuk menghasilkan suatu sistem nanoliposom yang berkualitas dipresentasikan oleh Xia *et al* (2006). Nanoliposom dapat digunakan untuk enkapsulasi koenzim Q10 (CoQ10) hanya dengan metode pencampuran, dan diproduksi dengan teknik injeksi etanol dan ultrasonikasi yang dapat dilakukan menggunakan peralatan yang sederhana dan murah, dan diperoleh globul dengan ukuran rata-rata 67 nm pada kombinasi fosfolipid/CoQ10/kolesterol/tween80, dengan tingkat efisiensi enkapsulasi lebih besar dari 95% (Xia *et al.*, 2006). Dari kedua contoh ini dapat disimpulkan bahwa nanoliposom merupakan teknologi yang menjanjikan dengan alternatif metode yang dapat dilakukan pada banyak laboratorium. Oleh karena itu, saat ini telah banyak paten atas teknologi ini diantaranya hasil publikasi dari Oh dan Lee (2008) yaitu nanoliposom yang digunakan dalam enkapsulasi protein dan Hong *et al* (2009) yaitu preparasi nanoliposom menggunakan lesitin. Nanoliposom dapat dimanfaatkan sebagai perlindungan terhadap obat dari degradasi biologis sebelum sampai pada tempat yang diharapkan. Salah satu contoh yang baik dapat dilihat dari formulasi nanoliposom ferro-glisinat, suatu garam besi yang digunakan untuk terapi defisiensi mineral besi dalam tubuh. Masalah utama penggunaan mineral ini adalah pada penggunaan melalui administrasi oral, garam ini kurang stabil dalam tingkat keasaman tinggi karena akan terdisosiasi dari bentuk glisinatnya. Ding *et al* (2010) telah berhasil memformulasikan nanoliposom dari garam ferro-glisinat yang cukup stabil dalam pH asam sampai pH 2, meskipun pada tingkat keasamaan yang ekstrim di bawah 1,5 tetap mengalami disosiasi. Namun konsep usaha yang telah dilakukan menunjukkan bahwa nanoliposom berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai sistem pelindung dalam penghantaran obat. Contoh lain pada pemanfaatan nanoliposom sebagai sistem yang meningkatkan stabilitas adalah formulasi nanoliposom pada retinol yang sangat mudah terdegradasi oleh cahaya. Retinol tanpa formulasi habis terdegradasi seluruhnya setelah dua hari penyimpanan, sedangkan pada

nanoliposom retinol masih terdapat lebih dari 20% retinol setelah delapan hari penyimpanan (Ko dan Lee, 2010).

Hingga saat ini cukup banyak pilihan metode yang dapat digunakan dalam pembuatan nanoliposom. Salah satu metode yang cukup aplikatif dan sederhana adalah dengan aliran kontinyu mikrofluidik. Liposom terbentuk dari campuran fosfolipid dengan obat pada pelarut organik seperti isopropil alkohol (IPA) yang ditekan melalui kanal dengan ukuran mikro yang masuk ke dalam aliran buffer. Karakter nanoliposom yang dihasilkan akan bervariasi tergantung pada luas kanal serta rasio kecepatan alir volumetrik antara tekanan yang diberikan pada campuran yang melalui kanal dengan kecepatan alir buffer (Jahn *et al.*, 2008). Metode pembuatan nanoliposom ini memungkinkan modifikasi yang fleksibel sesuai dengan kebutuhan dan memberikan hasil yang cukup homogen dan reproduibel selama faktor-faktor penentunya dapat dikontrol dengan baik.

Selain berbagai alternatif metode, fleksibilitas nanoliposom juga ditunjukkan dari ketersediaan berbagai jenis fosfolipid, baik yang sudah tersedia dari bahan alam, maupun derivat hasil modifikasi kolesterol. Malaekheh-Nikouei *et al* (2009) telah mengaplikasikan tiga derivat kolesterol yang dimodifikasi dengan penambahan gugus asam amino pada formulasi nanoliposom sebagai penghantaran DNA. Nanoliposom-DNA dengan derivat kolesterol termodifikasi ini memberikan hasil penetrasi seluler yang bervariasi namun secara konklusif semakin kationik gugus asam amino, semakin baik penetrasi seluler nanoliposom. Kesimpulan yang dapat diambil yaitu bahwa variasi pada fosfolipid penyusun nanoliposom akan berpengaruh pada sistem nanoliposom secara keseluruhan, yang dengan pertimbangan sifat molekuler dari sel target dapat digunakan untuk mengontrol kemampuan penetrasi seluler dari obat. Abreu *et al* (2011) melaporkan keberhasilan formulasi nanoliposom pada suatu obat antitumor metil 6-metoksi-3-(4-metoksifenil)-1H-indol-2-karboksilat dengan menggunakan variasi kombinasi lesitin telur (Egg-PC), dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC), dipalmitoil fosfatidilgliserol (DPPG), DSPC, kolesterol, diheksadesil fosfat, dan DSPE-PEG. Nanoliposom yang dihasilkan memiliki ukuran hidrodinamik bervariasi di bawah 120 nm, dengan stabilitas yang baik.

Pengembangan metode analisis nanoliposom dan berbagai jenis dispersi vesikuler telah dikembangkan sehingga memberikan keleluasaan bagi peneliti untuk mengembangkan sistem nanoliposom tanpa keterbatasan pada metode analisis dalam rangka karakterisasinya. Metode immobilisasi dan lisis dari nanoliposom dapat dilakukan dengan *photopatterning* UV, dengan memanfaatkan *biocompatible anchor for membrane* (BAM) dan polietilen glikol (PEG) yang ditanam pada papan kaca. Nanoliposom yang telah terjerap dalam sistem BAM-

PEG dapat divisualisasi dengan sempurna, dan proses lisisnya dapat diikuti. Metode ini dapat dimodifikasi sesuai kebutuhan dan berperan sebagai model untuk analisis berbagai jenis nanoliposom (Akagi *et al.*, 2011).

Secara konseptual, nanoemulsi berbeda dengan nanoliposom meskipun sama-sama memiliki kelebihan pada keberadaan fase hidrofob. Fase hidrofob ini yang berpengaruh cukup signifikan pada kemampuan penetrasi formula menembus membran biologis yang berkarakter lipid-bilayer. Peningkatan efek obat pada dosis yang sama sebagai hasil positif juga dapat diperoleh dari formulasi nanoemulsi. Kurkumin telah berhasil ditingkatkan efek antiinflamasi secara *in vivo* setelah diformulasikan dengan sistem nanoemulsi tipe minyak dalam air (o/w). Penelitian yang dilaporkan oleh Wang *et al* (2008) ini menunjukkan nanoemulsi kurkumin memiliki ukuran globul rata-rata sebesar 79,5 nm dan 618,6 nm dengan aktivitas antiinflamasi pada penghambatan udem kaki tikus terinduksi 12-*O*-tetradekanoilkorbol-13-asetat (TPA) sebesar 43% (618,6 nm) dan 85% (79,5 nm), dengan kurkumin tanpa formulasi pada dosis yang sama tidak menunjukkan adanya efek antiinflamasi. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa nanoemulsi cukup efektif dalam meningkatkan absorpsi obat ke dalam sirkulasi sistemik karena untuk dapat berefek diperlukan kadar obat yang cukup hingga berada pada jendela terapi. Aktivitas tersebut tidak tampak pada kurkumin tanpa modifikasi.

Pengembangan terkini sistem nanoemulsi untuk aplikasi oral melalui saluran gastrointestinal adalah teknologi auto-emulsifikasi (*Self-nanoemulsifying drug delivery systems/SNEDDs*). Konsep dari teknologi ini adalah formulasi antara minyak, surfaktan, dan kosurfaktan yang mengandung obat. Sistem ini selanjutnya akan masuk ke saluran cerna dan bercampur dengan cairan usus yang mengandung air. Ketika formula bercampur dengan cairan usus, maka akan terjadi emulsifikasi spontan yang menghasilkan globul berukuran nanometer. Salah satu produk sistem autoemulsifikasi yang telah dilaporkan adalah formulasi autoemulsi dari cefpodoxime (CFP), suatu obat yang memiliki bioavailabilitas yang rendah dan kelarutannya sangat tergantung pada pH. Sistem autoemulsi yang berhasil dibuat menggunakan kombinasi Cremophore EL, Akoline MCM, dan Capryol 90 ini menunjukkan karakter yang baik, di mana emulsifikasi membentuk nanopartikel terjadi secara spontan dengan ukuran partikel bervariasi tergantung media dispersi, dengan rata-rata 170 nm. Sistem ini dapat melepaskan obat secara keseluruhan di dalam media dalam 20 menit dan stabil karena tidak dipengaruhi oleh perbedaan tingkat keasaman (Date dan Nagarsenker, 2007).

Ilustrasi konsep sistem penghantaran obat auto-nanoemulsifikasi (*self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS)*). Sediaan diberikan dalam kombinasi obat, minyak, surfaktan, dan

kosurfaktan, kemudian akan mengalami proses emulsifikasi spontan di dalam cairan cerna saat mengalami pencampuran dengan cairan usus. Nanoemulsi selanjutnya mengalami proses absorpsi.

Nanopartikel sebagai Sistem Penghantaran Tertarget

Pengembangan penghantaran obat tertarget berfungsi untuk meningkatkan efektivitas dan efisiensi obat yang diaplikasikan, sekaligus keamanan penggunaan obat karena mencegah obat untuk bereaksi pada tempat yang tidak diharapkan. Penghantaran obat jenis ini secara umum dipahami sebagai hubungan ligan dengan ligan, ligan dengan protein, atau protein dengan protein, karena interaksi spesifik dapat diketahui dari fenomena kimiawi tersebut. Pemanfaatan protein sebagai konjugat sistem nanopartikel adalah memanfaatkan kekhasan dari polimer protein. Polimer ini tidak terbentuk atas monomer yang terus berulang seperti halnya pada polimer secara umum. Asam amino penyusun suatu protein dapat membentuk kombinasi urutan yang tak terbatas, membentuk sifat yang sangat spesifik dari tiap protein, sehingga dapat mengadakan suatu interaksi yang sangat spesifik pula. Oleh karena itu, protein banyak digunakan sebagai konjugat dalam sistem penghantaran obat. Polimer lain seperti derivat gula juga cukup banyak dipresentasikan karena gula merupakan komponen membran seluler yang dapat juga secara spesifik terdapat pada sel tertentu.

Park *et al* (2009) mempresentasikan suatu kombinasi nanopartikel silika dengan polietilenimin (PEI) dapat secara efektif menghantarkan plasmid DNA ke dalam sel punca mesenkim manusia (*human mesenchymal stem cell/hMSC*), sehingga dapat meningkatkan keberhasilan endositosis gen ke dalam sel, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Model gen yang mengekspresikan *green fluorescence protein* (GFP) berhasil diinternalisasikan dengan baik, ditandai dengan peningkatan produksi protein tersebut hingga 75% setelah hari ke-2. Penelitian ini menunjukkan bahwa nanopartikel silika yang bersifat netral dapat dimodifikasi dengan metode yang sederhana untuk menghasilkan suatu sistem penghantaran gen non-viral yang lebih aman dan murah.

Teknologi penghantaran tertarget saat ini juga telah memperkenalkan asam nukleat sebagai molekul pentarget yang dapat dikombinasikan dengan sistem nanopartikel. Oligonukleotida sebagai molekul pentarget ini disebut aptamer (Keefe *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010). Penggunaan aptamer ini dinyatakan lebih baik daripada penggunaan polipeptida/protein karena lebih mudah disintesis, dimodifikasi, tidak ada resiko penolakan oleh sistem imun, dan lebih stabil sehingga lebih fleksibel pada semua aplikasi sediaan farmasi (Keefe *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010). Beberapa contoh nanopartikel yang dikonjugasikan dengan aptamer di antaranya A10 RNA (aptamer) yang diimobilisasi pada

permukaan nanopartikel supermagnetik besi-oksida (Min *et al.*, 2011) dan nanopartikel PLGA-b-PEG berisi cisplatin yang dikonjugasikan dengan aptamer A10 (Dhar *et al.*, 2011). Kedua sistem tersebut ditujukan sebagai kandidat terapi tertarget pada kanker prostat (Ozalp *et al.*, 2011). Untuk mendapatkan aptamer yang tepat sesuai reseptor target, telah diperkenalkan metode seleksi yang disebut SELEX. Metode ini menyeleksi aptamer secara berulang menggunakan sel target atau protein target, dan setelah diperoleh aptamer yang tepat, kemudian diperbanyak secara eksponensial menggunakan bakteriofag (Stoltenburg *et al.*, 2007; Yan dan Levy, 2009).

Selanjutnya, contoh yang baik dalam pengembangan gula terkonjugasi polipeptida sebagai molekul pentarget dipresentasikan oleh Greupink *et al* (2005), di mana pada penelitian ini telah berhasil dihasilkan sebuah sistem penghantaran asam mikofenolat (MPA), suatu imunosupresan, dengan menggunakan polimer pembawa manosa-6-fosfat (M6P) yang telah dikonjugasikan dengan *human serum albumin* (HSA). Sistem ini secara *in vitro* terbukti mampu berinteraksi secara spesifik pada sel-sel *stellate* hepatic dan tidak pada sel-sel Kupffer dan endotel sinusoidal sehingga potensial untuk dapat menjadi obat fibrosis liver yang selektif. Manfaat dari kombinasi ini lebih dapat terlihat jika obat lebih dapat menimbulkan efek balik yang tidak diinginkan, misalnya gliotoksin yang mampu menginduksi terjadinya apoptosis sehingga ketidakselektifan aksinya akan menimbulkan efek yang buruk. Kombinasi gliotoksin dengan sistem M6P-HSA yang meningkatkan selektivitas kerjanya (Hagens *et al.*, 2008) secara langsung akan meningkatkan keamanannya.

Dari tipe penyusun sistemnya, dapat dilihat bahwa HSA berfungsi sebagai pembawa (*drug carrier*), dengan M6P sebagai konjugat untuk meningkatkan selektivitas pembawa (Poelstra *et al.*, 2010). Kombinasi dari sistem yang telah dibentuk dapat dijadikan acuan dalam mencari kombinasi baru untuk kebutuhan penghantaran lain dengan target yang sama. Kombinasi lain yang telah terbukti dapat dibuat dan memberikan hasil yang baik adalah modifikasi dalam penghantaran interleukin-10 (IL-10), suatu sitokin, yang dikonjugasi dengan M6P yang selektif pada *insulin-like growth factor II* (IGFII) sebagai reseptor yang berperan sebagai molekul target, di mana sistem ini telah terbukti selektif pada liver (Rachmawati *et al.*, 2007). Selektivitas M6P-HSA ini bahkan bermanfaat dalam penghantaran obat tertarget pada terapi kanker. Doksorubisin yang dikonjugasi dengan M6P-HSA terbukti selektif pada reseptor tumor liver yang disebut *manosa-6-fosfat/insulin-like growth factor II receptor* (M6P/IGFII-R) (Prakash, 2010) sehingga potensial untuk diaplikasikan sebagai alternatif kemoterapi liver yang lebih efektif dengan efek samping yang lebih kecil. Pada penelitian pengembangan yang dilakukan oleh Adrian *et al* (2006) sebagai pengembangan dari penelitian yang dilakukan

oleh Greupink *et al* (2005), sistem modifikasi M6P-HSA dikonjugasikan pada liposom, menghasilkan suatu liposom tertarget yang ditujukan secara spesifik untuk mengenali sel-sel *stellate* hepatic (HSC). Sistem liposom termodifikasi ini meningkatkan selektivitas pada HSC sebagai sel target sebesar empat kali lipat dibandingkan dengan liposom tanpa modifikasi. Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa sistem liposom dapat secara mudah untuk dimodifikasi sesuai dengan keperluan sehingga menghasilkan penghantaran yang lebih spesifik. Secara konklusif, keberhasilan pengembangan rangkaian penelitian dengan HSC sebagai target ini dilatarbelakangi oleh pemilihan molekul M6P yang secara tepat memiliki reseptor spesifiknya pada HSC, yaitu M6P/IGFII-R, sehingga dapat secara spesifik terinternalisasi ke dalam sel (Poelstra *et al.*, 2010).

Pentargetan suatu jaringan target di dalam sistem biologi tidak berarti hanya terfokus pada pentargetan reseptor tertentu saja, namun juga meliputi kemampuan suatu formulasi untuk menghantarkan obat pada tempat aksi yang awalnya sulit ditembus. Salah satu tempat aksi yang telah banyak diketahui memiliki sifat seperti ini adalah bagian otak yang terlindungi oleh sawar darah otak (*blood brain barrier*). Usaha untuk dapat menghantarkan obat melalui sawar darah otak ini telah banyak dilakukan, dan saat ini telah melibatkan sistem nanopartikel.

Salah satunya seperti yang dipresentasikan oleh Lu *et al* (2005) yaitu suatu sistem nanopartikel telah berhasil diperoleh dengan menggunakan *cationic bovine serum albumin* (CBSA) yang dikonjugasikan dengan polietilenglikol-polilaktid (PEG-PLA) dengan menggunakan metode emulsifikasi bertingkat dan evaporasi. Produksi dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan kationisasi dan tiolasi pada *bovine serum albumin* (BSA), dan kemudian dilanjutkan dengan konjugasi pada polimer dan kopolimer. Sistem ini menghasilkan nanopartikel dengan ukuran rata-rata 100 nm, dapat menembus sawar darah otak secara signifikan dibandingkan dengan BSA asli tanpa modifikasi, dan tidak menimbulkan kerusakan pada sel-sel endotel kapiler otak. Sistem nanopartikel ini secara molekuler tidak mentarget reseptor tertentu, namun kombinasi formulanya tetap didasarkan pada pertimbangan sifat-sifat biologis jaringan target. Desain sistem nanopartikel yang dibuat harus sesuai untuk dapat menembus sawar darah otak dan dapat terhantarkan dengan baik pada otak.

2.4. Diabetes Melitus Tipe 2

2.4.1. Definisi

Diabetes melitus tipe 2 adalah penyakit gangguan metabolik yang ditandai dengan kondisi hiperglikemik yang kronis. Kondisi hiperglikemik disebabkan karena kelainan pada sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya. Diabetes mellitus merupakan suatu epidemik global yang menyebabkan tingginya angka morbiditas dan mortalitas terutama akibat komplikasi mikro dan makrovaskular (Ozougwu *et al.*, 2013).

2.4.2. Klasifikasi diabetes mellitus

Klasifikasi DM terbagi menjadi dua macam. DM tipe 1 (DMT1), yaitu DM tergantung insulin dan DM tipe 2 (DMT2). Pada DMT1 terjadi kerusakan sel β pancreas yang berat sehingga pancreas tidak mampu memproduksi insulin atau produksinya minimal. Pada kasus DMT1, penderita mutlak mendapat insulin dari luar tubuh. Pada DMT2, terjadi pathogenesis ganda, yaitu kekurangan insulin juga disertai resistensi insulin sehingga tubuh tidak mampu meregulasi gula darah (KAKU, 2010, Ozougwu *et al.*, 2013).

2.4.3. Pathogenesis DM T2

DMT2 merupakan suatu penyakit yang kompleks, dimana berbagai mekanisme patogenetik terdapat bersamaan, terutama resistensi insulin dan penurunan fungsi sel beta pancreas (DeFronzo *et al.*, 2013). Kaku, juga menjelaskan bahwa DMT2 adalah kelainan heterogen yang disebabkan karena kombinasi dari faktor genetic yang dihubungkan dengan gangguan sekresi insulin, resistensi insulin dan faktor lingkungan seperti obesitas, konsumsi makanan yang berlebihan, kurang gerak, stress dan proses degenerative (KAKU, 2010). Dalam keadaan normal, konsentrasi glukosa di dalam plasma dijaga dalam rentang konsentrasi normal, meskipun ada fluktuasi tergantung intake dan kebutuhan, melalui regulasi yang ketat dan dinamis antara sensitivitas jaringan terhadap insulin (terutama di liver) dan sekresi insulin. Pada DMT2 mekanisme tersebut terganggu melalui dua mekanisme patologis utama, yaitu : kegagalan sekresi insulin karena disfungsi sel β pancreas dan kegagalan kerja insulin karena resistensi insulin. DMT2 berhubungan erat dengan kelainan genetik. Hal ini menyebabkan penyakit DM melibatkan berbagai macam gen dan faktor lingkungan.

Resistensi insulin terdapat pada 85% pasien DMT2 yang berakibat tidak terjadinya ambilan glukosa di jaringan otot rangka dan tidak terjadinya penekanan produksi glukosa di hati. Keadaan tersebut bertanggung jawab atas terjadinya hiperglikemia puasa. Resistensi

insulin berkaitan erat dengan berbagai faktor risiko kardiovaskuler, disamping resistensi insulin itu sendiri terbukti merupakan faktor risiko untuk penyakit kardiovaskuler (Bonora et al., 2002).

Pada orang yang mempunyai predisposisi untuk DM2, gangguan dini sensitivitas insulin telah disertai dengan penurunan yang nyata dalam massa dan fungsi sel beta. Kehilangan fungsi sel beta tersebutlah yang menentukan kapan terjadinya transisi dari toleransi glukosa normal menjadi prediabetes dan kemudian diabetes. Oleh karena itu pengobatan yang ditujukan untuk memperbaiki kelainan pathogenesis diatas akan dapat menjamin kontrol glikemik jangka panjang. DeFronzo mengusulkan bahwa terapi pada penderita diabetes melalui berbagai macam bahan aktif sesuai dengan mekanisme patogenesisnya (DeFronzo, 2009)

Hiperglikemi timbul bila hati, jaringan otot rangka dan jaringan lemak semakin resisten terhadap kerja insulin dan kompensasi sel β tidak mampu meningkatkan sekresi insulin untuk mempertahankan kadar glukosa darah normal yang fisiologis. Gambaran disfungsi sel β pada DM2 adalah respons sekresi insulin yang terganggu terhadap stimulasi glukosa. Secara fisiologis, respons sekresi insulin sesudah pemberian glukosa oral lebih besar disbanding dengan respons terhadap glukosa intravena. Peningkatan kadar glukosa didaerah splancnicus secara langsung menstimulasi sekresi insulin oleh sel β , melalui glikolisis, oksidasi mitokondria, peningkatan rasio ATP/ADP, penutupan ATP-sensitive K^+ channel, terbukanya voltage dependent Ca^{++} channel dan peningkatan kadar Ca^{++} intrasel. Disamping berbagai peristiwa yang dikemukakan diatas, berbagai transmisi rangsang yang berasal dari usus ke sel β pancreas telah terbukti berperan dalam meningkatkan respons sekresi insulin setelah pemberian glukosa peroral. Faktor hormonal yang bertindak sebagai pembawa sinyal dari usus ke pancreas disebut incretin.

Incretin disintesis di usus dan dilepaskan dari usus sesudah individu menelan makanan. Baik glucagon like peptide-1 (GLP-1) dan gastric inhibitory polypeptide (GIP) diidentifikasi sebagai incretin. GLP-1 dan GIP bekerja dengan cara berikatan dengan reseptor spesifik, selanjutnya ikatan tersebut akan mengaktifkan enzim adenyl cyclase dan meningkatkan konsentrasi cAMP di dalam sel β dan oleh sebab itu incretin dapat dapat menstimulasi sekresi insulin (FREEMAN, 2009)

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Membuktikan pemberian formulasi nanoemusli ekstrak etanol daun Singawalang mempengaruhi kadar gula darah, interleukin 6, TNF α , insulin pada tikus model DM
2. Membuktikan hubungan antara dosis formulasi nanoemulsi ekstrak etanol daun Singawalang dengan kadar gula darah tikus model DM

2.2. Manfaat Penelitian

2.2.1. Manfaat penelitian bagi ilmu pengetahuan

Manfaat riset ini adalah untuk menambah pengetahuan tentang pengembangan teknologi sistem penghantaran obat terutama bagi obat herbal. Pengetahuan ini diharapkan menjadi rujukan untuk pengembangan teknologi selanjutnya.

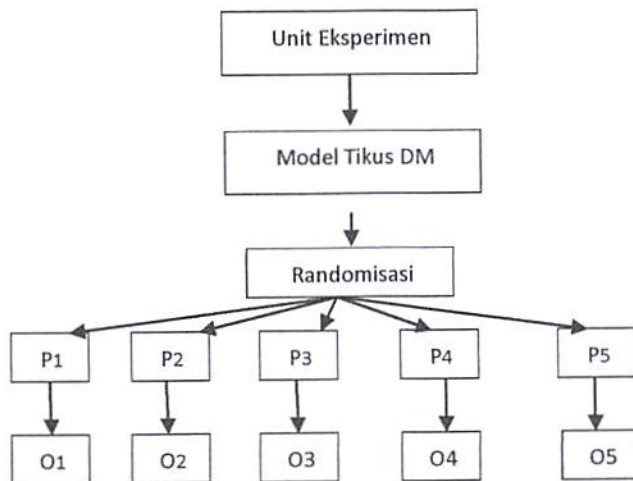
2.2.2. Manfaat bagi Industri

Hasil dari riset ini diharapkan bisa menarik dunia industri farmasi untuk mengembangkan dan menggunakan aplikasi obat herbal dalam sistem auto-nanoemulsifikasi. Sehingga, obat herbal Indonesia memiliki nilai jual yang tinggi.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris pada hewan coba. Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap.



Gambar 4. Bagan rancangan penelitian.

Keterangan

- P1 adalah kelompok tikus model DM yang mendapat terapi SNEDDS ekstrak daun singawalang dosis 90mg/kgbb
- P2 adalah kelompok tikus model DM yang mendapat terapi SNEDDS ekstrak daun singawalang dosis 180 mg/kgbb
- P3 adalah kelompok tikus model DM yang mendapat terapi SNEDDS ekstrak daun singawalang dosis 360 mg/kgbb
- P4 adalah kelompok tikus model DM yang mendapat terapi metformin 90 mg/kali
- P5 adalah kelompok tikus model DM yang tidak mendapat terapi

4.2. Unit Eksperimen dan Replikasi

4.2.1 Unit Eksperimen

Unit eksperimen pada penelitian ini adalah tikus jantan (*Rattus norvegicus* strain wistar) berumur 3-4 bulan dengan berat badan sekitar 125 – 200 gram, serta dalam kondisi sehat (Lukačínová et al., 2013).

4.2.2. Replikasi

Jumlah replikasi yang dipergunakan pada penelitian ini ditentukan dengan memakai rumus, sebagai berikut :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan

t = jumlah kelompok perlakuan (5 kelompok)

r = jumlah replikasi

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$5r \geq 21$$

$$r \geq 4$$

Jumlah replikasi pada penelitian ini berdasarkan rumus tersebut adalah 4. Setelah dilakukan koreksi $1/1-f$ ($f=0,5$), maka jumlah replikasi adalah 5.

4.3. Variabel penelitian

4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis SNEDDS ekstrak daun Singawalang

4.3.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah:

1. Kadar gula darah
2. Kadar interleukin 6
3. Kadar TNF α
4. Kadar Insulin

4.4. Definisi operasional

Definisi operasional 24uspense penelitian adalah :

1. Dosis SNEDDS ekstrak l daun Singawalang adalah jumlah ekstrak etanol Singawalang yang diberikan pada tikus sesuai dengan berat badan secara peroral satu kali sehari selama 14 hari. Dosis SNEDDS ekstrak Singawalang adalah 90mg/kgbb, 180mg/kgbb dan 360mg/kgbb. Penetapan dosis ekstrak berdasarkan penelitian berdasarkan penelitian sebelumnya pada uji toksisitas (Pratiwi et al., 2013, Naibaho et al., 2013, Mustika, 2014).
2. Kadar gula darah adalah jumlah glukosa darah sewaktu mencit yang diukur dengan

menggunakan alat glukometer. Darah diambil dari vena ekor tikus.

3. Kadar interleukin 6 adalah jumlah interleukin 6 pada serum darah tikus yang diambil dari jantung dan diukur dengan menggunakan elisa
4. Kadar TNF α adalah jumlah TNF α pada serum darah tikus yang diambil dari jantung dan diukur dengan menggunakan elisa
5. Kadar insulin adalah jumlah insulin pada serum darah tikus yang diambil dari jantung dan diukur dengan menggunakan elisa

4.5. Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah

Tanaman Singawalang

Tanaman singawalang (*Petiveria alliacea*) diperoleh dari Balai Materia Medica Batu, Malang dan sudah dilakukan determinasi tanaman. Bagian tanaman singawalang (*Petiveria alliacea*) yang diambil untuk dibuat ekstrak adalah bagian daun. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi

Hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan (*Rattus norvegicus* strain wistar) yang diperoleh dari Unit Hewan Coba UGM, berumur 3-4 bulan dengan berat badan sekitar 125-200 gram, serta dalam kondisi sehat (Lukačínová et al., 2013).

Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah ether (EMS No katalog 1180), alkohol absolut, alkohol 96%, alkohol 80%, alkohol 70% (Brataco), aquadestilata (Brataco), carboxy methyl cellulosa natrium (Brataco), pewarna Hematoxylin Eosin (EMS No katalog 14653), *phosphate buffer saline* (PBS) (Brataco), formaldehyde (Brataco), Metformin, Streptozotocin, aquadestilata, Elisa kit untuk Interleukin 6, TNf dan insulin

4.5.2. Peralatan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah: tabung 25uspense25r 2L, corong *Buchner*, vakum ekstraktor dan *rotavapour*, *chamber*, semprot dan pinset, timbangan, sendok pengaduk, mortar, stamper, sonde pediatrik no 8, spuit 5 cc, alat bedah minor, spuit 1cc, sarung tangan, masker, pipet mikro dan pinset. Elisa reader

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUA Dan ITD. Penelitian ini dilaksanakan selama 8 bulan

4.7. Prosedur Penelitian

Pada tahun Kedua dilakukan penelitian :

1. Formulasi SNEDDS ekstrak daun singawalang
2. Pembuatan tikus model DM
3. Pengukuran kadar gula darah sebelum dan sesudah pemberian SNEDDs ekstrak daun Singawalang pada berbagai dosis
4. Pengukuran kadar Il 6, TNF dan insulin serum darah tikus

Formulasi SNEDDS Ekstrak daun Singawalang.

Fase minyak yang sesuai untuk ekstrak daun singawalang adalah VCO, komponen surfaktan yang sesuai adalah Tween 80 dan kosurfaktan yang sesuai adalah PEG 400. Perbandingan antara M:S:KS adalah 1:7:2

Metformin

Metformin yang digunakan adalah metformin tablet dari Kalbe farma. Dosis Metformin 18mg/ tikus. Metformin diberikan dalam bentuk suspense dengan dosis yang sesuai, diberikan peronde sebanyak 1 mL

Model tikus diabetes

Hewan coba diadaptasikan dengan lingkungan selama 7 hari dan diberi makan dan minum secara ad libitum. Sebelum perlakuan tikus ditimbang bobot badannya terlebih dulu. Model tikus DM dibuat dengan menginduksi tikus tersebut dengan Streptozotocin (STZ). Dosis STZ adalah 50 mg/kgBB. Larutan STZ dibuat dengan mengencerkan STZ dengan larutan dapar sitrat sesuai dengan dosis yang ditentukan. Larutan STZ yang diinjeksikan sebanyak 0,2 mL. Larutan STZ dibuat 20 menit sebelum induksi. Tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 4 jam sebelum induksi dimulai untuk mengosongkan lambung dan mengurangi resiko aspirasi. Tikus diinjeksi dengan larutan STZ sesuai dengan dosis secara intraperitoneal. Berikan larutan sukrosa 10% atau dekstrosa 10% sepanjang malam pertama setelah induksi untuk menghindari *sudden hypoglycemic post injection*. Hiperglikemia yang bermakna akan terjadi dua hari setelah induksi. Kadar gula darah dihitung dengan menggunakan alat glukosmeter.

Tikus dinyatakan menderita DM jika kadar gula darah ≥ 200 mg/dl (Lukačínová et al., 2013, NUGROHO, 2006, Dewi et al., 2013)

Perlakuan

Sebanyak 35 tikus DMT2 dibagi secara acak menjadi 5 kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok tikus DMT2 yang memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 50mg/kgbb, kelompok ke-2 adalah kelompok tikus DMT2 yang memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 100mg/kgbb, kelompok ke-3 adalah kelompok tikus DMT2 yang memperoleh SNEEDS ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 200mg/kgbb, kelompok ke-4 adalah kelompok tikus DMT2 yang memperoleh metformin dengan dosis 18mg/tikus dan kelompok ke-5 adalah kelompok tikus yang tidak memperoleh terapi dan hanya memperoleh formula SNEEDS

Ekstrak etanol diberikan ke tikus dalam bentuk nanoemulsi (SNEEDS). SNEEDS Ekstrak etanol daun Singawalang dan metformin diberikan sehari sekali, personde selama 14 hari. Sebelum dan sesudah perlakuan tikus ditimbang bobot badannya. Pada hari ke-15 setelah terapi, tikus dikorbankan nyawanya untuk diambil darah, organ hepar, dan otot skeletal untuk dilakukan pemeriksaan. Pengukuran kadar gula darah sebelum dan sesudah pemberian SNEDDs ekstrak daun Singawalang pada berbagai dosis. Pengukuran kadar IL 6, TNF dan insulin serum darah tikus dengan menggunakan metode elisa.

BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil penelitian

5.1.1. Penyiapan simplisia

Telah dilakukan panen daun singawalang di Balai Materia Medika Malang. Daun yang dipanen memenuhi kriteria, yaitu; usia daun sekitar 3 bulan dan tidak terkena hama penyakit. Daun dicuci terlebih dahulu sebelum dikeringkan. Pengeringan daun singawalang dilakukan di dalam ruangan yang tidak terkena sinar matahari langsung pada suhu kamar. Pengeringan dilakukan selama 10 hari.



Gambar 5.1. Daun singawalang yang siap dipanen



Gambar 5.2. Bak pencucian daun Singawalang



Gambar 5.3. Daun singawalang dikeringkan diatas rak



Gambar 5.4. Ruang tempat pengeringan daun singawalang

5.1.2. Ekstraksi daun singawalang

Telah dilakukan ekstraksi sebanyak 500 gram serbuk daun singawalang dengan pelarut alkohol 70%. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi selama 3 hari. Hari pertama sebanyak 500 gram serbuk daun singawalang di rendam dalam 4 liter etanol 96% dalam benjana tertutup selama 24 jam. Setelah 24 jam, rendaman tersebut disaring dengan menggunakan corong Buchner dengan bantuan *vacuum extractor*. Filtrate yang diperoleh dikumpulkan dalam wadah tertutup, sedangkan residu direndam dalam 3 L etanol 70% selama 24 jam. Setelah 24 jam rendaman disaring, sedangkan residu direndam dengan etanol 70%

Pada hari ketiga, semua filtrate yang diperoleh diuapkan alkoholnya dengan menggunakan waterbath (sebagai pengganti rotavapour) pada suhu 40°C. Penguapan dilakukan selama 4 hari, setiap hari selama 4 jam. Hasil akhir didapatkan ekstrak kental sebanyak 105 gram



Gambar 5.5. Ekstrak etanol 70% daun Singawalang

5.1.3. Formulasi SNEEDs ekstrak daun singawalang

Formulasi Sneeds dibuat dengan menggunakan virgin coconut oil, tween 80 dan PEG 400 dengan perbandingan 1:7:2. ketiga bahan tersebut dicampur dengan menggunakan stirrer selama 30 menit, sampai terlihat homogen. Proses ini diulang sampai 2 kali

Dosis SNEDDs ekstrak daun singawalang yang digunakan adalah 50 mg/kgbb, 100 mg/kgbb dan 200 mg/kgbb.



Gambar 5.6. Formulasi SNEEDs



Gambar 5.7. Homogenisasi formula SNEEDs dengan stirrer

5.1.4. Model Hewan coba

Hasil pemeriksaan kadar gula darah sebelum dan sesudah induksi dengan STZ adalah sebagai berikut :

Tabel 5.1. Kadar gula darah tikus sebelum (GDA 1) dan 3 hari setelah induksi dengan STZ (GDA 2)

KODE	BB AWAL (g)	GDA 1 (mg/dL)	Dosis STZ	GDA 2 (mg/dL)
1	190	86	9,5	450
2	187	128	9,5	503
3	195	113	10	389
4	160	101	8	478
5	190	110	9,5	145
6	180	126	9	174
7	180	96	9	101
8	193	89	9,5	399
9	163	94	8	650
10	156	103	8	535

KODE	BB AWAL (g)	GDA 1 (mg/dL)	Dosis STZ	GDA 2 (mg/dL)
11	195	82	10	526
12	160	119	8	296
13	200	91	10	471
14	175	75	8,5	191
15	175	143	8,5	170
16	170	115	8,5	178
17	174	100	8,5	533
18	160	108	8	444
19	165	91	8	572
20	180	91	9	431
21	175	101	8,5	465
22	179	96	9	249
23	157	94	8	321
24	165	80	8	458
25	220	96	10	497
26	200	96	10	594
27	170	122	8,5	520
28	174	96	8,5	147
29	159	114	8	513
30	170	103	8,5	425
31	175	91	9	217
32	164	96	8	480

KODE	BB AWAL (g)	GDA 1 (mg/dL)	Dosis STZ	GDA 2 (mg/dL)
33	190	139	9,5	458
34	175	113	9	Mati
35	175	99	9	209
36	170	110	9	510
37	175	136	9	473
38	185	136	9,5	526
39	180	94	9	Mati
40	169	116	8,5	Mati

Hasil pemeriksaan GDA 1 menunjukkan bahwa sebelum induksi kadar glukosa darah puasa tikus adalah normal < 200 mg/dL. Tiga hari setelah induksi dengan STZ menunjukkan 30 ekor tikus kadar glukosa darah > 200 mg/dL, tiga ekor tikus mati, dan 7 ekor tikus belum meningkat kadar gula darahnya < 200 mg/dL sehingga dilakukan induksi untuk kedua kalinya dengan menggunakan STZ dosis yang sama. Kadar glukosa darah setelah tiga hari dari induksi STZ (GDA 3) dapat dilihat pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Kadar gula darah tikus sebelum (GDA 2) dan 3 hari setelah induksi dengan STZ (GDA 3)

NO	GDA 2 (mg/dL)	GDA 3 (mg/dL)
1	147	367
2	145	485
3	174	425
4	101	362
5	191	348
6	170	106
7	178	456



Gambar 5.8. Pemeriksaan kadar gula darah



Gambar 5.9. Induksi streptozotocin

Hasil pemeriksaan kadar gula darah puasa yang ketiga menunjukkan hanya satu ekor tikus yang tidak memenuhi syarat model tikus DMT2 sehingga dikeluarkan dari penelitian ini

5.1.5. Perlakuan

Selama 14 hari semua kelompok tikus model DMT2, disonde sesuai dengan dosisnya. Kelompok pertama adalah kelompok tikus DMT2 yang memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 50mg/kgbb, kelompok ke-2 adalah kelompok tikus DMT2 yang memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 100mg/kgbb, kelompok ke-3 adalah kelompok tikus DMT2 yang memperoleh SNEEDS ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 200mg/kgbb, kelompok ke-4 adalah kelompok tikus DMT2 yang memperoleh suspensi metformin dengan dosis 18mg/tikus dan kelompok ke-5 adalah kelompok tikus yang tidak memperoleh terapi dan hanya memperoleh formula SNEED.



Gambar 5. 10. SNEDDS ekstrak daun singawalang siap disonde ke tikus



Gambar 5.11. Proses penyondean ekstrak ke tikus

5.1.6. Terminasi hewan coba

Pada hari ke-15, setelah perlakuan, hewan coba diterminasi dengan menggunakan anestesi chloroform secara inhalasi. Darah diambil secara intrakardial dan tikus dibunuh dengan cara memotong aorta jantung. Hewan coba yang telah dibunuh akan dikumpulkan dalam limbah medis dan akan dibuang oleh tim limbah medis FKUA. Darah dikumpulpulkan ke dalam vacutainer tanpa EDTA dan dibiarkan selama 24 jam didalam pendingin. Setelah 24 jam, darah disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit untuk diambil serumnya dan serum dikumpulkan dalam ependorf.

5.1.7. Hasil pengukuran kadar gula darah dan berat badan

Berat badan tikus diukur pada hari ke-15 sebelum tikus dibunuh. Pengukuran kadar gula darah puasa pada hari ke-15 dilakukan dengan memotong ujung ekor tikus, setelah tikus dianestesi dengan chloroform. Pengukuran kadar gula darah puasa dengan menggunakan stick test. Hasil pengukuran berat badan dan pemeriksaan kadar gula darah sebelum dan sesudah terapi dapat dilihat pada tabel 5.3

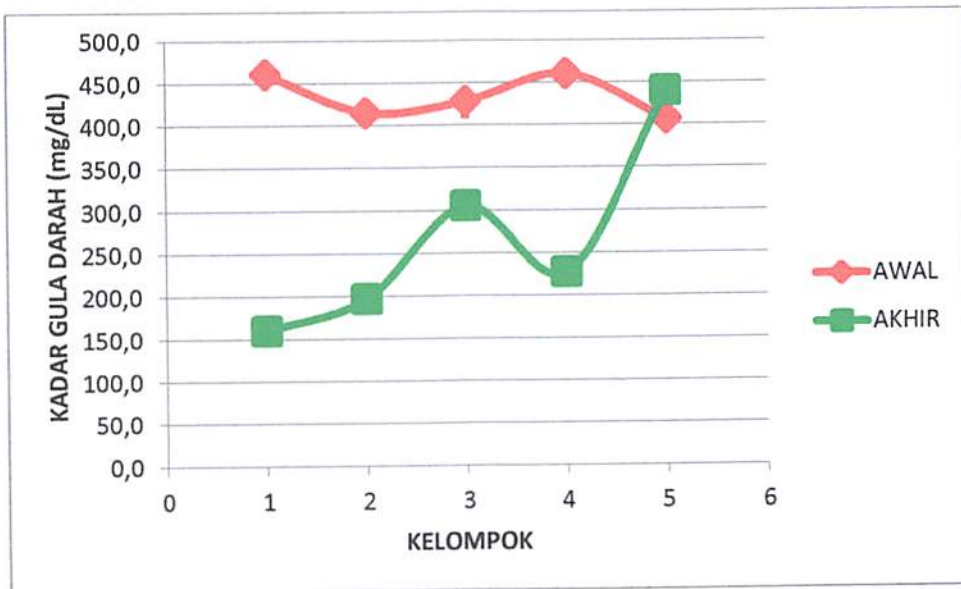
Tabel 5.3. berat badan dan kadar gula darah puasa sebelum dan sesudah perlakuan

KLP	NO	DATA BB (GRAM)		GULA DARAH PUASA mg/dL	
		AWAL	AKHIR	AWAL	AKHIR
1	1	187	168	503	237
	2	195	224	389	129
	3	160	160	478	118
	4	175	225	473	101
	5	185	215	526	129
	6	193	210	399	249
2	1	156	165	535	226
	2	195	240	526	136
	3	160	210	296	113
	4	190	240	458	158
	5	175	181	209	185
	6	200	179	471	367
3	1	174	140	533	480
	2	165	167	572	394
	3	180	140	431	385
	4	175	172	465	128
	5	179	250	249	99
	6	157	145	321	348
4	1	220	220	497	132

	2	200	160	594	465
	3	170	180	520	108
	4	159	161	513	161
	5	170	195	425	292
	6	175	203	217	209
5	1	174	146	367	665
	2	190	156	485	415
	3	180	191	425	399
	4	180	185	362	290
	5	175	168	348	399
	6	170	202	456	471

Keterangan : Kadar gula darah sebelum dan sesudah perlakuan pada setiap kelompok
 Kelompok 1 memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 50mg/kgbb, kelompok ke-2 memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 100mg/kgbb, kelompok ke-3 memperoleh SNEEDS ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 200mg/kgbb, kelompok ke-4 memperoleh suspensi metformin dengan dosis 18mg/tikus dan kelompok ke-5 adalah memperoleh formula SNEED.

Kadar gula darah puasa tikus sebelum terapi dan sesudah terapi, dan perbedaan penurunan kadar gula darah dapat dilihat pada gambar 5 dan tabel 5.12



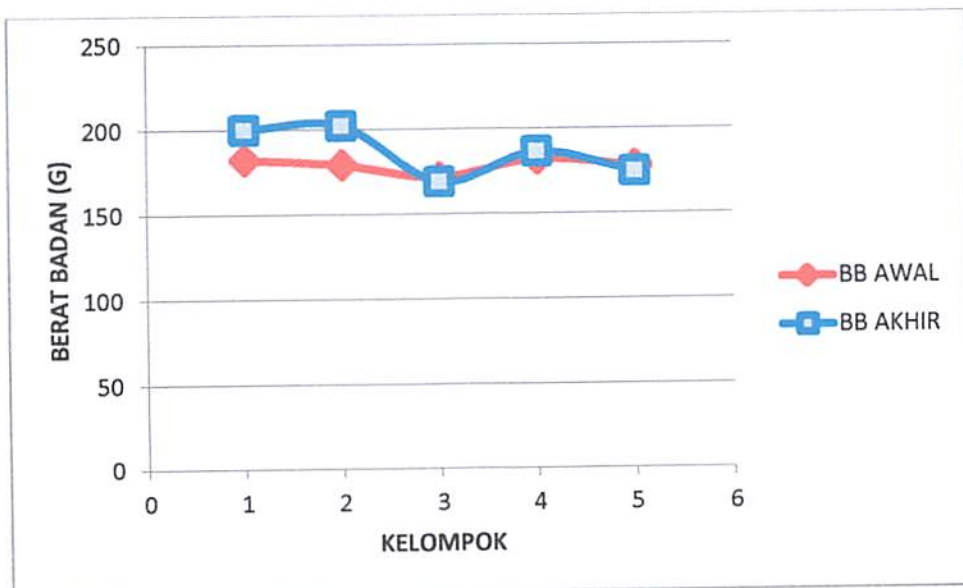
Gambar 5.12. Kadar gula darah sebelum dan sesudah perlakuan pada setiap kelompok
 Kelompok 1 memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 50mg/kgbb, kelompok ke-2 memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 100mg/kgbb, kelompok ke-3 memperoleh SNEEDS ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 200mg/kgbb, kelompok ke-4 memperoleh suspensi metformin dengan dosis 18mg/tikus dan kelompok ke-5 adalah memperoleh formula SNEED.

Tabel 5.4. Rerata kadar gula darah puasa tikus sebelum dan sesudah perlakuan serta perbedaan (delta) antara kadar awal dan akhir perlakuan.

KLP	AWAL	AKHIR	delta
1	461,3	160,5	300,8
2	415,8	197,5	218,3
3	428,5	305,7	122,8
4	461,0	227,8	233,2
5	407,2	439,8	-32,7

Berdasarkan hasil tersebut, kadar gula darah pada kelompok tanpa terapi mengalami peningkatan. Kelompok perlakuan baik yang memperoleh SNEED ekstrak etanol daun singawalang maupun metformin mengalami penurunan kadar gula darah. Rerata penurunan kadar gula darah puasa paling besar ada pada kelompok 1, yaitu kelompok yang memperoleh SNEED ekstrak daun singawalang dengan dosis 50 mg/kgbb. Pada kelompok satu kadar gula darah juga < 200 mg/Dl

Rerata berat badan tikus sebelum dan sesudah perlakuan dapat dilihat pada gambar 5.13



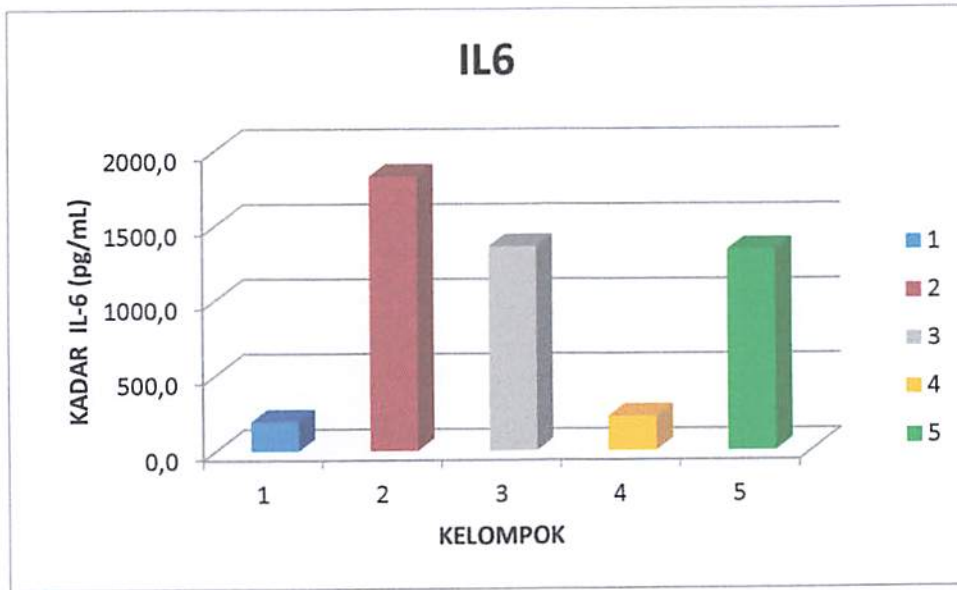
Gambar 5.13. Berat badan sebelum dan sesudah perlakuan pada setiap kelompok. Kelompok 1 memperoleh SNEEDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 50mg/kgbb, kelompok ke-2 memperoleh SNEEDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 100mg/kgbb, kelompok ke-3 memperoleh SNEEDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 200mg/kgbb, kelompok ke-4 memperoleh suspensi

metformin dengan dosis 18mg/tikus dan kelompok ke-5 adalah memperoleh formula SNEED.

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa berat badan tikus tidak mengalami perubahan yang berarti antar sebelum dan sesudah perlakuan

5.1.8. Hasil Pengukuran kadar IL-6

Hasil pengukuran kadar IL-6 pada serum darah tikus dapat dilihat pada gambar 5.14

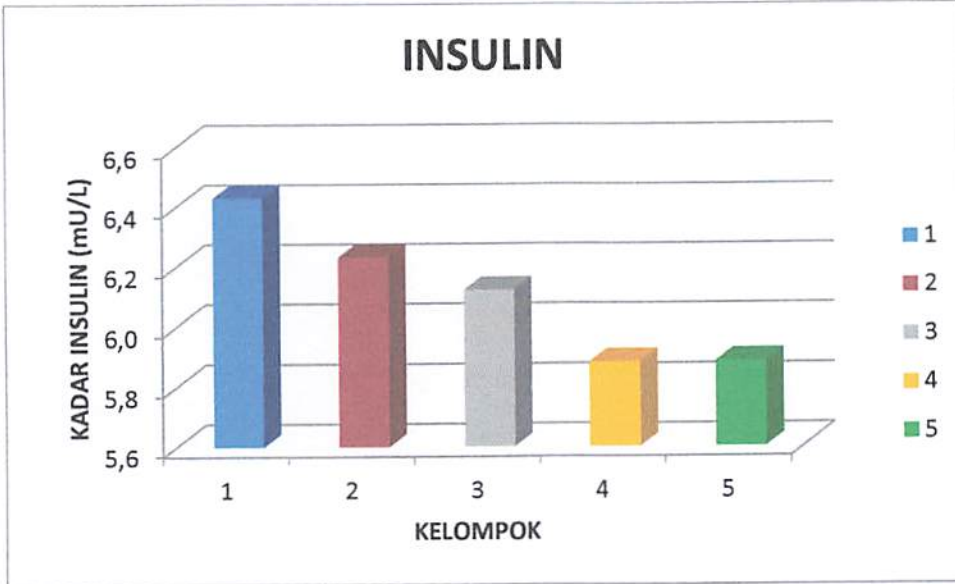


Gambar 5.14. Rerata kadar IL-6 pada serum darah tikus. Pengukuran dengan menggunakan ELISA. Kelompok 1 memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 50mg/kgbb, kelompok ke-2 memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 100mg/kgbb, kelompok ke-3 memperoleh SNEEDS ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 200mg/kgbb, kelompok ke-4 memperoleh suspensi metformin dengan dosis 18mg/tikus dan kelompok ke-5 adalah memperoleh formula SNEED.

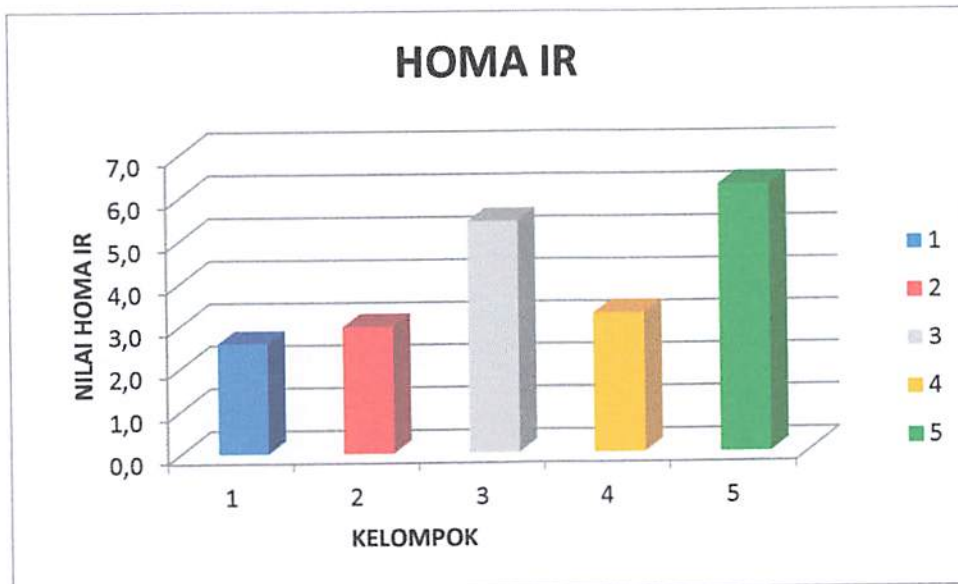
Data tersebut menunjukkan bahwa rerata tertinggi ada pada kelompok yang memperoleh SNEEDs ekstrak daun singawalang dengan dosis 100 mg/kgbb sedangkan rerata rendah ada pada kelompok yang memperoleh SNEED ekstrak dengan dosis 50 mg/kgbb dan metformin.

5.1.9. Hasil pengukuran kadar insulin dan HOMA-IR

Hasil pengukuran kadar insulin dapat dilihat pada gambar 5.15



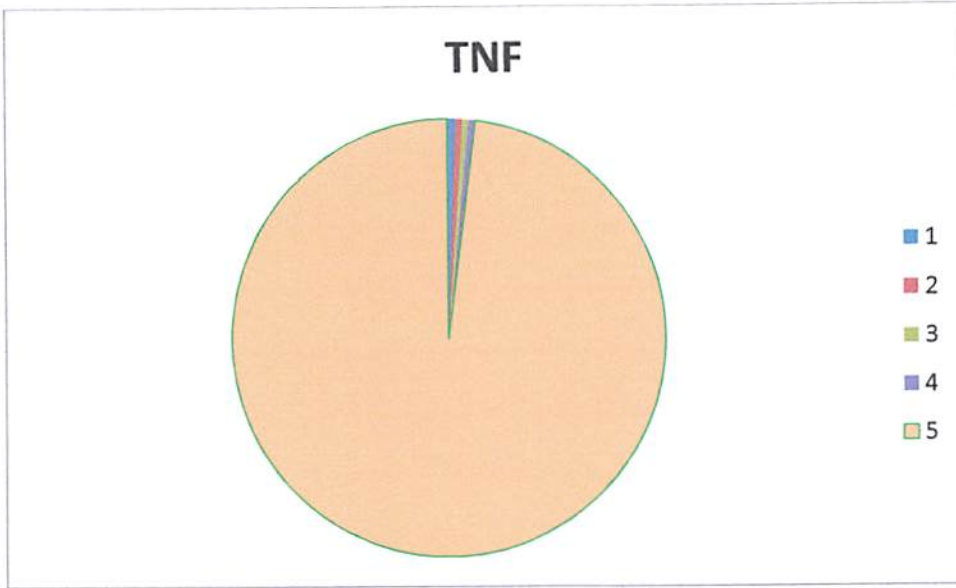
Gambar 5.15 Rerata kadar Insulin pada serum darah tikus. Pengukuran dengan menggunakan ELISA. Kelompok 1 memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 50mg/kgbb, kelompok ke-2 memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 100mg/kgbb, kelompok ke-3 memperoleh SNEEDS ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 200mg/kgbb, kelompok ke-4 memperoleh suspensi metformin dengan dosis 18mg/tikus dan kelompok ke-5 adalah memperoleh formula SNEED



Gambar 5.16. Rerata Nilai HOMA IR pada serum darah tikus. Pengukuran dengan menggunakan ELISA. Kelompok 1 memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 50mg/kgbb, kelompok ke-2 memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 100mg/kgbb, kelompok ke-3 memperoleh SNEEDS ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 200mg/kgbb, kelompok ke-4 memperoleh suspensi metformin dengan dosis 18mg/tikus dan kelompok ke-5 adalah memperoleh formula SNEED

5.1.10. Hasil pengukuran kadar TNF- α

Hasil pengukuran kadar TNF- α dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5.17. Rerata kadar Insulin pada serum darah tikus. Pengukuran dengan menggunakan ELISA. Kelompok 1 memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 50mg/kgbb, kelompok ke-2 memperoleh SNEDDs ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 100mg/kgbb, kelompok ke-3 memperoleh SNEEDS ekstrak etanol daun singawalang dengan dosis 200mg/kgbb, kelompok ke-4 memperoleh suspensi metformin dengan dosis 18mg/tikus dan kelompok ke-5 adalah memperoleh formula SNEED

5.1.11. Analisis statistik

Hasil analisis statististik menunjukkan terdapat perbedaan bermakna (nilai p)

Tabel 5.5. Nilai p Kadar TNF- α dari hasil analisis statistik

kelompok	1	2	3	4	5
1		,564	,074	,225	,019
2			,520	,749	,042
3				,568	,028
4					,028
5					

Tabel 5.6. Nilai p Kadar IL-6 dari hasil analisis statistik

kelompok	1	2	3	4	5
1		,028	,099	,599	,028
2			,655	,028	,465
3				,099	1,000
4					,035
5					

Tabel 5.7. Nilai p Kadar Insulin dari hasil analisis statistik

kelompok	1	2	3	4	5
1		,654	,317	,337	,475
2			,886	,749	,317
3				,668	,873
4					,855
5					

Tabel 5.8. Nilai p Kadar gula darah dari hasil analisis statistik

kelompok	1	2	3	4	5
1		,423	,199	,261	,004
2			,337	,873	,006
3				,522	,109
4					,037
5					

Tabel 5.9 Nilai p HOMA IR dari hasil analisis statistik

kelompok	1	2	3	4	5
1		,749	,030	,595	,007
2			,059	,831	,014
3				,090	,515
4					,023
5					

Luaran yang sudah dicapai

1. Paten sederhana . No pendaftaran : P 00201709102
2. Draft paten yang ke 2
3. Presentasi di pertemuan ilmiah international
4. Manuscript ke 1. Submit dan under revisio
5. Draft Manuscript ke 2
6. Draft manuscript ke 3

BAB 6

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Penelitian selanjutnya adalah untuk mengetahui mekanisme kerja SNEED ekstrak etanol daun Singawalang melalui ekspresi Glut-2, IRS-1, SIRT 1, dan PGC1 α pada tikus model DMT2



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian ini adalah SNEED ekstrak etanol daun Singawalang :

1. Menurunkan kadar gula darah pada tikus model DMT2
2. Menurunkan kadar TNF α serum darah pada tikus model DMT2
3. Menurunkan kadar IL-6 serum darah pada tikus model DMT2
4. Tidak mempengaruhi kadar Insulin serum darah pada tikus model DMT2
5. Menurunkan resistensi reseptor insulin (HOMA IR) pada tikus model DMT2

7.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut :

1. Mekanisme kerja sneeds ekstrak daun singawalang
2. Standarisasi sneeds ekstrak daun singawalang



DAFTAR PUSAKA

- AHMED, K. A., MUNIANDY, S. & ISMAIL, I. S. 2010. Type 2 Diabetes and Vascular Complications: A pathophysiological view. *Biomedical Research*, 21, 147-155.
- BARBOSA-FILHO, J. M., VASCONCELOS, T. H. C., ALENCAR, A. A., LEÔNIA M. BATISTA, OLIVEIRA, R. A. G., GUEDES, D. N., FALCÃO, H. D. S., MOURA, M. D., DINIZ, M. F. F. M. & MODESTO-FILHO, J. 2005. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15, 392-413.
- BONORA, E., FORMENTINI, G. & CALCATERA 2002. HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subject: prospective data from the verona diabetes complication study. *diabetes Care*, 25.
- CIFUENTES, M. 2009. A fraction from *Petiveria alliacea* induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and regulates HSP70. *Universitas Scientiarum*, 14.
- DEFRONZO, R. A. 2009. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 58, 773-95.
- DEFRONZO, R. A., ELDOR, R. & ABDUL-GHANI, M. 2013. Pathophysiological approach to therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *DIABETES CARE*, 36 Suppl 2, S127-38.
- DEWI, M. B., WULANDARI, M., SETYOWATI, D. A. I., MUSTIKA, A. & PURWANTO, B. 2013. Curcumin Maintains Lens Protein Solubility in Streptozotocin Induced Rat Model. *Prosiding 22nd International Workshop, Symposium and Seminar of Physiology and Exercise Physiology*.
- DOMÍNGUEZ, D. R., HEREDIA, L. B., Y, E. C. M. & LORES, R. I. 2002. EFECTO DEL EXTRACTO HIPOGLICEMANTE DE *PETIVERIA ALLIACEA* L SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA POR LOS ERITROCITOS. *Rev Cubana Invest Biomed*, 21, 161-6.
- FREEMAN, J. S. 2009. Role of the incretin pathway in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *CLEVELAND CLINIC JOURNAL OF MEDICINE*, 76, S12-S19.
- KAKU, K. 2010. Pathophysiology of Type 2 Diabetes and Its Treatment Policy. *JMAJ*, 53, 41-46.
- KIM, S., KUBEC, R. & MUSAH, R. 2006. 'Antibacterial and anti fungal activity of sulfur containing compound from *petiveria alliacea*'. *J. ethnopharmacology* :, 104 188-92.
- LUKAČÍNOVÁ, A., HUBKOVÁ, B., RÁČZ, O. & NIŠTIAR, F. 2013. Animal Models for Study of Diabetes Mellitus.
- MARTIEN, R., ADHYATMIKA, IRIANTO, I. D. K., FARIDA, V. & SARI, D. P. 2012. TECHNOLOGY DEVELOPMENTS NANOPARTICLES AS DRUG DELIVERY SYSTEMS. *Majalah Farmasetik*, 8, 133-144.
- MEENA, K. P., J.S. DANGI, P. K. S. & KUMAR, M. 2011. Nanoparticles Technology and Recent Advances in Novel Drug Delivery systems. *International Journal of Research in Drug Delivery*, 1, 1-5.
- MUSTIKA, A. 2014. Keamanan Penggunaan Ekstrak Etanol *Petiveria alliacea* pada Fungsi Ginjal Mencit. *Prosiding Annual Scientific Meeting Universitas Gadjah Mada, Maret 2014*.
- MUSTIKA, A., SARI, G. M. & INDRAWATI, R. 2015. Ekstrak Singawalang (*Petiveria alliacea*) Menurunkan Kadar Gula Darah melalui Peningkatan Ekspresi AMPK α 1 Universitas Airlangga.
- NAIBAHO, A. H., MUSTIKA, A. & RAHAJU, A. S. 2013. Uji Toksisitas Jangka Pendek ekstrak Singawalang (*Petiveria alliacea*) terhadap nekrosis ginjal mencit. Sarjana Skripsi, Airlangga university.
- NUGROHO, A. E. 2006. Animal Models Of Diabetes Mellitus : Pathology And Mechanism Of Some Diabetogenics. *B I O D I V E R S I T A S*, 7, 378-382.
- OBER, C. A. & GUPTA, R. B. 2011. NANOPARTICLE TECHNOLOGY DRUG DELIVERY. *Idea@s CONCYTEG*, 6, 714-726.
- OZOUGWU, J. C., OBIMBA, K. C., BELONWU, C. D. & UNAKALAMBA, C. B. 2013. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Academic Journals*, 4, 46-57.
- PRATIWI, I. A., MUSTIKA, A. & ANNIWATI, L. 2013. Uji Toksisitas Jangka Pendek ekstrak Singawalang (*Petiveria alliacea*) terhadap kadar serum transaminase serum. sarjana Skripsi, Airlangga University.
- SETIAWATI, W., MURTININGSIH, R., GUNAENI, N. & RUBIATI, T. 2008. Tumbuhan bahan pestisida Nabati dan cara pembuatannya untuk pengendalian organisme pengganggu tumbuhan.
- SYAHBUDDIN, S. 2010. Rational Therapy for Earlier and More Aggressive approach in patients with T2DM. *Prosiding cardiometabolic health toward 2020*, 21-29.
- TAYLOR, L. 2004. 'The healing power of rainforest herbs'. Diunduh dari : [http://www. Rainforest herbs.com](http://www.Rainforest herbs.com) tanggal 27 Juni 2011.
- YADAV, R., TIWARI, P. & DHANARAJ, E. 2008. Risk factors and complications of type 2 diabetes in Asians. *CRIPS* 9.
- ZAKARIA, MUSTIKA, A. & RAMADHANI. 2010. Uji Toksiitas Akut Daun Singawalang (*Petiveria alliacea*) pada Mencit Jantan(*mus musculus*). Sarjana Skripsi, Airlangga University.

Lampiran 1 Determinasi daun singawalang



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU

Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 295/ 102.7/ 2017
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Singawalang**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : Dr. ARIFA MUSTIKA, dr., M.Si.
NIM : 197009151998022001
Instansi : FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA

1. Perihal determinasi tanaman singawalang
 - Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 - Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 - Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 - Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 - Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
 - Bangsa : Phytolaccales
 - Suku : Phytolaccaceae
 - Marga : Petiveria
 - Jenis : *Petiveria alliacea*
2. Deskripsi : Habitus berupa terna kecil berbentuk semak-semak merunduk dan tingginya bisa mencapai 1 m. Berdaun jorong dengan panjang 6 – 19 cm, meruncing atau lancip, tajam tetapi tidak kaku, dan tak bertajuk. Bunganya kecil, berwarna putih. Buahnya berbentuk garis seperti taji sepanjang 6 mm. Berbau menyengat seperti bawang-bawangan (*Allium*).
3. Nama Simplisia : *Petiveriae Folium / Daun Singawalang*
4. Kandungan Kimia : Senyawa benzilhidroksietiltrisulfid, esteroide (b-sistosterol), terpenoid, saponin, polifenol, tanin, cumarin, difeniltrisulfur, acido lignoceric, triterpenes jenis isoarbinol, asetat, cinnamate isoarbinol, dan coumarin. Akar dan batangnya mengandung bahan jadian sulfur, trithiolaniacine, benzenic, bensaldehid, benzoic acid.
5. Penggunaan : Penelitian.
6. Daftar Pustaka
 - Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
 - Van Steenis, C.G.G.J. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 28 Juli 2017
Kepala UPT Materia Medica Batu



Dr. Husin R.M., Drs., Apt., M.Kes.
NIP.196111021991031003

Lampiran 2. Surat Keterangan Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Animal Care and Use Committee (ACUC)

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
" ETHICAL CLEARANCE "

No : 2.KE.092.05.2018

KOMISI ETIK PENELITIAN (*ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE*)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :

PENELITIAN BERJUDUL : Mekanisme Kerja Nanopartikel Ekstrak Daun
Singalawang (*Petivera alliaceae*) pada Regulasi
Glukosa Melalui Glut-2, IRS-1, Insulin, TNF- α , IL-6,
SIRT-1 dan PGC1 α pada Model Tikus Diabetes Mellitus

PENELITI UTAMA : Arifa Mustika

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT
PENELITIAN : Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 24 Mei 2018

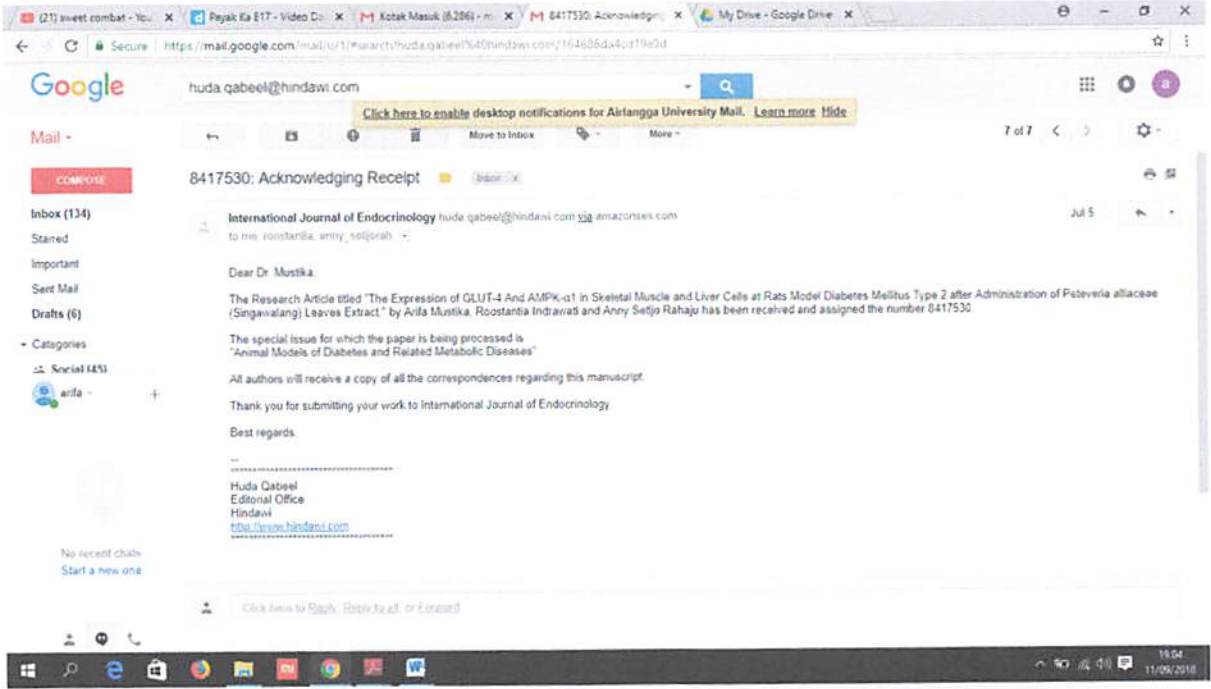
Mengetahui,
Dekan FKH-Unair

Prof. Dr. Puji Sianto, M.Kes.,Drh.
NIP. 195601051986011001

Ketua,

Dr. Nusdianto Triakoso, M.P.,Drh.
NIP. 196805051997021001

Lampiran 3. Bukti Submit artikel 1



Lampiran 4. Bukti uji substantif HAKI

20

HKI 3.61124/2018***09. Permohonan Pemeriksaan Substantif Paten*** 30/07/2018
 10.56.36***KHUMALASA RI*** 2.000.000.00*** 46***30/07/2018Terkait dengan:
 P00201709102***EKSTRAK DAUN SINGAYALANG (PET...



DEPARTEMEN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA R.I.
 DIREKTORAT JENDERAL
 HAK KEKAYAAN INTELEKTUAL

**Formulir Permintaan
 Pemeriksaan Substantif Paten**

Diisi oleh petugas
 Tanggal pengajuan :

Dengan ini saya/kami 1) :
 (71) Nama : Universitas Airlangga
 Alamat 2) : Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115
 Warga Negara : Indonesia
 Email : adam@ipb.unair.ac.id
 Telepon : 031 - 59174318
 NPWP (jika ada) : 00.005.564.0-606.000

Diisi oleh petugas
 []

yang telah mengajukan permintaan paten
 sendiri/melalui Konsultan HKI :

(74) Nama Konsultan HKI : - []
 Nomor Konsultan HKI : - []

dengan :

(65) Nomor Permintaan Paten : P00201709102
 (22) Tanggal penerimaan
 permintaan paten : 15 Desember 2017 []
 (54) Judul penemuan : EKSTRAK DAUN SINGALAWANG []
 (PETRIVERIA ALLIACEAE) SERTA PENGGUNAANNYA UNTUK []
 MENURUNKAN KADAR GULA DARAH

mengajukan permintaan pemeriksaan substantif untuk
 permintaan paten tersebut di atas. []

bersama ini, saya/kami sampaikan :

- [x] biaya pemeriksaan substantif paten sebesar Rp. 2.000.000,.....
 (..... dua juta rupiah.....) []
- [] biaya klaim yang belum dibayar buah @ Rp.
 sejumlah Rp. []
- [] kekurangan-kekurangan lain yang rincian ringkasnya tersebut
 Dalam lampiran formulir ini.

Yang mengajukan permintaan
 UNTUK DAN ATAS NAMA UNAIR,
 Ketua Lembaga Pengembangan Bisnis Dan Inkubasi



Dr. Muhammad Nufik Hadi Ryandono, S.E., M.Si
 NIP-197411192005011001

Lampiran 4. Bukti Presentasi artikel di seminar international



3rd ASEAN Congress on Medical Biotechnology and Molecular Biosciences

ACMBMB 2018 Secretariat 3rd ASEAN Congress on Medical Biotechnology and Molecular Bioscience, D-03A-3, Plaza Paragon, Point 2, Jalan Medan Pusat Bandar 5, Sekyen 9, 43650 Bandar Baru Bangi, Selangor, Malaysia MALAYSIA
Tel: +603 8928 0577, Fax: +603 8920 9344

Name : Dr. Arifa Mustika
Institution : Universitas Airlangga
Address : Jl Puacangan I no 4
East Java 60282 Indonesia
Paper ID : ACMBMB 2018: 066-039
Author : Arifa Mustika
Co-Author : Anny Setijo Rahaju
Paper Title : The effect of the extract Singawalang (*Petiveria alliacea*) leaves in decreasing cholesterol blood level and the profile of the liver and the blood vessel in Hypercholesterolemia rats
Date : May 18th, 2018

NOTIFICATION OF ACCEPTANCE

Dear Dr. Arifa Mustika,

On behalf of ACMBMB 2018 Committee, we are pleased to inform you that your submitted abstract (ACMBMB 2018: 066-039) entitled "The effect of the extract Singawalang (*Petiveria alliacea*) leaves in decreasing cholesterol blood level and the profile of the liver and the blood vessel in Hypercholesterolemia rats", has been reviewed and accepted for this conference.

We would like to remind you that the **Conference Fee shall be paid 2 weeks before conference date**. The early birds discounts due on Sunday, April 15th, 2018.

The 3rd ASEAN Congress on Medical Biotechnology and Molecular Biosciences will be held on 9 - 10 July 2018 at The Gurney Resort Hotel & Residences Penang, Malaysia.

Thank you for your cooperation and attention.

We are looking forward to seeing you at the conference.

Yours sincerely,

ACMBMB 2018 Secretariat
Tel: +603 8928 0577
Fax: +603 8920 9344
Email: secretariat@acmbmb.com
Website: <https://acmbmb.com/>

Lampiran 5. Draft artikel ke 2

Formulation and characterizations of Self nanoemulsifying drug delivery system of extract *Petiveria alliacea* (Singawalang) leaves

Arifa Mustika, Nurmawati Fatimah, Roostantia Indrawati, Gadis Melnar Sari,

^aDepartement of Pharmacology and Therapy, Medical Faculty of Airlangga University, Surabaya, Indonesia

^bDepartement of Phisiology, Medical Faculty of Airlangga University, Surabaya, Indonesia

Correspondence author email: arifa-m@fk.unair.ac.id

Abstract

Formulation of dosage form of Singawalang leaf extract should be considered. This is because, the extract contains a variety of compounds so that there may be a competitor in the absorption process and will cause the absorption of active ingredients in the gastrointestinal decline. One way to increase the absorption and disposition of active ingredients on target organs is to use a nanoparticle formulation. Therefore, the researcher will conduct research on nanoparticle formulation of leaf extract of singawalang (*Petiveria alliacea*).

The results of this study indicate that the corresponding oil phase for Singawalang leaf extract is migliol, the corresponding surfactant component is Tween 80 and the corresponding cosurfactant is PEG 400

Keyword : *Petiveria alliacea*, sneeds, nanoparticle, migliol

Introduction

Singawalang (*Petiveria alliacea*) is a plant widely found in Indonesia and empirically used by residents to treat various diseases such as diabetes, bleeding cough and is also used to protect plants from pests. The ethanol extract of Singawalang leaves has the ability to lower blood sugar levels (Barbosa-Filho et al., 2005, Domínguez et al., 2002). Mustika et al., 2015, also showed that leaf extract of Singawalang decreased blood sugar level in mouse model of type 2 DM with optimum dosage of 360 mg / kgbb and also increased AMPK expression on liver (Mustika et al., 2015).

This phenomenon raises the hope that the extract can be used as a phytopharmaca drug in the management of DMT2. To arrive at the phytopharmaca stage, it is necessary to do a good research on the mechanism of action at the pre clinical test stage and clinical trials. In addition, it is also necessary to do research on formulation of dosage form of leaf extract of singawalang. This is because, the extract contains a variety of compounds so that there may be a competitor in the absorbi process and will cause the absorption of active ingredients in the gastrointestinal decline. One way to increase the absorption and disposition of active ingredients on target organs is to use a nanoparticle formulation (Martien et al., 2012).

Therefore formulation of drug dosage forms and active material delivery systems play an important role in determining their therapeutic effects. Various research has been developed to improve the formulation and delivery system that aims to increase the levels of active ingredients to target organs, one of which is by the delivery of active ingredients in the nanoparticle system (Ober and Gupta, 2011, Meena et al., 2011)

Lipid based drug delivery system has attained increasing interest in oral route of administration of poorly bioavailable drug as a means to bypass the drug passage in the hepatic portal vein and consequently its hepatic degradation. This hypothesis was believed to be attained chiefly, by lymphatic transport via Peyer's patches along the GI tract [1]. Self emulsifying drug delivery system is one among the lipid based drug delivery systems that has been currently investigated for its advantages, providing a large interfacial area for partitioning the drug between oil and GI fluid [2]. This technique improves the oral bioavailability of poorly soluble drugs by enhancing the solubility and maintaining the drug in a dissolved state, in small droplets of oil, all over its transit through the gastrointestinal tract [3,4]. Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) has recently emerged as an approach to improve the solubility, dissolution and oral absorption for poorly water-soluble drugs. 5,6

Self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) is a type of SEDDS containing isotropic mixture of oil, surfactant, cosurfactant and drug substance, which can form a nanoemulsion in gastrointestinal tract after oral administration. The resultant emulsion with a particle size less than 100 nm increases the solubility of hydrophobic drug and enhances its absorption. Self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) is an isotropic mixture of oil, surfactants and co-surfactants that form fine oil-in-water nanoemulsion, upon mild agitation, followed by administration into aqueous media, such as GI fluids [5].

Thus, considering its potential benefits, we have developed a novel SNEDDS of *Petiveria alliacea* and evaluated its characterization. The present study is aimed to design and develop extract *Petiveria alliacea* loaded SNEDDS with the characterization. To accomplish this, the formulation was studied for drug solubility in various oils, surfactants and co-surfactants. From this, essential oils showed higher solubility data when compared to others. Hence, the essential oils were evaluated for their self emulsifying properties with surfactants and co-surfactants.

The objective of the study was to make a formulation of *Petiveria alliacea* (Singawalang) leaves extract in an auto-nanoemulsification system.

Material and methods

Material

Petiveria alliacea (Singawalang) leaves were collected from Balai Materia Medika (BMM) Batu, East Java, Indonesia and was determined by BMM. Ethanol 96 % purchased from Brataco. Various essential oil such as

Migliol, virgin cocconut oi, sun flower, olive oil, sesame oil, fish oil, soya oil, canola oil, rice oil, corn oil. Several chemical substance as tween 20, tween 80. PEG 400, propyleneglycol.

Methods

Extraction of *Petiveria alliacea* (Singawalang) leaves

1000 grams of Singawalang leaf powder has been extracted with 96% alcohol solvent. The extraction was done by maceration for 3 days.

Selection of SNEEDS componet

Solubility test of oil

Testing solubility of ethanol extract of leaf of singawalang in various oil. The oil used is Virgin Coconut Oil (VCO), Sesame Oil, Olive Oil, Corn Oil, Sun Flower Oil, Fish Oil, Soya oil, and Migliol. Fifty mg of ethanol extract of Singawalang leaf is put into 5 mL each oil gradually until saturated. The mixtures were vortexed as long as 5 minute and sonicated during 3 time 15 minute. Solubility will be visually observed

Solubility test of surfactant

Surfactant was selected on the ease of emulsification and solubility by visual. Various surfactants (span 20, span 80, tween 20 and tween 80) were selected to determine the emulsification ability of the selected oil phase. Mixture the amount of selected oil and the amount of each surfactant in the tube with ratio 1:1.

. Mix it by gently shaking the tube to determine the ease of emulsion. The amount of shake is used to determine the ease of emulsion. Allow the emulsion for 2 hours and the optical clarity of aqueous dispersion were visually observed.

Solubility test of co-surfactant

Co-Surfactant was selected on the ease of emulsification and solubility by visual. Various co-surfactants such as PEG 200, PEG 400 and PG were tested to find an appropriate formulation. Mixture the amount of surfactant and the amount of co-surfactant in the tube with ratio 2:1. Mix it by gently shaking the tube to determine the ease of emulsion. The amount of shake is used to determine the ease of emulsion. Allow the emulsion for 2 hours and the optical clarity of aqueous dispersion were visually observed

Construction of sneed system

The series of self-nanoemulsifying systems were formulated with varying concentrations of oil (25–70%w/w), surfactant (30–75%w/w), co-surfactant (0–25%w/w) (Table 1) at room temperature (25 °C) for 72 h. For any mixture, the total of surfactant, co-surfactant and oil concentration added was always 100%. Each formulation were homogenated with stirrer as long as 30 minute.

The suitable systems were selected based on visually observed and % transmittance by UV-VIS spectrophotometer at λ 650 nm.

Formulation of self-nanoemulsification of leaf extract of singawalang

SNEEDs formulation of extract singawalang leaves were prepared based on the optimum suitable composition of oil, surfactant, and co-surfactant.

The series of number of ethanol extracts of singawalang leaves (50 mg, 75 mg, 125 mg, and 200 mg) were dissolved in 5 mL each SNEEDs system. The formulation were homogenated by vortex 4 minute, sonicator 5 minute, and heating in the water bath at 37 C as long as 15 minute. The cycle were repeated 3 time

The evaluation of formulations were performed using self emulsification time and % transmittance by UV-VIS spectrophotometer at λ 650 nm.

Self emulsification time and % transmittance of sneed fromulation

In aquadest and artificial gastric fluid (AGF)

The emulsification time was evaluated by means of 1000 μ L of formula incorporated into the 100 mL aquadest and into the 100 mL AGF with temperature 37C and at sentrifuge at a rate of 148 RPM. Time from starting formula was inserted until dissolved all called emulsification time. Sample was evaluated % transmittance of UV-VIS spectrophotometer at λ 650 nm.

AGF solution was prepared by mixing 1 g NaCl sebanyak 1g, 35 mL HCl 37% and add aqueous until 500 mL. Adjust the pH until 1,2 by adding NaOH. Adjust AGF solution temperature at 37 C.

Particle size analysis

Particle size and polydispersibility index was obtained by using *Particle Size Analyzer* (HORIBA SZ-100). The polydispersity index reflects the uniformity of particle diameter and it can be used to depict the size distribution of nanoemulsion. The sensitivity range was 3 nm to 8000 nm. The measurements were performed at 25 °C at a fixed angle of 90°.

TEM analysis

The extract singawalang leaves SNEEDS globules were observed by transmission electron microscope. Sample were visualized by drying it on carbon coated grid and stained negatively with aqueous solution of phosphotungstic acid 2%. After drying the phosphotungstic acid, the sample were observed under TEM.

Samples were analyzed at a lower accelerating voltage of 100 kV with smaller objective aperture to achieve the contrast. Images were captured at 40000× magnification.

Result

SELECTION OF SNEDDS COMPONENTS

Solubility studies were carried out to identify a suitable oil, surfactant and cosurfactant for the formulation of extract singawalang leaf SNEDDS.

The result showed that singawalang leaf extract dissolved on VCO, Migliol and Corn oil (Table 1). So these three oils can be used as oil components to form nanoemulsion formulations. The result of the test can be concluded that the surfactant used to form the nanoemulsion formulation was Tween 80 and cosurfactant was PEG400 (Table 2).

Table 1 Solubility test of the extract Singawalang leaves in various oils

Oil	Solubility
VCO	Clear
Sesame	Muddy
Olive	Muddy
Corn	Clear
Sun Flower	Muddy
Fish	Muddy
Soya	Muddy
Migliol	Clear

Table 2 Surfactant and Co-surfactant emulsification study

Surfactant	Oil		Co-surfactant		
	Corn	Migliol	PEG200	PEG400	PG
Span 20	unclear	unclear	clear	clear	
Span 80	unclear	clear			
Tween 20	unclear	unclear			
Tween 80	Clear homogen	Clear			Clear

Sneed formulation

Berdasarkan pengamatan secara visual antara komponen minyak, surfaktan dan kosurfaktan, maka dipilih sepuluh komposisi formulasi SNEED untuk dilakukan uji visual, waktu emulsifikasi dan % transparency. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 3

Ten of such mixtures with varying concentrations were prepared in this investigation (Table)

.tabel 3

oil	Ratio			Result		
	oil	Surfactant (Tween 80)	Cosurfactant (PG)	Visual	Emulsification time (second)	Transparency (%)
Corn	1	1	1	Non homogen	X	X
	1	7	2	Muddy	x	x
	2	5	3	muddy	x	x
	2	6	2	muddy	x	x
	1	8	1	muddy	x	x
Migliol	1	1	1	muddy	x	x
	1	7	2	clear	25	95,4
	2	5	3	clear	21	95,5
	2	6	2	clear	15	95,2
	1	8	1	clear	25	95,4

Berdasarkan hasil pengamatan waktu emulsifikasi dan % transparency, maka dipilih 4 formulasi seperti pada tabel 4. Formulasi SNEED tersebut ditambahkan ekstrak daun Singawalang dengan dosis 1, sebanyak 50 mg , dosis 2 sebanyak 75 mg , dosis 3 sebanyak 125 mg , dosis 4 sebanyak 200 mg. berbagai formulasi Sneed ekstrak singawalang tersebut dilakukan uji visual, waktu emulsifikasi dan transmittance pada larutan AGF. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 5

Tabel .4. SNEDD formulation

Jenis minyak	Ratio komponen			Kode
	Minyak	surfaktan	kosurfaktan	

Jenis minyak	Ratlo komponen			Kode
	Minyak	surfaktan	kosurfaktan	
Migliol	1	7	2	C
	2	5	3	D
	1	8	1	E
	2	6	2	F

Tabel 5. Hasil uji formulasi SNEED extract daun singawlang untuk waktu emulsifikasi dan transmittance pada AGF

Formula	Visual	Waktu emulsifikasi	Trasmitance $\lambda=650\text{nm}$
C1	jernih	0:38:1	79,5
C2	jernih	0:32:2	72,6
C3	jernih	0:51:3	56,0
C4	jernih	0:41:2	39,4
D1	jernih	0:20:5	75,5
D2	jernih	0:25:1	74,5
D3	jernih	0:20:2	55,5
D4	jernih	0:30:2	43,8
E1	jernih	0:26:5	80,3
E2	jernih	0:32:9	74,0
E3	jernih	0:39:1	59,5
E4	jernih	0:38:1	54,6
F1	jernih	0:23:8	79,6
F2	jernih	0:30:9	86,1
F3	jernih	0:38:8	52,1
F4	jernih	0:37:2	34,2

Hasil Pemeriksaan Particle size analysis

Pemeriksaan PSA dapat dilihat pada tabel 5.6

Poly dispersity index

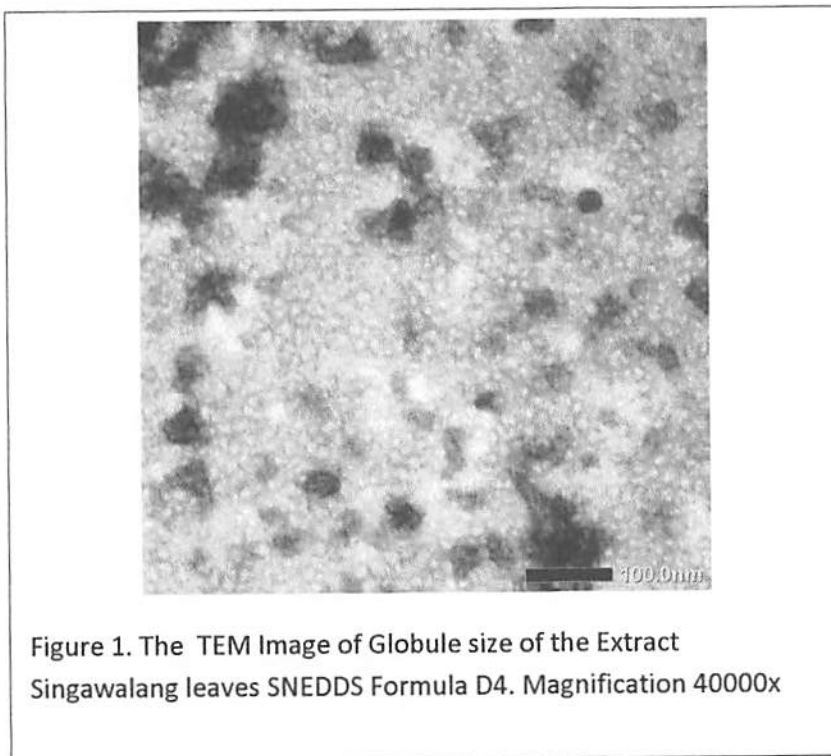
Droplet size and Uniformity of globule size in extract singawalang leaves SNEEDS formulation was nalayzed by diffraction scattering light intensity (HORIBA SZ-100) at 25°C and scattering angle of 90 . Hasil pemeriksaan tersebut dapat dilihat pada tabel 6

Tabel 5.6. Hasil pemeriksaan PSA pada berbagai formula

Formula	Z average (nm)	PI
C4	13	0,126
D4	18,7	0,004
E4	13,4	0,195
F4	17,8	0,249

Berdasarkan hasil particle size analyzis, the extract Singawalang leaves SNEDDs formulation, maka hail terbaik ditunjukkan pada formula dengan kode D4. Formula tersebut dilanjutkan dengan pemeriksaan morphology dengan TEM

Morphological study



Characterization

Acknowledgement

Ronny Marten from Departement of Biopharamceuticals, Faculty of Pharmacy of Gadjah Mada University, Yogyakarta

REFERENSI

- AHMED, K. A., MUNIANDY, S. & ISMAIL, I. S. 2010. Type 2 Diabetes and Vascular Complications: A pathophysiologic view. *Biomedical Research*, 21, 147-155.
- BARBOSA-FILHO, J. M., VASCONCELOS, T. H. C., ALENCAR, A. A., LEÔNIA M. BATISTA, OLIVEIRA, R. A. G., GUEDES, D. N., FALCÃO, H. D. S., MOURA, M. D., DINIZ, M. F. F. M. & MODESTO-FILHO, J. 2005. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with

- hypoglycemic activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15, 392-413.
- BISHT, S., FELDMANN, G., SONI, S., RAVI, R., KARIKAR, C. & MAITRA, A. 2007. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *J Nanobiotechnology*, 5, 3.
- BONORA, E., FORMENTINI, G. & CALCATERRA 2002. HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subject: prospective data from the verona diabetes complication study. *diabetes Care*, 25.
- CIFUENTES, M. 2009. A fraction from *Petiveria alliacea* induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and regulates HSP70. *Universitas Scientiarum*, 14.
- DEFRONZO, R. A. 2009. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 58, 773-95.
- DEFRONZO, R. A., ELDOR, R. & ABDUL-GHANI, M. 2013. Pathophysiologic approach to therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *DIABETES CARE*, 36 Suppl 2, S127-38.
- DOMÍNGUEZ, D. R., HEREDIA, L. B., Y, E. C. M. & LORES, R. I. 2002. EFECTO DEL EXTRACTO HIPOGLICEMANTE DE PETIVERIA ALLIACEA L SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA POR LOS ERITROCITOS. *Rev Cubana Invest Biomed*, 21, 161-6.
- FREEMAN, J. S. 2009. Role of the incretin pathway in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *CLEVELAND CLINIC JOURNAL OF MEDICINE*, 76, S12-S19.
- KAKU, K. 2010. Pathophysiology of Type 2 Diabetes and Its Treatment Policy. *JMAJ*, 53, 41-46.
- KIM, S., KUBEC, R. & MUSAH, R. 2006. 'Antibacterial and anti fungal activity of sulfur containing compound from *petiveria alliacea*'. *J. ethnopharmacology* :, 104 188-92.
- MARTIEN, R., ADHYATMIKA, IRIANTO, I. D. K., FARIDA, V. & SARI, D. P. 2012. TECHNOLOGY DEVELOPMENTS NANOPARTICLES AS DRUG DELIVERY SYSTEMS. *Majalah Farmaseutik*, 8, 133-144.
- MEENA, K. P., J.S. DANGI, P. K. S. & KUMAR, M. 2011. Nanoparticles Technology and Recent Advances in Novel Drug Delivery systems. *International Journal of Research in Drug Delivery*, 1, 1-5.
- MUSTIKA, A. 2014. Keamanan Penggunaan Ekstrak Etanol *Petiveria alliacea* pada Fungsi Ginjal Mencit. *Prosiding Annual Scientific Meeting Universitas Gadjah Mada, Maret 2014*.
- MUSTIKA, A., SARI, G. M. & INDRAWATI, R. 2015. Ekstrak Singawalang (*Petiveria alliacea*) Menurunkan Kadar Gula Darah melalui Peningkatan Ekspresi AMPK α 1 Universitas Airlangga.
- NAIBAHO, A. H., MUSTIKA, A. & RAHAJU, A. S. 2013. *Uji Toksisitas Jangka Pendek ekstrak Singawalang (Petiveria alliacea) terhadap nekrosis ginjal mencit*. Sarjana Skripsi, Airlangga university.
- OBER, C. A. & GUPTA, R. B. 2011. NANOPARTICLE TECHNOLOGY DRUG DELIVERY. *Idea@s CONCYTEG*, 6, 714-726.
- OZOUGWU, J. C., OBIMBA, K. C., BELONWU, C. D. & UNAKALAMBA, C. B. 2013. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Academic Journals*, 4, 46-57.
- PRATIWI, I. A., MUSTIKA, A. & ANNIWATI, L. 2013. *Uji Toksisitas Jangka Pendek ekstrak Singawalang (Petiveria alliacea) terhadap kadar serum transaminase serum*. sarjana Skripsi, Airlangga University.
- SETIAWATI, W., MURTININGSIH, R., GUNAENI, N. & RUBIATI, T. 2008. Tumbuhan bahan pestisida Nabati dan cara pembuatannya untuk pengendalian organisme pengganggu tumbuhan.
- SUNDARI, ZUPRIZAL, YUWANTA, T. & MARTIEN, R. 2014. Formulation Nanocapsule of Turmeric Extract Characterization on Oral Administration and Its Ability as Antibacterial. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 5, 1261-1265.
- SYAHBUDDIN, S. 2010. Rational Therapy for Earlier and More Aggressive approach in patients with T2DM. *Prociding cardiometabolic health toward 2020*, 21-29.
- TAYLOR, L. 2004. 'The healing power of rainforest herbs'. *Diunduh dari : <http://www.Rainforestherbs.com> tanggal 27 Juni 2011*.
- TSAI, Y. M., CHIEN, C. F., LIN, L. C. & TSAI, T. H. 2011. Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration. *Int J Pharm*, 416, 331-8.
- YADAV, R., TIWARI, P. & DHANARAJ, E. 2008. Risk factors and complications of type 2 diabetes in Asians. *CRIPS* 9.
- ZAKARIA, MUSTIKA, A. & RAMADHANI. 2010. *Uji Toksiitas Akut Daun Singawalang (Petiveria alliacea) pada Mencit Jantan(mus musculus)*. Sarjana Skripsi, Airlangga University.

LAMPIRAN 6 ANALISIS STATISTIK**UJI HOMOGENITAS****Test of Homogeneity of Variances**

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
TNF	24,029	4	29	,000
INSULIN	2,323	4	29	,080

Test of Homogeneity of Variances

IL6

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,515	4	21	,072

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
BBAWAL	3,734	4	25	,016
BBAKHIR	,480	4	25	,750
GDAWAL	1,678	4	25	,187
GDAKHIR	1,210	4	25	,331

Test of Homogeneity of Variances

HOMAIR

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,898	4	25	,142

UJI DISTRIBUSI NORMAL

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of TNF is normal with mean 760,55 and standard deviation 2.991,050.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	,200 ^{1,2}	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of IL6 is normal with mean 1.020,76 and standard deviation 1.675,041.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	,200 ^{1,2}	Reject the null hypothesis.
3	The distribution of INSULIN is normal with mean 6,06 and standard deviation 1,597.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	,200 ^{1,2}	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of BBAWAL is normal with mean 178,80 and standard deviation 14,761.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	,200 ^{1,2}	Retain the null hypothesis.
5	The distribution of BBAKHIR is normal with mean 186,60 and standard deviation 31,530.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	,200 ^{1,2}	Retain the null hypothesis.
6	The distribution of GDAWAL is normal with mean 434,77 and standard deviation 101,304.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	,200 ^{1,2}	Retain the null hypothesis.
7	The distribution of GDAKHIR is normal with mean 266,27 and standard deviation 149,133.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	,200 ^{1,2}	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

¹Lilliefors Corrected

²This is a lower bound of the true significance.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		HOMAI R
N		33
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4,5636
	Std. Deviation	2,84207
	Most Extreme Differences	
	Absolute	,144
	Positive	,144
	Negative	-,111
Test Statistic		,144
Asymp. Sig. (2-tailed)		,081 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

UJI BEDA

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of GDAKHIR is the same across categories of GRUP.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,022	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

TNF

KELOMPOK 1 DAN 4

KELOMPOK 1 DAN 2

Test Statistics^a

	TNF
Mann-Whitney U	20,000
Wilcoxon W	48,000
Z	-,576
Asymp. Sig. (2-tailed)	,564
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,620 ^b

- a. Grouping Variable: KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	TNF
Mann-Whitney U	15,000
Wilcoxon W	43,000
Z	-1,214
Asymp. Sig. (2-tailed)	,225
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,259 ^b

- a. Grouping Variable: KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 1 DAN 5

KELOMPOK 1 DAN 3

Test Statistics^a

	TNF
Mann-Whitney U	8,500
Wilcoxon W	29,500
Z	-1,788
Asymp. Sig. (2-tailed)	,074
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,073 ^b

- a. Grouping Variable: KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	TNF
Mann-Whitney U	3,000
Wilcoxon W	31,000
Z	-2,355
Asymp. Sig. (2-tailed)	,019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,018 ^b

- a. Grouping Variable: KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 2 DAN 3

Test Statistics^a

	TNF
Mann-Whitney U	16,500
Wilcoxon W	37,500
Z	-,644
Asymp. Sig. (2-tailed)	,520
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,534 ^b

- a. Grouping Variable:
KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 3 DAN 4

Test Statistics^a

	TNF
Mann-Whitney U	17,000
Wilcoxon W	38,000
Z	-,571
Asymp. Sig. (2-tailed)	,568
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,628 ^b

- a. Grouping Variable:
KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 2 DAN 4

Test Statistics^a

	TNF
Mann-Whitney U	22,000
Wilcoxon W	50,000
Z	-,320
Asymp. Sig. (2-tailed)	,749
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,805 ^b

- a. Grouping Variable:
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 3 DAN 5

Test Statistics^a

	TNF
Mann-Whitney U	3,000
Wilcoxon W	24,000
Z	-2,191
Asymp. Sig. (2-tailed)	,028
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,030 ^b

- a. Grouping Variable:
KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 2 DAN 5

Test Statistics^a

	TNF
Mann-Whitney U	5,000
Wilcoxon W	33,000
Z	-2,030
Asymp. Sig. (2-tailed)	,042
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,048 ^b

- a. Grouping Variable:
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 4 DAN 5

Test Statistics^a

	TNF
Mann-Whitney U	4,000
Wilcoxon W	32,000
Z	-2,192
Asymp. Sig. (2-tailed)	,028
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,030 ^b

- a. Grouping Variable:
- b. Not corrected for ties.

INTERLEUKIN 6

KELOMPOK 1 DAN 2

Test Statistics^a

	IL6
Mann-Whitney U	2,000
Wilcoxon W	17,000
Z	-2,200
Asymp. Sig. (2-tailed)	,028
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,032 ^b

- a. Grouping Variable: KLPK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 1 DAN 3

Test Statistics^a

	IL6
Mann-Whitney U	2,000
Wilcoxon W	17,000
Z	-1,650
Asymp. Sig. (2-tailed)	,099
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,143 ^b

- a. Grouping Variable: KLPK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 1 DAN 4

Test Statistics^a

	IL6
Mann-Whitney U	10,000
Wilcoxon W	25,000
Z	-,525
Asymp. Sig. (2-tailed)	,599
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,690 ^b

- a. Grouping Variable: KLPK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 1 DAN 5

Test Statistics^a

	IL6
Mann-Whitney U	3,000
Wilcoxon W	18,000
Z	-2,196
Asymp. Sig. (2-tailed)	,028
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,030 ^b

- a. Grouping Variable: KLPK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 2 DAN 3

Test Statistics^a

	IL6
Mann-Whitney U	6,000
Wilcoxon W	12,000
Z	-,447
Asymp. Sig. (2-tailed)	,655
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,786 ^b

- a. Grouping Variable: KLPK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 2 DAN 4

Test Statistics^a

	IL6
Mann-Whitney U	2,000
Wilcoxon W	17,000
Z	-2,200
Asymp. Sig. (2-tailed)	,028
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,032 ^b

- a. Grouping Variable: KLPK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 2 DAN 5

Test Statistics^a

	IL6
Mann-Whitney U	11,000
Wilcoxon W	32,000
Z	-,730
Asymp. Sig. (2-tailed)	,465
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,537 ^b

- a. Grouping Variable: KLPK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 3 DAN 4

Test Statistics^a

	IL6
Mann-Whitney U	2,000
Wilcoxon W	17,000
Z	-1,650
Asymp. Sig. (2-tailed)	,099
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,143 ^b

- a. Grouping Variable: KLPK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 3 DAN 5

Test Statistics^a

	IL6
Mann-Whitney U	9,000
Wilcoxon W	30,000
Z	,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^b

- a. Grouping Variable: KLPK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 4 DAN 5

Test Statistics^a

	IL6
Mann-Whitney U	3,500
Wilcoxon W	18,500
Z	-2,109
Asymp. Sig. (2-tailed)	,035
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,030 ^b

- a. Grouping Variable: KLPK
- b. Not corrected for ties.

INSULIN

KELOMPOK 1 DAN 2

Test Statistics^a

	INSULI N
Mann-Whitney U	21,000
Wilcoxon W	49,000
Z	-,448
Asymp. Sig. (2-tailed)	,654
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,710 ^b

- a. Grouping Variable:
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 1 DAN 3

Test Statistics^a

	INSULI N
Mann-Whitney U	14,000
Wilcoxon W	35,000
Z	-1,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	,317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,366 ^b

- a. Grouping Variable:
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 1 DAN 4

Test Statistics^a

	INSULI N
Mann-Whitney U	17,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-,959
Asymp. Sig. (2-tailed)	,337
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,383 ^b

- a. Grouping Variable: KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 1 DAN 5

Test Statistics^a

	INSULI N
Mann-Whitney U	16,000
Wilcoxon W	37,000
Z	-,714
Asymp. Sig. (2-tailed)	,475
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,534 ^b

- a. Grouping Variable: KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 2 DAN 3

Test Statistics^a

	INSULI N
Mann-Whitney U	20,000
Wilcoxon W	41,000
Z	-,143
Asymp. Sig. (2-tailed)	,886
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,945 ^b

- a. Grouping Variable: KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 2 DAN 4

Test Statistics^a

	INSULI N
Mann-Whitney U	22,000
Wilcoxon W	50,000
Z	-,320
Asymp. Sig. (2-tailed)	,749
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,805 ^b

- a. Grouping Variable: KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 2 DAN 5

Test Statistics^a

	INSULI N
Mann-Whitney U	14,000
Wilcoxon W	35,000
Z	-1,001
Asymp. Sig. (2-tailed)	,317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,366 ^b

- a. Grouping Variable: KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 3 DAN 4

Test Statistics^a

	INSULI N
Mann-Whitney U	18,000
Wilcoxon W	46,000
Z	-,429
Asymp. Sig. (2-tailed)	,668
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,731 ^b

- a. Grouping Variable: KELOMPOK
- b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 3 DAN 5

Test Statistics^a

	INSULI N
Mann-Whitney U	17,000
Wilcoxon W	38,000
Z	-,160
Asymp. Sig. (2-tailed)	,873
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,937 ^b

- a. Grouping Variable: KELOMPOK
b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 1 DAN 3

Test Statistics^a

	GDAKHI R
Mann-Whitney U	10,000
Wilcoxon W	31,000
Z	-1,283
Asymp. Sig. (2-tailed)	,199
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,240 ^b

- a. Grouping Variable: GRUP
b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 4 DAN 5

Test Statistics^a

	INSULI N
Mann-Whitney U	14,000
Wilcoxon W	35,000
Z	-,183
Asymp. Sig. (2-tailed)	,855
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,931 ^b

- a. Grouping Variable: KLPK
b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 1 DAN 4

Test Statistics^a

	GDAKHI R
Mann-Whitney U	11,000
Wilcoxon W	32,000
Z	-1,123
Asymp. Sig. (2-tailed)	,261
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,310 ^b

- a. Grouping Variable: GRUP
b. Not corrected for ties.

KADAR GULA DARAH

KELOMPOK 1 DAN 2

Test Statistics^a

	GDAKHI R
Mann-Whitney U	13,000
Wilcoxon W	34,000
Z	-,802
Asymp. Sig. (2-tailed)	,423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,485 ^b

- a. Grouping Variable: GRUP
b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 1 DAN 5

Test Statistics^a

	GDAKHI R
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	21,000
Z	-2,892
Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002 ^b

- a. Grouping Variable: GRUP
b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 2 DAN 3

Test Statistics^a

	GDAKHI R
Mann-Whitney U	12,000
Wilcoxon W	33,000
Z	-,961
Asymp. Sig. (2-tailed)	,337
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,394 ^b

a. Grouping Variable: GRUP
b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 3 DAN 4

Test Statistics^a

	GDAKHI R
Mann-Whitney U	14,000
Wilcoxon W	35,000
Z	-,641
Asymp. Sig. (2-tailed)	,522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,589 ^b

a. Grouping Variable: GRUP
b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 2 DAN 4

Test Statistics^a

	GDAKHI R
Mann-Whitney U	17,000
Wilcoxon W	38,000
Z	-,160
Asymp. Sig. (2-tailed)	,873
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,937 ^b

a. Grouping Variable: GRUP
b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 3 DAN 5

Test Statistics^a

	GDAKHI R
Mann-Whitney U	8,000
Wilcoxon W	29,000
Z	-1,604
Asymp. Sig. (2-tailed)	,109
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,132 ^b

a. Grouping Variable: GRUP
b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 2 DAN 5

Test Statistics^a

	GDAKHI R
Mann-Whitney U	1,000
Wilcoxon W	22,000
Z	-2,727
Asymp. Sig. (2-tailed)	,006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,004 ^b

a. Grouping Variable: GRUP
b. Not corrected for ties.

KELOMPOK 4 DAN 5

Test Statistics^a

	GDAKHI R
Mann-Whitney U	5,000
Wilcoxon W	26,000
Z	-2,085
Asymp. Sig. (2-tailed)	,037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,041 ^b

a. Grouping Variable: GRUP
b. Not corrected for ties.

HOMA IR

Test of Homogeneity of Variances

ANOVA

HOMAIR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	64,020	4	16,005	3,487	,021
Within Groups	114,740	25	4,590		
Total	178,760	29			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HOMAIR

LSD

(I) KLP	(J) KLP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	-,40000	1,23688	,749	-2,9474	2,1474
	3,00	-2,85000*	1,23688	,030	-5,3974	-,3026
	4,00	-,66667	1,23688	,595	-3,2141	1,8807
	5,00	-3,66667*	1,23688	,007	-6,2141	-1,1193
2,00	1,00	,40000	1,23688	,749	-2,1474	2,9474
	3,00	-2,45000	1,23688	,059	-4,9974	,0974
	4,00	-,26667	1,23688	,831	-2,8141	2,2807
	5,00	-3,26667*	1,23688	,014	-5,8141	-,7193
3,00	1,00	2,85000*	1,23688	,030	,3026	5,3974
	2,00	2,45000	1,23688	,059	-,0974	4,9974
	4,00	2,18333	1,23688	,090	-,3641	4,7307
	5,00	-,81667	1,23688	,515	-3,3641	1,7307
4,00	1,00	,66667	1,23688	,595	-1,8807	3,2141
	2,00	,26667	1,23688	,831	-2,2807	2,8141
	3,00	-2,18333	1,23688	,090	-4,7307	,3641
	5,00	-3,00000*	1,23688	,023	-5,5474	-,4526
5,00	1,00	3,66667*	1,23688	,007	1,1193	6,2141
	2,00	3,26667*	1,23688	,014	,7193	5,8141
	3,00	,81667	1,23688	,515	-1,7307	3,3641
	4,00	3,00000*	1,23688	,023	,4526	5,5474

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

Certificate of Appreciation

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

is hereby awarded to

Dr. Arifa Mustika

in recognition of his/her valued participation
as an **ORAL PRESENTER** in the

2018 ACMBMB 3rd ASEAN Congress on Medical Biotechnology and Molecular Biosciences

In conjunction with
2nd Conference of Malaysian Society
of Human Genetics

9 - 10 July 2018

The Gurney Resort Hotel & Residences Penang, Malaysia

Organized by



Jointly Organized by:



Prof. Dr. Zilfalil Alwi
Chairman of the Organising
Committee ACMBMB2018

Asoc. Prof. Dr. Sarina Sulong
President of Malaysian Society of
Human Genetics (MSHG)

Dr. Azlina Ahmad
Chair of the Scientific Committee
ACMBMB2018

