



Efek Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji *Nigella sativa* terhadap Kadar Katalase Hepar Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2

Pratiwi Oktaviana², Ema Pristi Yunita¹, Efta Triastuti¹

¹Bidang Farmasi Klinik, Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang

²Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

INFO ARTIKEL

Sejarah artikel:

Penerimaan naskah: 23

Februari 2016

Penerimaan naskah

revisi: 24 Februari 2016

Disetujui untuk

dipublikasikan: 20 Juni

2016

Kata kunci :

Katalase, Nanopartikel PLGA, *Nigella sativa*

Nigella sativa merupakan tanaman obat dengan efek antidiabetes dan antioksidan yang menurunkan kadar glukosa darah dan meningkatkan pertahanan antioksidan tubuh. Salah satu pertahanan antioksidan endogen untuk mencegah stres oksidatif pada komplikasi diabetes melitus (DM) adalah katalase (CAT) yang menjaga keseimbangan status redoks tubuh. Ekstrak biji *Nigella sativa* (NSE) mampu meningkatkan kadar antioksidan endogen. Penggunaan bahan alam sering mengalami kegagalan klinik dikarenakan rendahnya bioavailabilitas. Salah satu sistem penghantaran obat nanopartikel *poly(lactide-co-glycolic-acid)* (PLGA) mampu meningkatkan efek terapi ekstrak. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan kadar CAT hepar tikus *Sprague dawley* DM pada kelompok NSE 48 mg/kgBB/hari, nanopartikel PLGA-NSE 48 mg/kgBB/hari, glibenklamid 0,45 mg/kgBB/hari, dan diet normal tanpa terapi. Penelitian ini merupakan *true experimental design post-test with controlled-group* menggunakan 24 ekor tikus *Sprague dawley* dengan pakan diet tinggi lemak selama 40 hari, dilanjutkan induksi DM dengan streptozocin 35 mg/kgBB. Pengukuran kadar CAT hepar dengan metode kolorimetri. Uji fitokimia kualitatif menunjukkan NSE mengandung *thymoquinone* yang berkhasiat sebagai antioksidan. Preparasi nanopresipitasi nanopartikel PLGA-NSE menghasilkan nanopartikel *spheric-shape* diameter = 126,711 (41,21 ± 852,60) nm. Terapi nanopartikel PLGA-NSE selama 26 hari mampu menurunkan glukosa darah puasa tikus DM (66,67%) lebih baik dibandingkan ketiga kelompok yang lain. Nanopartikel PLGA-NSE tidak signifikan dalam meningkatkan kadar CAT hepar ($p = 0,872$). Namun, rerata kadar CAT hepar tikus DM tertinggi pada kelompok PLGA-NSE dibandingkan kelompok lainnya. Terdapat perbedaan rerata kadar CAT hepar antar kelompok tikus dan kadar CAT hepar tertinggi pada tikus dengan terapi nanopartikel PLGA-NSE.

The Effect of PLGA Nanoparticles of *Nigella sativa* Seed Extract on Catalase Level in The Liver Tissues of Type 2 Diabetes Mellitus Rats

ABSTRACT

Key words:

Catalase, PLGA

Nanoparticle, *Nigella sativa*

Nigella sativa, a medicinal plant, has antidiabetic and antioxidant effects via regulating blood glucose and antioxidant. One of the antioxidant defence capacity is catalase (CAT) which prevents oxidative stress in the DM progression via balancing redox state. This enzyme could be increased by *Nigella sativa* seeds extract (NSE). Plant-derived product has limited efficacy in clinical trial. One of drug delivery system, PLGA encapsulated nanoparticle, may improve this efficacy. The aims of this study were to evaluate CAT level in the liver tissues of DM *Sprague dawley* rats with 48 mg/kgBW/day NSE, PLGA nanoparticle of NSE 48 mg/kgBW/day, glibenclamide 0.45 mg/kgBW/day, and no therapy group. This research was a true experimental design post test controlled group, 24 rats were fed by high-fat diet for 40 days and followed by DM induced with 35 mg/kgBW streptozocin. CAT concentrations measured by colorimetric method. Thymoquinone which possesses antioxidant effect was identified by qualitative phytochemical evaluation. Nanoprecipitation method result PLGA nanoparticle *spheric-shape* with diameter = 126.711 (41.21 ± 852.60) nm. The administration of PLGA-NSE for 26 days to DM rats lowered fasting blood glucose (66.67%) better than other groups. The PLGA-NSE did not significantly increase the CAT level ($p = 0.872$). However, the mean of CAT level in the liver tissues of DM rats was higher in group PLGA-NSE compared to those in the other group. These results exhibited differences mean CAT level between groups and the highest CAT level in group with PLGA-NSE.

1. Pendahuluan

Indonesia adalah negara keempat penderita diabetes melitus (DM) terbanyak setelah Amerika Serikat, Cina, dan India¹. Berdasarkan hasil survei Departemen Kesehatan RI dalam RISKESDAS pada tahun 2007, pasien DM di Indonesia sebanyak 90-95% adalah DM tipe 2². Pada DM tipe 2 terjadi penurunan sekresi insulin dan penurunan sensitivitas insulin terhadap reseptor (resistensi insulin)³. Salah satu penyebab utama terjadinya penurunan sensitivitas dan resistensi insulin disebabkan oleh stres oksidatif, yaitu keadaan tidak seimbang antara radikal bebas dan sistem antioksidan⁴. Peningkatan stres oksidatif juga menyebabkan peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) yang bersifat sitotoksik terhadap sel sehingga terjadi kerusakan komponen seluler dan berperan penting terhadap komplikasi DM⁵. Konsentrasi ROS dikontrol oleh enzim antioksidan tubuh, salah satunya yaitu enzim katalase (CAT) di hepar⁶ yang berperan dalam mengonversi hidrogen peroksida menjadi H₂O dan O₂ sehingga secara langsung mampu mengurangi produksi hidrogen oksida dan lipid hidroperoksida. CAT juga merupakan enzim penting untuk menjaga keseimbangan redoks pada tubuh manusia sehingga dapat mencegah stres oksidatif⁷. Enzim CAT terdistribusi dalam jaringan tubuh manusia dengan konsentrasi tertinggi di dalam hepar, ginjal, dan eritrosit⁸.

Perkembangan ilmu pengetahuan mengarahkan penemuan berbagai intervensi baru terhadap manajemen terapi DM, yaitu dengan pemanfaatan antioksidan dalam manajemen terapi DM tipe 2⁹. Salah satu senyawa antioksidan yang dapat digunakan sebagai terapi antidiabetes adalah *thymoquinone*, senyawa ini merupakan senyawa aktif penting yang banyak ditemukan pada ekstrak biji *Nigella sativa* (30-48%)¹⁰. Penelitian efek antidiabetes pada ekstrak biji *Nigella sativa* yang mengandung *thymoquinone* telah banyak dilakukan dan terbukti memiliki efek antidiabetes, salah satunya ekstrak etanol biji *Nigella sativa* yang mampu menurunkan *Oral Glucose Tolerance Test* dan menstimulasi GLUT-4 di otot, dengan dosis ekstrak 48 mg/kgBB/hari¹¹. Namun penggunaan bahan alam memiliki keterbatasan, yaitu sering mengalami kegagalan pada fase klinik disebabkan rendahnya bioavailabilitas¹². Penggunaan nanopartikel *polylactic-co-glycolic-acid* (PLGA) mampu meningkatkan profil farmakokinetik bioavailabilitas kurkumin¹³.

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk meneliti efek terapi pemanfaatan nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* dosis 48 mg/kgBB dalam manajemen terapi DM dan pencegahan komplikasi DM dengan menjaga keseimbangan status redoks tubuh melalui peningkatan antioksidan endogen sehingga tidak terjadi stres oksidatif. Efikasi nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* dosis 48 mg/kgBB tersebut akan dibandingkan dengan non-nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* dosis 48 mg/kgBB/hari dan suspensi glibenklamid 0,45 mg/kgBB/hari melalui pengukuran kadar

antioksidan CAT yang terdapat pada hepar tikus model DM tipe 2.

2. Metode

Semua prosedur penelitian yang diintervensikan terhadap hewan coba sudah dinyatakan laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan FKUB dengan No. 066 / EC / KEPK - S1- FARM / 03 / 2015.

Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan eksperimen sebenarnya (*True Experimental Design*) menggunakan jenis *post test* dengan kelompok kontrol (*Post Test Control Group*). Rancangan penelitian yang dipakai adalah rancangan acak kelompok (RAK). Subjek penelitian adalah tikus *Sprague dawley* jantan umur 18 bulan dengan berat badan 250-400 gram dijadikan model DM Tipe 2 menggunakan *high fat diet* (HFD) selama 40 hari¹⁴ dan injeksi *intraperitoneal* (*i.p*) streptozocin (STZ) dosis rendah yaitu 35 mg/kgBB¹⁵.

Penelitian ini terdiri dari 3 fase yaitu fase adaptasi normal, fase HFD, dan fase terapi. Pada fase adaptasi normal semua tikus dilakukan diet normal yang terdiri dari PARS-comfeed:tepung terigu = 3:1 dengan bobot pakan 20 g/hari/ekor tikus selama 7 hari. Pada fase HFD, semua tikus diberikan diet pakan yang terdiri dari PARS 12,5 gram/hari; tepung terigu 6,25 gram/hari; kolesterol 0,25 gram/hari; asam kolat 0,025 gram/hari; dan minyak babi 0,625 gram/hari dengan bobot pakan 25 gram/hari selama 40 hari¹⁴. Penimbangan berat badan dan pengukuran kadar glukosa darah puasa (GDP) dilakukan pada setiap fase penelitian.

Jumlah sampel 24 ekor tikus dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu: kelompok kontrol negatif (diet pakan normal), kelompok kontrol positif (suspensi glibenklamid 0,45 mg/kgBB/hari), perlakuan 1 (non-nanopartikel ekstrak biji *Nigella sativa* 48 mg/kgBB/hari), dan perlakuan 2 (nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* 48 mg/kgBB/hari).

Ekstraksi Soklet Biji *Nigella sativa*

Proses ekstraksi soklet menggunakan 150 g serbuk biji *Nigella sativa* dan 900 mL etanol 95% selama 3 jam. Hasil ekstraksi soklet dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* T = 60°C selama ± 30 menit. Ekstrak disimpan pada wadah botol gelap dan tertutup rapat.

Pengujian Kualitatif Fitokimia Ekstrak Biji *Nigella sativa*

Menurut penelitian Dwarampudi *et al.* (2012) ekstrak mengandung alkaloid, saponin, triterpenoid, minyak dan minyak atsiri, tanin, flavonoid, serta saponin¹⁶. Uji fitokimia kualitatif ekstrak dilakukan untuk mengetahui adanya kandungan tersebut pada ekstrak yang digunakan untuk penelitian ini.

Uji minyak atsiri dilakukan dengan menambahkan reagen sudan III *q.s* ke dalam larutan ekstrak, lalu apabila larutan ekstrak berubah warna menjadi merah tua,

menunjukkan bahwa ekstrak positif mengandung minyak atsiri¹⁷.

Uji terpenoid dilakukan dengan menambahkan 2 mL kloroform dan 3 mL asam sulfat pekat ke dalam larutan ekstrak dan terjadi perubahan warna larutan ekstrak menjadi berwarna coklat kemerahan yang menunjukkan bahwa ekstrak mengandung terpenoid¹⁸.

Uji saponin dilakukan dengan mengocok ekstrak dan 10 mL air panas yang telah didinginkan selama 10 detik. Pada permukaan ekstrak terbentuk busa yang stabil dengan ketinggian 1 cm selama 10 menit. Busa yang stabil tersebut kemudian ditambahkan minyak zaitun *q.s* dan terbentuk emulsi yang menunjukkan bahwa terdapat kandungan saponin di dalam ekstrak¹⁹.

Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan reagen 5 mL amoniak encer dan 1 mL asam sulfat ke dalam larutan ekstrak, apabila terjadi perubahan warna ekstrak yang berwarna kuning menunjukkan bahwa ekstrak mengandung flavonoid. Dengan penambahan reagen 1% larutan aluminium ke dalam larutan ekstrak, apabila terjadi perubahan warna ekstrak menjadi kuning kecokelatan menunjukkan ekstrak mengandung flavonoid. Dengan penambahan 10 mL etil asetat dan 1 mL amoniak encer ke dalam larutan ekstrak dan apabila terjadi perubahan warna ekstrak menjadi kuning kecokelatan menunjukkan ekstrak mengandung flavonoid¹⁹.

Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan reagen Wagner ke dalam ekstrak dan terbentuk endapan coklat kemerahan yang menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung alkaloid. Dengan menambahkan reagen Mayer ke dalam larutan ekstrak apabila terbentuk krim menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung alkaloid. Dengan menambahkan reagen Dragendorf ke dalam ekstrak apabila terbentuk endapan jingga menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung alkaloid¹⁹.

Pengujian Kromatografi Lapis Tipis *Thymoquinone*

Proses eluasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan totalan 2 μ L ekstrak biji *Nigella sativa* dan 2 μ L standar *thymoquinone* pada plat silika dengan pelarut etil asetat : n-heksana = 1 : 9 dalam volume 100 mL, dieluasi sampai mencapai batas atas plat silika. Pengamatan noda menggunakan lampu UV dengan $\lambda = 254$ nm²⁰.

Pembuatan Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji *Nigella sativa*

Pembuatan sediaan nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* berdasarkan formula Paul *et al.* (2011) menggunakan metode nanopresipitasi dan untuk 26 hari terapi membutuhkan 3,1104 g ekstrak biji *Nigella sativa*; 15,552 g PLGA; 0,93312 L *propylene carbonat* (PC); 62,208 g pluronik F68; dan 6,2208 L aquabidestilata²¹. Proses ini diawali dengan melarutkan ekstrak biji *Nigella sativa* dan polimer PLGA ke dalam pelarut organik PC menggunakan stirer 500 rpm selama 30 menit. Campuran zat aktif ini ditambahkan ke dalam campuran larutan *stabilizer* menggunakan mikropipet dengan laju 0,5 mL/menit. Larutan *stabilizer* dibuat dengan cara melarutkan

pluronik F68 ke dalam aquabidestilata menggunakan magnetik stirer 1250 rpm selama 30 menit. Campuran sediaan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 g T = 4°C selama 30 menit.

Karakterisasi Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji *Nigella sativa*

Karakterisasi morfologi sediaan nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) merek FEI tipe inspect s 50. Pelet nanopartikel diletakkan pada karbon tip dan diberi etanol absolut agar cairan cepat menguap. Pelet tersebut dikondusifkan dan diamati ukuran nanopartikel pada SEM perbesaran 5.000x, 10.000x, dan 50.000x.

Pengukuran Kadar CAT Hepar Tikus

Pengukuran kadar CAT hepar menggunakan kit *Catalase StressXpress® Colorimetric Activity*. Jaringan hepar dibilas dengan fosfat bufer salin dan dihomogenkan dengan 0,5 mL *assay buffer* per 100 mg jaringan. Homogenat disentrifugasi 10.000 g selama 15 menit pada suhu 4°C dan diambil supernatan. Setelah itu, dipipet 25 μ L sampel supernatan dan standar pada sumuran. *Assay buffer* dipipet 25 μ L pada sumuran sebagai blanko. Reagen hidrogen peroksida sebanyak 25 μ L ditambahkan pada tiap sumuran menggunakan mikropipet. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Reagen pendeteksi kolorimetri sebanyak 25 μ L dan reagen *horseradish* peroksida sebanyak 25 μ L ditambahkan pada tiap sumuran untuk menginisiasi perubahan warna menjadi merah muda. Inisiasi reaksi ditunggu dengan cara diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit dan dilanjutkan pengukuran absorbansi sampel menggunakan spektrofotometer pada $\lambda = 570$ nm.

Analisis Data

Hasil pengukuran kadar CAT hepar tikus dianalisis menggunakan program *SPSS 20.0 for Windows 7* dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$). Metode analisis menggunakan uji normalitas data (Shapiro-Wilk), uji homogenitas, dan uji *One-Way ANOVA*.

3. Hasil

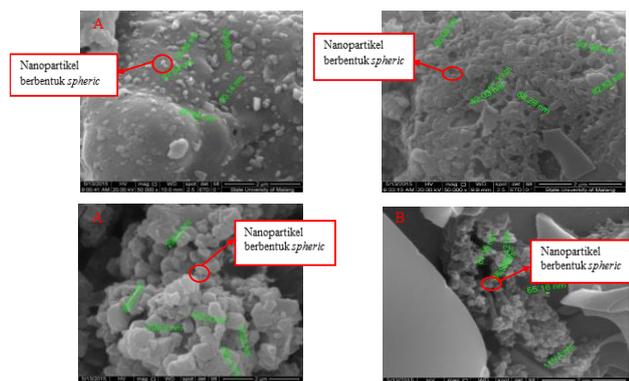
Ekstraksi dan Uji Fitokimia Kualitatif

Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi soklet 150 g serbuk biji *Nigella sativa* dan 900 mL etanol 95% menghasilkan 75,3 g ekstrak. Pada pengujian fitokimia kualitatif diperoleh bahwa ekstrak mengandung minyak atsiri, flavonoid, terpenoid, dan saponin. Hasil pengujian KLT menunjukkan bahwa ekstrak biji *Nigella sativa* mengandung *thymoquinone*.

Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji *Nigella sativa*

Pada pembuatan nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* diperoleh bobot pelet yang berbeda pada lima kali pembuatan nanopartikel. Hasil karakterisasi morfologi nanopartikel menggunakan SEM (gambar 1) menunjukkan nanopartikel bentuk *spheric* permukaan halus, namun tidak

dapat dipastikan bahwa semua nanopartikel yang terbentuk merupakan nanopartikel bentuk *spheric*.



Gambar 1. Hasil SEM Nanopartikel Ekstrak Biji *Nigella sativa* Batch 1 (A) dan Batch 2 (B)

Diameter nanopartikel yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 1 Diameter Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji *Nigella sativa*

No.	Pembuatan Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji <i>Nigella sativa</i>	Diameter Nanopartikel (nm)
1.	Batch 1	142,90 (50,14-318,00)
2.	Batch 2	66,57 (41,21-121,30)

Berat Badan Hewan Coba

Pada penelitian ini dilakukan penimbangan berat badan hewan coba selama penelitian berlangsung. Berikut Tabel 2 yang menjelaskan perbedaan berat badan pada tiap fase perlakuan:

Tabel 2. Berat Badan Hewan Coba

Kelompok Perlakuan	Berat Badan per Fase (gram)			
	Adaptasi	HFD (High Fat Diet)	Hari ke-3 setelah injeksi I.p STZ	Terapi
Negatif	206,5 (179-350)	364,5 (303-445)	310,0 (275-447)	265,5 (175-450)
Positif	221,0 (196-253)	357,0 (325-439)	316,0 (304-400)	248,0 (209-316)
Perlakuan 1	211,0 (195-229)	382,5 (280-414)	350,0 (247-361)	226,0 (188-315)
Perlakuan 2	226,0 (190-346)	380,0 (276-455)	353,5 (244-380)	247,5 (199-392)

Analisis statistik uji normalitas *Shapiro-Wilk* data berat badan diperoleh hasil sebaran data yang tidak normal. Hasil uji homogenitas yang diperoleh peneliti adalah data mempunyai varians yang homogen dengan $p = 0,661$ ($p > 0,05$). Kemudian dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* dan diperoleh nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga terdapat perbedaan berat badan tikus yang signifikan dari tiap fase perlakuan yang diberikan. Untuk mengetahui fase perlakuan yang mempunyai perbedaan secara bermakna, dilakukan uji hipotesis *Mann-Whitney*, hasil yang diperoleh peneliti

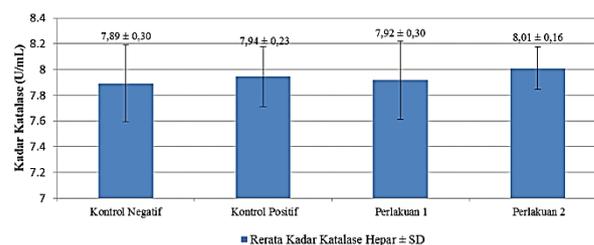
terdapat perbedaan berat badan yang signifikan ($p < 0,05$) pada masing-masing fase perlakuan.

Glukosa Darah Puasa Hewan Coba

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran GDP pada tiap fase penelitian. Pada fase adaptasi normal GDP semua tikus perlakuan < 126 mg/dL sehingga diet pakan normal tikus tidak menyebabkan peningkatan GDP. Pada fase HFD, semua GDP tikus kelompok perlakuan mengalami peningkatan GDP dan terdapat 7 ekor tikus sudah mengalami DM. Pada 3 hari setelah injeksi STZ *i.p* 35 mg/kgBB diperoleh GDP tikus semua kelompok perlakuan mengalami peningkatan yang signifikan dibanding GDP tikus fase HFD. Pada fase terapi dari pengukuran GDP semua tikus perlakuan menyebabkan 10 ekor tikus mengalami peningkatan GDP (diantaranya GDP 7 ekor tikus *Hi*), 12 ekor mengalami penurunan GDP, namun tikus masih mengalami DM, dan 1 ekor tikus tidak DM (GDP = 109 mg/dL) pada perlakuan 2.

Kadar CAT Hepar

Kadar CAT mengalami penurunan pada kondisi DM sehingga dengan adanya peningkatan kadar antioksidan CAT akan mencegah komplikasi mikrovaskular dan makrovaskular pada DM. Kadar CAT hepar yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 2 berikut ini:



Gambar 2. Rerata Kadar Katalase Hepar ± SD

Analisis statistik uji normalitas *Shapiro-Wilk* yang diperoleh adalah hasil sebaran data yang normal ($p > 0,05$). Langkah uji statistik selanjutnya adalah uji homogenitas, hasil yang diperoleh peneliti adalah data mempunyai varians yang homogen dengan $p = 0,590$ ($p > 0,05$). Kemudian dilanjutkan dengan uji *One-way ANOVA*, dari uji ini diperoleh nilai $p = 0,872$ ($p > 0,05$) sehingga intervensi terapi yang dilakukan peneliti tidak menyebabkan perbedaan kadar CAT hepar yang bermakna.

4. Pembahasan

Salah satu senyawa aktif penting adalah minyak esensial yang terkandung dalam biji *Nigella sativa* yaitu senyawa *thymoquinone* 30-48% yang berkhasiat sebagai antioksidan dan antidiabetes¹⁰. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji minyak atsiri dan hasilnya menunjukkan ekstrak positif mengandung minyak atsiri sehingga perlu dilakukan uji kualitatif spesifik KLT yang menunjukkan bahwa *thymoquinone* terkandung dalam ekstrak tersebut. Pada uji KLT peneliti diperoleh Rf noda *thymoquinone* yang sama dengan penelitian Basha *et al.* (1995) yaitu 0,77²². Ekstrak biji *Nigella sativa* yang mengandung *thymoquinone*

tersebut dipreparasi menggunakan nanopartikel PLGA untuk meningkatkan efikasi terapi pada DM tipe 2.

Nanopartikel dalam penelitian ini dipreparasi menggunakan metode nanopresipitasi yaitu menggunakan prinsip pembuatan nanopartikel dengan nukleasi agregat kecil. Proses ini diawali dengan melarutkan ekstrak biji *Nigella sativa* dan polimer PLGA ke dalam pelarut organik propilen karbonat (PC). Kemudian, campuran zat aktif ini ditambahkan ke dalam campuran larutan *stabilizer* menggunakan mikropipet dengan laju 0,5 mL/menit. Larutan *stabilizer* dibuat dengan cara melarutkan pluronik F68 ke dalam aquabidestilata. Dalam penelitian ini menggunakan formula 1% larutan *stabilizer*. Campuran zat aktif yang ditambahkan ke dalam larutan *stabilizer* secara cepat membentuk nukleasi pada saat pertama kali kontak dengan air dan membentuk nanopartikel. Polimer PLGA membentuk inti misel yang mengandung obat lipofilik. Jumlah eksipien dan zat aktif yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan formula dari penelitian oleh Paul *et al.* (2011). Pada lima kali proses pembuatan nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* diperoleh bobot pelet nanopartikel yang berbeda. Hal ini dipengaruhi oleh penggunaan alat sentrifugasi dengan kapasitas volume nanopartikel berbeda sehingga bobot pelet yang terendapkan di dalam *tube* jumlahnya juga berbeda, walaupun sudah digunakan kecepatan dan waktu sentrifugasi yang sama. Pada tabel 1 menunjukkan ukuran diameter nanopartikel yang diperoleh berbeda. Faktor yang mempengaruhi dalam pembentukan diameter nanopartikel tersebut, antara lain sonikasi, kecepatan sentrifugasi, tipe pelarut organik dan *stabilizer*, serta konsentrasi *stabilizer*. Semakin lama waktu sonikasi dan semakin tinggi kecepatan sonikasi cenderung memperkecil ukuran nanopartikel dan meningkatkan homogenitas ukuran partikel²³. Pada penelitian ini belum dilakukan sonikasi sehingga belum cukup untuk membentuk ukuran diameter nanopartikel yang lebih kecil. Kecepatan sentrifugasi mempengaruhi ukuran partikel, semakin tinggi kecepatan sentrifugasi akan memperkecil ukuran partikel²⁴. Pada penelitian ini penggunaan alat sentrifugasi dengan merek yang berbeda sehingga meskipun kecepatan sentrifugasi sama, akan tetapi terbentuk variasi diameter nanopartikel pada masing-masing *batch*. Sementara itu, dilaporkan bahwa preparasi nanopartikel yang menggunakan *stabilizer* non-ionik (pluronic F68 atau poli-vinil alkohol) dan pelarut organik larut air sebagian (etil asetat atau propilen karbonat) terbentuk nanopartikel dengan diameter rata-rata lebih dari 110 nm²⁵. Dalam penelitian ini, digunakan *stabilizer* non-ionik pluronic F68, pelarut organik larut air sebagian, dan propilen karbonat. Oleh karena itu, diameter nanopartikel yang terbentuk lebih dari 110 nm, yaitu dengan diameter 81,18 (41,21-318,00) nm. Pada penelitian lain juga dilaporkan bahwa *stabilizer* non-ionik (PVA) konsentrasi 0,1% (kecepatan sentrifugasi 8.800 rpm) dan konsentrasi 0,25% (kecepatan sentrifugasi 12.000 rpm) terbentuk diameter nanopartikel lebih kecil dibandingkan konsentrasi *stabilizer* lainnya (0,5% dan 0,75%)²³. Peningkatan konsentrasi *stabilizer* mampu menurunkan zeta potensial sehingga secara langsung

mampu meningkatkan ukuran partikel. Dalam penelitian ini, digunakan *stabilizer* non-ionik pluronic F68 konsentrasi 1% sehingga hal ini juga mempengaruhi diameter ukuran nanopartikel. Homogenitas dan distribusi ukuran partikel mempengaruhi efektivitas terapi. Namun, pada penelitian ini belum dilakukan karakterisasi homogenitas dan distribusi ukuran partikel. Nanopartikel PLGA yang digunakan dalam penelitian ini adalah dari semua *batch* yang ada. Beberapa keterbatasan dalam penelitian ini adalah belum dilakukan sonikasi dan penggunaan alat sentrifugasi dengan merek yang berbeda sehingga menyebabkan diameter nanopartikel antar *batch* menjadi berbeda jauh. Oleh karena itu, terlebih dahulu perlu dilakukan optimasi pembuatan nanopartikel PLGA.

Selain itu, parameter lain yang juga dilakukan oleh peneliti adalah melakukan penimbangan berat badan hewan coba. Pada fase terapi, semua tikus kembali dilakukan diet normal dan pada kelompok tikus perlakuan juga diberikan terapi selama 26 hari. Pada tabel 2 diketahui bahwa terdapat perbedaan rata-rata berat badan tikus pada tiap fase perlakuan. Uji hipotesis dengan *Kruskal-Wallis* mendukung bahwa terdapat perbedaan berat badan yang signifikan ($p < 0,001$) pada semua tikus perlakuan di setiap fase penelitian. Berat badan semua tikus meningkat pada fase HFD akibat konsumsi HFD. Konsumsi HFD akan menyebabkan infiltrasi lemak di berbagai organ (pankreas, hepar) yang mengaktifkan mediator inflamasi interleukin-1, interleukin-6, interleukin-8, dan *Tumour Necrosis Factor- α* sehingga menyebabkan terjadinya fosforilasi serin *insulin receptor substrate-1* dan menghambat sinyal transduksi insulin^{26,27}. Selain itu, pelepasan mediator inflamasi tersebut menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi yang akan menyebabkan apoptosis sel- β dan kerusakan sel- β (pada pankreas) sehingga sekresi insulin berkurang. Terjadi penurunan berat badan tikus pada fase 3-hari setelah injeksi STZ *i.p* karena tikus DM mengalami lipolisis sehingga terjadi penurunan berat badan. Tikus DM mengalami lipolisis karena glukosa tidak mampu terambil ke dalam sel otot sehingga untuk memenuhi kebutuhan energi maka tubuh mengkompensasinya dengan lipolisis. Pada fase terapi juga terjadi penurunan berat badan tikus karena dilakukan diet pakan normal dan induksi terapi pada tikus.

Sementara itu, dari hasil pengukuran kadar GDP diperoleh GDP semua tikus perlakuan pada rentang normal (GDP < 126 mg/dL) setelah fase adaptasi normal sehingga diet normal tidak menyebabkan DM. GDP dinyatakan DM apabila GDP > 126 mg/dL²⁸. GDP tikus perlakuan mengalami peningkatan setelah dilakukan HFD dan terdapat 7 ekor tikus sudah mengalami DM. GDP tikus 3 hari setelah STZ *i.p* mengalami peningkatan yang sangat signifikan dibandingkan GDP sebelumnya dan 10 ekor tikus dengan GDP *Hi*. Hal ini disebabkan, sensitivitas *glucosemeter Easy Touch* sampai kadar GDP = 600 mg/dL dan hasil kadar GDP tikus > 600 mg/dL. Oleh karena itu, alat tidak mampu mengukur kadar GDP tikus dan diinterpretasikan dengan *Hi*. STZ merupakan senyawa nitrosourea yang menginduksi kerusakan rantai DNA pada sel- β pankreas. Pada fase terapi menyebabkan 12 ekor mengalami penurunan GDP dan

masih mengalami DM, sementara itu sebanyak 10 ekor tikus mengalami peningkatan GDP (di antaranya GDP 7 ekor tikus *Hi*) dan 1 ekor tikus kelompok P2 dengan terapi nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* dengan GDP tidak DM (GDP = 109 mg/dL). Penurunan GDP disebabkan tikus diberi perlakuan terapi suspensi glibenklamid 0,45 mg/kgBB/hari, ekstrak biji *Nigella sativa* 48 mg/kgBB/hari, dan nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* 48 mg/kgBB/hari. Pada GDP tikus yang masih mencapai *Hi* kemungkinan tikus tidak mengalami kerusakan sel- β pankreas yang relatif melainkan absolut. Gejala klinis yang muncul pada tikus yaitu polidipsi, poliuri, penurunan berat badan, lemah, nafas terengah-engah, dan terjadi retinopati. Gejala-gejala tersebut merupakan gejala klinik yang sering terjadi pada DM tipe 1 sehingga terapi oral non-insulin belum adekuat dalam menurunkan GDP pada DM tipe 1. Oleh karena itu, dibutuhkan terapi insulin eksogen untuk terapi pada tikus dengan diabetes ketoasidosis dalam mencegah kematian.

Efek nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* memberikan efek terbaik dalam penurunan GDP (menurunkan GDP 66,67%) dan peningkatan kadar CAT hepar dibandingkan kelompok tikus DM dengan terapi suspensi glibenklamid 0,45 mg/kgBB/hari, ekstrak biji *Nigella sativa* 48 mg/kgBB/hari, dan diet normal tanpa terapi. Kadar CAT hepar tertinggi pada kelompok P2 karena pada kelompok tersebut paling baik dalam menurunkan GDP dan paling sedikit mengalami komplikasi DM (retinopati dan hepar abses) dibandingkan kelompok lainnya. Selain itu, penggunaan sistem penghantaran menggunakan nanopartikel PLGA mampu mengenkapsulasi ekstrak sehingga meminimalisir ekstrak terdegradasi oleh enzim pencernaan dan mudah diabsorpsi lebih cepat sehingga meningkatkan efikasi terapi DM. Kadar CAT hepar kelompok negatif paling rendah karena tikus hanya diberi diet pakan normal tanpa terapi dan mengalami penurunan produksi insulin akibat rusaknya sel β -pankreas (efek induksi STZ). Oleh karena itu, pada kelompok negatif merupakan kelompok yang banyak mengalami komplikasi DM (retinopati dan hepar abses) dibandingkan kelompok lainnya. Kandungan *thymoquinone* dalam ekstrak biji *Nigella sativa* mampu meningkatkan kadar antioksidan CAT hepar karena menurut penelitian Sultan *et al.* (2014), *thymoquinone* mampu berperan sebagai antioksidan dengan mencegah interaksi radikal bebas dan membran lapisan lipid, serta menekan produksi nitrit oksida yang berperan dalam pembentukan ROS²⁸. Uji hipotesis *One-way ANOVA* ($\alpha = 0,05$) menunjukkan bahwa antar kelompok perlakuan tidak ada perbedaan kadar CAT hepar yang signifikan dengan $p = 0,872$ ($p > 0,05$). Hal ini disebabkan dosis persen penjebaran ekstrak biji *Nigella sativa* pada nanopartikel PLGA belum diketahui sehingga belum bisa diketahui secara pasti dosis yang diberikan adalah 48 mg/kgBB atau tidak. Sediaan ekstrak biji *Nigella sativa* tidak dibuat dalam sediaan emulsi sehingga kemungkinan jumlah ekstrak yang disondekan kurang meskipun volume sonde sudah sesuai dosis. Preparasi sediaan suspensi glibenklamid menggunakan tablet glibenklamid sehingga

pada saat penimbangan kemungkinan bukan zat aktif glibenklamid yang dibuat suspensi melainkan ekspien dari tablet glibenklamid.

Oleh karena itu, dari penelitian ini dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan erata kadar CAT hepar antar kelompok tikus walaupun tidak bermakna secara statistik. Kadar CAT hepar tertinggi secara berurutan terdapat pada tikus yang mendapat terapi nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* 48 mg/kgBB/hari, tikus yang mendapat terapi suspensi glibenklamid 0,45 mg/kgBB/hari, tikus yang mendapat terapi ekstrak biji *Nigella sativa* 48 mg/kgBB/hari, dan tikus tanpa terapi.

5. Ucapan terima Kasih

Penelitian ini didukung oleh dana dari DPP/SPP Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Kami juga berterima kasih atas dukungan tenaga dan bantuan oleh rekan-rekan penelitian serta teknisi Laboratorium Farmasi dan Faal.

6. Daftar Pustaka

1. Pusat Data dan Informasi Persatuan Rumah Sakit Seluruh Indonesia (PERSI). *RI rangking keempat jumlah penderita diabetes terbanyak dunia-2011*. [online Des 2011; cited 2014 17 Nov]. Available from: <http://www.pdpersi.co.id/content/news.php?catid=23&mid=5&nid=618>.
2. Mihardja L, Delima, Siswoyo H, Ghani L, Soegondo S. *Prevalence and determinants of diabetes melitus and impaired glucose tolerance in indonesia (a part of basic health research/riskesdas)*. *Indones J Intern Med*. 2009; 41: 169-74.
3. American Diabetes Association (ADA). *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. *Diabetes Care*. 2013; 365:S67-S73.
4. Oprescu AI, Bikopoulos G, Naassan A, Allister EM, Tang C, Park E, et al. *Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo*. *Diabetes*. 2007 Dec; 56(12): 2927-37.
5. Qujeq D and Rezvani T. *Catalase (antioxidant enzyme) activity in streptozocin-induced diabetic rats*. *Int J Diabetes & Metab*. 2007; 15: 22-4.
6. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. *Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes*. *Diabetes*. 2004 Feb; 53: 119-24.
7. Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M. *Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus*. *BMC Med Genet*. 2008; (9): 30-6.
8. Kodydková LV, Kocík M, Žák A. *Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its*

- activity in different diseases. *Folia Biologica (Praha)*. 2014; 60: 153-67.
9. Ravichandiran V, Nirmala S. *A systematic review on antidiabetic medicinal plants*. *Research Journal Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013; 5(3): 155-168.
 10. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Shah AK, Najmi AK, Siddique NA. *A review on therapeutic potential of nigella sativa: a miracle herb*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013 May; 3(5): 337-52.
 11. Benhaddou-Andaloussi A, Louis M, Tri Vuong, Bouchra M, Padma M, Abdellatif S, et al. *The in vivo antidiabetic activity of nigella sativa is mediated through activation of the AMPK pathway and increased muscle Glut4 content*. *Evid Based Complement and Alternat Med*. 2011; 538671: 1-9.
 12. Alan S, Khan ZI, Mustafa G, Kumar M, Islam F, Bhatnagar A, et al. *Development and evaluations of thymoquinone encapsulated chitosan nanoparticles for nose-to brain targeting: a pharmacoscintigraphic study*. *Int J Nanomedicine*, 2012; 7: 5705-18.
 13. Khalil NM, Nascimento TC, Casa DM, Dalmolin LF, de Mattos AC, Hoss I, et al. *Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013 Jan; 101: 353-60.
 14. Pranata FJ. *Pengaruh pemberian ekstrak daun pare terhadap kadar insulin pada tikus putih strain wistar model diabetes melitus tipe 2 dengan hiperinsulinemia*. [skripsi]. Universitas Brawijaya Malang; 2010.
 15. Srinivasan B, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. *Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening*. *Pharmacol Res*. 2005 Oct; 52(4): 313-20.
 16. Dwarampudi LP, Dhanabal P, Muruganantham M, Raghu PS. *Antipsoriatic activity and cytotoxicity of ethanolic extract of Nigella sativa seeds*. *Pharmacogn Mag*, 2012 Oct-Dec; 8(32): 268-72.
 17. Stahl E. *Analisis obat secara kromatografi dan mikroskopi*. Bandung: Institut Teknologi Bandung; 1985.
 18. Gunawan IWG, Gede Bawa IGA, Sutrisnayanti. *Isolasi dan identifikasi senyawa terpenoid yang aktif antibakteri pada herba meniran (Phyllanthus niruri Linn)*. *Jurnal Kimia*. 2008; 2(1): 31-9.
 19. Departemen Kesehatan RI. *Materia medika indonesia jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1989.
 20. Velho-Pereira RM, Barhate CR, Kurkarni SR, Jagtap AG. *Validated high-performance thin-layer chromatographic method for the quantification of thymoquinone in nigella sativa extracts and formulations*. *Phytochem Anal*. 2011 Jul-Aug; 22(4): 367-73.
 21. Paul S, Bhattacharyya SS, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR. *Anticancer potentials of root extract of polygala senega and its PLGA nanoparticles-encapsulated form*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 13.
 22. Basha LI, Rashed MS, Aboul-Enein HY. *TLC assay of thymoquinone in black seed oil (nigella sativa linn) and identification of dithymoquinone and thymol*. *J Liq Chromatogr*. 1965; 18(1): 105-15.
 23. Hapsari BW, Mujamilah, Kurniawati M, Sulungbudi GT. *Sintesis nanosfer berbasis ferrofluid dan poly-lactic acid dengan metode sonikasi*. *Jurnal Sains Materi Indonesia*. 2007; 11(2): 139-44.
 24. Cooper, Harirforoosh. *Design and optimization of plga-based diclofenac loaded nanoparticles*. *PLOS ONE*. 2014; 9(1): 1-10.
 25. Song KC, Lee HS, Choung IY, Cho KI, Ahn Y, Choi EJ. *The Effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) nanoparticles*. *Colloids and Surface*. 2006: 162-7.
 26. Plomgard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK. *Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of akt substrate 160 phosphorylation*. *Diabetes*. 2005; 54: 2939-45.
 27. Werner ED, Lee J, Hansen L, Yuan M, Shoelson SE. *Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302*. *J Biol Chem*. 2004 Aug; 279(34): 35298-305.
 28. Chinedu AA, Alani SO, Olaide AO. *Effect of the ethanolic leaf extract of moringa oleifera on insulin resistance in streptozocin induced diabetic rats*. *Journal of Plant Sciences*, 2014; 2(6-1): 5-12.
 29. Sultan MT, Butt MS, Karim R, Iqbal SZ, Ahmad S, Zia-Ul-Haq M, et al. *Effect of Nigella sativa fixed and essential oils on antioxidant status, hepatic enzymes, and immunity in streptozotocin induced diabetes mellitus*. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Jun; 14: 1-7.