

***Utilization of Fig Leaves Extract (*Ficus carica* L.)
Based on Liposome Nanotechnology as an Antihyperglycemia Treatment***

**Pemanfaatan Ekstrak Daun Tin (*Ficus carica* L.) Berbasis
Nanoteknologi Liposom Sebagai Pengobatan Antihiperqlikemia**

**Bambang Hernawan Nugroho^{a,b*}, Aldia Dwi Karina Ningrum^a, Denox Asih
Pertiwi^a, Tasya Salsabila^a, Yandi Syukri^{a,b}**

^aJurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Islam Indonesia, Jl. Kaliurang Km 14.5

^bNanopharmacy Research Center, Universitas Islam Indonesia, Jl. Kaliurang Km 14.5

*Corresponding author: bambang.hernawan@uii.ac.id

Abstract

*The content of flavonoid in fig leaves extract (*Ficus carica* L.) has antidiabetic activity. However, it has low solubility and absorption that increased by liposome. This study aims to determine the effectiveness of fig leaves extract liposome as an antihyperglycemia against decreasing fasting blood glucose level of zebrafish. Fig leaves extract is standardized based on nonspecific parameters then formulated into liposome using a combination of Lipoid S 100, Lipoid DMPG-Na and Cholesterol. Characterization was done through visual observation, stability test, Particle Size Analyzer (PSA), and morphology test with Transmission Electron Microscope (TEM). The antihyperglycemia test consisted of three groups with each group used 7 zebrafish which were selected randomly. The negative control, positive control, and treatment group was given Aloxan on the first day and 1% glucose for 7 days. On the 7th day, the positive control group was given Metformin, while the treatment group was given liposome. Zebrafish was checked with a glucometer (Autocheck®). The 5th formula met the criteria for a good liposome preparation with characteristics of color was milky white, particle size 116.17 ± 4.40 nm; PI 0.439 ± 0.01 ; zeta potential 18.53 ± 0.41 mV; stable for 24 hours; with the morphology of round, elongated, and irregular shapes. The liposome of fig leaves extract was proven to be able to reduce fasting blood glucose level of zebrafish by 62.09%. It can be concluded that fig leaves extract liposome has the potential as an alternative treatment for antihyperglycemia.*

Keywords: Hyperglycemia, Fig Leaves Extract, Liposome, Zebra Fish

Abstrak

Kandungan flavonoid dalam ekstrak daun tin (*Ficus carica* L.) memiliki aktifitas anti diabetes. Namun, ekstrak daun tin memiliki kelarutan dan absorpsi yang rendah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas liposom ekstrak daun tin sebagai antihiperqlikemia terhadap kadar glukosa darah puasa ikan zebra. Ekstrak daun tin distandarisasi berdasarkan parameter nonspesifik kemudian diformulasikan ke dalam liposom. Selanjutnya dilakukan karakterisasi melalui pengamatan terbentuknya liposom secara visual, pembacaan ukuran partikel dengan Particle Size Analyzer (PSA), uji stabilitas, dan Transmission Electron Myroscope (TEM). Uji antihiperqlikemia terdiri dari tiga kelompok dan dipilih secara acak. Kelompok kontrol negatif, positif, dan perlakuan diberi Aloksan pada hari pertama dan glukosa 1%. Pada hari ke-7, kelompok kontrol positif diberi Metformin, sedangkan kelompok perlakuan diberi liposom. Ikan zebra diperiksa kadar gula darah puasa dengan glucometer. Formula ke-5 dengan waktu ultrasonikasi selama 8 menit telah memenuhi kriteria sediaan liposom yang baik dengan karakteristik warna putih susu, ukuran partikel $116,17 \pm 4,40$ nm; PI $0,439 \pm 0,01$; zeta potensial $-18,53 \pm 0,41$ mV; stabil selama 24 jam; dengan morfologi bentuk bulat, memanjang, dan tidak beraturan. Liposom ekstrak daun tin terbukti mampu menurunkan kadar glukosa darah puasa ikan

zebra sebesar 62,09%. Dapat disimpulkan bahwa liposom ekstrak daun tin berpotensi sebagai alternatif pengobatan antihiperlikemia.

Kata kunci: P Hiperlikemia, Ekstrak Daun Tin, Liposom, Ikan Zebra

Pendahuluan

Diabetes Mellitus (DM) merupakan sekumpulan gejala yang timbul pada seseorang, ditandai dengan kadar glukosa darah yang melebihi nilai normal (hiperlikemia) akibat tubuh kekurangan insulin baik absolut maupun relatif. Menurut laporan terakhir dari International Diabetes Federation (IDF) tahun 2003 penderita DM telah meningkat secara mengkhawatirkan. Prevalensi DM di Indonesia sekitar 1,2% sampai 2,3% dari jumlah penduduk berusia di atas 15 tahun (Dalimartha, 2003).

Liposom adalah salah satu bidang ilmiah yang paling cepat berkembang karena berkontribusi pada pengiriman kosmetik, makanan dan obat-obatan, serta mempelajari struktur dan fungsi membran biologis dan asal usul kehidupan. Istilah nanoliposome baru-baru ini diperkenalkan untuk secara eksklusif mengacu pada liposida nano liposida. sementara liposom mengacu pada vesikula lipid dengan kisaran diameter dari sekitar 20 nm hingga beberapa mikrometer. Nanoliposom memiliki fisik yang sama, struktur, termodinamika pembuatan properti dan

mekanisme pembentukan sebagai liposom. Mekanisme yang mendasari pembentukan liposom dan nanoliposom pada dasarnya adalah interaksi hidrofilik-hidrofobik antara fosfolipid dan molekul air. Vesikula yang disiapkan dalam rentang ukuran nanometrik dapat berakhir menjadi partikel mikrometrik pada penyimpanan karena agregasi. Namun, nanoliposome harus memiliki stabilitas yang cukup untuk mempertahankan ukurannya dan dapat didefinisikan sebagai 'bilayer lipid vesicles yang memiliki dan mempertahankan kisaran ukuran nanometer selama penyimpanan dan aplikasi'. Terapi yang ditargetkan juga dapat dicapai secara efisien melalui liposom dan nanoliposomes menggunakan mekanisme penargetan pasif atau aktif (Khosravi-Darani *et al.*, 2010).

Tin (*Ficus carica* L.) mengandung beberapa unsur diantaranya protein (67,6%), lemak (4,3%), serat (1,7%), abu total (4,7%), senyawa bebas nitrogen (5,3%), pentosa (16,4%); karoten (3,6%), bergaptena, stigmasterol, sitosterol, dan tirosin. Pada penelitian sebelumnya bahwa pemberian 70%

ekstrak metanol daun tin (*Ficus carica* L.) menghasilkan efek protektif terhadap pengobatan diabetes yang sudah diisolasi hal ini disebabkan karena kandungan antioksidan dan beberapa senyawa flavonoid dan fenolik dalam ekstrak (Allahyari *et al.*, 2014). Namun, ekstrak daun tin memiliki kelarutan yang rendah di dalam air dan kurangnya kemampuan permeabilitas menembus *barrier* absorpsi yang dapat mempengaruhi bioavailabilitas senyawa flavonoid di dalam tubuh. Oleh karena itu, perlu diformulasikan dalam sediaan liposom yang merupakan salah satu pembawa yang baik serta dapat meningkatkan kelarutan dan penetrasi senyawa yang dibawanya. Keterbaruan dari penelitian ini adalah mengembangkan suatu metode uji antihiperqlikemia menggunakan hewan uji ikan zebra dari sediaan nano liposom daun tin.

Metode Penelitian

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung sejak April hingga Agustus (lima bulan) di Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Hewan Uji Unit Riset *Zebra Fish* (Farmakologi) Universitas Islam Indonesia.

Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas (batang pengaduk, kaca arloji, beaker gelas, gelas ukur, sendok penyusut), mikropipet 500-1000 μ L, timbangan analitik (Metler Toledo), *Rotary evaporator* (Heidolph), *Transmission Electron Microscopy* (JEM 1400, JEOL), *Particle Size and Zeta potential* (Horiba SZ 100), pH meter (Horiba), *cabinet dryer*, *furnace* (thermolyne, thermos scientific), piknometer (pyrex), spektrofotometri serapan atom (PerkinElmer, PnAAcle 900T), dan oven (Mettler).

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun tin yang diperoleh dari Sidokarto, Yogyakarta, aquadestilata (Ikapharmindo), aloksan (Sigma Aldrich), Lipoid S 100 90, Lipoid DMPG-Na, kolesterol (Sigma Aldrich), blue tip, mikrotube, glukosa (Sigma Aldrich), metformin (Sigma Aldrich), NaCl (Sigma Aldrich), methanol (Merck), kloroform (Merck), dan PBS (*Phosfat Buffer Saline*) (Merck).

Tahapan Penelitian

Determinasi Tanaman Tin

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tin varietas *Green Jordan* yang didapatkan dari Sidokarto, Yogyakarta yang dideterminasi di Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Standarisasi Parameter Nonspesifik

Ekstraksi daun tin digunakan metode maserasi, sebelumnya daun tin dipanaskan menggunakan oven pada suhu 80° C selama 2-3 hari daun tin yang kering dibuat dalam bentuk serbuk dengan bantuan grinder. Serbuk daun tin ditimbang ±50 g direndam menggunakan konsistensi sampai 300 mL. Ambil filtrat dengan bantuan kertas saring, pisahkan filtrat dengan residu. Residu di maserasi ulang dengan akuades selama 1 hari, filtrat disaring dengan kertas saring. Filtrat awal dan filtrat akhir digabungkan, kemudian dilakukan *rotary evaporator* pada suhu 60° C dengan kecepatan 60 rpm, serta tekanan yang digunakan sebesar 73-74 mBar. *Rotary evaporator* digunakan sampai ekstrak menjadi kental dibutuhkan waktu sekitar 2 jam. Ekstrak kental kemudian distandarisasi non spesifik.

Susut Pengerinan

Ditara botol timbang dangkal yang sudah dipanaskan selama 30 menit pada suhu 105° C ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak ±1 g sebelum ditimbang ekstrak diratakan dalam bobot timbang hingga ketebalan mencapai 5 mm sampai 10 mm dengan bantuan batang pengaduk. Kemudian dimasukkan bobot timbang yang berisi ekstrak kedalam oven, dikeringkan pada suhu 105° C hingga bobot tetap dengan membuka tutup bobot timbang. Dilakukan replikasi 3 kali (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008). Rumus susut pengeringan dinyatakan dalam %b/b sebagai berikut:

$$\% \text{ susut pengeringan} = \frac{(\text{bobot awal} - \text{bobot akhir})}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

Bobot Jenis

Digunakan piknometer yang bersih dan kering, timbang piknometer kosong serta piknometer yang berisikan aquadest yang sudah dididihkan pada suhu 25° C Ekstrak cair 5% dimasukkan kedalam piknometer dan diatur suhunya hingga 25° C kemudian ditetapkan bobotnya. Dilakukan replikasi 3 kali (1). Tentukan Bobot jenis ekstrak cair dengan menggunakan rumus:

$$BJ = \frac{(\text{Bobot ekstrak} - \text{Bobot piknometer kosong})}{(\text{Bobot air} - \text{Bobot piknometer kosong})}$$

Kadar Air

Ekstrak ditimbang dengan seksama ± 2 g dimasukkan dalam labu kering, ditambahkan batu didih yang sebelumnya tabung pendingin dan penerima dibersihkan dengan asam pencuci dibilas menggunakan air dan dikeringkan. Selanjutnya masukkan 200 mL toluene jenuh air ke dalam labu kering, kemudian rangkai alat destilasi. Panaskan labu dengan hati-hati selama ± 15 menit. Setelah toluene mendidih atur kecepatan aliran kurang lebih 2 tetes per detik, dinaikkan kecepatan aliran perlahan-lahan hingga mencapai 4 tetes per detik. Setelah semua tersuling bagian tabung pendingin dicuci dengan toluene jenuh air, dilanjutkan dengan penyulingan selama 5 menit. Dibaca volume air setelah air dan toluene memisah secara sempurna (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008) Dilakukan pengujian kadar air menggunakan destilasi toluene sebanyak 3x. Rumus kadar air dinyatakan dalam % b/v sebagai berikut:

$$\%Kadar\ air = \frac{\text{Volume air (mL)}}{\text{Bobot sampel (g)}} \times 100\%$$

Kadar Abu Tidak Larut Asam

Ekstrak ditimbang dengan seksama sebanyak ± 2 g, digerus lalu dimasukkan dalam krus silikat yang sudah ditara serta dipijarkan. Dipijarkan secara perlahan-lahan hingga tidak abu. Abu yang diperoleh dilarutkan dengan asam klorida P, dididih selama 5 menit. Ambil bagian yang tidak larut asam, disaring dengan kertas saring bebas abu, dicuci menggunakan air panas, dipijarkan, lalu timbang bobot tetap yang dinyatakan dalam % b/b. Dilakukan replikasi 3 kali (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008). Rumus kadar

$$\%Kadar\ abu\ tidak\ larut\ asam = \frac{\text{Bobot abu tidak larut asam}}{\text{Bobot Ekstrak}} \times 100\%$$

abu tidak larut asam:

Pembuatan Liposom dengan Metode Hidrasi Lapis Tipis

Daun tin dicuci dan dirajang dengan ukuran seragam ± 6 cm, kemudian dilakukan pengeringan (diangin-anginkan) sampai cukup layu. Setelah cukup layu, dilakukan penimbangan 10 gram daun tin yang sudah diangin-anginkan. Daun tin yang telah layu kemudian di maserasi menggunakan 100 mL *aqua pro injection* hangat selama 24 jam.

Semua bahan pada campuran A yang terdiri dari lipoid S 100 95%, lipoid DMPG-Na 5%, dan kolesterol dimasukkan ke dalam labu alas bulat

rotary evaporator (Heidolph), dipanaskan sampai suhu 50⁰ C dengan tekanan 200 mBar selama 1 jam. Lakukan sampai terbentuk lapisan tipis pada dinding labu alas bulat, kemudian masukkan campuran B yang terdiri dari metanol dan kloroform, ekstrak, dan PBS ke dalam labu alas bulat. Diambil hasil injeksi, lalu dilakukan *down sizing* dengan menggunakan ultrasonik. Variasikan waktu yang diperlukan dan catat perubahan ukuran partikel. Selanjutnya dimurnikan dengan kolom PD 10 dan tampung ke dalam wadah untuk dianalisis dengan *Particle Size Analyzer* (PSA). Formulasi liposom dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Formulasi Nanoliposom Daun Tin

Nama Bahan	Formulasi
Lipoid S 100	95 %
Lipoid DMPG-Na	5%
Kolesterol	5%
Ekstrak daun tin	10%
Metanol	5 mL
Kloroform	5mL
PBS	10 mL

Uji Morfologi Nanoliposom

Morfologi karakteristik dan ukuran liposom dievaluasi dengan TEM (*Transmission Electron Microscopy*). Sampel liposom diencerkan dengan

pengenceran 20x dan 50x, lalu ditetaskan sampel pada *formvar coated cumprum grid* sebanyak satu tetes dan dikeringkan pada suhu ruang, setelah kering dianalisa dengan TEM. Sampel dimasukkan ke dalam wadah dan dianalisis pada suhu 25°C.

Pembacaan Ukuran Partikel dan Zeta Potensial

Pengukuran ukuran partikel dan zeta potensial dilakukan dengan menggunakan *partikel size analyzer* (Horiba SZ 100), sampel dimasukan kedalam kuvet setelah dilakukan pengenceran 100x.

Stabilitas dari sediaan liposom dievaluasi secara organoleptis berupa perubahan warna dan terbentuknya partikulat yang terdispersi kedalam cairan pembawa PBS.

Uji Antihiperglikemia dengan Zebra fish

Ikan zebra yang digunakan adalah ikan dewasa jantan dan betina yang dipilih secara acak dengan umur 4-6 bulan, dipelihara setidaknya satu minggu sebelum dilakukan percobaan. Ikan diletakkan dalam akuarium dengan suhu 28±2 °C setiap kelompok berjumlah 7 ikan dalam 2 L air. Diperhatikan filtrasi air dan dipelihara di bawah siklus fotoperiod (14 jam cahaya, dan 10 jam gelap) (Capiotti et al., 2014). Ikan diberi makan dua kali sehari dengan makanan

ikan Tetramin Flakes. Diperhatikan parameter kualitas air berupa suhu ($28 \pm 2^\circ \text{C}$, pH (± 7), kadar nitrat (NO_3^-) dan kadar oksigen yang dipertahankan oleh adanya proses aerasi pada aquarium. Masing-masing kelompok terdiri dari 7 ikan jantan dan betina. Semua kelompok diberikan induksi hiperglikemia, yang terdiri dari kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif (pemberian Metformin $100 \mu\text{M}$), dan kelompok perlakuan (nanoliposom daun tin 200 mg). Pada hari pertama aloksan ditimbang sebanyak 300 mg lalu dilarutkan ke dalam $\text{NaCl } 0,45 \%$ sebanyak 100 mL . Ikan direndam dalam larutan aloksan selama 1 jam lalu dipindah ke dalam larutan glukosa selama 24 jam. Larutan glukosa 1% dibuat dengan melarutkan D-glukosa anhidrat sebanyak 20 gram ke dalam 2 L air segar. Pada hari ke-7, kelompok kontrol positif diberikan Metformin dan kelompok perlakuan diberikan nanoliposom daun tin $200 \text{ mg} / 2 \text{ L}$. Ikan zebra dipuasakan selama 24 jam lalu diukur kadar glukosa darahnya.

Sebelum pengambilan darah, ikan dianestesi dengan air es selama ± 10 detik, kemudian diambil darahnya dengan cara dekapitasi di bagian belakang kepala ikan. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar glukosa

darah puasa menggunakan alat glukometer (Autocheck®). Setelah dilakukan pengukuran KGD pada masing-masing ikan, dilakukan perhitungan persentase penurunan KGD pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan terhadap kontrol negatif dengan menggunakan persamaan sebagai berikut.

$$\% \text{ penurunan KGD} = \frac{\text{KGD kontrol negatif} - \text{KGD perlakuan}}{\text{KGD kontrol negatif}} \times 100$$

Hasil dan Pembahasan

Hasil Standarisasi Parameter Nonspesifik Ekstrak Daun Tin

Parameter Susut Pengerinan

Susut pengerinan merupakan berat konstan suatu sampel yang telah dipanaskan pada temperature 105°C selama 30 menit, yang dinyatakan dalam persen. Tujuan susut pengerinan ialah diperoleh batasan maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang setelah proses pengerinan (DepKes, 2000). Selain itu, susut pengerinan berfungsi untuk menjaga mutu ekstrak dan terhindar dari pertumbuhan jamur (Hidayati *et al.*, 2018). Hasil pengujian susut pengerinan pada ekstrak daun tin yaitu $26,102 \pm 1,408\%$. Hasil ini menunjukkan telah memenuhi kriteria yang telah ditetapkan yakni tidak melebihi $30,91\%$ (Utami *et al.*, 2016).

Parameter Bobot Jenis

Bobot jenis (B_j) adalah sampel yang dinyatakan dalam b/v berdasarkan suhu ruangan (25°C) dengan bantuan alat piknometer atau yang lain. Tujuan bobot jenis untuk mengetahui batasan maksimal besaran ekstrak kenal atau cair yang masih dapat dituang serta mengetahui gambaran senyawa zat terlarut (DepKes, 2000). Bobot jenis dapat mencerminkan kemurnian ekstrak dari kontaminasi. Bobot jenis pada ekstrak daun tin yaitu $1,001 \pm 0,007 \text{ g/cm}^3$.

Penetapan Kadar Air

Tujuan pengukuran kadar air yaitu memberikan batasan minimal kandungan air dalam suatu ekstrak (1). Hasil penetapan kadar air pada ekstrak daun tin yaitu $9,625 \pm 0,57\%$, artinya telah memenuhi persyaratan kadar air dalam ekstrak yakni tidak lebih dari 10% (BPOM, 2014). Pengujian kadar air ekstrak daun tin dilakukan menggunakan metode destilasi toluene. Prinsip metode destilasi toluene yaitu memisahkan 2 senyawa atau lebih yang sulit dipisahkan dengan menggunakan tekanan yang tinggi serta menggunakan pelarut yang dapat menarik air namun tidak bercampur dengan air (karena perbedaan polaritas, air bersifat polar sedangkan

toluene bersifat non polar serta B_j air 1 g/cm^3 sedangkan B_j toluene $0,87 \text{ g/cm}^3$, air dalam ekstrak akan dibawa oleh pelarut hingga mencapai titik didih (tekanan uap cairan sama dengan tekanan uap atmosfer) dalam bentuk uap kemudian dilakukan pendinginan akan berubah menjadi tetesan air (Suharti, *et al.*, 2017).

Kadar Abu Tidak Larut Asam

Kadar abu tidak larut asam menandakan adanya kontaminasi mineral atau logam yang tidak larut asam dalam suatu produk (Guntarti, *et al.*, 2015). Pada saat pencucian yang tidak bersih memungkinkan masih adanya pasir atau pengotor lainnya. Komponen penyusun tidak larut asam misalnya pasir ataupun tanah merupakan senyawa silikat yang tidak terbakar dan tidak larut dalam asam. Kandungan abu yang tidak larut asam pada ekstrak daun tin yaitu $1,356 \pm 0,116\%$, menunjukkan tidak melebihi batas maksimum yaitu 4.5 % sesuai dengan persyaratan Materia Medika Indonesia (MMI) (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989). Secara keseluruhan, data hasil standarisasi parameter nonspesifik dapat dilihat pada Tabel 2. Parameter yang digunakan adalah susut pengeringan dari ekstrak, berat jenis ekstrak, kadar air dan kadar abu tidak larut, ekstrak daun tin

memenuhi standar non spesifik yang telah ditentukan

Tabel 2. Data Hasil Standarisasi Parameter Nonspesifik

No	Parameter	Hasil Standarisasi Ekstrak ($\bar{x} \pm SD$)	Acuan (Referensi)
1	Susut Pengerangan (%)	26,102 ± 1,408	Tidak lebih dari 30,91% (Utami <i>et al.</i> , 2016)
2	Berat Jenis (g/cm ³)	1,001 ± 0,007	-
3	Kadar Air (%)	9,625 ± 0,57	Tidak lebih dari 10% (BPOM, 2014)
4	Kadar Abu Tidak Larut Asam (%)	1,356 ± 0,116	Tidak lebih dari 4,5% (DepKes, 1989)

Pengamatan Visualisasi Nanoliposom Ekstrak Daun Tin

Pengamatan visualisasi dilakukan pada saat penguapan campuran yang dilakukan pada *rotary evaporator* dihasilkan lapisan tipis pada labu alas bulat, ditambahkan *Phosphate Buffered Saline* (PBS), dihasilkan warna seperti susu bentuk kental dan keruh

Formulasi Nanoliposom, Karakterisasi dan Stabilitas Fisik

Formula nanoliposom yang baik menunjukkan terjadinya perubahan warna dan kesesuaiannya dengan karakterisasi nanopartikel.

Tabel 3. Optimasi dan pemilihan formula berdasarkan waktu sonikasi terhadap ukuran partikel dan nilai indeks polidispersi nanoliposom ekstrak daun tin (n = 3)

Waktu sonikasi (menit)	Ukuran Partikel (nm±SD)	PI (Đ±SD)
0	639,43 ± 156,56	1,665 ± 0,40
2	225,73 ± 11,81	0,564 ± 0,03
4	152,3 ± 3,51	0,441 ± 0,06
6	133,13 ± 1,10	0,324 ± 0,04
8	116,17 ± 4,40	0,439 ± 0,01

Ekstrak daun tin yang digunakan untuk pembuatan nanoliposom sebesar 10%. Ukuran partikel nanoliposom yang baik yakni 100 nm – 150 nm, sedangkan PI (*Polidispersity Index*) yang baik ialah < 0,7 Đ, PI diujikan untuk mengetahui homogenitas larutan, semakin kecil PI maka homogenitas semakin baik. Hal ini menunjukkan bahwa formulasi yang digunakan adalah formula dengan waktu sonikasi 8 menit, karena memiliki ukuran partikel 116,17 ± 4,40 nm dan PI

0,439 ± 0,01 D setelah disonikasi selama 8 menit. Optimasi formula berdasarkan waktu sonikasi terhadap ukuran partikel dan nilai PI dapat dilihat pada Tabel 3.

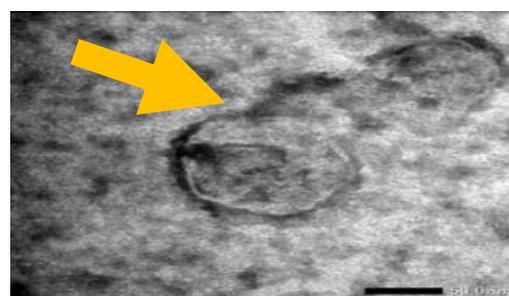
Zeta potensial memberikan gambaran gaya tolakan antar partikel dan menyebabkan semakin besar potensial zeta maka sistem dispersi akan semakin stabil. Zeta potensial yang dihasilkan pada waktu sonikasi 6 menit sebesar -15,73 ± 0,85 mV sedangkan pada waktu sonikasi 8 menit sebesar -18,53 ± 0,41 mV. Hal ini menunjukkan bahwa pada waktu sonikasi 8 menit, formula menjadi lebih stabil dibandingkan dengan waktu sonikasi selama 6 menit.

Zeta potensial menggambarkan perbedaan potensial lapisan yang mengikat kuat pada sediaan yang berhubungan dengan stabilitas dispersi koloid. Nilai zeta potensial yang stabil berkisar ± 30 mV dan nilai minimum yang dapat diterima yaitu ± 20 mV. Nilai negatif menunjukkan adanya asam lemak bebas pada sediaan sehingga terjadi penolakan yang cukup besar antar tetesan untuk bergabung yang menyebabkan sistem emulsi menjadi stabil (Makhmalzadeh, *et al.*, 2012). Muatan permukaan pada nanopartikel obat akan menentukan efisiensi *drug loading* obat. Baik muatan positif maupun negatif dapat meningkatkan

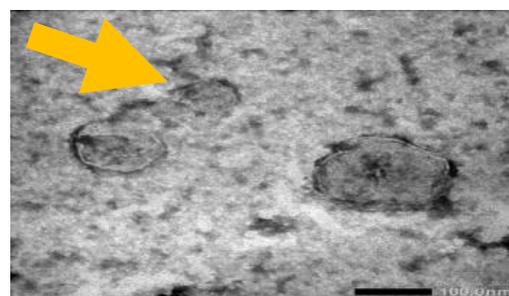
pengantaran liposom ke sel, namun beberapa studi mengungkapkan muatan positif dapat meningkatkan efek toksik.



(a)



(b)



(c)

Gambar 1. Hasil TEM liposom ekstrak daun tin dengan skala 20 nm (a), 50 (b) nm dan 100 nm (c)

Proses pembuatan liposom dapat berpengaruh terhadap bentuk dan lapisan fosolipid yang terbentuk, antara lain bentuk multi layer dan single layer, proses pembuatan dengan hidrasi lapis tipis menggunakan rotary evaporator pada penelitian ini diperoleh liposom

dengan ukuran berkisar 100 nm dengan lapisan tipis tunggal fosfolipid seperti pada Gambar 1, terbentuk partikel liposom dengan ukuran nano dengan bentuk sferis.

Muatan negatif dapat memberikan *entrapment* obat yang lebih rendah tapi nanopartikel bermuatan negatif menunjukkan lebih lama bertahan di dalam darah dan keluar menuju jaringan lebih lambat (Honary and Zahir, 2013). Observasi visual nanopartikel liposom ekstrak daun tin dilakukan dengan mengamati perubahan warna formula yang terjadi pada waktu ke 0 sampai 24 jam. Observasi visual nanopartikel bertujuan untuk mengetahui pembentukan nanopartikel lipoid secara kualitatif dengan adanya perubahan warna. Sampel yang sudah terbentuk menjadi nanopartikel liposom akan mengalami perubahan warna dari larutan bening kecoklatan berubah warna menjadi putih susu hal ini disebabkan karena terjadinya perubahan waktu yang terbantu pada waktu ke 0 setelah dilakukan uji stabilitas selama 24 jam warna dari nanopartikel lipoid ekstrak daun tin tidak berubah dan tidak terjadi agregasi.

Hasil Uji Antihiperglikemia

Uji pendahuluan dilakukan untuk memastikan metode induksi

hiperglikemia yang digunakan sudah tepat. Larutan dengan kadar Glukosa tinggi yang diinduksi pada ikan zebra dapat merangsang sekresi insulin, secara negatif mengatur enzim marker yang membatasi glukoneogenesis, yaitu *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK), meningkatkan kadar kortisol, serta menginduksi ekspresi VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Aloksan yang diinduksi pada ikan zebra secara cepat mencapai pankreas dan diambil oleh sel β langerhans (Shin, *et al.*, 2012). Aloksan mengalami siklus redoks untuk membangkitkan radikal superoksida dan merusak pankreas. Adanya induksi aloksan dan glukosa pada ikan zebra menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam mitokondria. Peningkatan ROS mengakibatkan kerusakan oksidatif berupa berbagai komplikasi diabetes dan meningkatkan pembentukan ekspresi *Tumour necrosis factor- α* (TNF- α) yang memperparah stres oksidatif dan mengakibatkan resistensi insulin (Widowati, 2008).

Pemberian glukosa 1% selama 7 hari mampu mempertahankan Kadar Gula Darah (KGD) ikan dalam kondisi hiperglikemia dan menghindari efek toksik dari induksi glukosa yang terlalu lama. Penggantian air induksi dilakukan

untuk mengurangi kekeruhan air dan dilakukan sebanyak dua hari sekali untuk menghindari penggantian air yang terlalu sering yang dapat menyebabkan stres pada ikan. Pada hari ke-7 dilakukan pengambilan darah untuk mengetahui kadar gula darah pada masing-masing kelompok. Hasil induksi hiperglikemia menunjukkan rata-rata kadar glukosa darah puasa ikan di hari ke-7 pada kelompok negatif, yaitu $122,83 \pm 25,19$ mg/dL. Ikan zebra dewasa memiliki kadar glukosa darah (KGD) normal sekitar 50-70 mg/dL, jumlah ini cukup dekat dengan KGD normal manusia (100 mg/dL) dan glukosa secara dinamis diatur saat puasa atau makan (Jörgenz, *et al.*, 2012). Hal ini menunjukkan bahwa induksi Aloksan dosis 300 mg/100 mL NaCl 0,45% dan Glukosa 1% berhasil membuat ikan menjadi diabetes yang ditunjukkan dari kadar glukosa darah puasa rata-rata ikan pada kelompok negatif sebesar 122,83 mg/dL.

Pada penelitian ini, ekstrak daun tin diformulasikan ke dalam liposom dengan konsentrasi 1000 mg/mL (1000 mg dalam 1mL pembawa). Konsentrasi yang digunakan cukup pekat untuk menghindari penggunaan komponen bahan yang tinggi pada sediaan liposom yang dapat memberikan efek toksik pada ikan. Sediaan liposom ekstrak daun tin

dosis 200 mg/2L diberikan pada kelompok perlakuan hari ke-7 selama 12 jam diikuti dengan larutan glukosa pada 12 jam berikutnya. Kelompok kontrol positif diberikan Metformin $100\mu\text{M}$ selama 4 jam pada hari ke-7 diikuti dengan larutan glukosa pada 20 jam berikutnya. Kontrol positif berfungsi sebagai pengontrol uji yang dilakukan dan memastikan metode yang digunakan baik.

Setelah diberikan perlakuan pada masing-masing kelompok selama 7 hari, ikan zebra dicek Kadar Gula Darah Puasa (KGDP) dan dilakukan analisis data. Rata-rata KGDP pada kelompok kontrol positif (Metformin $100\mu\text{M}$), yaitu $69,33 \pm 11,20$ mg/dL, memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) dengan kontrol negatif (induksi Aloksan 300mg/100 mL + Glukosa 1%). Hal ini membuktikan bahwa metode uji yang digunakan telah cukup baik. Metformin mempengaruhi regulasi pengambilan glukosa, glukoneogenesis, glikolisis dan sintesis glikogen sehingga obat ini sering direkomendasikan sebagai obat lini pertama pada pasien diabetes tipe 2.

Kelompok perlakuan dosis 200 mg/2 L liposom selama 12 jam memiliki rata-rata KGDP sebesar $74,66 \pm 19,36$ mg/dL. Artinya, pemberian liposom ekstrak daun tin dengan dosis 200 mg/2L

mampu menurunkan kadar gula darah puasa (KGDP) pada ikan hiperglikemia. Efektivitas liposom ekstrak daun tin sebagai antihiperglikemia dibandingkan dengan Metformin yang merupakan obat konvensional. Dari hasil tersebut, diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) antara Metformin dengan liposom ekstrak daun tin dosis 200 mg/2 L. Hal ini menunjukkan efektivitas liposom ekstrak daun tin cukup baik dan dapat digunakan sebagai alternatif antihiperglikemia. Persentase penurunan KGDP ikan zebra dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Persentase penurunan KGDP (Kadar Gula Darah Puasa) ikan zebra dibandingkan dengan kontrol negatif

Kelompok	(mg/dL)	
	Rerata KGDP (mg/dL) \pm SD	Penurunan KGDP (%)
Metformin 100 μ M	69,33 \pm 11,20	43,55
Liposom (Daun tin 200 mg/2L)	74,66 \pm 19,36	39,21

Kesimpulan

Formula nanoliposom yang digunakan dengan waktu sonikasi selama 8 menit telah memenuhi kriteria sediaan liposom yang baik dengan karakteristik warna putih susu, ukuran partikel $116,17 \pm 4,40$ nm PI $0,439 \pm 0,01$; zeta potensial $-18,53 \pm 0,41$ mV stabil selama 24 jam; dengan morfologi bentuk bulat, memanjang, dan tidak beraturan. Liposom ekstrak daun tin terbukti mampu menurunkan kadar glukosa darah puasa ikan zebra sebesar 39,21%. Dapat disimpulkan bahwa liposom ekstrak daun tin berpotensi sebagai alternatif pengobatan antihiperglikemia.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada Kemenristekdikti yang telah memberikan pendanaan untuk penelitian, Lipoid GmbH Jerman atas bantuan bahan penelitian fosfolipid, Jurusan Farmasi dan pusat penelitian Nanofarmasi Universitas Islam Indonesia yang sudah menunjang sarana dan prasarana penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Allahyari, S., Delazar, A. and Najafi, M., 2014. Evaluation of general toxicity, anti-oxidant activity and effects of *Ficus carica* leaves extract on ischemia/reperfusion injuries in isolated heart of rat. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(Suppl 2), p.577.
- BPOM, 2014. Peraturan Kepala BPOM RI Nomor 12 tahun 2014 tentang *Persyaratan Mutu Obat Tradisional*. BPOM. Jakarta.
- Capiotti KM, Junior RA, Denise C, Souza R, Silva D. 2014. Persistent Impaired Glucose Metabolism in A Zebrafish Hyperglycemia Model. *Comp Biochem Physiol Part B; Sci*;171:58–65.
- Dalimartha S. 2003. *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Diabetes Mellitus*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989. *Materia Medika Indonesia, 5th ed.* Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat dan Makanan, 1st ed.* Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008. *Farmakope Herbal Indonesia, 1st ed.* Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Guntarti, Any, et al., 2015. Penentuan Parameter Non Spesifik Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis pada Variasi Asal Daerah. *FARMASISAINS*, 2(5).
- Honary, S, Zahir F. 2013. Effect of Zeta Potential on the Properties of NanoDrug Delivery System – A Review (Part 2). *Tropical J of Pharm Res*; 12(2): 26.
- Jörgens K, Hillebrands JL, Hammes HP, Kroll J. 2012. Zebrafish: a Model for Understanding Diabetic Complications. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*. Apr;120(04):186-7.
- Khosravi-Darani, K., & Mozafari, M. R. (2010). Nanoliposome potentials in nanotherapy: A concise overview. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(1), 3-13.
- Makhmalzadeh BS, Torabi S, Azarpanah A. 2012. Optimization of Ibuprofen Delivery through Rat Skin From Traditional and Novel Nanoemulsion Formulations. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*;11(1):47.
- Shin, E., Hong, B.N. and Kang, T.H., 2012. An Optimal Establishment of an Acute Hyperglycemia Zebrafish Model. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(42), pp.2922-2928.
- Suharti, Netty, et al., 2017. Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Etanol Serta Uji Aktivitas Antioksidan Rimpang Jahe Merah yang Diinokulasi Fungi Mikoriza Arbuskula (FMA). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 19(1).
- Widowati, W., 2008. Potensi Antioksidan sebagai Antidiabetes. *Jurnal Kedokteran Maranatha*, 7(2).