

## BAB VI

### PEMBAHASAN

Semua prosedur penelitian sudah dinyatakan laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan FKUB pada tanggal 25 Februari 2015 dengan No. 164 / EC / KEPK / - S1 - FARM / 02 / 2015 yang dapat dilihat pada Lampiran 14.

#### 6.1 Uji Fitokimia Ekstrak Biji Jintan Hitam

Ekstraksi soxhlet 150 gram serbuk biji jintan hitam menggunakan 900 mL pelarut etanol 95% dihasilkan ekstrak cair sebanyak 75,3 gram. Penggunaan pelarut etanol didasarkan atas kemampuannya dalam menarik senyawa yang diinginkan dan keamanannya untuk diberikan pada makhluk hidup (tikus). Metode ekstraksi dengan pemanasan dipilih dengan harapan didapatkan kandungan senyawa *thymoquinone* yang lebih baik dibandingkan tanpa pemanasan. Konsistensi ekstrak yang didapatkan adalah cairan kental dengan warna hitam kecoklatan. Hasil ekstraksi ini sudah sesuai dengan Bashir and Qureshi (2010), yaitu didapatkan ekstrak berupa konsentrat berwarna hitam kecoklatan. Hasil ini agak berbeda karena pada jurnal rujukan digunakan evaporasi dengan vakum.

Biji jintan hitam mengandung senyawa minyak atsiri, alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, dan terpenoid (El-Tahir, 2006; Ahmad *et al.*, 2014; Sultan *et al.*, 2009). Pada penelitian ini zat aktif yang berperan sebagai antidiabetes dan antioksidan adalah *thymoquinone* (Abdelmeguid *et al.*, 2010). Oleh karena itu

dilakukan uji fitokimia kualitatif untuk mengetahui kandungan senyawa tersebut pada ekstrak.

*Thymoquinone* terdapat dalam minyak atsiri sehingga perlu dilakukan uji adanya kandungan minyak atsiri dengan menambahkan pereaksi Sudan III ke dalam ekstrak. Penambahan Sudan III menyebabkan perubahan warna dari kuning kecoklatan menjadi warna merah yang menandakan bahwa ekstrak positif mengandung minyak atsiri. Untuk memastikan adanya kandungan *thymoquinone*, dilakukan uji fitokimia dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam yang digunakan adalah *silica gel*. Eluen yang digunakan mengacu pada Sousa *et al.* (2012) yaitu n-heksan:etil asetat dengan perbandingan 9:1. Didapatkan Rf sebesar 0,77 pada ekstrak dan hasil Rf 0,77 juga didapatkan pada standar *thymoquinone*. Berdasarkan Rashed (1995), *thymoquinone* memiliki Rf 0,77 dengan menggunakan eluen benzena:isopropil eter = 1:1. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak positif mengandung *thymoquinone* walaupun eluen yang digunakan berbeda. Prinsip pemilihan eluen didasarkan atas polaritasnya dalam menarik konstituen. Walaupun eluen yang digunakan berbeda dengan jurnal rujukan, namun polaritasnya kemungkinan sama sehingga menghasilkan Rf dengan nilai yang sama. Pada hasil uji tidak diketahui jumlah *thymoquinone* yang terkandung dalam ekstrak karena tidak dilakukan uji kuantitatif. Untuk memastikannya perlu dilakukan uji kuantitatif menggunakan GC-MS.

Uji alkaloid dilakukan menggunakan 3 pereaksi berbeda yaitu reagen Mayer, reagen Wagner, dan reagen Dragendroff. Dari ketiga pereaksi tersebut penambahan reagen Wagner menunjukkan hasil positif dengan pembentukan endapan berwarna coklat kemerahan. Ion logam  $K^+$  dari KI pada reagen Wagner

akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marliana *et al.*, 2005). Penambahan reagen Mayer tidak menyebabkan pembentukan krim dan reagen Dragendroff tidak menyebabkan endapan kuning atau jingga. Berdasarkan *Materia Medika Indonesia V*, ekstrak dapat dikatakan mengandung alkaloid jika sekurang-kurangnya terbentuk endapan dengan menggunakan 2 pereaksi. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa ekstrak tidak mengandung alkaloid.

Uji saponin dilakukan dengan metode Forth yaitu memasukkan ekstrak ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan air, lalu dikocok selama 10 detik. Hasil uji saponin menunjukkan terbentuknya buih yang stabil setinggi 1 cm selama 10 menit sehingga ekstrak positif mengandung saponin. Timbulnya buih menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lain (Marliana *et al.*, 2005).

Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan 3 macam pereaksi pada ekstrak. Terbentuknya warna kuning pada penambahan amonia encer dan  $H_2SO_4$ , penambahan larutan Al, serta penambahan etil asetat dan amonia encer menandakan bahwa ekstrak positif mengandung flavonoid. Dari hasil uji didapatkan bahwa ekstrak biji jintan hitam mengandung flavonoid dengan hasil positif pada penambahan 3 jenis pereaksi.

Uji tanin dilakukan dengan menambahkan gelatin, NaCl, dan  $FeCl_3$ . Pada uji tanin diperoleh hasil positif dengan terbentuknya endapan berwarna biru kehitaman. Tanin bereaksi dengan gelatin membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air, sehingga adanya tanin pada ekstrak akan mengendapkan

protein pada gelatin. Penambahan NaCl akan meningkatkan penggaraman dari tanin-gelatin (Marliana *et al.*, 2005).

Pada uji terpenoid ekstrak ditambahkan dengan kloroform dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hasilnya terbentuk warna cokelat kemerahan pada permukaan. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak biji jintan hitam positif mengandung terpenoid.

## 6.2 Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji Jintan Hitam

Pembuatan nanopartikel berdasarkan kebutuhan dosis ekstrak untuk 6 ekor tikus (kelompok P2) dengan BB 400 g yang selanjutnya dibuat larutan stok. Dari hasil pembuatan nanopartikel didapatkan perbedaan berat pellet yang diperoleh. Perbedaan hasil ini dikarenakan pada saat ditimbang masih terdapat cairan yang bercampur dengan pellet dan jumlah cairannya tidak dapat diukur. Rerata berat pellet untuk terapi 6 ekor tikus dengan BB 400 g selama 1 hari adalah  $0,20 \pm 0,03$  gram. Berdasarkan perhitungan, nanopartikel dapat diberikan pada tikus dengan BB 400 gram selama 21 hari. Namun, hasil pembuatan nanopartikel tersebut dapat diberikan pada tikus selama 26 hari dikarenakan BB tikus < 400 BB dan cenderung menurun setiap harinya.

Hasil karakterisasi nanopartikel menunjukkan bahwa ukuran nanopartikel yang diamati dalam rentang 41,21-318,00 nm dengan rerata ukuran pada *batch* 1  $146,05 \pm 98,99$  nm, sedangkan *batch* 2 memiliki rerata ukuran  $75,67 \pm 26,90$  nm. Pengamatan ini tidak dapat mencerminkan keseluruhan ukuran nanopartikel dalam sampel. Seharusnya pengamatan menggunakan *Dynamic Light Scattering* yang dapat mengetahui keseluruhan ukuran dan distribusi partikel dalam sampel. Pada sampel ditemukan granul dengan permukaan yang halus dan kasar. Jika diamati secara keseluruhan, sampel mengandung lebih banyak partikel dengan

permukaan halus. Partikel jenis ini tidak dapat diketahui ukurannya dikarenakan distribusi partikelnya yang rapat sehingga pengamatan hanya dilakukan pada granul dengan permukaan kasar.

Ukuran nanopartikel yang bervariasi disebabkan oleh beberapa faktor. Mainardes *and* Evangelista (2005) menyatakan bahwa waktu sonikasi mempengaruhi ukuran dan distribusi partikel. Peningkatan waktu sonikasi menyebabkan penurunan ukuran partikel dan memperlebar distribusi partikel. Pada pembuatan nanopartikel ini tidak dilakukan sonikasi sehingga diperoleh partikel dengan ukuran yang cukup besar dan distribusi partikelnya rapat.

Berdasarkan Cooper *and* Harirforoosh (2014), peningkatan kecepatan sentrifugasi dan penggunaan stabilisator dengan konsentrasi lebih rendah menghasilkan nanopartikel dengan ukuran yang lebih kecil. Stabilisator PVA (*poly (vinyl alcohol)*) dengan konsentrasi 1% menyebabkan agregasi partikel. Molekul surfaktan melapisi antar muka fase organik dan aqueous sehingga menstabilkan emulsi nanodroplet dan mencegah agar partikel tidak menyatu. Oleh karena itu diperlukan stabilisator dengan konsentrasi lebih rendah yaitu molekul surfaktan dengan jumlah minimal yang dibutuhkan untuk menghasilkan ukuran partikel yang kecil. Peningkatan konsentrasi stabilisator menyebabkan peningkatan viskositas fase aqueous sehingga menurunkan *net share stress* menyebabkan pecahnya droplet (Budhian *et al.*, 2007). Oleh karena itu diperkirakan penyebab distribusi partikel yang rapat adalah penggunaan stabilisator yaitu Pluronic F68 dengan konsentrasi 1% pada pembuatan nanopartikel ini.

### 6.3 Induksi DM Tipe 2

Induksi DM tipe 2 pada penelitian ini mengacu pada Srinivasan *et al.* (2005) yaitu injeksi i.p. STZ dosis 35 mg/kg BB yang dikombinasi dengan HFD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 35 mg/kg BB merupakan dosis optimum STZ yang menyebabkan DM tipe 2. Kombinasi HFD dengan STZ dosis rendah menyebabkan DM tipe 2 yang menginduksi resistensi insulin dan gangguan sekresi insulin sedang.

Pada penelitian ini pemberian HFD dilakukan selama 40 hari lalu diinduksi STZ. Pengukuran BB pada hari ke-40 pemberian HFD didapatkan peningkatan BB pada semua tikus dibandingkan sebelum perlakuan. HFD menyebabkan peningkatan BB dikarenakan peningkatan ambilan energi dan penurunan laju metabolisme (Winzell *and* Ahren, 2004). Induksi STZ pada DM menyebabkan penurunan BB pada tikus, polifagi, poliuri dan polidipsi. Penurunan BB disebabkan katabolisme lemak dan protein akibat ketidakmampuan karbohidrat untuk digunakan sebagai sumber energi (Nakhaee *et al.*, 2009). Penurunan BB tikus dapat diamati setiap hari, lalu pada akhir terapi dibandingkan dengan BB tikus sebelum diinduksi DM. Pada akhir terapi diketahui terjadinya penurunan BB tikus dibandingkan sebelum terapi, namun hasilnya masih lebih tinggi jika dibandingkan dengan BB tikus sebelum perlakuan. Polifagi pada tikus diamati dari penurunan jumlah sisa pakan tiap harinya dibandingkan sebelum tikus mengalami DM. Poliuri diamati dari kandang tikus yang lebih cepat lembab dibandingkan sebelum diinduksi STZ. Polidipsi dapat diamati melalui sisa air minum tikus yang berkurang setiap harinya.

Pengukuran GDP dilakukan sebelum perlakuan, setelah pemberian HFD, 3 hari setelah diinduksi STZ, dan setelah pemberian terapi. Pengukuran GDP setelah pemberian HFD selama 40 hari didapatkan peningkatan kadar GDP pada semua tikus dibandingkan sebelum perlakuan. Dari hasil pengukuran GDP tersebut tidak semua

tikus mengalami DM. Namun bukan berarti induksi HFD yang diberikan selama 40 hari ini tidak berhasil, dikarenakan tujuan pemberian HFD adalah terjadinya resistensi insulin (Tanaka *et al.*, 2007).

Peningkatan kadar GDP yang sangat tinggi terjadi 3 hari setelah tikus diinjeksi dengan STZ. Kadar GDP ini bahkan tidak dapat diukur oleh alat yang memiliki kapasitas pengukuran glukosa dengan rentang 20-600 mg/dL. Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan HOMA-IR untuk memastikan kondisi resistensi insulin yang terjadi pada DM tipe 2. Peningkatan kadar GDP yang sangat tinggi tersebut memungkinkan terjadinya DM tipe 1. Menurut King (2012), induksi DM tipe 1 pada tikus dengan menggunakan injeksi tunggal STZ dosis 35-65 mg/kg BB. Selain itu dapat dilakukan pemberian berulang STZ dengan dosis 20-40 mg/kg BB per hari selama  $\geq 5$  hari.

#### **6.4 Efek Pemberian Nanopartikel PLGA Ekstrak Biji Jintan Hitam terhadap Kadar**

##### **Katalase**

Dari hasil pengukuran kadar katalase pankreas ditemukan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok P2 dengan PN, P2 dengan PP, dan P2 dengan P1. Kadar katalase tertinggi pada kelompok P2 diikuti PP, P1, dan PN. Kelompok PN yaitu tikus kontrol negatif memiliki kadar katalase paling rendah dibandingkan tikus yang mendapatkan terapi. Induksi DM pada penelitian ini dapat menyebabkan penurunan kadar antioksidan di pankreas seperti pada penelitian Babujanarthanam *et al.* (2011), yaitu terjadi penurunan kadar katalase di pankreas pada tikus DM dibandingkan dengan kontrol normal non-DM. Kondisi hiperglikemia menyebabkan produksi berbagai gula tereduksi melalui jalur glikolisis dan poliol. Hal tersebut menyebabkan stres oksidatif dan kerusakan sel  $\beta$  di pankreas.

Schettler *et al.* (1994) menyatakan bahwa peningkatan metabolit oksigen pada stres oksidatif menyebabkan penurunan aktivitas sistem pertahanan antioksidan. Selain itu, penurunan aktivitas enzim antioksidan pada DM melalui proses glikosilasi non-enzimatik (Kennedy and Baynes, 1984).

Kelompok P2 yaitu tikus yang mendapatkan terapi nanopartikel PLGA ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg BB/hari memiliki perbedaan kadar katalase yang signifikan dibandingkan dengan kelompok P1 yang mendapatkan terapi ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg BB/hari. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak biji jintan hitam yang dibuat nanopartikel dapat memperbaiki efektivitasnya sebagai antioksidan pada kondisi DM. Penelitian Vinod *et al.* (2015) menunjukkan bahwa ekstrak *A. auriculiformis* yang dibuat nanopartikel memiliki efek yang lebih poten sebagai antioksidan dibandingkan ekstraknya. Hal ini dikarenakan nanopartikel memiliki ukuran yang lebih kecil sehingga profil farmakokinetiknya lebih baik dibandingkan dengan ekstrak yang memiliki ukuran lebih besar.

Penelitian Kanter *et al.* (2004) menyatakan bahwa efek ekstrak biji jintan hitam sebagai antioksidan diperkirakan melalui hambatan peroksidasi lipid. Berdasarkan Bashandy *et al.* (2015), pemberian *thymoquinone* yang merupakan zat aktif utama dalam ekstrak biji jintan hitam dapat menurunkan stres oksidatif yang diinduksi STZ melalui peningkatan kadar katalase di pankreas. Efek *thymoquinone* diperkirakan melalui jalur hambatan NO yang melibatkan hambatan pada protein p44/42 dan p38 (El-Mahmoudy *et al.*, 2005).

Andaloussi *et al.* (2011) menyatakan pemberian terapi ekstrak biji jintan hitam 48 mg/kg BB selama 4 minggu dapat menurunkan kadar GDP mirip dengan tikus normal non-DM. *Thymoquinone* memiliki efek sebagai agen hipoglikemi dengan cara menurunkan kadar glukosa dan insulin darah pada tikus model DM (Abdelmeguid *et*

*al.*, 2010). Namun pada penelitian ini pemberian ekstrak biji jintan hitam maupun dalam bentuk nanopartikel tidak memberikan penurunan yang signifikan sesudah diberikan terapi selama 26 hari, bahkan beberapa tikus pada kelompok P1 maupun P2 mengalami peningkatan GDP. Perbedaan hasil ini disebabkan oleh beberapa faktor seperti metode ekstraksi yang digunakan. Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi soxhlet yang menggunakan pemanasan, sedangkan pada jurnal rujukan dilakukan maserasi. Walaupun sudah dipastikan bahwa ekstrak positif mengandung *thymoquinone*, namun tidak diketahui pasti kadarnya. Hal tersebut dapat menyebabkan perbedaan *thymoquinone* yang tertarik dalam ekstrak. Menurut Pari and Sankaranarayanan (2009), pemberian *thymoquinone* 80 mg/kg tiap minggu selama 45 hari pada tikus DM dapat menurunkan kadar glukosa darah hingga mendekati nilai normal.

Bila dibandingkan dengan kadar katalase, tikus dengan GDP yang meningkat setelah diberikan terapi memiliki kadar katalase yang lebih tinggi dibandingkan tikus dengan kadar GDP yang lebih rendah. Menurut Ramakrishna and Jailkhani (2008), pada kondisi DM tipe 2 atau hiperglikemia terjadi penurunan kadar katalase di pankreas. Perbedaan ini menunjukkan bahwa efek ekstrak biji jintan hitam maupun nanopartikel ekstrak biji jintan hitam terhadap glukosa darah kurang sensitif dibandingkan efeknya dalam menurunkan stres oksidatif di pankreas.

Efek pemberian glibenklamid pada tikus kontrol positif menunjukkan peningkatan kadar katalase dengan rerata yang lebih tinggi dibandingkan kelompok yang diberikan ekstrak biji jintan hitam. Hasil ini mirip dengan penelitian Gupta *et al.* (2011), pemberian glibenklamid 0,03 mg/kg/hari pada tikus DM selama 21 hari menunjukkan peningkatan kadar katalase pankreas yang signifikan dibandingkan kontrol. Namun efeknya dalam menurunkan kadar GDP

tidak signifikan, bahkan ditemui kenaikan atau kadar GDP yang tetap. Bila dibandingkan dengan kadar katalase, kadar GDP yang lebih tinggi justru memiliki kadar katalase yang lebih tinggi. Efek samping glibenklamid adalah peningkatan BB, namun BB tikus setelah diterapi menurun. Pada penelitian Sokolovska *et al.* (2012) glibenklamid 2 mg/kg/hari tidak dapat menurunkan kadar glukosa darah secara signifikan pada DM tipe 2 setelah 6 minggu terapi dikarenakan durasi penelitian yang tidak cukup untuk menyebabkan penurunan glukosa darah secara nyata. Namun pada penelitian Akbar *et al.* (2012), glibenklamid 0,04 mg/kg/hari secara signifikan menurunkan kadar glukosa darah pada DM dibandingkan dengan kontrol DM selama 16 minggu. Oleh karena itu salah satu faktor yang mempengaruhi hasil tersebut adalah durasi terapi. Pada penelitian ini digunakan glibenklamid tablet yang berisi eksipien, sehingga diperkirakan eksipien tersebut dapat mempengaruhi kerja glibenklamid yaitu dapat menurunkan permeabilitas obat (Avdeef *et al.*, 2008). Selain itu, meskipun serbuk glibenklamid yang digunakan sudah dihitung sesuai kebutuhan dosis, namun tidak dapat dipastikan jumlah dosis glibenklamid yang digunakan sudah sesuai dengan jumlah yang diinginkan atau tidak. Induksi DM pada penelitian ini menyebabkan peningkatan kadar GDP yang sangat tinggi menandakan kemungkinan terjadinya kerusakan jaringan pankreas mirip DM tipe 1 sehingga pemberian terapi seperti glibenklamid yang bekerja dengan meningkatkan sekresi insulin di sel  $\beta$  pankreas menjadi tidak optimal.

### 6.5 Survival Tikus

Pada penelitian ini salah satu kendala yang dihadapi adalah kematian 2 ekor tikus yang terjadi 4 hari setelah diinduksi STZ. Penyebabnya diperkirakan karena

keparahan kondisi DM yang dialami tikus. Tiga hari setelah diinduksi STZ atau 1 hari sebelum tikus mati, GDP tikus sebesar  $> 600$  mg/dL. STZ menyebabkan peningkatan GDP dengan cara memasuki sel  $\beta$  melalui GLUT2 dan menyebabkan alkilasi DNA. Kerusakan DNA menginduksi aktivasi *poly ADP-ribosylation* menyebabkan penurunan  $\text{NAD}^+$  dan ATP seluler. Peningkatan defosforilasi ATP menghasilkan substrat untuk xanthine oksidase sehingga terjadi pembentukan radikal superoksida, radikal hidroksil, dan hidrogen peroksida. STZ melepaskan NO yang menghambat aktivitas aconitase dan menyebabkan kerusakan DNA. Akibatnya sel  $\beta$  mengalami nekrosis sehingga tidak dapat memproduksi insulin (Szkudelski, 2001).

Sebelum ditemukan mati, gejala yang terjadi pada tikus adalah polidipsi, poliuri, penurunan BB, lemas, dan nafas terengah-engah. Walaupun tidak dilakukan pemeriksaan secara klinis, dapat diperkirakan tikus mengalami diabetik ketoasidosis. Diabetik ketoasidosis terjadi akibat defisiensi insulin yang diinduksi STZ. Ketidakmampuan penggunaan glukosa menyebabkan tubuh mencari alternatif sumber energi yaitu pemecahan jaringan adiposa yang menghasilkan akumulasi keton (Westerberg, 2013). Gejala lain yang ditemukan pada salah satu tikus adalah urin berwarna merah menandakan kemungkinan terjadinya hematuria. Hematuria merupakan penanda kerusakan ginjal. Pada DM, kerusakan ginjal diinduksi oleh stres oksidatif (Forbes *et al.*, 2008).

Pada saat pembedahan tikus, ditemukan tikus dengan nodul di hepar dan kemungkinan terjadi retinopati. Obesitas dan resistensi insulin pada DM tipe 2 dapat menginduksi timbulnya nodul di hepar. Kondisi hiperglikemia menyebabkan deposisi glikogen di hepar melalui fosforilase glikogen dan enzim sintase (Collison *et al.*, 2009). Retinopati diawali peningkatan glukosa darah menyebabkan hiperperfusi atau peningkatan aliran darah yang dapat diperparah oleh peningkatan tekanan darah dan

gangguan autoregulasi. Kadar glukosa yang tinggi secara langsung dapat merusak sel endotel menyebabkan kerusakan dinding pembuluh darah, oklusi pembuluh, hipoksia, dan iskemi (Kohner *et al.*, 1995).

## 6.6 Keterbatasan Penelitian

Induksi DM tipe 2 pada penelitian ini mengakibatkan 2 ekor tikus mati. Menurut jurnal rujukan, dosis STZ yang diberikan dapat menyebabkan DM tipe 2. Diperkirakan dosis ini kurang sesuai untuk tikus dengan usia yang lebih tua sehingga terjadi kematian. Namun belum ditemukan dosis STZ untuk induksi DM berdasarkan usia tikus. Induksi DM juga menyebabkan peningkatan kadar GDP yang sangat tinggi memungkinkan terjadinya DM tipe 1. Untuk memastikan induksi tersebut menyebabkan DM tipe 2 seharusnya dilakukan pengukuran HOMA-IR untuk mengetahui terjadinya resistensi insulin dan HOMA- $\beta$  untuk mengetahui fungsi sel  $\beta$ .

Pada penelitian ini tidak diketahui kadar *thymoquinone* yang terkandung dalam ekstrak karena tidak dilakukan uji kuantitatif menggunakan alat seperti GC-MS. Uji tersebut diperlukan untuk mengetahui kadar *thymoquinone* yang memiliki efek sebagai antidiabetes dan antioksidan. Uji GC-MS dapat dilakukan jika sampel yang digunakan adalah minyak sehingga selanjutnya dapat disarankan uji minyak biji jantan hitam sebagai terapi pada DM.

Dalam pembuatan nanopartikel kurang diperhatikan waktu sentrifugasi dan konsentrasi stabilisator yang digunakan, serta tidak dilakukan sonikasi. Hal tersebut dapat mempengaruhi ukuran dan distribusi partikel yang dihasilkan. Karakterisasi nanopartikel menggunakan SEM tidak dapat mengetahui keseluruhan ukuran maupun distribusi nanopartikel. Selain itu tidak dilakukan pemeriksaan *entrapment efficiency*

yaitu jumlah ekstrak yang terjerat dalam matriks nanopartikel. Pemeriksaan ini penting untuk menentukan dosis nanopartikel yang diberikan pada tikus.

Glibenklamid yang digunakan sebagai kontrol positif menggunakan tablet yang tidak hanya berisi zat aktif glibenklamid namun juga excipien. Excipien tersebut kemungkinan bisa mempengaruhi efek glibenklamid dengan cara menurunkan permeabilitasnya.

