

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Ekstraksi Biji *Nigella sativa*

Prinsip ekstraksi *soxhlet* adalah menggunakan pelarut yang selalu baru sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut konstan dengan adanya pendingin balik. Pelarut yang digunakan adalah pelarut organik karena mudah menguap dengan titik didih yang rendah dan dapat melarutkan minyak dengan baik. Pada penelitian ini dipilih etanol sebagai pelarut karena pertimbangan pemberian sediaan pada tikus sehingga dipilih pelarut organik yang relatif aman. Ekstrak cair yang dihasilkan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk memisahkan ekstrak dengan pelarut etanol.

Metode ekstraksi merujuk pada jurnal yang ditulis oleh Dwarampudi *et al.* (2012) tentang ekstraksi *soxhlet* menggunakan 500 g serbuk biji *Nigella sativa* dalam 3000 mL etanol 95%, selama 30 menit pada 70°C kemudian dievaporasi sampai terbentuk 22,78% rendemen ekstrak kental. Tidak dijelaskan secara rinci parameter organoleptik ekstrak. Namun, pada penelitian ini ekstrak yang dihasilkan memiliki karakteristik organoleptik yang sama dengan parameter standar serbuk biji *Nigella sativa* yaitu berwarna coklat dan berbau aromatik (Depkes RI, 1989). Jumlah ekstrak yang dihasilkan tidak sama dengan jurnal rujukan karena pengaruh beberapa faktor. Pertama, jumlah serbuk biji *Nigella sativa* dan volume pelarut yang digunakan tidak sama. Kedua, pada penelitian ini peneliti digunakan derajat pemanasan 90% berdasarkan protokol ekstraksi *soxhlet* di Balai Materia Medika, Batu. Derajat pemanasan akan mempengaruhi hasil ekstraksi karena siklus ekstraksi mulai terjadi jika pelarut sudah menguap

dengan pemanasan. Faktor ketiga adalah waktu yang dibutuhkan untuk ekstraksi (3 jam) tidak sama dengan jurnal rujukan (30 menit) karena dengan waktu 30 menit serbuk biji *Nigella sativa* belum terbasahi seluruhnya sehingga ekstraksi belum sempurna.

## 6.2 Uji Fitokimia Ekstrak Biji *Nigella sativa*

Pada penelitian ini dilakukan uji alkaloid, saponin, dan minyak atsiri untuk memastikan keberadaan senyawa-senyawa tersebut berdasarkan rujukan pada jurnal yang ditulis oleh Al-Attar *et al.* (2010) bahwa biji *Nigella sativa* mengandung alkaloid, saponin, dan minyak esensial yang mengandung minyak atsiri. Selain itu pada penelitian ini dilakukan uji terpenoid, flavonoid, dan tanin. Interpretasi seluruh hasil uji fitokimia pada penelitian ini merujuk pada *Materia Medika Indonesia*, Jilid V.

*Thymoquinone* (TQ) merupakan senyawa utama pada minyak atsiri biji *Nigella sativa* yang diduga memiliki efek antioksidan. Dari hasil uji, ekstrak biji *Nigella sativa* positif mengandung minyak atsiri sehingga dimungkinkan adanya TQ dalam ekstrak etanol biji *Nigella sativa*. Untuk memastikan kandungan TQ maka pada penelitian ini dilakukan uji menggunakan standar TQ dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Selain itu, dari hasil uji menunjukkan ekstrak etanol biji *Nigella sativa* positif mengandung terpenoid, flavonoid, tanin, dan saponin. Timbulnya buih pada uji saponin menunjukkan adanya glikosida yang terhidrolisis dalam air menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Marliana *et al.*, 2005). Adanya glikosida pada ekstrak biji *Nigella sativa* telah dibuktikan pada jurnal tentang penelitian fitokimia biji *Nigella sativa* (Kamal and Ahmad, 2014).

Kandungan alkaloid diuji menggunakan reaksi pengendapan menggunakan tiga macam reagen. Dari tiga macam uji, reaksi positif hanya terjadi pada uji dengan reagen Wagner yaitu terbentuk endapan cokelat kemerahan. Berdasarkan Depkes RI



(1989), ekstrak dapat dinyatakan positif mengandung alkaloid jika sekurang-kurangnya terbentuk endapan dengan dua macam reagen. Pada penelitian ini larutan uji ekstrak biji *Nigella sativa* hanya membentuk endapan pada satu reagen yaitu Wagner sehingga tidak bisa dinyatakan bahwa ekstrak positif mengandung alkaloid. Hal ini dapat terjadi karena dimungkinkan kadar alkaloid dalam ekstrak biji *Nigella sativa* sangat sedikit.

### 6.3 Uji Fitokimia Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT merupakan analisis kualitatif sampel dengan prinsip memisahkan sampel berdasarkan perbedaan polaritas antara sampel dengan eluen (fase gerak) yang digunakan (Rohman, 2009). Untuk tujuan identifikasi, noda pada plat KLT dikarakterisasikan berdasarkan nilai  $R_f$ -nya. Nilai  $R_f$  (faktor retensi) adalah rasio jarak yang dipindahkan oleh suatu zat terlarut terhadap jarak yang dipindahkan oleh garis depan eluen selama waktu yang sama (Day and Underwood, 1998).

Eluen KLT pada penelitian ini dipilih dengan cara *trial and error* menggunakan campuran n-heksana : etil asetat (9 : 1) yang merujuk pada (Sousa *et al.*, 2012). Uji KLT dengan deteksi menggunakan sinar UV  $\lambda = 254$  nm didapatkan jarak tempuh noda ekstrak biji *Nigella sativa* dan standar TQ sejauh 13 cm sehingga dengan jarak tempuh eluen 17 cm didapatkan  $R_f$  sebesar 0,765. Nilai ini sama dengan nilai  $R_f$  pada jurnal yang membahas tentang uji fitokimia KLT untuk mengidentifikasi TQ pada ekstrak metanol biji *Nigella sativa* menggunakan eluen benzena : isopropil eter (1 : 1). Dari penelitian tersebut diperoleh  $R_f$  TQ sebesar 0,77 yang dideteksi menggunakan densitometri  $\lambda = 254$  nm (Basha *et al.*, 2006). Nilai  $R_f$  ini sesuai dengan literatur lain yang menyatakan bahwa daya elusi dari fase gerak yang dipilih harus dapat memberikan harga  $R_f$

analit antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan (Rohman, 2009). Meskipun demikian, pada penelitian lain menyatakan bahwa uji KLT pada minyak menguap biji *Nigella sativa* menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (80 : 20 v/v) yang dideteksi pada UV = 254 nm didapatkan  $R_f$  TQ = 0,52 (Kamal *et al.*, 2003). Selain itu, uji KLT pada ekstrak etanol biji *Nigella sativa* dengan eluen dietil eter : benzena (1 : 1) menunjukkan  $R_f$  TQ = 0,82 (Suthar *et al.*, 2010). Perbedaan nilai  $R_f$  ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor pertama adalah polaritas dari eluen yang digunakan. Perbedaan jenis eluen yang digunakan akan menyebabkan perbedaan polaritasnya. Polaritas eluen akan mempengaruhi kelarutan sampel yang akan mempengaruhi pergerakan/laju sampel pada plat silika. Pada prinsipnya, nilai  $R_f$  dari analit pada pemisahan menggunakan KLT ditentukan oleh polaritas eluen yang digunakan. Nilai  $R_f$  sangat khas untuk senyawa tertentu pada eluen tertentu (Rohman, 2009). Setelah sampel ditotolkan pada plat silika dan dicelupkan pada eluen, eluen bergerak naik di sepanjang plat. Bersamaan dengan pergerakan eluen tersebut, zat terlarut sampel dibawa dengan laju yang tergantung pada kelarutan zat terlarut tersebut dalam fasa gerak dan interaksinya dengan silika (Day and Underwood, 1998). Faktor kedua adalah polaritas dari sampel, dalam hal ini ekstrak yang digunakan. Pada beberapa penelitian tersebut, sampel didapatkan dengan pelarut ekstraksi yang berbeda. Ekstrak dengan pelarut yang berbeda akan memberikan profil polaritas yang berbeda sehingga akan mempengaruhi kelarutan sampel pada eluen. Kelarutan sampel pada eluen menentukan laju sampel pada plat KLT sehingga akan menentukan jarak tempuh dan nilai  $R_f$  sampel.



Meskipun demikian, nilai  $R_f$  yang identik untuk suatu senyawa yang diketahui dan yang tidak diketahui dengan menggunakan beberapa sistem pelarut yang berbeda memberikan bukti yang kuat bahwa nilai untuk kedua senyawa tersebut adalah identik, terutama jika senyawa berdampingan di sepanjang plat KLT yang sama (Day and Underwood, 1998) sehingga nilai  $R_f$  yang identik pada ekstrak etanol biji *Nigella sativa* dan standar TQ pada penelitian ini dapat membuktikan secara kualitatif keberadaan TQ pada ekstrak etanol biji *Nigella sativa*.

#### 6.4 Kadar GDP dan MDA Otak Tikus

Hasil uji *one way-ANOVA* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan kadar MDA otak yang signifikan ( $p = 0,152$ ) antar kelompok. Kelompok perlakuan yang memiliki rata-rata kadar MDA otak tertinggi adalah kelompok  $P_2$  (tikus model DM tipe 2 yang diberi nanopartikel PLGA setara ekstrak biji *Nigella sativa* 48 mg/kg/hari) diikuti dengan kelompok  $P_1$  (tikus model DM tipe 2 yang diberi ekstrak biji *Nigella sativa* 48 mg/kgBB/hari), kelompok  $P_p$  (tikus model DM tipe 2 yang diberi Glibenklamid 0,09 mg/200 gBB), dan kelompok  $P_n$  (tikus model DM tipe 2 yang tidak diberi terapi).

Dari hasil pengukuran kadar GDP, pada kelompok  $P_p$  target penurunan kadar GDP menjadi  $< 126$  mg/dL tidak tercapai. Seluruh tikus masih mengalami DM dengan pemberian Glibenklamid 0,09 mg/200 gBB. Jumlah tikus yang memiliki GDP  $> 600$  mg/dL tidak mengalami penurunan baik pada kelompok  $P_p$  (3 dari 5 tikus) maupun pada kelompok  $P_n$  (3 dari 6 tikus) setelah 26 hari terapi, sedangkan rata-rata kadar MDA otak kelompok  $P_p$  lebih tinggi 5,317% dibandingkan kelompok  $P_n$ . Nilai SD kadar MDA otak pada kelompok  $P_p$  lebih besar daripada kelompok  $P_n$ . Hal ini menunjukkan distribusi data pada kelompok

$P_n$  lebih homogen. Hasil pengukuran kadar MDA otak ini tidak sesuai dengan jurnal yang ditulis oleh Ahmadi *et al.* (2013) bahwa Glibenklamid dapat menurunkan marker pembentukan radikal hidroksil ( $OH^\bullet$ ) 2,3- dan 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,3- dan 2,5 DHBA) selama 30 hari terapi pada tikus wistar model DM yang diinduksi STZ.  $OH^\bullet$  merupakan radikal bebas yang dapat memicu peroksidasi lipid sehingga penurunan  $OH^\bullet$  dapat menurunkan kadar MDA sebagai marker peroksidasi lipid. Berdasarkan tingkat keparahan DM yang dilihat dari kadar GDP tiga hari setelah injeksi STZ, pada kelompok  $P_p$  tikus yang memiliki kadar GDP > 600 mg/dL lebih banyak (3 dari 5 tikus) dibandingkan dengan kelompok lain. Oleh karena itu, tingginya kadar MDA otak dan kadar GDP pada kelompok  $P_p$  kemungkinan disebabkan oleh dua faktor yaitu kondisi DM berat yang mengakibatkan stres oksidatif berlebihan dan dosis Glibenklamid yang disondekan ke hewan coba mungkin tidak sesuai dengan dosis perhitungan. Pada penelitian ini, Glibenklamid diperoleh bukan dari serbuk murni Glibenklamid, namun dari tablet Glibenklamid sehingga kemungkinan yang banyak diberikan adalah eksipien dari tablet dibandingkan Glibenklamid itu sendiri.

Pada kelompok  $P_1$ , rata-rata kadar MDA otak lebih tinggi 17,91% dibandingkan kelompok  $P_n$  walaupun perbedaannya tidak signifikan secara statistik. Nilai SD kadar MDA otak pada kelompok  $P_1$  lebih besar daripada kelompok  $P_n$ . Hal ini menunjukkan distribusi data pada kelompok  $P_n$  lebih homogen. Seluruh tikus masih mengalami DM (kadar GDP > 126 mg/dL) setelah diberi terapi 48 mg/kgBB ekstrak biji *Nigella sativa*. Sebanyak 3 dari 6 tikus memiliki kadar GDP > 600 mg/dL baik pada kelompok  $P_1$  dan kelompok  $P_n$ . Hal ini tidak sesuai dengan jurnal rujukan bahwa dengan pemberian 48 mg/kgBB/hari



ekstrak etanol biji *Nigella sativa* secara *intra gastric* (sonde) dapat menurunkan kadar GDP tikus dibandingkan dengan kelompok tikus DM tanpa terapi (Benhaddou-Andaloussi *et al.*, 2011). Penurunan kadar GDP akan berhubungan dengan penurunan kadar MDA karena peningkatan kadar GDP akan meningkatkan peroksidasi lipid dengan marker MDA yang dapat diukur. Menurut beberapa jurnal, terjadi penurunan kadar GDP dan kadar MDA pankreas secara signifikan pada pemberian 2 mL/kg *intraperitoneal* (i.p) ekstrak biji *Nigella sativa* dibandingkan dengan kelompok tikus DM tipe 2 yang tidak diberi terapi (Abdelmeguid *et al.*, 2010). Peroksidasi lipid yang berlebihan dalam plasma dan sel dapat ditimbulkan dari pembentukan ROS. Pada DM yang tidak terkontrol, melalui jalur pentosa fosfat terjadi oksidasi glukosa yang menyebabkan pembentukan NADPH berlebih. Hal ini akan menginduksi pembentukan ROS sehingga memicu peroksidasi lipid pada sistem sitokrom P-450. Terdapat hubungan positif yang signifikan antara kadar MDA dengan kadar HbA<sub>1c</sub> dan glukosa darah, bahwa ketika terjadi peningkatan kadar glukosa darah dan kadar HbA<sub>1c</sub> juga terjadi peningkatan kadar MDA (Memisoğullari *et al.*, 2003). Pada kelompok P<sub>1</sub>, target penurunan glukosa darah oleh terapi ekstrak biji *Nigella sativa* tidak tercapai dan justru terjadi peningkatan jumlah tikus yang memiliki kadar GDP > 600 mg/dL (2 menjadi 3 dari 6 tikus) dibandingkan sebelum terapi. Oleh karena itu, penurunan kadar MDA otak tikus tidak dapat tercapai. Selain itu, kadar MDA yang tinggi pada kelompok P<sub>1</sub> tidak sesuai dengan beberapa jurnal yang menyatakan tentang aktivitas antioksidan TQ. TQ menunjukkan aktivitas yang mirip dengan SOD (*SOD-like activity*) dan merupakan penangkap radikal bebas yang poten terhadap superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), radikal hidroksil (OH<sup>•</sup>), dan

peroksil ( $RO_2^\bullet$ ) (Ismail *et al.*, 2010; Leong *et al.*, 2013) serta memiliki aktivitas hambatan terhadap NO synthase (Alimohmmadi *et al.*, 2013).

Selain itu, ketidaksesuaian dengan hasil penelitian terdahulu antara lain disebabkan oleh beberapa hal, yang pertama adalah organ yang diteliti. Pada penelitian ini, organ yang diteliti adalah otak. Otak merupakan organ yang sangat mudah terserang stres oksidatif dibandingkan dengan organ lain karena tersusun atas lipid yang banyak mengandung PUFA (asam lemak tak jenuh), memiliki kebutuhan yang sangat tinggi terhadap  $O_2$  per unit masa jaringan seperti pada mitokondria yang dapat meningkatkan terjadinya kerusakan oksidatif dari PUFA, dan banyaknya senyawa neurotransmitter yang mudah teroksidasi (Herlambang, 2006). Pada jurnal yang ditulis oleh Hamdy *and* Taha (2009) tentang efek minyak *Nigella sativa* dan TQ terhadap stres oksidatif dan neuropati pada tikus DM, kadar MDA otak tikus lebih tinggi daripada kadar MDA jantung dan kadar GSH sebagai antioksidan non-enzimatik pada jantung lebih tinggi daripada kadar GSH otak. Pada penelitian ini, diindikasikan dengan dosis 48 mg/kgBB/hari ekstrak biji *Nigella sativa* tidak mampu memperbaiki keadaan stres oksidatif yang ada di otak yang dibuktikan dengan kadar MDA otak kelompok  $P_1$  lebih tinggi daripada kelompok  $P_n$ .

Kedua adalah lama pemberian terapi. Pada penelitian ini, terapi diberikan selama 26 hari. Pada penelitian lain, penurunan kadar MDA pankreas secara signifikan terjadi setelah dua puluh hari terapi dan naik lagi pada tiga puluh hari setelah terapi. Hal ini mengindikasikan bahwa efek antioksidan ekstrak biji *Nigella sativa* menunjukkan profil "time dependent" (tergantung waktu) karena pengaruh faktor lain seperti kadar antioksidan jaringan (Abdelmeguid *et al.*, 2010). Mekanisme yang berperan dalam pembentukan radikal bebas pada



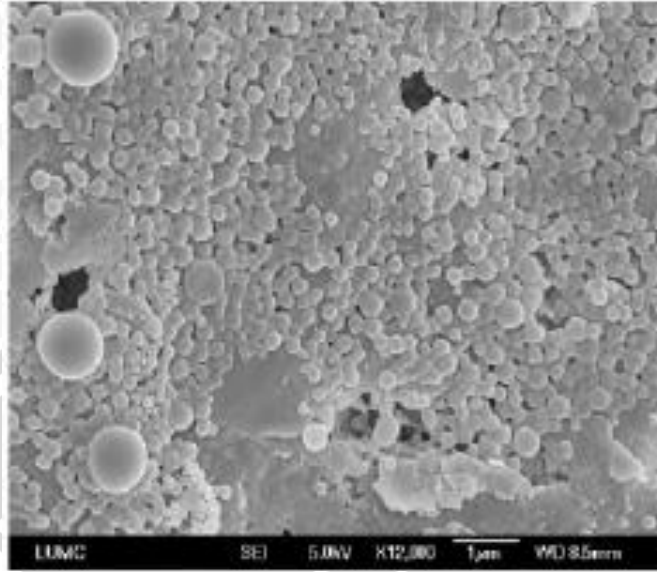
kondisi DM tidak hanya disebabkan oleh peningkatan glikosilasi auto-oksidatif dan non-enzimik, tetapi juga dipengaruhi oleh stres metabolik yang dihasilkan dari perubahan metabolisme energi, tingkat mediator-mediator inflamasi, dan status sistem pertahanan antioksidan (Griesmacher *et al.*, 1995).

Faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian adalah kadar TQ pada ekstrak biji *Nigella sativa* yang merupakan senyawa utama yang pada penelitian ini diduga memiliki efek antioksidan. Pada penelitian ini, telah terbukti secara kualitatif adanya kandungan TQ pada ekstrak biji *Nigella sativa* yang dibuktikan dengan uji KLT. Namun tidak dilakukan uji kuantitatif sehingga tidak diketahui secara pasti kadar TQ yang terdapat dalam 48 mg/kgBB ekstrak. Menurut Hamdy *and* Taha (2009), tikus DM yang diterapi menggunakan 10 mg/kgBB isolat murni TQ secara *intra-gastric* selama 14 hari menunjukkan penurunan MDA otak secara signifikan dan memiliki korelasi signifikan dengan peningkatan kadar GST, CAT, dan GSH sebagai antioksidan tubuh. Selain itu, pada penelitian ini ekstrak dilarutkan dalam akuades. Akuades tidak dapat melarutkan ekstrak dengan sempurna yang dilihat dari adanya gumpalan-gumpalan ekstrak yang mengapung di permukaan sediaan sehingga dosis ekstrak yang disondekan ke tikus berkurang dari dosis yang ditentukan. Selain itu, perbedaan komposisi tanah tempat tumbuh *Nigella sativa* memungkinkan perbedaan kualitas dari konstituen/kandungan senyawa yang ada dalam biji *Nigella sativa*.

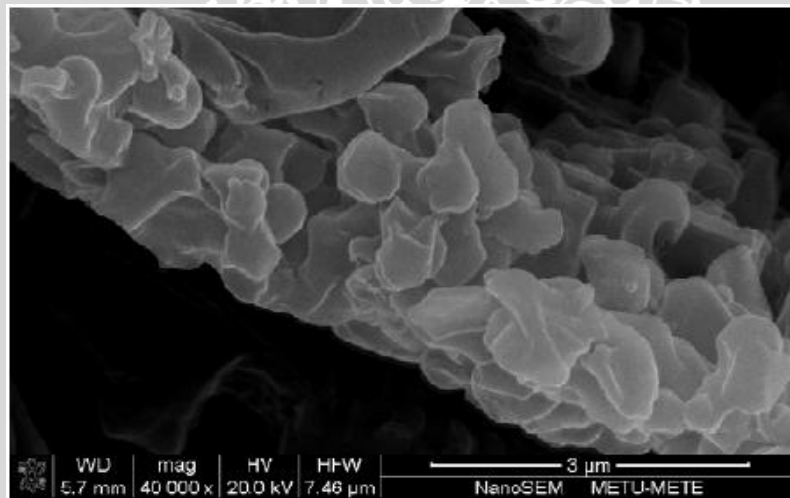
Pada kelompok P<sub>2</sub>, hanya ada 1 tikus yang tidak DM (kadar GDP < 126 mg/dL) setelah diterapi menggunakan sediaan nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa*. Kadar GDP > 600 mg/dL sama dengan kelompok P<sub>n</sub> yaitu sebanyak 3 dari 6 tikus memiliki GDP > 600 mg/dL. Rata-rata kadar MDA otak

lebih tinggi 23,321% dari pada kelompok  $P_n$  dan lebih tinggi dari pada kelompok  $P_1$ . Nilai SD kadar MDA otak pada kelompok  $P_2$  lebih besar dari pada kelompok  $P_n$ . Hal ini menunjukkan distribusi data pada kelompok  $P_n$  lebih homogen. Hasil pengukuran kadar MDA otak ini tidak sesuai dengan beberapa jurnal yang menyatakan bahwa dengan nano-enkapsulasi PLGA dapat meningkatkan efikasi terapi suatu obat. Menurut Ravindran *et al.* (2010), nanopartikel PLGA TQ lebih mudah terpenetrasi ke dalam sel dan organel sel sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas. Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi ketidaksesuaian ini. Pertama adalah bentuk dan ukuran nanopartikel yang dihasilkan. Pada penelitian ini nanopartikel yang dihasilkan memiliki bentuk tidak *spheris*, namun, tidak diketahui secara pasti homogenitas bentuk dan ukuran dari nanopartikel. Untuk mengetahuinya perlu dilakukan karakterisasi menggunakan *particle size analyzer*. Sedangkan menurut Bhardwaj *et al.* (2009), dengan bentuk yang *spheris* dan permukaan yang halus, nanopartikel lebih mudah diedarkan pada sirkulasi dan diantarkan ke dalam sel. Nanopartikel PLGA berbentuk *spheris* berhasil dibuat oleh Slütter *et al.* (2010) yang membuat vaksin OVA dalam nanopartikel PLGA (Gambar 6.1). Walaupun demikian, pada penelitian Türk *et al.* (2009) tentang preparasi nanopartikel PLGA menggunakan *stabilizer Pluronic F 127* (2%) dan PVA (1%), menunjukkan struktur morfologi dan ukuran ( $271,4 \pm 10,109$  nm) (Gambar 6.2) yang mirip dengan penelitian ini. Permukaan nanopartikel yang dibuat menggunakan *Pluronic* akan menghasilkan permukaan yang kasar dan berpori karena *Pluronic* teradsorpsi kuat pada permukaan nanopartikel (Türk *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2010).





**Gambar 6.1 Hasil Karakterisasi SEM Vaksin OVA-Nanopartikel PLGA**  
(Slütter *et al.*, 2010)



**Gambar 6.2 Hasil Karakterisasi SEM Nanopartikel PLGA Menggunakan Stabilizer Pluronic F 127 (2%) dan PVA (1%)** (Türk *et al.*, 2009)

Pada penelitian ini, rata-rata ukuran nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* yang dihasilkan lebih kecil (124,54 nm) daripada jurnal rujukan. Menurut jurnal rujukan, dengan pelarut *propylene carbonate* (PC) dan *Pluronic F 68* sebagai *stabilizer* dihasilkan nanopartikel dengan ukuran rata-rata  $213 \pm 5$  nm

(Song *et al.*, 2006). Walaupun pada penelitian ini rata-rata ukuran partikel yang dihasilkan kecil, namun nanopartikel yang dapat digunakan sebagai bahan penghantar obat ke otak harus memiliki diameter kurang dari 100 nm (Lockman *et al.*, 2002).

Keberhasilan penghantaran obat berbasis nanoteknologi ditentukan oleh ukuran dan sifat-sifat permukaannya (muatan dan hidrofilisitas). Efek *enhanced permeability and retention* (EPR) merupakan kunci efikasi formulasi nanopartikel. Dengan peningkatan permeabilitas dan retensi nanopartikel pada permukaan sel maka akan meningkatkan akumulasinya pada sel (Bhardwaj *et al.*, 2005). Ukuran nanopartikel yang kecil dapat mempertahankan keberadaannya pada sirkulasi lebih lama dibandingkan dengan nanopartikel berukuran besar. Keberadaan yang lama pada sirkulasi dapat meningkatkan akumulasi nanopartikel pada sel, namun, tidak ada hubungan yang signifikan antara ukuran nanopartikel dan efek EPR (Bhardwaj *et al.*, 2009).

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi ukuran nanopartikel adalah jenis dan konsentrasi *stabilizer* yang digunakan serta kecepatan sentrifugasi. Sistem penghantaran obat ke otak oleh nanopartikel sangat bergantung pada jenis *stabilizer* yang digunakan (Bhaskar *et al.*, 2010). *Stabilizer* memiliki peran yang signifikan pada ambilan, biodistribusi, dan profil pelepasan obat sehingga mempengaruhi efikasi obat secara *in vivo* (Bhardwaj *et al.*, 2009). Pada penelitian ini, *stabilizer* yang digunakan adalah *Pluronic F 68* 1% w/v dengan kecepatan sentrifugasi 10000 g. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Kreuter *et al.* (1997), dari 12 jenis *stabilizer*, hanya nanopartikel dengan *stabilizer Polysorbate* 20, 40, 60, dan 80 yang menghasilkan efek signifikan dalam melewati sawar darah otak dan efek maksimum terlihat pada nanopartikel



dengan *Polysorbate 80*. Selain itu, pada penelitian lain menunjukkan bahwa ukuran partikel secara signifikan dipengaruhi oleh konsentrasi *stabilizer* yang digunakan. Ukuran nanopartikel terkecil diperoleh dengan menggunakan konsentrasi *stabilizer* terkecil (0,1%). Konsentrasi *stabilizer* yang semakin besar menghasilkan nanopartikel dengan ukuran besar. Namun pada konsentrasi yang terlalu tinggi (1% w/v) dapat menyebabkan agregasi partikel. Di sisi lain, dengan kecepatan sentrifugasi yang lebih tinggi (12000 rpm) dapat menghasilkan nanopartikel dengan ukuran yang lebih kecil dibandingkan dengan kecepatan yang lebih kecil (8800 rpm) (Cooper and Harirforoosh, 2014).

Faktor yang kedua adalah kadar ekstrak biji *Nigella sativa* pada nanopartikel PLGA. Persen efisiensi penjerapan (EE%) merupakan salah satu bentuk karakterisasi nanopartikel untuk mengetahui persen obat yang terjebak/masuk ke dalam nanopartikel (Paul *et al.*, 2011). Namun, pada penelitian ini tidak dilakukan karakterisasi EE% sehingga tidak diketahui persentase atau kadar ekstrak biji *Nigella sativa* yang terjebak dalam nanopartikel PLGA. Menurut penelitian lain, EE% dapat dipengaruhi oleh konsentrasi *stabilizer* dan kecepatan sentrifugasi. Persen efisiensi penjerapan diklofenak terhadap nanopartikel PLGA mencapai puncak pada konsentrasi w/v *stabilizer* yang rendah. Jika konsentrasi *stabilizer* meningkat, terjadi penurunan persen penjerapan obat secara linear. Selain itu, kecepatan sentrifugasi yang semakin tinggi (12000 rpm) akan menyebabkan persen penjerapan obat semakin kecil dibandingkan dengan 8800 rpm (Cooper and Harirforoosh, 2014).

Faktor ketiga adalah kemungkinan terjadinya toksisitas. TQ merupakan senyawa golongan *quinone* yang dapat menjadi toksik akibat beberapa faktor seperti lingkungan dan makanan. *Quinone* dapat mengalkilasi protein seluler

penting maupun DNA. Selain itu *quinone* merupakan molekul redox yang sangat reaktif dan berperan pada siklus redox dalam bentuk senyawa *semiquinone* yang menyebabkan terbentuknya ROS seperti superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil yang akan menyebabkan stres oksidatif berat pada sel dengan membentuk oksidan pada lipid, protein, dan DNA serta menyebabkan produksi AGEs (Bolton *et al.*, 2000; Bandeira *et al.*, 2013). Jurnal tersebut dapat menjadi dasar kemungkinan terjadinya toksisitas pada pemberian sediaan ekstrak biji *Nigella sativa* maupun nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa*. Selain itu, radikal hidroksil ( $\text{OH}^\bullet$ ) merupakan ROS yang paling reaktif yang dapat bereaksi dengan molekul-molekul organik dan membentuk ikatan tak jenuh, abstraksi hidrogen, atau transfer elektron (Hue *et al.*, 1999). Pada penelitian ini, etanol sebagai pelarut ekstraksi biji *Nigella sativa* dan PC sebagai pelarut dalam pembuatan nanopartikel merupakan pelarut organik yang kemungkinan masih tersisa pada sediaan ekstrak biji *Nigella sativa* dan nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa*. Hal ini dapat menyebabkan reaksi dengan  $\text{OH}^\bullet$  yang dapat memicu terjadinya peroksidasi lipid yang diawali dengan abstraksi molekul hidrogen sehingga justru dapat meningkatkan kondisi stres oksidatif pada tikus DM yang ditandai dengan tingginya kadar MDA otak kelompok  $\text{P}_1$  dan  $\text{P}_2$  dibandingkan dengan kelompok  $\text{P}_n$ .

Untuk meminimalisasi kemungkinan terjadinya toksisitas tersebut, pada penelitian ini *pellet* nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* dicuci menggunakan *aqua bidest* dengan sentrifugasi 10000 g selama 30 menit sebanyak satu kali sebelum disondekan ke hewan coba. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan sisa pelarut organik. Namun, metode ini belum dapat memastikan hilangnya seluruh pelarut organik yang mungkin masih tersisa dalam



sediaan karena walaupun sudah dicuci, sediaan masih meninggalkan bau pelarut. Pada penelitian ini tidak dilakukan pengujian sisa pelarut. Alat yang dapat digunakan untuk menguji sisa pelarut etanol dalam ekstrak biji *Nigella sativa* adalah GC-MS. Ekstrak pekat diencerkan hingga konsentrasi 0,1% dengan pelarut metanol. Sampel diinjeksikan kedalam alat GC-MS pada suhu 70°C hingga 200°C. Analisis adanya gugus etanol melalui similar index dan pola kromatogram yang dihasilkan (Dirjen POM Depkes RI, 2000; Wibowo *et al.*, 2012). Menurut Permenkes RI tentang industri dan usaha obat tradisional, setiap industri dan usaha obat tradisional dilarang membuat obat tradisional dalam bentuk cairan obat dalam yang mengandung etanol dengan kadar lebih dari 1% (satu persen) (Permenkes RI, 2012).

Selain dengan pencucian, sediaan disimpan dengan kondisi yang baik yaitu pada botol gelap, tidak terkena cahaya matahari langsung, dan pada suhu dingin untuk menjaga kestabilan TQ yang ada dalam sediaan. Dari hasil uji pH terhadap sediaan nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* pembuatan pertama (7,17) dan kedua (6,47), pH sediaan masuk dalam rentang spesifikasi berdasarkan abstrak Salmani *et al.* (2014) yaitu TQ stabil pada pH = 5,5 - 7,4 dan tidak stabil pada pH basa. Namun, pH nanopartikel PLGA tidak sesuai dengan rujukan yang menyatakan bahwa PLGA yang dibuat menggunakan *Pluronic F 68* stabil pada pH 5,5 (Santander-Ortega *et al.*, 2006) sehingga tidak diketahui stabilitas nanopartikel PLGA ekstrak biji *Nigella sativa* yang diberikan pada hewan coba.

Nanopartikel PLGA dapat menembus sawar darah otak dengan dua mekanisme yaitu secara aktif dan pasif. Mekanisme pertama yaitu penghantaran aktif melalui endositosis. Ada dua mekanisme endositosis yaitu endositosis yang

dimediasi oleh reseptor (RME) dan endositosis yang dimediasi oleh adsorpsi permukaan nanopartikel (AME). Pada mekanisme RME, nanopartikel dikonjugasikan dengan ligan khusus (contoh: *clathrin*) yang mampu mengenali dan menempel pada reseptor di permukaan sel endotel (kapiler) otak. Penempelan ini memicu terbentuknya vesikel dan endositosis sehingga nanopartikel memasuki sawar darah otak. Pada mekanisme AME, prinsipnya adalah interaksi elektrostatis antara muatan positif permukaan nanopartikel dengan muatan negatif permukaan sel endotel otak sehingga memicu terjadinya endositosis. Permukaan nanopartikel dimodifikasi dengan cara dikonjugasikan dengan kation untuk menghasilkan muatan positif pada permukaannya. Selain dengan endositosis, penghantaran aktif dapat melalui mekanisme modulasi dari *tight junction* (TJ) di antara sel endotel sawar darah otak dan hambatan terhadap mekanisme *efflux P-glycoprotein* (Bhaskar *et al.*, 2010).

Nanopartikel yang tidak dikonjugasikan dengan ligan khusus pada permukaannya akan mengalami penghantaran pasif (difusi) dalam menembus sawar darah otak. Pada penghantaran pasif, energi utama berasal dari perbedaan gradien konsentrasi melewati membran antara sel (paraseluler) atau melewati sel (transeluler). PLGA memanfaatkan efek *enhanced permeability and retention* (EPR) yaitu dengan meningkatkan permeabilitas dan daya serapnya ke tempat sasaran yang dipengaruhi oleh ukuran, lipofilisitas, dan muatan permukaan. Molekul yang mampu menembus sawar darah otak secara pasif harus memiliki ukuran dan berat molekul yang kecil, lipofilik, dan memiliki muatan permukaan positif (Danhier *et al.*, 2012). Partikel yang memiliki permukaan bermuatan positif dapat menghasilkan interaksi yang lebih baik dengan muatan negatif membran sel. Hal ini akan menghasilkan peningkatan waktu retensi pada



permukaan sel sehingga dapat meningkatkan ambilan partikel ke dalam sel. Menurut Bhardwaj *et al.* (2009) PLGA yang dibuat menggunakan *stabilizer* kationik yaitu DMAB menghasilkan muatan positif pada permukaannya dan telah digunakan untuk penghantaran paclitaxel secara oral pada tikus *Sprague dawley* model kanker. Hasilnya, nanopartikel PLGA efektif dan aman untuk meningkatkan efikasi paclitaxel sebagai agen kemoterapi oral secara *in vivo* (Bhardwaj *et al.*, 2009).

Faktor lainnya adalah kemungkinan terjadinya DM tipe 1. Pada penelitian ini tidak dapat dipastikan terjadinya DM tipe 2 karena tidak dilakukan uji untuk mengetahui resistensi insulin dan/atau infiltrasi lemak pada jaringan yang membedakan antara DM tipe 2 dengan DM tipe 1. Menurut Srinivasan *et al.* (2005), untuk mendapatkan tikus *Sprague dawley* model DM tipe 2 dapat diinduksi dengan diet tinggi lemak (DTL) selama 2 minggu dikombinasi dengan injeksi STZ dosis rendah (35 mg/kgBB i.p), sedangkan untuk mendapatkan tikus *Sprague dawley* model DM tipe 1 dapat dilakukan dengan injeksi STZ dosis 65 mg/kgBB i.p dan dinyatakan DM jika GDP > 250 mg/dL (Owu *et al.*, 2013; Schmidt *and* Carrillo-Sepulveda, 2015). Walaupun induksi DM tipe 2 sudah sesuai dengan jurnal rujukan, namun kadar GDP yang sangat tinggi pada penelitian ini menunjukkan kondisi DM berat yang dapat menunjukkan kemungkinan terjadinya DM tipe 1 sehingga kadar GDP tidak dapat turun baik dengan terapi Glibenklamid, non-nanopartikel, maupun nanopartikel ekstrak biji *Nigella sativa* karena pada DM tipe 1 mutlak memerlukan terapi insulin dari luar (ADA, 2013).

Selain itu, ketidaksesuaian MDA otak pada penelitian ini dapat disebabkan karena beberapa faktor. Faktor pertama adalah perbedaan genetik

yang dapat mempengaruhi respon tubuh hewan coba terhadap induksi DM sehingga terdapat variasi kadar GDP dan MDA otak meskipun dalam satu kelompok perlakuan yang sama. Faktor kedua adalah tingkat stres yang dialami masing-masing hewan coba berbeda-beda. Kondisi stres dapat meningkatkan kadar glukosa darah. Pada penelitian ini, setiap hari dilakukan penimbangan berat badan hewan coba.

Hal-hal tersebut merupakan salah satu kelemahan yang tidak dapat dikontrol oleh peneliti karena berasal dari subyek penelitian. Walaupun demikian peneliti sudah melakukan usaha untuk meminimalisi faktor perancu dengan memberikan kriteria inklusi pada hewan coba berupa jenis kelamin, berat badan, usia, galur, dan fisik yang sehat. Faktor lain yang dapat menjadi perancu adalah masih adanya darah pada jaringan otak. Darah kaya akan ion besi yang dapat menjadi katalisator dalam proses peroksidasi lipid sehingga dapat menyebabkan peningkatan kadar MDA otak (Holbrook *et al.*, 1996).

### **6.5 Kematian Hewan Coba pada Penelitian**

Pada penelitian ini terdapat satu hewan coba yang mati pada kelompok P<sub>p</sub>. Kematian terjadi setelah satu hari mendapat terapi Glibenklamid. Dosis Glibenklamid yang diberikan sudah sesuai dari hasil konversi dosis manusia ke tikus yaitu 0,09 mg/200 gBB. Kematian ini dimungkinkan terjadi karena kondisi diabetik ketoasidosis. Walaupun diabetik ketoasidosis adalah komplikasi yang umum terjadi pada DM tipe 1, namun juga dapat terjadi pada DM tipe 2 dengan ciri-ciri sebagai berikut (Cook *et al.*, 2008): hiperglikemia (GDP > 250 mg/dL), ketosis (anion gap > 10), dan asidosis (pH arteri ≤ 7,25). Gejala yang dapat diamati yaitu mual, muntah, dehidrasi, polidipsi, poliuri, dan lemas. Pada penelitian ini, satu hari sebelum kematian kadar GDP tikus adalah 512 mg/dL



dengan gejala polidipsi, poliuri, dan lemas. Namun tidak dilakukan pengukuran elektrolit dan pH darah sehingga belum dapat memastikan terjadinya diabetik ketoasidosis.

## 6.6 Keterbatasan Penelitian

Beberapa keterbatasan pada penelitian ini antara lain:

1. Terdapat satu tikus yang mati pada perlakuan P<sub>p</sub> sehingga data yang dihasilkan kurang representatif.
2. Tidak dapat dipastikan keberhasilan terjadinya kondisi DM tipe 2.
3. Tidak dilakukan uji kuantitatif kadar TQ pada ekstrak biji *Nigella sativa* sehingga tidak dapat diketahui secara pasti kadar TQ yang diberikan pada setiap hewan coba.
4. Tidak dilakukan karakterisasi persen efisiensi penjebakan (EE%) sehingga tidak diketahui persentase atau dosis ekstrak biji *Nigella sativa* yang terjebak dalam nanopartikel PLGA.
5. Tidak dilakukan karakterisasi menggunakan *particle size analyzer* untuk mengetahui secara pasti homogenitas bentuk dan ukuran dari nanopartikel.