

Formulasi Nanoemulsi Ekstrak Terpurifikasi Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) Terinkorporasi dalam *Dissolved Microneedle Patch*

Amalia Daryati¹, Meila Tunjung Suryaningrum¹, Ahmad Prakoso¹, Ikke Ramandhita Mulia Isnaini¹ dan Syaiful Choiri^{2*}

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta, Indonesia, 57126.

²Teknologi Farmasetik dan Sistem Penghantaran Obat, Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta, Indonesia, 57126.

*email korespondensi: s.choiri@mipa.uns.ac.id

Received 16 September 2022, Accepted 29 November 2022, Published 30 November 2022

Abstrak: Sistem penghantaran sediaan patch transdermal mampu meningkatkan kepatuhan pasien, diabetes melitus dengan menghindari regimen dosis yang rumit serta penggunaan injeksi insulin. Senyawa 11 β ,13-dihydroveranolide yang diisolasi dari tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina*) terbukti secara efektif mampu menurunkan kadar gula darah. *Microneedle* merupakan alat untuk menghantarkan obat secara perkutan sehingga mampu mencapai sirkulasi sistemik. Penelitian ini bertujuan untuk memformulasikan nanoemulsi isolat ekstrak terpurifikasi daun afrika terinkorporasi dalam *dissolved microneedle patch*. Senyawa diisolasi dan diekstraksi menggunakan maserasi dengan pelarut metanol, dilanjutkan fraksinasi cair-cair, dan kromatografi kolom. Purifikat yang diperoleh dikarakterisasi profil kromatogram lapis tipis dan spektra vibrasional. Pengembangan formula nanoemulsi menggunakan teknik *mixture design* untuk memperoleh formula optimum yang diinkorporasikan ke dalam campuran polimer dan *microneedle* dicetak menggunakan *master template*. Pengujian *in vivo* dilakukan menggunakan tikus sebagai model hewan uji dan dikaji penurunan kadar gula darah tikus. Hasil fraksi semipolar diperoleh rendemen 11,99 % dan isolat daun afrika diperoleh rendemen 0,075%. Profil kromatogram lapis tipis menunjukkan spot tunggal pada sampel isolat dan spektra vibrasional mengkonfirmasi gugus-gugus senyawa 11 β ,13-dihydroveranolide. Karakterisasi ukuran droplet nanoemulsi menunjukkan hasil 73,54 \pm 3,92 nm dengan distribusi ukuran droplet yang seragam 0,594 \pm 0,058. Jarum yang dihasilkan berukuran pada rentang 100-250 μ m dengan nilai *folding endurance patch* sebesar >300 kali. Hasil pengujian kadar glukosa menunjukkan bahwa kelompok *patch* transdermal nanoemulsi mampu menurunkan kadar gula darah sebesar 60% dan tidak berbeda bermakna dengan control positif. Formula *patch* isolat tanpa nanoemulsi mampu menurunkan kadar gula darah tikus sebesar 20%. Formulasi nanoemulsi isolat daun afrika terinkorporasi dalam *dissolving microneedle* menunjukkan peningkatan efektivitas antidiabetes dibandingkan tanpa formulasi nanoemulsi.

Kata kunci: anti-diabetes; daun afrika; *microneedle*; nanoemulsi; optimasi

Abstract. African Leaf (*Vernonia amygdalina*) Purified Extract Nanoemulsion Formulation Incorporated in *Dissolved Microneedle Patch*. A transdermal *patch* delivery system can improve patient compliance with diabetes mellitus because it eliminates the complex dose regiment and insulin injection. The 11 β ,13-dihydroveranolide that isolated from the african leaf plant (*Vernonia amygdalina*) were proven to be effective in lowering blood sugar levels. Microneedle is a device for delivering drugs percutaneously so that they can reach the systemic circulation. This study aims to formulate a nanoemulsion of an isolated extract of purified African leaf extract incorporated in dissolved microneedle. The compounds were

isolated and extracted using maceration with methanol as solvent, followed by liquid-liquid extraction, and column chromatography. The isolates obtained were characterized by thin layer chromatogram profiles and vibrational spectra. The development of nanoemulsion formula using mixture design technique to obtain the optimum formula. The optimum formula was incorporated into the polymer mixture and microneedle printed using a master template. In vivo testing was carried out using rats as test animal models and studied the decrease in rat blood sugar levels. The results showed that the nanoemulsion transdermal *patch* group experienced a fairly good decrease, which was about 60% of the initial glucose level. It is quite close to the positive control results which decreased by 75% and better than the non-nanoemulsion transdermal *patch* group which only decreased by about 20%.

Keywords: anti-diabetic; african leaf; microneedle; nanoemulsion; optimization

1. Pendahuluan

Diabetes merupakan kelainan metabolik kronis dengan nilai prevalensi relatif tinggi yang terus mengalami peningkatan secara kuantitas dengan laju 2% pertahun (Pulungan *et al.*, 2019). Tatalaksana terapi diabetes melitus secara farmakologis seperti terapi insulin dan pemberian obat oral antidiabetes merupakan lini pertama untuk mengontrol kadar obat dalam darah. Permasalahan utama yang masih dihadapi yaitu rendahnya kepatuhan sehingga tidak tercapainya tujuan terapi diabetes (Pranoto, 2012). Salah satu sebab utama kegagalan terapi adalah permasalahan administrasi sediaan yang tidak menyenangkan, khususnya bagi pasien diabetes melitus tipe I, dan bahkan regimen terapi yang kompleks seperti multiterapi untuk pasien geriatri (Srinatania *et al.*, 2020). Permasalahan tersebut yang mendasari menurunnya kepatuhan pasien sehingga tidak tercapai kadar obat dalam sirkulasi sistemik (Najmi, 2018). Oleh karena itu, perlunya modifikasi sistem penghantaran obat yang mampu meningkatkan kenyamanan serta kemudahan dalam mengkonsumsi obat sehingga tercapainya tujuan terapi diabetes.

Sistem penghantaran obat dikembangkan untuk meningkatkan efektivitas dan meningkatkan efikasi dari suatu obat. Efikasi sistem penghantaran sediaan secara transdermal mampu menghantarkan obat melalui kulit dengan kecepatan tertentu untuk mencapai efek sistemik. Manfaat ini tidak hanya diperoleh dengan desain dan rancangan yang sederhana, sistem formulasi yang kompleks dengan modifikasi berbasis nanoteknologi mampu meningkatkan efektivitas dari sistem transdermal (Singh *et al.*, 2015). Metabolisme lintas pertama tidak dialami oleh sediaan transdermal, maka dapat diperoleh keseragaman konsentrasi dalam plasma dan nilai bioavailabilitas yang tinggi. *Patch* transdermal akan melepaskan obat secara berkelanjutan dan terkontrol sampai pada waktu tertentu selama menempel pada permukaan kulit (Zhang *et al.*, 2014). Hal ini diharapkan dapat meningkatkan kepatuhan pasien dalam meminum obat, khususnya pediatri dan geriatri.

Patch merupakan sediaan transdermal yang terdiri dari satu atau gabungan polimer yang bekerja sebagai pengontrol pelepasan obat (Setyawan *et al.*, 2016), kelemahan utama sediaan *patch* ini adalah permeasi melewati lapisan kulit bagian terluar yang merupakan barrier primer pada transport perkutan. *Microneedle* merupakan jarum yang berukuran mikrometer yang dapat digunakan sebagai teknologi penghantaran obat dan biasanya diaplikasikan secara transdermal sebagai disruptor fisik barrier absorpsi perkutan (Ita, 2017). *Microneedle* yang digunakan merupakan jenis *dissolving microneedle* yang akan melarut seutuhnya saat masuk ke lapisan kulit. Polimer yang digunakan dalam sistem ini merupakan polimer larut air (Kim *et al.*, 2012). Teknologi ini senyawa yang sudah diinkorporasikan ke dalam sistem *microneedle patch* dapat menembus lapisan stratum corneum yang merupakan penghalang terbesar sediaan transdermal dengan tidak menimbulkan rasa sakit berarti karena tidak masuk terlalu dalam ke kulit dan tetap dapat melepaskan obat secara optimal.

Pengembangan senyawa sebagai antidiabetik sudah sangat banyak, baik senyawa alami maupun senyawa sintesis. Senyawa antidiabetes alami salah satunya adalah 11 β ,13-*dihydroveranolide* yang diisolasi dari tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina*) memiliki potensi antidiabetes yang tinggi jika dibandingkan dengan kontrol positif (Okoduwa *et al.*, 2017). Daun afrika terbukti mampu mempengaruhi regenerasi sel β pankreas pada dosis secara oral pada dosis 150 mg/kgBB tikus jantan (Tandi *et al.*, 2019).

Sifat hipofolik menyebabkan kemampuan permeasi senyawa 11 β ,13-*dihydroveranolide* cenderung sulit. Cara yang dapat digunakan sebagai solusinya adalah membuat suatu sistem nanoemulsi yang dapat meningkatkan permeasi senyawa tersebut. Nanoemulsi merupakan sediaan dengan ukuran droplet kurang dari 100 nm yang stabil secara termodinamik dan terdiri dari minyak dan air yang membentuk dispersi transparan dengan penstabil surfaktan dan kosurfaktan (Shafiq *et al.*, 2007). Sistem nanoemulsi pada sediaan transdermal mampu meningkatkan permeasi senyawa lipofilik dan hidrofilik sehingga obat mampu melewati stratum korneum dan akhirnya mencapai sirkulasi sistemik (Alkilani *et al.*, 2018). Hingga saat ini, penelitian mengenai *microneedle patch* nanoemulsi senyawa 11 β ,13-*dihydroveranolide* dalam menurunkan kadar gula darah pada diabetes melitus belum dikembangkan lebih jauh. Penelitian ini bertujuan untuk memformulasikan nanoemulsi isolat ekstrak terpurifikasi daun afrika terinkorporasi dalam dissolved microneedle serta kajian efektivitas penurunan kadar gula darah pada tikus.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Daun tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina*) diperoleh dari Karanganyar, Jawa Tengah, Indonesia dipetik daun ketiga dari pucuk sampai daun ke 9 dari tanaman dengan rentang umur 9 bulan sampai 2 tahun pada bulan Juli 2022. Tanaman yang digunakan diidentifikasi dan diautentikasi di UPT Laboratorium Universitas Setia Budi dengan nomor: 26E/DET/UPT-LAB/18.08.2022.

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi yaitu metanol, etil asetat, dan n-heksan diperoleh dari PT. Agung Jaya (Surakarta, Indonesia). Pelarut lain yang digunakan dalam proses isolasi adalah metanol dan kloroform yang diperoleh dari Merck (Darmstadt, Jerman). Formulasi nanoemulsi dan *microneedle patch* menggunakan bahan Transcutol P (Gattefosse; Prancis), Capmul PG 8 NF (Abitec; Janesville, WI), Kolliphor EL (BASF; Jerman), HPMC K100LV (Colorcon, WestPoint, PA), PVP K30 (BASF; Jerman), dan PVA (Sigma Aldrich; USA). Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan sediaan tablet glibenklamid (Indofarma; Bekasi, Indonesia).

Hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan galur wistar putih dengan berat 220 ± 30 g diperoleh dari UPT Laboratorium Terpadu Universitas Sebelas Maret yang diperlakukan sesuai dengan protokol uji yang disetujui oleh komisi etik dan memperoleh ethical clearance dari Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta dengan nomor: 4291/A.2/KEPK-FKUMS/VI/2022.

2.2. Metode

2.2.1. Ekstraksi dan purifikasi 11 β ,13-*dihydroveranolide* dari tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina*)

Daun dari tanaman daun afrika segar dicuci kemudian diangin-anginkan selama tujuh hari sampai bobot konstan dengan kandungan lembab <5% (3,14%). Daun afrika kering dihaluskan dengan blender (Philips HR2056; Jakarta, Indonesia) kemudian direndam dengan metanol selama 3 x 24 jam. Ekstrak kemudian diremaserasi menggunakan methanol dengan menambahkan 2 Liter dalam 100 g ekstrak kering. Penggantian pelarut selama remaserasi dilakukan setiap 24 jam. Ekstrak dipekatkan menggunakan vacuum rotary evaporator pada suhu 40°C. Purifikasi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut n-heksan (fraksi non polar) dan dilanjutkan dengan etil asetat (fraksi semi polar). Hasil purifikasi etil asetat diuapkan pada suhu ruang sehingga diperoleh ekstrak kering. Purifikasi dilanjutkan dengan pemisahan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel 60 (0,2-0,5 mm) untuk kromatografi kolom dan fase gerak metanol:kloroform dengan gradient perbandingan 0,5:9,5 sampai 0:10 setiap 50 mL. Fraksi dengan waktu retensi yang sama setelah pengujian dengan

KLT kemudian dijadikan satu dan diuji gugus vibrasional menggunakan FTIR (Okoduwa *et al.*, 2021).

2.2.2. Karakterisasi hasil purifikasi dan isolat

Karakterisasi purifikat dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak kloroform:metanol (8,75:1,75) untuk melihat pola bercak pada plat KLT. Analisis gugus vibrasional menggunakan alat ATR-FTIR (Agilent Cary 630; California, USA) pada sampel yang memiliki nilai R_f yang sama dan dikeringkan. Analisis ATR-FTIR dilakukan dengan rentang kondisi bilangan gelombang 4000-650 cm^{-1} , resolusi 4/ cm^{-1} , jumlah iterasi 12 kali, dan *backgorund scan* 12 kali untuk melihat prediksi adanya senyawa target (Okoduwa *et al.*, 2021).

2.2.3. Pembuatan nanoemulsi isolat daun afrika

Formula nanoemulsi (M/A) dikembangkan menggunakan teknik *simplex mixture design* untuk menentukan formula optimum dengan komponen Capmul PG 8 NF sebagai fase minyak, Transcutol CG sebagai co-surfaktan, dan Kolliphor EL sebagai surfaktan. Masing-masing faktor memiliki perbandingan tertentu sesuai desain dan rancangan percobaan berbasis pada *simplex lattice design*. Isolat daun afrika berjumlah 200 mg ditambahkan ke dalam campuran Capmul PG 8 NF, Transcutol P dan Kolliphor EL dan diaduk selama 24 jam. Campuran disentrifugasi menggunakan *Thermo Scientific Fresco 17 microcentrifugator* (Waltham, MA) selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan yang diperoleh kemudian dipisahkan dan disimpan selama 24 jam di suhu ruang.

Waktu emulsifikasi dihitung dengan menghitung kecepatan prekonsentrat melarut sepenuhnya ke aquadest dengan perbandingan 1:50 yang diaduk menggunakan magnetic stirrer (Thermo Scientific; Massachusetts; USA) dengan kecepatan 400 rpm. Waktu yang dibutuhkan prekonsentrat nanoemulsi untuk teremulsifikasi sempurna dicatat sebagai waktu emulsifikasi. Nanoemulsi diukur persentase transmisinya dengan Thermo Scientific Orion AquaMate 8100 Spectrofotometer UV Vis (Waltham, MA) pada panjang gelombang 650 nm.

Faktor dianalisis dengan analisa regresi linear berganda sehingga diperoleh persamaan waktu emulsifikasi dan transmittan. Persamaan yang diperoleh kemudian dibuat dalam bentuk contour plot yang digunakan untuk memahami pengaruh utama serta interaksi pada masing-masing faktor. Optimasi formula nanoemulsi dilakukan menggunakan metode mixture design (*simplex lattice model*) yang dianalisa menggunakan software Design Expert v.12 (StatEase; Minneapolis, MN) dengan parameter waktu emulsifikasi (goal: minimize) dan persentase transmittan (goal: maximize). Formula terbaik dipilih oleh sistem melalui grafik contour plot.

2.2.4. Uji ukuran partikel dan potensial zeta nanoemulsi isolat daun afrika

Ukuran partikel *droplet* nanoemulsi dikarakterisasi menggunakan *particle size analyzer* (SZ-100 Malvern, UK) dengan prinsip *dynamic light scattering* pada panjang gelombang 633 nm dengan sudut hamburan 173° . Hasil Z-average dan *polydispersity index* digunakan untuk menyatakan ukuran dan distribusi *droplet* nanoemulsi. Zeta potensial dari nanoemulsi diukur dengan alat yang sama berdasarkan atas *electrophoretic mobility* dari nanoemulsi menggunakan kuvet karbon. Nanoemulsi divisualisasikan menggunakan mikroskop cahaya (Nikon Eclipse E100 LED; Tokyo, Jepang). Sebanyak dua tetes cairan nanoemulsi diteteskan ke atas kaca preparat kemudian diamati pada perbesaran 1000 kali. Hasil kemudian ditangkap dengan kamera dan dilakukan perkiraan ukuran menggunakan *software* ImageJ.

2.2.5. Pembuatan transdermal *patch* dengan *microneedle*

Transdermal *patch* dengan *microneedle* daun afrika dibuat menggunakan metode cetak. Polimer HPMC sebanyak 0,1 g dikembangkan pada 5 mL air panas kemudian ditambah dengan PVP dan PVA masing-masing sebanyak 0,1 dan 10 g. Sebanyak 5 mL nanoemulsi senyawa $11\beta,13$ -*dihydrovernonide* ditambahkan dan diaduk. Cetakan silikon sebelumnya dibuat dengan menuang campuran silikon di atas jarum pencetak dan ditunggu hingga kering. Campuran *patch* kemudian dituangkan ke cetakan silikon dan diberi tekanan tinggi dengan *syringe* yang telah dimodifikasi untuk menghilangkan gelembung udara yang menghalangi terbentuknya jarum kemudian dikeringkan di suhu ruang selama 24 jam (RH $40\pm 5\%$).

Microneedle patch non-nanoemulsi dibuat dengan melarutkan 200 mg isolat daun afrika ke dalam 15 mL etanol. Sebanyak 200 μ L larutan kemudian dihomogenkan dalam 5 mL aquadest. Campuran tersebut kemudian diinkorporasi ke dalam polimer pembuat *patch* yang dibuat sama dengan *microneedle patch* nanoemulsi. *Patch* dicetak dengan cetakan yang sama kemudian dikeringkan di suhu ruang selama 24 jam (RH $40\pm 5\%$).

Microneedle patch yang terbentuk diukur ukuran jarumnya menggunakan proyeksi ukuran *template* yang ditangkap dengan *photograph* menggunakan kamera beresolusi tinggi. Diameter *patch* diukur dengan jangka sorong (ketelitian 0.05 mm). Kekuatan *patch* diuji dengan melakukan *folding endurance patch*. *Patch* diambil sebanyak 6 secara acak kemudian dilipat menjadi 2 bagian secara berulang sampai patah atau terdapat retakan. Jumlah lipatan dihitung sebagai nilai kekuatan lipatan *patch*. Sediaan *microneedle patch* disimpan pada suhu ruang dengan kelembapan $40\pm 5\%$).

2.2.6. Pengukuran kadar glukosa darah

Pengujian secara *in vivo* dilakukan menggunakan tikus jantan galur wistar putih. Sebanyak 16 tikus diadaptasi selama 7 hari yang kemudian dibagi menjadi 4 kelompok. Pada

hari ke-8 semua tikus diinduksi diabetes melitus menggunakan aloksan dengan dosis 150 mg/kg BB. Aloksan dipilih karena secara selektif dapat merusak sel β pankreas karena aloksan yang terakumulasi melalui transporter glukosa GLUT2 (Watkins & Cooperstein, 1976). Kadar glukosa diperiksa melalui ekor dengan *glucosemeter* (Sinocare; Jakarta, Indonesia) setelah 3 hari sejak pemberian induksi diabetes dan ditetapkan sebagai kadar glukosa awal. Setelah tikus uji terindikasi diabetes melitus, kelompok kontrol positif diberi suspensi glibenklamid 5 mg secara peroral satu kali di pagi hari selama waktu pengujian; kelompok kontrol negatif diberi *microneedle patch* tanpa bahan aktif; kelompok perlakuan 1 diberi *microneedle Patch* nanoemulsi senyawa 11 β ,13-*dihydroveranolide* sebanyak 4 *patch* dengan dosis 2,5 mg/3 mm; dan kelompok perlakuan 2 diberi *microneedle patch* isolat senyawa 11 β ,13-*dihydroveranolide* sebanyak 4 *patch* dengan dosis 2,5 mg/3 mm. Perlakuan diberikan selama 7 hari dengan pengecekan kadar glukosa dilakukan pada hari ke 3, 5, dan 7 setelah diberi perlakuan dan tanpa penggantian *patch*.

2.2.7. Analisis data

Subjek uji *microneedle patch* nanoemulsi senyawa 11 β ,13-*dihydroveranolide* diuji kekuatan *patch* nya, efektivitasnya dalam menurunkan kadar glukosa tikus, serta kemampuan permeasi ke dalam kulit. Data kadar gula dalam darah selanjutnya dianalisis dengan *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95% ($p=0,05$).

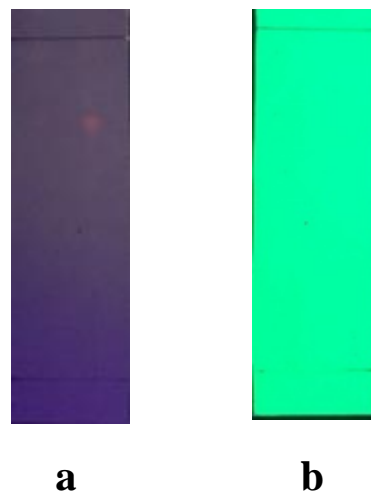
3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Ekstraksi dan purifikasi tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina*)

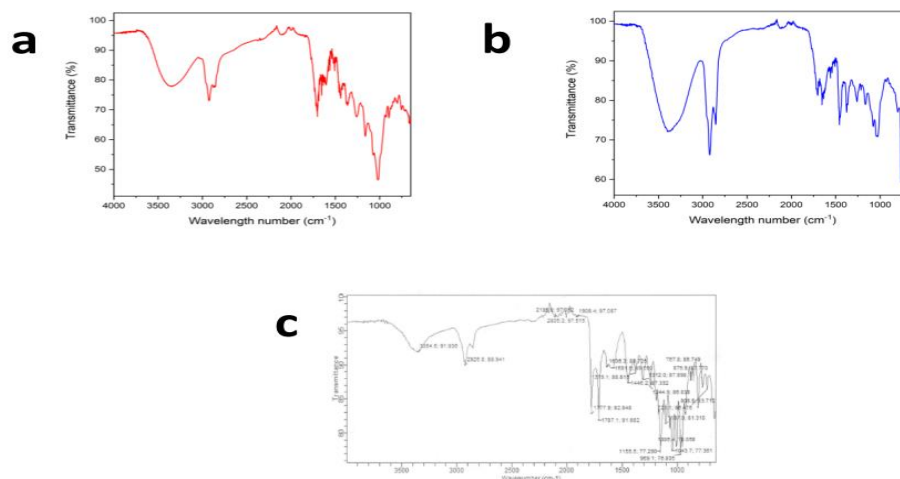
Simplisia daun tanaman daun afrika yang didapat memiliki kandungan lembab 3,14% (<10%), sehingga mencegah dekomposisi secara enzimatis metabolit sekunder pada daun afrika (Sulasmi *et al.*, 2016). Proses ekstraksi diperoleh ekstrak pekat sebanyak 2,546 L dan diperoleh hasil fraksinasi menggunakan etil asetat diperoleh 23,98 gram (rendemen 11,99 % dari simplisia daun afrika kering). Purifikasi lebih lanjut dari fraksi etil asetat yaitu isolasi senyawa 11 β ,13-*dihydroveranolide* menggunakan kolom kromatografi yang menghasilkan 27 botol variasi kombinasi methanol:kloroform. Setelah pengujian KLT didapat 4 botol dengan faktor retensi yang relatif sama, yaitu 0,825; 0,775; 0,8; dan 0,75. Keempat botol sudah menunjukkan satu spot yang artinya isolat yang diperoleh memiliki tendensi senyawa identik dan diduga merupakan senyawa yang sama (Gambar 1). Keempat isolat kemudian dijadikan satu dan dikeringkan pada suhu kamar. Rendemen yang dihasilkan adalah 1,475 gram (0,7375%) bila dibandingkan dengan simplisia daun kering yang digunakan.

Fraksi semipolar dan isolat hasil kromatografi kolom dianalisis gugus vibrasionalnya dengan instrumen FTIR (Gambar 2). Pengujian ini ditujukan untuk menjustifikasi adanya

senyawa $11\beta,13$ -*dihydroveranolide* pada spot tunggal di pengujian KLT. Hasil menunjukkan bahwa pada spectra fraksi semipolar memiliki gugus spesifik pada senyawa $11\beta,13$ -*dihydroveranolide*. Spektra pada sampel isolat sudah menunjukkan gugus-gugus senyawa $11\beta,13$ -*dihydroveranolide* dan memiliki pola vibrasional baik pada gugus fungsional ataupun fingerprint yang identik dengan acuan penelitian yang dilakukan oleh Okoduwa *et al.*, (2021) yang telah mengisolasi senyawa $11\beta,13$ -*dihydroveranolide* (Gambar 4b). Gugus penyusun yang ditemukan antara lain, gugus O-H pada bilangan gelombang 3100-3500 cm^{-1} ; C-H pada bilangan gelombang 2500-3300 cm^{-1} ; C=O pada bilangan gelombang 1670-1820 cm^{-1} ; C=O pada bilangan gelombang 1700-1725 cm^{-1} ; =C=H₂ pada bilangan gelombang 1440-1480 cm^{-1} ; =C=H₂ pada bilangan gelombang 960-990 cm^{-1} ; serta -C=CH- pada bilangan gelombang 790-840 cm^{-1} .



Gambar 1. Hasil KLT purifikat tanaman daun afrika dengan kromatografi kolom pada tingkat fase gerak metanol-kloroform (10:90) pada panjang gelombang 366 nm (a) dan 254 nm (b).



Gambar 2. Spektra IR sampel fraksi etil asetat (a), Spektra IR sampel isolat (b), Spektra IR senyawa $11\beta,13$ -*dihydroveranolide* pada penelitian Okoduwa, (2017) (c).

3.2. Nanoemulsi isolat ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina*) senyawa 11β,13-dihydroveranolide

Nanoemulsi minyak dalam air (M/A) dibuat dengan *loading* isolat senyawa 11β,13-dihydroveranolide sebanyak 2,5% (25 mg/mL). Rancangan formula beserta data waktu emulsifikasi dan transmitan tertera pada Tabel 1. Hasil yang diperoleh dianalisis menggunakan analisa regresi linear berganda sehingga diperoleh Persamaan 1.

$$\text{Transmitan (\%)} = 23.29 A + 46.87 B + 41.25 C -23.37 AB + 108.00 AC - 103.52 BC$$

Persamaan 1. Presentase transmittan yang diperoleh dari analisa regresi linear berganda. Keterangan: A= Capmul PG 8 NF; B= Transcutol P; C=Kolliphor EL.

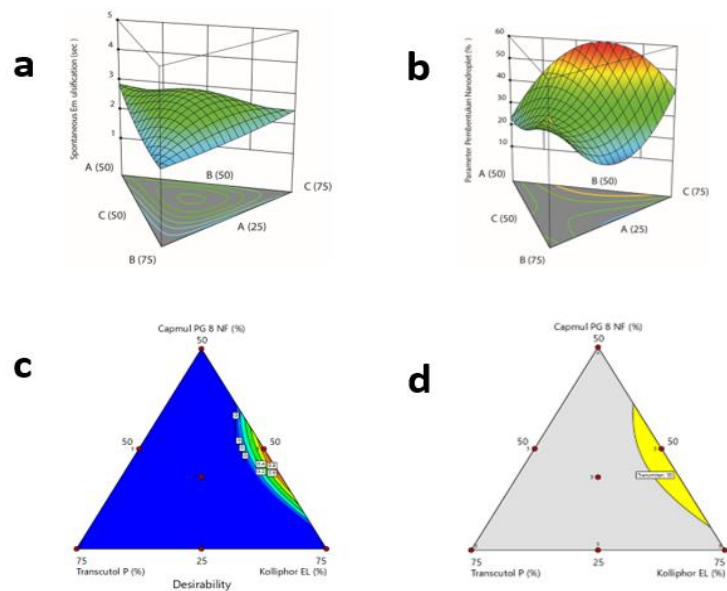
Persamaan 1 menunjukkan bahwa model signifikan ($p < 0,05$) sehingga faktor yang dikaji mempengaruhi nilai transmitan dan *lack of fit test* yang tidak bermakna ($p > 0,05$) sehingga tidak menyebabkan *misleading* dalam prediksi model. Nilai *adjusted R²* 0,7546 dan *predicted R²* 0,6338, sehingga selisih antara kedua koefisien determinasi tersebut kurang dari 20%, menunjukkan keadekuatan prediksi dari model (Gelman *et al.*, 2019). Hasil menunjukkan bahwa linear model menunjukkan pengaruh yang bermakna ($p < 0,05$), sehingga setiap faktor memberikan pengaruh yang bermakna terhadap transmitan. Transcutol P (B; 47,84) memberikan pengaruh yang paling tinggi terhadap parameter transmitan. Kolliphor EL (C; 41,25) memberikan pengaruh cukup tinggi dan Capmul PG 8 NF (A; 23,29) yang memberikan pengaruh terkecil. Interaksi antara Capmul PG 8 NF dengan Transcutol P memberikan penurunan yang tidak bermakna (-23,37; $p > 0,05$). Interaksi antara Capmul PG 8 NF dengan Kolliphor EL memberikan pengaruh yang bermakna (108,0; $p < 0,05$), sedangkan interaksi antara Transcutol P dan Kolliphor EL memberikan signifikansi paling rendah. Co-surfaktan dapat meningkatkan fleksibilitas sehingga ketegangan pada film surfaktan dapat menurun dan membentuk sistem nanodroplet yang baik. Namun, pengaruh co-surfaktan dalam meningkatkan stabilitas nanoemulsi ini tergantung dari panjang rantainya. Co-surfaktan alkohol rantai panjang seperti Transcutol P yang merupakan heksanol dapat menghasilkan pemisahan domain air yang tertutup, sehingga menyebabkan sistem misel yang terbentuk kurang seragam dan kurang terorganisir (Shaker *et al.*, 2019).

Tabel 1. Desain dan rancangan nanoemulsi isolat tanaman daun afrika menggunakan *simplex lattice design*. Keterangan: A= Capmul PG 8 NF; B= Transcutol P; C= Kolliphor EL.

A (mL)	B (mL)	C (mL)	Transmitan (%)	Waktu Emulsifikasi (detik)
0,25	0,50	0,75	40,80±6,87	3,37±0,70
0,50	0,50	0,50	26,90±2,5	2,54±0,76
0,37	0,50	0,62	16,10±6,72	2,50±0,36
0,25	0,62	0,62	23,80±6,95	3,22±1,50
0,37	0,62	0,50	41,83±12,68	2,74±0,60
0,33	0,58	0,58	56,93±4,43	2,94±0,69
0,25	0,75	0,50	47,40±4,27	2,34±0,26

Contour plot dari parameter transmittan ditunjukkan pada Gambar 3a dengan kombinasi bahan yakni Transcutol P sebagai ko-surfaktan, Kolliphor EL sebagai surfaktan dan Capmul PG-8 NF sebagai fase minyak. Gambar 3a menunjukkan daerah optimum untuk sistem nanoemulsi fase minyak dalam air (M/A) berada pada kombinasi bahan Kolliphor EL dan Capmul PG 8 NF pada proporsi tengah, dan Transcutol P dengan konsentrasi rendah. Hal ini disebabkan Kolliphor EL berinteraksi dengan minyak terhidrofilisasi sehingga mampu meminimalisasi ukuran droplet (di bawah 100 nm) yang ditunjukkan dengan nilai transmittan yang tinggi.

Contour plot dari parameter transmittan ditunjukkan pada Gambar 3b dengan kombinasi bahan yakni Transcutol P sebagai co-surfaktan, Kolliphor EL sebagai surfaktan dan Capmul PG 8 NF sebagai fase minyak. Gambar 3a menunjukkan daerah optimum untuk sistem nanoemulsi berada pada kombinasi bahan Kolliphor EL dan Capmul PG 8 NF pada proporsi tengah, dan Transcutol P dengan konsentrasi rendah. Hal ini disebabkan Kolliphor EL berinteraksi dengan minyak terhidrofilisasi sehingga mampu meminimalisasi ukuran *droplet* (di bawah 100 nm) yang ditunjukkan dengan nilai transmittan yang tinggi.



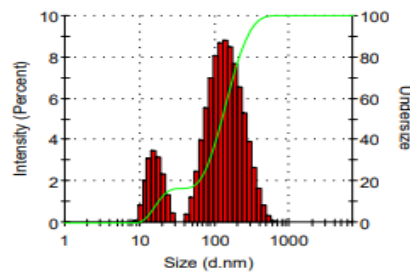
Gambar 3. *Contour plot* parameter waktu emulsifikasi Keterangan: (a) transmittan (b) desirability (c) overlay plot menggunakan metode *simplex lattice design*.

Gambar 3c menggambarkan plot *desirability* yang digunakan untuk menentukan formula paling optimum, berdasarkan *spontaneous emulsification* melalui parameter waktu emulsifikasi dan pembentukan nano *droplet* melalui karakterisasi nilai transmittan. Formula optimum yang diharapkan memiliki karakteristik *spontaneous emulsification* kurang dari 30 detik dan transmittansi yang lebih dari 70% (Kuncahyo *et al.*, 2019). Daerah optimum ditunjukkan oleh *superimposed contour plot* yang dibatasi oleh parameter transmittan. Formula terbaik yang

dihasilkan yaitu kombinasi Capmul PG 8 NF sebesar 0,35 mL; Transcutol P 0,5 mL; dan Kolliphor EL 0,64 mL.

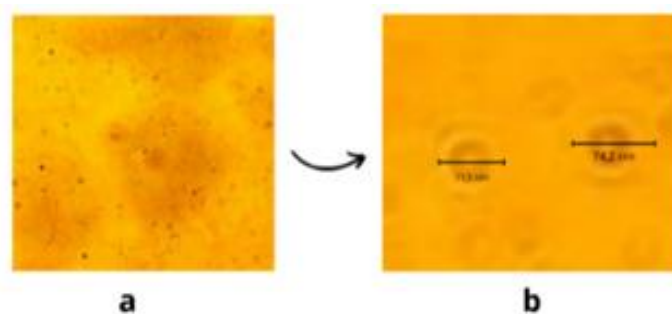
3.3. Uji ukuran partikel dan potensial zeta nanoemulsi senyawa 11 β ,13-dihydroveranolide

Sistem nanoemulsi yang paling optimal kemudian dilakukan pengujian *particle size analyzer* (PSA). Tujuan pengujian ini adalah memastikan ukuran sampel berada dalam ukuran nanometer. Hasil distribusi ukuran droplet ditunjukkan pada Gambar 4 yang diperoleh ukuran *droplet* rerata $73,54 \pm 3,92$ nm dengan distribusi ukuran *droplet* yang menunjukkan ukuran *droplet* seragam $0,594 \pm 0,058$.



Gambar 4. Distribusi ukuran droplet nanoemulsi formula optimum nanoemulsi isolat ekstrak daun afrika.

Hasil dari Gambar 4 terdapat 2 puncak yaitu menunjukkan terbentuknya puncak *droplet micellar* pada daerah sekitar 10 nm sedangkan nanoemulsi secara murni ditunjukkan pada *droplet* dengan ukuran 100 nm. Hasil yang sama telah dilaporkan bahwa terjadi proses perubahan pola distribusi ukuran partikel karena proses solidifikasi terhadap proses emulsifikasi, tetapi juga interaksi antara formula lipid dan pembawanya yang akan mempengaruhi perilaku *nanodroplet*, maka dari itu puncak pertama dapat dipastikan merupakan sistem *micellar* dan puncak kedua merupakan sistem nanoemulsi (Kuncahyo *et al.*, 2019). Hasil ini diperkuat dengan ukuran droplet di bawah 20 nm merupakan karakteristik dari aglomerasi dari surfaktan yang disebut dengan *micellar*.



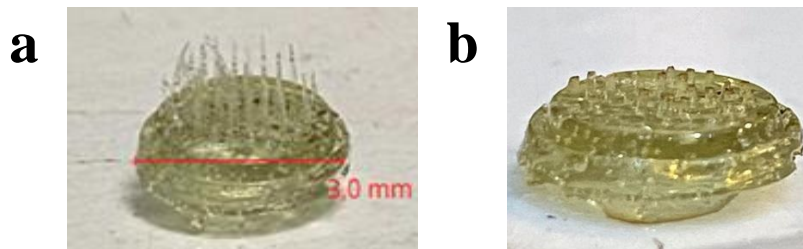
Gambar 5. Visualisasi mikroskop nanoemulsi formula optimum menggunakan perbesaran 1000x (a) dan overview ukuran droplet nanoemulsi yang dianalisis dengan software Image-J (b).

Visualisasi secara mikroskopik dilakukan untuk melihat ukuran partikel sistem nanoemulsi yang terbentuk. Pengujian ini bertujuan untuk melihat ukuran *droplet* nanoemulsi secara kualitatif yang merupakan justifikasi dari hasil analisis ukuran partikel (Gambar 5).

3.4. Pembuatan transdermal *patch* dengan *microneedle*

Sediaan *microneedle patch* yang dibuat menggunakan kombinasi polimer HPMC, PVA, dan PVP. Interaksi dari bahan PVA dan PVP maupun HPMC dan PVP tidak menimbulkan iritasi pada pengujian kulit (Bhatia *et al.*, 2012). Dalam sediaan *patch*, HPMC berperan sebagai basis yang nantinya dapat mengikat sediaan nanoemulsi dengan komponen polimer pembentuk *patch* lain (Zakaria *et al.*, 2021). HPMC sebagai polimer tidak larut air memiliki bentuk kristal yang akan membentuk *barrier* bagi pergerakan molekul. PVP atau polivinil pirolidon merupakan polimer larut air yang mampu mengembang dan membentuk konsistensi menyerupai gel. Hal ini akan membentuk lapisan alami seperti pori pori yang dapat mempermudah molekul obat berdifusi keluar sediaan (Sateeh *et al.*, 2002). PVP memiliki sifat hidrofilik dan memiliki titik leleh yang rendah yang menjadi kunci meleburnya sediaan *microneedle transdermal patch* yang dibuat saat bersinggungan dengan suhu tubuh (Zakaria *et al.*, 2021). PVA sendiri merupakan polimer hidrofilik yang memiliki fungsi membentuk konsistensi atau kekerasan jarum pada sediaan. Menurut Ramadhani *et al.*, (2017) sediaan *patch* dengan perbandingan PVA yang lebih tinggi menghasilkan nilai ketebalan dan kekuatan *patch* yang lebih tinggi pula.

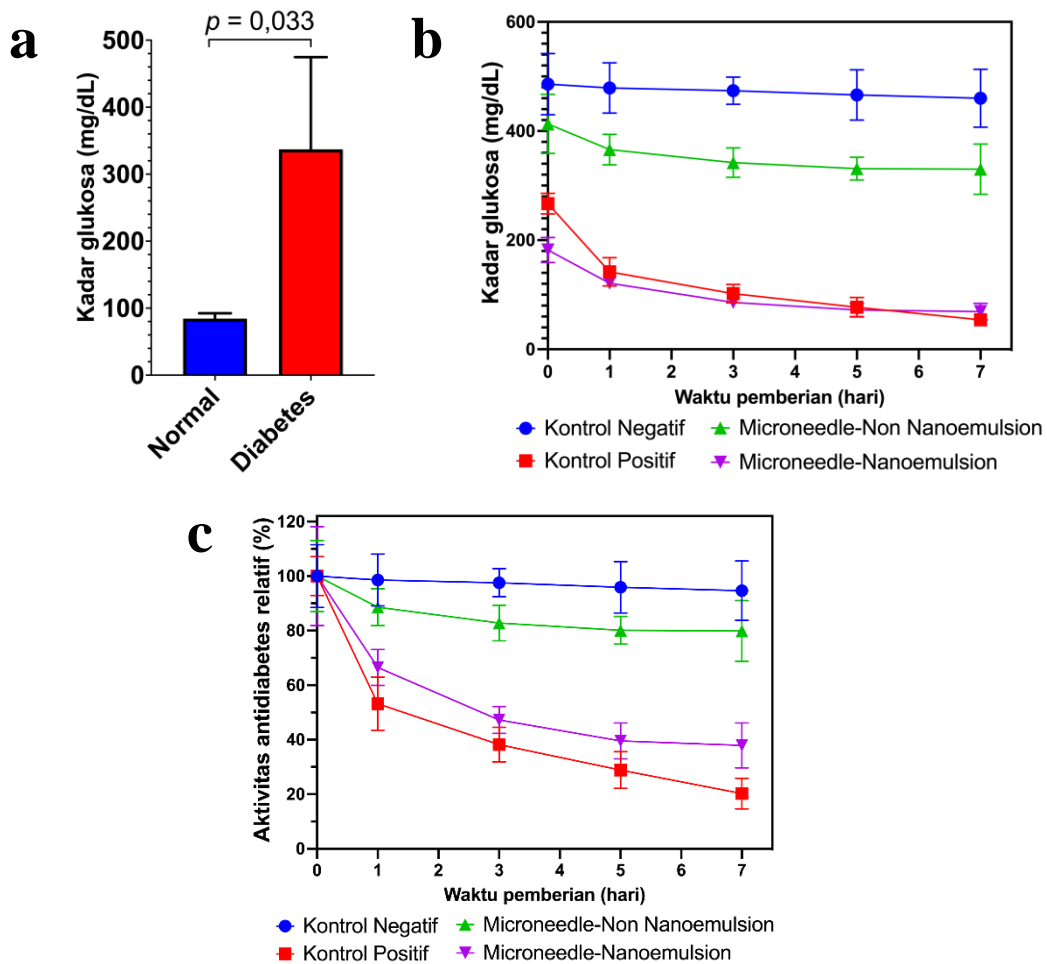
Hasil pembuatan *microneedle nanoemulsi* isolat daun afrika dapat dilihat pada Gambar 6a. Hasil menunjukkan terbentuk jarum-jarum dari cetakan template dengan diameter antara rentang 100-250 μm . Menurut Ita (2017), ukuran *microneedle* harus memiliki diameter 100-500 μm sehingga jarum yang dihasilkan sudah masuk kriteria tersebut. Hasil karakterisasi secara fisik menunjukkan bahwa *microneedle patch* memiliki nilai *folding endurance* yang tinggi (>300 lipatan). Hasil ini menunjukkan ketahanan fisik dari *microneedle patch* yang juga tinggi sehingga dapat mempertahankan konsistensi bentuknya. Evaluasi secara mikroskopis dari *microneedle patch* setelah diaplikasikan dapat dilihat pada Gambar 6b. Hasil menunjukkan terjadinya proses *dissolving microneedle* pada jarum setelah 1 hari diberikan kepada tikus yang diikuti dengan terlepasnya nanoemulsi isolat daun afrika. Nanoemulsi yang dihasilkan akan distabilkan karena diinkorporasikan dalam basis hydrogel sebagai protective colloidal yang mampu mencegah coalescence atau agregat dari nanodroplet. Proses pemadatan akan memfiksasi nanodroplet terdispersi dalam pembawa *microneedle patch*.



Gambar 6. Visualiasi makroskopik *prototype* nanoemulsi isolat daun afrika terinkorporasi dalam sediaan *patch* microneedle (a) dan visualisasi *prototype* sediaan setelah diaplikasikan (b).

3.6. Pengukuran kadar glukosa darah

Pola penurunan kadar glukosa darah tikus dalam pengujian *in vivo* dapat membuktikan kekuatan sediaan transdermal *patch* nanoemulsi senyawa 11 β ,13-*dihydrovernonolide* dalam menurunkan kadar glukosa. Kelompok tikus yang digunakan adalah kontrol negatif, kontrol positif dengan menggunakan sediaan oral glibenklamid, kelompok perlakuan *patch* nanoemulsi, dan kelompok perlakuan *patch* larutan senyawa 11 β ,13-*dihydrovernonolide*.



Gambar 7. Kadar gula darah tikus setelah induksi aloksan (diabetes) (a) serta profil kadar gula darah (b) dan relatif aktivitas (c) penurunan kadar gula darah setelah pemberian *patch* microneedle.

Data kadar glukosa darah tikus menunjukkan tikus sudah mengalami diabetes dengan peningkatan kadar gula darah yang bermakna ($p < 0,05$) (Gambar 7a) dengan peningkatan sebesar 350%. Kadar glukosa darah tikus antar kelompok kemudian diperbandingkan untuk melihat profil penurunan kadar glukosa tiap kelompoknya. Gambar 7b menunjukkan penurunan yang didapat tidak bisa diperbandingkan karena kadar awal diabetes melitus tiap kelompoknya berbeda. Perbandingan kadar gula darah akan lebih *relevant* jika diukur kemampuan bahan aktif dalam menurunkan kadar gula darah diukur dalam bentuk presentase (Gambar 7c). Tiap kelompok dibuat dengan garis awal yang sama yaitu 100%. Kemudian penurunan kadar glukosa dapat dihitung dalam bentuk persen pula untuk bisa dibandingkan. Hasil menunjukkan bahwa profil penurunan paling tinggi berada pada kelompok kontrol positif dengan kadar glukosa tikus menurun hingga 80% dari kadar awal pada hari ketiga. Kontrol negatif menunjukkan hasil yang sesuai prediksi dengan tidak ada penurunan berarti. Pada kelompok perlakuan sediaan uji, kelompok *patch* transdermal nanoemulsi menunjukkan penurunan yang lebih baik, yaitu sekitar 40% dari kadar glukosa awal dibanding kelompok dengan *patch* transdermal non nanoemulsi yang hanya turun sekitar 20%. Hasil penelitian ini memberikan persentase penurunan yang lebih baik dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang memformulasikan senyawa 11 β ,13-*dihydroveranolide* dalam bentuk sediaan oral yang hanya mampu menurunkan kadar glukosa darah pada tikus sebesar 12,55% (Okoduwa *et al.*, 2021).

Penurunan kadar glukosa pada tikus uji dikaitkan dengan fungsi perbaikan sel β pankreas. Kelompok dengan sediaan *patch* nanoemulsi memiliki aktivitas penurunan yang lebih baik dibandingkan kelompok dengan *patch* non nanoemulsi. Hal ini dikaitkan dengan kemampuan nanoemulsi dalam berdifusi ke dalam sel tubuh yang lebih baik dibandingkan sediaan nonnanoemulsi yang memiliki ukuran lebih besar sehingga menghambat masuknya zat aktif ke dalam sel (Alkilani *et al.*, 2018).

4. Kesimpulan

Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) memiliki kandungan senyawa 11 β ,13-*dihydroveranolide* yang terbukti mampu menurunkan kadar gula darah ditunjukkan dari penurunan kadar glukosa darah tikus dalam pengujian secara *in vivo* pada kelompok yang diberi sediaan microneedle patch nanoemulsi isolat daun afrika. Isolat senyawa 11 β ,13-*dihydroveranolide* diperoleh dengan metode kromatografi kolom dan dilakukan pengujian FTIR. Isolat diformulasikan ke dalam nanoemulsi transdermal *patch* dengan *microneedle* untuk selanjutnya diujikan secara *in vivo* ke tikus. Keterbatasan dalam penelitian ini adalah tidak adanya sediaan antidiabetes *patch* transdermal konvensional sebagai kontrol positif sehingga belum dapat mewakili efektivitas *patch* transdermal yang dibuat. Periode penelitian ini terbatas

yaitu hanya empat bulan sehingga diperlukan desain penelitian yang efisien. Saran penelitian perlunya *monitoring patch* transdermal yang dibuat secara berkala untuk mengetahui efektivitas obatnya.

Ucapan Terimakasih

Terima kasih kami sampaikan kepada Belmawa Ristekdikti atas dukungan penelitian melalui pendanaan penelitian pada tahun 2022 dan Universitas Sebelas Maret atas dukungan terhadap penelitian. Terimakasih juga kami sampaikan kepada Gattefose (SaintPriest, Perancis), Abitect (Janesville, WI), BASF (Ludwigshafen, Jerman) yang telah memberikan bantuan bahan untuk formulasi.

Deklarasi Konflik Kepentingan

S. Choiri merupakan salah satu editorial member JPSCR, proses review dan editing dilakukan secara independen dan tidak memberikan pengaruh apapun. Semua penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan terhadap naskah ini.

Daftar Pustaka

- Alkilani, A. Z., M. T. C., Mc Crudden, dan Donnely. R. F. (2018). Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical development based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*, 7. 438-470.
- Bhatia, C., Sachdeva, M., dan Bajpai, M. (2012). Formulation and evaluation of transdermal patch of pregabalin. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(2), 569.
- Gelman, A., Goodrich, B., Gabry, J., dan Vehtari, A. (2019). R-squared for bayesian regression models. *The American Statistician*, 00: 1-3.
- Ita, K. (2017). Dissolving microneedles for transdermal drug delivery: Advances and challenges. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93, 1116–1127.
- Kim, Y., Park, J., dan Prausnitz, M. R., (2012), Microneedles for Drug and Vaccine Delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(14):1547–1568.
- Kuncahyo, I., Choiri, S., Fudholi, A., Martien, R. dan Rohman, A., (2019). Assessment of fractional factorial design for the selection and screening of appropriate components of a self-nanoemulsifying drug delivery system formulation. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9(4): 609.
- Najmi, A. S. (2018). Kepatuhan Pengobatan pada pasien diabetes melitus (Studi di Puskesmas wilayah Surabaya). *Skripsi*, Universitas Airlangga: Surabaya.
- Okoduwa, S. I. R., Umar, I. A., James, D. B., dan Inuwa, H, M. (2017). Validation of the antidiabetic effects of *Vernonia amygdalina* delile leaf fractions in fortified diet-fed streptozotocin treated rat model of type-2 diabetes. *Journal of Diabetology*, 8(3): 75-85.
- Okoduwa, S. I., Umar, I. I. A., James, D. B., Inuwa, H. M., Habila, J. D., dan Venditti, A. (2021). Bioguided fractionation of hypoglycaemic component in methanol extract of *Vernonia amygdalina*: an in vivo study. *Natural Product Research*, 35(24), 5943-5947.
- Pranoto, A. (2012). *Terapi Insulin pada Penderita Diabetes Mellitus Rawat Jalan dan Rawat Inap*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Pulungan, A. B., Annisa, D., dan Imada, S. (2019). Diabetes melitus tipe-1 pada anak: Situasi di Indonesia dan tata laksana. *Sari Pediatri*, 20(6):392-400.

- Ramadhani, U. K. S., Djajadisastra, J., dan Iskandarsyah, I. (2017). Pengaruh polimer dan peningkat penetrasi terhadap karakter penetrasi matriks sediaan *patch* transdermal karvedilol. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 15(2), 121-127.
- Setyawan, E. I., Padmanaba, I. G. P., Samirana, P. O., dan Mahamuni, L. P. K. (2016). Efek PEG 400 dan mentol pada formulasi *patch* ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap pelepasan senyawa polifenol. *Jurnal Farmasi Udayana*, 5(2), 12-18.
- Sateeh K., Vinod N., dan Ramesh P. (2002). Polymers in transdermal drug delivery systems. *Pharmaceutical technology*, 26(5), 62-81.
- Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ahmad, F. J., Khar, R. K., dan Ali, M. (2007). Design and development of oral oil in water ramipril nanoemulsion formulation: in vitro and in vivo assessment. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3(1), 28-44.
- Shaker, D. S., Ishak, R. A., Ghoneim, A., dan Elhuoni, M. A. (2019). Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. *Scientia Pharmaceutica*, 87(17), 1-34.
- Singh, D., Pradhan, M., Nag, M., dan Singh, M. R. (2015). Vesicular system: Versatile carrier for transdermal delivery of bioactives. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 43(4), 282-290.
- Srinatania, D., Sukarya, D., dan Lindayani, L. (2020). Gambaran kepatuhan minum obat ARV pada anak dengan HIV/AIDS. *Jurnal Keperawatan Komprehensif*, 6(1): 53-58.
- Sulamsi, E. S., Indriwati, S. E., dan Suarsini, E. (2016). Preparation of various type of medicinal plants simplicia as material of jamu herbal. In *International Conference on Education (ICE2) 2018: Education and Innovation in Science in the Digital Era* (pp. 1014-1024).
- Tandi, J., Mariani, N. M. I., dan Setiawati, N. P. (2019). Potensi Ekstrak Etanol Daun Afrika (*Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch. Bip, Ex walp) Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah dan Histopatologi Pankreas Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Streptocococin dan Pakan Tinggi Lemak. *Majalah Farmasetika*, 4(1): 66-77.
- Watkins, D. U. D. L. E. Y., dan Cooperstein, S. J. (1976). Effect of alloxan on islet tissue permeability: protection and reversal by dithiols. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 199(3), 575-582.
- Zakaria, N., Bangun, H., Vonna, A., Oesman, F., Khaira, Z., dan Fajrina, F. (2021). Pengaruh penggunaan polimer HPMC dan polivinil pirolidon terhadap karakteristik fisik transdermal *patch* natrium diklofenak. *Jurnal Sains & Kesehatan Darussalam*, 1(2), 58-66
- Zhang, Y., Cun, D., Kong, X., dan Fang, L. (2014). Design and evaluation of a novel transdermal *patch* containing diclofenac and teriflunomide for rheumatoid arthritis therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Science*, 9(5), 251-259.

