

LAPORAN KEMAJUAN PENELITIAN

Ringkasan Penelitian, terdiri dari 250-500 kata, berisi: latar belakang penelitian, tujuan penelitian, tahapan metode penelitian, luaran yang ditargetkan, uraian TKT penelitian yang ditargetkan serta hasil penelitian yang diperoleh sesuai dengan tahun pelaksanaan penelitian.

RINGKASAN

Urgensi penelitian ini adalah luka diabetes yang berkembang dapat meningkatkan risiko amputasi. Tingkat amputasi tungkai bawah pasien dengan DM adalah 15 kali lebih tinggi daripada pasien tanpa diabetes, dan sekitar 50%-70% dari semua amputasi tungkai bawah. Dampak amputasi sangat berpengaruh terhadap tekanan emosional dan fisik, produktivitas, kerugian finansial dan kualitas hidup yang menurun. Ekstrak etanol 70% daun mangga arumanis (*Mangifera indica* L) terbukti efektif menyembuhkan luka diabetes dan memiliki sifat antibakteri dengan kategori kuat. Disisi lain, poloxamer adalah surfaktan non-ionik yang banyak digunakan dalam perawatan luka karena membantu pembersihan luka, menekan agregasi dan denaturisasi protein, memperbaiki jaringan membran sel serta memiliki aktivitas antimikroba. Poloxamer 407 dan poloxamer 188 adalah dua poloxamer bersifat in situ gelling thermoresponsive systems. Poloxamer 407 terbukti meningkatkan laju proses penyembuhan luka. Sedangkan Poloxamer 188 memiliki khasiat memulihkan integritas seluler yang terbukti menutup pori-pori membran sel otot rangka dan fibroblas pada luka bakar, dapat berfungsi membalut luka, mengurangi rasa sakit, bengkak, dan radang. Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh formula sediaan thermoresponsive hydrogel system ekstrak etanol daun mangga arumanis (*Mangifera indica* L.) terstandard yang terbukti aman dan dapat membantu penyembuhan luka diabetes dengan mutu yang stabil.

Metode penelitian ini terdiri dari ekstraksi dan standarisasi ekstrak daun mangga, pembuatan sediaan gel thermoresponsiv dengan menggunakan poloxamer 407 dan 188 serta karakterisasi sifat fisik dari gel yang dihasilkan. Penelitian ini masuk dalam TKT 2, karena sebelumnya sudah dilakukan penelitian terkait aktivitas dan formulasi ekstrak daun mangga sebagai penyembuh ulkus diabetes. Pada penelitian ini, diperoleh perbandingan poloxamer 407 dan 188 sebesar 17% dan 2%. Basis formula yang diformulasikan dengan 7% ekstrak menghasilkan pH $4,52 \pm 0,02$; daya sebar $6,68 \text{ cm} \pm 0,16$; waktu gelasi $70,67 \text{ (s)} \pm 6,03$; swelling index $206,86 \text{ (\%)} \pm 83,58$; bobot penyemprotan $0,13 \text{ (g)} \pm 0,04$ dan viskositas $892,70 \text{ cps} \pm 21,29$

Luaran telah disesuaikan dengan panduan penelitian skema penelitian dasar. Luaran wajib berupa publikasi jurnal terakreditasi SINTA 2 dalam status submit.

Kata kunci maksimal 5 kata kunci. Gunakan tanda baca titik koma (;) sebagai pemisah dan ditulis sesuai urutan abjad

Ekstrak etanol 70%; Hydrogel; Luka; *Mangifera indica* L; Thermoresponsive

Hasil dan Pembahasan Penelitian, terdiri dari 1000-1500 kata, berisi: (i) kemajuan pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian, (ii) data yang diperoleh, (iii) hasil analisis data yang telah dilakukan, (iv) pembahasan hasil penelitian, serta (v) luaran yang telah didapatkan. Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. **Penyajian**

data dan hasil penelitian dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya serta didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

HASIL DAN PEMBAHASAN PENELITIAN

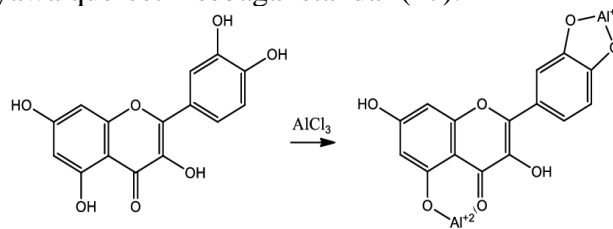
Ekstraksi dan Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Mangga

Ekstrak etanol daun mangga Arumanis dibuat menggunakan etanol 70% melalui metode maserasi (8). Keuntungan metode maserasi terletak pada prosesnya yang sederhana dan mudah, mampu melarutkan sebagian besar senyawa aktif sekaligus menghindari kerusakan pada unsur yang peka terhadap panas (11). Kandungan air dalam etanol 70% berfungsi sebagai zat pembengkakan pada bahan tanaman, meningkatkan permukaan kontak dengan pelarut ekstraksi. Penggunaan etanol dapat menyebabkan dehidrasi dan merusak sel tumbuhan akibat rusaknya dinding sel tumbuhan. Oleh karena itu, etanol 70% menunjukkan efek sinergis, meningkatkan efektivitas ekstraksi metabolit sekunder tumbuhan (11). Mangiferin merupakan molekul dengan polaritas menengah yang terkandung dalam daun mangga, juga larut dengan baik dalam etanol (12). Apalagi penggunaan etanol 70% direkomendasikan oleh Farmakope Herbal Indonesia Edisi II. Untuk mencegah hilangnya aktivitas antioksidan pada flavonoid dan degradasi mangiferin, proses penguapan menggunakan rotary evaporator dan waterbath dilakukan pada suhu tidak melebihi 50°C (7,11).

Ekstrak etanol yang dihasilkan menunjukkan warna coklat tua, rasa pahit, dan aroma khas daun mangga. Berat ekstrak pekat ditetapkan 378,215 gram, setelah pemanfaatan daun mangga Arumanis sebanyak 1500 gram. Proses ekstraksi ini menghasilkan persentase rendemen sebesar 25,214%, yang menunjukkan efektivitas metode ekstraksi.

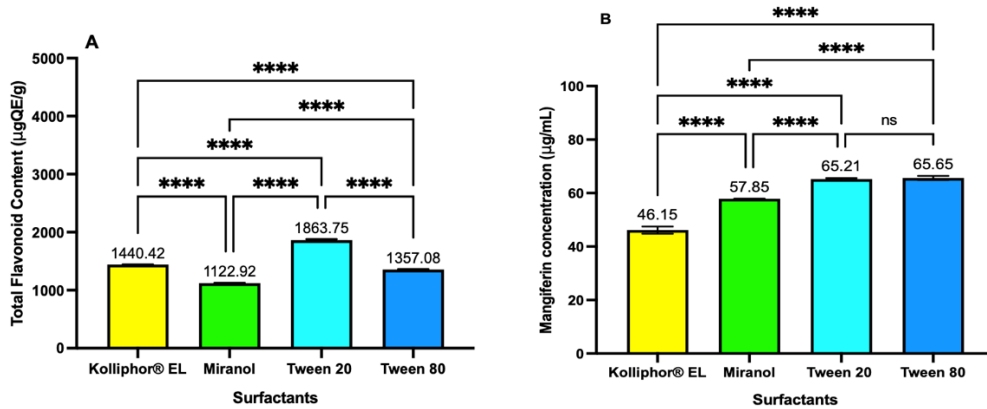
Identifikasi Flavonoid dan Mangiferin

Flavonoid diidentifikasi melalui reaksi dengan $AlCl_3$ sehingga menyebabkan terbentuknya kompleks antara ion aluminium dan senyawa flavonoid. $AlCl_3$ bereaksi dengan gugus hidroksil pada senyawa flavonoid membentuk kompleks warna yang dapat dideteksi menggunakan uji kolorimetri (Gambar 1). Konsentrasi flavonoid ditentukan berdasarkan kurva kalibrasi yang dibuat dengan menggunakan senyawa quercetin sebagai standar (17).

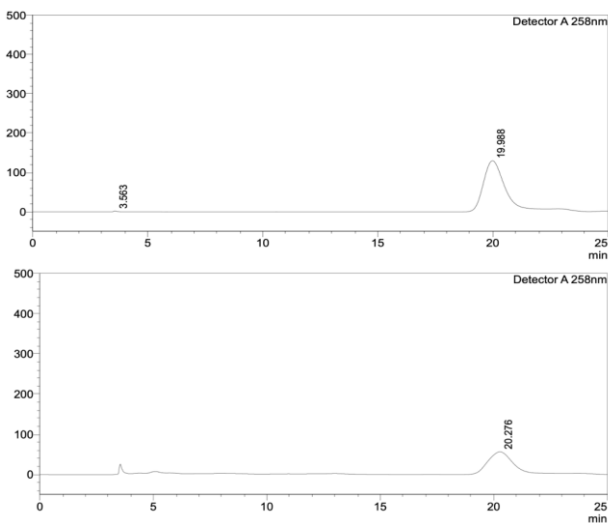


Gambar 2 menyajikan hasil analisis kuantitatif komprehensif yang bertujuan untuk mengevaluasi efek berbagai surfaktan terhadap kandungan total flavonoid dan konsentrasi mangiferin yang terkandung dalam supernatan ekstrak etanol daun mangga arumanis. Gambar tersebut menggambarkan perbandingan yang jelas dari kandungan total flavonoid dan konsentrasi mangiferin pada berbagai larutan surfaktan yang digunakan. Kelarutan optimal flavonoid total diamati pada Tween 20 dengan nilai $1863,750 \pm 0,838 \mu gQE/g$, diikuti oleh Kolliphor EL ($1440,417 \pm 0,265 \mu gQE/g$), Tween 80 ($1357,083 \pm 0,464 \mu gQE/g$), dan Miranol® C2M ($1122,917 \pm 0,340 \mu gQE/g$). Uji statistik menunjukkan bahwa kelarutan flavonoid berbeda nyata pada semua surfaktan (Gambar 2A). Tingginya kandungan flavonoid yang dilarutkan dalam Tween 20 tidak terduga karena beberapa penelitian menunjukkan bahwa kelarutan flavonoid lebih

tinggi ketika dilarutkan dengan Tween 80 dibandingkan dengan Tween 20 (18). Penelitian oleh Vigneshwari (2023) menunjukkan peningkatan kelarutan kuersetin flavonoid di Tween 80 dibandingkan Tween 20. Terdapat juga perbedaan polaritas antara Tween 20 dan Tween 80, ditandai dengan nilai keseimbangan hidrofilik-lipofilik (HLB) masing-masing sebesar 16,67 dan 13,82 (21). Ini menyiratkan bahwa Tween 20 menunjukkan polaritas yang lebih tinggi dibandingkan Tween 80 (20,22). Sifat hidrofilik zat yang diekstraksi dengan etanol 70% membuatnya lebih mudah dilarutkan dalam Tween 20, sehingga kandungan total flavonoid pada ekstrak yang dilarutkan dengan Tween 20 tinggi.



Evaluasi kelarutan mangiferin ditentukan menggunakan metode kromatografi cair fase terbalik – kinerja tinggi (RP-HPLC) dengan kurva standar, seperti diilustrasikan pada bahan pelengkap bagian 2. Profil kromatografi standar menunjukkan respon kromatogram mangiferin pada menit ke 19.988, seperti yang digambarkan pada Gambar 3A. Profil kromatografi mangiferin pada sampel muncul pada waktu yang mendekati standar, yaitu pada menit ke 20.276 (Gambar 3B). Hasil waktu retensi yang diperoleh sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Retnaningtyas dkk (2019) yang menunjukkan waktu menit 18.939 (10). Hal ini menegaskan adanya kemiripan komponen senyawa yang diuji dengan standar mangiferin yang digunakan. Hasil analisis menunjukkan bahwa kelarutan mangiferin tertinggi dicapai pada Tween 80 ($65,645 \pm 1,207$) µg/ml antar surfaktan, diikuti oleh Tween 20, Miranol C2M, dan Kolliphor EL (Gambar 2)



Rancangan Formula

Ekstrak daun mangga yang sudah ditetapkan kadar flavonoid dan mangiferin selanjutnya akan dibuat dalam sediaan termosensitif hidrogel. Rancangan formula hidrogel adalah sebagai berikut.

Tabel 1. Rancangan formula

Bahan
Ekstrak daun mangga
Natrium alginat
Poloxamer 407
Poloxamer 188
Tween 20
Natrium benzoat
Akuades

Pembuatan Basis *Thermosensitive Hydrogel* Ekstrak Daun Mangga

Sebelum dibuat formula hidrogel secara lengkap, terlebih dahulu dilakukan optimasi basis gel. Penentuan komposisi basis sangat penting karena sangat berpengaruh pada terbentuknya gel yang sensitif terhadap perubahan suhu. Hal tersebut terutama sangat tergantung pada perbandingan poloxamer 407 dan 188 yang sangat menentukan apakah sediaan akan terbentuk gel pada suhu tertentu atau tidak. Percobaan pembuatan basis gel dibuat dengan trial and eror dengan tiga formula sebagai berikut :

Tabel 2. Formula basis termoresponsif hidrogel

Bahan	Formula 1	Formula 2	Formula 3
Natrium alginat	1,5	0,3	0,5
Poloxamer 407	3	2	17
Poloxamer 188	1,5	1	2
Tween 20	3,5	3,5	3,5
Natrium benzoat	0,1	0,1	0,1
Akuades	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Formula basis kemudian diuji waktu gelasinya sebagai parameter untuk menentukan formula basis terbaik yang akan diambil. Dari uji waktu gelasi diperoleh bahwa formula 1 dan 2 menunjukkan waktu gelasi lebih dari 20 menit. Sedangkan formula 3 memberikan hasil waktu gelasi kurang dari 2 menit. Dari hasil tersebut selanjutnya dipilih formula3 sebagai basis sediaan gel ekstrak daun mangga.

Pembuatan *Sprayable Thermosensitive Hydrogel* Ekstrak Daun Mangga

Tahap akhir pembuatan *sprayable thermosensitive hydrogel* adalah dengan mencampurkan larutan basis dan larutan ekstrak menggunakan *magnetic stirrer* hingga tidak terbentuk gumpalan. *Aluminium foil* digunakan untuk melapisi gelas beker pada saat penambahan larutan ekstrak ke dalam larutan basis agar zat aktif tidak teroksidasi. Titik kritis dari proses ini adalah pengadukan yang homogen dan konstan hingga diperoleh hasil yang maksimal. Formula ekstrak yang dimasukkan dalam formula mengikuti penelitian yang telah dilakukan sebelumnya (2) dengan konsentrasi, 5%, 6% dan 7%.

Evaluasi Fisik Sediaan *Sprayable Thermosensitive Hydrogel* Ekstrak Daun Mangga

Tabel 3. Hasil evaluasi fisik sediaan

Uji Evaluasi	Sampel			
	Plasebo	F1	F2	F3
pH	7,01 ± 0,02	5,03 ± 0,02	4,67 ± 0,03	4,52 ± 0,02
Daya Sebar (cm)	10,17 ± 0,15	5,20 ± 0,20	6,17 ± 0,15	6,68 ± 0,16
Waktu Gelasi (s)	52,33 ± 2,52	88,67 ± 4,58	85,00 ± 4,58	70,67 ± 6,03
<i>Swelling Index</i> (%)	230,05 ± 83,27	201,29 ± 83,27	205,43 ± 83,01	206,86 ± 83,58
Bobot Penyemprotan (g)	-	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,13 ± 0,04
Viskositas (25°C)	808,92 ± 18,96	995,07 ± 3,47	933,71 ± 20,12	892,70 ± 21,29

Tabel 4. Hasil evaluasi fisik sediaan

Formula	Hasil Organoleptik	Homogenitas
Plasebo	Cair, jernih, dan tidak berbau	Homogen
F1	Cair, jernih kuning kecoklatan, dan berbau khas ekstrak daun rambutan	Homogen
F2	Cair, jernih kuning kecoklatan lebih pekat dari F1, dan berbau khas ekstrak daun rambutan	Homogen
F3	Cair, jernih kuning kecoklatan paling pekat, dan berbau khas ekstrak daun rambutan	Homogen

Evaluasi fisik sediaan terdiri dari uji *organoleptik*, uji homogenitas, uji waktu gelasi, uji pH, dan uji *swelling index*. Hasil uji organoleptik sesuai dengan hasil evaluasi fisik (Tabel 3). Semua formula dikatakan homogen karena tidak adanya partikel yang terlihat pada sediaan. Uji pH dilakukan untuk mengetahui kesesuaian sediaan terhadap pH kulit sehingga tidak mengakibatkan iritasi dan aman digunakan pada kulit. Menurut Pratasik *et al.* (9), pH yang sediaan topikal yang sesuai untuk kulit yakni 4,5-6,5. Berdasarkan hasil diperoleh bahwa semua formula masuk ke dalam rentang persyaratan sesuai dengan tabel 3.

Uji daya sebar untuk mengetahui kemampuan basis menyebar sehingga dapat dikatakan mudah saat dioleskan pada kulit. Berdasarkan hasil riset, formula 3 memiliki daya sebar yang paling luas yakni 6,68 cm. Hal ini menunjukkan formula 3 memenuhi persyaratan daya sebar yang baik yakni pada 5-7 cm (9). Uji gelasi merupakan pengujian yang dilakukan untuk mengetahui waktu suatu sediaan cair untuk meningkat viskositasnya ke suatu titik dimana cairan tersebut menjadi gel. Menurut Abbasi *et al.* (11), waktu gelasi yang baik adalah sediaan mampu menjadi gel pada waktu kurang dari 180 detik. Berdasarkan hasil riset, formulasi 3 menunjukkan hasil

terbaik karena memiliki waktu gelasi tercepat. Waktu gelasi yang cepat berpengaruh dalam mencegah drainase dari tempat aplikasi zat aktif dan waktu tinggal di area aplikasi untuk pelepasan yang lama.

Menurut Fadiana dan Haryanto (12), rasio *swelling* yang baik sebagai pembalut luka adalah 200-500%. Berdasarkan hasil riset, semua formula masuk ke dalam rentang rasio *swelling index* yang baik sebagai pembalut luka sehingga eksudat dapat diserap dengan maksimal oleh sediaan gel termosensitif.

Uji bobot penyemprotan dilakukan untuk mengetahui keseragaman bobot sediaan setiap kali penyemprotan. Berdasarkan hasil riset, F3 menunjukkan hasil terbaik yaitu 0,13 gram dengan memenuhi persyaratan bobot penyemprotan yang baik yaitu 0,11-0,35 gram (12).

Uji viskositas merupakan uji yang digunakan untuk menetapkan suatu kekentalan sediaan. Persyaratan viskositas hidrogel yang berkisar diantara 2522.1 cP-6213.5 cP (12). Berdasarkan hasil riset, adanya pengoptimasi akan menaikkan nilai viskositas hidrogel.

Status Luaran, berisi **jenis, identitas** dan **status ketercapaian setiap luaran wajib** dan **luaran tambahan** (jika ada) yang dijanjikan. **Lampirkan bukti dokumen** ketercapaian luaran wajib dan luaran tambahan. Jenis luaran dapat berupa publikasi, perolehan kekayaan intelektual, hasil pengujian atau luaran lainnya yang telah dijanjikan pada proposal. Uraian status luaran harus didukung dengan **bukti kemajuan** ketercapaian luaran sesuai dengan luaran yang dijanjikan. Lengkapi isian jenis luaran yang dijanjikan. Jika sudah ada bukti hasil cek plagiarisme untuk karya tulis ilmiah dilampirkan (similaritas 25%)

STATUS LUARAN

Luaran untuk luaran ini berupa jurnal nasional. Naskah publikasi dalam tahapan penyusunan dan persiapan submit. Draft terlampir.

Peran Mitra berupa **realisasi kerjasama** dan **kontribusi Mitra** baik *in-kind* maupun *in-cash* (untuk Penelitian Terapan dan Pengembangan). Bukti pendukung realisasi kerjasama dan realisasi kontribusi mitra **dilaporkan** sesuai dengan kondisi yang sebenarnya. **Lampirkan** bukti dokumen realisasi kerjasama dengan Mitra.

PERAN MITRA

.....

.....

Kendala Pelaksanaan Penelitian berisi kesulitan atau hambatan yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan.

KENDALA PELAKSANAAN PENELITIAN

.....

.....

Rencana Tahapan Selanjutnya berisi tentang rencana penyelesaian penelitian dan rencana untuk mencapai luaran yang dijanjikan jika belum tercapai.

RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA

.....

.....

Daftar Pustaka disusun dan ditulis **berdasarkan sistem nomor** sesuai dengan urutan pengutipan. **Hanya pustaka yang disitasi/diacu** pada laporan kemajuan saja yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka. **Minimal 15 referensi.**

DAFTAR PUSTAKA

1. Yazdanpanah L. Literature review on the management of diabetic foot ulcer. World J Diabetes. 2015;6(1).
2. Afrinanda R. Formulasi dan Uji Efektivitas Gel Ekstrak Etanol 70% Daun Mangga Arumanis (Mangifera Indica L.) Sebagai Penyembuh Luka Diabetes pada Tikus Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Streptozotocin. Universitas Ahmad Dahlan; 2019.
3. Ristiawati Y. Formulasi Gel Ekstrak Purifikasi Klorofil Daun Mangga (Mangifera Indica L.) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus Dan Pseudomonas aeruginosa. Universitas Ahmad Dahlan; 2022.
4. Noviana IM. Pengaruh Penyimpanan pada Aktivitas Antibakteri Gel Ekstrak Daun Mangga Arumanis (Mangifera Indica L.) Terpurifikasi Terhadap Bakteri Staphylococcus Aureus. Universitas Ahmad Dahlan; 2021.
5. Safitri S, Miyarso C, Fitriyati L. Uji Anti Luka Bakar Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Mangga Arumanis (Mangifera indica L.) Dan Daun Salam (Syzygium polianthum (Wight) Walp.)

Terhadap Penyembuhan Luka Bakar Derajat II A Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *J Farm Klin dan Sains*. 2022;2(2).































6. Kintoko K, Karimatulhaji H, Elfasyari TY, Ihsan EA, Putra TA, Hariadi P, et al. Effect of Diabetes Condition on Topical Treatment of Binahong Leaf Fraction in Wound Healing Process. *Maj Obat Tradis*. 2017;
7. Huang YY, Lin CW, Cheng NC, Cazzell SM, Chen HH, Huang KF, et al. Effect of a Novel Macrophage-Regulating Drug on Wound Healing in Patients with Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open*. 2021;4(9).
8. Dumville JC, Lipsky BA, Hoey C, Cruciani M, Fison M, Xia J. Topical antimicrobial agents for treating foot ulcers in people with diabetes. Vol. 2017, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017.
9. Soliman KA, Ullah K, Shah A, Jones DS, Singh TRR. Poloxamer-based in situ gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications. Vol. 24, *Drug Discovery Today*. 2019.
10. Fatimah SF, Lukitaningsih E, Martien R, Nugroho AK. Bibliometric analysis of articles on nanoemulsion and/or in-situ gel for ocular drug delivery system published during the 2011–2021 period. *Pharmacia*. 2022;69(2).
11. Percival SL, Chen R, Mayer D, Salisbury AM. Mode of action of poloxamer-based surfactants in wound care and efficacy on biofilms. *Int Wound J*. 2018;15(5).
12. Kim TI, Jung W, Chung J-Y, Jeong H, Kim SH. Effect of a poloxamer-based thermosensitive gel on rotator cuff repair in a rabbit model: a controlled laboratory study. *J Orthop Surg Res*. 2019;14(1):190.
13. Fang L, Wu H, Li X, Fang J, Zhu Y. Improvement of Skin Wound Healing for Diabetic Mice with Thermosensitive Hydrogel Combined with Insulin Injection. Giribabu N, editor. *Int J Endocrinol*. 2022;2022:7847011.
14. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2017.
15. Tan G, Yu S, Li J, Pan W. Development and characterization of nanostructured lipid carriers based chitosan thermosensitive hydrogel for delivery of dexamethasone. *Int J Biol Macromol*. 2017;103.
16. Mahboobian MM, Mohammadi G, Mohammadi M. Thermosensitive brinzolamide in situ gel nanoemulsions, in vitro and ex vivo evaluation. *Biointerface Res Appl Chem*. 2021;11(1).
17. Wang L, Pan H, Gu D, Li P, Su Y, Pan W. A composite System Combining Self-Targeted Carbon Dots and Thermosensitive Hydrogels for Challenging Ocular Drug Delivery. *J Pharm Sci*. 2021;
18. Chu Y, Chai S, Li F, Han C, Sui X, Liu T. Combined Strategy of Wound Healing Using Thermo-Sensitive PNIPAAm Hydrogel and CS/PVA Membranes: Development and In-Vivo Evaluation. *Polymers (Basel)*. 2022;14(12).
19. Andrgie AT, Darge HF, Mekonnen TW, Birhan YS, Hanurry EY, Chou HY, et al. Ibuprofen-loaded heparin modified thermosensitive hydrogel for inhibiting excessive inflammation and promoting wound healing. *Polymers (Basel)*. 2020;12(11).
20. Wang J, Zhao B, Sun L, Jiang L, Li Q, Jin P. Smart thermosensitive poloxamer hydrogels loaded with Nr-CWs for the treatment of diabetic wounds. *PLoS One*. 2022;17(12 December).
21. Xu Z, Liu Y, Ma R, Chen J, Qiu J, Du S, et al. Thermosensitive Hydrogel Incorporating Prussian Blue Nanoparticles Promotes Diabetic Wound Healing via ROS Scavenging and Mitochondrial Function Restoration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2022 Mar;14(12):14059–71.

22. Gondi M, Prasada Rao UJS. Ethanol extract of mango (*Mangifera indica* L.) peel inhibits α -amylase and α -glucosidase activities, and ameliorates diabetes related biochemical parameters in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *J Food Sci Technol*. 2015;52(12).

LAMPIRAN-LAMPIRAN:

- a. Luaran wajib penelitian dan status capaiannya
- b. *Logbook* (Catatan Harian) (diinput dan diunduh dari portal)

Logbook Kegiatan

No	Tanggal	Kegiatan	Catatan	File Bukti	Aksi
1	22 November 2023 - 10:00:00	Penyusunan draft luaran			 
2	13 November 2023 - 08:00:00	Analisis Data			 
3	01 November 2023 - 08:20:00	Evaluasi sediaan gel			 
4	30 Oktober 2023 - 08:00:00	Evaluasi sediaan gel			 
5	26 Oktober 2023 - 08:00:00	Pembuatan formula gel daun mangga			 
6	20 Oktober 2023 - 08:00:00	Uji waktu gelasi gel			 
7	19 Oktober 2023 - 08:15:00	Uji waktu gelasi basis gel			 
8	16 Oktober 2023 - 09:00:00	Trial basis gel dengan pengadukan di kulkas			 
9	11 Oktober 2023 - 09:00:00	Identifikasi kandungan flavonoid dan mangiferin			 
10	20 September 2023 - 08:00:00	Uji waktu gelasi basis gel			 
11	18 September 2023 - 08:00:00	Trial basis termoresponsive gel			 
12	05 September 2023 - 09:00:00	Evaporasi ekstrak daun mangga			 
13	31 Agustus 2023 - 08:00:00	Maserasi simplisia daun mangga			 
14	28 Agustus 2023 - 09:00:00	Penyerbukan simplisia daun mangga			 
15	21 Agustus 2023 - 08:05:00	Pengeringan daun mangga menggunakan oven			 

Investigating the Impact of Surfactant and Cosolvent on the Polyphenolic Content in Arumanis Mango Leaf Extract (*Mangifera indica* L.)

1st Siti Fatmawati Fatimah¹

2nd Verda Farida²

3rd Yudha Rizqi Nuari³

4th Daniek Vivianhari⁴

5th Deasy Vanda Pertiwi^{5*}

^{1,2,3,5} Faculty of Pharmacy, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta

⁴ Faculty of Pharmacy, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA Jakarta

*email: deasy.pertiwi@pharm.uad.ac.id

Keywords:

Co-solvent

Extract

Mangifera indica L.

Surfactant

Abstract

The leaf of *Mangifera indica* L. contains flavonoids and mangiferin which showed positive effects on wound healing of diabetic ulcer. In a formula of thermosensitive gel, the used of suitable surfactant and co-solvent is required to ensure the high solubility of the active pharmaceutical ingredient (API), thereby optimizing the efficacy. This study aims to determine the ideal surfactant and cosolvent for a thermosensitive hydrogel formula of *Mangifera indica* leaf ethanol extract. The leaf was extracted by maceration using 70% ethanol then determined for moisture content. The extract was prepared for solubility tests of flavonoid and mangiferin on surfactants (Kolliphor® EL, Tween® 20, Tween® 80, Miranol® C2M) and co-solvents (Glycerin, PEG 400, and transcitol). Methods for total flavonoids content were Spectrophotometry UV-Vis and mangiferin with RP-HPLC method. The moisture content in the extract is $8.590 \pm 0.754\%$. The surfactant demonstrating the highest capability in flavonoid dissolution is Tween 20 ($1863.750 \pm 0.838 \mu\text{gQE/g}$ extract), followed by Tween 80, Kolliphor EL, and Miranol C2M. In the context of co-solvents, PEG 400 ($1309.583 \pm 0.292 \mu\text{gQE/g}$ extract) show superior flavonoid dissolution capability, with glycerin and Transcutol following in descending order. Tween 20 and Tween 80 exhibit comparable efficacy in mangiferin dissolution, followed by Miranol C2M and Kolliphor EL. Among co-solvents, Transcutol demonstrate the highest aptitude for mangiferin dissolution, succeeded by PEG 400 and glycerin. This study indicates Tween 20 is a preferable surfactant and PEG 400 was considered as co-solvent to be further used in a thermosensitive gel formula for diabetic ulcer

Received: Month Year

Accepted: Month Year

Published: Month Year



© year The Authors. Published by Institute for Research and Community Services Universitas Muhammadiyah Palangkaraya. This is Open Access article under the CC-BY-SA License

INTRODUCTION

Ethanol extract from Arumanis mango (*Mangifera indica* L.) leaf is effective in healing diabetic wounds because it contains compounds such as flavonoids as antioxidants and mangiferin. Antioxidant activity can protect skin cells from oxidative damage and accelerate wound healing in inflammatory conditions, thus potentially accelerating the healing of diabetic wounds. Apart from that, flavonoid compounds also have an

antibacterial role which can prevent infection in wounds (1,2).

The ethanol extract of mango leaves can be formulated in hydrogel dosage form. Topical hydrogel preparations can provide fluid to necrotic wounds, exfoliate the wound, and encourage autolysis. Hydrogel is the best choice for treating dry wounds and can achieve debridement rates 50% faster than wet dressings, and also provides hydrating, wound cooling,

analgesic effects and is more cost effective. However, topical preparations also have potential disadvantages, including difficulty to administer the dose accurately, difficulty in applying in narrow areas, and most patients use their hands to apply the preparation in multi-purpose containers, thereby allowing contamination of the preparation during repeated use (3). Thermoresponsive hydrogel systems are in situ gelling systems from polymer solutions that undergo a sol-gel transition in response to changes in temperature (4). With thermoresponsive hydrogel systems technology, the hydrogel solution will form a gel after being dropped on the wound in response to body temperature, making it easier for users when the preparation is applied to areas that are difficult to reach and can avoid contamination of the preparation because the preparation only needs to be dripped without applying. Besides that, the drip volume can be adjusted so that the dose can be measured more accurately.

In this thermoresponsive hydrogel formula, surfactants are needed to reduce the surface tension between the extract and the thermogel base to obtain preparation with evenly dispersed and homogenous active substances. Based on this background, this research aims to determine the most appropriate surfactant that can be used in a standardized thermoresponsive hydrogel preparation formula of 70% ethanol extract of Arumanis mango leaves (*Mangifera indica* L.) which is proven to bind flavonoids and mangiferin optimally.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Mangifera indica L. leaves, ethanol (Merck®), toluene (Merck®), Mg powder (Merck®), HCl (Merck®), FeCl₃ (Merck®), Tween® 20 (PT Brataco), Tween® 80 (PT Brataco), Kolliphor EL (Sigma Aldrich®), Transcutol (provided by PT Rohto Laboratories Indonesia), Miranol C2M (PT Kemiko Indonesia), glycerin (PT Brataco), PEG 400 (Kimia Marjet), phosphoric acid (Merck®), methanol HPLC (Merck®), mangiferin standard (Sigma Aldrich®), quercetin standard (Sigma Aldrich®), AlCl₃ (Merck®), Na-acetate (Merck®), and distilled water (PT Widatra).

Methods

Preparation of Raw Materials from Arumanis Mango Leaves

Arumanis mango leaves (*Mangifera indica* L.) were subjected to a rigorous cleansing with distilled water, followed by a controlled drying process at 45°C for 3-4 days in an oven (BINDER, Germany). The dried leaves exhibited a dark brown coloration, and upon manual compression, demonstrated a friable texture due to the absence of moisture. Subsequently, the leaves underwent a meticulous grinding process, and the resulting mango powder was sifted through a mesh with a standardized size of 40 (5).

Preparation of Ethanolic Extract from Arumanis Mango Leaves

Extraction was conducted using 1500 grams of Arumanis mango leaf powder to a 70% ethanol solvent in a container, totaling 3600 mL. The method employed was maceration for a 24-

hour duration at room temperature. Following this period, the solution was filtered using paper assisted by a Buchner funnel. Subsequently, a re-maceration process was initiated for an additional 24 hours, repeated thrice (6). Filtrates were consolidated and subjected to evaporation using a Rotary Vacuum Evaporator (Heidolph, Germany) at 50°C, aimed at eliminating residual ethanol in the extract. The resultant solution was transferred to a porcelain dish and heated in a water bath (Memmert®, Germany) at 50°C until a concentrated extract was obtained (7). The yield was calculated according to Equation 1 (8).

$$\text{Yield} = \frac{\text{Final weight}}{\text{Initial weigh}} \times 100\% \quad \dots (1)$$

Moisture Content Determination

The assessment followed the guidelines outlined in Indonesian Herbal Pharmacopoeia Edition II for Moisture Content determination (<83>), employing either the azeotropic or toluene distillation method. Prior to the procedure, the receiving tube and condenser were cleaned and dried. Five grams of the extract were precisely weighed and put into a flask. Afterwards, 200 mL of saturated toluene was added to the round-bottom flask, and the apparatus was meticulously assembled. The round-bottom flask was subjected to heating for a duration of 15 minutes. Once the boiling initiates, distillation was adjusted at a rate of 2 drops per second, progressively increasing to 4 drops per second. Distillation was done for 5 minutes until the receiving tube reached room temperature. In the event of water droplets adhering to the walls of the receiving tube, a rubber apparatus attached to a copper wire was

utilized to rub the tube, moistened with toluene until the water droplets went down. Subsequent to this, the water volume was recorded (8). The moisture content was calculated according to Equation 2.

$$\begin{aligned} & \% \text{ Moisture content} \\ & = \frac{\text{Water volume (ml)} \times 1 \text{ gram/ml}}{\text{Sample weight (gram)}} \times 100\% \quad \dots (2) \end{aligned}$$

Solubility Test Samples Preparation

A mass of 500 mg of concentrated Arumanis mango leaf ethanolic extract was precisely weighed and supplemented with a surfactant or co-solvent to achieve a total mass of 3 grams. The surfactants and co-solvents used in this research were presented in Table 1. The mixture underwent sonication (Elmasonic S 30H®, Germany) for 30 minutes, followed by stirring using a magnetic stirrer (Thermo Fisher Scientific, USA) at a speed scale of 5 for 24 hours. Then, the mixture was centrifuged using table top centrifuge PLC-03 (Gemmy Industrial Corp., Taiwan) at a speed of 3000 rpm for 15 minutes. The resulting filtrate was obtained and stored in amber vials in cool temperature.

Table 1. List of Surfactants and Co-solvents Utilized in the Study

Surfactant	Co-solvents
Kolliphor EL	Glycerin
Miranol C2M	PEG 400
Tween 20	Transcutol
Tween 80	

Determination of Total Flavonoids

The preparation of the standard curve involved weighing 10.0 mg of quercetin standard,

which was subsequently placed into a 25 ml volumetric flask. Ethanol was added to the mark, resulting in a solution concentration of 400 mg/L. Concentration series were established at 5, 10, 25, 50, 75, and 100 mg/L. From each concentration, 0.5 ml was combined with 1.5 ml of ethanol, and transferred into a 5 ml volumetric flask. The standard solution was added with 0.1 ml of 10% AlCl_3 and 1 ml of 1M Na-acetate. Distilled water was added to reach the mark, and the solution was transferred to a cuvette. The absorbance of the standard solution was measured at a wavelength of 438 nm using a UV-Vis spectrophotometer (UV-1800 Shimadzu Corporation) (9).

For sample analysis, 0.5 ml of the sample was added with 1.5 ml of ethanol in a 5 ml volumetric flask. The sample was then added with 0.1 ml of 10% AlCl_3 and 1 ml of 1M Na-acetate. Distilled water was added to the mark. The sample solution was transferred to a cuvette, and its absorbance was determined at a wavelength of 438 nm (9). The flavonoid content was calculated and expressed as quercetin equivalent (μg QE/mL) with quercetin serving as a standard.

Quantification of Mangiferin Content

The determination of mangiferin content was conducted according to the method developed by Retnaningtyas et al. (2020) with modifications (10). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (LC-2030C (-48); Shimadzu Corp., Japan) equipped with a UV detector was the analytical instrument of choice. The C18 YMC-Triart C18 column (L1), 4.6 mm x 250 nm S-5 μm , was utilized with a flow rate of 0.8 mL/min, a wavelength of 258 nm, and an injection volume of 20 μL . The

mobile phase consisted of a methanol and 0.1% phosphoric acid mixture in a 31:69 ratio utilizing an isocratic technique. Preparation of the 0.1% phosphoric acid solution involved diluting concentrated phosphoric acid with distilled water to achieve a concentration of 0.1%. The mobile phase mixture underwent degassing for 10 minutes and was subsequently filtered through a 0.22 μm Pall membrane filter (Merck, Germany).

The standard preparation was prepared by weighing 10 mg of mangiferin standard into a dry 10 ml volumetric flask. Methanol was added up to the mark, and the solution was stirred until completely dissolved. A series of standard curve concentrations were established by withdrawing specific volumes of the stock solution and diluting them with methanol to achieve concentrations of 5, 10, 30, 40, 70, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Sample preparation was done by weighing 10 mg of the sample into a dry 5 ml volumetric flask, followed by the addition of 3 ml of methanol. The solution underwent sonication for 10 minutes. Subsequently, methanol was added up to the mark, and the solution was agitated until homogeneously mixed. The resulting solution was then filtered using a 0.22 μm PTFE filter (Membrane solutions®).

Statistical analysis

The solubility assessments of flavonoids and mangiferin within the surfactant and cosurfactant groups was done using GraphPad Prism software version 10.0.1 (170). Graphs were also generated using the aforementioned software. Solubility datasets were subjected to one-way ANOVA to analyze the solubility of flavonoid and

mangiferin among individual surfactants and cosolvents. The degree of significance was denoted by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$. Conversely, if $p > 0.05$, the solubility test outcomes were considered statistically nonsignificant.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation and characterization of Ethanolic Extract from Arumanis Mango Leaves

The ethanolic extract of Arumanis mango leaves was prepared using 70% ethanol through the maceration method (8). The advantage of the maceration method lies in its simple and easy process, capable of dissolving a significant portion of active compounds while avoiding damage to heat-sensitive constituents (11). The water content in 70% ethanol serves as a swelling agent for plant materials, enhancing the contact surface with the extraction solvent. The use of ethanol can induce dehydration and damage plant cells due to the wall breakdown of the plant cells. Therefore, 70% ethanol exhibits a synergistic effect, enhancing the effectiveness of secondary plant metabolite extraction (11) including mangiferin, a molecule with intermediate polarity contained in mango leaves, also dissolves well in ethanol (12). Moreover, the usage of 70% ethanol is recommended by the Indonesian Herbal Pharmacopoeia Edition II. One of the reasons is because it can be easily (8). To prevent antioxidant activity loss in flavonoids and degradation of mangiferin, the evaporation process using a rotary evaporator and water bath was conducted at a temperature not exceeding 50°C (7,11).

Table 2. Attributes of the ethanolic extract derived from Arumanis mango leaves.

Parameter	Comments
Color	Dark brown
Taste	Bitter
Odor	Distinctive aroma of mango leaf
Yield	25.214%
Moisture content	8.59 ± 0.754% (<i>requirement: 5 - 30%</i>)

The properties of the ethanolic extract from Arumanis mango leaves can be seen in Table 2. The resulting ethanol extract exhibited a dark brown color, a bitter taste, and a distinctive aroma of mango leaf. The weight of the concentrated extract was determined to be 378.215 grams, following the utilization of 1500 grams of Arumanis mango leaf. This extraction process resulted in a yield percentage of 25.214%, highlighting the effectiveness of the extraction method.

Moisture content analysis is crucial due to the potential microbial and fungal growth associated with high water content in crude materials, ensuring the quality, safety, and efficacy of the product. In addition to compendial compliance, the toluene distillation method was chosen for its simplicity and speed. Toluene, with a lower density than water, facilitates the separation between toluene and water during distillation. Water was positioned below, while toluene remained above.

Prior to distillation, toluene saturation was conducted to purify it, as there might be residual water in the toluene. After adding the extract, the distillation process started until all the water content in the extract was drawn. Volume readings were taken when there were no more droplets on

the collection contained. The moisture content in the concentrated extract of Arumanis mango leaves was determined to be $8.590 \pm 0.754\%$, falling within the range of 5-30%, meeting the specified requirements (13). This result ensures the prevention of fungal and mold growth and signifies excellent storage stability, guaranteeing the quality of Arumanis mango leaf extract throughout its storage period (14).

Comparison of Surfactant Effectiveness in Dissolving Flavonoid & Mangiferin

In accordance with the Indonesian Herbal Pharmacopoeia (2017), unless stated otherwise in the monograph, the maceration process is carried out utilizing a 70% ethanol (8). This solvent selection aims to facilitate optimal extraction of all constituent components, both polar and nonpolar entities. The solubility of active extract components is essential for achieving uniform dispersion within the preparation. However, owing to the ethanol solvent extraction, certain non-polar constituents may exhibit poor solubility in water. Consequently, the incorporation of surfactants becomes imperative to enhance solubility and improve the homogeneity of active ingredients.

Surfactants can enhance the solubility of drug substances due to their amphiphilic structure. This characteristic enables surfactants to be frequently used for the dissolution of active ingredients with low water solubility by incorporating them into micelles. Non-ionic surfactants, particularly Tween 20, Tween 80, and Kolliphor EL, are preferred in pharmaceutical formulations over anionic and cationic surfactants

due to their higher efficacy and lower toxicity (15). Tween 20, for instance, has demonstrated efficacy in dissolving rosemary extract without inducing irritation, as evidenced in the Hen's Egg Test – Chorio Allantoic Membrane (HET-CAM) toxicity assessment. On the other hand, Miranol C2M, an amphoteric surfactant, exhibits distinctive features, including favorable water solubility, high surface activities, a wide isoelectric range, low critical micelle concentration (CMC), high foam stability, low toxicity, low irritation, excellent biodegradability, bioactivity, and interface change, among others (16).

To evaluate the efficacy of surfactants in enhancing the solubility of active constituents present in the ethanolic extract of Arumanis mango leaves, a specific quantity of concentrated extract was solubilized in the surfactants. To separate the dissolved and undissolved parts, the sample underwent centrifugation, and the resultant supernatant was acquired for further analysis. The quantification of soluble compounds was conducted by detecting the total flavonoids and mangiferin present in the supernatant.

Flavonoids were identified through a reaction with $AlCl_3$, leading to the formation of complexes between aluminum ions and flavonoid compounds. $AlCl_3$ reacts with hydroxyl groups on flavonoid compounds, forming color complexes that are detectable using colorimetric assay (Figure 1). The flavonoid concentration was determined based on the calibration curve made using quercetin compound as standard (17). The standard curve for quercetin can be seen in supplementary material section 1.

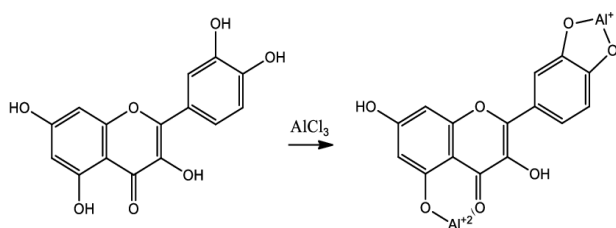


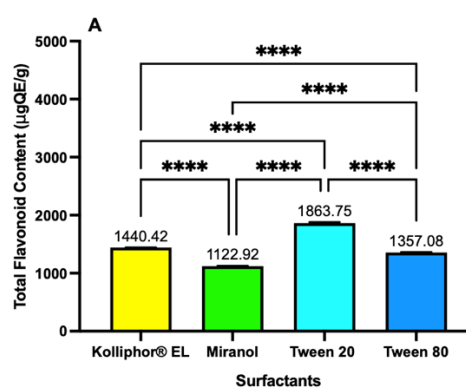
Figure 1. Formation of complexes through a reaction between hydroxyl groups present in flavonoids and aluminum chloride (AlCl_3).

Figure 2A presents the outcomes of a comprehensive quantitative analysis aimed at evaluating the impact of various surfactants on the total flavonoid content and mangiferin concentration contained in the supernatant of the ethanolic extract of arumanis mango leaves. The figure depicts a clear comparison of total flavonoid content and mangiferin concentration across the different surfactant solutions employed. The optimal solubility of total flavonoids is observed with Tween 20, with a value of $1863.750 \pm 0.838 \mu\text{gQE/g}$, followed by Kolliphor EL ($1440.417 \pm 0.265 \mu\text{gQE/g}$), Tween 80 ($1357.083 \pm 0.464 \mu\text{gQE/g}$), and Miranol® C2M ($1122.917 \pm 0.340 \mu\text{gQE/g}$). The statistical test showed that the solubility of flavonoids were significantly different in all surfactants (Figure 2A).

The high content of flavonoid solubilized in Tween 20 is unexpected since some research suggested that the solubility of flavonoids were higher upon solubilizing with Tween 80 than in Tween 20 (18). Research by Vigneshwari (2023) demonstrated enhanced solubility of the flavonoid quercetin in Tween 80 over Tween 20. Similarly, Erawati suggested that Tween 80 can elevate quercetin solubility in citrate buffer pH 4.5 ± 0.2 to a greater extent than Tween 20. Notably, both Vigneshwari and Erawati focused on singular quercetin, while our current investigation utilized

an extract containing various flavonoids, including cicerin-7-malonylglucoside, apigenin, apigenin 7-O-glucuronide, reynoutrin, and eupatorin (19). However, a study on the total flavonoid content in *Chrysanthemum morifolium* extracts indicated higher values when flowers were extracted using Tween 20 compared to extraction using Tween 80 (20).

Furthermore, the extraction of mango leaf constituents was carried out using 70% ethanol, a solvent known for its efficacy in extracting both polar and nonpolar components. However, the polar nature of 70% ethanol suggests a preference for the extraction of flavonoids with higher polarity. There is also a distinction in polarity between Tween 20 and Tween 80, characterized by their hydrophilic-lipophilic balance (HLB) values of 16.67 and 13.82, respectively (21). This implies that Tween 20 exhibits higher polarity than Tween 80 (20,22). The hydrophilic characteristics of substances extracted with ethanol 70% make it more easy to be solubilized in Tween 20, thus, a high total flavonoid content in extract solubilized with Tween 20.



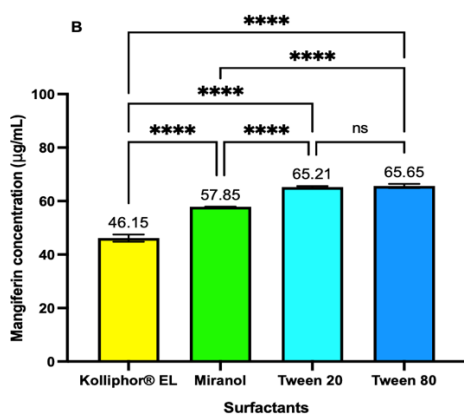


Figure 2. Quantitative analysis of Total Flavonoid Content (A) and Mangiferin Concentration (B) in different surfactant solutions. Total Flavonoid Content is expressed as quercetin equivalents ($\mu\text{g QE}$)/gram plant extract

The solubility evaluation of mangiferin was determined using the reverse phase - high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method with a standard curve, as illustrated in Supplementary material section 2. The chromatographic profile of the standard exhibits the mangiferin chromatogram response at minute 19.988, as depicted in Figure 3A. The chromatographic profile of mangiferin in the sample emerges at a time close to the standard, at minute 20.276 (Figure 3B). The obtained retention time results are closely aligned with the study conducted by Retnaningtyas et al (2019), indicating a time of minute 18.939 (10). This confirms the presence of similarity in the components of the tested compound with the mangiferin standard used. Analysis results reveal that the highest solubility of mangiferin is achieved with Tween 80 (65.645 ± 1.207) $\mu\text{g/ml}$ among surfactants, followed by Tween 20, Miranol C2M, and Kolliphor EL (Figure 2).

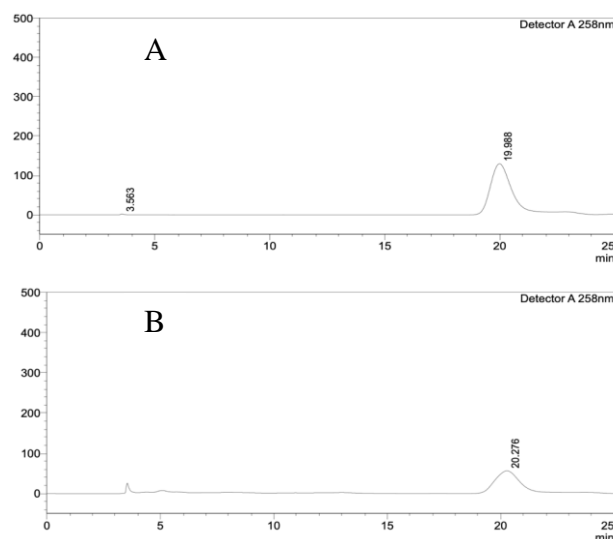


Figure 3. The chromatographic profile of the standard mangiferin (A) and sample (B) exhibits the retention time of mangiferin

Comparison of Co-solvent Effectiveness in Dissolving Flavonoid & Mangiferin

The addition of co-solvents is an effective strategy to enhance the solubility of nonpolar active ingredients by reducing the polarity of a considerable amount of solvents closer to the nonpolar solute (15). Transcutol has recently demonstrated efficacy as a cosolvent for improving the solubility of various poorly soluble drugs in aqueous solutions (23). Co-solvents like polyethylene glycol 400 (PEG 400), known for their inert properties, are frequently employed to improve the solubility of drug substances (24). Flavonoids and mangiferin, being polyphenolic compounds, prompt the selection of glycerin as co-solvents, proven to exhibit high effectiveness in the extraction process of polyphenols (25,26).

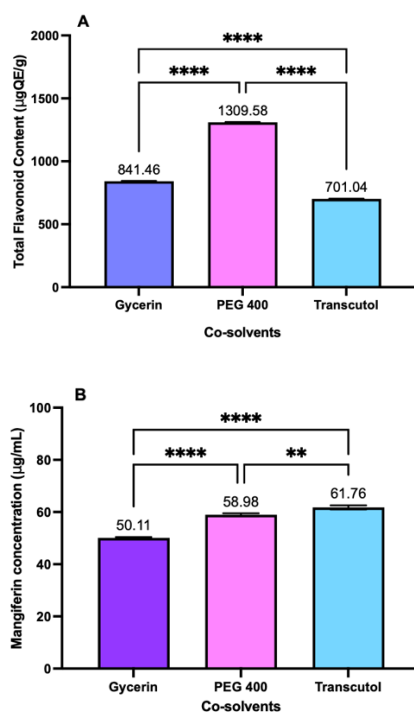


Figure 4. Quantitative analysis of Total Flavonoid Content (A) and Mangiferin Concentration (B) in different co-solvent solutions. Total Flavonoid Content is expressed as quercetin equivalents (μgQE)/gram plant extract

The results of the solubility assessments involving various co-solvents are illustrated in Figure 4. In this phase of the investigation, a selection of co-solvent solutions was strategically employed. The figure 4 presents a systematic comparison, offering a visual representation of the influence of these co-solvents on the solubility of flavonoids (A) and mangiferin (B). The study evaluated the co-solvents' capacity to enhance the extraction efficiency of total flavonoids and mangiferin. As indicated in Figure 4, the solubility of flavonoids is optimized when employing PEG 400 of $1309.583 \pm 0.292 \mu\text{gQE/g}$ extract, followed by glycerin ($841.458 \pm 0.374 \mu\text{gQE/g}$) and transcutol ($701.042 \pm 0.449 \mu\text{gQE/g}$). Conversely, transcutol (61.761 ± 1.314) $\mu\text{g/ml}$ emerges as the co-solvent with optimal mangiferin solubility,

followed by PEG 400 ($58.981 \pm 0.945 \mu\text{g/ml}$) and glycerin ($50.108 \pm 0.572 \mu\text{g/ml}$), with all exhibiting statistically significant differences.

PEG 400 demonstrates superior ability in dissolving flavonoids ($1309.583 \mu\text{g/ml}$), surpassing glycerin ($841.458 \mu\text{g/ml}$) by 1.56 times and transcutol ($701.042 \mu\text{g/ml}$) by 1.87 times. Regarding mangiferin solubility, PEG 400 displays a relatively lower value ($58.981 \mu\text{g/ml}$) than transcutol ($61.761 \mu\text{g/ml}$). However, the quantity of dissolved mangiferin in PEG 400 is only 0.95 times less than that dissolved in Transcutol. From this analysis, it can be concluded that PEG 400 stands out as the most optimal co-solvent for dissolving both flavonoids and mangiferin.

CONCLUSION

An investigation into the effects of surfactants and cosolvents has been conducted on the solubility of total flavonoids and mangiferin in Arumanis mango leaf extract (*Mangifera indica* Linn). Tween 20, as a surfactant, and PEG 400, as a cosolvent, emerge as promising candidates for enhancing the solubility of active compounds in Arumanis mango leaf extract. These components hold the potential for utilization in the formulation of topical thermosensitive in situ gel.

ACKNOWLEDGMENT

The authors express the gratitude to the Asosiasi Perguruan Tinggi Farmasi Muhammadiyah dan Aisyiah (APTFMA) for the Letter of Decision from the Management regarding the Research and Community Service Grant Collaboration for the year 2023, which was made possible by the grant number APTFM No: 04/L-APTFMA/VIII/2023 from the APTFMA.

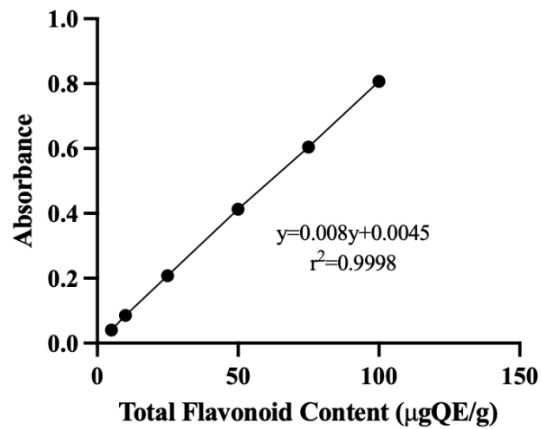
REFERENCES

1. Kintoko K, Karimatulhaji H, Elfasyari TY, Ihsan EA, Putra TA, Hariadi P, et al. Effect of Diabetes Condition on Topical Treatment of Binahong Leaf Fraction in Wound Healing Process. *Maj Obat Tradis*. 2017;
2. Safitri S, Miyarso C, Fitriyati L. Uji Anti Luka Bakar Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Mangga Arumanis (*Mangifera indica* L.) Dan Daun Salam (*Syzygium polianthum* (Wight) Walp.) Terhadap Penyembuhan Luka Bakar Derajat Ii A Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *J Farm Klin dan Sains*. 2022;2(2).
3. Dumville JC, Lipsky BA, Hoey C, Cruciani M, Fiscon M, Xia J. Topical antimicrobial agents for treating foot ulcers in people with diabetes. Vol. 2017, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017.
4. Soliman KA, Ullah K, Shah A, Jones DS, Singh TRR. Poloxamer-based in situ gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications. Vol. 24, *Drug Discovery Today*. 2019.
5. Afrinanda R. Formulasi dan Uji Efektivitas Gel Ekstrak Etanol 70% Daun Mangga Arumanis (*Mangifera Indica* L) Sebagai Penyembuh Luka Diabetes pada Tikus Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Streptozotocin. Universitas Ahmad Dahlan; 2019.
6. Sholikha M, Wulandari A. Tyrosinase Inhibition Activity and Phytochemical Screening of *Melaleuca leucadendron* L. Leaves. *Borneo J Pharm*. 2022;5(3).
7. Loan NTT, Long DT, Yen PND, Hanh TTM, Pham TN, Pham DTN. Purification process of mangiferin from *mangifera indica* l. Leaves and evaluation of its bioactivities. *Processes*. 2021;9(5).
8. Kemenkes R.I. *Farmakope Herbal Indonesia*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2017.
9. LPPT UGM. Lembar kerja uji kimia laboratorium pengujian ekstrak valerian dan katu. Yogyakarta; 2023. Report No.: DP/5.10.2/LPPT.
10. Retnaningtyas Y, Kristiningrum N, Renggani HD, Sary IP. Stability Indicating RP-HPLC for Quantification Mangiferin in Extract of Three Species Mango Leaves. *Indo J Chem Res*. 2020;8(1).
11. Rodríguez De Luna SL, Ramírez-Garza RE, Serna Saldívar SO. Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. Vol. 2020, *Scientific World Journal*. 2020.
12. Acosta J, Sevilla I, Salomón S, Nuevas L, Romero A, Amaro D. Determination of mangiferin solubility in solvents used in the biopharmaceutical industry. *J Pharm Pharmacogn Res*. 2016;
13. Purnama NS, Hasan H, Pakaya MS. Standarisasi Dan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Nangka (*Artocapus heterophyllus* L). *Indones J Pharm Educ*. 2021;1(3).
14. Zainab Z, Sulistyani N, Anisaningrum A.

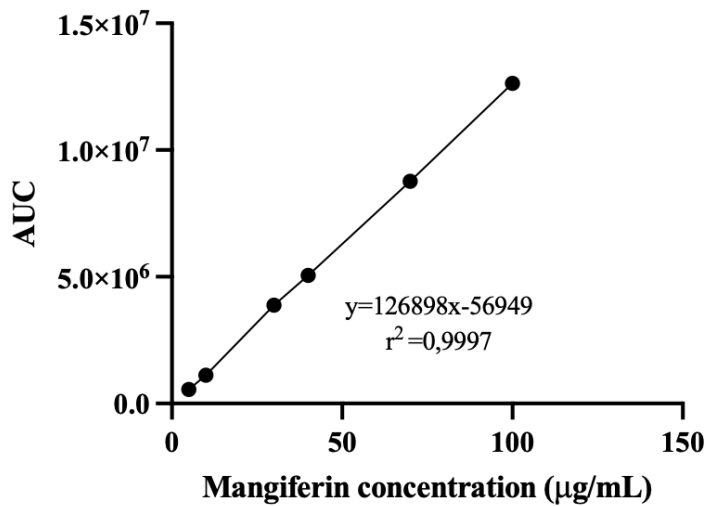
- Penetapan Parameter Standardisasi Non Spesifik Dan Spesifik Ekstrak Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis* L.). *Media Farm J Ilmu Farm*. 2016;13(2).
15. He M, Zheng W, Wang N, Gao H, Ouyang D, Huang Z. Molecular Dynamics Simulation of Drug Solubilization Behavior in Surfactant and Cosolvent Injections. *Pharmaceutics*. 2022;14(11).
16. Sarkar R, Pal A, Rakshit A, Saha B. Properties and applications of amphoteric surfactant: A concise review. Vol. 24, *Journal of Surfactants and Detergents*. 2021.
17. Shraim AM, Ahmed TA, Rahman MM, Hijji YM. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*. 2021;150.
18. Vigneshwari R, Dash S. Comparative Interaction of Flavonoid Quercetin with Different Tween Surfactants. *ACS Food Sci Technol*. 2023;
19. Ybañez-Julca RO, Asunción-Alvarez D, Quispe-Díaz IM, Palacios J, Bórquez J, Simirgiotis MJ, et al. Metabolomic Profiling of Mango (*Mangifera indica* Linn) Leaf Extract and Its Intestinal Protective Effect and Antioxidant Activity in Different Biological Models. *Molecules*. 2020;25(21).
20. Suliga J, Śliwa P. Micellar-mediated extraction of green tea containing *Chrysanthemum morifolium* flowers. *Sci Technol Innov*. 2017;1(1).
21. Smail SS, Ghareeb MM, Omer HK, Al-Kinani AA, Alany RG. Studies on surfactants, cosurfactants, and oils for prospective use in formulation of ketorolac tromethamine ophthalmic nanoemulsions. *Pharmaceutics*. 2021;13(4).
22. Miller R. Emulsifiers: Types and Uses. In: *Encyclopedia of Food and Health*. 2015.
23. Shakeel F, Haq N, Alanazi FK, Alsarra IA. Solubility and thermodynamic function of apremilast in different (Transcutol + water) cosolvent mixtures: Measurement, correlation and molecular interactions. *J Ind Eng Chem*. 2017;56.
24. Ma BL, Yang Y, Dai Y, Li Q, Lin G, Ma YM. Polyethylene glycol 400 (PEG400) affects the systemic exposure of oral drugs based on multiple mechanisms: taking berberine as an example. *RSC Adv*. 2017;7(5).
25. Huamán-Castilla NL, Mariotti-Celis MS, Martínez-Cifuentes M, Pérez-Correa JR. Glycerol as alternative co-solvent for water extraction of polyphenols from Carménère pomace: Hot pressurized liquid extraction and computational chemistry calculations. *Biomolecules*. 2020;10(3).
26. Niaz K, Khan F. Analysis of polyphenolics. In: *Recent Advances in Natural Products Analysis*. 2020.

Supplementary material

Section 1. The standard curve for determining the flavonoid content with quercetin as the standard.



Section 2. The standard curve for determining mangiferin content





SURAT PERJANJIAN PELAKSANAAN PENELITIAN

Nomor : PD-043/SP3/LPPM-UAD/VIII/2023

Pada hari ini, Senin tanggal Tujuh bulan Agustus tahun Dua ribu dua puluh tiga (07-08-2023), kami yang bertandatangan di bawah ini :

1. Nama : Anton Yudhana, S.T., M.T., Ph.D.
Jabatan : Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Ahmad Dahlan (LPPM UAD), selanjutnya disebut sebagai PIHAK PERTAMA.
2. Nama : Deasy Vanda Pertiwi, S.Farm., M.Sc., Apt
Jabatan : Dosen/Peneliti pada Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi (FFAR) Universitas Ahmad Dahlan (UAD), selaku Ketua Peneliti, selanjutnya disebut PIHAK KEDUA.

PIHAK PERTAMA dan PIHAK KEDUA selanjutnya disebut PARA PIHAK.

PARA PIHAK menyatakan setuju dan bermufakat untuk mengadakan perjanjian pelaksanaan penelitian untuk selanjutnya disebut Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian (SP3) dengan ketentuan dan syarat-syarat sebagai berikut.

Pasal 1
DASAR HUKUM

- (1) Hasil review/penilaian proposal yang dilakukan oleh Tim Reviewer Penelitian Internal UAD.
- (2) Surat Keputusan Kepala LPPM UAD Nomor: U12/722/VIII/2023 tanggal 05 Agustus 2023 tentang Penetapan Penerima Dana Penelitian Internal Universitas Ahmad Dahlan Tahun Akademik 2022/2023

Pasal 2
RUANG LINGKUP DAN JANGKA WAKTU PENELITIAN

- (1) PIHAK PERTAMA memberikan pekerjaan kepada PIHAK KEDUA dan PIHAK KEDUA menyatakan menerima pekerjaan dari PIHAK PERTAMA berupa kegiatan penelitian sebagai berikut :

Skema	: Penelitian Dasar
Judul penelitian	: Penerapan teknologi in situ gelling thermoresponsive systems pada ekstrak daun mangga arumanis (<i>Mangifera indica</i> L.) sebagai penyembuhan luka diabetes
Jenis Riset	: Dasar, TKT : 3
Luaran Wajib	: Artikel di Jurnal Nasional Terakreditasi Sinta 2
- (2) Jangka waktu pelaksanaan penelitian tersebut pada ayat (1) dimulai sejak ditandatangani SP3 ini sampai dengan batas akhir unggah Laporan Akhir Penelitian pada tanggal 31 Maret 2024

Pasal 3

PERSONALIA PELAKSANA PENELITIAN

Personalia pelaksana penelitian ini terdiri dari :

- Ketua Peneliti : Deasy Vanda Pertiwi, S.Farm., M.Sc., Apt
Pembimbing : -
Anggota : 1. Siti Fatmawati Fatimah, M.Sc. Apt.
2. apt. Yudha Rizky Nuari, M.Sc.
3. Dr. Moch. Saiful Bachri, S.Si.,M.Si., Apt.

Pasal 4

BIAYA PENELITIAN DAN CARA PEMBAYARAN

- (1) PIHAK PERTAMA menyediakan dana pelaksanaan penelitian kepada PIHAK KEDUA sejumlah Rp. 11.400.000,00 (Sebelas Juta Empat Ratus Ribu Rupiah) yang dibebankan pada Anggaran Pendapatan dan Belanja (APB) LPPM UAD Tahun Akademik 2022/2023 dibayarkan melalui rekening bank atas nama Ketua Peneliti oleh Biro Keuangan dan Anggaran UAD sebagai berikut :
- Nama : Deasy Vanda Pertiwi, S.Farm., M.Sc., Apt
Nama Bank : BPD DIY SYARIAH
Nomor Rekening : 801211014706
- (2) Tahap I sebesar $70\% \times \text{Rp } 11.400.000,00 = \text{Rp } 7.980.000,00$ (tujuh juta sembilan ratus delapan puluh ribu Rupiah), dibayarkan setelah SP3 ini ditandatangani oleh PARA PIHAK dan PIHAK KEDUA telah mengunggah file kontrak SP3 ini pada portal Penelitian UAD.
- (3) Tahap II sebesar $30\% \times \text{Rp } 11.400.000,00 = \text{Rp } 3.420.000,00$ (tiga juta empat ratus dua puluh ribu Rupiah), dibayarkan setelah (a) PIHAK KEDUA mengunggah Laporan Akhir Penelitian dan (b) luaran wajib penelitian dinyatakan tercapai.
- (4) Jika sampai pada batas akhir penelitian PIHAK KEDUA hanya dapat mengunggah Laporan Akhir Penelitian dan TIDAK DAPAT merealisasikan luaran wajib, maka dana penelitian Tahap II hanya dapat dicairkan sebesar 15%.

Pasal 5

PELAKSANAAN PEMBIMBINGAN

- (1) Khusus skema Penelitian Dosen Pemula (PDP), peneliti wajib melakukan pembimbingan atau konsultasi dengan dosen pembimbing penelitian paling sedikit 4 (empat) kali pembimbingan.
- (2) Pembimbingan sebagaimana dimaksud dalam ayat (1) antara lain dalam hal-hal berikut.
- penyusunan angket/kuesioner dan atau teknik pengumpulan data lainnya;
 - analisis data dan interpretasinya;
 - penyusunan hasil penelitian, pembahasan, penarikan kesimpulan;
 - penyusunan luaran penelitian.
- (3) Pembimbingan sebagaimana dimaksud dalam ayat (1) dan ayat (2) dituliskan sesuai dengan template form pembimbingan yang tersedia.

Pasal 6
JENIS LAPORAN PENELITIAN

- (1) PIHAK KEDUA wajib menyusun dan mengunggah laporan penelitian melalui portal Penelitian UAD yang terdiri atas :
 - a. Laporan Kemajuan
 - b. Laporan Akhir
- (2) Berkas Laporan Kemajuan digunakan sebagai bahan monitoring dan evaluasi (monev) internal, diunggah selambat-lambatnya tanggal 09 Desember 2023.
- (3) Berkas Laporan Akhir digunakan sebagai acuan pencairan dana Tahap II dan bahan pertimbangan berlanjut atau tidaknya kontrak penelitian tahun jamak (multi years), diunggah selambat-lambatnya tanggal 31 Maret 2024.

Pasal 7
LUARAN WAJIB PENELITIAN

- (1) PIHAK PERTAMA berkewajiban untuk merealisasikan luaran wajib penelitian sebagaimana yang dijanjikan dalam proposal.
- (2) Status minimal luaran wajib yang harus dicapai oleh PIHAK KEDUA adalah sebagai berikut.
 - (i) accepted untuk jenis luaran artikel jurnal/seminar/konferensi, atau
 - (ii) telah terbit untuk jenis luaran buku (versi cetak atau versi online), atau
 - (iii) diterima atau dibahas instansi pengguna untuk jenis luaran naskah akademik, atau
 - (iv) telah keluar Sertifikat untuk jenis luaran Hak Cipta, atau
 - (v) telah terdaftar atau didaftarkan untuk jenis luaran Desain Industri, Paten, atau Paten Sederhana, atau
 - (vi) telah terwujud atau telah dilakukan uji laboratorium untuk jenis luaran purwarupa (prototipe), dan sejenisnya.
- (3) Status luaran wajib akan dievaluasi dan menjadi bahan pertimbangan pencairan dana luaran wajib sebesar 15% dari total dana penelitian.

Pasal 8
MONITORING DAN EVALUASI

- (1) PIHAK PERTAMA berhak untuk melakukan monitoring dan evaluasi (monev) pelaksanaan penelitian, baik secara administrasi maupun substansi.
- (2) Pemantauan kemajuan penelitian dilakukan oleh Tim Monev yang dibentuk oleh PIHAK PERTAMA.
- (3) Monev internal dilakukan terhadap dokumen Laporan Kemajuan dan capaian luaran penelitian (wajib dan/atau tambahan) yang diunggah oleh PIHAK KEDUA.
- (4) PIHAK PERTAMA berhak untuk menentukan lanjut atau putusnya kontrak penelitian tahun jamak (multi years) berdasarkan hasil dari monev tahap II terhadap Laporan Akhir dan capaian luaran penelitian tahun berjalan yang diunggah PIHAK KEDUA.

Pasal 9

TANGGUNGAN PENELITIAN DAN LUARAN PENELITIAN

- (1) Peneliti dinyatakan memiliki tanggungan penelitian apabila sampai pada masa penerimaan proposal penelitian periode berikutnya belum menyelesaikan kewajiban unggah Laporan Akhir Penelitian.
- (2) Peneliti yang memiliki tanggungan penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) tidak diperkenankan mengajukan proposal penelitian pada periode tersebut.
- (3) Peneliti dinyatakan memiliki tanggungan luaran penelitian apabila sampai pada masa akhir unggah Laporan Akhir Penelitian, luaran wajib belum tercapai dengan status minimal seperti disebutkan pada Pasal 7 ayat (2).
- (4) Peneliti yang memiliki tanggungan luaran penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (3) masih diperkenankan mengajukan proposal penelitian pada periode terdekat.
- (5) Peneliti yang belum memenuhi luaran wajib sampai pada penerimaan proposal penelitian pada periode tahun berikutnya tidak diperkenankan mengajukan proposal pada periode tersebut.
- (6) Tanggungan penelitian dan/atau luaran wajib penelitian berlaku bagi Ketua dan Anggota peneliti dari Universitas Ahmad Dahlan.

Pasal 10

SANKSI DAN PEMUTUSAN PERJANJIAN PENELITIAN

- (1) PIHAK PERTAMA berhak memberikan peringatan dan atau teguran atas kelalaian dan atau pelanggaran yang dilakukan oleh PIHAK KEDUA yang mengakibatkan tidak dapat terpenuhinya kontrak penelitian ini.
- (2) PIHAK PERTAMA berhak melakukan pemutusan perjanjian penelitian, jika PIHAK KEDUA tidak mengindahkan peringatan yang diberikan oleh PIHAK PERTAMA.
- (3) Segala kerugian material maupun finansial yang disebabkan akibat kelalaian PIHAK KEDUA, maka sepenuhnya menjadi tanggung jawab PIHAK KEDUA.
- (4) Jenis sanksi yang diberikan dapat berupa :
 - (a) tidak diperkenankannya mengajukan proposal penelitian sebagaimana dimaksud pada Pasal 9 ayat (5) sampai kewajibannya terselesaikan; dan atau
 - (b) tidak dapat mencairkan dana Tahap II; dan atau
 - (c) mengembalikan dana yang telah diterima oleh PIHAK KEDUA.

Pasal 11

KEADAAN MEMAKSA (FORCE MAJEURE)

Ketentuan dalam Pasal 10 tersebut di atas tidak berlaku dalam keadaan sebagai berikut :

- a. Keadaan memaksa (force majeure)
- b. PIHAK PERTAMA menyetujui atas terjadinya keterlambatan yang didasarkan pada pemberitahuan sebelumnya oleh PIHAK KEDUA kepada PIHAK PERTAMA dengan Surat Pemberitahuan mengenai kemungkinan terjadinya keterlambatan dalam penyelesaian kegiatan penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2; dan sebaliknya PIHAK KEDUA menyetujui terjadinya keterlambatan pembayaran sebagai akibat keterlambatan dalam penyelesaian perjanjian penelitian.

Pasal 12

- (1) Keadaan memaksa (force majeure) sebagaimana yang dimaksud dalam Pasal 11 ayat (1) adalah peristiwa-peristiwa yang secara langsung mempengaruhi pelaksanaan perjanjian serta terjadi di luar kekuasaan dan kemampuan PIHAK KEDUA ataupun PIHAK PERTAMA.
- (2) Peristiwa yang tergolong dalam keadaan memaksa (force majeure) antara lain berupa bencana alam, pemogokan, wabah penyakit, huru-hara, pemberontakan, perang, waktu kerja diperpendek oleh pemerintah, kebakaran dan atau peraturan pemerintah mengenai keadaan bahaya serta hal-hal lainnya yang dipersamakan dengan itu, sehingga PIHAK KEDUA ataupun PIHAK PERTAMA terpaksa tidak dapat memenuhi kewajibannya.
- (3) Peristiwa sebagaimana dimaksud pada ayat (2) tersebut di atas, wajib dibenarkan oleh penguasa setempat dan diberitahukan dengan surat pemberitahuan oleh PIHAK KEDUA kepada PIHAK PERTAMA atau PIHAK PERTAMA kepada PIHAK KEDUA yang menyebutkan telah terjadinya peristiwa yang dikategorikan sebagai keadaan memaksa (force majeure).
- (4) PIHAK PERTAMA memberikan kesempatan kepada PIHAK KEDUA untuk menyelesaikan perjanjian kontrak ini sampai pada batas waktu yang disepakati oleh PARA PIHAK jika keadaanforce majeure dinyatakan telah selesai.

Pasal 13

PENYELESAIAN PERSELISIHAN

- (1) Apabila dalam pelaksanaan perjanjian dan segala akibatnya timbul perbedaan pendapat atau perselisihan, PIHAK PERTAMA dan PIHAK KEDUA setuju untuk menyelesaikannya secara musyawarah untuk mencapai mufakat.
- (2) Apabila penyelesaian sebagaimana termaksud dalam ayat (1) di atas tidak tercapai, maka PIHAK PERTAMA dan PIHAK KEDUA sepakat menyerahkan perselisihan tersebut melalui mediasi dengan Rektor sebagai atasan langsung dari PIHAK PERTAMA yang putusannya bersifat final dan mengikat.

Pasal 14

PENGUNDURAN DIRI

- (1) Apabila PIHAK KEDUA mengundurkan diri atau membatalkan SP3 ini, maka PIHAK KEDUA wajib mengajukan Surat Pengunduran Diri yang ditujukan kepada PIHAK PERTAMA.
- (2) Surat Pengunduran Diri sebagaimana dimaksud pada ayat (1) wajib ditembuskan kepada Ketua Program Studi ketua peneliti yang bersangkutan.
- (3) PIHAK KEDUA wajib mengembalikan dana yang telah diterima kepada PIHAK PERTAMA

Pasal 15
LAIN-LAIN

- (1) Hal-hal yang dianggap belum cukup dan perubahan-perubahan perjanjian akan diatur kemudian atas dasar permufakatan kedua belah pihak yang akan dituangkan dalam bentuk Surat atau Perjanjian Tambahan (addendum), yang merupakan satu kesatuan dan bagian yang tidak terpisahkan dari perjanjian awal.
- (2) Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian (SP3) ini berlaku sejak ditandatangani dan disetujui oleh PARA PIHAK.

PIHAK PERTAMA,



Anton Yudhana, S.T., M.T., Ph.D.
NIP/NIY. 60010383

Diunduh pada : 11 Agustus 2023 - 19:47:59

PIHAK KEDUA,

Materai 10.000

A handwritten signature in black ink is written over a 10,000 Indonesian Rupiah revenue stamp. The stamp is partially visible, showing the number '10.000' and some decorative elements.

Deasy Vanda Pertiwi S.Farm., M.Sc.,
Apt
NIP/NIY. 60160915

