

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis yang dilakukan sesuai dengan jenis dan metode pengujian yang divalidasi yaitu penentuan akurasi dan presisi. Penentuan batas deteksi (LOD) dan penentuan kuantifikasi (LOQ) tidak dilakukan karena jenis dan metode pengujian masuk kedalam kategori 1 dimana disebutkan komponen maupun substansi bahan baku obat atau bahan aktif (termasuk pengawet) pada hasil akhir farmasetika. Menurut *United State Pharmacopeia* (USP), validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang dianalisis . Hasil penentan akurasi dan presisi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Parameter validasi metode analisis kurva kalibrasi Naringenin

Parameter	Hasil
Koefisien determinasi (R^2)	0,9957
Koefisien Relasi (R)	0,9979
Perolehan kembali (<i>Recovery</i>)	98,65 %
Koefisien Variasi (CV)	0,0204 %

1. Linearitas

Tujuan linearitas yaitu untuk mengetahui seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dan konsentrasi (x) pada beberapa seri larutan baku. Kurva kalibrasi ini kemudian digunakan untuk penentuan regresi linearnya yang berupa persamaan $y=bx+a$, dimana x adalah konsentrasi, y adalah respon, a adalah intersep y yang sebenarnya dan b adalah slope yang sebenarnya. Tujuan dari dibuatnya regresi adalah untuk menentukan estimasi terbaik untuk slope dan intersep y sehingga mengurangi *residual error*, yaitu perbedaan nilai hasil percobaan dengan nilai yang diprediksi melalui persamaan regresi linear. Nilai linearitas yang baik adalah $0,99 \leq r \leq 1$ (Gandjar & Rohman, 2013).

Hasil validasi metode analisis dipengaruhi oleh konsentrasi Naringenin yang menghasilkan serapan lebih dari 99%, ditunjukkan dari nilai koefisien

determinasi (R^2) 0,9957. Koefisien korelasi yang didapatkan dari kedua kurva kalibrasi ini menunjukkan hasil yang linier karena memenuhi kriteria penerimaan menurut *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) yaitu nilai koefisien korelasi $> 0,99$.

2. Penetapan Presisi

Nilai presisi menunjukkan seberapa dekat suatu hasil pemeriksaan bila dilakukan berulang. Ketelitian (presisi) ditentukan berdasarkan nilai koefisien variasi (KV atau CV) dimana nilai CV yang baik adalah $\leq 2\%$ ((Harvey, 2000). Hasil pengujian menunjukkan bahwa metode spektrofotometri UV yang digunakan untuk penetapan kadar Naringenin dalam dapar fosfat pH 7,4 memiliki presisi yang baik pada konsentrasi tinggi, sedang, dan rendah karena memiliki nilai CV sebesar 0,0204 %.

3. Penetapan Akurasi

Akurasi (kecermatan) didefinisikan sebagai kesesuaian antara hasil analisis dengan nilai acuan yang dapat diterima yang dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*). Persen perolehan kembali adalah angka yang menunjukkan besarnya penambahan standar yang mampu diidentifikasi kembali dengan suatu metode. Nilai perolehan kembali bergantung pada matriks sampel, prosedur proses sampel, dan konsentrasi cecair. Penetapan proses akurasi peneliti menggunakan tiga macam konsentrasi yaitu 80%, 100%, dan 120%. Nilai *recovery* yang diperoleh pada rentang % *recovery* berdasarkan *Association of Official Analytical Chemists* (2002) yaitu antara 85-115%. Berdasarkan hasil yang diperoleh, nilai *recovery* Naringenin dalam dapar phospat pH 7,4 sebesar 98,65 % sehingga metode yang digunakan memiliki akurasi yang baik.

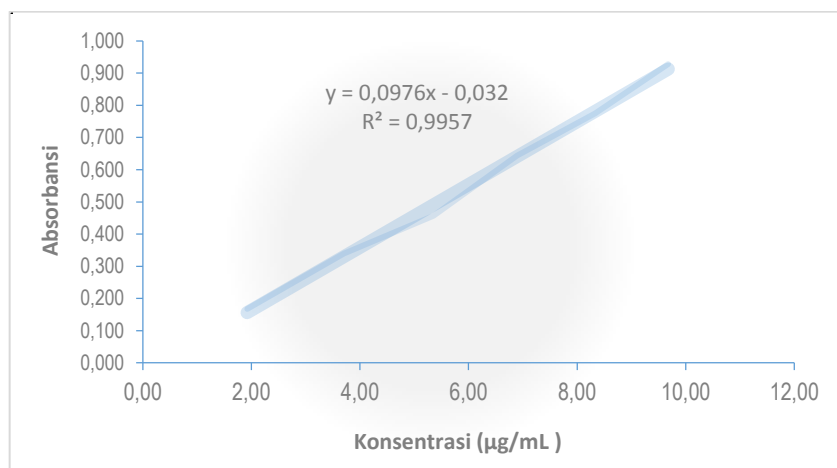
B. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Scanning panjang gelombang maksimum dari Naringenin dilakukan pada larutan induk Naringenin dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ pada panjang gelombang 400-200 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum diperoleh dari panjang gelombang yang memiliki serapan terbesar. Hasil panjang gelombang maksimum Naringenin menggunakan spektrofotometer

UV-VIS menunjukkan panjang gelombang 322 nm dengan nilai serapannya sebesar 0,7856 nm. Hasil panjang gelombang maksimum Naringenin pada lampiran 3a.

C. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Seri konsentrasi Naringenin yang dibuat yaitu pada 2, 4, 6, 8, dan 10 $\mu\text{g/mL}$ dari larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ dengan pengukuran serapan menggunakan spektrofotometer UV-VIS sebanyak empat kali replikasi. Luas area diplotkan dengan masing-masing konsentrasi untuk membuat persamaan regresi linier dengan persamaan $y = bx + a$. Dari kurva hubungan antara luas area dan konsentrasi akan diperoleh nilai koefisien korelasi (r) sebagai parameter untuk menentukan linieritasnya. Penentuan persamaan regresi linear dengan nilai x yaitu konsentrasi, y adalah absorbansi. Hasil persamaan regresi linear yang diperoleh yaitu $y = -0,032 + 0,0976x$ dimana nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9957. Hal ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan memenuhi persyaratan metode yang baik dari segi linearitas, yaitu persyaratan data linearitas yang dapat diterima adalah jika memenuhi nilai koefisien korelasi (r) mendekati 0,999 (Mulja dan Hanwar, 2003).



Gambar 11. Kurva kalibrasi Naringenin pelarut dapar fosfat pH 7,4.

D. Pembuatan dan uji karakterisasi basis *solid* SNEDDS

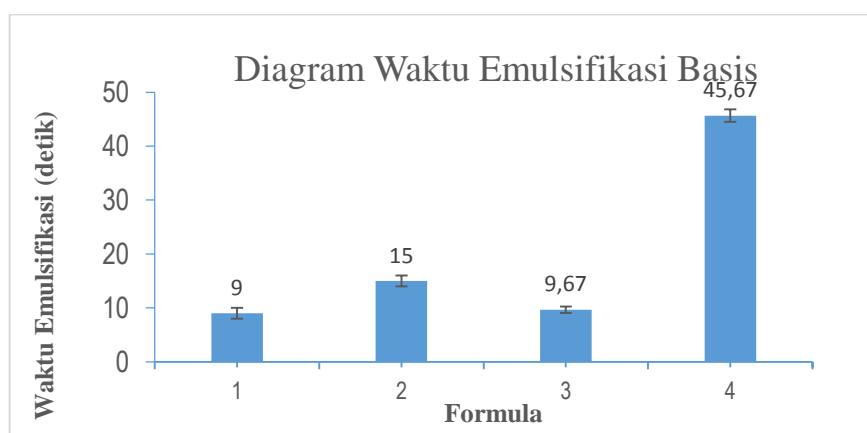
Tabel 3. Rancangan Formula *solid* SNEDDS Naringenin

Formula	Komposisi <i>solid</i> SNEDDS (bagian)		
	Stearin	PEG 1000	Kolliphor-EL
1	1	4,5	1
2	3	4,5	1
3	1	4,5	4
4	3	4,5	4

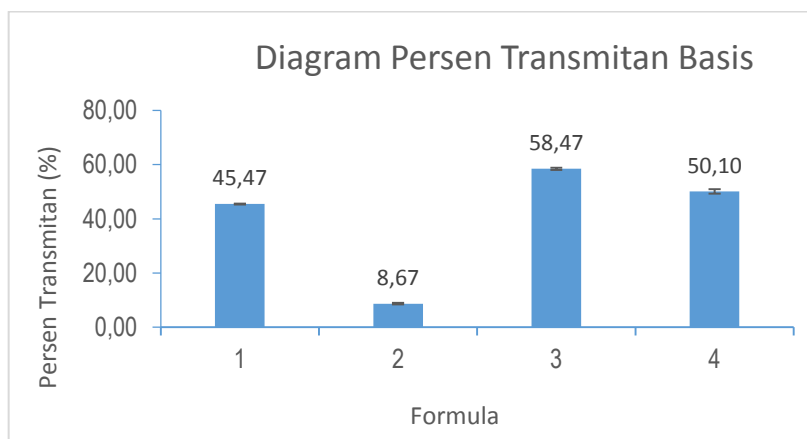
Pembuatan *solid* SNEDDS pada penelitian ini dilakukan tanpa penambahan zat pematik karena basis dipilih untuk bahan-bahan yang sudah bersifat padatan sehingga mampu membentuk *solid* SNEDDS pada awal pembentukan tanpa adanya penambahan zat pematik. Basis *solid* SNEDDS dibuat berdasarkan proporsi bahan pada tabel 3 kemudian dilakukan karakterisasi nanoemulsi pada basis *solid* SNEDDS berdasarkan *emulsification time* dan persen transmittan. Parameter uji karakteristik nanoemulsi antara lain *emulsification time* terbentuknya nanoemulsi kurang dari satu menit dan persen transmittan nanoemulsi mendekati transmittan air yaitu 100%. Hasil pembuatan basis *solid* SNEDDS dapat dilihat pada lampiran 8 dan hasil karakterisasi nanoemulsi basis *solid* SNEDDS dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil karakterisasi basis *solid* SNEDDS

Formula <i>solid</i> SNEDDS	Komponen <i>solid</i> SNEDDS			Karakterisasi basis <i>solid</i> SNEDDS	
	Stearin	PEG 1000	Kolliphor-EL	<i>Emulsification time</i> (detik)	Transmittan (%)
1	1	4,5	1	9,00±1	45,47±0,21
2	3	4,5	1	15,00±1	8,67±0,32
3	1	4,5	4	9,67±0,58	58,47±0,42
4	3	4,5	4	45,67±1,15	50,10±0,78



Gambar 12. Diagram hasil uji waktu emulsifikasi basis *solid* SNEDDS



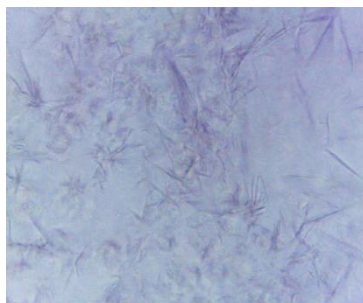
Gambar 13. Diagram hasil uji persen transmitan basis solid SNEDDS

Karakterisasi berupa *emulsification time* dan persen transmitan saling berkaitan. Hasil pada kedua karakterisasi tersebut tidak selalu berbanding lurus, jika *emulsification timenya* tidak selalu pada karakteristik transmitannya bagus, dikarenakan hal ini tidak lepas dari komposisi setiap bahan dalam setiap formula. Penambahan minyak yaitu stearin yang tinggi akan menyebabkan emulsi yang terbentuk tidak transparan sehingga *emulsification time* yang dihasilkan lama. Hal tersebut dapat dibuktikan pada diagram hasil *emulsification time* basis *solid* SNEDDS (gambar 12) dimana pada formula 2 dan 4 memiliki *emulsification time* paling tinggi dan paling lama karena pada formula 2 dan 4 memiliki kandungan minyak yang lebih tinggi dibandingkan formula lain. Penggunaan Kolliphor-EL sebagai surfaktan yang mampu membentuk sistem nanoemulsi o/w secara spontan saat didispersikan dalam cairan lambung. Semakin tinggi Kolliphor-EL yang berperan sebagai surfaktan akan semakin meningkatkan persen transmitan (Kommuru dkk., 2001). Hal tersebut dapat dibuktikan pada diagram hasil pengujian persen transmitan basis *solid* SNEDDS (gambar 13) dimana pada formula 3 dan 4 memiliki hasil persen transmitan paling tinggi karena memiliki kandungan surfaktan yang lebih banyak dibandingkan formula lain. Hasil tersebut didukung pula oleh penggunaan ko-surfaktan yaitu PEG 1000 yang dapat membantu kelarutan dari Kolliphor-EL maupun kelarutan dari obat dalam basis minyak (Amrutkar dkk., 2014). Hasil *emulsification time* dan persen transmitan dapat dianalisis lebih lanjut menggunakan persamaan regresi linier berganda dengan pendekatan 2^2 *factorial design* untuk menentukan formula optimum basis *solid* SNEDDS.

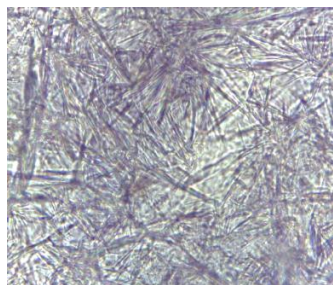
E. Penentuan Kadar Naringenin Berdasarkan Uji Karakteristik Basis *Solid* SNEDDS

Penentuan kadar Naringenin bertujuan untuk mengetahui banyaknya Naringenin yang mampu termuat ke dalam basis *solid* SNEDDS tanpa terbentuk kristal. Dosis uji yang digunakan yaitu 20 mg, 25 mg, dan 50 mg Naringenin diinkorporasikan dalam 1 gram basis *solid* SNEDDS pada formula optimum kemudian diamati ada atau tidaknya kristal. Penentuan formula basis *solid* SNEDDS yang optimum dipilih berdasarkan parameter *emulsification time* dan persen transmittan. Hasil pengujian *emulsification time* dan persen transmittan kemudian dianalisis menggunakan pendekatan 2^2 *factorial design*, sehingga diperoleh formula optimum yaitu pada formula 3. Hasil analisis dapat dilihat pada lampiran 4 a dan b.

Pengamatan kristalinitas Naringenin dalam basis *solid* SNEDDS menunjukkan bahwa pada dosis 20 mg Naringenin tidak ditemukan adanya kristal, sehingga Naringenin yang dimuat dalam 1 gram basis *solid* SNEDDS sebanyak 20 mg. Hasil pengujian dapat dilihat pada gambar 14 dan gambar 15.



Gambar 14. Naringenin 20mg +1 g basis *solid* SNEDDS



Gambar 15. Basis *solid* SNEDDS

F. Pembuatan *solid* SNEDDS Naringenin

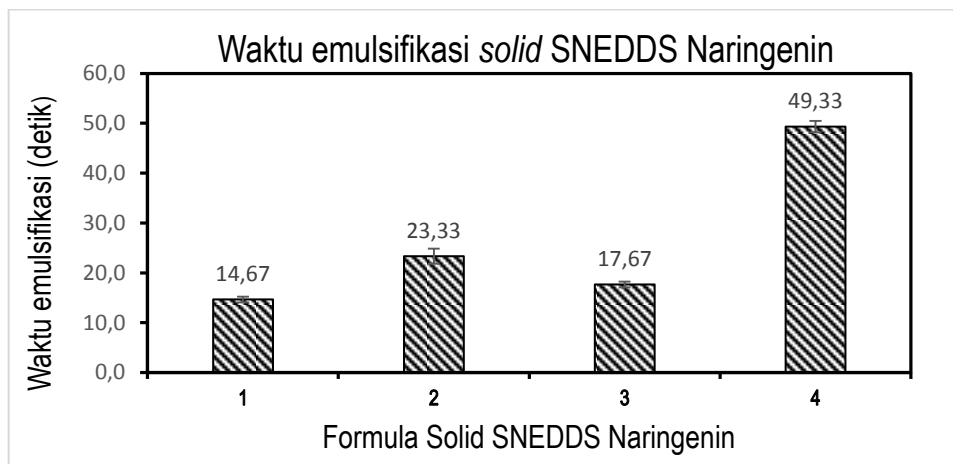
Tahap pertama dalam pembuatan *solid* SNEDDS Naringenin adalah ditimbang semua bahan. Konsentrasi Naringenin dijaga konstan pada semua formulasi sesuai dengan hasil uji kadar Naringenin dalam basis *solid* SNEDDS yaitu 20mg/g. Campuran minyak, surfaktan, dan kosurfaktan sebagai basis *solid* SNEDDS dibuat dengan perbandingan sesuai proporsi formulasi terpilih. Naringenin ditimbang akurat dan dicampurkan dalam Stearin, kemudian campuran surfaktan dan kosurfaktan ditambahkan ke dalam campuran obat-minyak. Tahap kedua, campuran bahan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit dengan kecepatan 700 rpm, setelah itu disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm.

G. Uji Karakteristik Nanoemulsi *solid* SNEDDS Naringenin

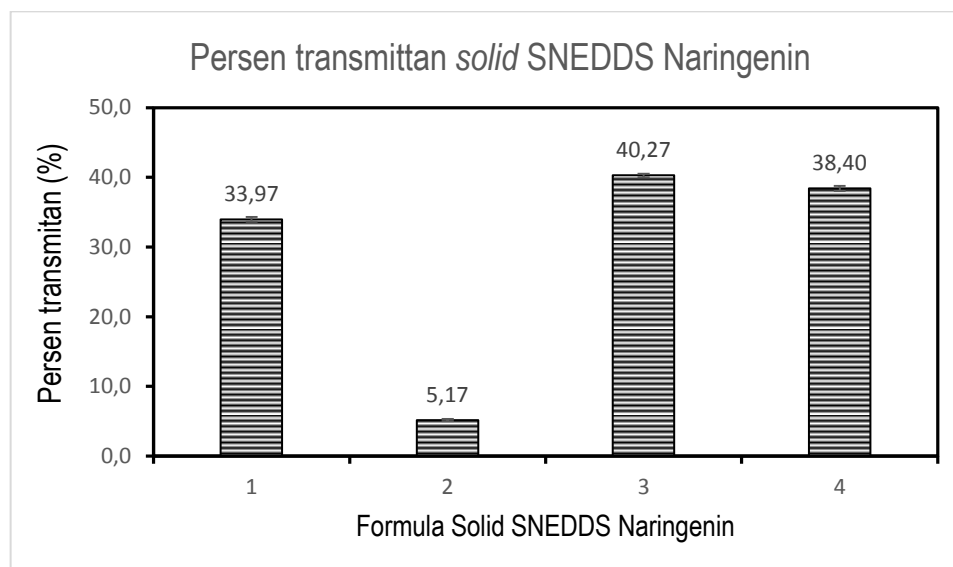
Pengujian karakterisasi nanoemulsi *solid* SNEDDS Naringenin meliputi *emulsification time*, persen transmittan, profil disolusi, dan profil difusi. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui bahwa sediaan nanoemulsi memenuhi syarat dan stabil. Parameter uji karakteristik nanoemulsi antara lain *emulsification time* terbentuknya nanoemulsi kurang dari satu menit, persen transmittan nanoemulsi mendekati transmittan air yaitu 100%, nilai AUC dan Q yang stabil dan semakin besar dengan bertambahnya waktu, dan jumlah obat terdifusi yang semakin besar dengan bertambahnya waktu. Hasil karakteristik *emulsification time* dan persen transmittan tertera pada tabel 5. Hasil karakterisasi tersebut kemudian dianalisis dengan pendekatan 2^2 *factorial design* untuk menentukan pengaruh serta proporsi formula optimum Stearin dan Kolliphor-EL pada *solid* SNEDDS Naringenin.

Tabel 5. Hasil karakterisasi *solid* SNEDDS Naringenin

Formula <i>solid</i> SNEDDS	Komponen <i>solid</i> SNEDDS			Karakterisasi komponen <i>solid</i> SNEDDS Naringenin	
	Stearin	PEG 1000	Kolliphor EL	Emulsification time (detik)	Persen transmittan (%)
1	1	4,5	1	14,67±0,58	33,97±0,35
2	3	4,5	1	23,33±1,53	5,17±0,15
3	1	4,5	4	17,67±0,58	40,27±0,25
4	3	4,5	4	49,33±1,15	38,40±0,36



Gambar 16. Diagram hasil pengujian *emulsification time solid SNEDDS Naringenin*



Gambar 17. Diagram hasil pengujian persen transmitan *solid SNEDDS Naringenin*

Emulsification time dan persen transmitan menjadi parameter penting dalam pengujian karakteristik *solid SNEDDS Naringenin* karena dari kedua parameter tersebut dapat diketahui bahwa sediaan nanoemulsi memenuhi syarat dan uji stabilitas. *Emulsification time* kurang dari satu menit untuk terbentuknya nanoemulsi dan persen transmitan nanoemulsi mendekati transmitan air yaitu 100%. Semakin rendah *emulsification time* dan semakin tinggi nilai persen transmitan maka akan semakin baik karakteristik nanoemulsi yang dihasilkan. Hasil *emulsification time* dan persen transmitan *solid SNEDDS Naringenin* tertera pada tabel 5.

Karakteristik utama SNEDDS adalah pembentukan nanoemulsi secara spontan (*spontaneous emulsification*). Kemampuan *spontaneous emulsification* ini dapat diukur dengan waktu pembentukan emulsi (*emulsification time*). Hasil pengujian *emulsification time* dapat dilihat pada gambar 16 dimana waktu emulsifikasi terendah pada formula 1 (14,67 detik) dan tertinggi pada formula 4 (49,33 detik). Hal tersebut disebabkan proporsi minyak dan surfaktan pada formula 1 lebih rendah dibandingkan formula lainnya. Semakin banyak minyak yang digunakan menyebabkan emulsi yang terbentuk tidak transparan sehingga *emulsification time* yang dihasilkan lama dan sebaliknya. Kemampuan emulsifikasi surfaktan menentukan kemampuan *solid* SNEDDS terdispersi secara cepat dalam kondisi pengadukan ringan. Surfaktan juga meningkatkan kemampuan minyak dalam melarutkan obat (Patel dkk., 2010). Minyak yang ditambahkan tidak terlalu banyak sehingga dengan komposisi yang kecil sudah bisa melarutkan Naringenin dengan bantuan surfaktan dan kosurfaktan.

Pengukuran persen transmittan juga merupakan salah satu faktor penting dalam karakteristik melihat sifat fisik nanoemulsi yang terbentuk yaitu untuk mengukur kejernihan nanoemulsi. Hasil pengujian persen transmittan dapat dilihat pada gambar 17 dimana persen transmittan terendah pada formula 2 (5,17%) dan tertinggi pada formula 3 (40,27%). Hal tersebut disebabkan tingginya jumlah surfaktan dan rendahnya jumlah minyak yang digunakan pada formula 3. Surfaktan mampu membentuk sistem nanoemulsi o/w secara spontan saat didispersikan dalam cairan lambung sehingga semakin banyak surfaktan akan mampu meningkatkan persen transmittan (Kommuru dkk., 2001).

Hasil *emulsification time* dan transmittan *solid* SNEDDS Naringenin baik karena sedikitnya jumlah minyak yang ditambahkan. Hal tersebut sama dengan yang telah disampaikan dalam penelitian Indratmoko (2014) bahwa jumlah surfaktan-kosurfaktan harus lebih banyak dari jumlah minyaknya agar mampu melingkupi tetesan minyak saat teremulsi di dalam air dan menghasilkan ukuran tetesan dalam rentang nanometer. Hasil *emulsification time* dan persen transmittan dapat dianalisis lebih lanjut menggunakan persamaan regresi linier berganda dengan pendekatan 2^2 *factorial design* untuk menentukan formula optimum basis

solid SNEDDS. Hasil berupa *countour plot* yang diperoleh dari *Design Expert* ini akan menjelaskan optimasi dari 4 formulasi dengan komposisi bahan yang berbeda-beda.

1. Persen transmitan

Kejernihan yang diukur dalam persen Transmitan adalah salah satu kontrol terhadap pembentukan dispersi dari *solid* SNEDDS karena nanoemulsi memiliki ukuran droplet yang sangat kecil sehingga jika dilihat dengan mata telanjang maka terlihat transparan (Gupta, 2010). Jika nanoemulsi semakin tidak transparan maka dimungkinkan memiliki ukuran droplet yang semakin besar. Pengamatan kejernihan secara visual merupakan parameter kualitatif spontanitas dispersi (Xi,dkk.2009). Nilai Transmitan yang mendekati 100% menunjukkan bahwa *solid* SNEDDS menghasilkan dispersi jernih dan transparan dengan ukuran tetesan diperkirakan mencapai nanometer (Bali,dkk. 2010). Penentuan persen transmitan dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS. Sampel hasil *emulsification time* dimasukan ke dalam kuvet kemudian dibaca persen transmitan menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan blanko aquadestilata pada panjang gelombang 633 nm. Media yang digunakan untuk uji persen transmitan adalah air, karena air netral terhadap komponen *solid* SNEDDS sehingga tidak akan mempengaruhi komposisi didalamnya. Tubuh manusia sebagian besar terdiri dari air, sehingga air dianggap sebagai cairan dalam tubuh, apabila kontak dengan SNEDDS disertai dengan agitasi yang ringan maka SNEDDS akan secara spontan melakukan emulsifikasi, melepaskan zat aktif obat ke sel tubuh secara cepat dan tepat menuju targetnya tanpa dipengaruhi kondisi disekitarnya.

Hasil persen transmitan yang telah dianalisis menggunakan pendekatan 2^2 *factorial design* menghasilkan persamaan

$$Y = - 7,67 (A) + 9,88 (B) \dots\dots\dots (1)$$

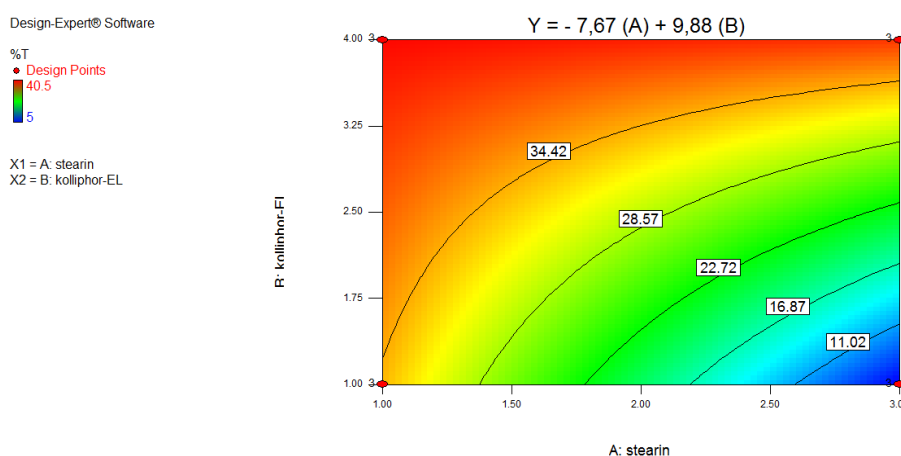
Keterangan :

Y = Persen transmitan (%)

A = Stearin

B= Kolliphor-EL

Berdasarkan hasil analisis persen transmitan dengan 2^2 factorial design menjelaskan bahwa pengaruh komponen B lebih besar dibandingkan komponen A. Pengaruh komponen B sebesar 48,39% dan pengaruh komponen A sebesar 29,12% mampu mempengaruhi persen transmitan secara bermakna ($p < 0,05$). Persamaan diatas menunjukkan komponen B yaitu Kolliphor-EL meningkatkan persen transmitan *solid* SNEDDS Naringenin sebesar 9,88, sedangkan komponen A yaitu stearin menurunkan persen transmitan sebesar 7,67. Hasil dapat dilihat pada lampiran 5b kemudian disimpulkan bahwa penambahan stearin semakin besar lebih dominan dalam menurunkan persen transmitan karena semakin banyak minyak yang digunakan akan menyebabkan nanoemulsi yang dihasilkan akan semakin keruh dan menyebabkan kemampuan bahan surfaktan dan kosurfaktan untuk membentuk emulsi yang transparan akan semakin sulit, sedangkan penambahan surfaktan mampu meningkatkan persen transmitan karena untuk membentuk ukuran droplet yang sangat kecil maka diperlukan antarmuka minyak dan air yang sangat luas, sehingga juga diperlukan jumlah surfaktan yang lebih besar untuk menjembatani antarmuka minyak dan air agar dispersi kedua fase dapat stabil. Jika jumlah surfaktan tidak mencukupi, maka antarmuka minyak/air semakin kecil, sehingga ukuran droplet yang terbentuk akan semakin besar (Hasani, 2015).



Gambar 18. Contour plot persen transmitan

Interaksi dan efek antara stearin dan kolliphor-EL sebagai komponen *solid* SNEDDS Naringenin secara lebih detail dapat dilihat pada contour plot persen

transmitan . Hasil *contour plot* menunjukkan bahwa semakin mendekati warna merah, maka nilai persen transmitan semakin besar dengan jumlah komponen stearin semakin kecil dan komponen kolliphor-EL semakin besar , sedangkan pada area berwarna biru nilai persen transmitan semakin kecil dengan jumlah komponen stearin semakin besar dan komponen kolliphor-EL semakin kecil.

2. *Emulsification time*

Uji waktu emulsifikasi (*emulsification time*) bertujuan untuk mengukur seberapa lama *solid* SNEDDS mampu membentuk nanoemulsi pada 5 mL media aquadestilata yang ditunjukkan dengan visual jernih dan transparan dengan parameter pembentukan nanoemulsi kurang dari 1 menit . Penentuan *emulsification time* dilakukan untuk memperoleh gambaran kemudahan *solid* SNEDDS membentuk emulsi saat berada dalam tubuh. Pengerjaan waktu emulsifikasi hanya memerlukan sedikit energi sebagaimana emulsifikasi tersebut akan terjadi karena gerak peristaltik di saluran pencernaan. Surfaktan mampu membentuk sistem nanoemulsi o/w secara spontan saat didispersikan dalam cairan lambung.

Hasil pengujian persen transmitan dan *emulsification time solid* SNEDDS Naringenin dianalisis dengan pendekatan 2^2 *factorial design* sehingga didapatkan formula optimum yaitu formula 3. Hasil *emulsification time* yang telah dianalisis menggunakan pendekatan 2^2 *factorial design* menghasilkan persamaan :

$$Y = 10,08 (A) + 7,25 (B) \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan :

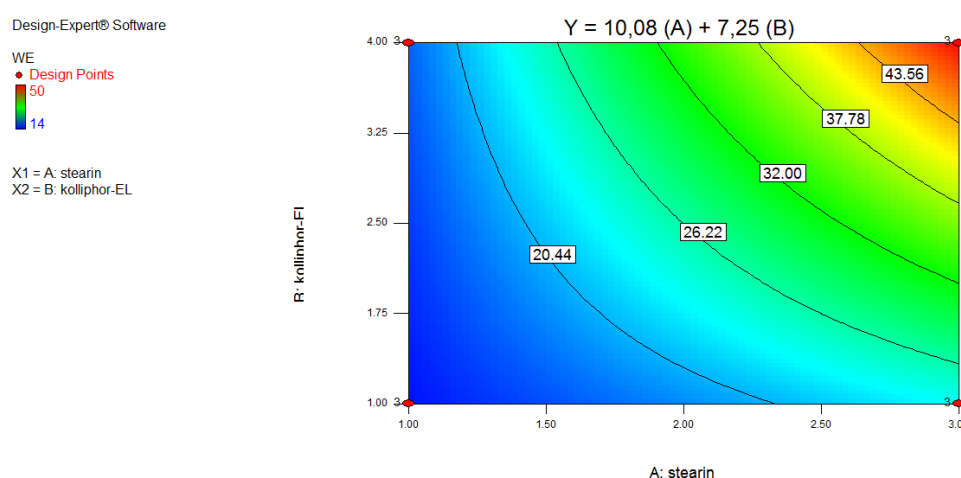
Y = *Emulsification time* (detik)

A = Stearin

B= Kolliphor-EL

Berdasarkan hasil analisis *emulsification time* dengan 2^2 *factorial design* menjelaskan bahwa pengaruh komponen A lebih besar dibandingkan komponen B. Pengaruh komponen A sebesar 54,08 % dan pengaruh komponen B sebesar 27,96% mampu mempengaruhi *emulsification time* secara bermakna ($p < 0,05$). Persamaan di atas menunjukkan komponen A yaitu stearin meningkatkan *emulsification time solid* SNEDDS Naringenin sebesar 10,08, sedangkan

komponen B yaitu kolliphor-EL meningkatkan *emulsification time* sebesar 7,25. Hasil dapat dilihat pada lampiran 5a kemudian disimpulkan bahwa stearin lebih dominan dalam meningkatkan *emulsification time* SNEDDS karena semakin banyak minyak yang digunakan akan menyebabkan kemampuan bahan surfaktan dan kosurfaktan untuk membentuk emulsi yang transparan akan semakin lama sehingga waktu emulsifikasinya semakin meningkat, demikian juga sebaliknya (Kurakula. 2013).



Gambar 19. Contour plot Emulsification time

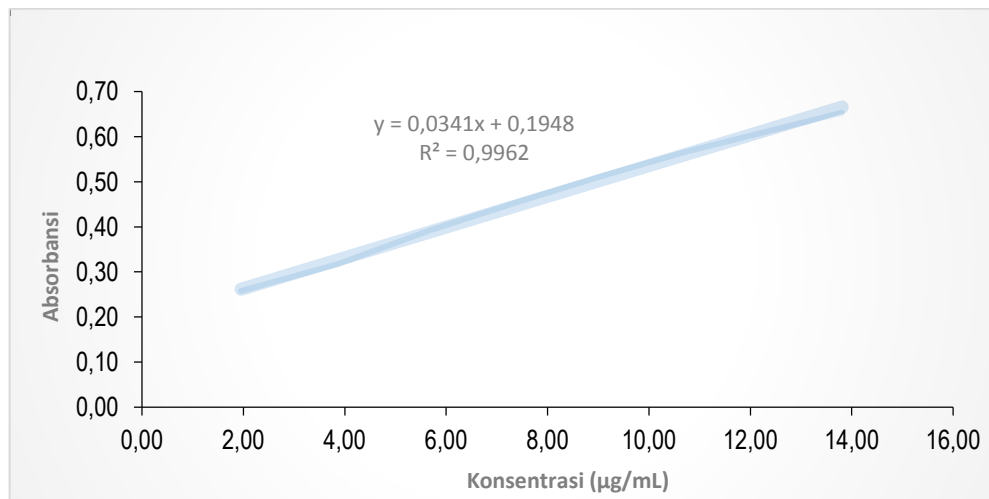
Contour plot emulsification time (gambar 19) menunjukkan interaksi antara stearin dan kolliphor-EL sebagai komponen *solid* SNEEDS Naringenin. Hasil *contour plot* menunjukkan bahwa semakin mendekati warna merah, maka *emulsification time* semakin lama dengan jumlah komponen stearin dan kolliphor-EL semakin besar, sedangkan semakin mendekati area berwarna biru menunjukkan *emulsification time* semakin cepat dengan jumlah komponen stearin dan kolliphor-EL semakin kecil.

3. Uji disolusi

3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Naringenin dengan Pelarut HCl 0,1 N. Panjang gelombang maksimum Naringenin dilakukan dengan *scanning* larutan induk Naringenin dengan konsentrasi 10 µg/mL pada panjang gelombang antara 400-200 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum diperoleh dari panjang gelombang yang memiliki serapan

terbesar. Hasil panjang gelombang maksimum Naringenin menggunakan spektrofotometer UV-VIS menunjukkan panjang gelombang 288 nm dengan nilai absorbansi sebesar 0,5505. Hasil panjang gelombang maksimum Naringenin pada lampiran 5.

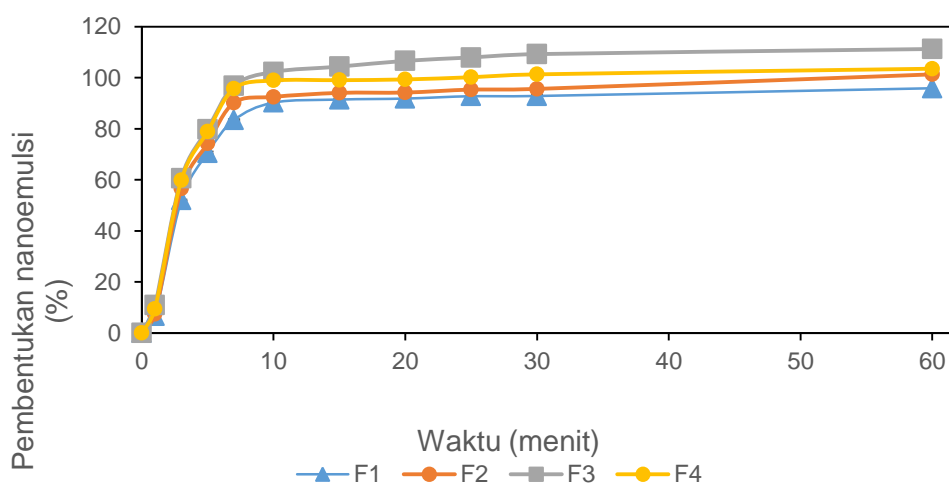
3.2 Kurva Kalibrasi Naringenin dengan Pelarut HCl 0,1 N. Pembuatan enam seri konsentrasi Naringenin yaitu 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 $\mu\text{g/mL}$ dari larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ pengukuran serapan menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan HCl 0,1 N sebagai blangko dan dibaca pada panjang gelombang 288 nm sebanyak empat kali replikasi. Penentuan persamaan regresi linear dengan nilai x yaitu konsentrasi, y adalah absorbansi. Hasil persamaan regresi linear yang diperoleh yaitu $y = 0,1948 + 0,0341x$, dimana nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9962. Hal ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan memenuhi persyaratan metode yang baik dari segi linearitas, yaitu persyaratan data linearitas yang dapat diterima adalah jika memenuhi nilai koefisien korelasi (r) mendekati 0,999 (Mulja dan Hanwar, 2003).



Gambar 20. Kurva kalibrasi Naringenin pelarut HCl 0,1 N

3.3 Disolusi. Disolusi merupakan suatu proses pelarutan senyawa aktif dari bentuk suatu sediaan ke dalam media pelarut. Uji disolusi dapat digunakan untuk meniru pelepasan zat aktif dari matriks makanan dalam saluran pencernaan (Tedeschi *et al.* 2009). Proses disolusi dilakukan secara *in vitro* pada medium asam untuk menirukan pH cairan lambung. Suhu yang digunakan pada uji disolusi adalah $37 \pm 0,5$ yaitu menyerupai suhu tubuh manusia. Waktu yang

digunakan pada uji disolusi disesuaikan dengan waktu pencernaan dalam tubuh manusia, yakni berkisar 1-3 jam dalam medium asam (Kwon. 2005). Uji disolusi dapat menunjukkan laju pelepasan zat aktif yang tersalut nanopartikel dalam model tubuh manusia. Hasil uji disolusi *solid* SNEDDS Naringenin digambarkan dengan suatu grafik antara waktu dengan % disolusi obat yang terdisolusi dalam medium HCl 0,1 N yang menggambarkan profil pelepasan obat secara *in vitro*. Profil pelepasan Naringenin formula 1 sampai dengan 4 *solid* SNEDDS Naringenin dapat dilihat pada gambar 21.



Gambar 21. Profil disolusi *solid* SNEDSS Naringenin formula 1-4.

Pembentukan nanoemulsi dalam *solid* SNEDDS dapat menggambarkan jumlah obat yang terlarut dalam media pelarut, sehingga dapat dibuktikan dengan uji disolusi. Hasil dari pengujian tersebut dapat dilihat pada gambar 21. Seluruh formula memiliki pola yang sama, artinya perbedaan variasi konsentrasi tidak memberikan perubahan pola. Grafik uji disolusi menunjukkan bahwa pembentukan nanoemulsi pada 10 menit pertama dari formula 1 sekitar 90,27%, formula 2 sekitar 92,52%, formula 3 sekitar 102,30%, dan formula 4 sekitar 98,94%. Formula 1 sampai dengan 4 mulai stabil pada menit ke 10 (Q_{10}). Nilai Q_{10} tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai AUC dan DE (*Dissolution Efficiency*) yang juga menjadi parameter uji disolusi.

Grafik uji disolusi pada 10 menit pertama menjelaskan bahwa kemampuan pembentukan nanoemulsi paling cepat adalah pada formula 3 dimana pada 10 menit pertama pembentukan nanoemulsi sudah mencapai 102,30%, sedangkan

formula yang paling lambat pembentukan nanoemulsinya adalah formula 1 dimana pada 10 menit pertama pembentukan nanoemulsi sebesar 90,27%, sedangkan pembentukan nanoemulsi formula 1 sampai dengan 4 pada menit ke-30 (Q_{30}) berturut-turut yaitu 92,86%, 95,63%, 109,26%, dan 101,33%. Hasil tersebut memenuhi persyaratan nilai Q_{30} menurut Farmakope Indonesia edisi IV (1995) dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang 80%.

Parameter lain yang digunakan untuk menyatakan uji disolusi adalah DE (*Dissolution Efficiency*) yang menyatakan perbandingan antara luas daerah di bawah kurva (AUC) kecepatan pelarutan dan daerah pada waktu yang sama menggambarkan 100% obat terlarut dalam medium. Pengungkapan hasil proses disolusi dalam *Dissolution Efficiency* (DE) lebih sering digunakan karena mampu menggambarkan seluruh proses yang terjadi (Fudholi, 2013). Keuntungan dari penggunaan metode ini adalah dapat menggambarkan semua titik pada kurva kecepatan disolusi identik dengan pengungkapan data percobaan secara *in vivo* karena dalam pengujian disolusi secara *in vitro* melalui metode DE akan didapatkan hasil AUC (*area under curve*) dari grafik % pelepasan obat terhadap waktu sedangkan dalam pengujian secara *in vivo* juga akan didapatkan AUC dari grafik konsentrasi obat di dalam plasma (C_p) terhadap waktu. Hasil AUC dari kedua pengujian dapat dianggap sebagai hasil yang sama (Andreas, 2016). Nilai yang diperoleh dipengaruhi oleh bentuk kurva yang merupakan gambaran dari kinetika pelarutan suatu zat (Saraswati, 2009). Berdasarkan nilai DE_{10} formula 1, 2, 3, dan 4 berturut-turut adalah 59,93%, 63,72%, 69,29%, dan 67,97%. Hasil disolusi keempat formula *solid* SNEDDS Naringenin tersebut kemudian dipilih 1 titik yaitu pada Q_{10} yang menunjukkan pelepasan zat aktif Naringenin pada menit ke 10 dan AUC sampai menit ke 10 (total luas area di bawah kurva dari menit ke-0 hingga ke-10 yang menunjukkan naik turunnya kadar obat dalam darah sepanjang waktu) untuk dianalisis menggunakan regresi linier berganda dengan pendekatan 2^2 factorial design, sehingga diperoleh persamaan :

a. AUC (Area Under Curve)

$$Y = 3,35 (A) + 21,98 (B) \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan :

Y = AUC (*Area Under Curve*) disolusi

A = Stearin

B= Kolliphor-EL

b. Q_{10}

$Y = 0,047 (A) + 3,07 (B) \dots\dots\dots (4)$

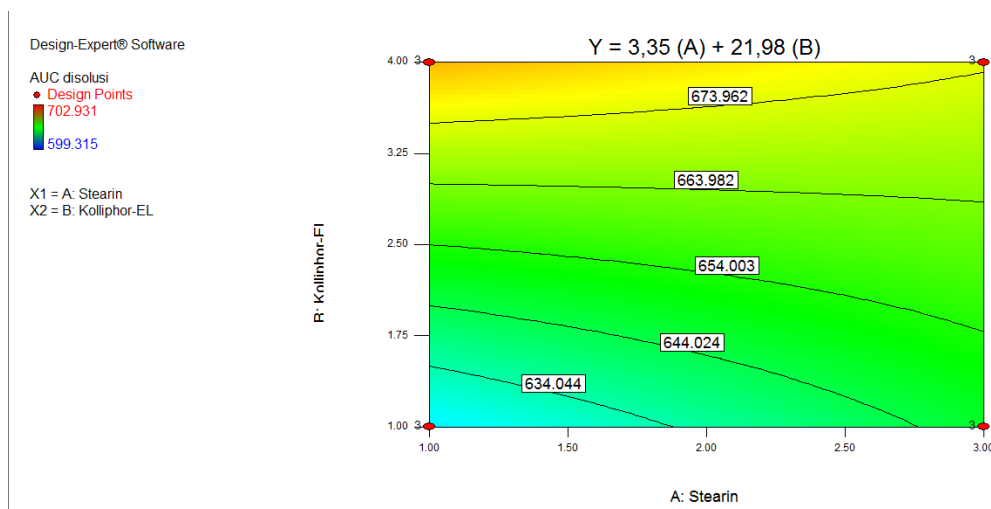
Keterangan :

Y = Q_{10} (persen) disolusi

A = Stearin

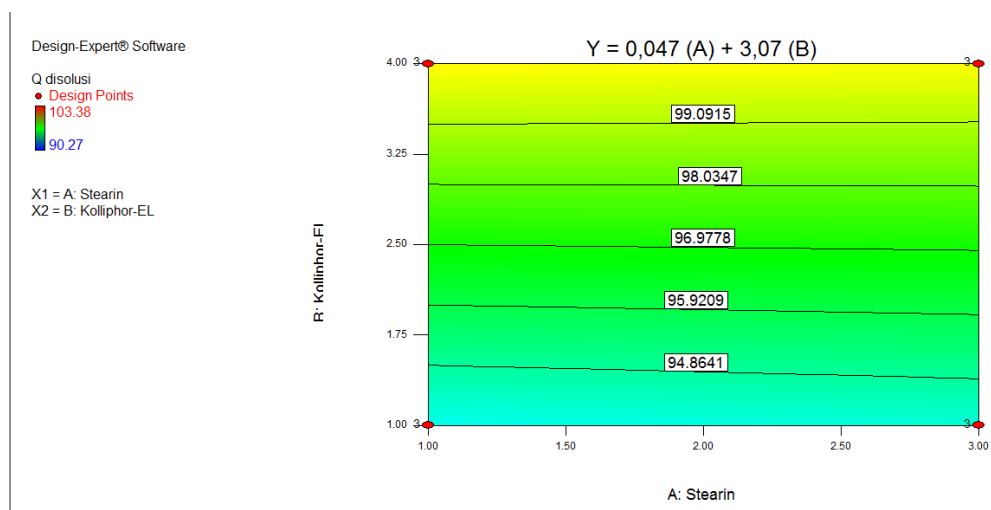
B= Kolliphor-EL

Berdasarkan hasil analisis AUC dan Q_{10} uji disolusi dengan 2^2 *factorial design* menjelaskan bahwa pada parameter AUC pengaruh komponen B lebih besar dibandingkan komponen A. Pengaruh komponen B sebesar 59,66% dan komponen A sebesar 1,38%, sedangkan pada parameter Q_{10} pengaruh komponen B lebih besar dibandingkan komponen A. Pengaruh komponen B sebesar 60,56% dan komponen A sebesar 0,014%. Komponen Stearin dan Kolliphor-EL mampu mempengaruhi AUC dan Q_{10} pada uji disolusi secara bermakna ($p < 0,05$). Berdasarkan dua persamaan diatas menjelaskan bahwa komponen A yaitu stearin dan kolliphor-EL mampu meningkatkan AUC dan Q_{10} pada uji disolusi *solid* SNEDDS Naringenin sebesar 3,35 pada parameter AUC dan 0,047 pada parameter Q_{10} , sedangkan komponen B yaitu kolliphor-EL meningkatkan AUC dan Q_{10} pada uji disolusi *solid* SNEDDS Naringenin sebesar 21,98 pada parameter AUC dan 3,07 pada parameter Q_{10} . Pengaruh Kolliphor-EL lebih dominan pada uji disolusi karena agar obat dapat terdisolusi salah satu syaratnya adalah ukuran partikel atau dropletnya harus kecil dan untuk membentuk ukuran droplet yang sangat kecil pada *solid* SNEDDS maka diperlukan antarmuka minyak dan air yang sangat luas, sehingga juga diperlukan jumlah surfaktan yang lebih besar untuk menjembatani antarmuka minyak dan air agar dispersi kedua fase dapat stabil. Jumlah surfaktan yang tidak mencukupi menyebabkan antarmuka minyak/air semakin kecil, sehingga ukuran droplet yang terbentuk akan semakin besar (Hasani. 2015).



Gambar 22. Contour plot AUC Uji Disolusi

Contour plot AUC uji disolusi (gambar 22) menunjukkan interaksi antara stearin dan kolliphor-EL sebagai komponen *solid* SNEEDS Naringenin. Hasil *contour plot* menunjukkan bahwa semakin mendekati warna merah maka AUC semakin besar dengan jumlah komponen stearin dan kolliphor-EL semakin besar, sedangkan semakin mendekati area berwarna biru menunjukkan AUC semakin kecil dengan jumlah komponen stearin dan kolliphor-EL semakin kecil.

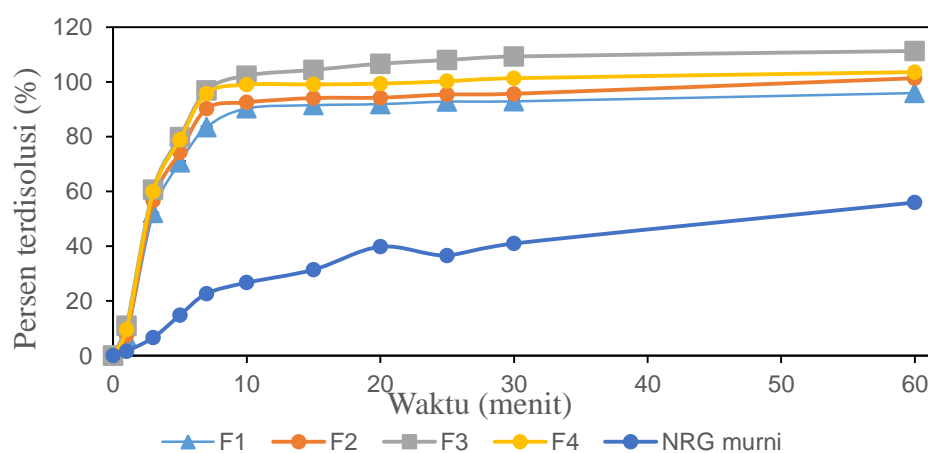


Gambar 23. Contour plot Q₁₀ Uji Disolusi

Contour plot Q₁₀ uji disolusi (gambar 23) menunjukkan interaksi antara stearin dan kolliphor-EL sebagai komponen *solid* SNEEDS Naringenin. Hasil *contour plot* menunjukkan bahwa semakin mendekati warna merah maka Q₁₀ semakin besar dengan jumlah komponen stearin dan kolliphor-EL semakin besar,

sedangkan semakin mendekati area berwarna biru menunjukkan Q_{10} semakin kecil dengan jumlah komponen stearin dan kolliphor-EL semakin kecil.

Hasil disolusi *solid* SNEDDS Naringenin tersebut juga dibandingkan profil disolusinya dengan Naringenin murni untuk membuktikan apakah *solid* SNEDDS Naringenin memiliki pengaruh terhadap kecepatan disolusi. Hasil uji disolusi terbanding antara Naringenin murni dengan *solid* SNEDDS Naringenin dapat dilihat pada gambar 24.



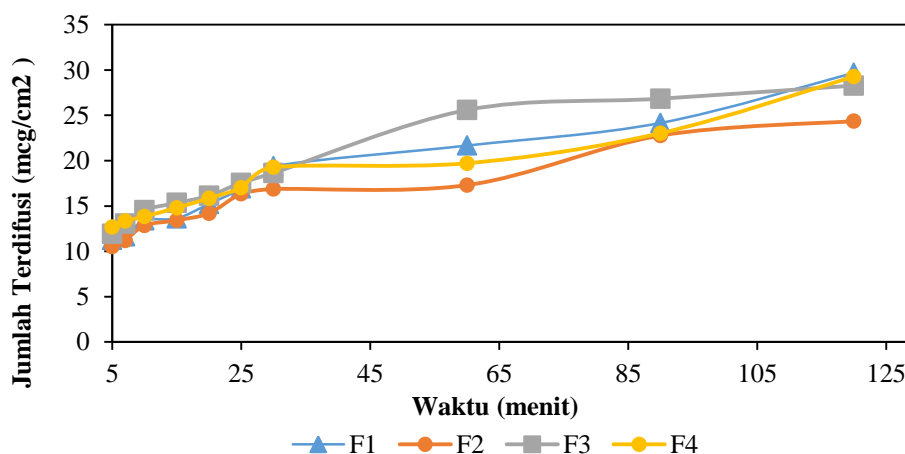
Gambar 24. Profil disolusi *solid* SNEDSS Naringenin formula 1-4 dengan Naringenin murni

Profil disolusi tersebut menunjukkan bahwa *solid* SNEDDS mampu menaikkan disolusi dari Naringenin dilihat dari grafik disolusi *solid* SNEDDS lebih tinggi dibandingkan Naringenin murni. Sediaan *solid* SNEDDS Naringenin memiliki persen terdisolusi lebih dari 50% pada menit ke-3 dan terus mengalami peningkatan yang signifikan hingga menit ke-60 sehingga menghasilkan luas daerah yang lebih besar dibandingkan dengan Naringenin murni (Gambar 24). Nilai AUC hingga menit ke 10 Naringenin murni sebesar 145,075 sedangkan *solid* SNEDDS Naringenin formula 1 sampai dengan 4 berturut-turut sebesar 599,31; 637,21; 692,87 dan 679,68. Kelarutan Naringenin dalam sistem *solid* SNEDDS lebih besar dikarenakan dalam *solid* SNEDDS obat dibawa oleh suatu pembawa minyak dimana minyak tersebut dapat membantu obat terdispersi lebih cepat dibandingkan sediaan murninya.

4. Uji difusi dengan *dialysis bag*

Persen terdisolusi dengan menggunakan *dialysis bag* dari *solid* SNEDDS Naringenin yang dihasilkan dapat digunakan untuk mengetahui jumlah Naringenin yang dapat menembus membran dalam setiap waktu, sehingga dapat dihitung parameter farmakokinetika dari sediaan tersebut. Peningkatan persen terdifusi dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan membran dialysis dan larutan dapar phospat buffer saline (pH 7,4) sebagai pengganti cairan darah. Jumlah Naringenin yang dapat menembus membran dalam setiap satuan waktu dapat menggambarkan pembentukan nanoemulsi yang dikarakterisasi dengan pembentukan atau pelarutan *solid* SNEDDS dengan metode disolusi.

Hasil uji difusi dengan membran dialysis *solid* SNEDDS Naringenin digambarkan dengan suatu grafik antara waktu dengan % terdisolusi yang mampu menembus membran dalam medium dapar fosfat pH 7,4 dimana menggambarkan pembentukan nanoemulsi. Hasil dari pengujian tersebut dapat dilihat pada gambar 25.



Gambar 25. Profil difusi solid SNEDSS Naringenin formula 1-4

Kemampuan *solid* SNEDDS Naringenin dalam menembus membran dapat dibuktikan dengan uji difusi menggunakan *dialysis bag*. Hasil dari pengujian tersebut dapat dilihat pada gambar 25. Seluruh formula memiliki pola yang sama, artinya perbedaan variasi konsentrasi tidak memberikan perubahan pola. Persen pelepasan obat dengan membran *dialysis bag* tidak bisa mencapai 100% karena

transport membran kompartemen donor-aseptor tidak berpindah maksimal 50%. Pada menit 0 hingga 120 formula 4 memiliki jumlah terdifusi paling tinggi yaitu mencapai $29,70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sedangkan jumlah terdifusi obat terendah pada formula 2 yaitu sebesar $24,36 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Hasil jumlah terdifusi keempat formula *solid* SNEDDS Naringenin kemudian dianalisis nilai konstanta difusinya menggunakan regresi linier berganda dengan pendekatan 2^2 *factorial design*, sehingga diperoleh persamaan :

A. Konstanta difusi

$$Y = - 0,014 (A) + 0,002264 (B) \dots\dots\dots (5)$$

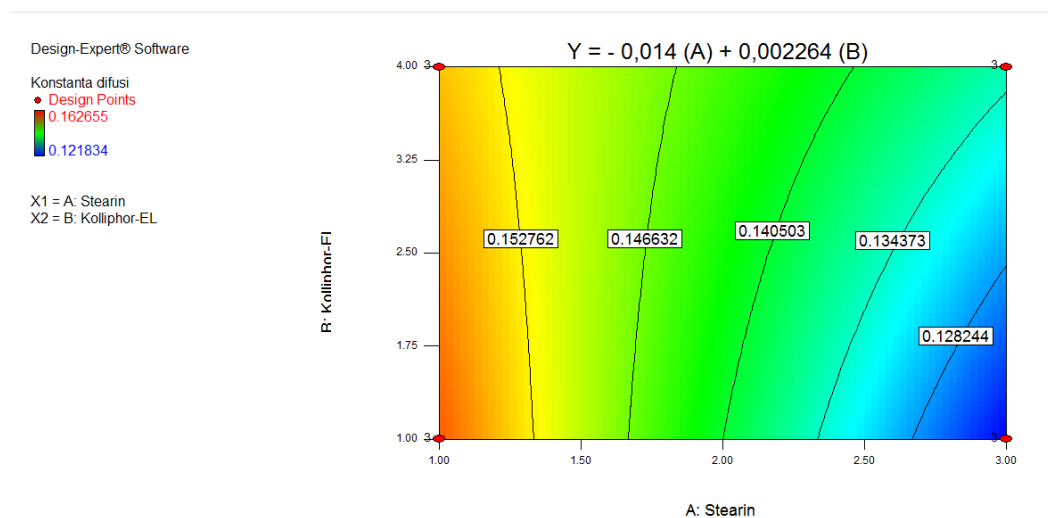
Keterangan :

Y = Konstanta difusi

A = Stearin

B= Kolliphor-EL

Berdasarkan hasil analisis konstanta difusi dengan 2^2 *factorial design* menjelaskan bahwa pengaruh komponen A lebih besar dibandingkan komponen B. Pengaruh komponen A sebesar 87,90%, sedangkan pengaruh komponen B sebesar 2,27% mampu mempengaruhi konstanta difusi secara bermakna ($p < 0,05$). Berdasarkan dua persamaan diatas menjelaskan bahwa komponen A yaitu stearin menurunkan konstanta difusi sebesar 0,014, sedangkan komponen B yaitu kolliphor-EL meningkatkan konstanta difusi sebesar 0,002264 pada uji difusi *solid* SNEDDS Naringenin. Hasil dapat dilihat pada lampiran 5e dan 5f kemudian disimpulkan bahwa kolliphor-EL lebih dominan dalam meningkatkan konstanta difusi *solid* SNEDDS Naringenin karena untuk membentuk ukuran droplet yang sangat kecil maka diperlukan antarmuka minyak dan air yang sangat luas, sehingga juga diperlukan jumlah surfaktan yang lebih besar untuk menjembatani antarmuka minyak dan air agar dispersi kedua fase dapat stabil. Jumlah surfaktan yang tidak mencukupi menyebabkan antarmuka minyak/air semakin kecil, sehingga ukuran droplet yang terbentuk akan semakin besar (Hasani, 2015).



Gambar 26. Contour plot konstanta difusi

Contour plot konstanta difusi (gambar 25) menunjukkan interaksi antara stearin dan kolliphor-EL sebagai komponen *solid* SNEEDS Naringenin. Hasil *contour plot* menunjukkan bahwa semakin mendekati warna merah maka konstanta difusi semakin besar dengan jumlah komponen stearin semakin kecil dan kolliphor-EL semakin besar, sedangkan semakin mendekati area berwarna biru menunjukkan AUC semakin kecil dengan jumlah komponen stearin semakin besar dan kolliphor-EL semakin kecil.

H. Formula Optimum

Komposisi formula optimum *solid* SNEDDS Naringenin yang dibuat menggunakan program 2^2 *factorial design* memperoleh proporsi komponen *solid* SNEDDS dengan perbandingan Stearin : Kolliphor-EL (1,0 : 4,0) dengan parameter *emulsification time* sebesar 17,67 detik, persen transmittan 40,27%, AUC disolusi 683,94, Q_{10} disolusi 100,15%, dan konstanta difusi 0,1548. Hasil formula optimum dapat dilihat pada lampiran 5.