

**FORMULASI *SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS)  
MINYAK ATSIRI KULIT BUAH JERUK KALAMANSI (*Citrus x microcarpa* Bunge)  
TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI (*Escherichia coli*)**

**(Skripsi)**

**Oleh :**

**Afna Nur Afni Palogan  
1918031008**



**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

**FORMULASI *SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM*  
(SNEDDS) MINYAK ATSIRI KULIT BUAH JERUK KALAMANSI  
(*Citrus x microcarpa* Bunge) TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI  
*Escherichia coli***

**Oleh :  
Afna Nur Afni Palogan**

**Skripsi  
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar  
SARJANA FARMASI**

**Pada  
Program Studi Farmasi  
Fakultas Kedokteran Universitas Lampung**



**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
2023**

Judul Skripsi : **FORMULASI *SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS) MINYAK ATSIRI KULIT BUAH JERUK KALAMANSI (*Citrus x microcarpa* Bunge) TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI *Escherichia coli***

Nama Mahasiswa : **Afna Nur Afni Palogan**

No. Pokok Mahasiswa : 1918031008

Program Studi : FARMASI

Fakultas : KEDOKTERAN

**MENYETUJUI**  
Komisi Pembimbing

  
**Andi Nafisah T. A. M., S. Farm., M.Sc.**  
NIP. 19890223 202012 2 015

  
**apt. Citra Yuliyanda P., M. Farm.**  
NIP. 19900719 202012 2 031

**MENGETAHUI**

Plt. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

  
  
**Dr. Eng. Satripto Dwi Yuwono, S. Si., M. T**  
NIP. 19740705 200003 1 001

**MENGESAHKAN**

1. Tim Penguji

Ketua : **Andi Nafisah T. A. M., S. Farm., M.Sc.**



Sekretaris : **apt. Citra Yuliyanda P., M. Farm.**



Penguji

Bukan Pembimbing : **dr. Rasmi Zakiah Oktarlina, M. Farm.**



2. Plt. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung,



**Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, S. Si., M. T**

NIP 19740705 200003 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **17 Mei 2023**

## LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

Skripsi dengan judul “**FORMULASI SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM (SNEDDS) MINYAK ATSIRI KULIT BUAH JERUK KALAMANSI (*Citrus x microcarpa* Bunge) TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI *Escherichia coli***” adalah hasil karya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau disebut plagiarisme. Hak intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila di kemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, Mei 2023

Pembuat Pernyataan



**Atna Nur Afni Palogan**

**NPM. 1918031008**

## RIWAYAT HIDUP

Afna Nur Afni Palogan lahir di Bandar Lampung pada tanggal 18 Juli 2001. Penulis lahir dari pasangan Bapak Suhaili dan Ibu Sumarni, merupakan anak kedua dari tiga bersaudara. Penulis memiliki satu kakak perempuan bernama Arma Daily Palogan, S. Sos., dan satu adik perempuan bernama Elodya Nur Cahyani Palogan. Penulis memiliki riwayat di MTs Negeri 2 Bandar Lampung pada tahun 2013-2016; di tahun yang sama melanjutkan pendidikan menengah atas di MAN 1 Bandar Lampung hingga 2019. Pada tahun 2019, penulis diterima di Program Studi S1 Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

Penulis menjalani masa kuliah dengan aktif dalam beberapa perlombaan, asisten dosen, dan organisasi mahasiswa. Penulis pernah menjadi Juara 3 Lomba Menulis Opini Tingkat Nasional yang diadakan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Lampung Mangkurat pada tahun 2020, Juara 3 Mahasiswa Berprestasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung tahun 2021, Juara 2 Lomba *Literature Review* Tingkat Nasional yang diadakan oleh Himpunan Mahasiswa Farmasi Universitas Lampung tahun 2022, dan Finalis Duta Inspirasi Indonesia *batch* 8 yang diadakan oleh Kemenpora RI pada tahun 2023. Penulis juga pernah menjadi Asisten Dosen Penelitian Farmakologi, Praktikum Farmasetika, dan Praktikum Teknologi Formulasi Sediaan Farmasi, serta Praktikum Farmakologi dan Toksikologi. Penulis juga aktif dalam Forum Studi Islam Ibnu Sina Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama 1 tahun pada tahun 2020-2021 sebagai Sekretaris Departemen Akademik dan Himpunan Mahasiswa Farmasi (Himafarsi) Universitas Lampung selama 2 tahun sebagai Ketua Departemen Fundraising pada tahun 2021-2022 serta Ketua Departemen *Business and Partnership* pada tahun 2022-2023. Penghargaan lain yang penulis dapatkan selama bergabung di Himafarsi diantaranya, Ketua Departemen Terinisiatif pada tahun 2022.

## SANWACANA

Puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Formulasi Self-nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) terhadap Aktivitas Antibakteri *Escherichia coli***”. Shalawat serta salam tak lupa tucurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Penulis dalam menyelesaikan skripsi ini, mendapatkan banyak bimbingan, masukan, motivasi, kritik, saran dan doa dari banyak pihak. Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

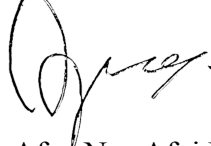
1. Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D. E. A. IPM., selaku Rektor Universitas Lampung;
2. Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, S. Si., M. T, selaku Plt. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
3. dr. Oktafany, S. Ked., M. Pd. Ked., selaku Kepala Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
4. Ibu Andi Nafisah T. A. M., S. Farm., M. Sc., selaku Pembimbing I yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam memberikan arahan, motivasi, kritik dan saran yang membangun selama penulisan penelitian skripsi dan selama penulis menjadi mahasiswa;
5. Ibu Apt. Citra Yuliyanda Pardilawati, S. Farm., M. Farm., selaku Pembimbing II yang telah berkenan meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam memberikan arahan, dukungan, kritik dan saran membangun selama penelitian skripsi serta selama penulis menjadi mahasiswa;
6. dr. Rasmi Zakiah Oktarlina, S. Ked., M. Farm., selaku Pembahas yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam memberikan motivasi, evaluasi, kritik dan saran membangun kepada penulis;
7. apt. Mirza Junando, M. Farm. Klin., selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan nasihat selama perkuliahan hingga semester akhir;

8. Seluruh dosen, staf, dan civitas Fakultas Kedokteran Universitas Lampung atas bimbingan dan ilmu yang telah diberikan selama penulis menjalani perkuliahan;
9. Seluruh staf Laboratorium Farmasetika dan Teknologi Formulasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung yang telah membantu proses penelitian;
10. Seluruh staf Laboratorium Mikrobiologi dan Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung yang telah membantu penelitian;
11. Seluruh staf Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung yang telah membantu proses pengujian penelitian;
12. Seluruh staf Bagian Mikrobiologi UPTD Laboratorium Kesehatan Daerah (Labkesda) Provinsi Lampung yang telah membantu penelitian;
13. Seluruh staf *Integrated Laboratory and Research Center (ILRC)* Universitas Indonesia yang telah membantu proses pengujian penelitian;
14. Ayah, Ibu, Ayuk Cak, Bang Ary dan Cicik tersayang atas dukungan moril dan materil yang sangat berarti dalam proses penyusunan skripsi ini;
15. Teman-teman L19AND yang mau berjuang dan mendedikasikan hidupnya sebagai angkatan pertama yang selalu mengerti, kuat dan keren, serta membantu penyiapan sampel minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi;
16. Teman-teman “#BnProfff it!” dan Adik-adik Farmasi 2020 lainnya yang mau meluangkan waktu dan tenaga untuk persiapan sampel penelitian;
17. Sahabat-sahabat Mikro (Muti, Khalim, Luhut, Nana) yang selalu bersama dari pengerjaan uji antibakteri hingga mendapatkan zona bening;
18. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan dorongan dan bantuan selama penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam skripsi ini. Oleh karena itu, penulis membuka diri terhadap kritik dan saran yang membangun.

Bandar Lampung, Mei 2023

Penulis



Afna Nur Afni Palogan



﴿بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ﴾

Bismillahirrahmanirrahim-

﴿فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا﴾    ﴿إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا﴾

“5. Maka, sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan.

6. Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan.”

QS. Al-Insyirah : 5-6

**Sebuah persembahan sederhana untuk  
orang-orang yang paling aku sayangi  
Ayah, Ibu, Cak, Cicik, dan Tim Nano**

**-Ngah-**

## ABSTRACT

### FORMULATION OF *SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS) ESSENTIAL OIL OF CALAMANSI PEEL (*Citrus x microcarpa* Bunge) AS AN ANTIBACTERIAL *Escherichia coli*

By

Afna Nur Afni Palogan

**Background:** Diarrhea is the eighth cause of death caused by *Escherichia coli*. The peel of the calamansi fruit has potential as an antibacterial compound. These compounds are difficult to dissolve in water and evaporate easily, so a spontaneous nanoemulsion delivery system is needed to optimize them. The aim of the research was to obtain the optimum formula for spontaneous nanoemulsion delivery systems and antibacterial effectiveness.

**Methods:** The design of this research used mixture design of tween 80 and propylene glycol in self-nanoemulsifying drug delivery system formula.

**Results:** Based on the research results, the recommended formula is tween 80 and propylene glycol of 5.5 and 2.5 with a formula desirability is 1,000. The characteristics of the optimum formula show a particle size of 69.17 nm, a zeta potential of -27.0 mV, and the shape of the surface size at 30,000× magnification shows a stable form of nanoparticles. The optimum formula inhibition for *Escherichia coli* was 23.15 mm and 11.55 mm for essential oils.

**Conclusion:** Self-nanoemulsifying delivery system of essential oil of calamansi peel can improve the effectiveness of *Escherichia coli* inhibition as an antibacterial.

**Keywords:** Antibacterial, *Escherichia coli*, Essential Oil of Calamansi Peel, Self-nanoemulsifying Drug Delivery System.

## ABSTRAK

### FORMULASI *SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS) MINYAK ATSIRI KULIT BUAH JERUK KALAMANSI (*Citrus x microcarpa* Bunge) TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI *Escherichia coli*

Oleh

Afna Nur Afni Palogan

**Latar Belakang:** Diare merupakan penyakit penyebab kematian ke-delapan yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli*. Bagian kulit buah jeruk kalamansi memiliki potensi sebagai senyawa antibakteri. Senyawa tersebut bersifat sukar larut dalam air dan mudah menguap sehingga diperlukan sistem penghantaran nanoemulsi spontan untuk mengoptimalkannya. Tujuan penelitian untuk mendapatkan formula optimum sistem penghantaran nanoemulsi spontan yang efektif terhadap antibakteri *Escherichia coli*.

**Metode:** Desain penelitian ini menggunakan metode rancangan pencampuran tween 80 dan propilen glikol pada formula nanoemulsi spontan pada uji daya hambat *Escherichia coli*.

**Hasil:** Berdasarkan hasil penelitian, formula yang direkomendasikan adalah tween 80 dan propilen glikol sebesar 5,5 dan 2,5 dengan kelayakan formula sebesar 1,000. Karakteristik formula optimum menunjukkan ukuran partikel sebesar 69,17 nm, zeta potensial sebesar -27,0 mV, dan bentuk ukuran permukaan pada perbesaran 30.000× menunjukkan bentuk nanopartikel yang stabil. Daya hambat formula optimum pada *Escherichia coli* sebesar 23,15 mm dan minyak atsiri sebesar 11,55 mm.

**Kesimpulan:** Sistem penghantaran nanoemulsi spontan minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi dapat memperbaiki efektivitas antibakteri *Escherichia coli* yang sukar larut dan mudah menguap.

**Kata Kunci:** Antibakteri, *Escherichia coli*, Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi, Sistem Penghantaran Nanoemulsi Spontan.

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>i</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>iv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum .....	3
1.3.2 Tujuan Khusus .....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat bagi Peneliti.....	4
1.4.2 Manfaat bagi Institusi .....	4
1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Minyak Atsiri .....	5
2.1.1 Metode Pembuatan Minyak Atsiri .....	5
2.1.2 Evaluasi Minyak Atsiri.....	7
2.2 Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) .....	8
2.2.1 Morfologi.....	8
2.2.2 Klasifikasi Ilmiah .....	8
2.2.3 Kandungan.....	9
2.2.4 Manfaat.....	10
2.3 Nanoemulsi .....	11
2.4 <i>Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System</i> (SNEDDS) .....	12
2.4.1 Komponen.....	12
2.4.2 Evaluasi dan Karakterisasi.....	13

2.5 <i>Escherichia coli</i> .....	14
2.5.1 Morfologi.....	14
2.5.2 Klasifikasi.....	15
2.5.3 Patogenesitas.....	15
2.5.4 Pengobatan dan Pencegahan.....	16
2.6 Antibakteri.....	17
2.6.1 Uji Aktivitas Antibakteri.....	17
2.7 Bahan Tambahan.....	18
2.7.1 <i>Virgin Coconut Oil</i> (VCO).....	18
2.7.2 <i>Polysorbate 80</i> (Tween 80).....	18
2.7.3 Propilen Glikol.....	19
2.7.4 <i>Dimethyl Sulfoxide</i> (DMSO).....	19
2.8 Kerangka Teori.....	20
2.9 Kerangka Konsep.....	22
2.10 Hipotesis.....	22
2.10.1 Hipotesis Null (H <sub>0</sub> ).....	22
2.10.2 Hipotesis Alternatif (H <sub>1</sub> ).....	22
<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>	<b>23</b>
3.1 Desain Penelitian.....	23
3.2 Tempat dan Waktu.....	23
3.3 Bahan Uji Penelitian.....	24
3.3.1 Buah Jeruk Kalamansi.....	24
3.3.2 Mikroba Uji Penelitian.....	24
3.3.3 Media <i>Nutrient Agar</i> (NA).....	24
3.3.4 Media <i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA).....	24
3.3.5 Media <i>Artificial Gastric Fluid</i> (AGF).....	25
3.3.6 Media <i>Artificial Intestinal Fluid</i> (AIF).....	25
3.4 Variabel Penelitian.....	25
3.5 Definisi Operasional Variabel.....	26
3.6 Alat dan Bahan.....	27
3.6.1 Alat.....	27
3.6.2 Bahan.....	27

3.7	Prosedur .....	28
3.7.1	Destilasi Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi .....	28
3.7.2	Uji Pendahuluan Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi Terhadap Zona Hambat Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> .....	28
3.7.3	Pembuatan SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi .	29
3.7.4	Penentuan Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi .....	30
3.7.5	Karakterisasi Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi .....	31
3.8	Analisis Data .....	34
3.9	Etika Penelitian .....	35
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>		<b>36</b>
4.1	Hasil .....	36
4.1.1	Hasil Determinasi Tanaman Buah Jeruk Kalamansi .....	36
4.1.2	Hasil Identifikasi Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi.....	36
4.1.3	Hasil Analisis Senyawa Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi .....	37
4.1.4	Hasil Uji Pendahuluan Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi pada Bakteri <i>Escherichia coli</i> ..	37
4.1.5	Hasil Evaluasi Formula SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) .....	39
4.1.6	Hasil Penentuan Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) ...	41
4.1.7	Hasil Karakterisasi Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) ...	42
4.2	Pembahasan.....	47
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>		<b>57</b>
5.1	Kesimpulan .....	57
5.2	Saran .....	58
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>		<b>59</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Senyawa Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi.....	10
Tabel 2. Komposisi Media AGF.....	25
Tabel 3. Komposisi Media AIF.....	25
Tabel 4. Definisi Operasional Variabel.....	26
Tabel 5. Formulasi SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi.....	29
Tabel 6. Hubungan Diameter dan Kategori Zona Hambat.....	34
Tabel 7. Hasil Identifikasi Minyak Atsiri dari Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge).....	36
Tabel 8. Hasil Rendemen Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi.....	37
Tabel 9. Hasil Diameter Zona Hambat dari Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) terhadap Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> .....	38
Tabel 10. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Diameter Zona Hambat Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) terhadap Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> .....	38
Tabel 11. Hasil Uji <i>Post Hoc</i> LSD Diameter Zona Hambat Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) terhadap Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> .....	39
Tabel 12. Hasil Uji Persen Transmitan Formula SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge).....	40
Tabel 13. Hasil Uji Waktu Emulsifikasi Formula SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge).....	41
Tabel 14. Hasil Uji Waktu Emulsifikasi Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge).....	43
Tabel 15. Hasil Karakterisasi Ukuran Partikel, PI, dan Zeta Potensial Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge).....	43
Tabel 16. Hasil Diameter Zona Hambat Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) terhadap Zona Hambat Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> .....	45

Tabel 17. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Data Diameter Zona Hambat Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) terhadap Zona Hambat Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> .....	46
Tabel 18. Hasil Uji <i>Post Hoc</i> LSD Diameter Zona Hambat Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) terhadap Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> .....	46



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skema Pembuatan Minyak Atsiri.....	5
Gambar 2. Tanaman Buah Jeruk Kalamansi .....	8
Gambar 3. Struktur <i>Limonene</i> . .....	9
Gambar 4. Nanoemulsi.....	11
Gambar 5. Mekanisme SNEDDS di Dalam Tubuh .....	12
Gambar 6. <i>Escherichia coli</i> , Perbesaran 1000x.....	14
Gambar 7. Struktur <i>Polysorbate 80</i> .....	19
Gambar 8. Struktur Propilen Glikol.....	19
Gambar 9. Struktur DMSO .....	20
Gambar 10. Kerangka Teori.....	21
Gambar 11. Kerangka Konsep .....	22
Gambar 12. Skema Formulasi SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi.....	30
Gambar 13. Hasil Kurva Grafik %T Formula Optimum dari SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge)....	42
Gambar 14. Hasil Karakterisasi <i>Scanning Electron Miscroscope</i> (SEM) Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) .....	44
Gambar 15. Hasil Uji Kestabilan Fisik Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi ( <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) (a) Suhu Ruang dan (b) Suhu 37°C.....	44

**DAFTAR SINGKATAN**

%T	: Persen Transmittan
μL	: Mikroliter
AGF	: <i>Artificial Gastric Fluid</i>
AIF	: <i>Artificial Intestinal Fluid</i>
CMC	: <i>Carboxy Methyl Cellulose</i>
DMSO	: <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
GBD	: <i>Global Burden of Disease</i>
GC - MS	: <i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i>
HLB	: <i>Hydrophylic-Lipophylic Balance</i>
M/A	: Minyak dalam Air
MAKBJK	: Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi
MHA	: <i>Mueller Hinton Agar</i>
ml	: Mililiter
mm	: Milimeter
mV	: Milivolt
nm	: Nanometer
PI	: <i>Polydispersity Index</i>
s	: <i>second</i> (detik)
SD	: Standar Deviasi
SEM	: <i>Scanning Electron Microscope</i>
SNEDDS	: <i>Self-nanoemulsifying Drug Delivery System</i>
VCO	: <i>Virgin Coconut Oil</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 LATAR BELAKANG**

Diare adalah komorbiditas penyebab kematian kedelapan dengan penyakit menular lainnya di antara semua usia secara global, baik anak-anak maupun orang dewasa. Negara-negara di Afrika memiliki rasio kasus fatalitas diare lebih tinggi dibandingkan wilayah Palestina, diikuti Asia Tenggara seperti Indonesia, Vietnam, Kamboja, dan Sri Lanka (GBD 2016 DDC, 2018). Diare dan gastroenteritis termasuk ke dalam daftar penyakit tidak menular terbanyak di Indonesia yang terjadi pada tahun 2014. Penyakit tidak menular ini bersifat kronis dan progresif, sehingga pasien yang mengalami penyakit ini tidak akan menyadari sampai muncul gejala (Purnamasari, 2018).

Terapi antibiotik efektif dalam mengurangi durasi dan keparahan diare, terutama pada *traveler's diarrhea*. Florokuinolon, seperti siprofloksasin, levofloksasin, dan oflofloksasin diindikasikan sebagai antibiotik untuk bakteri dengan spektrum luas enterik seperti *Escherichia coli*. Perbedaan efektivitas antibakteri antardaerah juga kemungkinan berbeda karena adanya pola resistensi antibiotik lokal (Leung *et al.*, 2019). Resistensi antibiotik siprofloksasin secara signifikan lebih tinggi di negara berkembang dibandingkan di negara maju karena meluasnya penggunaan antibiotik ini pada pasien rawat jalan secara terus-menerus tanpa ada pembatasan yang diatur dalam perundang-undangan (Kot, 2019).

Indonesia merupakan negara agrobiodiversitas dan budaya yang tinggi, namun pemanfaatan sumber daya pangan masih jauh dari optimal. Agrobiodiversitas tidak hanya dimanfaatkan sebagai makanan dan nutrisi, namun dapat juga dimanfaatkan sebagai obat (Pawera, 2021). Buah jeruk dan

produknya memiliki nilai ekonomi dan pengobatan yang tinggi. Minyak atsiri dari kulit jeruk mengandung banyak senyawa bioaktif seperti *limonene*, kumarin, flavonoid, karoten, terpen, dan linolol. Senyawa alami tersebut menjadi senyawa potensial dengan kemampuan menghambat biofilm dari strain bakteri *Escherichia coli* O157:H7. Salah satu tanaman khas Indonesia adalah jeruk kalamansi (Rohatgi & Gupta, 2021; Singh *et al.*, 2021).

Pada penelitian sebelumnya, ekstrak kasar kulit buah jeruk kalamansi konsentrasi 40% dan minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi konsentrasi 20% sudah diujikan terhadap daya hambat bakteri *Escherichia coli*. Hasil dari penelitian memiliki zona hambat tergolong sedang (Amiliah *et al.*, 2021). Penelitian lain, yaitu membuat sediaan *Handsanitizer* gel dari minyak atsiri jeruk kalamansi 0%, 1%, 2%, 4%, didapatkan kemampuan daya hambat lemah, sedang, dan kuat (Haque *et al.*, 2018).

Nanoemulsi dari minyak atsiri sangat berpotensi dalam produk pengobatan yang paling andal dan ramah lingkungan. Nanoemulsi dari *finger citron* (*C. medica* L. var. *sarcodactylis*) berpengaruh sebagai antibakteri *B. subtilis*, *Escherichia coli*, dan *S. aureus*. Kekurangan dari sediaan nanoemulsi minyak atsiri adalah senyawa bioaktif mudah terdegradasi dan bersifat hidrofobik, sehingga diperlukan rasio fase minyak dan surfaktan yang optimal pada tahap formulasi (Singh *et al.*, 2021; Singh & Pulikkal, 2022).

Formulasi nanopartikel menggunakan senyawa bioaktif alami sebagai antibiotik tunggal atau kombinasi dengan antibiotik lain, memiliki efektivitas terapi yang kuat dan berpotensi menjadi solusi masalah resistensi antibiotik. Hal yang harus dipertimbangkan dalam pre-formulasi nanopartikel adalah aspek keamanan dan dampak lingkungan dari sintesis nanopartikel tersebut (Anand *et al.*, 2022). Pembuatan nanoemulsi memiliki dua metode, yaitu menggunakan metode energi tinggi dan metode energi rendah. Metode energi tinggi memiliki kekurangan yaitu kurang ramah lingkungan dan juga mahal jika dibandingkan dengan metode energi rendah. *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) adalah salah satu metode emulsifikasi energi

rendah yang secara spontan dapat membentuk nanoemulsi minyak dalam air menggunakan fase minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan dengan sedikit pengadukan (Singh & Pulikkal, 2022; Tungadi, 2020).

Berdasarkan uraian di atas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian dengan judul, “Formulasi *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) terhadap Aktivitas Antibakteri *Escherichia coli*.” Penelitian ini penting dilakukan sebagai alternatif pengobatan menggunakan bahan alam dengan metode energi rendah yang dapat dimanfaatkan sebagai antibiotik di masa yang akan datang.

## 1.2 RUMUSAN MASALAH

1. Apakah minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) dapat diformulasikan dalam SNEDDS?
2. Bagaimana karakteristik formula optimum sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge)?
3. Bagaimana efektivitas formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi terhadap uji daya hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*?

## 1.3 TUJUAN PENELITIAN

### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui formula optimum sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) sehingga mendapatkan karakteristik sediaan nanoemulsi dan mengetahui aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mendapatkan formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge)

- b. Untuk mengetahui karakteristik dari formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge).
- c. Untuk mengetahui pengaruh dari formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) terhadap hambatan pertumbuhan *Escherichia coli*.

## 1.4 MANFAAT PENELITIAN

### 1.4.1 Manfaat bagi Peneliti

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan dan pengalaman peneliti tentang pemanfaatan tanaman jeruk kalamansi, dimulai dari cara pengambilan buah, penyulingan minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi, formulasi sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge), hingga melakukan karakterisasi formula optimum sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) dan uji daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

### 1.4.2 Manfaat bagi Institusi

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi ilmiah untuk penelitian selanjutnya dalam pengembangan sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) dengan variasi fase minyak, surfaktan, ataupun ko-surfaktan lain sebagai sistem penghantaran obat terkendali yang ramah lingkungan.

### 1.4.3 Manfaat bagi Masyarakat

Hasil penelitian ini dapat menjadi sumber informasi kepada masyarakat mengenai pemanfaatan kulit dari buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge).

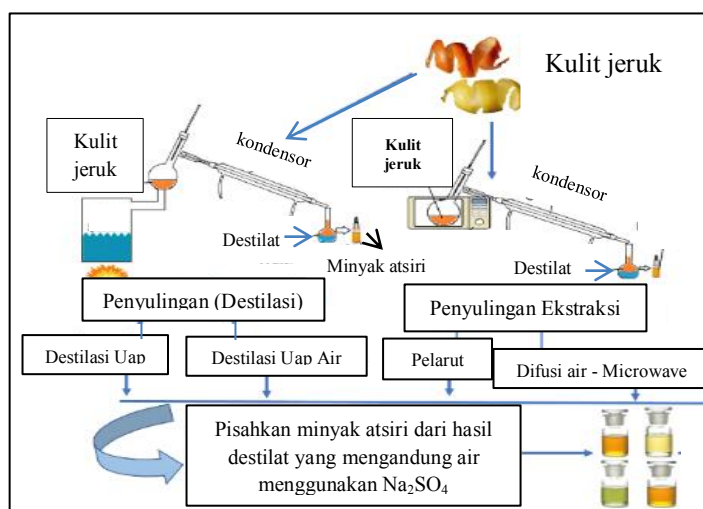
## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Minyak Atsiri

Minyak atsiri atau yang disebut juga minyak essensial, minyak eterus, minyak menguap, atau minyak terbang, merupakan salah satu komoditas ekspor agroindustri Indonesia. Minyak atsiri mempunyai rasa getir, tidak berwarna, dan mudah menguap pada suhu kamar (Palogan *et al.*, 2023). Minyak atsiri dalam tanaman berfungsi sebagai pengusir serangga, mencegah daun dan bunga rusak. Keberadaan minyak atsiri dalam tanaman terdapat di dalam kulit batang, bunga, buah, kuncup, daun, akar, rimpang, biji atau seluruh bagian tanaman. Penyimpanan minyak atsiri pada tanaman jeruk, tersimpan di bagian mahkota bunga atau dalam kulit buah (Endarini, 2016).

#### 2.1.1 Metode Pembuatan Minyak Atsiri

Pembuatan minyak atsiri dari tanaman terdiri dari dari berbagai metode. Skema pembuatan minyak atsiri terdapat pada gambar 1. Berikut adalah penjelasan metode pembuatan minyak atsiri kulit jeruk:



Gambar 1. Skema Pembuatan Minyak Atsiri (Singh *et al.*, 2021).

## 1. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu zat dari suatu padatan atau cairan dengan bantuan pelarut. Proses ekstraksi ini digunakan khusus untuk mengekstraksi minyak atsiri pada bunga. Bila dipisahkan dengan metode lain, maka minyak atsiri yang terkandung akan hilang pada proses pemisahan. Minyak atsiri kulit buah jeruk dapat diekstraksi dengan metode tradisional, namun membutuhkan waktu ekstraksi yang lama, biaya energi yang tinggi, dan reagen kimia tambahan (Singh *et al.*, 2021).

## 2. Penyulingan

Penyulingan adalah metode pemisahan komponen senyawa berdasarkan titik uap suatu bahan. Metode penyulingan dalam pengolahan minyak atsiri ada tiga yaitu:

### a. Penyulingan dengan air (*hydrodistillation*)

Metode ini dilakukan dengan merendam bagian tanaman yang mengandung minyak atsiri di dalam air mendidih.

### b. Penyulingan dengan Uap dan Air (*Hydro steam distillation*)

Metode ini diawali dengan meletakkan bahan baku tanaman di atas saringan dalam ketel yang sudah diisi dengan air sampai batas saringan, kemudian ketel dipanaskan dan menghasilkan uap air. Uap tersebut akan mengeluarkan minyak atsiri dari tanaman dan dialirkan melalui pipa ke kondensor sehingga terjadi pengembunan dan uap air yang bercampur dengan minyak atsiri akan mencair kembali. Minyak atsiri yang dihasilkan dalam metode ini relatif baik dan bagus untuk skala ekspor.

### c. Penyulingan dengan uap (*Steam distillation*)

Metode penyulingan ini sama dengan metode sebelumnya, namun tidak menggunakan air dalam prosesnya. Uap yang digunakan menggunakan uap dari suatu pembangkit uap yang



diletakkan dalam ketel penyulingan terpisah, sehingga memerlukan biaya yang cukup besar

(Aryani *et al.*, 2020).

Destilat minyak atsiri yang dihasilkan selanjutnya dimasukkan ke dalam corong pisah untuk memisahkan minyak atsiri murni dan air dalam destilat pada proses penyulingan. Minyak atsiri kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik dan dihitung rendemennya menggunakan rumus :

$$Rendemen = \frac{\text{berat minyak atsiri yang dihasilkan}}{\text{berat bahan baku sebelum dilakukan penyulingan}} \times 100\%$$

(Cahyati *et al.*, 2016).

### 2.1.2 Evaluasi Minyak Atsiri

Keaslian minyak atsiri akan menentukan mutu, efikasi dan kegunaannya. Adapun evaluasi minyak atsiri sebagai berikut:

1. Organoleptis (Bentuk, Bau, dan Warna)

Pengujian organoleptis dari minyak atsiri dapat dinilai secara visual. Minyak dengan kualitas yang bagus memiliki tingkat kecerahan warna yang cukup tinggi.

2. Kelarutan dalam Alkohol

Minyak atsiri dapat larut dalam alkohol pada konsentrasi dan perbandingan tertentu. Uji kelarutan alkohol adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui derajat keaslian minyak atsiri.

3. Analisis senyawa menggunakan GC-MS

Kromatografi Gas - Spektrometri Massa (GC-MS) adalah metode kombinasi untuk menganalisa sampel senyawa minyak atsiri secara kualitatif maupun kuantitatif

(Aryani *et al.*, 2020; Cahyati *et al.*, 2016).

## 2.2 Jeruk Kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge)

### 2.2.1 Morfologi

Jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) yang juga dikenal sebagai calamondin, limau kastuari, limau, merupakan tanaman jeruk asli Asia Tenggara. Jeruk kalamansi di Indonesia banyak terdapat di pulau Sumatera yaitu pada Bengkulu, Palembang, dan Lampung, namun ada juga yang tumbuh di Pulau Kalimantan, Kabupaten Kubu Raya (Chandra *et al.*, 2022; Palogan *et al.*, 2023). Tanaman ini memiliki tinggi 3-5 m dengan banyak tulang batang yang panjang, bercabang, dan beranting. Daunnya memiliki bentuk lonjong berwarna hijau dengan diameter antara 2,5-3,8 cm. Bunga dari tanaman jeruk kalamansi berwarna putih (Othman *et al.*, 2016). Buah Jeruk kalamansi berwarna oranye dengan kulit berwarna hijau atau oranye yang tipis. Buahnya berbentuk bulat kecil dengan diameter rata-rata hingga 4,5 cm, memiliki tekstur halus, dan rasa yang asam (Cheong *et al.*, 2012).



**Gambar 2.** Tanaman Buah Jeruk Kalamansi.

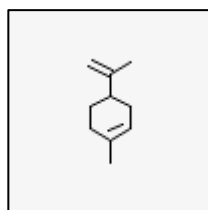
### 2.2.2 Klasifikasi Ilmiah

Jeruk kalamansi diklasifikasikan sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Sapindales
Suku	: Rutaceae
Marga	: <i>Citrus</i>
Jenis	: <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge (Cronquist, 1981).

### 2.2.3 Kandungan

Jeruk kalamansi merupakan sumber gula, minyak atsiri, polifenol, enzim, vitamin, dan mineral yang baik. Jeruk kalamansi dipanen saat masih mentah karena minyak atsiri dengan kandungan senyawa *limonene* paling tinggi kadarnya ketika buah belum matang. Karakterisasi minyak atsiri jeruk kalamansi yang diperoleh setelah destilasi uap sebesar 0,7% b/b dan hasil analisis kualitatif menggunakan GC-MS didapatkan senyawa *limonene* 92,67. Profil sitotoksitas minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi tergolong baik dan memiliki toksisitas selektif yang tinggi (Palma *et al.*, 2019). Senyawa terpenoid seperti *limonene* yang bersifat hidrofobik, memiliki mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri dengan berikatan pada protein transmembran luar dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan sel mengembang hingga rusak (Amiliah *et al.*, 2021).



**Gambar 3.** Struktur *Limonene* (Palma *et al.*, 2019).

Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol kulit buah jeruk kalamansi mengandung senyawa flavonoid dan diuji ulang menggunakan metode kromatografi lapis tipis dan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 254 UV didapatkan hasil nilai *Rf* (*Retention factor*) sebesar 0,84 (Noviyanty *et al.*, 2019). Hasil penelitian lain, sari jeruk kalamansi positif mengandung flavonoid dengan kadar 10,958 mg/mL dengan baku pembanding kuarsetin (Ramadhani *et al.*, 2019). Senyawa flavonoid berpotensi sebagai antibakteri dengan merusak dinding sel bakteri (Amiliah *et al.*, 2021).

Pada penelitian lain, minyak atsiri jeruk kalamansi yang diproduksi oleh sel-sel di dalam kulit buah jeruk sebanyak 0,75% b/b. Terpeneol,

senyawa yang berfungsi untuk rasa dan kualitas jeruk. Sedangkan, untuk aroma bunga dihasilkan dari senyawa *linalool* (Chen *et al.*, 2017). Kandungan senyawa dalam tanaman kalamansi berbeda-beda, tergantung dari varietas tanaman berasal, lokasi pengambilan sampel, dan perbedaan metode ekstraksi minyak atsiri (Xin *et al.*, 2022).

**Tabel 1.** Senyawa Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi (Chen *et al.*, 2017).

No	Nama senyawa	Jumlah (%)
1.	<i>Limonene</i>	87.52
2.	$\beta$ -myrcene	4.75
3.	$\alpha$ -pinene	1.41
4.	$\alpha$ -terpineol	1.51
5.	Aldehid	1.07
6.	$\alpha$ -terpinolene	0.68
7.	geranyl acetate	0.40

#### 2.2.4 Manfaat

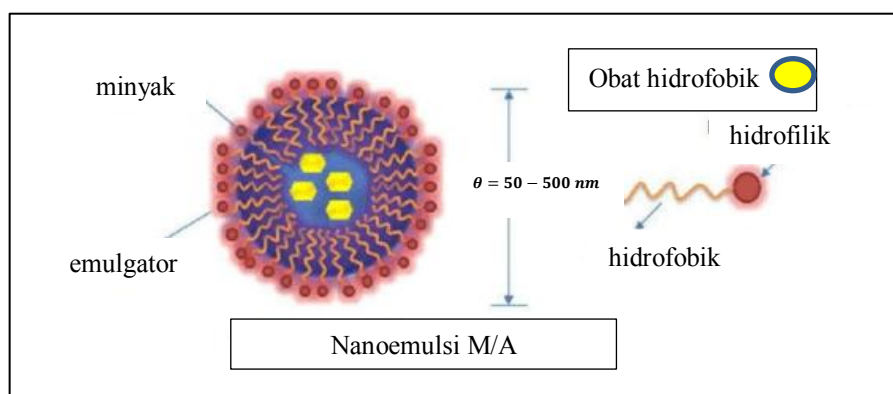
Jeruk kalamansi sangat populer di industri rasa dan kuliner. Jeruk kalamansi dapat tumbuh subur di halaman rumah yang bisa dimanfaatkan sebagai obat batuk dan *antiphlogistic* (Palma *et al.*, 2019). Flavonoid dari spesies jeruk memiliki banyak sifat biologis, terutama antioksidan dan antiinflamasi. Antioksidan dalam jeruk kalamansi bermanfaat untuk pencegahan penyakit kronis (Chen *et al.*, 2017). Senyawa *carvacrol* dan *timol* dari jeruk kalamansi memberikan efek sinergis antimikroba pada strain membran bakteri gram negatif dan gram positif, seperti *Escherichia coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* (Chung *et al.*, 2018).

Minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi dalam penelitian lain, diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* memiliki pengaruh terhadap daya hambat yang berbeda-beda. Semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri, semakin besar aktivitas antibakteri yang dihasilkan (Kindangen *et al.*, 2018).

Minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi juga dapat dimanfaatkan sebagai zat aktif obat kumur dalam konsentrasi 0,5% dengan variasi emulsifier (0,5%; 1%; 2%) memiliki bau khas, warna kuning keruh (0,5%), kuning sedikit bening(1%), kuning bening (2%), pH sesuai standar nasional (SNI), dan viskositas yang signifikan dengan obat kumur yang ada di pasaran (Nabilah *et al.*, 2020).

### 2.3 Nanoemulsi

Nanoemulsi merupakan sistem penghantaran obat hidrofobik yang dapat meningkatkan *bioavailabilitas* obat di dalam tubuh (Singh & Pulikkal, 2022).



**Gambar 4.** Nanoemulsi (Nazari-vanani *et al.*, 2018).

Pembuatan nanoemulsi terbagi menjadi dua yaitu:

#### 1) Metode Energi Tinggi

Pada metode ini, sistem nanoemulsi dapat dibuat dengan perangkat mekanik seperti *homogenizer* tekanan tinggi, *mikrofluidizer*, dan *ultrasonikator*. Energi mekanik tekanan tinggi dapat memecah partikel hingga menghasilkan tetesan ukuran nanopartikel.

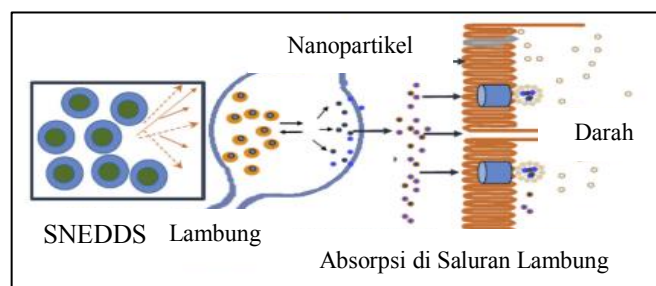
#### 2) Metode Energi Rendah

Pada metode ini, sistem nanoemulsi yang terbentuk dari senyawa kimia dengan sedikit intensitas pengadukan. Metode ini terdiri dari emulsifikasi inversi fase dan *self-emulsifying* atau emulsi spontan.

(Devireddy & Jonnalagadda, 2021; Tungadi, 2020).

## 2.4 Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS)

*Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) adalah campuran isotropik dari fase minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan yang secara spontan akan membentuk nanoemulsi dalam media air (Devireddy & Jonnalagadda, 2021; Gayathri *et al.*, 2021). Formulasi SNEDDS berpotensi dalam penghantaran obat lipofilik yang memiliki kelarutan yang rendah dalam air sehingga dapat mempercepat disolusi obat, meningkatkan absorpsi dan bioavailabilitas obat, serta masalah penyimpanan obat (Akhtar *et al.*, 2020; Suhery *et al.*, 2020). Pertimbangan lain dalam formulasi SNEDDS, yaitu fase air karena kandungan ion dan nilai pH dari fase air akan mempengaruhi ukuran tetesan dan stabilitas emulsi (Nazari-vanani *et al.*, 2018).



**Gambar 5.** Mekanisme SNEDDS di Dalam Tubuh (Akhtar *et al.*, 2020).

### 2.4.1 Komponen

Dalam formulasi SNEDDS terdiri dari tiga komponen penyusun yaitu:

a. Fase Minyak

Minyak adalah komponen yang dibutuhkan untuk melarutkan zat aktif obat yang bersifat hidrofobik sehingga memudahkan proses emulsifikasi (Nazari-vanani *et al.*, 2018). Minyak yang dapat digunakan dalam fase minyak SNEDDS yaitu *olive oil*, *coconut oil*, dan lain-lain (Gayathri *et al.*, 2021; Suhery *et al.*, 2020).

b. Surfaktan

Surfaktan digunakan untuk mempercepat proses emulsifikasi yang spontan. Surfaktan non-ionik seperti tween, span, dan gliserin, lebih disukai daripada surfaktan jenis lain karena dapat digunakan

secara oral dan toksisitas lebih rendah. Konsentrasi surfaktan yang stabil dalam formula SNEDDS adalah 30-60% (Devireddy & Jonnalagadda, 2021; Gayathri *et al.*, 2021).

c. Ko-surfaktan

Penambahan ko-surfaktan dalam formulasi SNEDDS untuk membantu surfaktan menurunkan tegangan permukaan antara minyak dan air sehingga mampu membentuk nanoemulsi yang stabil (Gayathri *et al.*, 2021). Propilen glikol, polietilen glikol (PEG), dan *transcutol* adalah contoh dari ko-surfaktan yang biasanya digunakan dalam formulasi SNEDDS (Devireddy & Jonnalagadda, 2021; Suhery *et al.*, 2020).

#### 2.4.2 Evaluasi dan Karakterisasi

Adapun evaluasi dan karakterisasi yang harus dilakukan pada formulasi sediaan SNEDDS adalah:

a. Persen Transmitan

Persen transmitan merupakan parameter sediaan nanoemulsi yang dapat diperkirakan tetesan emulsi telah mencapai ukuran nanometer (Huda & Wahyuningsih, 2018).

b. Penentuan Waktu Emulsifikasi

Waktu emulsifikasi menggambarkan kemudahan sediaan SNEDDS saat kontak dengan cairan gastrik di dalam tubuh. Semakin cepat waktu emulsifikasi maka akan meningkatkan absorpsi obat (Camelia *et al.*, 2021).

c. Ukuran Droplet Nanoemulsi

Ukuran droplet nanoemulsi akan bergerak lebih aktif sehingga mampu melawan gaya gravitasi dan tidak menyebabkan terjadinya koalesens. Zeta potensial dalam ukuran partikel juga penting untuk memprediksi stabilitas sediaan, sifat fisikokimia, dan keberadaan

elektrolit. Nilai zeta potensial yang stabil pada sistem nanoemulsi adalah  $\pm 30$  mV (Gayathri *et al.*, 2021; Nazari-vanani *et al.*, 2018).

d. *Scanning Electron Microscope* (SEM)

*Scanning electron microscope* (SEM) menunjukkan morfologi dan distribusi partikel nanoemulsi yang tidak teraglomerasi melalui mikroskop (Ermawati dkk, 2020).

e. Stabilitas Sediaan Nanoemulsi

Sediaan nanoemulsi dikatakan stabil jika tidak mengalami pengendapan selama penyimpanan sediaan pada suhu dan media tertentu (Suryani *et al.*, 2019).

## 2.5 *Escherichia coli*

### 2.5.1 Morfologi



**Gambar 6.** *Escherichia coli*, Perbesaran 1000x (Carroll *et al.*, 2016).

*Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif yang termasuk famili *Enterobacteriaceae*, tidak berkapsul, tidak berspora dan memiliki bentuk batang pendek dengan ukuran  $2-4 \mu \times 0,4-0,7\mu$  (Gupte, 2010). Struktur antigen kompleks dari bakteri ini didasarkan pada antigen O, K, dan H. Nomor spesifik yang telah ditetapkan sebagai antigen *Escherichia coli* adalah O18:K1:H17. Secara intrinsik, famili *Enterobacteriaceae* resisten terhadap antimikroba karena membran luarnya mencegah obat memasuki sel (Carroll *et al.*, 2016).



### 2.5.2 Klasifikasi

Klasifikasi *Escherichia coli* yaitu (Carroll *et al.*, 2016):

Domain	: <i>Bacteria</i>
Filum	: <i>Proteobacteria</i>
Kelas	: <i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordo	: <i>Enterobacteriales</i>
Famili	: <i>Enterobacteaceae</i>
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

### 2.5.3 Patogenesisitas

#### 1. Infeksi Saluran Kemih

*Escherichia coli* menjadi penyebab paling umum infeksi saluran kemih, terutama pada wanita muda. Gejalanya meliputi frekuensi berkemih dimulai dari *dysuria*, *hematuria*, *piuria*, dan nyeri pinggang. Adanya antigen O yang dimiliki *Escherichia coli* menyebabkan terjadinya kolonisasi bakteri dan infeksi klinis lainnya (Carroll *et al.*, 2016).

#### 2. Penyakit Diare

*Escherichia coli* bersifat patogen di usus manusia dapat mengakibatkan penyakit diare. Kelompok bakteri ini disebut *intestinal pathogenic Escherichia coli* (IPEC). Ada empat kelompok *Escherichia coli* yang bersifat patogen yaitu (Nester *et al.*, 2012; Pratiwi, 2008):

##### a. *Shiga toxin-producing Escherichia coli* (STEC)

Strain ini menghasilkan senyawa toksin shiga yang bersifat racun hingga menyebabkan penyakit serius lainnya seperti penyakit diare berdarah. Strain ini disebut juga *entereohemorrhagic Escherichia coli*.

b. *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC)

Jenis strain ini dikenal sebagai penyebab utama *traveler's diarrhea*. Strain ini menghasilkan satu atau lebih enterotoksin, yang identik dengan toksin kolera sehingga menyebabkan diare berair dan pasien mengalami dehidrasi berat.

c. *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC)

Strain bakteri ini memiliki kemiripan dengan *shigella*, keduanya memiliki aktivitas yang sama, yaitu menyerang sel-sel epitel usus kolon hingga menyebabkan diare.

d. *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC)

Jenis strain ini mengkolonisasi usus halus dengan menginduksi perubahan filamen aktin, sehingga mikrovili usus halus digantikan oleh sel bakteri dan timbul lesi A/E.

#### 2.5.4 Pengobatan dan Pencegahan

Pengobatan penyakit yang disebabkan *Escherichia coli* bervariasi sesuai dengan gejala dan strain bakteri yang menginfeksi. Siprofloksasin adalah antibiotik golongan florokuinolon yang dianjurkan untuk infeksi diare yang disebabkan *Escherichia coli*. Dosis orang dewasa adalah 750 mg sebagai dosis tunggal, sedangkan untuk anak-anak 20-30 mg/kg/hari dalam 1 atau 2 dosis terbagi atau 500 mg setiap hari selama 3 hari (Fasugba *et al.*, 2015; Kot, 2019). Pada diare berat, terapi pengobatan harus ditambahkan larutan elektrolit dan loperamide untuk mengganti cairan tubuh yang hilang dan memperlambat kinerja aktivitas usus. Pencegahannya dapat dilakukan dengan rajin mencuci tangan, *pasteurisasi* minuman, memasak makanan sampai matang, dan pada *Traveler's diarrhea* dapat dicegah dengan mengonsumsi larutan bismuth (Leung *et al.*, 2019; Nester *et al.*, 2012).

## 2.6 Antibakteri

Pengobatan infeksi yang baik dimulai dengan menegakkan diagnosis klinik dan diagnosis etiologik, kemudian dilanjutkan dengan memilih antibakteri yang paling sesuai dengan etiologi penyakit (FK UI, 2016). Antibakteri adalah senyawa kimia yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba seperti bakteri. Target mekanisme kerja antibakteri adalah menghambat dinding sel bakteri, membran sel bakteri, dan lain-lain (Elliott *et al.*, 2009).

### 2.6.1 Uji Aktivitas Antibakteri

#### a. Metode Difusi

Metode difusi dibagi menjadi lima cara, yaitu (Pratiwi, 2008):

##### 1. Metode *disk diffusion* (tes Kirby & Baur)

Metode *disk diffusion* menggunakan *disk* yang berisi agen antibakteri, kemudian diletakkan pada media agar yang sudah ditanami bakteri sehingga agen antibakteri berdifusi pada media agar tersebut.

##### 2. *Cup-plate technique* (Sumuran)

Metode ini serupa dengan *disk diffusion*, namun *disk* diganti dengan lubang sumuran sebagai media uji pertumbuhan sampel antibakteri.

##### 3. *E-test*

Metode ini menggunakan strip plastik yang mengandung antimikroba dari kadar terendah hingga tertinggi, diletakkan pada permukaan media yang telah ditanami bakteri.

##### 4. *Ditch plate technique*

Metode *ditch plate* dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri bagian tengah dan bakteri uji digoreskan ke arah agen antibakteri.

### 5. *Gradient-plate technique*

Pada metode ini, media dicairkan dan dilarutkan dengan larutan uji. Campuran kemudian dituang ke dalam cawan petri dan diletakkan dalam posisi miring.

#### a. Metode Dilusi

Metode dilusi dibedakan menjadi dua, yaitu (Pratiwi, 2008):

##### 1. Metode dilusi padat (*solid dilution test*)

Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat. Keuntungan metode ini yaitu satu konsentrasi agen antibakteri yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa bakteri uji.

##### 2. Metode dilusi cair (*Broth Dilution Test*)

Metode dilusi cair digunakan dengan membuat seri pengenceran larutan agen antibakteri pada medium cair yang ditambahkan dengan bakteri uji.

## 2.7 Bahan Tambahan

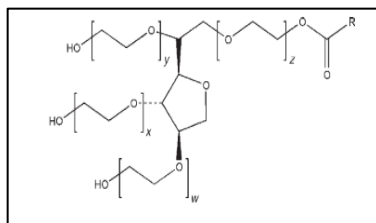
### 2.7.1 *Virgin Coconut Oil (VCO)*

*Virgin coconut oil* (VCO) terdiri dari 99% trigliserida dan kaya akan asam lemak. Asam lemak tersebut diantaranya asam laurat (46-48% dalam VCO), asam miristat (17% dalam VCO), dan asam lemak tak jenuh seperti asam kaprat, asam kaprilat, asam miristat, asam palmitat dan asam stearat (Rowe *et al.*, 2009). Penambahan VCO sebagai fase minyak akan memudahkan zat aktif yang tidak larut dalam air untuk proses emulsifikasi pembuatan nanoemulsi (Camelia *et al.*, 2021).

### 2.7.2 *Polysorbate 80 (Tween 80)*

*Polysorbate 80* merupakan surfaktan nonionik dengan nilai HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) sebesar 15. Warna dan bentuk dari

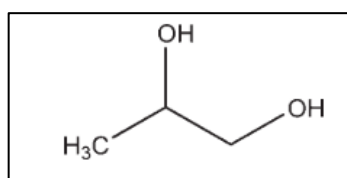
tween 80 pada suhu 25°C yaitu cairan kuning berminyak dengan aroma yang khas. Tween 80 dapat digunakan sebagai pelarut untuk vitamin dan minyak esensial yang larut dalam minyak serta berperan sebagai agen pembasah dalam formulasi suspensi oral (Rowe *et al.*, 2009).



**Gambar 7.** Struktur *Polysorbate 80* (Rowe *et al.*, 2009).

### 2.7.3 Propilen Glikol

Propilen glikol merupakan zat tambahan yang digunakan sebagai pembawa pengemulsi oral. Konsentrasi propilen glikol yang digunakan sebagai pelarut atau ko-solven dalam larutan oral sebesar 10-30%. WHO telah menetapkan asupan harian propilen glikol yang dapat diterima hingga 25 mg/kgBB (Rowe *et al.*, 2009). Berikut struktur propilen glikol pada gambar 8.

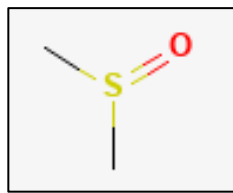


**Gambar 8.** Struktur Propilen Glikol (Rowe *et al.*, 2009).

### 2.7.4 *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO)

*Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) adalah sebuah zat tambahan yang bersifat aprotik atau tidak memiliki sifat asam dan basa, sehingga dapat ditambahkan sebagai pelarut untuk meningkatkan penetrasi obat. DMSO dapat digunakan sebagai pelarut dengan konsentrasi  $\leq 100\%$  (Rowe *et al.*, 2009). Penelitian sebelumnya, DMSO digunakan sebagai kontrol negatif uji daya hambat bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Hasil pada

penelitian tersebut, didapatkan bahwa DMSO tidak memiliki kemampuan sebagai antibakteri (Amiliah *et al.*, 2021).



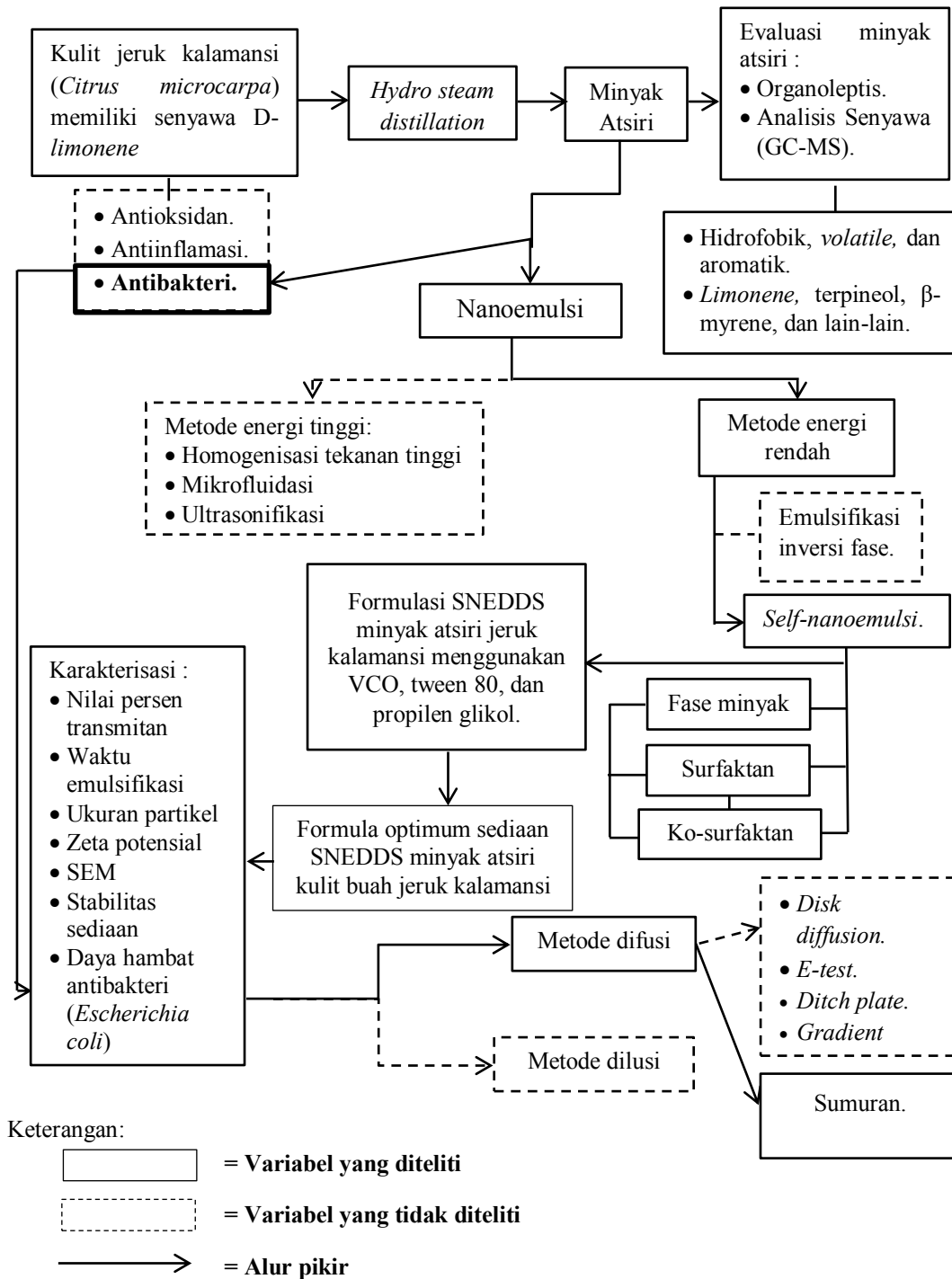
**Gambar 9.** Struktur DMSO (Rowe *et al.*, 2009).

## 2.8 Kerangka Teori

Jeruk kalamansi merupakan tanaman yang menghasilkan minyak atsiri yang bersifat hidrofobik, *volatile* (mudah menguap), dan memiliki bau khas aromatik (Palma *et al.*, 2019). Senyawa yang terkandung di dalamnya terdiri dari  $\pm$  90% senyawa *limonene* dan senyawa terpen lainnya, yang berfungsi sebagai antibakteri alami (Chen *et al.*, 2017). Nanoemulsi dapat menjadi salah satu sistem untuk memanfaatkan minyak atsiri untuk meningkatkan kelarutan di dalam air sehingga dapat meningkatkan absorpsi dan bioavailabilitas obat, serta memperbaiki masalah stabilitas penyimpanan obat. *Self-nanoemulsifying* merupakan metode pembuatan nanoemulsi dengan energi rendah yang dengan sedikit pengadukan (Singh & Pulikkal, 2022).

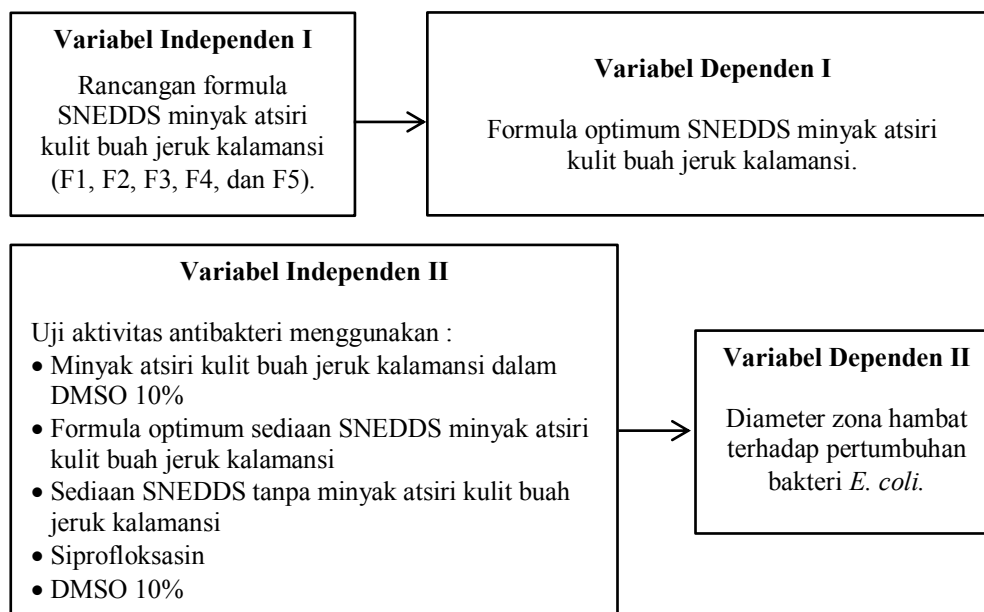
Formulasi *self-nanoemulsifying drug delivery system* (SNEDDS) yang merupakan campuran isotropik minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan yang membentuk nanoemulsi secara spontan dalam media air. Fase minyak seperti *virgin coconut oil* dapat digunakan untuk melarutkan minyak atsiri jeruk kalamansi dalam formulasi SNEDDS. Surfaktan seperti *polysorbate 80* juga ditambahkan dalam formulasi karena memiliki HLB yang tinggi dan efek toksisitasnya yang rendah. Penambahan ko-surfaktan seperti propilen glikol dalam formulasi juga penting untuk membantu surfaktan menurunkan tegangan permukaan minyak dan air sehingga membentuk nanoemulsi yang stabil. Formulasi SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi kemudian dilakukan uji evaluasi untuk menentukan formula optimum menggunakan *software Design Expert 13* (Gayathri *et al.*, 2021; Singh &

Pulikkal, 2022). Formula optimum kemudian dikarakterisasi terkait ukuran partikel, nilai zeta potensial, SEM, stabilitas sediaan, dan uji aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* menggunakan metode sumuran (Camelia *et al.*, 2021; Hidayat *et al.*, 2021).



**Gambar 10.** Kerangka Teori (Camelia *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2017; Gayathri *et al.*, 2021; Palma *et al.*, 2019; Pratiwi, 2008; Singh dan Pulikkal, 2022).

## 2.9 Kerangka Konsep



**Gambar 11.** Kerangka Konsep.

## 2.10 Hipotesis

### 2.10.1 Hipotesis Null (H0)

Formula SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi tidak dapat diformulasikan dalam bentuk sediaan SNEDDS sehingga tidak memenuhi karakteristik persyaratan sediaan SNEDDS dan tidak memiliki diameter zona hambat terhadap pertumbuhan *E. coli*.

### 2.10.2 Hipotesis Alternatif (H1)

Formula SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi dapat diformulasikan dalam bentuk sediaan SNEDDS. Formula optimum hasil formulasi SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi memenuhi karakteristik persyaratan sediaan SNEDDS dan memiliki diameter zona hambat terhadap *E. coli*.



## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental dengan metode rancangan lengkap pemanfaatan minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) sebagai antibakteri (*Escherichia coli*) menggunakan *mixture design* menjadi sediaan nanoemulsi spontan.

### **3.2 Tempat dan Waktu**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Botani Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, untuk mendeterminasi tanaman buah jeruk kalamansi. Kulit buah jeruk kalamansi selanjutnya dilakukan destilasi uap air di Laboratorium *Clinical and Dispensing* (C&D) Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung. Minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi kemudian dilakukan uji pendahuluan untuk mengetahui konsentrasi efektif daya hambat bakteri *Escherichia coli* Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung. Formulasi SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi selanjutnya dilakukan di Laboratorium Farmasetika dan Teknologi Formulasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung. Evaluasi dan karakterisasi formula SNEDDS selanjutnya dilakukan di Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung dan *Integrated Laboratory and Research Center* (ILRC) Universitas Indonesia. Formula optimum sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi dilakukan uji aktivitas antibakteri di Laboratorium Kesehatan Daerah (Labkesda) Provinsi Lampung. Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2022 hingga April 2023.

### 3.3 Bahan Uji Penelitian

#### 3.3.1 Buah Jeruk Kalamansi

Buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari Kebun Yangti *Cafe & Resto* di Bandar Jaya, Lampung Tengah, Provinsi Lampung. Buah jeruk kalamansi yang digunakan merupakan buah jeruk yang belum matang dan dipanen di pagi hari sebelum matahari terik.

#### 3.3.2 Mikroba Uji Penelitian

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli*, yang didapat dari Unit Pelayanan Terpadu Daerah Balai Laboratorium Kesehatan Daerah (Labkesda) Provinsi Lampung.

#### 3.3.3 Media *Nutrient Agar* (NA)

Media *nutrient agar* (NA) adalah media yang digunakan untuk kultur bakteri *Escherichia coli*. Media NA dibuat dengan melarutkan 0,8 gram NA dalam 40 ml *aquades* ke dalam erlenmeyer yang ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*. Media tersebut kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Amiliah *et al.*, 2021).

#### 3.3.4 Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media *mueller hinton agar* (MHA) adalah media yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri *Escherichia coli*. Media MHA dibuat dengan melarutkan 3,8 gram MHA dalam 100 ml *aquades* ke dalam Erlenmeyer yang ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*, kemudian dihomogenkan di dalam *microwave* sampai mendidih. Media tersebut kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, setelah itu dibiarkan sampai suhu ruang yang digunakan sebagai media uji pertumbuhan bakteri (Chandra *et al.*, 2022).

### 3.3.5 Media *Artificial Gastric Fluid* (AGF)

Media *artificial gastric fluid* (AGF) adalah media yang digunakan pada saat menentukan uji waktu emulsifikasi spontan formula SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi dengan sedikit pengadukan yang menggambarkan kondisi di saluran pencernaan lambung (Tungadi, 2020). Media AGF dibuat seperti pada tabel berikut:

**Tabel 2.** Komposisi Media AGF (Suryani *et al.*, 2019).

<i>Media Artificial Gastric Fluid</i>	
NaCl	1 gr
HCl 2N	21 mL
Aquades	Ad 500 mL
pH	1-2

### 3.3.6 Media *Artificial Intestinal Fluid* (AIF)

Media *artificial intestinal fluid* (AIF) adalah media yang digunakan pada saat menentukan uji waktu emulsifikasi spontan formula SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi dengan sedikit pengadukan yang menggambarkan kondisi di saluran pencernaan pada usus halus (Tungadi, 2020). Media AIF dibuat seperti pada tabel berikut:

**Tabel 3.** Komposisi Media AIF (Suryani *et al.*, 2019).

<i>Media Artificial Intestinal Fluid</i>	
0,2 N NaOH	95 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 gr
Aquades	Ad 500 mL
pH	6-7

## 3.4 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

### 1. Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian terdiri dari dua variabel yaitu rancangan formula SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi dengan lima konsentrasi berbeda dan uji aktivitas antibakteri pada formula

optimum sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi untuk mendapatkan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

## 2. Variabel Dependen

Variabel dependen dari rancangan formula SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi adalah formula optimum. Sedangkan variabel dependen dari uji aktivitas antibakteri formula optimum sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

### 3.5 Definisi Operasional Variabel

**Tabel 4.** Definisi Operasional Variabel.

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil	Skala
Minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi	Senyawa aromatik yang berpotensi sebagai antibakteri alami yang dapat dilarutkan dalam DMSO 10% (Amiliah <i>et al.</i> , 2021).	30.000 gram jeruk kalamansi dilakukan <i>hydro-steam-distillation</i> . Minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi diuji daya hambat pertumbuhan <i>E. coli</i> menggunakan metode sumuran.	Rendemen minyak atsiri sebesar 23 mL dan diameter zona hambat $\geq 11$ mm.	Numerik
Formula SNEDDS Minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi	Rancangan formula nanoemulsi minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi dengan variasi tween 80 dan propilen glikol (Camelia <i>et al.</i> , 2021).	Evaluasi berbagai formula berupa persen transmittan dan waktu emulsifikasi dalam <i>aquades</i> , media cairan <i>intestinal</i> maupun <i>gastric</i> .	Hasil evaluasi lima formula yang dibuat memiliki nilai <i>desirability</i> 1,000 yaitu pada Formula 4 (F4).	Numerik
Sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi	Formula optimum sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi yang memiliki nilai <i>desirability</i> satu atau mendekati satu (Camelia <i>et al.</i> , 2021; Hidayat <i>et al.</i> , 2021).	Karakteristik formula berupa ukuran partikel, nilai zeta potensial dan <i>scanning electron microscope</i> (SEM), serta uji aktivitas antibakteri <i>Escherichia coli</i> .	Formula berwarna jernih transparan, nilai persen transmittan 80-99%, ukuran partikel $\leq 200$ nm, waktu emulsifikasi < 2 menit, nilai potensi zeta - 27,0 mV, dan hasil morfologi ukuran globul seragam, serta memiliki daya hambat sangat kuat.	Numerik

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil	Skala
Diameter zona hambat pertumbuhan <i>E. coli</i>	Daerah bening pada media uji menandakan tidak ada pertumbuhan bakteri <i>E. coli</i> (Pratiwi, 2008).	Metode sumuran.	Diameter < 5 mm (lemah), 6-10 mm (sedang), 11-20 mm (kuat), dan > 21 mm (sangat kuat).	Ordinal

### 3.6 Alat dan Bahan

#### 3.6.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Shimadzu<sup>®</sup>), timbangan digital (Goodwife<sup>®</sup>), oven (Memmert<sup>®</sup>), aluminium foil (Klinpak<sup>®</sup>), seperangkat alat destilasi uap air (Esnse<sup>®</sup>), corong pisah (Iwaki<sup>®</sup>), instrumen GC-MS (Shimadzu<sup>®</sup>), vortex (Ika 3<sup>®</sup>), centrifuge tube (Onemed<sup>®</sup>), labu erlenmeyer (Iwaki<sup>®</sup>), hotplate magnetic stirrer (Heidolph<sup>®</sup>), gelas ukur (Iwaki<sup>®</sup>), vial (Onemed<sup>®</sup>), beaker glass (Iwaki<sup>®</sup>), labu ukur (Iwaki<sup>®</sup>), mikro pipet (Dlab<sup>®</sup>), yellow tip (Onemed<sup>®</sup>), jangka sorong (Sigmat<sup>®</sup>), spektrofotometer UV-Vis (Agilent Technologies<sup>®</sup>), particle size analyzer (Horiba-Sz 100z<sup>®</sup>), instrumen SEM (FEI<sup>®</sup>), autoklaf (Hirayama Series<sup>®</sup>), nephelometer (Phoenixspec<sup>®</sup>), biological safety cabinet (Thermo Scientific<sup>®</sup>), pHmeter (Merck<sup>®</sup>), jarum ose (MICO<sup>®</sup>), mikroskop (Olympus<sup>®</sup>), inkubator (Memmert<sup>®</sup>), pinset (Onemed<sup>®</sup>), masker (Onemed<sup>®</sup>), handscoon (Onemed<sup>®</sup>), rak dan tabung reaksi (Iwaki<sup>®</sup>), serta cawan petri (Iwaki<sup>®</sup>).

#### 3.6.2 Bahan

Adapun bahan yang digunakan adalah jeruk kalamansi, kultur *Escherichia coli*, natrium sulfat anhidrat (Merck<sup>®</sup>), kapas (Onemed<sup>®</sup>), DMSO (Merck<sup>®</sup>), NaCl 0,9% (B.Braun<sup>®</sup>), standar Mc Farland 0.5 (DensiCHEK<sup>®</sup>), etanol 95% (Onemed<sup>®</sup>), aquades (Water One<sup>®</sup>), siprofloksasin (Novapharin<sup>®</sup>), virgin coconut oil (Safiya<sup>®</sup>), propilen glikol (Brataco<sup>®</sup>), polysorbate 80 (Brataco<sup>®</sup>), media MHA (Oxoid<sup>®</sup>), media AGF (Merck<sup>®</sup>), dan media AIF (Merck<sup>®</sup>).

### 3.7 Prosedur

#### 3.7.1 Destilasi Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi

Buah jeruk kalamansi yang belum matang dicuci dengan air mengalir kemudian dipotong melintang menjadi dua bagian untuk memudahkan proses pemisahan antara kulit buah jeruk kalamansi dengan bagian buahnya (Aryani *et al.*, 2020; Cahyati *et al.*, 2016). Kulit buah jeruk kalamansi dikeringkan menggunakan *food dehydrator* pada suhu 35°C hingga kulit buah kering untuk mendapatkan hasil rendemen yang maksimal pada proses penyulingan (Kamal *et al.*, 2011).

Kulit buah jeruk sebanyak 700 gram dimasukkan ke dalam tabung rangkaian alat destilator yang sudah diisi air sebanyak 10 Liter. Penyulingan menggunakan metode *hydrosteam* dilaksanakan selama 6-8 jam. Destilat yang dihasilkan selanjutnya dilakukan pemisahan menggunakan corong pisah untuk membebaskan air yang mengikat minyak atsiri. Minyak atsiri yang telah dipisahkan dari destilat kemudian ditambahkan sedikit natrium sulfat anhidrat untuk memastikan tidak adanya air pada minyak atsiri, kemudian minyak atsiri ditimbang untuk dihitung rendemennya. Identifikasi minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi menggunakan GC-MS untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit yang dihasilkan (Sukohar *et al.*, 2022).

#### 3.7.2 Uji Pendahuluan Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi Terhadap Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*

Minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) dilakukan uji pendahuluan terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* untuk menentukan konsentrasi dalam pembuatan sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi. Konsentrasi yang digunakan adalah konsentrasi 2%, 4%, dan 8% minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi dalam DMSO 10%. Kontrol positif yang

digunakan dalam adalah siprofloksasin 2%, sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 10% (Husni *et al.*, 2021).

### 3.7.3 Pembuatan SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi

Formula SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi dirancang menggunakan *mixture design* pada *software Design Expert* 13. Formula yang dihasilkan dari *software* tersebut sebanyak lima formula dengan melihat hasil uji persen transmittan dan waktu emulsifikasi dalam *aquades*, media cairan *intestinal*, maupun *gastric* (Gayathri *et al.*, 2021; Hidayat *et al.*, 2021). Berikut rancangan formulanya:

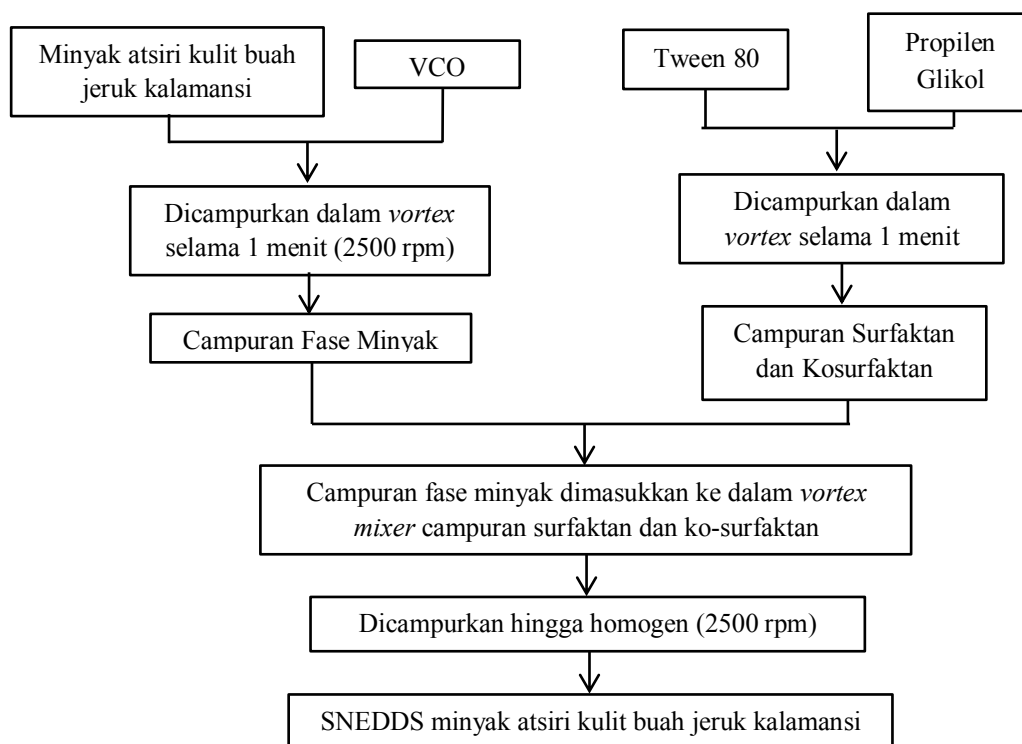
**Tabel 5.** Formulasi SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi.

Formula	Minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (mL)	VCO (mL)	Tween 80 (mL)	Propilen glikol (mL)	Total (ml)
1	0.4	0.6	3.5	0.5	5
2	0.4	0.6	3.25	0.75	5
3	0.4	0.6	3	1	5
4	0.4	0.6	2.75	1.25	5
5	0.4	0.6	2.5	1.5	5

$$\text{Tween 80} = \frac{2.5 \sim 3.5}{5} \times 100\% = 50 \sim 70\%$$

$$\text{Propilen glikol 80} = \frac{0.5 \sim 1.5}{5} \times 100\% = 10 \sim 30\%$$

Pembuatan sediaan SNEDDS dibuat dengan cara mencampurkan minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi 0,4 ml dalam 0,6 ml VCO sebagai fase minyak dalam *vortex*, setelah itu membuat campuran surfaktan menggunakan tween 80 dengan konsentrasi 50-70% dan propilen glikol dengan konsentrasi 10-30% sebagai kosurfaktan dengan cara yang sama seperti fase minyak. Campuran surfaktan dan kosurfaktan, dipindahkan ke dalam *tube* campuran fase minyak, seperti yang tertera pada gambar 12 (Camelia *et al.*, 2021).



**Gambar 12.** Skema Formulasi SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi (Camelia *et al.*, 2021).

### 3.7.4 Penentuan Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi

Penentuan formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi ditentukan melalui pengujian persen transmittan dan waktu emulsifikasi formula SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi dalam *aquades*, media AGF, dan media AIF yang dianalisis oleh *software Design Expert* (Camelia *et al.*, 2021; Gayathri *et al.*, 2021).

#### 1. Uji Persen Transmittan

Formula SNEDDS dievaluasi diambil 500  $\mu\text{L}$  dari masing-masing formula pada tabel 5, kemudian dimasukkan dalam *centrifuge tube* 50 mL dengan penambahan akuades sampai tanda batas, lalu dihomogenkan menggunakan *vortex*. Emulsi yang terbentuk diamati menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 650 nm untuk melihat persen transmittan dari masing-masing formula (Camelia *et al.*, 2021).



## 2. Uji Waktu Emulsifikasi

Pengujian dilakukan dengan memasukkan 50 $\mu$ L sampel dari masing-masing formula ke dalam 25 mL aquadest, media AGF, maupun media AIF di atas *hotplate magnetic stirrer* pada suhu  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  dengan kecepatan 100 rpm (Camelia *et al.*, 2021; Huda & Wahyuningsih, 2018).

### 3.7.5 Karakterisasi Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi

Formula optimum sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi dilakukan karakterisasi sediaan untuk membandingkan hasil evaluasi rancangan formula awal dan karakterisasi dari formula yang dianalisis oleh *software Design Expert* meliputi uji persen transmittan, waktu emulsifikasi, nilai zeta potensial, ukuran partikel, SEM, dan stabilitas sediaan dalam media cairan *intestinal* maupun *gastric*, serta daya hambat formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi pada bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode difusi sumuran (Kindangen *et al.*, 2018).

#### 1. Uji Persen Transmittan

Persen transmittan formula optimum diamati menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan langkah yang sama seperti penentuan formula optimum, blanko yang digunakan adalah aquades (Huda & Wahyuningsih, 2018).

#### 2. Uji Waktu Emulsifikasi

Waktu emulsifikasi sediaan SNEDDS ditentukan kembali secara visual untuk membandingkan hasil saat pengujian formula awal dengan formula optimum dalam aquadest, media AIF, maupun media AGF di atas *hotplate magnetic stirrer* pada suhu  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  dengan kecepatan 100 rpm (Camelia *et al.*, 2021; Huda & Wahyuningsih, 2018).

### 3. Ukuran Partikel

Formula optimum dikarakterisasi ukuran partikel, menggunakan *particle size analyzer* (PSA) dengan melarutkan sampel 1 : 100 dalam aquadest, lalu dimasukkan ke dalam kuvet. Kuvet dimasukkan ke dalam holder instrumen, kemudian dianalisis di dalam instrumen PSA menghasilkan ukuran partikel, indeks polidispersitas, dan zeta potensial (Gayathri *et al.*, 2021; Nazari-vanani *et al.*, 2018).

### 4. *Scanning Electron Microscope (SEM)*

Formula optimum SNEDDS dilapisi dengan emas (Au) untuk mengkonduktifkan sampel, kemudian diletakkan di dalam vakum selama 20 menit untuk memadatkan sampel sebelum dimasukkan ke dalam instrumen SEM. Hasil morfologi dan topografi dari formula optimum dapat terlihat dan diamati pada layar komputer pada perbesaran tertentu (Mukubwa *et al.*, 2020).

### 5. Uji Stabilitas Sediaan

Uji stabilitas sediaan dilakukan dengan 100  $\mu$ L SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi ditambahkan dalam media yang berisi aquades, AGF, dan AIF, masing-masing sebanyak 10 mL. Campuran tersebut dihomogenkan dengan *vortex* selama 30 detik. Setelah homogen, media dipanaskan dan dipertahankan suhunya  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  selama 4 jam. Sebagai baku pembandingan, dilakukan juga pengamatan sediaan nanoemulsi yang di simpan pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$  (Suryani *et al.*, 2019).

### 6. Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan sebagai berikut:

#### a. Sterilisasi Alat

Alat dan media penelitian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit, sedangkan untuk ose dan pinset disterilkan di atas pijaran api langsung (Kindangen *et al.*, 2018).

b. Peremajaan Bakteri *Escherichia coli*

Peremajaan dimulai dengan memasukkan bakteri menggunakan ose yang sudah disterilkan ke dalam media *nutrient agar* miring dengan menggoreskan bagian permukaan media. Media yang sudah ditanami bakteri ditutup dengan kapas dan dilapisi *plactic wrap* untuk diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator pada suhu 37°C (Kindangen *et al.*, 2018).

b. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri yang sudah diinkubasi, diambil dengan kawat ose untuk disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 mL larutan NaCl 0,9%, kemudian diaduk hingga homogen. Suspensi bakteri yang dibuat harus memiliki kekeruhan yang sama dengan larutan standar 0,5 *Mc Farland*, kekeruhan dilihat menggunakan *nephelometer*. Jika kurang keruh, suspensi ditambahkan koloni, sedangkan jika lebih keruh maka suspensi dapat ditambahkan NaCl 0,9% (Kindangen *et al.*, 2018).

c. Penentuan Aktivitas Antibakteri

Penentuan aktivitas antibakteri dimulai dengan mencampurkan suspensi bakteri 1 ml ke dalam 75 ml media MHA yang cair, kemudian diaduk hingga homogen. Media MHA tersebut kemudian dituangkan ke dalam 3 cawan petri, apabila media sudah padat dilanjutkan membuat 5 sumuran dengan diameter  $\pm$  6 mm pada masing-masing cawan petri menggunakan ujung *yellow tip*. Objek pengamatan menggunakan formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi, siprofloksasin 2%, formula SNEDDS tanpa minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi, minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi 8% dalam DMSO 10%, dan DMSO 10%, masing-masing sebanyak 50  $\mu$ L dipipet dan dituangkan ke setiap sumuran. Cawan petri diinkubasi selama 24 jam, kemudian diukur

diameter zona hambat nya. Daerah bening hasil inkubasi menunjukkan zona hambat antibakteri dari bahan uji dalam satuan millimeter (mm). Diameter diukur menggunakan jangka sorong dengan cara mengukur panjang keseluruhan dikurangi diameter sumuran ( $\pm 6\text{mm}$ ), kemudian diameter dikategorikan berdasarkan penggolongan kekuatan daya antibakterinya. Kriteria daya hambat antibakteri digambarkan dalam tabel 6 (Camelia *et al.*, 2021; Kindangen *et al.*, 2018; Pratiwi, 2008).

**Tabel 6.** Hubungan Diameter dan Kategori Zona Hambat (Pratiwi, 2008).

Diameter (mm)	Kategori Zona Hambat
< 5	Lemah
5-10	Sedang
11-20	Kuat
> 20	Sangat kuat

#### d. Destruksi Alat dan Media Setelah Pengujian

Alat dan media setelah digunakan dalam penelitian uji aktivitas antibakteri dilakukan destruksi menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Alat yang dapat digunakan kembali dapat dicuci setelah dilakukan destruksi, sedangkan alat dan media yang tidak bisa digunakan kembali dapat dibuang di limbah medis.

### 3.8 Analisis Data

Analisis pada penelitian ini dilakukan secara statistik dengan mencari konsentrasi maksimal untuk uji pendahuluan minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi konsentrasi 2%, 4%, dan 8%, terhadap daya hambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan uji *Saphiro-wilk* untuk menguji normalitas data dan uji *Levene test* untuk homogenitas data. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan uji *One Way Anova*. Namun, apabila data terdistribusi tidak normal dan tidak homogen, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis*. Hipotesis dianggap bermakna bila hasil *p-values*  $< 0,05$  dan dianggap tidak bermakna

apabila  $p\text{-values} > 0,05$ . Analisis data ini dilakukan menggunakan aplikasi SPSS versi 25 (Chandra *et al.*, 2022).

Minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi konsentrasi paling maksimal daya hambat antibakteri kemudian diformulasikan dalam bentuk SNEDDS untuk melihat perbedaan nilai persen transmitan dan waktu emulsifikasi. Perbedaan dianggap signifikan pada  $p\text{-values} < 0,05$  menggunakan *software Design-Expert 13* (Hidayat *et al.*, 2021). Formula optimum dilakukan karakterisasi dan uji aktivitas antibakteri kembali pada bakteri *Escherichia coli* menggunakan analisis statistik yang sama dengan uji pendahuluan sehingga dapat mengetahui efektivitas formula SNEDDS minyak kulit jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge).

### **3.9 Etika Penelitian**

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik penelitian (*ethical clearance*) dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dalam surat keputusan yang bernomor: 396/UN26.18/PP.05.02.00/2023 (Lampiran 1).

## BAB V KESIMPULAN DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) dapat diformulasikan dalam SNEDDS dengan menggunakan VCO sebagai fase minyak dan variasi tween 80 sebagai surfaktan dan propilen glikol sebagai kosurfaktan, serta dilanjutkan analisis statistika secara numerikal menggunakan *Design-Expert Software* menghasilkan nilai *desirability* formula optimum sebesar satu (1,000).
2. Karakteristik formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) memiliki nilai persen transmittan sebesar 88,17% dengan blanko sebesar 89,13%, waktu emulsifikasi dalam media *aquades*, AGF, dan AIF masing-masing sebesar 46,70 detik, 46,98 detik, dan 59,19 detik. Adapun ukuran partikel, indeks polidispersitas, dan nilai zeta potensial yang dihasilkan masing-masing memiliki rata-rata sebesar 69,17 nm, 0,489 (<1) dengan sistem monodispersi, dan -27,0 mV. Hasil karakteristik morfologi menggunakan *scanning electron microscope* (SEM) menunjukkan ukuran nanopartikel pada perbesaran 30.000× dengan bentuk droplet bulat khas minyak, permukaan yang halus, dan tidak terjadi flokulasi maupun agregasi yang tampak, dan stabil secara fisik saat pengujian stabilitas sediaan sehingga memenuhi persyaratan sediaan nanoemulsi yang baik.
3. Formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) memiliki pengaruh lebih baik terhadap daya hambat pertumbuhan *Escherichia coli* dibandingkan hanya dengan pemberian minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge), serta efektif sebagai sistem penghantaran obat yang bersifat hidrofobik dan mudah terdegradasi.

## 5.2 Saran

1. Disarankan dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai variasi fase minyak, surfaktan, dan kosurfaktan lain pada formula SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) untuk mendapatkan formula optimal secara grafikal.
2. Disarankan untuk penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas karakterisasi formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) terhadap aktivitas antibakteri menggunakan strain bakteri patogen lainnya, antioksidan, antikanker, dan lain-lain.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adjeng ANT, Murrukmihadi M, Hertiani T, & Nugroho AK. 2023. Optimization of sorbitol, glycerine, and xanthan gum combination in mucolytic syrup of *Hibiscus rosa-sinensis* leaves extract using mixture design (D-optimal). *Rasayan J. Chem.*, 16(1), 509–518.
- Akhtar N, Mohammed SAA, Khan RA, Yusuf M, Singh V, Mohammed HA, *et.al.* 2020. Self-Generating nano-emulsification techniques for alternatively-routed, bioavailability enhanced delivery, especially for anti-cancers, anti-diabetics, and miscellaneous drugs of natural, and synthetic origins. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 58, 1–41, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101808>
- Amiliah, Nurhamidah, & Handayani D. 2021. Aktivitas antibakteri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrofortunella Microcarpa*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Pendidikan Dan Ilmu Kimia*, 5(1), 92–105.
- Anand U, Carpena M, Kowalska-Góralaska M, Garcia-Perez P, Sunita K, Bontempi E, Dey A, *et.al.* 2022. Safer plant-based nanoparticles for combating antibiotic resistance in bacteria: A comprehensive review on its potential applications, recent advances, and future perspective. *Science of the Total Environment*, 821, 1–21.
- Annisa R, Indrawijaya YA, Megawati DS, & Zakia AF. 2019. Formulation and characterization on self nanoemulsifying drug delivery system of *Eleutherine palmifolia* extract employing short, medium, and long chain triglyceride. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*, 5(2), 80–85.
- Aryani F, Noorcahyati, & Arbainsyah. 2020. Pengenalan atsiri (*Melaleuca cajuputi*). Samarinda: Jurusan Teknologi Pertanian Politeknik Pertanian Negeri.
- Cahyati S, Kurniasih Y, & Khery Y. 2016. Efisiensi isolasi minyak atsiri dari kulit jeruk dengan metode destilasi uap-air ditinjau dari perbandingan bahan baku dan pelarut yang digunakan. *Hydrogen: Jurnal Kependidikan Kimia*, 4(2).
- Camelia FD, Nurahmanto D, & Wisudiyarningsih B. 2021. Optimasi tween dan propilen glikol dalam self-nanoemulsifying drug delivery system VCO-minyak daun kemangi. *Jurnal Pustaka Kesehatan*, 9(3), 158–165.



- Carroll KC, Butel JS, Morse SA, dan Mietzner T. 2016. Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology. 27<sup>th</sup> edition. New York: Mc Graw Hill Education.
- Chandra VE, Syarifah RNYRSA, Mardhia M, dan Mahyarudin, M. 2022. Uji aktivitas antibakteri air perasan jeruk sambal (*Citrus microcarpa* Bunge) terhadap pertumbuhan *Escherhia coli*. *Majalah Kedokteran Andalas*, 45(2), 134–144.
- Chen M, Yang K, Huang T, dan Wu M. 2017. traditional small-size citrus from Taiwan: essential oils , bioactive compounds and antioxidant Capacity. *Medicines*, 4(1), 1–11.
- Cheong MW, Chong ZS, Liu SQ, Zhou W, Curran P, dan Yu B. 2012. Characterisation of calamansi (*Citrus microcarpa*). Part I: volatiles, aromatic profiles and phenolic acids in the peel. *Food Chemistry*, 134(2), 686–695.
- Chung D, Cho TJ, dan Rhee MS. 2018. Citrus fruit extracts with carvacrol and thymol eliminated 7-log acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes*: A potential of effective natural antibacterial agents. *Food Research International*, 107, 578–588.
- Cronquist A. 1981. *An Integrated System of Clasification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press.
- Devireddy SK, dan Jonnalagadda LP. 2021. A literature review on self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS). *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 70(1), 85–94.
- Elliott T, Worthington T, Osman H, dan Martin G. 2009. *Mikrobiologi Kedokteran & Infeksi* (diterjemahkan). Edisi ke-4. Jakarta: Kedokteran EGC.
- Endarini LH. 2016. *Farmakognisi dan Fitokimia*. Jakarta: Kemenkes RI.
- Ermawati ED, Yugatama A, & Wulandari W. 2020. Uji sifat fisik, sun Protecting Factor, dan In Vivo ZnO Terdispersi dalam Sediaan Nanoemulgel. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 5(1), 49.
- Ermawati ED, Wulandari W, dan Yugatama A. 2020. Optimization of Olive Oil, Tween 80, and Propylene Glycol of Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Zinc Oxide by D-Optimal Method. *Jurnal Farmasi Sains Dan Komunitas*, 17(2), 92–101.
- Fasugba O, Gardner A, Mitchell BG, dan Mnatzaganian G. 2015. Ciprofloxacin resistance in community- and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 1–16. [online journal]. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1282-4>

- FK UI. 2016. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke-6. Jakarta: FK UI.
- Gayathri T, Ramana MV, Rao NR, dan Pradesh A. 2021. Self-nanoemulsifying drug delivery system - An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 67(1), 135–141.
- GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. 2018. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis*. 18, 1211–1228.
- Gupte S. 2010. *The short textbook of medical microbiology: including parasitology*. 10<sup>th</sup> Edition. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers.
- Haque AF, Dewi B, dan Amanda D. 2018. Uji Efektivitas antibakteri handsanitizer minyak atsiri kalamansi (*Citrofortunella microcarpa*) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus Aureus* Secara *In Vitro*. *Jurnal Penelitian Dan Kajian Ilmiah Kesehatan*. 7(1), 27–31.
- Haque AF, Dewi B, & Hartati L. 2022. Formulasi dan evaluasi fisik sediaan gel *hand sanitizer* minyak atsiri jeruk kalamansi (*Citrus macrocarpa Bunge*). *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 3(1), 12–16.
- Hidayat IR, Zuhrotun A, & Sopyan I. 2021. *Design-expert software* sebagai alat optimasi formulasi sediaan farmasi. *Majalah Farmasetika*, 6(1), 99–120.
- Huda N & Wahyuningsih I. 2018. Karakterisasi self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) minyak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.). *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 3(2), 49.
- Husni E, Yeni F, & Dachriyanus. 2021. Chemical contents profile of essential oil from calamansi (*Citrus microcarpa* Bunge) peels and leaves and its antibacterial activities. *2nd International Conference on Contemporary Science and Clinical Pharmacy*, 40, 314–322.
- Izham MNM, Hussin Y, Aziz MNM, Yeap SK, Rahman HS, Masarudin MJ, *et. al.* 2019. Preparation and characterization of self nano-emulsifying drug delivery system loaded with citraland its antiproliferative effect on colorectal cells *In Vitro*. *Nanomaterials*, 9(1), 1–18.
- Kamal, G. M., Hussain, A. I., & Ashraf, M. Y. 2011. Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *International Food Research Journal*, 18(4), 1275–1282.
- Kanwal T, Saifullah S, Rehman J, Razzak A, Maharjan R, Imran M, *et.al.* 2020. Design of absorption enhancer containing self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for curcumin improved anti- cancer activity and oral bioavailability. *Journal of Molecular Liquids*, 1–40.

- Khan AW, Kotta S, Ansari SH, Kumar R, & Ali J. 2015. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of the poorly water-soluble grapefruit flavonoid Naringenin: design, characterization, in vitro and in vivo evaluation, *Drug Delivery*, 22(4), 552–561. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.878003>.
- Kindangen GD, Lolo AW, & Yamlean PVY. 2018. Uji aktivitas antibakteri minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa* Bunge.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Pharmacon*, 7(4), 62–68.
- Kot B. 2019. Antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli*, *Polish Journal of Microbiology*, 68(4), 403–415. <https://doi.org/10.33073/PJM-2019-048>.
- Leung AKC, Leung AAM, Wong AHC, dan Hon KL. 2019. Travelers' Diarrhea : A Clinical Review. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*. 13(1), 38–48.
- Mahdi L, Sudibyo RS, & Martien R. 2020. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of *Curcuma mangga* Val. essential oil and the stability study. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 31(4), 238–243. <https://doi.org/10.22146/ijp.584>.
- Mukubwa GK, Nkanga CI, Buya AB, Krause RWM, & Patrick B. 2020. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of *Garcinia kola* seeds ethanolic extract : formulation and in vivo antimalarial activity. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 8(3), 177–190.
- Nabilah, Pardilawati CY, dan Savitri I. 2020. Formulasi obat kumur minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa* Bunge). *Jurnal STIK Siti Khadijah Palembang*, 10(2), 116–125.
- Nazari-vanani R, Sattarahmady N, Azarpira N, dan Heli H. 2018. Introducing Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System to Increase the Bioavailability of Oral Medications. *Jorjani Biomedicine Journal*, 6(3), 1–13.
- Nester, Anderson, dan Roberts. 2012. *Microbiology: A Human Prospective*. Edisi ke-7. New York: McGraw-Hill.
- Noviyanty Y, Hepiyansori, dan Marlina R. 2019. Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Etanol Kulit Buah Jeruk Kalamansi (*Citrus microcarpa* Bunge). *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 6(2), 312–321.
- Nugroho BH, & Sari NP. 2018. Formulation of self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) karamunting leaf extract (*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk). *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 14(1), 1–8.

- Othman SN, Hassan M, Nahar L, Basar N, Jamil S, dan Sarker S. 2016. Essential Oils from the Malaysian Citrus (Rutaceae) Medicinal Plants. *Medicines*. 3(2): 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3390/medicines3020013>.
- Palma CE, Cruz PS, Cruz DTC, Bugayong AMS, dan Castillo AL. 2019. Chemical composition and cytotoxicity of Philippine calamansi essential oil. *Industrial Crops and Products*. 128: 108–114.
- Palogan ANA, Sitingjak MNB, Adjeng ANT, Pardilawati CY, & Oktarlina RZ. 2023. Potensi minyak atsiri jeruk kalamansi (*Citrus microcarpa* Bunge) Sebagai Antibakteri Alami: Tinjauan Pustaka. *Agromedicine*, 10(1), 154–158.
- Pawera IL. 2021. *Food, agrobiodiversity and diet: the nutritional ethnobiology of the Minangkabau and Mandailing indigenous food systems in West Sumatra*. Prague: Czezh University of Life Sciences Prague.
- Pratiwi ST. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: PT Gelora Aksara Pratama.
- Priani SE, & Darusman F. 2017. Formulation self nano emulsifying drug delivery system glimepiride using oleic acid as oil phase, *Pharmaciana*, 7(2), 267–276. <https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v7i2.7387>
- Priani SE, Somantri SY, & Aryani R. 2020. Formulasi dan karakterisasi SNEDDS (Self nanoemulsifying drug delivery system) mengandung minyak jantan hitam dan minyak zaitun. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 7(1), 31–38. <https://doi.org/10.25077/jsfk.7.1.31-38.2020>
- Purnamasari D. 2018. The emergence of non-communicable disease in Indonesia. *Acta Med Indones*, 50(4), 273–274.
- Putri, N. E., Nurahmanto, D., & Rosyidi, V. A. (2021). Optimasi Tween 80 dan Propilen Glikol dalam Self- Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* ). *E-Journal Pustaka Ilmu Kesehatan*, 9(2), 78–83.
- Ramadhani N, Samudra AG, dan Pratiwi LWI. 2019. Analisis Penetapan Kadar Flavonoid Sari Jeruk Kalamansi (*Citrofortunella microcarpa*) dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*. 6(1), 53–58.
- Rohatgi A, dan Gupta P. 2021. Natural and synthetic plant compounds as anti-biofilm agents against *Escherichia coli* O157:H7 biofilm. *Infection, Genetics and Evolution*. 95, 1–13.
- Rowe RC, Sheskey PJ, dan Quinn ME. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Edisi ke-6. London: Pharmaceutical Press.

- Singh B, Pal J, Kaur A, dan Yadav MP. 2021. Insights into the chemical composition and bioactivities of citrus peel essential oils. *Food Research International*. 143, 1–19.
- Singh IR, dan Pulikkal AK. 2022. Preparation, stability and biological activity of essential oil-based nano emulsions: A comprehensive review. *OpenNano*. 8, 1–21. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100066>.
- Sokkula SR, & Gande S. 2020. A comprehensive review on self-nano emulsifying drug delivery systems: advancements & applications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 12(5), 576–583. <https://doi.org/10.25004/ijpsdr.2020.120522>
- Suhery WN, Sumirtapura YC, Pamudji JS, dan Mudhakhir D. 2020. Development and characterization of self-nanoemulsifying drug delivery system (Snedds) formulation for enhancing dissolution of fenofibric acid. *Journal of Research in Pharmacy*. 24(5), 738–747
- Sukohar A, Armadany FI, Bakede F, Malaka MH, Ramdini DA, & Adjeng ANT. 2022. Antimicrobial activity of *Syzygium aromaticum* L. leaves essential oil against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Research J. Pharm. and Tech*, 15(12), 1–5.
- Suryani, Adjeng ANT, & Mana'an S. 2017. Optimasi formula gel antioksidan ekstrak etanol buah bligo (*Benincasa hispida*) dengan metode simplex lattice design (SLD). *Jurnal Farmasi Galenika*, 3(2), 150–156. <https://doi.org/10.22487/j24428744.2017.v3.i2.8815>
- Suryani S, Sahumena MH, Putrawansya LRP, Adjeng ANT, Aswan M, & Ruslin. 2019. The Self-nanoemulsifying Drug Delivery System Formulation of Mefenamic Acid. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 13(4), 287–294.
- Suryani, Zubaydah WOS, Sahumena MH, Adawia S, Wahyuni R, Adjeng ANT, et. al. 2019. Preparation and characterization of self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) from *Moringa oleifera* L. and *Cassia alata* L. leaves extracts. *2nd International Conference on Bioscience, Biotechnology, and Biometrics*, 070011(2199), 1–8.
- Syukri Y, Martien R, Lukitaningsih E, & Nugroho AE. 2018. Novel self-nano emulsifying drug delivery system (SNEDDS) of andrographolide isolated from *Andrographis paniculata* Nees: Characterization, in-vitro and in-vivo assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 1–25. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.06.014>
- Teaima M, Hababeh S, Khanfar M, Alanazi F, Alshora D, & El-Nabrawi M. 2022. Design and optimization of pioglitazone hydrochloride self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) incorporated into an orally disintegrating

tablet. *Pharmaceutics*, 14(2), 1–23.

Tungadi R. 2020. *Teknologi Nano Sediaan Liquida dan Semisolida*. Edisi pertama. Jakarta: CV. Sagung Seto.

Tungadi R, Thomas NA, & Gobel WGV. 2021. Formulasi, karakterisasi, dan evaluasi drops liquid self nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) astaxanthin, *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, 1(3), 168–178.

Wahyuningsih, I. I. S., & Latief, Y. (2021). Formulasi self nano emulsifying drug delivery system (SNEDDS) minyak biji jinten hitam dengan surfaktan tween 80 dan kosurfaktan Sorbitol. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 19(1), 118–124.

Xin YH, Wu YX, Qiao B, Su L, Xie SQ, dan Ling P. 2022. Evaluation on the phenotypic diversity of calamansi (*Citrus microcarpa*) germplasm in Hainan island. *Scientific Reports*.