

**FORMULASI DAN KARAKTERISASI *SELF-NANOEMULSIFYING
DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS) DARI MINYAK ATSIRI KULIT
JERUK KALAMANSI (*Citrus x microcarpa* Bunge) SERTA UJI
AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus*
SECARA *IN VITRO***

(Skripsi)

**Oleh
MUTIARA NAULI BR. SITINJAK
1918031007**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

**FORMULASI DAN KARAKTERISASI *SELF-NANOEMULSIFYING
DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS) DARI MINYAK ATSIRI KULIT
JERUK KALAMANSI (*Citrus x microcarpa* Bunge) SERTA UJI
AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus*
SECARA *IN VITRO***

**Oleh
Mutiara Nauli Br. Sitinjak**

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

Pada

**Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung**



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

Judul Skripsi : **FORMULASI DAN KARAKTERISASI *SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS) DARI MINYAK ATSIRI KULIT JERUK KALAMANSI (*Citrus x microcarpa* Bunge) SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO***

Nama Mahasiswa : Mutiara Nauli Br. Sitinjak

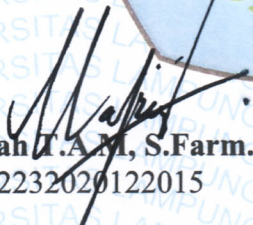
No. Pokok Mahasiswa : 1918031007

Program Studi : Farmasi

Fakultas : Kedokteran



1. Komisi Pembimbing


Andi Nafisan T.A.M., S.Farm., M.Sc.
NIP. 198902232020122015


apt. Zulpakor Oktoba, S.Si., M.Farm.
NIK. 232111871023101

2. Plt. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, S.Si., M.T.
NIP. 197407052000031001

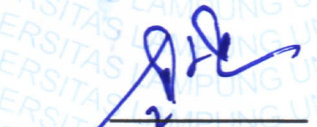
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Andi Nafisah TAM., S.Farm., M.Sc.



Sekretaris : apt. Zulpakor Oktoba, S.Si., M.Farm.



Penguji

Bukan Pembimbing: Prof. Dr. dr. Asep Sukohar, M.Kes., Sp.KKLP



2. Plt. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, S.Si., M.T.

NIP. 197407052000031001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 23 Juni 2023

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

Skripsi dengan judul **“FORMULASI DAN KARAKTERISASI *SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS) DARI MINYAK ATSIRI KULIT JERUK KALAMANSI (*Citrus x microcarpa* Bunge) SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO*”** 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. Hal 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, Maret 2023



Mutiara Nauli Br. Sitinjak

NPM. 1918031007

RIWAYAT HIDUP

Mutiara Nauli Br. Sitinjak lahir di Sidoharjo pada tanggal 12 Februari 2001. Penulis lahir dari pasangan Bapak Kules Sitinjak dan Ibu Mimin Aminah Pakpahan. Penulis merupakan anak kedelapan dari sembilan bersaudara yakni, Juwanda Sitinjak, Juvri Hasudungan Sitinjak, Rafael Junaidi Sitinjak, Jolly Sitinjak, Jerry Manopo Sitinjak, Jadi Antoni, Agus Santowi, dan Michael Julius Sebastian Sitinjak. Riwayat pendidikan yang ditempuh oleh penulis sebagai berikut: SDN 2 Sidoharjo sejak tahun 2007 kemudian melanjutkan pendidikan menengah pertama di SMP Fransiskus Tanjung Karang pada tahun 2013. Kemudian, melanjutkan sekolah menengah atas di SMAN 7 Bandar Lampung pada tahun 2016. Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tahun 2019 melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi (SNMPTN).

Penulis menjalani masa perkuliahan dengan aktif dalam beberapa perlombaan dan organisasi. Penulis berkesempatan menjadi juara 2 pada perlombaan *Speech Competition* yang diadakan PGSD Universitas Negeri Medan tahun 2021, juara 2 lomba Film Pendek *Pharmalation* yang diadakan Farmasi Universitas Lampung tahun 2021, dan finalis *Literature Review* yang diadakan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Makassar pada tahun 2021. Penulis juga mengikuti organisasi intra kampus yaitu Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) FK Unila selama dua tahun sebagai *Executive Apprentice* (EA) dan Sekretaris Dinas Kajian, Aksi, Strategi, dan Advokasi. Penulis juga mengikuti organisasi Himpunan Mahasiswa Farmasi Unila (Himafarsi) selama 2 tahun sebagai Bendahara Departemen Sosial. Penulis juga pernah menjadi asisten dosen Teknologi Formulasi selama 2 tahun. Selama menjadi mahasiswa penulis juga aktif dalam mengikuti berbagai rangkaian kepanitiaan di kampus. Pada semester akhir, penulis memfokuskan diri pada skripsi dan akademik untuk kelulusan dan studi lanjut profesi apoteker.

SANWACANA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Formulasi dan Karakterisasi *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) dari Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) serta Uji Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara *In Vitro*”**.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bimbingan, masukan, bantuan, dorongan, kritik dan saran dari berbagai pihak. Dengan ini penulis ingin menyampaikan ucapan rasa terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., I.P.M selaku Rektor Universitas Lampung
2. Dr. Eng. Satripto 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. Andi Nafisah TAM., S.Farm., M.Sc selaku Pembimbing utama yang terhormat dan inspiratif yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam memberikan masukan, saran, dorongan, semangat, kepercayaan diri, dan motivasi kepada penulis. Terima kasih atas perhatian, kesabaran, arahan, dan bimbingan dalam proses penyusunan skripsi ini serta selama penulis menempuh Pendidikan Farmasi di Universitas Lampung;
5. apt. Zulpakor Oktoba, S.Si., M.Farm selaku Pembimbing II yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam memberikan arahan, masukan, saran, dan dorongan kepada penulis. Terima kasih atas ilmu, arahan, bimbingan, dan kesabaran dalam proses penyusunan skripsi ini serta selama penulis menempuh Pendidikan Farmasi di Universitas Lampung;

6. Guru besar yang terhormat dan inspiratif, Prof. Dr. dr. Asep Sukohar, S.Ked., M.Kes., Sp.KKLP selaku Pembahas yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam memberikan arahan, masukan, saran, dan dorongan kepada penulis. Terima kasih atas ilmu berharga yang telah diberikan kepada penulis selama proses penyusunan skripsi ini serta selama penulis menempuh Pendidikan Farmasi di Universitas Lampung;
7. Dosen Pembimbing Akademik, apt. M. Fitra Wardhana, S.Farm., M.Farm dan apt. Mirza Junando, S.Farm., M.Farm.Klin. Terima kasih telah membantu dan membimbing dengan sepenuh hati selama proses penulis menempuh Pendidikan S1 Farmasi di Universitas Lampung;
8. Seluruh dosen Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang tidak bisa disebutkan satu per satu. Terima kasih atas ilmu dan bimbingan yang telah diberikan selama proses perkuliahan;
9. Seluruh staf dan civitas akademik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang telah membantu proses penyusunan skripsi ini;
10. Papa dan Mama yang memberi alasan untuk Tiara tetap bertahan. Papa dan Mama yang selalu menyelipkan nama Tiara di doa tengah malamnya. Setiap ingin menyerah, takut, kecewa, papa dan mama selalu menjadi sahabat terbaik, mendengarkan keluh kesah, dan terkadang memberi waktu untuk sendiri tanpa paksaan untuk bercerita. Rasa syukur tidak cukup untuk dituliskan dalam secarik kertas, karena kasih sayang, cinta, dan pengorbanan papa dan mama tak bisa dituliskan dengan kata. Terima kasih, Pa, sudah menjadi garda terdepan dan pembimbing boru papa satu-satunya. Terima kasih, Ma, sudah menjadi sosok perempuan hebat yang selalu aku banggakan dan aku idolakan. Terima kasih Pa, Ma, sudah menjadikan Tiara anak perempuan Papa dan Mama. Tiara sampai di titik ini karena berkat perpanjangan tangan Tuhan melalui papa dan mama.
11. Abang-abang dan Adik yang selalu hadir dalam setiap langkah Tiara. Abang-abang dan Adik yang selalu siap menopang jika Tiara tersandung dalam perjalanan hidup, selalu menjaga satu sama lain, saling melindungi, serta menjadi rumah ternyaman dan teraman untuk Tiara pulang. Terima

kasih, Bang, Dik, berkat kalian Tiara bisa menjalani kehidupan yang penuh warna dan setiap harinya terasa berharga.

12. Seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa, semangat, perhatian, nasihat yang sangat berarti dalam penyusunan skripsi ini;
13. Teman dekat di farmasi yaitu, Made, Lyan, Acol, Era, Nanda, Farras, Cindy, dan Fredison yang telah menjadi teman terbaik dan menjadi keluarga bagi penulis. Terima kasih atas dukungan, motivasi, teman belajar sampai pada tahap ini. Semoga kita bisa menjadi apoteker yang kompeten nantinya;
14. Teman seperbimbingan nanoteknologi, Afna, yang memberi semangat dan dukungan dalam suka maupun duka perjalanan skripsi;
15. Teman-teman seperjuangan tim bakteri, Luhut, Siti, Afna, Nana, yang selalu menemani dan mendukung selama penelitian berlangsung;
16. Teman-teman farmasi lainnya, Neysha, Winda, Rila, Nungky, Regi, Arini, Zay, Eka, Zeta, Siti, Vira, Denia, Sekar, Ergi, Vadi, Nara, dan Tasya. Terima kasih atas kenangan indah dalam menjalani kehidupan perkuliahan;
17. Keluarga Ligamentum-Ligand, angkatan 2019, terima kasih atas setiap tahun-tahun di FK Unila yang dilalui bersama. Adik-adik angkatan 2020, 2021, dan 2022, terima kasih atas dukungan dan doanya;
18. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam menyelesaikan penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan. Penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi banyak orang dan dapat menambah pengetahuan serta informasi bagi pembaca.

Bandar Lampung, Maret 2023

Penulis

Mutiara Nauli Br. Sitinjak

ABSTRACT

FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM (SNEDDS) FROM KALAMANSI ORANGE PEEL ESSENTIAL OIL (*Citrus x microcarpa* Bunge) AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST AGAINST *Staphylococcus aureus* IN VITRO

By

MUTIARA NAULI BR. SITINJAK

Background: Calamansi peel essential oil (*Citrus x microcarpa* Bunge) contains monoterpene and sesquiterpene compounds which have antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. However, essential oil compounds have volatile properties, so that it will affect their antibacterial activity. Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) was chosen as a delivery system to increase the stability of essential oils.

Objective: To discover the optimum SNEDDS formula, SNEDDS characteristics, and test of SNEDDS antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.

Methods: This research is an experimental study to find out the optimum SNEDDS formula, SNEDDS characteristics, and antibacterial activity test of SNEDDS Calamansi peel essential oil (*Citrus x microcarpa* Bunge) at concentrations of 4% against *Staphylococcus aureus*.

Results: The results showed that the optimum SNEDDS formula consists of tween 80 with a concentration of 78%, 9% propylene glycol, 9% olive oil, and 4% essential oil. Prediction software Design Expert Stat-Ease 22.0.3 showed optimum formula with a clear yellow color appearance and the distinctive odor of orange oil. An average emulsification time of SNEDDS in distilled water was $95 \pm 0,26$, artificial gastric fluid (AGF) media was $93 \pm 0,36$, artificial intestinal fluid (AIF) was $90 \pm 0,13$; an average particle size was $174,3 \pm 35,99$ nm; an average polydisperse index values was $0,56 \pm 0,04$; an average zeta potential was $-25,13 \pm 0,40$; SEM morphological visualization showed no particle aggregation occurred, and was physically stable at $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ and 25°C with no separation or agglomeration. The optimum formula with a concentration of 50 μl has activity against *Staphylococcus aureus* with an average inhibition zone diameter of $12,10 \pm 0,10$ mm.

Conclusion: Calamansi peel essential oil (*Citrus x microcarpa* Bunge) can be formulated into SNEDDS, meet the characteristic criteria of SNEDDS, and has antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: citrus peel calamansi, SNEDDS, antibacterial, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRAK

FORMULASI DAN KARAKTERISASI *SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS) DARI MINYAK ATSIRI KULIT JERUK KALAMANSI (*Citrus x microcarpa* Bunge) SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO*

Oleh

MUTIARA NAULI BR. SITINJAK

Latar Belakang: Minyak atsiri kulit jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) mengandung senyawa monoterpen dan seskuiterpen yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Namun, senyawa minyak atsiri memiliki sifat mudah menguap, sehingga akan mempengaruhi aktivitas antibakterinya. *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) dipilih sebagai sistem penghantaran untuk meningkatkan stabilitas minyak atsiri.

Tujuan: Mengetahui formula SNEDDS yang optimum, karakteristik SNEDDS, dan uji aktivitas antibakteri SNEDDS terhadap *Staphylococcus aureus*.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk mengetahui formula optimum SNEDDS, karakteristik SNEDDS, dan uji aktivitas antibakteri minyak atsiri kulit SNEDDS kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) konsentrasi 4% terhadap *Staphylococcus aureus*.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa formula SNEDDS optimum terdiri dari tween 80 dengan konsentrasi 78%, propilen glikol 9%, *olive oil* 9%, dan minyak esensial 4%. Prediksi *software Design Expert Stat-Ease 22.0.3* menunjukkan formula optimum dengan tampilan warna kuning jernih dan bau khas minyak jeruk. Rata-rata waktu emulsifikasi SNEDDS dalam aquades sebesar $95 \pm 0,26$, media *artificial gastric fluid* (AGF) sebesar $93 \pm 0,36$, *artificial intestinal fluid* (AIF) sebesar $90 \pm 0,13$; ukuran partikel rata-rata $174,3 \pm 35,99$ nm; nilai indeks polidispersitas rata-rata $0,56 \pm 0,04$; nilai potensial zeta rata-rata $-25,13 \pm 0,40$. Visualisasi morfologi SEM menunjukkan tidak terjadi agregasi partikel, dan stabil secara fisik pada suhu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ dan 25°C tanpa pemisahan atau aglomerasi. Formula optimum dengan konsentrasi 50 μl memiliki aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus* dengan diameter zona hambat rata-rata $12,10 \pm 0,10$ mm.

Kesimpulan: Minyak atsiri kulit kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) dapat diformulasikan menjadi SNEDDS, memenuhi kriteria karakteristik SNEDDS, dan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

Kata Kunci: kulit jeruk kalamansi, SNEDDS, antibakteri, *Staphylococcus aureus*.

DAFTAR ISI

BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Manfaat Bagi Peneliti	5
1.4.2. Manfaat Bagi Institusi Pendidikan.....	5
1.4.3. Manfaat Bagi Masyarakat.....	5
1.4.4. Manfaat Bagi Peneliti Selanjutnya	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Jeruk Kalamansi.....	6
2.1.1. Klasifikasi	6
2.1.2. Morfologi	6
2.1.3. Kandungan	7
2.1.4. Manfaat	8
2.2. Minyak Atsiri	8
2.2.1. Definisi.....	8
2.2.2. Metode Pengambilan Minyak Atsiri.....	9
2.2.3. Rendemen Minyak Atsiri.....	12
Berat bahan baku sebelum penyulingan	12
2.2.4. Parameter Kualitas dan Kemurnian Minyak Atsiri.....	12
2.3. Sistem Penghantaran Obat	13
2.3.1. Definisi.....	13
2.3.2. Nanopartikel.....	14

2.4. <i>Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System</i> (SNEDDS).....	15
2.4.1. Definisi SNEDDS	15
2.4.2. Mekanisme Emulsifikasi SNEDDS	16
2.4.3. Komponen Penyusun SNEDDS.....	16
2.4.4. Keunggulan SNEDDS	19
2.4.5. Kelemahan SNEDDS.....	20
2.4.6. Evaluasi SNEDDS	21
2.4.7. Karakterisasi SNEDDS.....	22
2.5. Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.5.1. Deskripsi <i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.5.2. Patogenesis.....	25
2.5.3. Pencegahan dan Pengobatan.....	26
2.6. Aktivitas Antibakteri.....	26
2.6.1. Uji Aktivitas Antibakteri	27
2.7. Kerangka Teori	29
2.8. Kerangka Konsep.....	30
2.9. Hipotesis.....	30
2.9.1. Hipotesis nol	30
2.9.2. Hipotesis alternatif.....	30
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	32
3.1. Rancangan Penelitian.....	32
3.2. Tempat dan Waktu	32
3.3. Sampel Penelitian.....	33
3.3.1. Besar Sampel	33
3.3.2. Kelompok Sampel.....	34
3.4. Alat dan Bahan Penelitian.....	34
3.4.1. Alat.....	34
3.4.2. Bahan	34
3.5. Prosedur Penelitian	35
3.5.1. Etika Penelitian.....	35
3.5.2. Determinasi Tanaman.....	35
3.5.3. Destilasi Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi.....	35

3.5.4. Uji Pendahuluan Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri	36
3.5.5. Formulasi SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi	36
3.5.6. Preparasi SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi	38
3.5.7. Evaluasi Sediaan SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi....	39
3.5.8. Optimasi Formula SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi ..	40
3.5.9. Verifikasi Formula Optimum SNEDDS	40
3.5.10. Karakterisasi Sediaan SNEDDS.....	41
3.5.11. Uji aktivitas antibakteri	43
3.5.12. Alur Penelitian.....	46
3.6. Identifikasi Variabel.....	47
3.6.1. Variabel Independen	47
3.6.2. Variabel Dependen	47
3.6.3. Definisi Operasional Variabel	48
3.7. Analisis Data	49
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	50
4.1. Hasil	50
4.1.1. Hasil Etika Penelitian.....	50
4.1.2. Hasil Determinasi Tanaman.....	50
4.1.3. Hasil Rendemen Minyak Atsiri	50
4.1.4. Hasil Parameter Kualitas dan Kemurnian Minyak Atsiri	51
4.1.5. Hasil Analisis Senyawa Minyak Atsiri.....	51
4.1.6. Hasil Uji Pendahuluan Aktivitas Antibakteri	52
4.1.7. Hasil Preparasi SNEDDS.....	54
4.1.8. Hasil Evaluasi SNEDDS.....	55
4.1.9. Hasil Optimasi SNEDDS.....	56
4.1.10. Hasil Verifikasi Formula Optimum.....	57
4.1.11. Hasil Karakterisasi Formula Optimum SNEDDS.....	57
4.2. Pembahasan.....	63
4.2.1. Rendemen Minyak Atsiri	63
4.2.2. Analisis Senyawa Minyak Atsiri.....	64
4.2.3. Uji Pendahuluan	65
4.2.4. Preparasi Formula SNEDDS.....	66

4.2.5. Evaluasi Formula SNEDDS	66
4.2.6. Verifikasi Formula Optimum SNEDDS	67
4.2.7. Karakterisasi Formula Optimum SNEDDS	68
4.2.8. Stabilitas Sediaan	71
4.2.9. Aktivitas Antibakteri	71
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....	74
5.1 Simpulan	74
5.2 Saran.....	75
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN.....	86

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Formulasi SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi.....	38
Tabel 2. Komposisi <i>Artificial Gastric Fluid</i> (AGF)	42
Tabel 3. Komposisi <i>Artificial Intestinal Fluid</i> (AIF)	42
Tabel 4. Hubungan Diameter dan Kategori Zona Hambat	45
Tabel 5. Definisi Operasional Variabel	48
Tabel 6. Hasil Rendemen Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi.....	50
Tabel 7. Hasil Identifikasi Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi	51
Tabel 8. Hasil Diameter Zona Hambat dari Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) terhadap Pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i>	52
Tabel 9. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Diameter Zona Hambat Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) terhadap Pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i>	53
Tabel 10. Hasil Uji Post Hoc LSD Diameter Zona Hambat Minyak Asi Kulit Buah Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) terhadap Pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i>	53
Tabel 11. Hasil Preparasi Formula SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge).....	54
Tabel 12. Hasil Uji Persen Transmitan Formula SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge)	55
Tabel 13. Hasil Uji Waktu Emulsifikasi Formula SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge)	56
Tabel 14. Hasil Verifikasi Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge).....	57
Tabel 15. Hasil Uji Waktu Emulsifikasi Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge)	58
Tabel 16. Hasil Karakterisasi Ukuran Partikel Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge)	59

Tabel 17. Hasil Karakterisasi Indeks Polidispersitas (PDI) Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge)...	59
Tabel 18. Hasil Karakterisasi Potensial Zeta Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge).....	59
Tabel 19. Hasil Diameter Zona Hambat Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) terhadap Zona Hambat Pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Tabel 20. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Data Diameter Zona Hambat Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) terhadap Zona Hambat Pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i>	62
Tabel 21. Hasil Uji Post Hoc LSD Diameter Zona Hambat Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) terhadap Pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i>	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Jeruk Kalamansi.....	6
Gambar 2. Struktur limonen	7
Gambar 3. <i>Hydrosteam distillation</i>	9
Gambar 4. <i>Steam distillation</i>	10
Gambar 5. <i>Hydrodistillation</i>	10
Gambar 6. SNEDDS di dalam saluran pencernaan manusia.....	15
Gambar 7. Preparasi nanoemulsi dengan metode <i>self-emulsification</i>	16
Gambar 8. <i>Staphylococcus aureus</i> , perbesaran 100x	24
Gambar 9. Kerangka Teori	29
Gambar 10. Kerangka Konsep.....	30
Gambar 11. Struktur Tween 80	37
Gambar 12. Struktur Propilen Glikol	37
Gambar 13. Skema Pembuatan SNEDDS	39
Gambar 14. Skema Alur Penelitian	47
Gambar 15. Hasil Kurva Grafik %T Formula Optimum dari SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge).....	58
Gambar 16. Hasil Karakterisasi <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM) Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge).....	60
Gambar 17. Hasil Uji Kestabilan Fisik Formula Optimum SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi (<i>Citrus x microcarpa</i> Bunge) (a) Suha Ruang dan (b) Suhu 37°C	60

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Infeksi merupakan salah satu penyebab bagi seseorang untuk mengalami gangguan pada sistem pernapasan. Infeksi saluran pernapasan menjadi penyebab utama kecacatan dan kematian yang terjadi di dunia. Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2019, infeksi saluran pernapasan bawah menempati peringkat ke-4 dari 10 penyebab kematian teratas yang menyumbang 55% dari 55,4 juta kematian di seluruh dunia, dengan jumlah kematian mencapai 2,6 juta jiwa (World Health Organization, 2020).

Infeksi bakteri pada saluran pernapasan bagian bawah bisa menjadi penyebab penyakit, ditandai dengan batuk kronis. Di Indonesia terdapat berbagai macam penyakit dengan gejala utama batuk kronis, diantaranya adalah pneumonia dengan prevalensi pneumonia pada balita sebesar 3,55% pada tahun 2021 (Kementerian Kesehatan RI, 2022). Selain pneumonia, penyakit lain dengan gejala batuk kronis adalah Penyakit Paru Obstruktif Kronis (PPOK). Prevalensi PPOK di Indonesia sebesar 3,7% pada tahun 2013 dan lebih sering terjadi pada laki-laki berjumlah lebih banyak dibandingkan perempuan (Kementerian Kesehatan RI, 2013).

Salah satu bakteri yang paling sering ditemukan pada sputum pasien dengan gejala batuk kronis adalah *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian Jinghua *et al.*, (2017) dengan menganalisis patogen yang terdapat pada sputum batuk anak dengan *community-acquired pneumonia*, terdapat 119 sampel sputum batuk anak terdeteksi bakteri gram positif, dengan dominasi strain bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 17.23% (Jinghua *et al.*, 2017).

Antibiotik menjadi salah satu pilihan pengobatan yang diberikan dalam penanganan infeksi yang disebabkan *Staphylococcus aureus* karena dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri tersebut. Akan tetapi, tingginya persebaran antibiotik untuk mengatasi infeksi *Staphylococcus aureus* berdampak pada peningkatan prevalensi strain bakteri yang mengalami resistensi terhadap antibiotik sehingga berdampak pada keberhasilan terapi pasien (Guo *et al.*, 2020). Potensi resistensi terhadap antibiotik mencetuskan eksplorasi terhadap alternatif lain berupa pengobatan dari bahan alam yang memanfaatkan senyawa aktif pada minyak atsiri sebagai antibiotik alami untuk menekan pertumbuhan bakteri dan memiliki efek samping minimal (Fadlilah, 2015).

Indonesia memiliki hutan hujan tropis dengan 30.000 spesies tanaman, 9.600 diantaranya teridentifikasi berkhasiat sebagai tanaman obat (Alqamari *et al.*, 2017). Dalam memilih terapi obat, masyarakat cenderung kembali pada prinsip *back to nature*, terutama dalam memilih terapi medis yang kini mengalami kemajuan pesat dalam terapi pengobatan tradisional (Sukohar *et al.*, 2018). Penggunaan tanaman sebagai obat dinilai memiliki efek samping relatif lebih rendah ketika digunakan secara tepat, baik dari takaran, waktu dan cara konsumsi, serta ketepatan pemilihan bahan yang sesuai dengan indikasi (Kasim & Yusuf, 2020). Salah satu tanaman obat yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai bahan antimikroba yaitu jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) (Amiliah *et al.*, 2021). Jeruk kalamansi dibudidayakan di Bengkulu sebagai salah satu bahan pembuatan produk sirup yang dipasarkan sebagai oleh-oleh khas Bengkulu. Akan tetapi, produksi sirup jeruk kalamansi menghasilkan limbah berupa kulit, pulp, dan cairan hasil pengendapan yang tidak dikelola. Mengatasi permasalahan tersebut, limbah kulit jeruk kalamansi dapat dimanfaatkan dengan mengoptimalkan pengolahan sebagai minyak atsiri agar memiliki nilai jual yang tinggi (Dewi *et al.*, 2016).

Kulit jeruk kalamansi mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, terpenoid, dan minyak atsiri. Pada penelitian yang dilakukan Kindangen *et al.*, (2018) dengan melakukan pengujian aktivitas antibakteri

minyak atsiri kulit jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) pada bakteri gram positif, terbukti bahwa senyawa-senyawa yang terkandung pada minyak atsiri kulit jeruk kalamansi dapat menghambat pertumbuhan pada bakteri *Staphylococcus aureus* (Kindangen *et al.*, 2018). Senyawa metabolit sekunder tersebut memiliki aktivitas antibakteri pada *Staphylococcus aureus* dengan mengganggu proses penyusunan komponen membran sel atau permeabilitas membran sel sehingga menyebabkan penyusutan atau komponen keluar dari dalam sel. Selain itu, kandungan senyawa pada kulit jeruk kalamansi dapat menghambat pembentukan membran sel dan menghambat proses pertumbuhan dari bakteri (Amiliah *et al.*, 2021).

Minyak atsiri memiliki beberapa sifat yang merugikan seperti mudah menguap dan mengalami degradasi jika terkena beberapa faktor eksternal, seperti panas, cahaya, oksigen, kelembaban, bahan kimia, tekanan, dan pencernaan lambung. Selain itu, kegagalan minyak atsiri untuk pemberian *in vivo* dikarenakan kelarutannya yang rendah, sifat hidrofobik, bioavailabilitas rendah, dan permeabilitas membran yang buruk. Keterbatasan minyak atsiri dapat diatasi dengan menggunakan sistem nanopartikel sebagai penghantaran obat (Dupuis *et al.*, 2022).

Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) adalah sistem penghantaran obat yang meningkatkan kelarutan minyak atsiri dalam media air dan meningkatkan bioavailabilitas ketika dikonsumsi secara oral dan memberi efek anti bakteri (Akhtar *et al.*, 2020). SNEDDS adalah campuran minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan yang ketika mengalami dispersi air dan agitasi ringan, SNEDDS secara otomatis akan berubah menjadi nanoemulsi *oil-in-water* dengan ukuran droplet $\leq 200\text{nm}$ (Buya *et al.*, 2020).

Optimasi surfaktan dan ko-surfaktan pada formulasi SNEDDS dilakukan untuk mencapai komposisi surfaktan dan ko-surfaktan yang tepat sehingga ketika sediaan SNEDDS didispersikan dalam air akan membentuk nanoemulsi secara spontan dan menghasilkan globul dengan ukuran $\leq 100\text{nm}$ (Priani *et al.*, 2020).

Berdasarkan hal tersebut mendorong peneliti untuk melakukan formulasi dan karakterisasi *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) dari minyak atsiri kulit jeruk kalamansi serta uji antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Penelitian ini penting dilakukan untuk mengembangkan alternatif pengobatan menggunakan bahan alam sebagai obat antibiotik di masa mendatang.

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah minyak atsiri jeruk kalamansi dapat diformulasikan sebagai sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) yang baik?
2. Apakah hasil karakterisasi sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) sesuai dengan kriteria sediaan SNEDDS yang baik?
3. Apakah terdapat aktivitas antibakteri sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik dan efektivitas formula SNEDDS minyak kulit jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge)-olive oil dengan variasi konsentrasi tween 80 dan propilen glikol terhadap aktivitas bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui rancangan terbaik formula *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) menggunakan perbandingan minyak atsiri kulit jeruk kalamansi, surfaktan, dan ko-surfaktan.
- b. Untuk mengetahui hasil karakterisasi sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) minyak atsiri

kulit jeruk kalamansi yang dibuat sesuai dengan kriteria sediaan SNEDDS yang baik.

- c. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Bagi Peneliti

Hasil penelitian diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai formulasi dan karakterisasi *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) dari minyak atsiri kulit jeruk kalamansi serta uji antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.4.2. Manfaat Bagi Institusi Pendidikan

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan referensi penelitian terkait formulasi dan karakterisasi *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) dari minyak atsiri kulit jeruk kalamansi serta uji antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.4.3. Manfaat Bagi Masyarakat

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan referensi untuk terapi alternatif menggunakan senyawa aktif dari minyak atsiri kulit jeruk kalamansi.

1.4.4. Manfaat Bagi Peneliti Selanjutnya

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai gambaran informasi terkait formulasi dan karakterisasi *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) dari minyak atsiri kulit jeruk kalamansi serta uji antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Jeruk Kalamansi

2.1.1. Klasifikasi



Gambar 1. Jeruk Kalamansi (Dokumentasi Pribadi).

Jeruk kalamansi diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Sapindales
Family	: Rutaceae
Genus	: <i>Citrus</i>
Spesies	: <i>Citrus x microcarpa</i> Bunge

(Novitasari *et al.*, 2018).

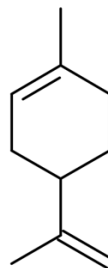
2.1.2. Morfologi

Jeruk Kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) adalah hasil dari hibrida *Citrus* sp dan *fortunella* sp yang marak dibudidayakan di Pulau Sumatera, seperti Bengkulu, Palembang, dan Lampung (Ramadhani *et al.*, 2019). Tanaman dengan tulang batang yang panjang, beranting,

dan, bercabang ini memiliki tinggi hingga 3-5 meter. Kulit buah jeruk kalamansi cukup tipis dan berwarna hijau kekuningan, daun berbentuk bulat atau lonjong yang berwarna hijau, bunga berwarna putih, dan buah yang berbentuk bulat kecil dan berdiameter rata-rata 4,5 cm, memiliki tekstur halus, dan rasa yang asam (Othman *et al.*, 2016).

2.1.3. Kandungan

Kulit buah jeruk kalamansi mengandung senyawa metabolit sekunder antara lain flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan minyak atsiri. Minyak atsiri pada kulit jeruk memiliki komponen utama berupa senyawa golongan terpenoid, yaitu monoterpen dan seskuiterpen, yang berperan sebagai antimikroba dengan menghambat sintesis asam nukleat, dinding polisakarida dan ergosterol dari membran sel (Amiliah *et al.*, 2021). Senyawa monoterpen yang paling umum ditemukan adalah D-*limonene* yang berperan sebagai antibakteri alami, tetapi bersifat volatil sehingga mudah terdegradasi (Palma *et al.*, 2019).



Gambar 2. Struktur *limonene* (Baser & Buchbauer, 2016).

Pada penelitian yang dilakukan Quyen *et al* (2019) dengan menguji kandungan minyak atsiri pada kalamondin atau jeruk kalamansi di Vietnam menggunakan analisis *gas chromatography-mass spectrometry* (GC-MS), diperoleh hasil bahwa senyawa paling tinggi yang terkandung pada minyak atsiri jeruk kalamansi adalah *limonene* (96,925%), -myrcene (1,424%), 1R- α -pinene (0,561%), cyclohexene (0,343%) dan -cubebene (0,598%) (Quyen *et al.*, 2019).

2.1.4. Manfaat

Buah jeruk kalamansi kerap dikembangkan menjadi bahan baku dalam pembuatan sirup yang populer dipasarkan sebagai oleh-oleh khas Bengkulu. Selain itu, kandungan kulit jeruk kalamansi berbagai senyawa metabolit sekunder yang berkhasiat bagi kesehatan. Kandungan flavonoid memiliki banyak sifat biologis, terutama antioksidan dan antiinflamasi. Antioksidan dalam jeruk kalamansi bermanfaat untuk pencegahan penyakit kronis (Chen *et al.*, 2017). Kemudian, senyawa carvacrol dan timol dari jeruk kalamansi memberikan efek sinergis antimikroba pada strain membran bakteri gram negatif dan gram positif, seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, dan *Listeria monocytogenes* (Chung *et al.*, 2018).

Pada penelitian yang dilakukan Amiliah *et al* (2021) dengan menguji aktivitas antibakteri kulit buah jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi pada konsentrasi 20% memiliki kemampuan antibakteri yang kuat (12,7 mm) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan sedang (8,3 mm) terhadap bakteri dan *Escherichia coli* (Amiliah *et al.*, 2021).

2.2. Minyak Atsiri

2.2.1. Definisi

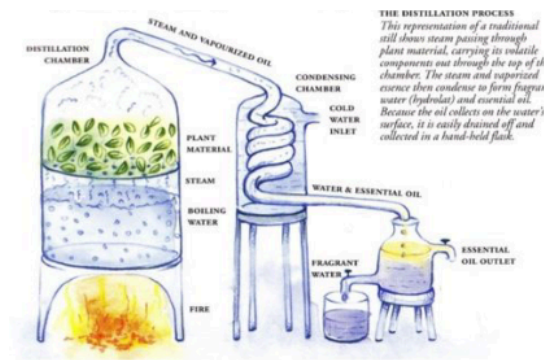
Minyak atsiri dapat diperoleh dari kulit batang, bunga, buah, kuncup, daun, akar, rimpang, biji atau seluruh bagian tanaman. Minyak atsiri memiliki rasa getir, tidak berwarna, dan volatil pada suhu ruang. Pada tanaman jeruk, minyak atsiri tersimpan di bagian mahkota bunga atau dalam kulit buah. Fungsi minyak atsiri dari tanaman untuk mengusir serangga dan mencegah kerusakan daun dan bunga. Selain itu, minyak

atsiri juga dapat berperan untuk menarik serangga agar membantu proses penyerbukan tanaman (Endarini, 2016).

2.2.2. Metode Pengambilan Minyak Atsiri

a. Metode destilasi atau penyulingan menggunakan perbedaan titik didih. Digunakan untuk memisahkan jenis zat yang berbeda (Endarini, 2016).

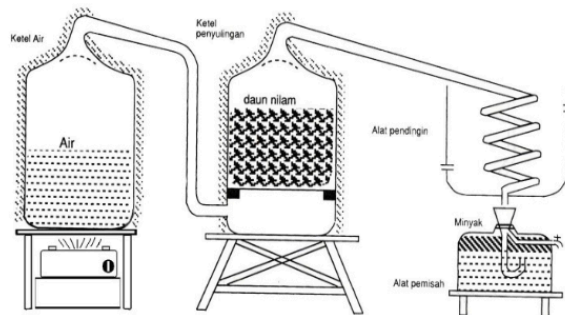
- *Hydro steam distillation*



Gambar 3. *Hydro steam distillation* (Aryani *et al.*, 2020).

Proses penyulingan uap air atau *hydro steam distillation* dengan cara menempatkan bahan tanaman di atas saringan dalam ketel penyulingan. Ketel penyulingan kemudian diisi dengan air sampai batas saringan. Selanjutnya, ketel dipanaskan hingga menghasilkan uap air. Uap air akan membawa minyak atsiri mengalir melalui pipa ke kondensor hingga terjadi pengembunan dan uap air yang telah bercampur dengan minyak atsiri akan mencair kembali. Setelah itu, dialirkan ke alat pemisah untuk memisahkan air dan minyak atsiri. Produk minyak yang dihasilkan melalui metode ini cukup baik dan memenuhi kualifikasi ekspor (Aryani *et al.*, 2020).

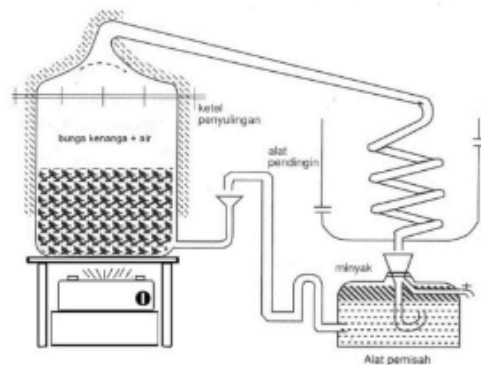
- *Steam distillation*



Gambar 4. *Steam distillation* (Aryani et al., 2020).

Prinsip kerja penyulingan uap seperti ini hampir sama dengan *hydro steam distillation*, tetapi ketel uap dan ketel penyulingan saling terpisah. Ketel uap yang berisi air dipanaskan, lalu uapnya dialirkan ke ketel penyulingan yang berisi bahan baku. Minyak akan terbawa bersama uap dan dialirkan ke alat pendingin. Di dalam alat pendingin terjadi proses pengembunan, sehingga uap yang bercampur minyak akan mengembun dan mencair kembali (Aryani et al., 2020).

- *Hydrodistillation*



Gambar 5. *Hydrodistillation* (Aryani et al., 2020).

Penyulingan dengan air atau *hydrodistillation* memiliki prinsip penyulingan bahan berhubungan langsung dengan air mendidih. (Aryani et al., 2020).

- b. Metode penyarian dengan memanfaatkan perbedaan kelarutan. Pelarut penyari yang cocok bagi minyak atsiri adalah pelarut organik (sangat mudah larut) dan bukan menggunakan air (tidak larut). Metode ini diterapkan bagi minyak-minyak atsiri yang tidak tahan proses pemanasan dan bila kadar minyak di dalam tanaman sangat rendah/kecil (Endarini, 2016).
- c. Metode pengepresan atau pemerasan pada tanaman dengan kadar minyak atsiri yang cukup besar. Selain itu, metode ini diterapkan untuk jenis minyak atsiri yang kandungan senyawanya mudah mengalami dekomposisi karena pengaruh temperatur (Endarini, 2016).

Macam-macam metode pengepresan:

- *Sponge Extraction Method*, yaitu metode pengempaan dengan mengupas kulit buah, seperti jeruk atau lemon, lalu direndam dalam air hingga kulit buah elastis. Kemudian, kulit buah dibalik di atas sponge dan diberi tekanan. Minyak yang keluar setelah diberi tekanan akan diserap oleh sponge. Terakhir, sponge diperas untuk memperoleh minyak atsiri (Aryani *et al.*, 2020).
 - *Expression of Rasping Process*, yaitu metode pemerasan kulit buah yang telah diparut dan dimasukkan dalam kantung plastik hingga mengeluarkan minyak (Aryani *et al.*, 2020).
 - *Scarification Method*, yaitu metode dengan menggulirkan buah jeruk atau lemon pada wadah berisi duri-duri tajam dan menusuk kulit buah untuk mengeluarkan minyak (Aryani *et al.*, 2020).
- d. Ekstraksi
 - Ekstraksi dengan pelarut non-volatil atau *enfleurage* adalah metode ekstraksi dengan menggunakan aktivitas enzim yang masih terus aktif bahan minyak atsiri dipanen hingga 15 hari setelahnya. Cara isolasi minyak atsiri yaitu dengan menggunakan minyak lemak yang dioleskan pada lempeng

kaca secara merata hingga membentuk lapisan tipis. Kemudian, irisan tanaman ditaburkan di atas lapisan tersebut dan didiamkan pada selang waktu tertentu. Selanjutnya, irisan tanaman diganti secara rutin dengan yang baru hingga minyak lemak jenuh dengan minyak atsiri. Setelah itu, minyak dikumpulkan dan dilakukan ekstraksi dengan alkohol, lalu didinginkan pada suhu rendah untuk memisahkan lemaknya. Sesudahnya, dilakukan penyaringan, lalu minyak dibuat pekat dengan penyulingan (Endarini, 2016).

- Ekstraksi dengan pelarut volatil atau maserasi, yaitu proses ekstraksi menggunakan pelarut volatil, seperti etanol untuk merendam bahan tanaman yang mengandung minyak atsiri. Campuran tersebut kemudian dipisahkan untuk diambil minyak atsirinya. Namun, metode ini dianggap mahal karena menggunakan bahan pelarut kimia (Aryani *et al.*, 2020).

2.2.3. Rendemen Minyak Atsiri

Rendemen minyak atsiri merupakan perbandingan antara hasil minyak atsiri yang diperoleh dengan bahan tanaman yang diolah. Besar rendemen minyak atsiri dihitung berdasarkan perbandingan sebagai berikut (Kementerian Kesehatan RI, 2017).

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

2.2.4. Parameter Kualitas dan Kemurnian Minyak Atsiri

Parameter kualitas dan kemurnian minyak atsiri mencakup:

a. Bau dan warna

Evaluasi terhadap bau dan warna minyak atsiri dinilai secara organoleptik. Minyak atsiri yang diperoleh akan menunjukkan mutu yang baik bila memiliki tingkat kecerahan warna yang cukup tinggi. Namun, minyak atsiri yang didiamkan pada suhu kamar dan terkena sinar matahari secara langsung akan menurun kualitasnya.

Hal ini ditunjukkan dengan perubahan yang dialami, yaitu perubahan bau, warna menjadi gelap, kental, dan membentuk resin (Ketaren, 1985).

b. Kelarutan dalam alkohol

Kelarutan minyak atsiri dalam alkohol ditentukan dengan mengamati daya larut minyak dalam alkohol. Uji kelarutan alkohol adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui derajat keaslian minyak atsiri yang diuji. Minyak atsiri dapat larut dalam alkohol dengan perbandingan dan konsentrasi tertentu. Dengan demikian dapat diketahui jumlah dan konsentrasi alkohol yang dibutuhkan untuk melarutkan sejumlah minyak atsiri secara sempurna. Selain larut dalam alkohol, minyak atsiri dapat larut di dalam pelarut organik lainnya (Guenther, 1987).

c. Analisis senyawa menggunakan GC-MS

Metode *Gas Chromatography and Mass Spectroscopy* (GC-MS) merupakan metode kombinasi yang digunakan untuk menganalisa sampel senyawa minyak atsiri yang bersifat termostabil dan volatil baik secara kuantitatif atau kualitatif (Aryani *et al.*, 2020).

2.3. Sistem Penghantaran Obat

2.3.1. Definisi

Sistem penghantaran obat atau *drug delivery system* adalah istilah mengenai bagaimana obat dapat mencapai lokasi target aksinya untuk memberi efek terapeutik. Obat-obatan diharapkan mampu menargetkan sel penyebab penyakit dengan konsentrasi yang tepat secara efektif. Akan tetapi, terdapat tantangan karena laju pelepasan obat, stabilitas, dan kemampuan penargetan spesifik sel atau jaringan tidak terkontrol dan tidak dapat diawasi. Sistem penghantaran obat dirancang untuk mengatasi permasalahan tersebut karena memiliki kemampuan untuk mengatur laju pelepasan obat dan meningkatkan efektivitas obat (Sultana *et al.*, 2022).

2.3.2. Nanopartikel

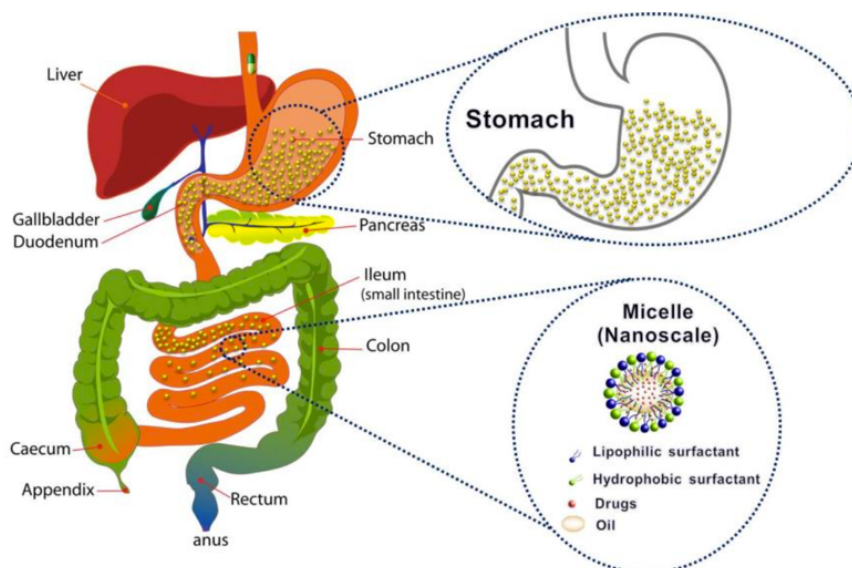
Nanoteknologi adalah karakterisasi desain dan penerapan struktur, perangkat, dan sistem dengan mengontrol bentuk dan ukuran pada skala nanometer (1nm sampai dengan 100nm). Nanoteknologi dikembangkan dalam sistem penghantaran obat, terapi infeksi, kanker, dan gangguan syaraf, bioimaging, serta berbagai bidang biomedis. Perkembangan nanopartikel pada teknologi medis diterapkan untuk menyembuhkan patogen resisten antibiotik. Nanopartikel dikaitkan dengan stratum bakteri dengan menembus membran plasma dan menghancurkan metabolisme seluler sehingga berdampak pada kematian sel bakteri. Nanopartikel juga menghasilkan oksigen reaktif jenis endogen dan eksogen yang menuju kerusakan metabolit bakteri (Sharma *et al.*, 2022).

Nanopartikel berperan penting dalam meningkatkan stabilitas minyak atsiri dari peluang terjadinya degradasi oleh cahaya, panas, dan factor lingkungan lain. Sediaan nanopartikel bertujuan untuk meningkatkan permeasi melewati kulit dan *barrier* biologis lain, memperbaiki bioavailabilitas, dan mencapai penghantaran senyawa aktif secara terkontrol. Sistem nano yang mengandung minyak atsiri dibagi atas dua kategori, yaitu sistem nanostruktur basis lipid dan sistem nanostruktur basis polimer. Sistem nanostruktur basis lipid terbentuk dari komponen lipid, mudah terurai oleh organisme hidup, dan aman pada penggunaan *pharmaceutical*, contohnya yaitu *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS), solid lipid nanopartikel, nanoemulsi, dan liposom. Sedangkan, sistem nanostruktur basis polimer seperti nanogel dan nanokapsul dapat terbentuk dari polimer alami, semisintetik, atau sintetik (de Matos *et al.*, 2018).

2.4. *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS)*

2.4.1. Definisi SNEDDS

Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) merupakan campuran isotropik minyak, surfaktan, ko-surfaktan, dan/atau kosolven. Ketika terjadi kontak antara SNEDDS dengan media cair seperti pada saluran gastrointestinal yang disertai agitasi ringan akan memfasilitasi pembentukan nanoemulsi secara spontan. Ukuran droplet yang dihasilkan berkisar 50nm hingga 300nm. Zat aktif obat yang dilarutkan pada SNEDDS memiliki keunggulan yaitu tingginya kecepatan disolusi karena luas permukaan nanoemulsi yang terbentuk besar (Bernkop-Schnürch, 2013).

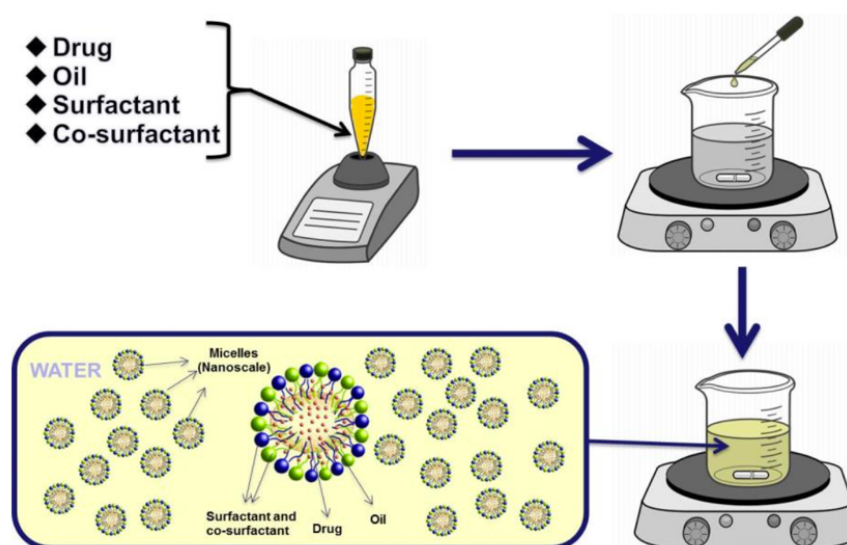


Gambar 6. SNEDDS di dalam saluran pencernaan manusia (Zhao, 2015).

SNEDDS menjadi salah satu perkembangan nanoteknologi dalam sistem penghantaran bagi obat hidrofobik karena dapat meningkatkan bioavailabilitas oral. SNEDDS tidak memerlukan proses pemanasan maupun penguapan pelarut karena dapat merusak struktur komponen molekul minyak atsiri dan menghilangkan kandungan yang volatil (de Matos *et al.*, 2018).

2.4.2. Mekanisme Emulsifikasi SNEDDS

Formula SNEDDS yang mengandung surfaktan dan ko-surfaktan ketika didispersikan dalam air akan membentuk nanoemulsi secara spontan dan menghasilkan globul dengan ukuran $\leq 100\text{nm}$. Ketepatan komposisi surfaktan dan ko-surfaktan dan agitasi ringan membentuk lapisan antar muka yang rapat pada nanoglobul dan memberi ukuran kecil pada globul (Priani *et al.*, 2020).



Gambar 7. Preparasi nanoemulsi dengan metode *self-emulsification* (Zhao, 2015).

Pada penelitian yang dilakukan Mahdi *et al.*, (2020) dengan menguji proses emulsifikasi sediaan SNEDDS dalam tiga macam cairan yang berbeda, yaitu cairan usus buatan dengan pH 7, cairan lambung buatan dengan pH 1,2, dan aquades yang terbebas dari CO₂. Pengujian menunjukkan terbentuknya nanoemulsi secara spontan dalam ketiga cairan berbeda tersebut (Mahdi *et al.*, 2020).

2.4.3. Komponen Penyusun SNEDDS

2.4.3.1. Minyak

Minyak yang digunakan dalam formulasi SNEDDS dipertimbangkan dari trigliserida rantai menengah hingga panjang dan harus memiliki kelarutan yang baik terhadap obat

karena fungsinya dalam memfasilitasi absorpsi obat (Sultana *et al.*, 2022).

Trigliserida rantai panjang menunjukkan transportasi limfatik zat aktif obat yang lebih besar (bertanggung jawab dalam menghindari *first-pass metabolism* obat) dibandingkan dengan dengan tri-, di-, dan mono-gliserida rantai menengah. Sementara itu, mono- dan di-gliserida rantai menengah berpotensi memiliki pelarutan yang lebih besar untuk obat hidrofobik dan meningkatkan permeasi (Devireddy & Jonnalagadda, 2021).

2.4.3.2. Surfaktan

Surfaktan merupakan substansi yang ditambahkan pada formulasi SNEDDS dengan tujuan untuk mengurangi tegangan permukaan sehingga menghasilkan sediaan yang stabil. Surfaktan dikategorikan berdasarkan muatan (ionik dan non-ionik) dan keseimbangan hidrofilik-lipofilik (HLB). Surfaktan dengan muatan non-ionik dan memiliki nilai HLB di atas 12 menjadi pilihan terbaik untuk formulasi SNEDDS karena dapat membuat proses emulsifikasi nano tanpa hambatan (Sultana *et al.*, 2022).

Jenis-jenis Surfaktan

a. Surfaktan anionik

Surfaktan gugus hidrofilik dengan muatan negatif disebut dengan surfaktan anionik. Surfaktan anionik termasuk natrium lauril sulfat, natrium lauret polioksietilen eter sulfat, sabun asam lemak, natrium setil polioksietilen eter fosfat, fosfolipid kedelai (lesitin), karboksil (RCOO⁻), sulfonat (RSO₃⁻) atau sulfat (ROSO₃⁻) kalium laurat, natrium lauril sulfat (Devireddy & Jonnalagadda, 2021).

b. Surfaktan kationik

Surfaktan gugus hidrofilik dengan muatan positif disebut dengan surfaktan kationik. Macam-macam surfaktan kationik yaitu amina primer, sekunder, dan tersier, serta garam ammonium kuarterner dari gugus alkil yang lebih tinggi contohnya oktadesil trimetil ammonium klorida, C12-14 alkildimetilbenzil amonium klorida (Devireddy & Jonnalagadda, 2021).

c. Surfaktan amfolitik / surfaktan zwitterionic

Surfaktan yang terdiri dari kedua muatan, baik muatan positif dan negatif. Contoh surfaktan amfolitik adalah sulfobetaines (Devireddy & Jonnalagadda, 2021).

d. Surfaktan non-ionik

Surfaktan dengan gugus hidrofilik yang tidak memiliki muatan, tetapi mengandung gugus fungsional polar yang kuat seperti hidroksil atau polioksietilen, dan memberikannya kelarutan dalam air ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) disebut sebagai surfaktan non-ionik. Surfaktan non ionik lebih stabil dibandingkan surfaktan ionik, tidak beracun, dan stabil secara termodinamika dengan nilai keseimbangan hidrofilik lipofilik (HLB) yang cukup tinggi untuk menghasilkan SNEDDS yang stabil. Pembentukan SNEDDS dengan rasio surfaktan, ko-surfaktan, dan minyak yang lebih tinggi terhadap campuran lipid molekuler bertanggung jawab untuk peningkatan bioavailabilitas oral obat yang sukar larut dalam air. Contoh surfaktan non-ionik adalah ester sorbian (Spans) dan polisorbat (Tween 20) (Devireddy & Jonnalagadda, 2021).

Konsentrasi surfaktan secara garis besar ditentukan oleh ukuran molekul droplet dalam pembuatan emulsifikasi dan Nano emulsifikasi. Jika konsentrasi surfaktan meningkat,

maka ukuran tetesan meningkat. Hal ini berperan penting untuk stabilisasi droplet minyak dari sistem surfaktan dan meningkatkan kelarutan obat yang sukar larut atau kelarutan rendah dalam air (Devireddy & Jonnalagadda, 2021).

2.4.3.3. Ko-surfaktan

Penambahan ko-surfaktan untuk mencapai homogenitas dan stabilitas sediaan SNEDDS karena surfaktan saja tidak senantiasa dapat memfasilitasi mekanisme nanoemulsifikasi. Perhitungan rasio kosolven dan surfaktan yang dipakai secara tepat dapat menghindari pengendapan obat akibat polaritas kosolven migrasi menuju air (Sultana *et al.*, 2022).

2.4.4. Keunggulan SNEDDS

Keunggulan utama formulasi SNEDDS ialah tingginya pelarutan obat pada fase minyak sehingga molekul obat dipertahankan dalam bentuk larutan untuk jangka waktu lama dan absorpsi obat memungkinkan ke seluruh saluran gastrointestinal ketika obat dilepaskan. Jumlah obat yang cukup pada saluran gastrointestinal dalam jangka waktu yang panjang sehingga menghindari terjadinya pengendapan obat (Akhtar *et al.*, 2020).

Peningkatan kecepatan disolusi dari obat yang dilarutkan pada SNEDDS sangat tinggi karena luas permukaan nanoemulsi yang terbentuk sangat besar. Hal tersebut disebabkan oleh kandungan homogen anhidrat dari minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan. Kombinasi komposisi SNEDDS akan membentuk nano droplet dengan ukuran $\leq 100\text{nm}$ ketika mendapat adukan perlahan pada saluran gastrointestinal atau saat dilakukan pengenceran dengan air. Ketika obat berpartisipasi antara fase lipid dan air di saluran gastrointestinal, dispersi droplet akan membuat luas permukaan droplet meningkat (Akhtar *et al.*, 2020). Pada penelitian terhadap andrographolide yang diformulasikan pada SNEDDS menunjukkan peningkatan 1,2 kali lipat dalam AUC (area di

bawah kurva) dan 1,26 kali lipat peningkatan C_{max} (konsentrasi maksimum) dibandingkan dengan andrographolide biasa. Oleh karena itu, formulasi SNEDDS menjadi sistem penghantaran yang efektif untuk meningkatkan disolusi dan bioavailabilitas obat (Sultana *et al.*, 2022).

Komposisi SNEDDS menunjukkan peningkatan permeasi yang telah ditunjukkan berbagai penelitian secara *in vitro* maupun *in vivo*. Penelitian dengan menggabungkan protein dalam SNEDDS menunjukkan transpor protein model (β -laktam) puluhan kali lipat lebih besar dalam melewati monolayer Madin-Darbin Canine Kidney (MDCK) dibandingkan dalam larutan bebas dengan kandungan surfaktan atau ko-surfaktan yang sama dengan formulasi SNEDDS. Efek *in vivo* dari formulasi SNEDDS menunjukkan peningkatan stabilitas protein terhadap *protease* pada saluran gastrointestinal dalam jangka waktu yang panjang (Bernkop-Schnürch, 2013).

2.4.5. Kelemahan SNEDDS

Urutan pencampuran komposisi SNEDDS mempengaruhi terbentuknya nanoemulsi. Apabila surfaktan dicampurkan dengan air pertama kali sebelum menambahkan fase berminyak, maka hanya terbentuk makroemulsi. Untuk memperoleh nanoemulsi, maka surfaktan dicampur dengan fase berminyak terlebih dahulu. Selain itu, nanoemulsi tidak stabil secara termodinamika, tetapi stabil secara kinetik. Nanoemulsi berada dalam kondisi termodinamika *non-equilibrium*. Namun, destabilisasi kinetika nanoemulsi sangat lambat sehingga dianggap stabil secara kinetik. Hal tersebut dikarenakan ukuran nano yang mencegah flokulasi droplet dan koalesensi (Dokania & Joshi, 2015).

2.4.6. Evaluasi SNEDDS

2.4.6.1. Uji Persen Transmittan (%T)

Digunakan dalam memeriksa kejernihan nanoemulsi dengan melihat kemampuan larutan sampel untuk meneruskan tembakan cahaya spektrofotometri UV. Nilai persen transmittan mengilustrasikan kemampuan surfaktan melakukan proses emulsifikasi. Tingginya angka persen transmittan menunjukkan proses emulsifikasi dari surfaktan yang digunakan semakin baik (Chabib *et al.*, 2017).

Semakin tinggi nilai persen transmittan menunjukkan semakin kecil ukuran partikel yang terbentuk. Sistem disperse atau larutan nanopartikel tidak dapat diamati secara kasat mata sehingga terlihat transparan dan jernih (Abdassah, 2017).

2.4.6.2. Uji Waktu Emulsifikasi

Dilakukan untuk menetapkan kecepatan formula SNEDDS dalam membentuk emulsi (Zhao, 2015). Salah satu parameter penting dari formula SNEDDS adalah kemampuan membentuk emulsi secara spontan saat kontak langsung dengan cairan. Semakin cepat waktu emulsifikasi maka absorpsi obat akan meningkat. Sistem emulsi yang jernih dihasilkan dari waktu emulsifikasi yang singkat (kurang dari 1-2 menit). Sebaliknya, jika waktu emulsifikasi melebihi 2 menit, sistem emulsi yang dihasilkan akan keruh dan tidak direkomendasikan pada formulasi SNEDDS. Kecepatan waktu emulsifikasi dapat terjadi karena ketepatan dalam pemilihan minyak, surfaktan dan ko-surfaktan dalam formula SNEDDS (Tungadi *et al.*, 2021).

2.4.7. Karakterisasi SNEDDS

2.4.7.1. Uji Persen Transmittan (%T)

Nilai persen transmittan mengilustrasikan kemampuan surfaktan melakukan proses emulsifikasi. Tingginya angka persen transmittan menunjukkan proses emulsifikasi dari surfaktan yang digunakan semakin baik (Chabib *et al.*, 2017).

Semakin tinggi nilai persen transmittan menunjukkan semakin kecil ukuran partikel yang terbentuk. Sistem disperse atau larutan nanopartikel tidak dapat diamati secara kasat mata sehingga terlihat transparan dan jernih (Abdassah, 2017).

2.4.7.2. Uji Waktu Emulsifikasi

Uji waktu emulsifikasi dilakukan untuk menetapkan kecepatan formula SNEDDS dalam membentuk emulsi (Zhao, 2015). Salah satu parameter penting dari formula SNEDDS adalah kemampuan membentuk emulsi secara spontan saat kontak langsung dengan cairan. Semakin cepat waktu emulsifikasi maka absorpsi obat akan meningkat. Sistem emulsi yang jernih dihasilkan dari waktu emulsifikasi yang singkat (kurang dari 1-2 menit). Kecepatan waktu emulsifikasi dapat terjadi karena ketepatan dalam pemilihan minyak, surfaktan dan ko-surfaktan dalam formula SNEDDS (Tungadi *et al.*, 2021).

2.4.7.3. Uji Ukuran Partikel

Mengukur ukuran partikel rata-rata dan distribusi ukuran partikel dengan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). Uji ini menunjukkan kinerja *self-emulsifying* yang menentukan tingkat pelepasan obat dan stabilitas sediaan nanoemulsi (Zhao, 2015). Diambil 100 μ L formula SNEDDS, kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL air suling, lalu dianalisis dengan menggunakan alat PSA (Priani *et al.*, 2020).

2.4.7.4. Uji Visualisasi Morfologi

Scanning electron microscopy (SEM) digunakan untuk menyelidiki morfologi permukaan SNEDDS yang disiapkan secara visual. Formula SNEDDS optimum diamati menggunakan SEM untuk mengetahui distribusi partikel nano pada sediaan SNEDDS (Ermawati *et al.*, 2020). Sebagian sampel ditaburkan di atas pelat grafit dan dilapisi dengan emas di bawah vakum selama 20 menit (Mukubwa *et al.*, 2020).

2.4.7.5. Potensial Zeta

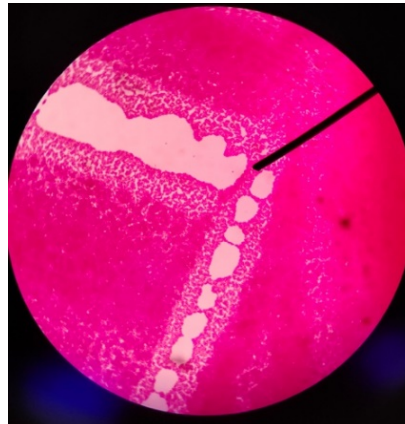
Pada formulasi nanoemulsi diharapkan memperoleh nilai potensial zeta yang tinggi, baik bernilai positif atau negatif karena menunjukkan kestabilan sistem. Nilai potensial zeta yang baik bagi sediaan emulsi adalah lebih dari ± 30 mV. Nilai potensial zeta kurang dari ± 30 mV mengindikasikan bahwa daya tolak-menolak antarpartikel kurang baik sehingga menyebabkan stabilitas nanoemulsi kurang terjaga dengan mencegah terjadinya flokulasi (Hastuti & Sukarno, 2020).

2.4.7.6. Uji Stabilitas

Sebanyak 100 μ L SNEDDS ditambahkan dalam media *artificial gastric fluid* (AGF), *artificial intestinal fluid* (AIF), dan aquades hingga mencapai volume total sebesar 50 ml. Campuran dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* selama 30 detik. Kemudian, media dipanaskan dan dipertahankan pada temperatur $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Campuran diamati setiap jam selama 4 jam untuk mengetahui kestabilannya. Stabilitas ditandai dengan tidak ada sedimen yang terbentuk. Selanjutnya, dilakukan pengamatan stabilitas nanoemulsi pada suhu kamar (25°C) sebagai pembanding (Suryani *et al.*, 2019).

2.5. Bakteri *Staphylococcus aureus*

2.5.1. Deskripsi *Staphylococcus aureus*



Gambar 8. *Staphylococcus aureus*, perbesaran 100x (Dokumentasi Pribadi).

Menurut Brooks *et al.*, (2013) klasifikasi *Staphylococcus aureus* sebagai berikut:

Kingdom	: Monera
Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Micrococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Staphylococcus aureus adalah bakteri komensal Gram-positif dan berdiameter antara 0,5.-1,5 m yang umum ditemukan pada saluran pernapasan sebagai microbiota normal, berkoloni pada bayi yang baru lahir sebesar 40% dan 50% pada orang dewasa tanpa menimbulkan efek yang buruk. Namun, *Staphylococcus aureus* dapat berubah menjadi patogen, dengan kolonisasi reservoir penting untuk infeksi (Pidwill *et al.*, 2021).

Staphylococcus aureus mengalami pertumbuhan tercepat pada temperatur 37°C, tetapi membentuk pigmen pada suhu ruang (20-25°C). *Staphylococcus aureus* membentuk koloni berbentuk bulat,

berwarna abu-abu sampai kuning keemasan (Brooks *et al.*, 2013). Dinding sel *Staphylococcus aureus* terdiri dari beberapa lapisan, terutama 50% terdiri atas lapisan peptidoglikan yang tebal dan kuat. Dinding sel juga tersusun atas membran sitoplasma yang membungkus sitoplasma dan memiliki lapisan lipid yang tipis. Sebanyak 40% dari komposisi dinding sel terdiri dari dua jenis asam teikoat: dinding sel asam teikoat yang terintegrasi dalam dinding sel dan membran sitoplasma asam lipoteikoat yang terintegrasi dalam lapisan lipid. Asam teikoat berperan dalam transportasi material dalam sel bakteri. Protein eksternal terdiri dari sisa sel dinding, bertindak sebagai faktor virulensi dalam patogenesis infeksi (Rasheed & Hussein, 2021).

2.5.2. Patogenesis

Staphylococcus aureus merupakan patogen yang umum ditemukan pada kultur dahak dari pasien yang menderita infeksi saluran pernapasan bawah dengan gejala batuk kronis. Penyakit dengan gejala batuk kronis yang disebabkan oleh infeksi *Staphylococcus aureus* yaitu sebagai berikut (Panggalo *et al.*, 2013).

a. Pneumonia

Gejala klinis dari pneumonia komunitas seperti batuk, demam, gagal napas, dan bahkan gejala keracunan infeksi. *Staphylococcus aureus* adalah patogen yang banyak ditemukan pada sputum pasien pneumonia komunitas (Jinghua *et al.*, 2017).

b. Eksaserbasi akut

Eksaserbasi akut PPOK sering menyebabkan batuk kronis dan peningkatan volume sputum secara signifikan. Eksaserbasi akut merupakan penyebab utama rawat inap dan kematian pasien PPOK. Sebagian besar kasus eksaserbasi akut PPOK (80%) disebabkan oleh infeksi, di mana 40-50% adalah bakteri, termasuk *Staphylococcus aureus* (Zhang *et al.*, 2017).

2.5.3. Pencegahan dan Pengobatan

Ciprofloxacin merupakan antibiotik golongan fluoroquinolone yang dianjurkan untuk infeksi saluran pernapasan bawah yang disebabkan *Staphylococcus aureus*. Dosis orang dewasa dengan indikasi pneumonia dan infeksi saluran pernapasan bawah adalah 500-750 mg dua kali sehari, selama 7-14 hari (MIMS, 2022).

Ciprofloxacin merupakan antibiotik spektrum luas (*broad spectrum*), dan termasuk dalam golongan fluoroquinolone yang paling umum digunakan dengan mekanisme kerja menghambat DNA girase (*topoisomerase II*) dan *topoisomerase IV* yang terdapat dalam bakteri. Penghambatan terhadap enzim yang terlibat dalam replikasi, rekombinasi dan reparasi DNA tersebut mengakibatkan penghambatan terhadap pertumbuhan sel bakteri (Faidiban *et al.*, 2020).

2.6. Aktivitas Antibakteri

Antibakteri didefinisikan sebagai sifat dari suatu bahan berpotensi menghambat atau membunuh bakteri penyebab infeksi. Infeksi terjadi ketika mikroba patogen memasuki jaringan tubuh dan mengalami perkembangbiakan, salah satunya adalah *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan pneumonia, empiema, meningitis, endokarditis atau sepsis dengan supurasi di tiap organ (Brooks *et al.*, 2013).

Penghambatan pertumbuhan bakteri dikategorikan menjadi dua, yaitu bakterisidal dan bakteristatik. Senyawa yang termasuk kategori bakterisidal yaitu jika mampu membunuh bakteri, sedangkan senyawa yang termasuk kategori bakteristatik hanya menghambat atau menekan pertumbuhan bakteri (Magani *et al.*, 2020).

2.6.1. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Difusi

Metode difusi dalam pengujian aktivitas antibakteri dibagi atas metode *kirby bauer* (difusi cakram/kertas saring) dan metode *well diffusion* (sumuran/difusi agar). Dari kedua metode tersebut, metode *kirby bauer* seringkali dipilih oleh peneliti karena lebih praktis, tetapi lebih sulit dalam membaca hasil diameter zona hambat yang terbentuk karena cenderung kecil. Sebaliknya, metode *well diffusion* menghasilkan rerata diameter zona hambat pada bakteri lebih besar dibandingkan metode *kirby bauer* (Sari & Febriawan, 2021).

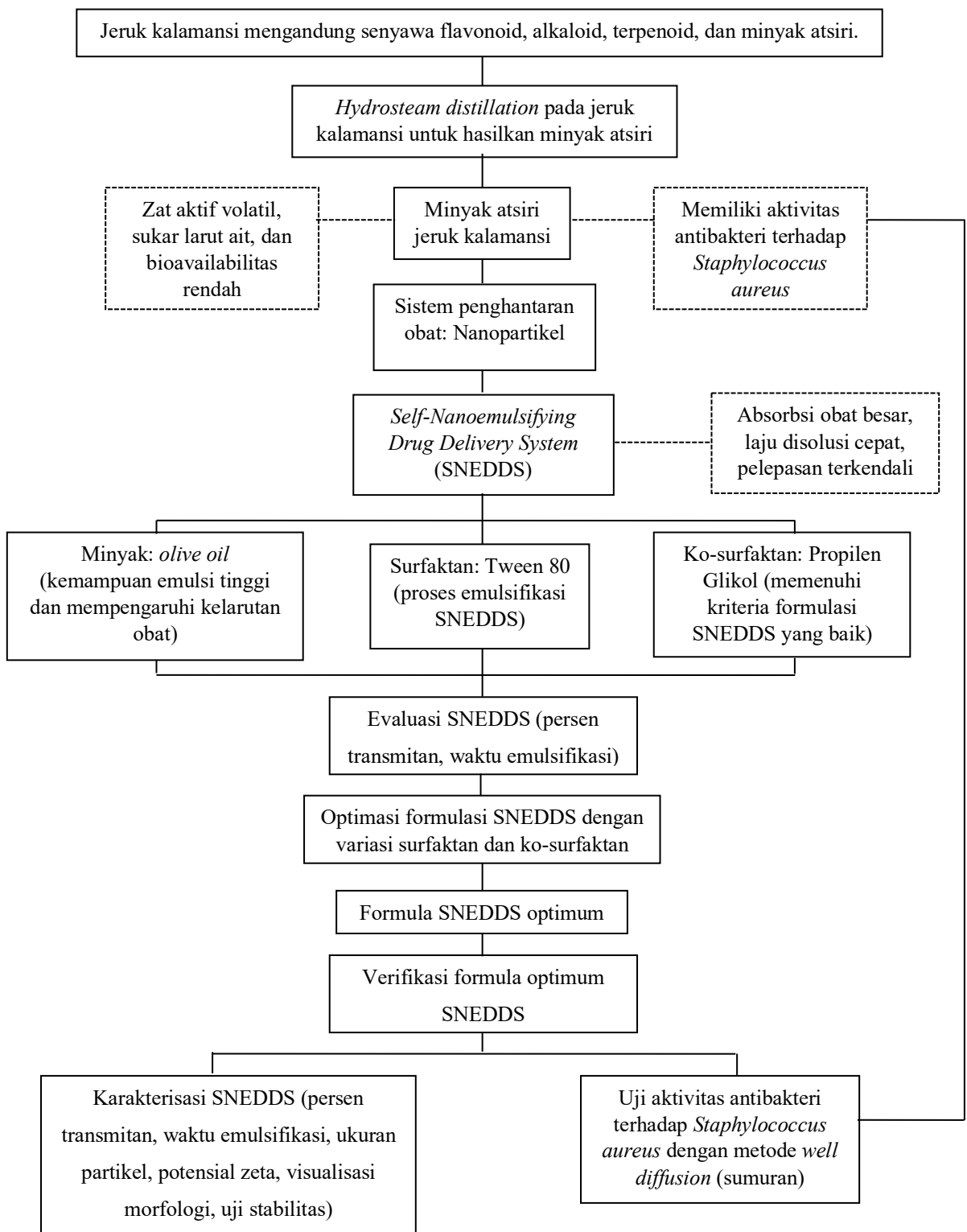
Pada penelitian Haryati *et al* (2017) dengan membandingkan metode *kirby bauer* dan *well diffusion* pada aktivitas antibakteri ekstrak buah alpukat terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak buah alpukat dengan menggunakan metode *kirby bauer* pada konsentrasi 10% menghasilkan diameter zona hambat sebesar 16,6 mm, konsentrasi 20% menghasilkan diameter zona hambat sebesar 21,6 mm, dan konsentrasi 30% menghasilkan diameter zona hambat sebesar 26,8 mm. Sedangkan, aktivitas antibakteri ekstrak buah alpukat menggunakan metode *well diffusion* dengan konsentrasi 10% menghasilkan diameter zona hambat sebesar 25,4 mm, konsentrasi 20% sebesar 27,4 mm, dan konsentrasi 30% sebesar 28,8 mm. Penelitian ini membuktikan metode *well diffusion* menghasilkan rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk lebih besar ketimbang metode *kirby bauer* (Haryati *et al.*, 2017).

b. Dilusi

Metode dilusi memakai prinsip pengenceran antibakteri sehingga diperoleh beberapa konsentrasi obat yang ditambah suspensi bakteri dalam media. Metode dilusi agar cair/*broth dilution test* mengukur Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bakterisidal Minimum (KBM). Metode ini dilakukan dengan

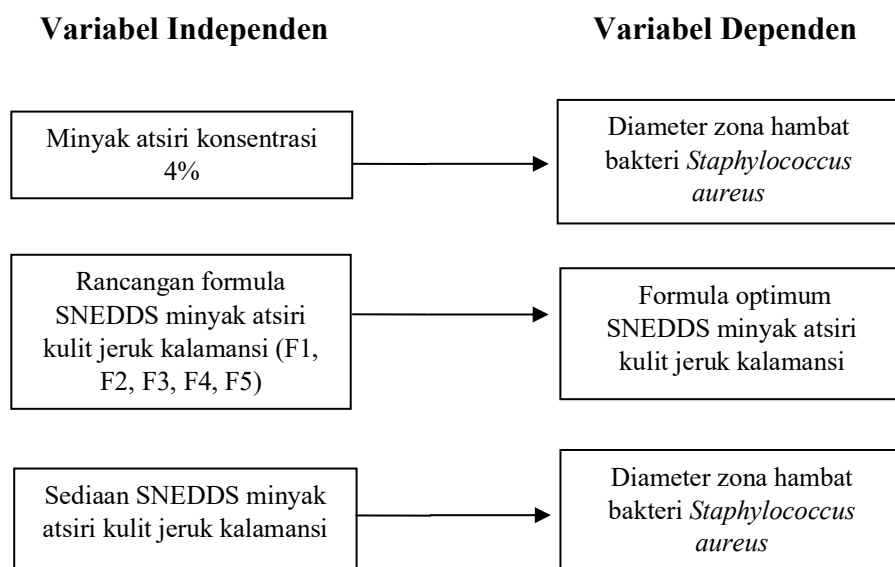
membuat seri pengenceran agen antibakteri pada medium cair yang ditambahkan dengan bakteri uji. Nilai KHM ditunjukkan oleh konsentrasi paling rendah yang menunjukkan penghambatan pertumbuhan bakteri ditandai dengan jernihnya medium uji. Selanjutnya, nilai KBM ditentukan oleh konsentrasi terendah yang memperlihatkan kematian bakteri (Fitriana *et al.*, 2019).

2.7. Kerangka Teori



Gambar 9. Kerangka Teori (Amiliah *et al.*, 2021; Aryani *et al.*, 2020; Bernkop-Schnürch, 2013; Brooks *et al.*, 2013; Chabib *et al.*, 2017).

2.8. Kerangka Konsep



Gambar 10. Kerangka Konsep

2.9. Hipotesis

2.9.1. Hipotesis nol

1. Minyak atsiri jeruk kalamansi tidak dapat diformulasikan sebagai sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) yang baik
2. Hasil karakterisasi sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) tidak sesuai dengan kriteria sediaan SNEDDS yang baik
3. Tidak terdapat aktivitas antibakteri sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

2.9.2. Hipotesis alternatif

1. Minyak atsiri jeruk kalamansi dapat diformulasikan sebagai sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) yang baik

2. Hasil karakterisasi sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) sesuai dengan kriteria sediaan SNEDDS yang baik
3. Terdapat aktivitas antibakteri sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan memformulasikan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) dengan bahan aktif minyak atsiri kulit jeruk kalamansi menggunakan variasi konsentrasi surfaktan. Kemudian, dilakukan karakterisasi *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) yang meliputi % transmitan, ukuran partikel, visualisasi morfologi, waktu emulsifikasi, dan potensial zeta. Setelah itu, dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan metode *well diffusion* (sumuran).

3.2. Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Botani Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, untuk mendeterminasi tanaman jeruk kalamansi. Kemudian, destilasi minyak atsiri kulit jeruk kalamansi dilakukan di Laboratorium *Clinical and Dispensing* (C&D) Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Selanjutnya, formulasi dan evaluasi SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi dilakukan di Laboratorium Farmasetika Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Setelah itu, pengujian aktivitas antibakteri sediaan SNEDDS terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Bandar Lampung. Sesudahnya, karakterisasi sediaan SNEDDS akan dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) Universitas Lampung dan *Integrated Laboratory and Research Centre* Universitas Indonesia (ILRC UI). Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan November 2022 hingga April 2023.

3.3. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) yang didapatkan dari Bandar Jaya Barat, Kecamatan Terbanggi Besar, Kabupaten Lampung Tengah, Provinsi Lampung. Kulit jeruk kalamansi kemudian didestilasi dengan metode *hydrosteamdistillation* sehingga menghasilkan minyak atsiri. Untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat pada minyak atsiri kulit jeruk kalamansi dilakukan *screening* minyak dengan analisis *gas chromatography-mass spectrometry* (GC-MS). Minyak atsiri kulit jeruk kalamansi memiliki aktivitas antibakteri alami terhadap *Staphylococcus aureus*.

Kemudian, dilakukan pembuatan sediaan SNEDDS dengan mencampurkan bahan-bahan, yaitu *olive oil*, Tween 80, dan Propilen Glikol, dengan mempertimbangkan nilai persen transmitan dan waktu emulsifikasi. Formula optimum SNEDDS minyak atsiri jeruk kalamansi akan dikarakterisasi dengan melakukan uji organoleptik, uji ukuran partikel, uji visualisasi morfologi (SEM), uji potensial, uji stabilitas, dan uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

3.3.1. Besar Sampel

Formulasi SNEDDS dilakukan dengan memvariasikan surfaktan (Tween 80) dan ko-surfaktan (Propilen Glikol) menggunakan *software Design Expert Stat-Ease 22.0.3* dengan metode *Simplex Lattice Design* (SLD). Hasil percobaan menggunakan *software* menghasilkan 5 formula. Untuk meminimalisir kemungkinan kesalahan data dalam penelitian, perlakuan pada masing-masing formula dilakukan tiga kali untuk melihat nilai persen transmitan dan waktu emulsifikasi. Setelah memperoleh formula SNEDDS yang optimum, dilakukan karakterisasi termasuk uji antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan pengulangan sebanyak tiga kali (Camelia *et al.*, 2021).

3.3.2. Kelompok Sampel

Kelompok sampel pada penelitian ini terdiri dari lima kelompok perlakuan, yaitu Ciprofloxacin 2% sebagai kontrol positif, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) sebagai kontrol negatif, minyak atsiri kulit jeruk kalamansi sebagai objek pengamatan, formula optimum SNEDDS sebagai objek pengamatan, dan formula optimum SNEDDS tanpa bahan aktif sebagai objek pengamatan.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini antara lain seperangkat alat destilasi uap-air (Pyrex®), corong pisah (Pyrex®), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S®), *Particle Size Analyzer* (Horiba Scientific®), autoklaf (ALP®), pH meter (Elmetron®), *hotplate* (Cimarec®), inkubator (Mettler In55®), *vortex mixer* (Brantead®), *biosafety cabinet* (Biobase®), jangka sorong (Sigmat®), *beaker glass* (Pyrex®), labu ukur (Pyrex®), mikropipet (Socorex®), pembakar spiritus (Pudak®), *vial* (Pyrex®), spatula (Sellaco®), pinset (Renz®), jarum ose (Rofa®), *magnetic stirrer* (Cimarec®), *microtube* (Onemed®), rak dan tabung reaksi (Pyrex®), tabung Erlenmeyer (Pyrex®), cawan petri (Pyrex®), kertas saring (Whatman®), *handsocon* (Sensi®), dan masker (Sensi®).

3.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian kali ini antara lain minyak atsiri kulit jeruk kalamansi, *olive oil* (PT Brataco Chemica), Propilen Glikol (PT Brataco Chemica), Tween 80 (PT Brataco Chemica), Mc Farland 0.5 (PT Brataco Chemica), NaCl (PT Brataco Chemica), Etanol 95% (PT Brataco Chemica), Akuades (PT Brataco Chemica), dan kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* pada media Mueller Hinton Agar (UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Bandar Lampung).

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Etika Penelitian

Etika penelitian ialah perlakuan yang diberikan peneliti terhadap subjek penelitiannya (Irmawartini & Nurhaedah, 2017). Dalam melakukan penelitian disertai etika penelitian berupa proposal *ethical clearance* dari Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk mendapatkan izin etik penelitian menggunakan *Staphylococcus aureus* pada formulasi *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) minyak atsiri kulit jeruk kalamansi.

3.5.2. Determinasi Tanaman

Jeruk kalamansi yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari Bandar Jaya Barat, Kecamatan Terbanggi Besar, Kabupaten Lampung Tengah, Provinsi Lampung. Sebelum dilakukan penelitian, jeruk kalamansi terlebih dahulu dilakukan determinasi. Determinasi tanaman bertujuan untuk memastikan identitas jeruk kalamansi yang digunakan benar dan dapat digunakan dalam penelitian. Selain itu, determinasi dapat memastikan bahwa jeruk kalamansi yang digunakan sesuai dengan klasifikasinya. Dengan demikian, kesalahan dalam pengumpulan bahan yang diuji dapat dihindari (Ayuningtyas *et al.*, 2022).

3.5.3. Destilasi Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi

Sebanyak 700 gram kulit jeruk kering yang sudah dihaluskan menggunakan *blender* dimasukkan ke dalam rangkaian alat destilator yang berisi air sebanyak 1 liter. Uap air ketika pemanasan pada alat destilasi mengikat minyak atsiri sampel yang kemudian mengalir melalui kondensor menuju wadah penampungan. Proses ini berlangsung selama 6-8 jam. Minyak atsiri yang dihasilkan dilakukan pemisahan menggunakan corong pisah agar air terbebas dari destilat. Air pada corong pemisah dikeluarkan melalui keran pada bagian bawah corong pemisah. Setelah itu, minyak atsiri ditimbang untuk dihitung rendemennya (Cahyati *et al.*, 2016).

3.5.4. Uji Pendahuluan Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri

Uji pendahuluan aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui kemampuan minyak atsiri kulit buah jeruk kalamansi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yang bersifat patogen (Kindangen *et al.*, 2015). Konsentrasi yang digunakan dalam uji pendahuluan adalah 1%, 2%, dan 4% dalam DMSO 10% untuk melihat adanya zona bening di sekitar sumur pada media MHA yang telah terdapat bakteri uji (Amiliah *et al.*, 2021).

3.5.5. Formulasi SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi

a. Bahan Aktif

Destilasi minyak atsiri kulit jeruk kalamansi menggunakan metode *hydrosteam distillation* atau destilasi uap air. Minyak atsiri kulit jeruk kalamansi pada konsentrasi 1%, 2% dan 4% pada formulasi sediaan *handsanitizer gel* memiliki kemampuan menghambat aktivitas bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro* menggunakan metode cakram. Konsentrasi 4% menghasilkan diameter zona hambat yang tergolong kuat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Haque *et al.*, 2022).

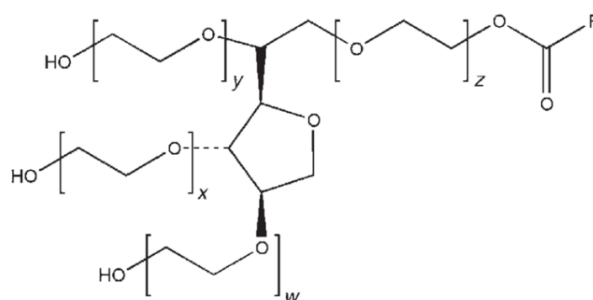
b. Bahan Tambahan (*excipients*)

1. *Olive oil*

Olive oil dipilih sebagai fase minyak dalam formulasi SNEDDS karena mengandung asam oleat, yang memiliki kemampuan emulsi tinggi dan kapasitas pelarutan obat yang luas. Pengembangan *olive oil* menjadi bentuk yang stabil seperti nanoemulsi menjadi sangat potensial jika dikaitkan dengan banyaknya sifat yang dimiliki. Asam oleat umumnya digunakan sebagai agen pengemulsi dan meningkatkan profil kelarutan rendah dalam air. Ini juga dapat digunakan sebagai formulasi SNEDDS oral (Annisa *et al.*, 2020).

2. Tween 80

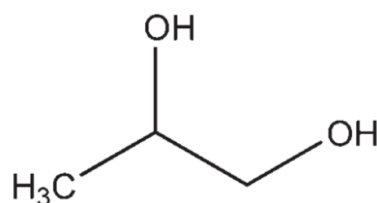
Tween 80 sebagai surfaktan bekerja dengan cara menurunkan tegangan permukaan antara minyak dan air untuk menghasilkan butiran emulsi berukuran kecil. Selain itu, Tween 80 dipilih menjadi surfaktan dalam formulasi SNEDDS karena merupakan surfaktan non-ionik yang bersifat kurang toksik dan memiliki nilai HLB tinggi, yaitu 15 sehingga dapat menghasilkan larutan yang jernih dibandingkan dengan surfaktan dengan nilai HLB rendah. Nilai HLB yang tinggi membuat surfaktan nonionik lebih stabil daripada surfaktan ionik secara termodinamika. Untuk membentuk sediaan SNEDDS yang stabil dan homogen, konsentrasi surfaktan yang digunakan berada pada rentang 78-81% (Camelia *et al.*, 2021; (Ermawati *et al.*, 2020).



Gambar 11. Struktur Tween 80 (Sheskey *et al.*, 2017).

3. Propilen Glikol

Propilen glikol digunakan sebagai ko-surfaktan karena membantu kelarutan dari surfaktan hidrofilik maupun obat dalam basis minyak. Propilen glikol juga aman digunakan sebagai komponen sediaan serta mampu meningkatkan emulsifikasi dari surfaktan (Camelia *et al.*, 2021; Ratnapuri *et al.*, 2022).



Gambar 12. Struktur Propilen Glikol (Sheskey *et al.*, 2017).

c. Rancangan Formula SNEDDS

Formulasi sediaan SNEDDS minyak atsiri jeruk kalamansi dilakukan untuk memperoleh formula sediaan SNEDDS yang optimum dan stabil. Penelitian ini memvariasikan perbandingan jumlah antara surfaktan dan ko-surfaktan dengan jumlah bahan aktif dan fase minyak masing-masing 0,45 mL dengan tujuan mengetahui pengaruh dari surfaktan dan ko-surfaktan. Untuk memperoleh formula optimum SNEDDS digunakan metode desain faktorial pada *software Design Expert Stat-Ease 22.0.3* dengan metode *Simplex Lattice Design (SLD)*. *Software* ini digunakan untuk menganalisis nilai % transmittan (nilai > 80%) dan waktu emulsifikasi (< 1-2 menit) (Camelia *et al.*, 2021).

Percobaan ini menghasilkan lima (5) buah formula dengan volume sediaan yang berbeda. Jenis dan jumlah bahan disajikan pada tabel 1.

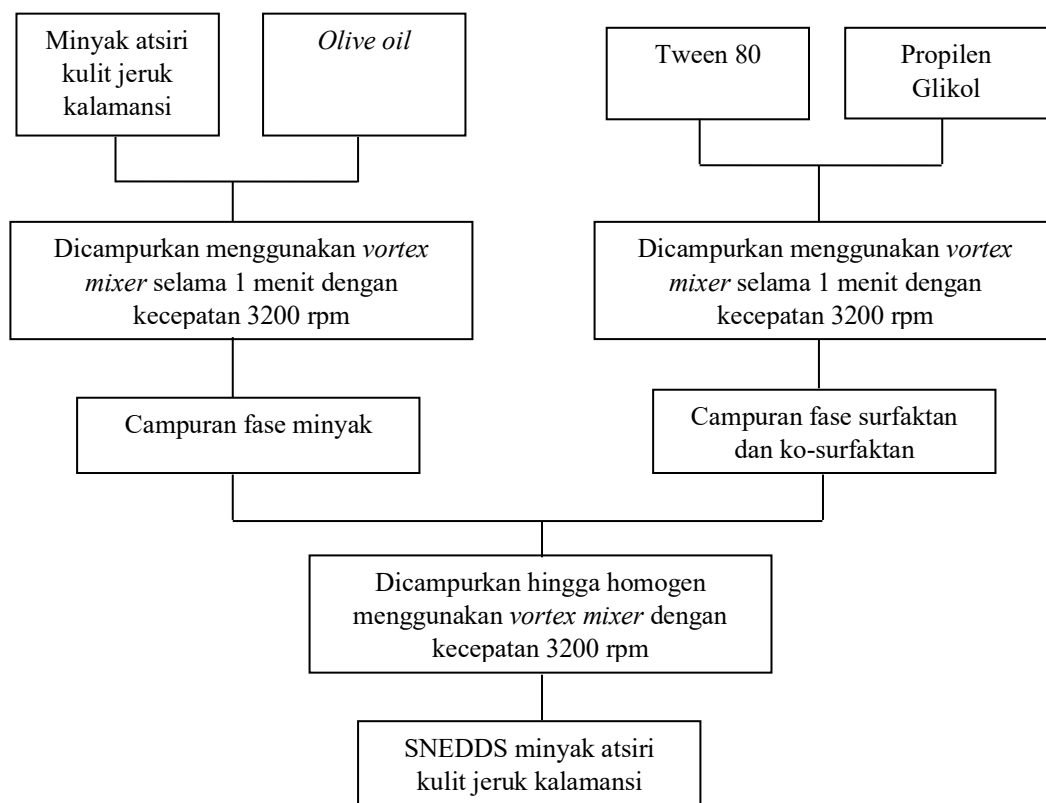
Tabel 1. Formulasi SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi

Nama Bahan	Fungsi Bahan	Formula (F) (mL)				
		F1	F2	F3	F4	F5
Minyak atsiri kulit jeruk kalamansi	Bahan aktif	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<i>Olive oil</i>	Fase minyak	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Tween 80	Surfaktan	3,9	3,875	3,85	3,825	3,8
Propilen glikol	Ko-surfaktan	0,45	0,475	0,5	0,525	0,55

3.5.6. Preparasi SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi

Sediaan SNEDDS dibuat dalam lima formula seperti tertera pada tabel 1. Pembuatan sediaan SNEDDS dilakukan dengan mencampurkan minyak atsiri kulit jeruk kalamansi dengan *olive oil* sebagai fase minyak dalam *vortex mixer* selama 1 menit. Kemudian, dibuat campuran surfaktan dan ko-surfaktan, yaitu Tween 80 dan Propilen Glikol dengan cara yang sama seperti fase minyak. Selanjutnya, campuran antara fase minyak ditambahkan ke dalam campuran surfaktan dan ko-surfaktan selama 1 menit dengan kecepatan 3200 rpm (Camelia *et al.*, 2021).

Skema pembuatan SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Skema Pembuatan SNEDDS

3.5.7. Evaluasi Sediaan SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi

a. Uji Persen Transmitan (%T)

Uji persen transmitan dimulai dengan memipet campuran sebanyak 100 μ l lalu dimasukkan dalam labu ukur 10 ml. Selanjutnya, dilakukan penambahan aquades sampai tanda batas, lalu dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* selama 5 menit. Uji transmitan dilakukan dengan memasukkan kuvet berisi sampel ke dalam alat spektrofotometri UV-Vis yang berada pada panjang gelombang 650 nm. Hasil dari pengujian diharapkan memperoleh nilai transmitan > 80%. Nilai transmitan > 80% dipilih sebagai sistem SNEDDS karena menunjukkan ukuran nanopartikel yang merupakan persyaratan SNEDDS (Ermawati *et al.*, 2020).

b. Waktu Emulsifikasi

Waktu emulsifikasi diujikan dengan memasukkan sebanyak 100 μ l sampel dari setiap formula ke dalam 10 ml aquades di atas *hotplate magnetic stirrer* yang berada pada suhu 37°C dengan kecepatan 100 rpm. Nanoemulsi secara ideal terbentuk pada waktu < 1-2 menit dan dapat diamati secara visual karena ditandai dengan jernihnya sediaan (Camelia *et al.*, 2021).

3.5.8. Optimasi Formula SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi

Formula optimum sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi ditentukan dengan menggunakan *software Design Expert Stat-Ease 22.0.3*. Analisa nilai dari respon persen transmittan (nilai persen transmittan > 80% dan waktu emulsifikasi < 1-2 menit (Camelia *et al.*, 2021).

Optimasi formula SNEDDS dapat dilakukan dengan menentukan *goal criteria* dari respon yang telah diinginkan dengan *range* yang dicapai. Nilai persen transmittan yang diharapkan tinggi sedangkan waktu emulsifikasi yang diharapkan rendah pada sediaan formula optimum. Nilai persen transmittan yang diharapkan > 80%, maka *goal* dari respon persen transmittan yaitu *in range* 80-99%. Selanjutnya, goal dari respon waktu emulsifikasi yaitu *in range* 30-120 detik supaya sediaan SNEDDS dapat cepat teremulsifikasi pada saat kontak dengan cairan gastrointestinal didalam tubuh.

3.5.9. Verifikasi Formula Optimum SNEDDS

Formula optimum yang telah dipilih oleh *software Design Expert Stat-Ease 22.0.3* akan diverifikasi dengan membandingkan secara statistik respon prediktif dari desain faktorial pada *software* dan respon observatif dengan taraf kepercayaan 95%. Evaluasi nilai persen transmittan dan waktu emulsifikasi dilakukan untuk mendapatkan nilai respon observatif. Uji-T (*One Sample T-Test*) digunakan untuk membandingkan secara statistik respon prediktif dari desain faktorial

dan respon observatif dengan taraf kepercayaan 95%. Taraf signifikansi $> 0,05\%$ menunjukkan data memiliki perbedaan bermakna. Sebaliknya, jika taraf signifikasinya $< 0,05\%$ maka data memiliki perbedaan bermakna (Adjeng *et al.*, 2023).

3.5.10. Karakterisasi Sediaan SNEDDS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Kalamansi

a. Uji Persen Transmittan (%T)

Uji persen transmittan dimulai dengan memipet campuran sebanyak 100 μl lalu dimasukkan dalam labu ukur 10 ml. Selanjutnya, dilakukan penambahan aquades sampai tanda batas, lalu dihomogenkan menggunakan vortex mixer selama 5 menit. Uji transmittan dilakukan dengan memasukkan kuvet berisi sampel ke dalam alat spektrofotometri UV-Vis yang berada pada panjang gelombang 650 nm. Hasil dari pengujian diharapkan memperoleh nilai transmittan $> 80\%$ (Ermawati *et al.*, 2020).

b. Waktu Emulsifikasi

Waktu emulsifikasi diujikan dengan memasukkan sebanyak 100 μl sampel dari setiap formula ke dalam 10 ml aquades di atas hotplate magnetic stirrer yang berada pada suhu 37°C dengan kecepatan 100 rpm. Nanoemulsi secara ideal terbentuk pada waktu $< 1-2$ menit dan dapat diamati secara visual karena ditandai dengan jernihnya sediaan (Camelia *et al.*, 2021).

c. Ukuran Partikel

Uji ukuran partikel menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) dengan mengambil sampel sebanyak 100 μl dan dilarutkan dalam 10 ml aquades ke dalam tabung reaksi, lalu dimasukkan ke dalam kuvet. Kuvet dimasukkan ke dalam *holder*, adanya grafik hubungan antara diameter globul (nm) dengan frekuensi (%) kemudian dianalisis dengan instrumen PSA. Ukuran partikel pada sediaan SNEDDS diharapkan < 200 nm (Camelia *et al.*, 2021).

d. Uji Visualisasi Morfologi

Uji visualisasi morfologi menggunakan instrument *Scanning electron microscopy* (SEM) dengan cara sampel ditaburkan di atas pelat grafit dan dilapisi dengan emas di bawah vakum selama 20 menit. Kemudian, morfologi permukaan SNEDDS dilihat melalui monitor. Hasil SEM pada sediaan nanopartikel perbesaran 30.000 kali menunjukkan ukuran partikel yang lebih kecil dan tidak teraglomerasi (Mukubwa *et al.*, 2020).

e. Uji Stabilitas

Sebanyak 100 μ L SNEDDS ditambahkan dalam media *artificial gastric fluid* (AGF), *artificial intestinal fluid* (AIF), dan aquades hingga mencapai volume total sebesar 10 ml. Campuran dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* selama 30 detik. Kemudian, media dipanaskan dan dipertahankan pada temperatur $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Campuran diamati setiap jam selama 4 jam untuk mengetahui kestabilannya. Stabilitas ditandai dengan tidak ada sedimen yang terbentuk. Selanjutnya, dilakukan pengamatan stabilitas nanoemulsi pada suhu kamar (25°C) sebagai pembanding (Suryani *et al.*, 2019). Komposisi AGF dan AIF dapat dilihat pada tabel 2 dan tabel 3.

Tabel 2. Komposisi *Artificial Gastric Fluid* (AGF) (Suryani *et al.*, 2019).

Komposisi <i>Artificial Gastric Fluid</i> (AGF)	
NaCl	1 g
HCl 37%	3,5 ml
Distilled water	Ad 500 ml
pH 1,2	

Tabel 3. Komposisi *Artificial Intestinal Fluid* (AIF) (Suryani *et al.*, 2019)

Komposisi <i>Artificial Intestinal Fluid</i> (AGF)	
0.2 N NaOH	95 ml
KH ₂ PO ₄	4 g
Distilled water	Ad 500 ml
pH 7,5	

f. Potensial Zeta

Nilai potensial zeta (baik bernilai positif atau negatif) menunjukkan kestabilan sistem dari sediaan SNEDDS. Nilai potensial zeta suatu sediaan emulsi yang stabil adalah diantara batas lebih dari +30 mV atau kurang dari -30 mV (Hastuti & Sukarno, 2020).

3.5.11. Uji aktivitas antibakteri

a. Pembuatan Media Kultur Bakteri

- Media Nutrient Agar (NA)

Sebagai media inokulasi bakteri dan media untuk pengujian aktivitas antibakteri metode *well diffusion* atau sumuran. Adapun pembuatan media agar miring yaitu dilarutkan nutrient agar 0,8 gram dalam 40 ml aquades ke dalam Erlenmeyer. Kemudian, nutrient agar dihomogenkan dengan *hotplate magnetic stirrer* sampai mendidih, lalu dituangkan larutan sama banyak pada dua tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil. Selanjutnya, media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didiamkan pada suhu ruangan sampai memadat pada kemiringan 30 (Kindangen *et al.*, 2018).

- Media Mueller Hinton Agar (MHA)

Mueller Hinton Agar (MHA) ditimbang sebanyak 38 gram dan disuspensikan dalam 1000 mL aquades ke dalam Erlenmeyer. Kemudian, dilakukan pemanasan menggunakan *hotplate magnetic stirrer* sampai mendidih. Selanjutnya, larutan dituangkan pada tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil. Media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, setelah itu disimpan di lemari pendingin (Kindangen *et al.*, 2018).

b. Sterilisasi Peralatan

Setiap alat dibersihkan sebelum melakukan uji aktivitas antibakteri, yaitu dengan mencuci cawan petri, tabung reaksi, cawan petri, dan tip serta wadah, kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan

kertas. Setelah itu, semua alat dan media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Tungadi *et al.*, 2021).

c. Peremajaan Biakan Bakteri

Peremajaan biakan bakteri diawali dengan mendekatkan mulut tabung reaksi berisi bakteri pada nyala api pada *biosafety cabinet* (BSC). Kemudian, media yang berisi bakteri ditutup dengan rapat menggunakan kapas dan *plastic wrap*, lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Camelia *et al.*, 2021).

d. Pembuatan Standar Mc Farland 0,5%

Dicampurkan sebanyak 50 µl BaCl₂ 1% ke dalam vial berisi H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 ml, lalu dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* (Camelia *et al.*, 2021).

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Diambil biakan bakteri pada nutrient agar (NA) miring menggunakan ose, lalu disuspensikan dengan cara memasukkan ke dalam tabung yang sudah berisi NaCl 0,9% sebanyak 5 ml, lalu di gojog perlahan hingga menjadi homogen dan diatur kekeruhannya dengan standar mc farland 0,5%. Standar mc farland 0,5% setara dengan 1,5 x 10⁸ sel bakteri/ml (Camelia *et al.*, 2021).

f. Penentuan Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri

Dituang sebanyak 20 ml media Mueller Hinton Agar (MHA) yang telah steril ke dalam 3 cawan petri steril. Kemudian, suspensi bakteri dipipet sebanyak 50 µl dan dicampurkan dalam MHA sebelum mengeras. Selanjutnya, dibuat 5 lubang sumuran menggunakan *white tip* steril. Setelah MHA memadat, *white tip* diambil dan lubang sumuran diisi dengan minyak atsiri kulit jeruk kalamansi konsentrasi 4%, formula optimum SNEDDS dengan minyak atsiri, formula optimum SNEDDS tanpa minyak atsiri, kontrol positif (Ciprofloxacin) dan kontrol negatif (DMSO) yang diambil masing-masing sebanyak 50 µl. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dan diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong (Sigma®) dengan cara

mengukur diameter daerah transparan dikurangi diameter sumuran (Sukohar *et al.*, 2022).

Tabel 4. Hubungan Diameter dan Kategori Zona Hambat (Davis & Stout, 1971).

Diameter	Zona Hambat
< 5 mm	Lemah
6-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
> 21 mm	Sangat Kuat

3.5.12. Alur Penelitian

<i>Flowchart</i>	Deskripsi
<pre> graph TD A[1. Destilasi kulit jeruk kalamansi] --> B[2. Minyak atsiri kulit jeruk kalamansi] B --> C[3. Formula SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi menggunakan olive oil, tween 80, dan propilen glikol] C --> D[4. Preparasi SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi] D --> E[5. Evaluasi formula (% transmitan dan waktu emulsifikasi)] E --> F[6. Optimasi formula SNEDDS dengan variasi surfaktan ko-surfaktan] F --> G[7. Formula SNEDDS optimum] G --> H[8. Verifikasi Formula optimum SNEDDS] H --> I[9. Karakterisasi Formula Optimum (persen transmitan, waktu emulsifikasi, ukuran partikel, potensial zeta, visualisasi morfologi, dan aktivitas antibakteri pada bakteri Staphylococcus aureus)] I --> J[10. Analisis Data] </pre>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kulit jeruk kalamansi yang kering didestilasi menggunakan metode <i>hydrosteamdistillation</i> hingga menghasilkan minyak atsiri. 2. Minyak atsiri kulit jeruk kalamansi yang dihasilkan, dianalisis menggunakan GC-MS. 3. Minyak atsiri kulit jeruk kalamansi dirancang formula SNEDDS menggunakan <i>software Design Expert Stat-Ease 22.0.3</i> dengan metode <i>Simplex Lattice Design (SLD)</i> untuk mendapatkan formula optimal dengan variasi tween 80 sebagai surfaktan dan propilen glikol sebagai ko-surfaktan. 4. Diperoleh Formula SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi. 5. Berbagai variasi formula dilakukan evaluasi uji % transmitan dan waktu emulsifikasi. 6. Hasil evaluasi yang menunjukkan nilai % transmitan mendekati 100% dan waktu emulsifikasi kurang dari 1-2 menit menjadi formula optimum. 7. Sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi selanjutnya dilakukan karakterisasi. Hasil karakterisasi yang diharapkan sesuai dengan parameter berikut: <ul style="list-style-type: none"> – uji organoleptik: jernih dan tidak terjadi pemisahan fase

	<ul style="list-style-type: none"> – ukuran partikel: 10-200nm – SEM: ukuran partikel <200nm dan tidak teraglomerasi – nilai potensial zeta: ± 30 mV – uji stabilitas: tidak ada sedimen yang terbentuk <p>Hasil karakterisasi yang berada dalam rentang batas setiap parameter dapat dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> (Camelia <i>et al</i>, 2021).</p> <p>8. Analisis data dilakukan menggunakan aplikasi IBM SPSS versi 20.</p>
--	---

Gambar 14. Skema Alur Penelitian

3.6. Identifikasi Variabel

3.6.1. Variabel Independen

Variabel independen atau variabel bebas adalah variabel yang memberikan pengaruh atau menyebabkan perubahan pada variabel dependen (Masturoh & Anggita, 2018). Variabel independen pada penelitian ini yaitu minyak atsiri kulit jeruk kalamansi konsentrasi 4%, rancangan formula SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi, dan uji daya hambat *Staphylococcus aureus* pada formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi.

3.6.2. Variabel Dependen

Variabel dependen atau variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat dari variabel bebas (Masturoh & Anggita, 2018). Variabel dependen pada penelitian ini adalah formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi dan diameter zona hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.6.3. Definisi Operasional Variabel

Tabel 5. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Minyak atsiri jeruk kalamansi <i>kon</i> \geq <i>sentrasi</i> 4%	Kandungan senyawa minyak atsiri jeruk kalamansi hasil destilasi uap-air memiliki aktivitas antibakteri (Amiliah <i>et al.</i> , 2021).	Sebanyak 30 kg kulit jeruk kalamansi didestilasi dengan metode destilasi uap-air. Kemudian, minyak atsiri dilakukan uji daya hambat pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> dengan metode sumuran.	Minyak atsiri yang diperoleh sebanyak 23 mL dengan rendemen minyak atsiri sebesar 3,28% serta diameter zona hambat pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> \geq 11 mm.	Numerik
Rancangan formula SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi	Rancangan formula dengan bahan aktif minyak atsiri jeruk kalamansi dan variasi komposisi tween 80 dan propilen glikol (Camelia <i>et al.</i> , 2021).	Evaluasi pada formula menggunakan persen transmitan dan waktu emulsifikasi.	Hasil evaluasi lima formula (F1-F5) memiliki nilai <i>desirability</i> mendekati satu atau satu sehingga memperoleh formula optimum.	Numerik
Formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi	Formula optimum sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi dengan <i>olive oil</i> , tween 80, dan propilen glikol (Camelia <i>et al.</i> , 2021)	Karakterisasi formula dengan melakukan pengujian organoleptik, ukuran partikel, visualisasi morfologi (SEM), dan potensial zeta, serta uji aktivitas antibakteri menggunakan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .	Formula yang dihasilkan memiliki nilai persen transmitan $>$ 80%, waktu emulsifikasi $<$ 2 menit, berwarna jernih transparan, ukuran partikel $<$ 200 nm, hasil SEM perbesaran 100 kali menunjukkan ukuran partikel kecil dan tidak teraglomerasi, nilai potensial zeta \pm 30 mV, dan daya hambat terhadap bakteri \geq 11 mm.	Numerik

Diameter Zona hambat	Zona hambat berupa zona bening di sekeliling kertas cakram pada media agar padat biakan bakteri. Zona hambat menginterpretasikan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri (Seko <i>et al.</i> , 2021).	Metode <i>well diffusion</i> (sumuran) menggunakan ciprofloxacin (K+), DMSO (K-), minyak atsiri kulit jeruk kalamansi, sediaan SNEDDS minyak kulit atsiri jeruk kalamansi, dan sediaan SNEDDS tanpa zat aktif.	– Zona hambat lemah = < 5mm – Zona hambat sedang = 6-10 mm – Zona hambat kuat = 11-20 mm – Zona hambat sangat kuat = > 21 (Camelia <i>et al.</i> , 2021).	Ordinal
-------------------------	--	--	--	---------

3.7. Analisis Data

Penentuan formula optimum SNEDDS menggunakan *software Design Expert Stat-Ease 22.0.3* dengan metode *Simplex Lattice Design* (SLD) untuk memvariasikan surfaktan dan ko-surfaktan pada formula SNEDDS dengan melihat pengaruh nilai persen transmittan dan waktu emulsifikasi. Formula optimum dilakukan uji karakterisasi aktivitas antibakteri pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Data yang sudah diperoleh akan dianalisis menggunakan uji *Saphiro-wilk test* untuk menguji normalitas data. Distribusi data normal jika $p > 0,05$ dan jika $p < 0,05$ distribusi data tidak normal. Apabila data terdistribusi normal maka digunakan uji statistik *One Way Anova* dan dilanjutkan uji homogenitas dengan *Levene test*. Apabila data terdistribusi tidak normal maka digunakan uji alternatif *Kruskal-Wallis*. Analisis ini digunakan untuk menganalisis variabel independen dan dependen, yaitu untuk mengetahui efektivitas pemberian sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hipotesis akan dianggap bermakna bila hasil $p < \alpha$ (0,05), dan dianggap tidak bermakna apabila $p > \alpha$ (0,05). Analisis data ini dilakukan menggunakan aplikasi IBM SPSS versi 20 (Chandra *et al.*, 2022; Oktoba *et al.*, 2018).

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

1. Minyak atsiri kulit jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) dapat diformulasikan sebagai sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug delivery System* (SNEDDS) dengan menggunakan *olive oil* sebagai fase minyak dan variasi tween 80 sebagai surfaktan dan propilen glikol sebagai kosurfaktan. Selanjutnya, formula optimum dianalisis statistika secara numerikal menggunakan *Software Design Expert Stat-Ease 22.0.3* sehingga menghasilkan nilai *desirability* formula optimum sebesar satu (1,000).
2. Hasil karakterisasi formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) sesuai dengan kriteria sediaan SNEDDS yang baik, yaitu memiliki nilai persen transmisi sebesar 80,29% dengan blanko sebesar 89,31%, waktu emulsifikasi dalam media aquades, AGF, dan AIF masing-masing sebesar 110 detik, 105 detik, dan 103 detik. Adapun ukuran partikel, indeks polidispersitas, dan nilai potensial zeta yang dihasilkan masing-masing memiliki rata-rata sebesar 174,3 nm, 0,56, dan -25,13 mV. Karakterisasi morfologi menggunakan *scanning electron microscopy* (SEM) menunjukkan ukuran nanopartikel pada perbesaran 30.000x dengan permukaan yang halus, dan tidak terjadi penggumpalan atau agregasi, dan stabil secara fisik saat pengujian stabilitas sediaan sehingga memenuhi persyaratan sediaan SNEDDS yang baik.
3. Aktivitas antibakteri dari formula optimum SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* tergolong kuat dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 12,10 mm.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai variasi minyak, surfaktan, dan kosurfaktan lain pada formula SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) sehingga mendapatkan formula optimal.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penetapan kadar, uji bioavailabilitas, dan uji disolusi sediaan SNEDDS minyak atsiri kulit jeruk kalamansi (*Citrus x microcarpa* Bunge) terstandar.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdassah, M. (2017). Nanopartikel Dengan Gelasi Ionik. *Farmaka*, 15(1), 45–52.
- Adiandasari, J., Wusnah, & Azhari. (2021). Pengaruh Suhu dan Waktu terhadap Proses Penyulingan Minyak Sereh Wangi (*Cymbopogon nardus* L.). *Chemical Engineering Journal Storage*, 1(1), 22–28.
- Adjeng, A. N. T., Murrukmihadi, M., Hertiani, T., & Nugroho, A. K. (2023). Optimization Of Sorbitol, Glycerine, And Xanthan Gum Combination in Mucolitic Syrup Of Hibiscus rosa-sinensis Leaves Extract Using Mixture Design (D-Optimal). *Rasayan Journal of Chemistry*, 16(1), 509–518.
- Akhtar, N., Mohammed, S. A. A., Khan, R. A., Yusuf, M., Singh, V., Mohammed, H. A., Al-Omar, M. S., Abdellatif, A. A. H., Naz, M., & Khadri, H. (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* (Vol. 58). Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101808>
- Alqamari, M., Tarigan, D. M., & Alridiwirah. (2017). *Budidaya Tanaman Obat & Rempah* (M. O. Mulya, Ed.; 1st ed.). Umsu Press. <http://umsupress.com>
- 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.
- Annisa, R., Hendradi, E., & Melani, D. (2016). Pengembangan Sistem Nanostructured Lipid Carriers (NLC) Meloxicam Dengan Lipid Monostearin Dan Miglyol 808 Menggunakan Metode Emulsifikasi. *Journal Of Tropical*

Pharmacy And Chemistry, 3(3), 156–169.
<https://doi.org/10.25026/jtpc.v3i3.102>

Annisa, R., Yuwono, M., & Hendradi, E. (2020). Effect of vegetable oil on self-nanoemulsifying drug delivery system of dayak onion [*eleutherine palmifolia* (L.) merr.] extract using hydrophilic-lipophilic balance approach: Formulation, characterization. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 10(2), 210–216. <https://doi.org/10.25258/ijddt.10.2.4>

Aryani, F., Noorcahyati, & Arbainsyah. (2020). *Cara Poduksi dan Pengujian Kualitas Minyak Atsiri*. <https://pdfslide.net/documents/pemungutan-minyak-atsiri.html>

Ayuningtyas, N. D., S, A. P. P., & Aryani, S. M. (2022). Optimization Of Formula SNEDDS Mahogany Seed Oil (*Swietenia mahagoni* (Linn.)) with Simplex Lattice Design Method. *Jurnal Ilmiah Kesehatan*, 15(1), 2580–135.

Bernkop-Schnürch, A. (2013). Reprint of: Nanocarrier systems for oral drug delivery: Do we really need them? In *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 50, Issue 1, pp. 2–7). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.06.011>

Brooks, Geo. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2013). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology 26th Edition*. McGraw-Hill Publishing.

Buya, A. B., Beloqui, A., Memvanga, P. B., & Pr eat, V. (2020). Self-nanoemulsifying drug-delivery systems: From the development to the current applications and challenges in oral drug delivery. In *Pharmaceutics* (Vol. 12, Issue 12, pp. 1–52). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121194>

Cahyati, S., Kurniasih, Y., & Khery, Y. (2016). Efisiensi Isolasi Minyak Atsiri Dari Kulit Jeruk Dengan Metode Destilasi Air-Uap Ditinjau Dari Perbandingan Bahan Baku Dan Pelarut Yang Digunakan. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Kimia "Hydrogen,"* 4(2).

- Camelia, F. D., Nurahmanto, D., & Wisudiyarningsih, B. (2021). Optimasi Tween dan Propilen Glikol dalam Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System VCO-Minyak Daun Kemangi. *E-Journal Pustaka Kesehatan*, 9(3).
- Chabib, L., Adhi Pradana, D., & Aqliyah, N. H. (2017). Karakterisasi Formulasi Snedds Nano Kurkumin Sebagai Anti Arthritis Rematoid. *Prosiding Seminar Nasional Seri 7. Menuju Masyarakat Madani Dan Lestari*.
- Chen, M.-H., Yang, K.-M., Huang, T.-C., & Wu, M.-L. (2017). Traditional Small-Size *Citrus* from Taiwan: Essential Oils, Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity. *Medicines*, 4(2), 28. <https://doi.org/10.3390/medicines4020028>
- Choironi, N. A., Pudyastuti, B., Gumelar, G., Fareza, M. S., Wijaya, T. H., & Setyono, J. (2022). Optimasi Formula Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Etil-p-metoksisinamat (EPMS). *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 18(2), 205. <https://doi.org/10.20961/alchemy.18.2.56847.205-213>
- Damayanti, H., Wikarsa, S., & Jafar, G. (2019). Formulasi Nanoemulgel Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana* L.). *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, 1(3), 166–176.
- Dao, T. P., Nguyen, M. Van, Tran, Q. N., Truong Le, D., Nhi Tran, T. Y., & Lam, T. Van. (2022). Experimental and Kinetic Modeling Studies on Extraction. *Chem. Eng. Research Article*, 41(11), 2022.
- Davis, W. W., & Stout, T. R. (1971). Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. In *Applied Microbiology*.
- de Matos, S. P., Lucca, L. G., & Koester, L. S. (2018). Essential oils in nanostructured systems: Challenges in preparation and analytical methods. In *Talanta* (Vol. 195, pp. 204–214). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.029>
- Devireddy, S. K., & Jonnalagadda, L. P. (2021). A Literature Review on Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS). *International Journal of*

Pharmaceutical Sciences Review and Research, 70(1).
<https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2021.v70i01.011>

Dewi, K. H., Mujiharjo, S., Pebrian, A., Jurusan, U., Pertanian, T., Pertanian, F., Bengkulu, U., & Supratman, J. W. R. (2016). "Zero Waste" The Potential Of Processing Byproduct Of Syrup Kalamansi Toward " Zero Waste." In *Jurnal Agroindustri* (Vol. 8, Issue 1).

Dokania, S., & Joshi, A. K. (2015). Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS)-challenges and road ahead. In *Drug Delivery* (Vol. 22, Issue 6, pp. 675–690). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.3109/10717544.2014.896058>

Dupuis, V., Cerbu, C., Witkowski, L., Potarniche, A. V., Timar, M. C., Żychska, M., & Sabliov, C. M. (2022). Nanodelivery of essential oils as efficient tools against antimicrobial resistance: a review of the type and physical-chemical properties of the delivery systems and applications. In *Drug Delivery* (Vol. 29, Issue 1, pp. 1007–1024). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2056663>

Endarini, L. H. (2016). *Farmakognisi dan Fitokimia* (1st ed.). Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan.

Ermawati, D. E., Wulandari, W., & Yugatama, A. (2020). Optimization Of Olive Oil, Tween 80, And Propylene Glycol Of Selfnanoemulsifying Drug Delivery System Of Zinc Oxide By D-Optimal Method. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Community*, 17(2), 92–101.
<https://doi.org/10.24071/jpsc.001649>

Fadlilah, M. (2015). Benefit Of Red Betel (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav.) As Antibiotics. *J Majority*, 4(3), 71–75.

Fitriana, Y. A. N., Fatimah, V. A. N., & Fitri, A. S. (2019). Aktivitas Anti Bakteri Daun Sirih: Uji Ekstrak KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bakterisidal Minimum). *SAINTEKS*, 16(2).

- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>
- Haque, A. F., 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).
- Haryati, S. D., Darmawati, S., & Wilson, W. (2017). Perbandingan Efek Ekstrak Buah Alpukat (*Persea americana* Mill) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Dengan Metode Disk Dan Sumuran. *Prosiding Seminar Nasional Publikasi Hasil-Hasil Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat*.
- Hastuti, E. D., & Sukarno. (2020). Formulasi Sediaan Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (Snedds) Ekstrak Etil Asetat Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) Serta Uji Stabilitas Fisik. *Cendekia Journal of Pharmacy*, 4(2). <http://cjp.jurnal.stikescendekiautamakudus.ac.id>
- Husni, E., Yeni, F., & Dachriyanus. (2021). Chemical Contents Profile of Essential Oil from Calamansi (*Citrus microcarpa* Bunge) Peels and Leaves and Its Antibacterial Activities. *Advances in Health Sciences Research*, 40, 314–322.
- Indratmoko, S., . S., & Issusilaningtyas, E. (2021). Formulasi, Karakterisasi Dan Evaluasi Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Ekstrak Etanol Kulit Buah Nanas Sebagai Antibakteri *Streptococcus Mutans*. *Fitofarmaka: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 11(1), 12–22. <https://doi.org/10.33751/jf.v11i1.2560>
- Irmawartini, & Nurhaedah. (2017). *Metodologi Penelitian* (1st ed.). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Jinghua, M., Gaizhuang, L., & Qiaoli, C. (2017). Pathogens and antibiotic resistance of children with community-acquired pneumonia. *Biomedical Research*, 28(20), 8839–8843. www.biomedres.info

- Kasim, V. N. A., & Yusuf, Z. K. (2020). *Tumbuhan Obat Berbasis Penyakit* (1st ed.). C.V Athra Samudra.
- Ke, Z., Hou, X., & Jia, X. (2016). Design and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery systems for improved bioavailability of cyclovirobuxine D. *Drug Design, Development and Therapy*, *10*, 2049–2060. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S106356>
- Kementerian Kesehatan RI. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia* (2nd ed.). Kementerian Kesehatan RI.
- Khan, A. W., Kotta, S., Ansari, S. H., Sharma, R. K., & 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, G. D., Lolo, W. A., & Yamlean, P. V. Y. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Kulit Buah Jeruk Kalamansi (*Citrus microcarpa* Bunge.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli*. In *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT* (Vol. 7, Issue 4).
- Kiromah, N. Z. W. (2014). Aktivitas Antibakteri Kombinasi Minyak Atsiri Kemangi (*Ocimum basilicum*) dengan Kloramfenikol atau Gentamisin Terhadap *Salmonella typhi*. *Biomedika*, *5*(2).
- Magani, A. K., Tallei, T. E., & Kolondam, B. J. (2020). Uji Antibakteri Nanopartikel Kitosan terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. (Antibacterial Test of Chitosan Nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*). *Jurnal Bios Logos*, *10*(1).
- Mahdi, L., Sudibyo, R. S., & Martien, R. (2020). Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) of Curcuma mangga Val. Essential Oil and The Stability Study. In *RESEARCH ARTICLE Indonesian Journal of Pharmacy Indonesian J Pharm* (Vol. 31, Issue 4).

- Masturoh, I., & Anggita, N. (2018). *Metodologi-Penelitian-Kesehatan_SC* (1st ed.). Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- MIMS. (2022). *Ciprofloxacin*. <https://www.mims.com>.
- Mukubwa, G. K., Nkanga, C. I., Buya, A. B., Mbinze, J. K., Krause, R. W. M., & Memvanga, P. 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. <http://jppres.com/jppres><http://jppres.com/>
- Novitasari, A., Purwandari, E. P., & Coastera, F. (2018). Identifikasi Citra Daun Tanaman Jeruk Dengan Local Binary Pattern Dan Moment Invariant. In *Jurnal Informatika dan Komputer (JIKO)* (Vol. 3, Issue 2).
- Nurhayati, L. S., Yahdiyani, N., & Hidayatulloh, A. (2020). Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt dengan Metode Difusi Sumuran dan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 1(2), 41. <https://doi.org/10.24198/jthp.v1i2.27537>
- Oktoba, Z., Moektiwardoyo, M., & Mustarichie, R. (2018). In Vivo Hair Growth Stimulating Activity of Ethanol Extract and Its Fractions from Rampai Lampung (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Leaves. *International Research Journal Of Pharmacy*, 9(9), 87–92. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.099193>
- Pakki, E., Sumarheni, Aisyah, Ismail, & Safirahidzni, S. (2016). Formulasi Nanopartikel Ekstrak Bawang Dayak (*Eleutherine americana* (Aubl) Merr) Dengan Variasi Konsentrasi Kitosan-Tripolifosfat (TPP). *J. Trop. Pharm. Chem.*, 3(4), 251–263.
- Palma, C. E., Cruz, P. S., Cruz, D. T. C., Bugayong, A. M. S., & Castillo, A. L. (2019). Chemical composition and cytotoxicity of Philippine calamansi essential oil. *Industrial Crops and Products*, 128, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.010>

- Pidwill, G. R., Gibson, J. F., Cole, J., Renshaw, S. A., & Foster, S. J. (2021). The Role of Macrophages in *Staphylococcus aureus* Infection. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.620339>
- Priani, S. E., Somantri, S. Y., & Aryani, R. (2020). Formulasi dan Karakterisasi SNEDDS (Self Nanoemulsifying Drug Delivery System) Mengandung Minyak Jintan Hitam dan Minyak Zaitun. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 7(1), 31. <https://doi.org/10.25077/jsfk.7.1.31-38.2020>
- Puspawati, N. L. P. F., Widiari, I. M., & Sukadana. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kimia* 14 (1). <https://doi.org/10.24843/JCHEM.2020.v14.i01.p10>
- Quyen, N. T. C., Ngan, T. T. K., Dao, T. P., Anh, P. N. Q., Anh, N. Q., Thi, N. T. N., Ngoc, T. T. Le, Nhan, L. T. H., Truc, T. T., & Phuong, L. T. B. (2019). Essential Oil Hydrodistillation Process from Vietnamese Calamondin (*Citrus microcarpa*) Peels and GC/MS Analysis of Essential Oils Components. *Asian Journal of Chemistry*, 31(11), 2585–2588. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.22148>
- Rasheed, N. A., & Hussein, N. R. (2021). *Staphylococcus aureus*: An Overview of Discovery, Characteristics, Epidemiology, Virulence Factors and Antimicrobial Sensitivity. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 08(03).
- Ratnapuri, P. H., Fitriana, M., R, A. A., Sa'adah, N., Dewi, T. R., Helsawati, & Rosanti, D. A. (2022). Formulasi dan Evaluasi Nanoemulsi dari Ekstrak Herba Kelakai dengan Kombinasi Tween 80 dan Propilenglikol. *Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah*, 7(2), 262–268.
- Sharma, P., Navneet, & Kaushal, A. (2022). Green nanoparticle formation toward wound healing, and its application in drug delivery approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 100088. <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100088>

- Sheskey, P. J., Cook, W. G., & Cable Collin G. (2017). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (8th ed.). Pharmaceutical Press.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Yadav, M. P. (2021). Insights into the chemical composition and bioactivities of *Citrus* peel essential oils. In *Food Research International* (Vol. 143). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110231>
- Sipahutar, Y. H., Suryanto, M. R., Ramli, H. K., Pratama, R. B., & Panjaitan, T. F. C. (2020). Organoleptic quality of whiteleg shrimp (*litopenaeus vannamei*) cultivated from intensive and traditional pond at Bulukumba District, South Sulawesi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 564(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/564/1/012040>
- Sukohar, A., Armadany, F. I., Bakede, N. A. F., Malaka, M. H., Ramdini, D. A., & Adjeng, A. N. T. (2022). Antimicrobial Activity of *Syzygium aromaticum* L. Leaves Essential Oil against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Research J. Pharm. and Tech*, 15(12). www.rjptonline.org
- Sultana, A., Zare, M., Thomas, V., Kumar, T. S. S., & Ramakrishna, S. (2022). Nano-based drug delivery systems: Conventional drug delivery routes, recent developments and future prospects. In *Medicine in Drug Discovery* (Vol. 15). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100134>
- Suryani, Zubaydah, W. O. S., Sahumena, M. H., Adawia, S., Wahyuni, R., Adjeng, A. N. T., Nisa, M., Kasmawati, H., Ihsan, S., Ruslin, & Aswan, M. (2019). Preparation and characterization of self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) from *Moringa oleifera* L. and *Cassia alata* L. leaves extracts. *AIP Conference Proceedings*, 2199. <https://doi.org/10.1063/1.5141325>
- Tungadi, R., Thomas, N. A., & Gobel, W. G. van. (2021). Formulasi, Karakterisasi, Dan Evaluasi Drops Liquid Self Nano-Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Astaxanthin. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, 1(3), 168–178. <https://doi.org/10.37311/ijpe.v1i3.11400>
- Winarti, L., Suwaldi, Martien, R., & Hakim, L. (2016). Formulation of self-nanoemulsifying drug delivery system of Bovine serum albumin using HLB

(Hydrophilic-Lypophilic Balance) approach. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 27(3), 117–127.
<https://doi.org/10.14499/indonesianjpharm27iss3pp117>

Wulandari, E., Alverina, A. C., & Martien, R. (2016). Snedds (Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System) Formulation Of β -Carotene In Olive Oil (*Olea europaea*). *International Journal of Advanced Research*, 4(11), 1031–1043. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/2179>

Zhang, H. L., Tan, M., Qiu, A. M., Tao, Z., & Wang, C. H. (2017). Antibiotics for treatment of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: A network meta-analysis. *BMC Pulmonary Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12890-017-0541-0>

Zhao, T. (2015). *Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for the oral delivery of lipophilic drugs* [Thesis]. University of Trento.