

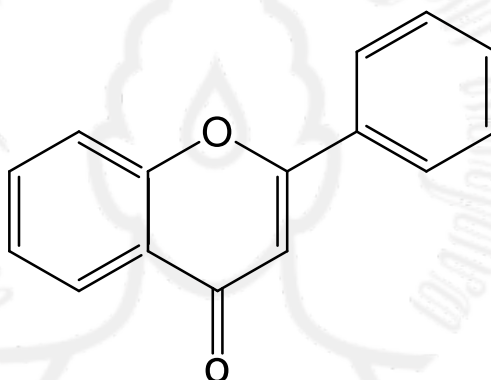
BAB II

LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

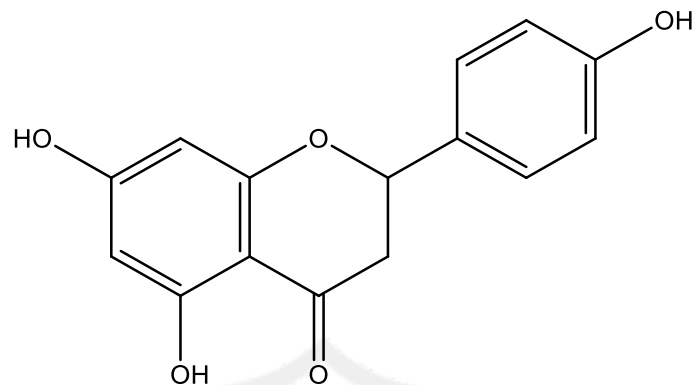
1. Naringenin

Flavonoid adalah kelompok fitokimia yang memiliki inti benzopiron dengan struktur dasar C₆-C₃-C₆ (Gambar 1), dan lebih dari 4.000 flavonoid yang berbeda telah dideskripsikan dan dikategorikan ke dalam flavonol, flavon, flavanon, isoflavon, katekin, dan antosianidin. Flavonoid memiliki aktivitas farmakologi yang berbeda, seperti aktivitas antioksidan, anti alergi, antibakteri, antiinflamasi, antimutagenik, dan antikanker (Patel *et al.*, 2018).



Gambar 1. Struktur kimia flavonoid (Chemdraw, 2014)

Naringenin adalah salah satu flavonoid alami penting yang ditemukan di beberapa buah yang seperti pada jeruk, tomat, dan sayuran. Naringenin secara kimia disebut dengan 2,3-dihidro-5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiron-4-1 (C₁₅H₁₂O₅) (Gambar 2), dengan berat molekul 272,26 g/mol (Salehi *et al.*, 2019). Naringenin merupakan aglikon dari naringin (*naringenin-7-rhamnoglucoside*) naringenin juga dapat ditemukan sebagai narirutin (*naringenin-7-O-rutinoside*) atau naringenin-glucoside (*naringenin-7-O-glucoside*), tergantung pada substitusi gula (Yen *et al.*, 2009). Naringenin menempati posisi sentral sebagai C₁₅ antara dalam jalur biosintesis flavonoid (Bido *et al.*, 2010).



Gambar 2. Struktur kimia naringenin (Chemdraw, 2014)

Naringenin mempunyai sifat yang sangat lipofilik sehingga mudah diserap melalui epitel usus dengan difusi pasif ke dalam enterosit, namun memiliki kelarutan yang rendah dalam air (9,80 µg/mL dalam suhu kamar) dan nilai bioavailabilitas sekitar 15% secara oral yang diabsorpsi melalui difusi pasif (Khan *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2011; Semalty *et al.*, 2014). Naringenin memiliki nilai log P sebesar 2,42 yang menunjukkan nilai lipofilisitas dengan nilai pKa sebesar 8,84 dan 7,05, serta bersifat padat dengan titik leleh 208-215°C (Joshi *et al.*, 2018). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Chabane *et al* (2009), permeabilitas naringenin melalui sel Caco-2 adalah sebagian besar penyerapan dilakukan secara difusi pasif dan tidak dipengaruhi oleh pH tubuh.

Naringenin merupakan substrat poliglikoprotein (p-gp), efflux protein (MRP-2), dan transporter MRP 1 dengan penyerapan secara difusi pasif dan transport aktif (Orrego-Lagarón *et al.*, 2015). Penyerapan naringenin menggunakan metode perfusi pada tikus menyatakan bahwa penyerapan naringenin sebesar 68% melalui usus besar, 47% melalui duodenum, 42% melalui ileum, dan 39% melalui jejunum (Xu *et al.*, 2009). Parameter farmakokinetik setelah pemberian 135 mg naringenin secara oral menunjukkan nilai C_{max} sebesar 2009,51 µg/mL, T_{max} sebesar 3,67 jam, AUC sebesar 9424,52 µg.jam/mL, waktu paruh 2,31 jam, dan bioavailabilitas sebesar 5,81% (Kanaze *et al.*, 2007).

Aktivitas utama dari naringenin adalah sebagai antioksidan yang berperan dalam menghambat sitokin yang menyebabkan inflamasi seperti TNF- α , IFN- γ , dan IL-6, serta berperan sebagai imunomodulator (Zeng *et al.*, 2018). Sifat-sifat dalam

naringenin berkaitan dengan gugus hidroksil. Adanya gugus 3-hidroksil menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan dengan hesperidin (Baranowska & Bajkacz, 2018). Naringenin memiliki efek biologis yang luas pada kesehatan manusia diantaranya penurunan *biomarker* peroksidasi lipid dan karbonilasi protein, meningkatkan metabolisme karbohidrat, meningkatkan aktivitas antioksidan, memodulasi aktivitas sistem kekebalan tubuh, dan juga memberikan efek anti-aterogenik dan anti-inflamasi (Wang *et al.*, 2015). Naringenin juga dilaporkan memiliki kemampuan untuk memodulasi metabolisme asam lemak yang mendukung oksidasi asam lemak dalam mengganggu akumulasi lipid di hati sehingga dapat mencegah penumpukan lemak di hati (Zobeiri *et al.*, 2018). Metabolit naringenin memiliki efek sebagai antivirus, antikanker, antiproliferatif, antikarsinogenik, dan kemampuannya untuk memperbaiki DNA (Tong *et al.*, 2012). Efek antivirus telah dilaporkan bahwa naringenin menunjukkan efek penghambatan tergantung dosis terhadap virus dengue, mencegah replikasi intraseluler virus chikungunya, dan menghambat perakitan & replikasi virus hepatitis C menular dengan cara yang bergantung pada dosis (Frabasile *et al.*, 2017; Hassandarvish *et al.*, 2016).

Naringenin memiliki kelemahan yaitu bioavailabilitas yang sangat rendah akibat dari sistem hidrofobiknya yang membatasi kelarutan dan permeabilitasnya. Keterbatasan naringenin menyebabkan beberapa upaya untuk peningkatan bioavailabilitas (Kumar & Abraham, 2016). Peningkatan permeabilitas dan bioavailabilitas naringenin telah dikembangkan melalui banyak sistem penghantaran obat diantaranya melalui sistem nanoemulsi yang stabil dalam penyimpanan (Bhia *et al.*, 2021). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Khan *et al* (2015) menunjukkan bahwa terjadi peningkatan profil konsentrasi plasma naringenin dalam sistem nanoemulsi, hal tersebut menunjukkan adanya peningkatan penyerapan dan bioavailabilitas naringenin dalam sistem nanoemulsi.

Sistem penghantaran secara *self-nanoemulsifying drug delivery system* (SNEDDS) dapat meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas sebesar sebelas kali dengan ukuran droplet sebesar 52 nm (Ahmed & Badr-Eldin, 2018). SNEDDS secara oral dapat meningkatkan inhibisi enzim sitokrom P450 dalam metabolisme,

mengurangi efflux p-gp, dan mengubah fase hepatic menjadi fase limfatik sehingga dapat mengurangi *first pass metabolisme* sehingga berpotensi meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas naringenin (Cherniakov *et al.*, 2015). Pemberian naringenin secara oral sangat buruk karena kelarutan yang rendah sehingga mudah dihidrolisis di saluran gastrointestinal, namun dalam formulasi naringenin melalui sistem SNEDDS naringenin dapat terlarut dengan baik sehingga menghasilkan nilai T_{max} yang rendah dengan nilai AUC dua kali lebih tinggi dibandingkan pemberian naringenin secara oral. Hal tersebut menunjukkan bahwa sistem SNEDDS mampu meningkatkan kelarutan, permeabilitas, dan bioavailabilitas dari naringenin (Khan *et al.*, 2015).

2. Nanoemulsi

Nanoemulsi merupakan salah satu sistem penghantaran obat berbasis *nano-sized* yang memiliki ukuran 20-500 nm (Sharma *et al.*, 2010). Nanoemulsi adalah sistem partikel koloid berukuran submikron sebagai dispersi isotropik yang stabil secara termodinamik dan kinetik yang tersusun dari air dan minyak yang distabilkan oleh tegangan antarmuka yang dihasilkan dari surfaktan dan kosurfaktan untuk membentuk suatu fase (Gurpreet & Singh, 2018). Sifat surfaktan akan menentukan fase kontinu (fase eksternal) dari emulsi, bila surfaktan larut dalam minyak maka fase kontinyunya adalah minyak, dan bila surfaktan larut dalam air maka fase kontinyunya adalah air (Mustan *et al.*, 2021). Nanoemulsi memiliki banyak keuntungan sebagai sistem penghantaran obat diantaranya memiliki biaya yang rendah, viskositas rendah dengan aliran newtonian, stabilitas penyimpanan dan termodinamika yang tinggi, meningkatkan kelarutan obat yang bersifat lipofilik dan hidrofilik sehingga meningkatkan bioavailabilitas, dan memiliki ukuran tetesan yang kecil (Alkilani *et al.*, 2018). Senyawa bioaktif pangan yang telah berhasil dienkapsulasi dalam formulasi nanoemulsi adalah flavonoid (flavanol, flavon, flavanon, dan isoflavon), nonflavonoid (asam hidroksibenzoat, stilben, dan kurkuminoid), dan karotenoid (karoten dan xantofil) (Donsi, 2018).

Proses pembuatan nanoemulsi dapat dilakukan dengan dua metode diantaranya *high energy* dan *low energy*. Metode *high energy* meliputi *high*

pressure homogenization (HPH), *microfluidization*, dan ultrasonikasi sedangkan metode *low energy* meliputi metode *inversion emulsification* dan metode *self-nanoemulsification*. Metode *low energy* lebih disukai daripada metode *high energy* karena metode ini membutuhkan lebih sedikit energi, sehingga lebih efisien dan tidak memerlukan instrumen canggih (Kumar *et al.*, 2019).

a. *High energy*

Metode *high energy* memanfaatkan perangkat mekanis yang menghasilkan kekuatan yang mampu membentuk tetesan minyak yang sangat halus (Jasmina *et al.*, 2017). Metode ini dapat digunakan untuk mengontrol ukuran partikel yang lebih besar dengan pilihan komposisi formulasi selain itu juga mengontrol stabilitas, sifat aliran, dan warna emulsi (Graves *et al.*, 2005).

1) *High pressure homogenizer* (HPH)

HPH merupakan salah satu metode pembentukan nanoemulsi yang menggunakan beberapa kekuatan seperti hidrolis, geser, turbulensi intens, dan kavitasi. Mekanisme HPH adalah melewati campuran minyak dan surfaktan melalui lubang kecil homogeniser pada tekanan 500-5000 psi untuk menghasilkan nanoemulsi (Jasmina *et al.*, 2017). Campuran dipaksa untuk melewati lubang pada tekanan yang sangat tinggi mulai dari 500 hingga 5000 psi. Produk yang dihasilkan selanjutnya mengalami turbulensi intens dan geser hidrolis yang menghasilkan emulsi dengan partikel yang kecil. Ukuran partikel yang lebih kecil dapat diperoleh dengan siklus homogenisasi yang lebih banyak (Gurpreet & Singh, 2018). Ukuran partikel nanoemulsi yang dihasilkan oleh HPH umumnya lebih seragam dan tergantung pada komposisi, jenis sampel, homogenizer, dan kondisi homogenizer seperti intensitas energi, waktu, dan suhu (Qian & McClements, 2011).

2) *Microfluidization*

Metode ini menggunakan alat *microfluidizer* yang memanfaatkan pompa bertekanan tinggi (500-20.000 psi) yang mendorong produk keluar melalui *interaction chamber* yang menghasilkan pembentukan partikel sub-partikel yang kecil. Campuran disirkulasikan berulang kali melalui mikrofluida sampai ukuran partikel yang diinginkan tercapai. Produk yang

dihasilkan juga dilewatkan melalui *high shear zone* untuk menyeragamkan tetesan nanoemulsi (Goh *et al.*, 2015). Metode *microfluidization* menghasilkan distribusi ukuran partikel nanoemulsi yang lebih kecil dibandingkan HPH, selain itu juga dihasilkan nanoemulsi yang stabil pada konsentrasi surfaktan yang rendah (Wooster *et al.*, 2008).

3) Ultrasonifikasi

Metode ultrasonifikasi menggunakan gelombang ultrasonik yang memberikan getaran ultrasonik hingga 20.000 kHz untuk memecah makroemulsi menjadi nanoemulsi. Ultrasonik akan memecah *droplet* besar menjadi *droplet* kecil yang berukuran nano dengan suatu siklus (Gurpreet & Singh, 2018). Ukuran tetesan fase terdispersi dapat dicapai dengan mengoptimalkan desain *ultrasonic reaction chambers*, kondisi operasi, dan formulasi produk seperti konsentrasi surfaktan dan jenis fase minyak (Leong *et al.*, 2009).

b. *Low energy*

Metode ini menggunakan sifat fisik internal dari sistem seperti suhu atau komposisi bahan pada formula untuk menghasilkan nanoemulsi (Jasmina *et al.*, 2017). Metode emulsifikasi *low energy* lebih hemat energi karena memanfaatkan energi kimia sistem internal dan hanya memerlukan pengadukan ringan untuk produksi nanoemulsi (Solans & Solé, 2012).

1) *Inversion emulsification*

Metode *Inversion emulsification* atau kondensasi, didasarkan pada fase transisi selama proses emulsifikasi. Fase transisi merupakan hasil dari perubahan spontan surfaktan yang dicapai pada komposisi konstan, dengan mengubah surfaktan nonionik dengan suhu tertentu dan dengan memvariasikan komposisi sistem (Ishak & Annuar, 2016).

2) *Self-nanoemulsification*

Metode ini didasarkan pada pembentukan surfaktan bersama pelarut yang berdifusi dari fase terdispersi ke fase kontinu, yang menciptakan tetesan emulsi berukuran nano. Metode *self-emulsification* juga disebut sebagai metode emulsifikasi spontan (Solans & Solé, 2012). Metode *self-*

emulsification didasarkan pada fenomena pembentukan nanoemulsi secara spontan dengan komponen minyak, surfaktan, ko-surfaktan (Agrawal *et al.*, 2015).

3. *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS)

SNEDDS merupakan campuran isotropik minyak (sintetis atau alami), surfaktan (cair atau padat), dan ko-surfaktan yang memiliki kemampuan unik untuk membentuk emulsi minyak dalam air (o/w) yang diikuti dengan pengenceran (Khan *et al.*, 2015). Proses nanoemulsi pada SNEDDS terjadi secara spontan tanpa bantuan energi. SNEDDS merupakan sistem penghantaran senyawa obat yang sesuai untuk obat dengan kelarutan buruk dan bersifat lipofilik yang menghasilkan emulsifikasi dengan absorpsi yang lebih cepat (Krstić *et al.*, 2018).

Sistem penghantaran SNEDDS memiliki potensi besar untuk meningkatkan absorpsi dan bioavailabilitas obat yang sukar larut dalam air dalam keadaan dispersi koloid (Cerpnjak *et al.*, 2013). SNEDDS mampu meningkatkan kelarutan dan disolusi obat dengan mekanisme pembentukan fase tersolubilisasi dengan meningkatkan inhibisi enzim sitokrom P450 dalam metabolisme, mengurangi efflux p-gp, dan mengubah fase hepatik menjadi limfatik yang dapat menghindari *first pass metabolism* sehingga berpotensi meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas obat (Cherniakov *et al.*, 2015).

SNEDDS dapat menghasilkan tetesan nanoemulsi berukuran 20-200 nm di bawah gastrointestinal. Ukuran globul kecil SNEDDS menyediakan luas permukaan antarmuka yang besar, yang meningkatkan penyerapan obat dan bioavailabilitas dengan meningkatkan pelepasan obat dan permeasi membran serta mengurangi metabolisme prasistemik (Dou *et al.*, 2018). Keunggulan SNEDDS dibandingkan pembawa lipid lainnya adalah tidak membutuhkan peralatan yang banyak, stabil secara fisik & kimia, mudah untuk diproduksi dalam skala besar, terhindar dari flokulasi, creaming, sedimentasi, dan koalesen, serta dapat mengontrol pelepasan obat (Kassem *et al.*, 2016). Komponen utama penyusun SNEDDS adalah minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan. Minyak berfungsi sebagai pelarut dan pembawa untuk obat dengan kelarutan rendah atau hidrofobik, serta

minyak berfungsi sebagai inti dari droplet nanoemulsi. Surfaktan berfungsi sebagai emulgator air dan minyak dengan menurunkan energi antarmuka dan ko-surfaktan yang membantu tugas surfaktan yang berperan sebagai emulgator, atau meningkatkan stabilitas surfaktan dalam menyetabilkan sistem dispersi (Lestari *et al.*, 2021).

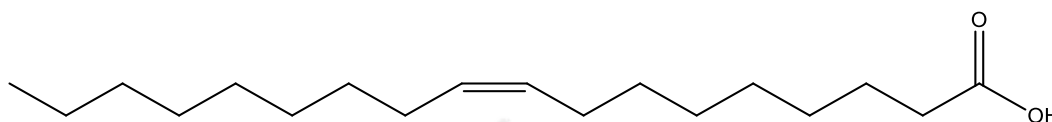
a. Minyak

Minyak adalah eksipien yang berpengaruh terhadap proses dispersi obat yang bersifat lipofilik. Minyak juga dapat meningkatkan penghantaran obat lipid melalui sistem limfatik dan mampu meningkatkan waktu yang dibutuhkan untuk pengosongan lambung (Patel *et al.*, 2012). Komponen minyak biasanya mengandung hidrokarbon jenuh/tidak jenuh atau ester asam lemak tidak jenuh dalam bentuk cair, semipadat atau padat pada suhu kamar. Minyak sintesis lebih dipilih dibandingkan minyak alami karena komponen minyak alami lebih kompleks sehingga tidak dapat diprediksi (Enin, 2015). Minyak merupakan komponen utama dalam pembentukan suatu sistem emulsi, minyak dapat membantu untuk memfasilitasi emulsifikasi dengan surfaktan dan ko-surfaktan untuk meningkatkan kelarutan obat dalam inti minyak dari tetesan (Pathak *et al.*, 2018).

Struktur molekul minyak akan mempengaruhi kemampuan emulsifikasinya. Trigliserida dalam minyak terdiri dari rantai panjang (lebih dari 12 atom C), rantai sedang (6-12 atom C), dan rantai pendek (kurang dari 5 atom C). Trigliserida rantai sedang dan panjang sering digunakan pada formulasi SNEDDS. Trigliserida rantai sedang mampu melepaskan obat lebih cepat dibandingkan rantai panjang (Krstić *et al.*, 2018). Beberapa penelitian melaporkan bahwa penggunaan trigliserida rantai panjang dapat mengubah transportasi hepatic menjadi limfatik sehingga tidak melewati *vena porta hepatica* dan menghindari *first pass metabolism* (Joshi *et al.*, 2018).

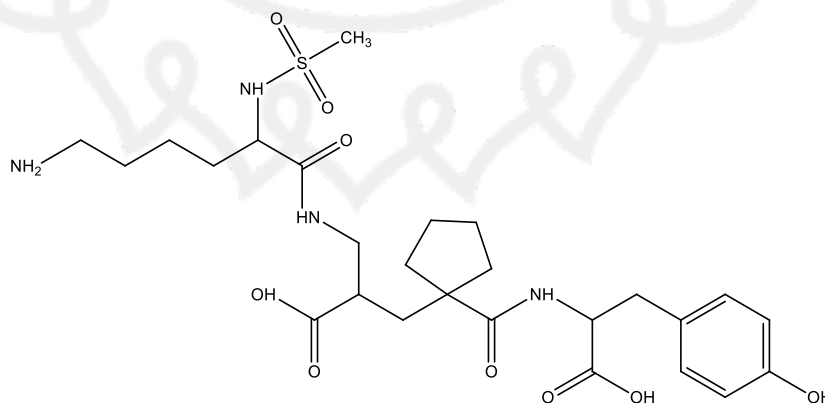
Pemilihan jenis minyak dalam SNEDDS bergantung pada sifat fisikokimia dan kelarutan obat, viskositas, tegangan antarmuka, kepadatan, dan polaritas (Li *et al.*, 2019). Minyak nabati biasanya digunakan dalam SNEDDS karena mudah diuraikan oleh mikroorganisme sehingga ramah lingkungan.

Minyak nabati yang biasanya digunakan adalah *corn oil*, *olive oil*, *virgin coconut oil*, dan *soya bean* (Patel *et al.*, 2014). Minyak sering yang digunakan adalah asam oleat, Labrasol, dan Labrafac Lipophile WL 1349.



Gambar 3. Struktur molekul asam oleat (Depkes RI, 2020)

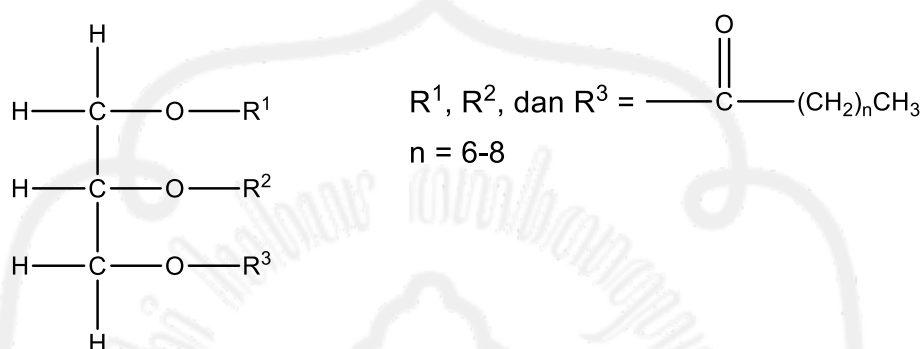
Asam oleat ($C_{18}H_{34}O_2$, BM= 282,47 g/mol) (Gambar 3) biasanya digunakan sebagai agen pengemulsi dalam sediaan topikal untuk meningkatkan obat yang sukar larut dalam air. Asam oleat merupakan cairan berwarna kekuningan hingga coklat yang terdiri dari asam-9-octadecenoid dengan asam jenuh dan asam tak jenuh. Asam oleat tidak dapat digunakan bersama dengan logam berat, kalsium, dan aluminium, asam perklorat, yodium larutan, dan zat pengoksidasi karena dapat menyebabkan interaksi. Asam oleat bereaksi dengan basa untuk membentuk sabun (Depkes RI, 2020; Sheskey *et al.*, 2017). Labrasol (caprylocaproyl macrogolgliserida, caprylocaproyl polyxygliserida, PEG-8 caprylic) (Gambar 4) merupakan jenis minyak yang terdiri dari PEG dan gliserida dengan nilai *hydrophylic lipophylic balance* (HLB 12) (Safwat *et al.*, 2017).



Gambar 4. Struktur molekul Labrasol (Safwat *et al.*, 2017)

Labrafac Lipophile WL 1349 (Medium-chain triglycerides) (Gambar 5) merupakan cairan berbentuk minyak yang tersusun atas trigliserida rantai

menengah yang memiliki sifat penetrasi dan permeasi di kulit serta stabil terhadap oksidasi. Labrafac Lipophile WL 1349 merupakan cairan minyak yang tidak berwarna hingga agak kekuningan yang tidak berbau dan berasa serta dapat membeku dalam suhu 0°C. Labrafac Lipophile WL 1349 tidak boleh bersentuhan dengan wadah atau kemasan polystyrene karena menyebabkan plastik menjadi rapuh saat kontak (Sheskey *et al.*, 2017).



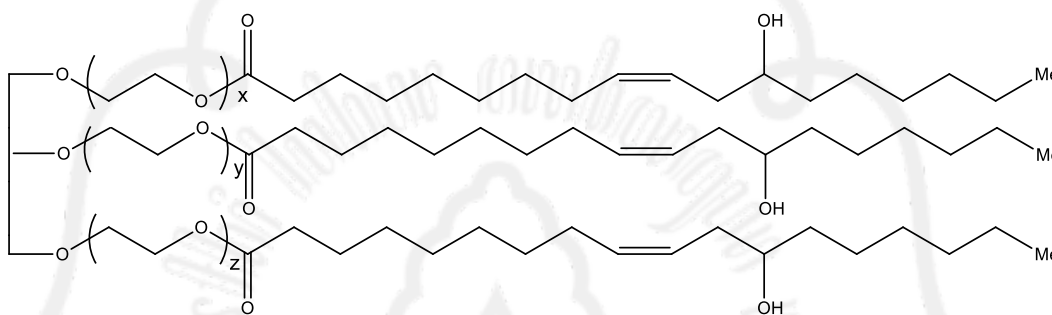
Gambar 5. Struktur molekul Labrafac Lipophile WL 1349 (Sheskey *et al.*, 2017)

b. Surfaktan

Surfaktan merupakan komponen penting dalam formulasi SNEDDS yang digunakan sebagai penstabil nanoemulsi ketika kontak dengan medium air yang ditandai dengan tidak adanya pemisahan fase dan pengendapan (Bandivadekar *et al.*, 2013). Surfaktan merupakan eksipien amfifilik yang membantu melarutkan obat lipofilik. Surfaktan memiliki peran penting diantaranya mencegah pengendapan dengan memperluas keberadaan obat di gastrointestinal, memperlambat pengosongan lambung, memperpanjang waktu obat untuk diserap (Krstić *et al.*, 2018). Penggunaan surfaktan dalam sistem nanoemulsi berfungsi untuk menurunkan tegangan antarmuka dengan membentuk lapisan film antarmuka yang berperan penting untuk menstabilkan tetesan yang baru terbentuk dan memastikan stabilitas jangka panjang dengan mekanisme energi bebas (Singh *et al.*, 2017).

Surfaktan yang biasanya digunakan dalam formulasi SNEDDS adalah surfaktan nonionik karena bersifat aman, tidak toksik, dan tidak mengiritasi. Nilai HLB surfaktan dalam pembuatan SNEDDS adalah lebih dari 10 agar

terbentuk sistem nanoemulsi minyak dalam air (o/w) secara spontan (Nazari-Vanani *et al.*, 2017). Konsentrasi surfaktan dalam SNEDDS tidak boleh terlalu banyak karena dapat membentuk *miscelar* dan menyebabkan iritasi lambung serta menurunkan sensitifitas permeabilitas di usus. Surfaktan nonionik adalah surfaktan yang tidak bermuatan gugus hidrofilnya. Surfaktan nonionik yang sering digunakan adalah Tween 80, Kolliphor EL, lesitin, Span 80, dan Labrafil M 1944 CS (Dickhout *et al.*, 2018).



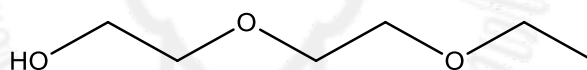
Gambar 6. Struktur molekul Kolliphor EL (Sheskey *et al.*, 2017)

Kolliphor EL ($C_{5}H_{12}O_4$, BM = 136,15 g/mol) (Gambar 6) adalah surfaktan nonionik dengan rantai C panjang, bersifat lipofil, dengan HLB 13,5 yang dibuat dengan mereaksikan minyak jarak dan etilen oksida dengan perbandingan molar 1:35. Kolliphor EL merupakan cairan berminyak kuning pucat yang jernih pada suhu di atas $26^{\circ}C$ dengan bau yang samar tapi khas yang dapat larut dalam air dan dalam banyak pelarut organik, seperti karbon tetraklorida, xilena, isopropil alkohol, kloroform, toluene, etil asetat, etil alkohol, n-propil alkohol, dan trikloroetilena. Kolliphor EL akan mengalami perubahan warna dan pengendapan ketika digunakan bersama dengan iodida, merkuri, zat fenolik, salisilat, sulfonamida, dan tanin (Sheskey *et al.*, 2017).

Labrafil M CS 1944 (Gambar 7) merupakan jenis surfaktan nonionik yang dapat terdispersi dalam air untuk melarutkan dan meningkatkan bioavailabilitas oral dari obat yang tidak larut dalam air. Labrafil M CS 1944 terdiri dari campuran monoester, diester, dan trister gliserol serta monoester dan diester polietilen glikol yang diperoleh melalui proses alkoholisis parsial dari

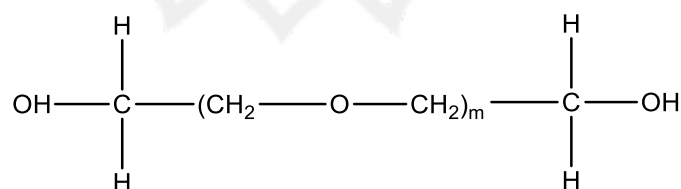
agar membentuk sistem SNEDDS yang lebih cepat. Penambahan ko-surfaktan juga dapat meningkatkan proses emulsifikasi dan mengatur ukuran *droplet* (Kamble *et al.*, 2016). Ko-surfaktan yang biasanya digunakan dalam formulasi SNEDDS adalah jenis alkana-poliol atau alkohol rantai pendek dan medium karena dapat membentuk nanoemulsi secara spontan dan menurunkan tegangan antarmuka (Badran *et al.*, 2014)

Ko-surfaktan yang sering digunakan adalah Transcutol CG dan *polyethylene glycol* 400 (PEG 400). Transcutol CG ($C_6H_{14}O_3$) dengan nama kimia *diethylene glycol monoethyl ether* (Gambar 8) merupakan jenis ko-surfaktan yang dapat digunakan untuk melarutkan senyawa lipofilik dan hidrofilik yang memiliki nilai HLB 4,2. Transcutol CG merupakan senyawa hidrofilik yang memiliki kelarutan yang sama seperti kulit sehingga dapat meningkatkan permeasi obat di kulit. Transcutol CG merupakan cairan yang memiliki bau ringan, bersifat hidroskopis, dan larut dalam air (Haque & Talukder, 2018).



Gambar 8. Struktur molekul Transcutol CG (Haque & Talukder, 2018)

PEG 400 (BM = 380-420 g/mol) (Gambar 9) merupakan cairan bening, kental, dan tidak berwarna yang dapat larut dalam air, alkohol, aseton, glikol, gliserin, dan hidrokarbon alifatik & alkoholik yang memiliki nilai HLB 11,6 (Depkes RI, 2020; Sheskey *et al.*, 2017).



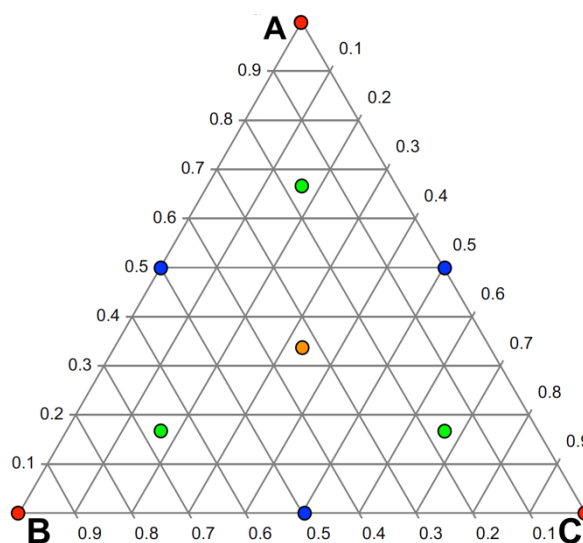
Gambar 9. Struktur molekul PEG 400 (Depkes RI, 2020)

4. Mixture Design

Design of experiment (DoE) dalam pengembangan obat berbasis pada *quality by design* (QbD) menawarkan berbagai keuntungan antara lain digunakan untuk menentukan formula/kondisi proses yang optimum, menilai pengaruh dan interaksi antar variabel, dan menurunkan jumlah percobaan tanpa mengurangi esensi informasi pengaruh antar variabel dan interaksinya. *Mixture design* merupakan salah satu contoh DoE yang digunakan untuk menentukan pengaruh, interaksi dan formula optimum dalam suatu campuran. Suatu formula merupakan campuran yang terdiri dari beberapa komponen. Setiap perubahan fraksi salah satu komponen campuran dapat merubah sedikitnya satu atau lebih variabel fraksi komponen lain (Anderson & Whitcomb, 2015). Jumlah masing-masing komponen pada rentang fraksi 0-1 bagian, dan jumlah semua komponen adalah 1 bagian (*fixed combination*) (StatEase, 2016; (Anderson & Whitcomb, 2015).

Area yang menyatakan semua kemungkinan kombinasi komponen-komponen dapat dinyatakan oleh garis batas dan *interior* dari suatu gambar dengan q tiap sudut dan $q - 1$ dimensi yang disebut dengan *contour plot*. Semua fraksi dari kombinasi dua campuran dapat dinyatakan sebagai garis lurus. Sebanyak 3 komponen ($q = 3$) akan dinyatakan sebagai dua dimensi dengan 3 sudut yaitu gambar segitiga sama sisi (model *special cubic*) seperti terlihat pada Gambar 6. Panjang setiap sisi segitiga menggambarkan ukuran 3 komponen sebagai suatu fraksi dari keseluruhan komponen (StatEase, 2016).

Tiap sudut segitiga merupakan komponen tunggal sehingga hanya terdapat 1 komponen dalam sistem campuran tersebut yakni 1 komponen pada proporsi tertinggi dan 2 komponen lainnya pada proporsi terendah. Campuran yang berada pada garis merupakan campuran biner yakni terdapat komponen kesatu dan kedua dengan total fraksi campuran kedua komponen tersebut adalah 1 dan komponen ketiga pada proporsi yang terendah. Titik yang berada dalam segitiga disebut dengan campuran terner yang merupakan campuran ketiga komponen dan yang harus diperhatikan adalah ketiga sisi segitiga harus mempunyai skala yang sama (Bolton & Bon, 2004).



Gambar 10. Model *mixture design* dengan komponen tunggal (titik merah), campuran biner (titik biru), dan campuran terner (titik hijau dan jingga) (Statease, 2016)

Hubungan fungsional antara respon (variabel tergantung) dengan komposisi (variabel bebas) dinyatakan dengan Persamaan 1.

$$Y = B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{23} X_2 X_3 + B_{123} X_1 X_2 X_3 \dots\dots\dots(1)$$

- Y : Respon
- X₁, X₂, X₃ : Fraksi dari tiap komponen
- B₁, B₂, B₃ : Koefisien regresi X₁, X₂, X₃
- B₁₂, B₁₃, B₂₃ : Koefisien regresi interaksi X₁-X₂, X₁-X₃, X₂-X₃
- B₁₂₃ : Koefisien regresi interaksi X₁-X₂- X₃

Persamaan 1 tidak terdapat B₀ (intersep) yang merupakan suatu konstanta dari suatu titik potong, karena dalam model segitiga sama sisi ini tidak dimungkinkan adanya suatu titik potong. Dalam desain menggunakan 3 variabel (q = 3) maka X₁ + X₂ + X₃ = 1(2)

Berdasarkan Persamaan 2 didapat X₃ = 1 - (X₁ + X₂) dan disubstitusikan ke Persamaan 1 menjadi Persamaan 3.

$$Y = B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 [1 - (X_1 + X_2)] + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 [1 - (X_1 + X_2)] + B_{23} X_2 [1 - (X_1 + X_2)] + B_{123} X_1 X_2 [1 - (X_1 + X_2)] \dots\dots\dots(3)$$

Jika Persamaan 3 diubah dalam bentuk persamaan kuadrat dengan basis X_2 maka dihasilkan Persamaan 4.

$$(-B_{23} - B_{123} X_1) X_2^2 + (B_2 - B_3 + B_{12} X_1 - B_{13} X_1 + B_{23} - B_{23} X_1 + B_{123} X_1 - B_{123} X_1^2) X_2 + (B_1 X_1 + B_3 - B_3 X_1 + B_{13} X_1 - B_{13} X_1^2) - Y = 0 \dots \dots \dots (4)$$

dengan dikaitkan pada $Y = ax^2 + bx + c$, maka:

$$\begin{aligned} a &= -B_{23} - B_{123} X_1 \\ b &= B_2 - B_3 + B_{12} X_1 - B_{13} X_1 + B_{23} - B_{23} X_1 + B_{123} X_1 - B_{123} X_1^2 \\ c &= B_1 X_1 + B_3 - B_3 X_1 + B_{13} X_1 - B_{13} X_1^2 - Y \end{aligned}$$

Koefisien dapat diketahui dari perhitungan regresi dan Y adalah respon yang diinginkan. Nilai X_1 ditentukan maka nilai X_2 dapat dihitung, akan didapatkan 2 nilai X_2 dan dicari X_2 yang memenuhi syarat yaitu memenuhi Persamaan 1 dan 2 dengan kata lain X_2 digunakan untuk mencari nilai X_3 dengan Persamaan 3. Setelah semua nilai didapatkan dimasukkan ke dalam segitiga maka akan didapatkan *contour plot* yang diinginkan (Armstrong, 2006). Beberapa kondisi memungkinkan setiap komponen tidak memiliki rentang yang sama, sehingga bentuk rancangan percobaan tidak penuh sebagai segitiga sama sisi, tetapi membentuk luasan yang tergantung pada rentang yang digunakan dikenal sebagai model *D-optimal design* (StatEase, 2016).

5. Transport perkutan

Kulit merupakan organ terbesar dari tubuh dengan luas permukaan $1,7 \text{ m}^2$ atau sekitar 16% dari total massa tubuh orang (Alkilani *et al.*, 2015). Kulit terdiri dari penghalang alami yang melindungi tubuh dari bahaya eksternal seperti paparan kimia, mikroorganisme, sinar UV, dan kerusakan mekanis (Wang *et al.*, 2018). Kulit memiliki struktur berlapis-lapis diantaranya epidermis, dermis, dan hipodermis (Gambar 7).

a. Epidermis

Epidermis merupakan lapisan paling luar dari kulit yang memiliki ketebalan 0,8 mm yang terdiri dari keratinosit, melanosit, sel Langerhans, dan sel markel (Alkilani *et al.*, 2015). *Stratum corneum* merupakan lapisan epidermis terluar yang kontak langsung dengan lingkungan dengan kepadatan yang tinggi

(1,4 g/cm³ dalam keadaan kering) dan hidrasi yang rendah (15-20%) (Shahzad *et al.*, 2015). Melanosit berfungsi untuk memberikan pigmentasi kulit, sel langerhans yang merupakan sel-sel sistem kekebalan tubuh, sel merkel yang berfungsi sebagai mekanoreseptor membentuk kontak dengan neuron sensorik. Epidermis terdiri dari *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, dan *stratum corneum* (Tavakoli & Klar, 2020).

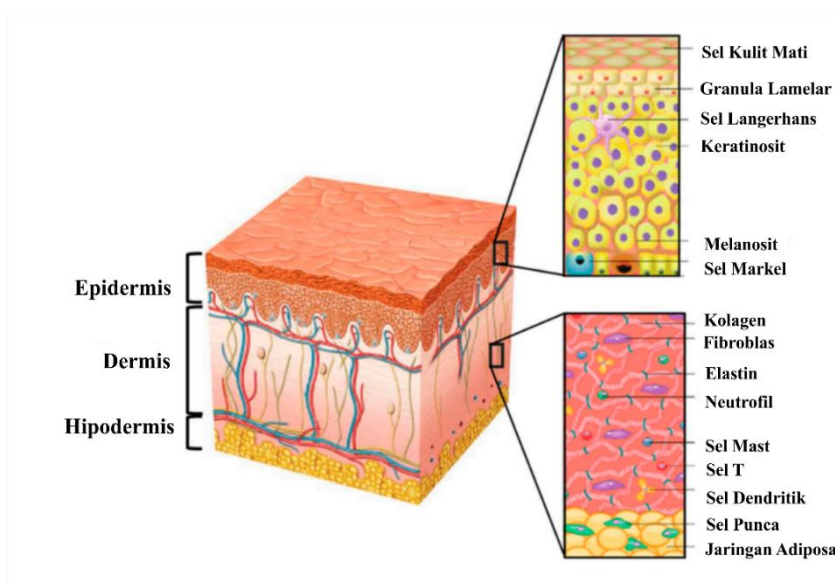
b. Dermis

Dermis merupakan lapisan kulit yang terletak di bawah epidermis dan merupakan lapisan kulit paling tebal (1,5 - 4 mm) yang terdiri dari kolagen dan serat elastin (Alkilani *et al.*, 2015). Fibroblas merupakan sel utama pada dermis yang mensintesis kolagen dan elastin untuk memberikan kekuatan mekanik dan elastisitas. Lapisan dermis tersusun atas kelenjar keringat, folikel rambut, kelenjar *sebaceous*, dan ujung saraf (Rittié, 2016).

c. Hipodermis

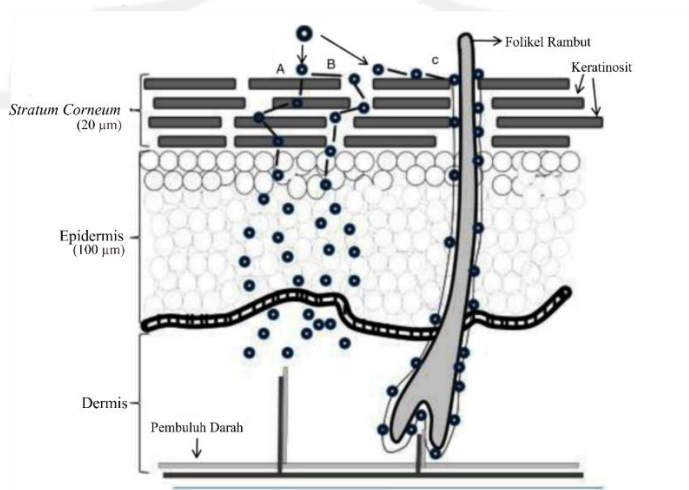
Hipodermis merupakan lapisan kulit terdalam yang terdiri dari jaringan lemak. Lapisan ini merupakan lapisan yang kontak langsung dengan jaringan dibawah tubuh seperti tulang dan otot sehingga fungsi utama dari hipodermis adalah perlindungan terhadap panas, kejutan fisik, dan sinyal vaskular dari syaraf kulit (Liu *et al.*, 2014). Sel lemak dalam hipodermis sekitar 50% dari lemak tubuh yang terdiri dari fibroblast dan makrofag (Alkilani *et al.*, 2015). Hipodermis juga dianggap sebagai organ endokrin yang berfungsi sebagai tempat penyimpanan energi (Pereira *et al.*, 2017).

Lapisan *stratum corneum* merupakan lapisan epidermis yang sulit ditembus oleh zat luar sehingga menjadi suatu tantangan dalam pemberian obat secara perkutan. Ketika obat atau bahan aktif dioleskan ke permukaan kulit, terdapat tiga jalur penetrasi melalui kulit yaitu jalur interseluler, transeluler, dan transapendageal (Gambar 8) (Nauman *et al.*, 2015). Jalur intraseluler berpenetrasi dengan melewati sel melalui lipid antar sel yang terletak di antara korneosit yang berdekatan (Subongkot & Sirirak, 2020). Jalur transeluler merupakan penetrasi melalui korneosit (Azarmi *et al.*, 2020).



Gambar 11. Struktur penampang kulit (Tavakoli & Klar, 2020)

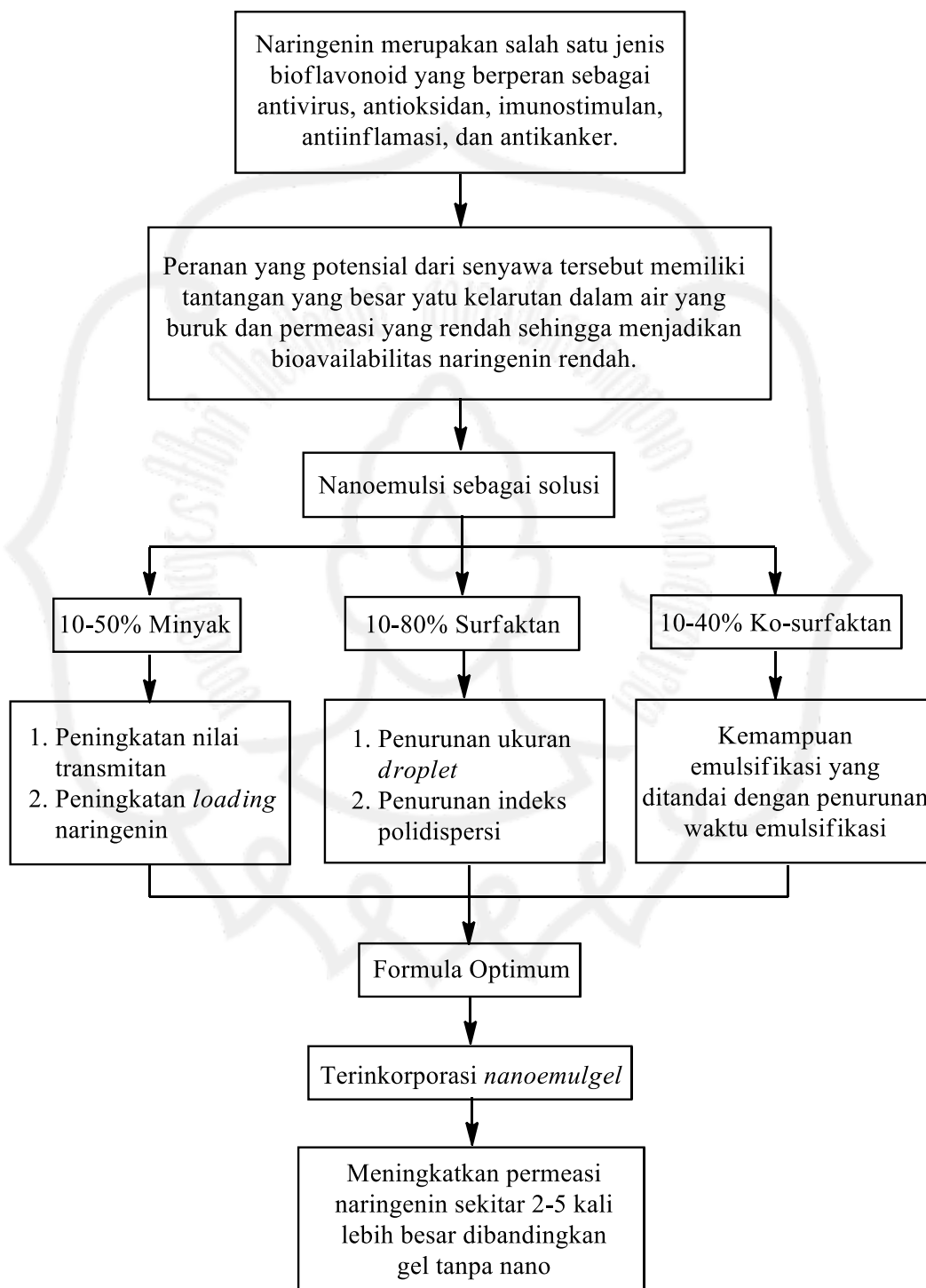
Penetrasi senyawa aktif melalui kulit dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya ukuran molekul, derajat ionisasi, lipofilisitas (Yukuyama *et al.*, 2017). Jalur transpendageal merupakan penetrasi melalui folikel rambut melewati penghalang *stratum corneum*. Folikel rambut berfungsi sebagai jalur yang relevan karena jaringan kapiler darah yang padat mendukung penetrasi yang efisien (Elmahdy *et al.*, 2021).



Gambar 12. Jalur penetrasi kulit : jalur transeluler (A), jalur interseluler (B), jalur transappedangeal (C) (Madani *et al.*, 2013)

B. Kerangka Pemikiran

Konsep dari kerangka pemikiran dari penelitian ini dalam dilihat dalam Gambar 13.



Gambar 13. Konsep kerangka pemikiran

Naringenin merupakan salah satu jenis bioflavonoid yang banyak ditemui dalam kulit jeruk yang berperan sebagai antivirus, antioksidan, imunostimulan, antiinflamasi, dan antikanker. Peranan yang potensial dari senyawa tersebut memiliki tantangan yang besar yaitu kelarutan yang buruk dan permeasi yang rendah sehingga menjadikan bioavailabilitas naringenin rendah. Sediaan berbasis emulsi dapat menjawab tantangan tersebut dengan meningkatkan kelarutan dan permeasinya.

Nanoemulsi merupakan sistem yang sesuai untuk penghantaran obat secara perkutan yang menawarkan beberapa kelebihan dari segi stabilitas, efektifitas, dan feasibilitas dibandingkan formulasi nano berbasis lemak lainnya. Nanoemulsi terdiri dari beberapa komponen diantaranya minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan. Penggunaan minyak memberikan kontribusi terhadap peningkatan nilai transmittan yang ditunjukkan dengan semakin tinggi konsentrasi minyak, maka dihasilkan penampilan nanoemulsi yang keruh. Minyak juga dapat meningkatkan *loading* obat karena peningkatan dispersi bahan aktif dalam pembawa dengan ketercampuran yang baik (Bali *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2018). Surfaktan memberikan kontribusi terhadap penurunan ukuran *droplet*. Pembentukan nanoemulsi sangat bergantung pada konsentrasi surfaktan dalam menstabilkan minyak dengan membentuk lapisan film antarmuka sehingga berpengaruh terhadap pembentukan ukuran *droplet* (Patel *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2017). Penggunaan surfaktan secara tunggal tidak dapat menurunkan tegangan permukaan minyak dan air secara efisien, untuk itu dibutuhkan suatu ko-surfaktan (Harwansh *et al.*, 2019). Ko-surfaktan memberikan kontribusi terhadap kemampuan emulsifikasi yang ditunjukkan dengan peningkatan waktu emulsifikasi. Ko-surfaktan memiliki peranan dalam proses pembentukan nanoemulsi dan stabilisasi *droplet* nanoemulsi dengan mengurangi tegangan antarmuka antara minyak dan air fase (Dou *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2017). Formula optimum nanoemulsi dapat diperoleh pada perbandingan surfaktan yang lebih dominan dibandingkan minyak dan ko-surfaktan. Penggunaan minyak 10-50%, surfaktan 10-80%, dan ko-surfaktan 10-40% dapat menghasilkan nanoemulsi dengan waktu emulsifikasi <30 detik, transmittan >70%, ukuran *droplet* emulsi 30-

100 nm, indeks polidispersi <1 , dan *loading* obat >50 mg/mL (Kuncahyo *et al.*, 2021; Meng *et al.*, 2020; Syukri *et al.*, 2021).

Nanoemulsi kurkumin dengan komponen minyak (minyak emu), surfaktan (Cremophor RH40), dan ko-surfaktan (Labrafil M2125CS) yang diinkorporasikan dalam gel (Carbopol) dalam formulasi *nanoemulgel* mampu meningkatkan permeasi dua kali lipat lebih besar dibandingkan gel tanpa nano (Jeengar *et al.*, 2016). Aparna *et al.* (2015) membandingkan profil permeasi *ex vivo* telmisartan dengan komponen minyak (Labrafil), surfaktan (Tween 20), dan ko-surfaktan (Carbitol) yang diinkorporasikan dalam gel (Carbopol) dalam formulasi *nanoemulgel* dengan gel konvensional menunjukkan peningkatan permeabilitas pada formulasi *nanoemulgel* lima kali lipat lebih besar dibandingkan gel konvensional. Inkorporasi nanoemulsi ketoconazole dengan komponen minyak (Labrafac Lipophile WL 1349), surfaktan (Tween 80), dan ko-surfaktan (PEG 400) dalam gel (Carbopol) yang menghasilkan *nanoemulgel* ketoconazole yang mampu meningkatkan permeasi sebesar 19,4% dibandingkan nanoemulsi ketoconazole (Mahtab *et al.*, 2016). Inkorporasi nanoemulsi dalam nanoemulgel dapat meningkatkan permeasi obat sekitar 2-5 kali lebih besar dibandingkan dengan gel tanpa nano.

C. Hipotesis

1. Penggunaan minyak memberikan kontribusi terhadap peningkatan nilai transmitan dan *loading* obat, surfaktan memberikan kontribusi terhadap pembentukan ukuran *droplet*, dan ko-surfaktan memberikan kontribusi terhadap kemampuan emulsifikasi yang ditunjukkan dengan peningkatan waktu emulsifikasi. Formula optimum nanoemulsi dapat diperoleh pada perbandingan surfaktan yang lebih dominan dibandingkan minyak dan ko-surfaktan. Penggunaan minyak 10-50%, surfaktan 10-80%, dan ko-surfaktan 10-40% dapat menghasilkan nanoemulsi dengan waktu emulsifikasi <30 detik, transmitan $>70\%$, ukuran *droplet* emulsi 30-100 nm, indeks polidispersi <1 , dan *loading* obat >50 mg/mL.

-
2. Nanoemulsi naringenin terinkorporasi dalam *nanoemulgel* mampu meningkatkan kemampuan permeasi naringenin sebesar 2-5 kali lebih besar dibandingkan dengan gel tanpa nano yang diuji dengan kajian pelepasan obat secara *ex-vivo*.

