

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN *SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM (SNEDDS)* EKSTRAK BIJI JINTEN HITAM (*NIGELLA SATIVA L.*) DENGAN METODE DPPH

Karya Tulis Ilmiah
Untuk Memenuhi Sebagai Syarat
Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran

Program Studi Pendidikan Dokter



Disusun Oleh:
Miftach Khoirunnisa
15711007

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
2019**

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SELF-NANOEMULSIFYING DRUG
DELIVERY SYSTEM (SNEDDS) BLACK CUMIN SEED EXTRACT
(NIGELLA SATIVA L.) USING DPPH METHOD**

A Scientific Paper
Submitted as Fulfillment
To Obtain The Medical Degree

Undergraduated Program of Medicine



By:
Miftach Khoirunnisa
15711007

**MEDICAL FACULTY
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
2019**

NASKAH PUBLIKASI

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN *SELF-NANOEMULSIFYING DRUG*
DELIVERY SYSTEM (SNEDDS) EKSTRAK BIJI JINTEN HITAM
(*NIGELLA SATIVA L.*) DENGAN METODE DPPH**


Disusun dan diajukan oleh :

Miftach Khoirunnisa

Telah diseminarkan pada tanggal : 28 Februari 2019

Dan telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama


dr. Isnatin Miladiyah, M.Kes

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN *SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM* (SNEDDS) EKSTRAK BIJI JINTEN HITAM (*Nigella sativa L.*) DENGAN METODE DPPH

Miftach Khoirunnisa¹, Isnatin Miladiyah²

¹ Mahasiswa Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

² Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

Corresponding author:

Name : Miftach Khoirunnisa

Address : Jl. Kaliurang km 12,5

Phone : 0823 0173 4440

Email address : miftachkh97@gmail.com

Abstrak

Latar Belakang: Jinten hitam (*Nigella sativa L.*) telah dimanfaatkan sebagai obat tradisional selama ribuan tahun karena memiliki banyak khasiat, salah satunya sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang berperan penting dalam mekanisme sistem pertahanan tubuh untuk melawan serangan radikal bebas yang dapat menimbulkan berbagai macam penyakit. Pada umumnya jinten hitam dikemas dalam sediaan oral yang memiliki tingkat kelarutan rendah, sehingga dapat mengurangi efek terapeutiknya. Oleh karena itu dikembangkan teknik pengolahan ekstrak biji jinten hitam yang dibentuk dalam sediaan *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS).

Tujuan Penelitian: Untuk mengetahui apakah aktivitas antioksidan SNEDDS ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa L.*) lebih baik dari ekstrak biji jinten hitam biasa.

Metode Penelitian: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Data dianalisis dengan regresi linier dan *one way* ANOVA menggunakan *software* SPSS versi 21.

Hasil: Pada uji ANOVA didapatkan nilai Sig. > 0,05. SNEDDS ekstrak biji jinten hitam memiliki aktivitas antioksidan yang lebih efektif dibandingkan dengan minyak biji jinten hitam non SNEDDS dengan nilai IC₅₀ 0.677 ± 0.028 µg/mL.

Kesimpulan: Tidak terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi senyawa uji dengan persen inhibisi antioksidan. SNEDDS ekstrak biji jinten hitam memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan minyak biji jinten hitam biasa.

Kata Kunci: *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS), *Nigella sativa L.*, Antioksidan, DPPH.

Abstracts

Background: Black cumin (*Nigella sativa* L.) has been used as a traditional medicine for thousands of years as it has many therapeutic effects, one of them is as antioxidant. Antioxidants are compounds that play an important role in the body's defense system mechanism towards free radicals' attacks that cause various diseases. In general, black cumin is consumed as oral administration drug that have a low solubility level resulting on reducing the therapeutic effect. Therefore, the development of black cumin seed extract processing technique formed in the preparation of Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS).

Objective: To determine the antioxidant activity of SNEDDS black cumin seed extract (*Nigella sativa* L.) is better than ordinary cumin seed extract.

Methods: This research is a laboratory experimental study. Measurement of antioxidant activity was carried out by the DPPH method. Data were analyzed by linear regression and one way ANOVA using SPSS version 21 software.

Results: The value of $p > 0.05$ is obtained in ANOVA significance test. SNEDDS black cumin seed extract has more effective antioxidant activity compared to non SNEDDS black cumin seed oil with IC50 value of $0.677 \pm 0.028 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Conclusion: There is no significant relationship between the concentration of the test compound with the percent inhibition of antioxidants. SNEDDS black cumin seed extract has more effective antioxidant activity compared to ordinary black cumin seed oil.

Keywords: : *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS), Nigella sativa L., Antioxidant, DPPH.*

Introduction

Tanaman herbal adalah tanaman yang diketahui memiliki senyawa aktif yang mampu mengintervensi fungsi fisiologis dan patologis sehingga dapat mencegah atau menyembuhkan penyakit¹. Pengobatan menggunakan tanaman herbal lebih digemari karena kebanyakan orang percaya bahwa obat herbal memiliki khasiat yang lebih manjur dan efek samping yang lebih ringan dibandingkan dengan obat-obat kimia². *Nigella sativa* L. atau yang lebih dikenal dengan jinten hitam merupakan tanaman herbal dari famili *Ranunculaceae*, yang banyak tumbuh di negara-negara Mediterania, Timur Tengah, Eropa Timur, dan Asia Barat³. Jinten hitam memiliki beberapa nama lain seperti "*habbatus sauda*" yang merupakan kata serapan dari bahasa arab dan disebut juga dengan "kalonji" di sebagian besar wilayah Asia Selatan⁴. Selain itu jinten hitam (*Nigella sativa* L.) juga memiliki latar belakang agama yang sangat penting bagi setiap

muslim khususnya dalam sejarah pengobatan islam. Nabi Muhammad SAW menyampaikan dalam hadistnya tentang khasiat dari jinten hitam yang dapat mengobati segala macam penyakit. Imam Bukhari meriwayatkan dari 'Aisyah R.A. bahwa ia pernah mendengar Nabi Muhammad SAW bersabda yang artinya: "*Sungguh dalam habbatus sauda (jinten hitam) itu terdapat penyembuh segala penyakit, kecuali as-sam*" Saya ('Aisyah R.A) bertanya, "*Apakah as-sam itu wahai nabi?*" Beliau menjawab, "*Kematian.*"⁵. Ibnu sina yang merupakan salah satu ilmuwan muslim dibidang kedokteran juga telah menuliskan dalam bukunya yang terkenal "*Canon of Medicine*" tentang beberapa sifat dan manfaat dari jinten hitam untuk pengobatan dan merumuskannya dalam cabang ilmu "*Thibbun Nabawi*" yang artinya pengobatan ala nabi¹.

Kebenaran hadits Nabi Muhammad SAW tentang khasiat jinten hitam tersebut kemudian terbukti dengan banyaknya

penelitian yang mengungkap adanya aktivitas senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai diuretik, antihipertensi, antidiabetes, antikanker, antidiare, imunomodulator, analgesik, antibakterial, antihelmintik, analgesik, anti inflamasi, spasmolitik, bronkodilator, gastro-protektif, hepatoprotektif, dan lain-lain⁶. Beberapa studi fitokimia pada *Nigella sativa* L. juga menunjukkan bahwa ekstrak jinten hitam banyak mengandung senyawa-senyawa antioksidan, di antaranya adalah *thymoquinone*, *carvacrol*, *t-anethole* dan *4-terpineol* yang secara tidak langsung dapat mengurangi produksi spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*) dan menyebabkan penghambatan pada peroksidasi lipid⁷. Namun di antara senyawa-senyawa antioksidan yang terkandung pada biji jinten hitam, *thymoquinone* diketahui merupakan senyawa dengan sifat antioksidan yang paling kuat¹.

Antioksidan merupakan senyawa yang berperan sangat penting dalam mekanisme sistem pertahanan tubuh untuk melawan patologi yang terkait dengan serangan radikal bebas⁸. Antioksidan dapat menghambat atau mencegah kerusakan oksidatif senyawa molekuler biologis tubuh yang dapat mengarah kepada kondisi stres oksidatif. Fenomena stres oksidatif terjadi saat ada ketidakseimbangan antara pembentukan spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*) dengan jumlah molekul senyawa antioksidan di dalam tubuh. Radikal bebas dapat berasal dari luar tubuh seperti polusi, debu, alkohol, asap rokok maupun dari dalam tubuh yang diproduksi secara terus-menerus sebagai hasil dari metabolisme normal⁹. Kelebihan spesies oksigen reaktif (ROS) dalam tubuh dapat memicu reaksi inflamasi dengan merangsang pelepasan sitokin-sitokin dan mengaktifasi enzim-enzim peradangan seperti lipoxigenases¹⁰. Oleh karena itu kondisi stres oksidatif dianggap memberikan kontribusi signifikan terhadap berbagai penyakit yang berkaitan dengan inflamasi

seperti radang sendi, vaskulitis, glomerulonefritis, lupus, eritematosa, sindrom pernapasan, kardiovaskuler, stroke, sindrom imunodefisiensi, emfisema, ulkus gaster, hipertensi, preeklamsia, juga gangguan neurologis seperti penyakit alzheimer, penyakit parkinson, penuaan dan karsinogenesis^{11,12}.

Penggunaan tanaman herbal sebagai sumber obat-obatan alami masih banyak dipilih karena dipercaya memiliki efek samping yang lebih ringan dibandingkan dengan obat-obat sintetik kimia². Obat-obatan herbal umumnya dikemas dalam bentuk sediaan per oral, hal ini disebabkan karena pemberian obat dengan rute oral merupakan cara yang dirasa paling aman, nyaman, dan berbiaya rendah¹³. Tingkat kelarutan yang rendah dan bioavailabilitas oral yang buruk pada ekstrak tanaman herbal membuat efektivitas obat di dalam tubuh kurang maksimal. Oleh karena itu, beberapa peneliti mulai mengembangkan formulasi obat berdasarkan minyak dalam bentuk nanoemulsi yang diharapkan dapat meningkatkan bioavailabilitas oral dan kelarutan obat dari ekstrak tanaman herbal. Salah satunya adalah *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS)¹⁴.

Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) merupakan formulasi yang terdiri dari campuran isotropik minyak, surfaktan, kosurfaktan dan zat bioaktif obat yang mampu membentuk nanoemulsi minyak dalam air secara spontan di dalam saluran gastrointestinal dengan menghasilkan ukuran tetesan yang berukuran nanometer saat terdispersi dalam media cair^{15,16}. SNEDDS merupakan salah satu sediaan farmasi yang memiliki banyak keunggulan, di antaranya mampu memaksimalkan absorpsi, transportasi, memodulasi biodistribusi dan disposisi obat, serta memungkinkan pengiriman obat yang tertarget sehingga dapat mengurangi efek samping obat¹⁷. Mekanisme utama SNEDDS dalam meningkatkan bioavailabilitas obat

yaitu dengan meningkatkan kelarutan obat, melindungi obat terhadap hidrolisis enzimatis, meningkatkan luas permukaan spesifik tetesan dengan mengatur ukuran tetesan hingga nanometer, dan meningkatkan permeabilitas obat yang diinduksi oleh surfaktan¹⁴. Dibandingkan dengan sistem nanoemulsi yang lain, formulasi SNEDDS cenderung lebih stabil secara fisik dan kimiawi untuk penyimpanan jangka panjang dan memungkinkan pengemasan obat dalam bentuk dosis satuan seperti kapsul hidrosipropilmetilselulosa atau gelatin baik yang lunak maupun keras¹⁷.

Materials and Methods

Materials

Micropipette (Thermo Scientific dan Finnipipette), *Particle Size Analyser* (HORIBA SZ 100), sonikator (Branson 5510), spektrofotometer UV-Vis (Hitachi Spectrophotometer UV-Vis UH5300), *magnetic stirrer*, timbangan analitik (Melter Toledo XS205 Duel Range), vortex, Franz Diffusion Cell, Biji jinten hitam (*nigella sativa L.*), petroleum eter, minyak biji jinten hitam, Tween 80 (surfaktan), dan PEG400 (ko-surfaktan), bubuk *1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl* (DPPH), metanol, aquades, kuersetin.

Uji Determinasi Biji Jinten Hitam

Biji jinten hitam yang didapatkan dari Pasar Beringharjo dilakukan uji determinasi untuk memastikan bahwa biji yang diperoleh tersebut merupakan *Nigella sativa L.*

Pembuatan Ekstrak Biji Jinten Hitam

Biji jinten hitam dikeringkan lalu dihaluskan hingga berbentuk serbuk. Sebanyak 1 Kg biji jinten hitam direndam dalam 6 Liter larutan etanol 96% selama 3 hari. Kemudian larutan diekstraksi menggunakan pelarut petroleum eter yang dipanaskan selama 4 jam. Hasil ekstraksi dievaporator untuk menghilangkan pelarut petroleum eter¹⁸.

Pembuatan Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Biji Jinten Hitam

Penentuan formula optimal SNEDDS biji jinten hitam didasarkan pada penelitian sebelumnya yang diperoleh dari hasil analisis menggunakan *Software Design Expert* versi 10 adalah Minyak Biji Jinten Hitam (MBJH) 0,532 mL, Tween 80 (surfaktan) 2,047 mL, dan PEG 400 (ko-surfaktan) 0,258 mL¹⁹. Berdasarkan hasil tersebut selanjutnya dibuat 2 variasi konsentrasi yang lain yaitu: MBJH 0,266 mL, Tween 80 2,047 mL, PEG 400 0,258 mL, dan MBJH 0,133 mL, Tween 80 2,047 mL, PEG 400 0,258 mL.

Penentuan Ukuran Globul dan Zeta Potensial

Penentuan ukuran globul dan zeta potensial dilakukan dengan mengencerkan SNEDDS Biji Jinten Hitam ke dalam air dengan rasio 1:25 di atas *magnetic stirrer* sampai terbentuk nanoemulsi. Kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA).

Uji Stabilitas

Uji stabilitas yang digunakan pada penelitian ini dengan 3 uji yaitu uji *Heating Stability*, uji *Freeze-Thaw*, dan uji sentrifugasi. Pengujian *Heating Stability* menggunakan oven dengan suhu 60°C – 100°C selama 5 jam²⁰. Pengujian *Freeze-Thaw* dengan cara sediaan disimpan dalam suhu 4°C selama 24 jam, lalu dipindahkan pada suhu 40°C selama 24 jam (1 siklus). Pengujian dilakukan sebanyak 3 siklus²¹. Uji sentrifugasi dilakukan dengan cara sebanyak 2 ml sediaan dimasukkan ke dalam *ependorf* kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit, lalu dilakukan pengamatan karakterisasi fisik meliputi pengamatan organoleptis²².

Pembuatan Larutan Stok DPPH

Larutan stok DPPH 50 ppm dibuat dengan cara menimbang DPPH sebanyak 5 mg

kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml metanol absolut, lalu diaduk dan dihomogenkan. Larutan stok DPPH dijaga pada suhu kamar dan harus terlindung dari cahaya²³.

Pembuatan Larutan Kontrol Kuersetin

Kuersetin 10 ppm dibuat dengan cara menimbang sebanyak 1 mg kuersetin kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml metanol absolut dan dihomogenkan²³. Setelah itu dibuat 2 variasi konsentrasi lainnya, yaitu 8 dan 6 ppm yang dibuat dengan cara masing-masing larutan stok dipipet 8 dan 6 mL, lalu ditambahkan dengan metanol sampai volume 10 mL. Kuersetin dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol positif yang telah terbukti memiliki daya antioksidan kuat dengan nilai $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ²³.

Penetapan panjang gelombang (λ) maksimum DPPH

Larutan stok DPPH sebanyak 1 ml dipipet ke dalam vial kemudian dicukupkan volumenya sampai 5 ml dengan metanol, dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometri UV-Visibel.

Pengujian Aktivitas Antioksidan SNEDDS Ekstrak Biji Jinten Hitam

Pengujian dilakukan dengan menambahkan sebanyak 1 ml larutan sampel ke dalam 4 ml larutan stok DPPH (50 ppm) pada tabung reaksi. Kemudian dihomogenisasi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Lalu dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimal. Perlakuan yang sama juga dilakukan pada semua sample, yaitu ekstrak biji jinten hitam (non SNEDDS) dan kuersetin sebagai kontrol positif. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan untuk mendapatkan data yang valid.

Penetapan *Inhibitory Concentration* (IC_{50})

Nilai *Inhibitory concentration* (IC_{50}) merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak biji jinten hitam (mikrogram/mililiter) yang mampu menghambat 50% oksidasi. Nilai IC_{50} didapatkan dari persamaan garis regresi linear antara konsentrasi sampel terhadap persen inhibisi antioksidan sampel. Perhitungan nilai persen inhibisi antioksidan menggunakan rumus yang telah ditentukan berikut ini²⁴:

$$\text{Persen Inhibisi Antioksidan (\%)} = \frac{[(Ac-As)/Ac] \times 100\%}{}$$

Keterangan :

Ac : nilai absorbansi larutan kontrol

As : nilai absorbansi larutan sampel

Results

Ekstraksi Biji Jinten Hitam dan Pembuatan Formulasi SNEDDS

Hasil dari uji determinasi tersebut adalah biji jinten hitam yang peneliti dapatkan tersebut adalah benar merupakan spesies dari *Nigella sativa L.* Mula-mula pembuatan SNEDDS dilakukan dengan cara mencampur minyak biji jinten hitam dengan Tween 80 sesuai dengan formula yang telah dibuat sebelumnya. Kemudian dilakukan pengadukan dengan menggunakan sonikator selama 5-10 menit hingga memperoleh sediaan yang jernih dan transparan. Setelah itu baru ditambahkan PEG 400 ke dalam formula dan disonikasi kembali hingga mendapatkan formula optimal SNEDDS yang jernih dan memiliki ukuran partikel yang kecil. Untuk mengetahui apakah formula SNEDDS berhasil dibuat atau tidak, formula tersebut kemudian dipipet ke dalam segelas aquades dan diaduk. Formula SNEDDS dianggap telah berhasil dibuat, ketika sediaan tersebut dapat larut dalam aquades menghasilkan larutan yang jernih/transparan/ sedikit berkabut. Penampakan awal ketiga formula SNEDDS dapat dilihat pada Gambar 1:



Gambar 1. Ketiga formula SNEDDS dengan 3 variasi konsentrasi sebelum pengujian.

Selanjutnya dari ketiga formula SNEDDS yang telah berhasil dibuat masing-masing dilakukan evaluasi dan pengamatan organoleptis tahap awal. Hasil pengamatan tersebut adalah sebagai berikut:

A. Konsentrasi 1

Sediaan SNEDDS pada formula 1 dengan konsentrasi minyak biji jinten hitam 0,532 ini berwarna kuning kecokelatan, jernih, dan memiliki bau khas minyak biji jinten hitam.

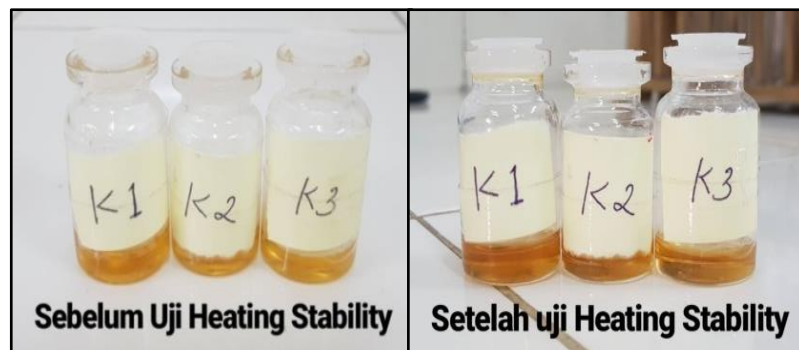
B. Konsentrasi 2

Sediaan SNEDDS pada formula 2 dengan konsentrasi minyak biji jinten hitam 0,266 berwarna kuning kecokelatan, jernih, dan memiliki bau khas minyak biji jinten hitam.

C. Konsentrasi 3

Sediaan SNEDDS pada formula 3 dengan konsentrasi minyak biji jinten hitam 0,133 berwarna kuning kecokelatan, jernih, dan memiliki bau khas minyak biji jinten hitam.

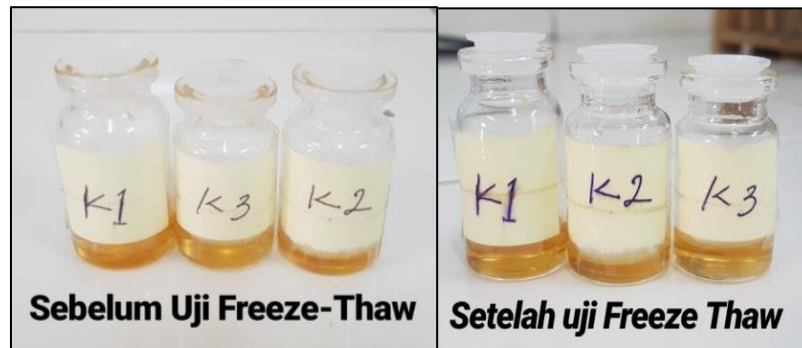
Secara umum, hasil pengamatan organoleptis yang dilakukan pada masing-masing formula tersebut dari segi bentuk, warna, maupun bau tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Selanjutnya dilakukan uji stabilitas fisik, pada penelitian ini uji sentrifugasi tidak dapat dilakukan karena keterbatasan alat. Hasil dari uji *Heating Stability* dan uji *Freeze-Thaw* dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3 maupun Tabel 1 dan 2 dibawah ini berturut-turut:



Gambar 2. Penampakan ketiga formula SNEDDS sebelum dan sesudah uji *Heating Stability*.

Tabel 1. Hasil uji *Heating Stability*.

SNEDDS	Sebelum Uji <i>Heating Stability</i>	Sesudah Uji <i>Heating Stability</i>		
	Pengamatan Organoleptis	Pengamatan Organoleptis	Pemisahan Fase	Presipitasi
K 1	Kuning kecoklatan, jernih, berbau khas minyak jinten hitam	Kuning kecoklatan, jernih, berbau khas minyak jinten hitam	Tidak ada	Tidak ada
K 2	Kuning kecoklatan, jernih, berbau khas minyak jinten hitam	Kuning kecoklatan, jernih, berbau khas minyak jinten hitam	Tidak ada	Tidak ada
K 3	Kuning kecoklatan, jernih, berbau khas minyak jinten hitam	Kuning kecoklatan, jernih, berbau khas minyak jinten hitam	Tidak ada	Tidak ada



Gambar 3. Penampakan ketiga formula SNEDDS sebelum dan sesudah uji *Freeze-Thaw*.

Tabel 2. Hasil uji *Freeze-Thaw*.

SNEDDS	Sebelum Uji <i>Heating Stability</i>	Sesudah Uji <i>Heating Stability</i>		
	Pengamatan Organoleptis	Pengamatan Organoleptis	Pemisahan Fase	Presipitasi
K 1	Kuning kecoklatan, jernih, berbau khas minyak jinten hitam	Kuning kecoklatan, jernih, berbau khas minyak jinten hitam	Tidak ada	Tidak ada
K 2	Kuning kecoklatan, jernih, berbau khas minyak jinten hitam	Kuning kecoklatan, jernih, berbau khas minyak jinten hitam	Tidak ada	Tidak ada
K 3	Kuning kecoklatan, jernih, berbau khas minyak jinten hitam	Kuning kecoklatan, jernih, berbau khas minyak jinten hitam	Tidak ada	Tidak ada

Setelah dilakukan uji *Heating Stability* dan *Freeze-Thaw* dapat disimpulkan bahwa dari ketiga formula SNEDDS yang dibuat oleh peneliti memiliki tingkat kestabilan fisik yang bagus, di mana tidak terlihat adanya perubahan organoleptis sebelum dan sesudah perlakuan, tidak ada pemisahan fase, dan tidak terjadi pembentukan kristal maupun endapan. Berikutnya, dilakukan pengukuran globul/partikel dan zeta potensial pada ketiga formula SNEDDS dengan

menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). Penentuan pengukuran globul dan zeta potensial tujuannya adalah untuk mengetahui ukuran partikel (nanometer) yang terbentuk dengan emulsi spontan serta mengukur kestabilan dari partikel-partikel yang berada dalam sediaan SNEDDS tersebut. Hasil dari pengukuran globul dan zeta potensial dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3:

Tabel 3. Ukuran partikel dan nilai zeta potensial dari SNEDDS biji jinten hitam.

SNEDDS	Ukuran Partikel (nm)	Nilai Zeta Potensial (mV)
K 1	178,5	-59,5
K 2	149,0	-34,7
K 3	133,2	-23,5

Hasil pengukuran globul yang disajikan pada tabel 3 menunjukkan adanya penyusutan ukuran partikel dari formula SNEDDS K1 hingga K3. Formula SNEDDS K1 dengan persen konsentrasi minyak biji jinten hitam paling banyak memiliki ukuran globul terbesar yaitu 178,5 nm. Sedangkan Formula SNEDDS K3 dengan persen konsentrasi minyak biji jinten hitam (MBJH) paling sedikit memiliki ukuran globul terkecil yaitu 133,2 nm. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh pada perbandingan formula antara MBJH, Tween 80, dan PEG 400 terhadap besar ukuran partikel yang dapat dibentuk melalui emulsi spontan.

Sementara itu hasil uji zeta potensial dari formula SNEDDS K1 dan K2 menghasilkan nilai berturut-turut, -59,5 mV dan -34,7 mV. Hal ini menunjukkan bahwa partikel pada formula SNEDDS K1 dan K2 termasuk kategori stabil karena nilai zeta potensial lebih rendah dari -30 mV. Akan tetapi formula SNEDDS K3 memiliki nilai zeta potensial -23,5 mV yang menunjukkan nilai yang lebih tinggi dari -30 mV namun juga lebih rendah dari +30 mV. Hal ini menunjukkan bahwa partikel pada formula SNEDDS K3 tidak cukup stabil.

Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Setelah melalui serangkaian pengujian untuk menilai kualitas dari SNEDDS ekstrak biji jinten hitam yang telah dibuat oleh peneliti, pengujian dilanjutkan dengan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH. Penentuan aktivitas antioksidan diawali dengan membuat larutan stok DPPH 50 ppm dan larutan stok kuersetin 10 ppm dengan pelarut metanol. Selanjutnya larutan stok DPPH diencerkan menjadi 10 ppm untuk diukur panjang gelombang maksimum dan absorbansinya yang akan digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Larutan DPPH 10 ppm diukur pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Namun setelah dilakukan pengujian ternyata DPPH dengan konsentrasi 10 ppm tidak bisa terbaca panjang gelombang maksimumnya oleh alat. Peneliti bahkan telah melakukan 2x pengujian namun hasilnya tetap sama, di mana DPPH 10 ppm tidak dapat menghasilkan puncak pada panjang gelombang tertentu. Selanjutnya dilakukan modifikasi dengan mengukur

panjang gelombang maksimum DPPH pada konsentrasi 50 ppm. Panjang gelombang maksimum pada DPPH 50 ppm yang dihasilkan adalah pada panjang gelombang 515 nm yang ditandai dengan adanya puncak. Sedangkan absorbansi DPPH pada panjang gelombang maksimum tersebut adalah 0,717 nm. Setelah mendapatkan

panjang gelombang maksimum dan absorbansi dari larutan DPPHnya, berikutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan pada semua sampel termasuk quersetin. Data nilai hasil absorbansi dan persen inhibisi antioksidan dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 4. Data hasil absorbansi dan % inhibisi antioksidan sampel SNEDDS.

SNEDDS	Konsentrasi	Absorbansi	% Inhibisi Antioksidan
K 1	20	0,193 ± 0.027	73,129 ± 3.707
K 2	10	0,185 ± 0.023	73.408 ± 2.535
K 3	5	0,187 ± 0.025	73,873 ± 3.546

Tabel 5. Data hasil absorbansi dan % inhibisi antioksidan minyak biji jinten hitam (non SNEDDS).

MBJH non SNEDDS	Konsentrasi	Absorbansi	% Inhibisi Antioksidan
M 1	50	0.698 ± 0.003	2.696 ± 0.426
M 2	100	0.700 ± 0.006	2.603 ± 0.793

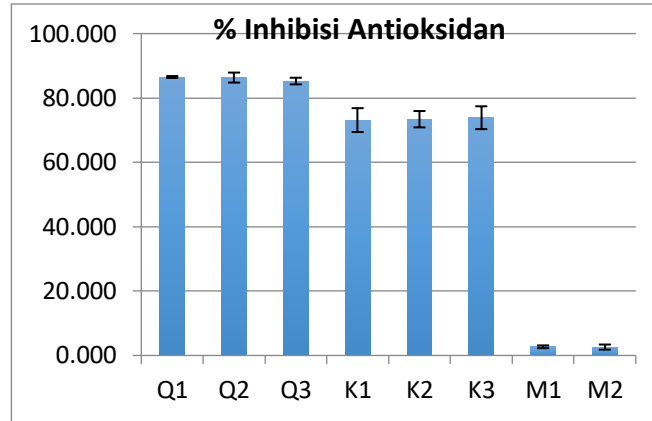
Tabel 6. Data hasil absorbansi dan % inhibisi antioksidan larutan quersetin (kontrol positif).

Quersetin	Konsentrasi	Absorbansi	% Inhibisi Antioksidan
Q 1	10	0.097 ± 0.002	86.518 ± 0.290
Q 2	8	0.098 ± 0.011	86.332 ± 1.553
Q 3	6	0.106 ± 0.007	85.263 ± 1.028

Berdasarkan data pada tabel di atas dapat disimpulkan semakin kecil nilai absorbansi suatu larutan maka semakin tinggi persen inhibisinya. Tingginya nilai persen inhibisi antioksidan suatu senyawa menunjukkan semakin tinggi pula potensi larutan tersebut sebagai antioksidan. Berdasarkan data diatas

persen inhibisi antioksidan tertinggi adalah quersetin K1 yaitu 86.518 ± 0.290 %, sedangkan yang terendah adalah minyak biji jinten hitam K2 (non SNEDDS) yaitu 2.603 ± 0.793 %. Berikut diagram yang merangkum seluruh hasil persen inhibisi antioksidan:

Diagram 1. Persen inhibisi antioksidan semua sampel uji.



Nilai IC_{50} dapat diperoleh dari membuat persamaan garis regresi linier antara masing-masing konsentrasi larutan sampel dan persen inhibisinya dengan menggunakan

software SPSS versi 21. Hasil persamaan garis regresi linier dan nilai IC_{50} ditunjukkan pada tabel di bawah ini:

Tabel 7. Data hasil persamaan garis regresi linier serta nilai IC_{50} dari sample SNEDDS, MBJH non SNEDDS, dan quersetin.

Sampel Uji	Persamaan Garis Regresi Linier	Nilai Y	Nilai X atau IC_{50}
SNEDDS	$y = 74.013x - 0.047$	50	0.677 ± 0.028
MBJH	$y = 2.789x - 0.002$	50	18.126 ± 2.260
Quersetin	$y = 83.528x + 0.314$	50	0.595 ± 0.015

Nilai IC_{50} dari quersetin yaitu 0.595 ± 0.015 $\mu\text{g/mL}$ masih lebih rendah dibandingkan dengan nilai IC_{50} dari SNEDDS ekstrak biji jinten hitam sebesar 0.677 ± 0.028 $\mu\text{g/mL}$. Akan tetapi berdasarkan jurnal referensi dari penelitian terdahulu baik SNEDDS ekstrak biji jinten hitam maupun quersetin masih tergolong kategori antioksidan sangat kuat.

Discussion

Pemilihan surfaktan menjadi sangat penting dalam pembuatan formulasi SNEDDS karena surfaktan berperan penting dalam pembentukan nanoemulsi dan menurunkan tegangan antar 2 fase (minyak-air) agar dapat terdispersi dengan baik¹⁵. Pada penelitian ini surfaktan yang digunakan adalah Tween 80, karena merupakan jenis surfaktan non-ionik yang memiliki angka toksisitas rendah sehingga lebih aman untuk

Penelitian ini juga membuktikan bahwa aktivitas antioksidan biji jinten hitam yang dikemas dalam sediaan SNEDDS jauh lebih baik jika dibandingkan dengan ekstrak minyak biji jinten hitam biasa (non SNEDDS) dengan nilai IC_{50} 18.126 ± 2.260 $\mu\text{g/mL}$.

digunakan²⁵. Namun dibandingkan dengan penggunaan satu surfaktan pada formulasi SNEDDS, perlu adanya penambahan ko-surfaktan untuk menciptakan tegangan permukaan yang baik dan memperkecil ukuran globul nanoemulsi, ko-surfaktan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Polietilen glikol (PEG) 400^{26,27}. PEG 400 dipilih karena paling sering digunakan, serta termasuk surfaktan non ionik yang sifatnya

stabil, mudah bercampur dengan komponen lain, tidak iritatif, dan tidak beracun²⁸.

Berdasarkan hasil evaluasi tahap awal sediaan SNEDDS minyak biji jinten hitam yaitu pengamatan organoleptis pada formula K1, K2 dan K3 memperlihatkan hasil berupa sediaan yang jernih dan transparan. Menurut Handayani²⁹, reaksi nanoemulsi yang berhasil membentuk partikel berukuran nanometer akan menghasilkan sediaan yang jernih dan transparan atau sedikit berkabut. Hal ini telah dibuktikan dengan hasil pengujian selanjutnya yang disajikan pada Tabel 3, yaitu pada pengukuran globul baik dari K1, K2, dan K3 yang menghasilkan partikel dengan satuan nanometer berturut-turut 178,5 nm, 149 nm, dan 133,2 nm. Ukuran tersebut telah memenuhi persyaratan besaran partikel nanoemulsi dalam sistem penghantaran obat yaitu 50-300 nm, sehingga sangat cocok untuk digunakan dalam industri baik makanan ataupun obat^{30,31}. Berdasarkan hasil pengukuran globul didapatkan penyusutan ukuran partikel yang signifikan dari formula K1, K2 dan K3. Di mana persen konsentrasi MBJH dari formula K1 hingga K3 dibuat semakin rendah dan persen konsentrasi Tween 80 dan PEG 400 dibuat semakin tinggi. Data tersebut menunjukkan bahwa penambahan PEG 400 juga membantu Tween 80 dalam pembentukan nanoemulsi sehingga menghasilkan ukuran globul yang lebih kecil lagi dibandingkan jika hanya menggunakan satu surfaktan saja²⁶.

Nilai zeta potensial merupakan parameter yang digunakan untuk mengkarakterisasi tingkat kestabilan nanopartikel dalam sediaan SNEDDS³⁰. Nanopartikel dengan nilai zeta potensial lebih besar dari +30 mV atau lebih kecil dari -30 mV dapat dikatakan memiliki tingkat kestabilan tinggi³². Berdasarkan data yang terdapat pada tabel 3 formula SNEDDS K1 dan K2 memiliki nanopartikel yang stabil dengan nilai zeta potensial -59,5 mV dan

-34,7 mV. Sementara itu formula SNEDDS K3 memiliki nilai zeta potensial sebesar -23,5 mV, nilai ini tidak memenuhi kriteria nilai zeta potensial yang baik. Namun demikian hasil dari pengujian stabilitas fisik nanoemulsi menunjukkan semua formulasi memiliki kestabilan yang baik karena memenuhi kriteria yaitu, tidak terdapat tanda pemisahan fase, kekeruhan ataupun presipitasi³³.

Prosedur pengujian diawali dengan pengukuran panjang gelombang DPPH yang dilarutkan menggunakan pelarut metanol. Panjang gelombang maksimum ini nantinya akan digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan sampel uji dengan metode DPPH. Mulanya pengujian panjang gelombang maksimum dengan menggunakan larutan DPPH sempat gagal 2 kali. Selanjutnya dilakukan modifikasi konsentrasi dari larutan DPPH menjadi 50 ppm. Selanjutnya hasil panjang gelombang maksimum dan absorban dari larutan DPPH 50 ppm dapat dilihat pada Gambar 5. Prinsip kerja dari Spektrofotometer UV-Vis adalah didasarkan pada serapan (absorbansi) radiasi atau cahaya oleh suatu larutan berwarna pada panjang gelombang tertentu. Alat ini juga dikenal sebagai kolometri, karena hanya larutan berwarna saja yang dapat diukur menggunakan alat ini³⁴. Hal ini menjelaskan alasan mengapa larutan DPPH dengan konsentrasi 10 ppm tidak dapat dibaca dengan baik panjang gelombang maksimumnya, karena intensitas warna ungu pada larutan tersebut sangat rendah.

Hasil uji aktivitas antioksidan dinyatakan dengan parameter IC₅₀, yaitu bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang mampu meredam DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan yang dimiliki senyawa tersebut⁹. Suatu senyawa dapat dikatakan memiliki daya antioksidan yang sangat kuat jika nilai IC₅₀ < 10 µg/mL, kuat jika nilai IC₅₀ antara 10-50 µg/mL, sedang apabila nilai IC₅₀ berkisar antara 50-

100 µg/mL, lemah jika nilai IC₅₀ berkisar antara 100-250 µg/mL dan tidak aktif jika nilai IC₅₀ diatas 250 µg/mL³⁵. Sebagaimana yang terdapat pada Tabel 10, hasil pengujian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan quersetin memiliki nilai IC₅₀ yang lebih rendah dari SNEDDS ekstrak biji jinten hitam yaitu 0.595 ± 0.015 µg/mL. Hal ini menunjukkan aktivitas antioksidan pada quersetin masih lebih baik dibandingkan dengan SNEDDS ekstrak biji jinten hitam, meskipun keduanya termasuk kategori antioksidan yang sangat kuat. Akan tetapi aktivitas antioksidan pada SNEDDS ekstrak biji jinten hitam jauh lebih baik jika dibandingkan dengan ekstrak minyak biji jinten hitam yang tidak dikemas dalam sediaan SNEDDS dengan nilai IC₅₀ sebesar 0.677 ± 0.028 µg/mL. Efektivitas antioksidan dalam sediaan SNEDDS dipengaruhi oleh sifat fisik nanoemulsi, kestabilan molekulnya serta partisi senyawa antioksidan dalam fase lipid³⁶. Hasil uji

Conclusion

Aktivitas antioksidan SNEDDS ekstrak biji jinten hitam belum bisa menyamai tingkat aktivitas antioksidan dari kontrol positifnya quersetin. Namun, SNEDDS ekstrak biji jinten hitam memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan dengan minyak biji jinten hitam non SNEDDS.

Conflict of Interest

Seluruh penulis menyatakan tidak ada *conflict of interest* dalam penelitian ini.

Reference

1. Kooti, W., Hasanzadeh-Noohi, Z., Sharafi-Ahvazi, N., Asadi-Samani, M. & Ashtary-Larky, D.,2016. Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (Nigella sativa). *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(10), pp.732–745.
2. Majdalawieh, A.F., Fayyad, M.W. & Nasrallah, G.K.,2017. Anti-cancer properties and mechanisms of action Of

ANOVA antara masing-masing konsentrasi sampel dengan persen inhibisi didapatkan nilai Sig. > 0,05. Hal tersebut bermakna bahwa tidak ada hubungan yang signifikan antara konsentrasi sampel dengan persen inhibisinya.

Penelitian ini memiliki keterbatasan tidak dapat membuktikan secara spesifik senyawa mana yang memiliki efek antioksidan paling kuat karena senyawa antioksidan yang terkandung di dalam biji jinten hitam terlalu kompleks. Selain itu penggunaan satu jenis metode pengukuran aktivitas antioksidan dirasa belum dapat menghasilkan kesimpulan penelitian yang valid dari keseluruhan aktivitas antioksidan yang terdapat pada biji jinten hitam. Oleh karena itu sangat disarankan untuk menggunakan lebih dari satu metode pengujian aktivitas antioksidan, termasuk penelitian in vivo.

Acknowledgements

Ucapan terima kasih penulis tujukan kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini, khususnya kepada dr. Sufi Desrini, M.Sc, yang banyak memberi masukan dalam penulisan karya tulis ilmiah ini, Pak Har selaku Laboran Teknologi Farmasi, Mas Tohari Laboran Research Kimia Terpadu, dan Bapak Hariyanto yang telah memberikan banyak bimbingan, arahan, dan kemudahan hingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah ini dengan baik.

thymoquinone, the major active ingredient of Nigella sativa. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57(18), pp.3911-3928.

3. Abedi, A.S., Rismanchi, M., Shahdoostkhany, M., Mohammadi, A. & Mortazavian, A.M.,2017. Microwave-assisted extraction of Nigella sativa L. essential oil and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Food*

- Science and Technology*, 54(12), pp.3779–3790.
4. Ping, N.C., Hashim, N.H., Sharifah, D. & Adli, H., 2014. Effects of *Nigella sativa* (habbatus sauda) oil and nicotine chronic treatments on sperm parameters and testis histological features of rats. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014, pp.1-7.
 5. Almatrafi, A.A.,2016. Medicinal uses of *Nigella sativa* (black seeds). , (February), pp.2–5.
 6. Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S.A., Najmi, A.K., Siddique, N.A., Damanhour, Z.A. & Anwar, F.,2013. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(5), pp.337–352.
 7. Amina, B.,2016. Toxicity and anti-oxidant activity of the essential oil of *Nigella sativa*. *Der Pharmacia Lettre*, 8(15), pp.245–249.
 8. Biochem, A., Pisoschi, A.M. & Negulescu, G.P., 2011. Methods for total antioxidant activity determination : a review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. 1(1), pp.1–10.
 9. Zuhra, C.F., Tarigan, J.B. & Sihotang, H., 2008. Aktivitas antioksidan senyawa flavonoid dari daun katuk (*Sauropus andrognus* (L) Merr). *Jurnal Biologi Sumatera*. 3(1), pp.10–13.
 10. Dzoyem, J.P. & J.N. Eloff, 2014., Anti-inflammatory, anticholinester-ase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa, *Journal of Ethnopharmacology*. pp.1-33.
 11. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N.,2010. Free radicals , antioxidants and functional foods : Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), pp.118-126.
 12. Figueiredo-gonzález, M., Valentão, P., Pereira, D.M. & Andrade, P.B.,2017. Further insights on tomato plant: cytotoxic and antioxidant activity of leaf extracts in human gastric cells. *Food and Chemical Toxicology*. pp. 1-33.
 13. Cherniakov, I., Domb, A.J. & Hoffman, A., 2015. Self-nano-emulsifying drug delivery systems : an update of the biopharmaceutical aspects. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 12(7), pp.1121-1133
 14. Abdelbary, G., Amin, M. & Salah, S.,2012. Self nano-emulsifying simvastatin based tablets: design and in vitro / in vivo evaluation. , (January), pp.1–11.
 15. Patel, J., Patel, A., Raval, M., Sheth, N., 2011. Formulation and development of a self-nanoemulsifying drug delivery system of irbesartan. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2(-), pp.9–16.
 16. Christophersen, P.C., Christiansen, M.L., Holm, R., Kristensen, J., Jacobsen, J., Abrahamsson, B., 2014. Fed and fasted state gastrointestinal in vitro lipolysis: in vitro in vivo relations of a conventional tablet, a SNEDDS and a solidified SNEDDS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 57(-), pp.232-239.
 17. Date, A.A., Dixit, R. & Nagarsenker, M.,2010. Self-nanoemulsifying drug delivery systems : formulation insights , applications and advances. *Future Science Group: Future Medicine*. 5(10), pp.1595–1616.
 18. Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E., 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnolic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*. 110, pp.76–82.
 19. Putri, D. N. A., 2018. Optimasi, karakterisasi dan uji stabilitas nanoherbal biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dalam bentuk *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS). Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
 20. Talegaonkar, S., Azeem, A., Ahmad, F.J., Khar, R.K., Pathan, S.A. & Khan, Z.I., 2008. Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2(3),

- pp.238–257.
21. Hasrawati, A., Hasyim, N. & Irsyad, N.A., 2016. Pengembangan formulasi mikroemulsi minyak sereh (*Cymbopogon nardus*) menggunakan emulgator surfaktan nonionik. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 3(1), pp.151–154.
 22. Fitriani, E.W., Imelda, E., Kornelis, C. & Avanti, C., 2016. Karakterisasi dan stabilitas fisik mikroemulsi tipe A/M dengan fase minyak LCT dan MCT. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 3(1), pp.31–44.
 23. Handayani, V., Ahmad, A.R., & Sudir, M., 2014. Uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol bunga dan daun patikala (*Etlintera elatior* (Jack) R . M . Sm) menggunakan metode DPPH. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 1(2), pp.86–93.
 24. Dudonne, St Ephanie, E, Xavier Vitrac, P.C., Ere, Marion Woillez, A.J.-M.M. & Erillon, 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), pp.1768–1774.
 25. Handayani, D. L., Yusriadi, & Hardani R., 2017. Formulasi mikroemulsi ekstrak terpurifikasi daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) sebagai suplemen antioksidan. *Galenika Journal of Pharmacy*. 3(1), pp.1-9.
 26. Krstić, M., Đorđić, M., J.Đ., & S.I. ć, 2018. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) and self-microemulsifying 12 drug delivery systems (SMEDDS) as lipid nanocarriers for improving dissolution rate and bioavailability of poorly soluble drugs. *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting Elsevier Inc.* 12, pp.473-508.
 27. Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Aqil, M., & Shafiq, S., 2007. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. *Journal of The American Association of Pharmaceutical Scientists*. pp. 191-199.
 28. Kurniawati, T. & Zulkarnain, A. K., 2012. Pengaruh penambahan polietilen glikol 400 terhadap absorpsi piroksikam secara in situ. *Majalah Farmasetik*. 8(1), pp.127-132.
 29. Handayani, F. S., Nugroho, B. H., & Munawiroh, S. Z., 2019. Optimasi formulasi nanoemulsi minyak biji anggur energi rendah dengan *D-Optimal Mixture Design* (DMD). *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 14(1), pp.17-34.
 30. Taurina, W., Sari, R., Hafinur, U. C., Wahdaningsih, S., & Isnandar. 2017. Optimasi kecepatan dan lama pengadukan terhadap ukuran nanopartikel kitosan-ekstrak etanol 70% kulit jeruk siam (*Citrus nobilis* L.var *Microcarpa*). *Traditional Medicine Journal*. 22(1), pp.16-20.
 31. McClements DJ. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*. 7(6): 2297–316.
 32. Ayuningtias, D. D. R., Nurahmanto, D., & Rosyidi, V. A., 2017. Optimasi komposisi polietilen glikol dan lesitin sebagai kombinasi surfaktan pada sediaan nanoemulsi kafein. *e-jurnal pustaka kesehatan*. 5(1), pp.157-163.
 33. Kassem, A., Mohsen, A.M., Ahmed, R.S., dan Essam, T.M. 2016. Self-nanoemulsifying drug delivery sytem (SNEDDS) with enhanced solubilization of nystatin for treatment of oral candidiasis: Design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Molecular Liquids*. 218, pp.219–232.
 34. Bintang, M., 2010. *BIOKIMIA: Teknik penelitian*, Jakarta : Erlangga.
 35. Phongpaichit, S., Nikom, J., Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., & Hutadilok, T. N., 2007. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from garcinia plant. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(3), 517 – 525.
 36. Jusnita, N. & Syurya, W., 2019. Karakterisasi nanoemulsi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.). *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 6(1), pp.16–24.