

**OPTIMASI FORMULA SNEDDS EKSTRAK JINTEN HITAM
(*Nigella sativa* L.) DENGAN FASE MINYAK IKAN HIU CUCUT
BOTOL (*Centrophorus sp*) SERTA UJI AKTIVITAS
IMUNOSTIMULAN**

Tesis

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat *Master of Science* (M.Sc)**

Magister Sains dan Teknologi



Diajukan oleh

MAYA UZIA BEANDRADE

14/369824/PFA/01387

Kepada

**PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA**

2016

Tesis

OPTIMASI FORMULA SNEDDS EKSTRAK JINTEN HITAM (*Nigella sativa* L.) DENGAN FASE MINYAK IKAN HIU CUCUT BOTOL (*Centrophorus sp*) SERTA UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULAN

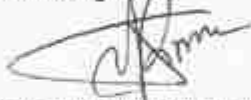
dipersiapkan dan disusun oleh:

MAYA UZIA BEANDRADE

14/369824/PFA/01387

telah dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 16 Januari 2016

Pembimbing Utama



Dr. rer. nat. Ronny Martien, M.Si.

Pembimbing Pendamping



Dr. Ag. Yuswanto, S.U., Apt.

Mengetahui:

Fakultas Farmasi

Universitas Gadjah Mada

Dekan,



Prof. Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc., Apt.

Tim Penguji:

Ketua: Prof. Dr. Achmad Fudholi, DEA., Apt.

Anggota:

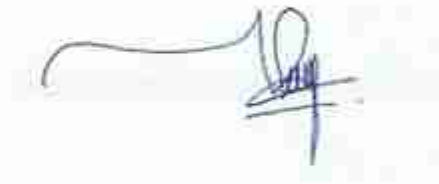
1. Prof. Dr. Ediatl, SE., Apt.
2. Dr. rer. nat. Ronny Martien, M.Si.
3. Dr. Ag. Yuswanto, S.U., Apt.



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 16 Januari 2016

A handwritten signature in blue ink, consisting of a long horizontal stroke followed by a stylized, looped flourish.

Maya Uzia Beandrade

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, yang telah memberikan kekuatan dan kesehatan sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul “Optimasi Formula SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.) dengan Fase Minyak Ikan Hiu Cucut Botol (*Centrophorus sp*) serta Uji Aktivitas Imunostimulan”. Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat guna memperoleh derajat Master of Science (M.Sc) pada Magister Manajemen Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Penulis menyadari bahwa tesis ini tidak akan selesai tanpa bantuan dari berbagai pihak, maka perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada yang terhormat:

1. Dr. rer. nat. Ronny Martien, M.Si., selaku pembimbing utama yang telah memberikan banyak waktu dalam membimbing, mengarahkan dan membantu penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan hingga terselesaikannya tesis ini.
2. Dr. Ag. Yuswanto, S.U., Apt, selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan banyak waktu dalam membimbing, mengarahkan dan membantu penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan hingga terselesaikannya tesis ini.
3. Prof. Dr. Achmad Fudholi, DEA, Apt, dan Prof. Dr. Ediati, SE, Apt., selaku tim penguji yang telah memberikan saran dan masukan demi kesempurnaan tesis ini.

4. Prof. Dr. Subagus Wahyono, M.Sc., Apt selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada dan Dr. Erna Prawita Setyowati, M.Si., Apt selaku Ketua Program Megister Manajemen Farmasi yang telah menyediakan sarana untuk terlaksananya penelitian dan penyusunan tesis ini.
5. Bapak, Mama, Yudhi, Rafaella, Mas Didit, Mbak Ajeng, Zevandra, atas doa, perhatian, dan dukungannya selama ini.
6. Sahabat-sahabat saya Linda, Tata, dan Ririn atas doa dan dukungannya.
7. Mas Wahyudi dan Mbak Dewa atas saran selama penelitian dan penulisan tesis.
8. Teman-teman MST 2014 khususnya kelas formulasi, terima kasih telah berbagi suka dan duka, semoga kesuksesan selalu mengiringi langkah kita semua.
9. Seluruh staff administrasi Program Pascasarjana Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada yang membantu selama penulis melangsungkan pendidikan.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu saran dan kritik yang membangun dari pembaca demi kesempurnaan tesis ini sangat penulis harapkan. Semoga tesis ini bermanfaat bagi perkembangan dan pelayanan farmasi di Indonesia.

Yogyakarta, 16 Januari 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL	i
PERSETUJUAN TESIS	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ARTI SINGKATAN	xiii
INTISARI	xiv
ABSTRACT	xv
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Keaslian Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	5
E. Tujuan Penelitian	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
A. <i>Self-nanoemulsifying drug delivery systems</i> (SNEDDS)	6
B. <i>Simplex Lattice Design</i>	13
C. Jinten Hitam (<i>Nigella sativa</i> L.)	16
D. Sistem Imun	19
E. Landasan Teori	26
F. Hipotesis	27

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	29
A. Bahan Penelitian	29
B. Peralatan Penelitian	30
C. Jalannya Penelitian	30
1. Determinasi Biji Jinten Hitam	30
2. Pembuatan Ekstrak Jinten Hitam	31
3. Karakterisasi Ekstrak	31
a. Pengamatan organoleptis ekstrak	31
b. Viskositas	31
c. Kadar air	31
4. Identifikasi Kuantitatif Ekstrak Etanol Jinten Hitam dengan KLT Densitometri	32
a. Pembuatan kurva baku timokuinon	32
b. Uji kuantitatif timokuinon pada ekstrak jinten hitam	32
5. Uji Kelarutan Ekstrak Jinten Hitam Dalam Minyak, Surfaktan, dan Ko-surfaktan	32
6. Optimasi Formula SNEDDS dengan <i>Design Expert 7.1.5</i>	33
a. Penentuan komposisi minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan	33
b. Optimasi formula SNEDDS	34
7. Verifikasi Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam	35
8. Uji Viskositas Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam	36
9. Karakterisasi Ukuran dan Distribusi Ukuran Tetesan Formula Optimal SNEDDS Jinten Hitam	36
10. Uji Immunostimulan Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam	36
a. Pengurusan <i>Ethical Clearance</i>	36
b. Pemilihan dan pengelompokan hewan uji	37
c. Kondisi pemeliharaan hewan uji	37
d. Uji immunostimulan	37

11. Uji <i>Extract Loading</i> SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam Optimal.....	39
12. Uji Stabilitas SNEDDS.....	40
a. Uji penyimpanan pada suhu ruang selama 90 hari.....	40
b. Uji <i>Freeze-Thawing</i>	40
D. Variabel Penelitian.....	41
1. Variabel bebas.....	41
2. Variabel tergantung.....	41
3. Variabel terkendali.....	41
E. Analisis Data.....	41
F. Skema Jalannya Penelitian.....	43
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	44
A. Determinasi Biji Jinten Hitam.....	44
B. Pembuatan Ekstrak Jinten Hitam.....	44
C. Karakterisasi Ekstrak Jinten Hitam.....	44
D. Identifikasi Kuantitatif Ekstrak Etanol Jinten Hitam dengan KLT Densitometri.....	46
1. Pembuatan kurva baku timokuinon.....	46
2. Uji kuantitatif timokuinon dalam ekstrak jinten hitam.....	47
E. Uji Kelarutan Ekstrak Jinten Hitam Dalam Minyak, Surfaktan, dan Ko-surfaktan.....	48
F. Desain Formula SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam dengan <i>Design Expert 7.1.5</i>	49
1. Kejernihan.....	52
2. Waktu emulsifikasi.....	55
G. Optimasi dan Verifikasi Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam.....	59
H. Uji Viskositas Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam....	63
I. Karakterisasi Ukuran dan Zeta Potensial Tetesan Formula Optimal SNEDDS Jinten Hitam.....	65

J. Uji Immunostimulan Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam.....	67
K. Uji <i>Extract Loading</i> Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam.....	77
L. Uji Stabilitas SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam.....	78
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	83
A. Kesimpulan.....	83
B. Saran.....	83
DAFTAR PUSTAKA	85
LAMPIRAN	92

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Struktur kimia skualen.....	9
Gambar 2. Struktur kimia Tween 80.....	11
Gambar 3. Struktur kimia <i>Polyoxyl 50 Hydrogenated Castor Oil</i>	11
Gambar 4. Struktur kimia PEG 400.....	13
Gambar 5. <i>Simplex lattice design</i> untuk 3 komponen.....	13
Gambar 6. Biji jinten hitam.....	17
Gambar 7. Struktur kimia timokuinon.....	18
Gambar 8. Respon imun alami dan adaptif.....	20
Gambar 9. Skema penelitian.....	43
Gambar 10. Kurva baku timokuinon.....	46
Gambar 11. Kelarutan timokuinon dalam minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan.....	48
Gambar 12. Kurva <i>normal plot of residuals</i> kejernihan nanoemulsi.....	52
Gambar 13. <i>Countour plot</i> untuk respon kejernihan (persentase transmittan).....	55
Gambar 14. Kurva <i>normal plot of residuals</i> respon waktu emulsifikasi.....	56
Gambar 15. <i>Countour plot</i> untuk respon waktu emulsifikasi.....	59
Gambar 16. <i>Countour plot</i> formula optimal SNEDDS.....	62
Gambar 17. Viskositas SNEDDS ekstrak jinten hitam.....	64
Gambar 18. Ukuran tetesan nanoemulsi SNEDDS ekstrak jinten hitam 200 mg/g.....	65
Gambar 19. Zeta potensial nanoemulsi SNEDDS ekstrak jinten hitam 200 mg/g.....	66
Gambar 20. Rasio sel makrofag (%).....	67
Gambar 21. Indeks fagositosis makrofag.....	70
Gambar 22. Fagositosis makrofag antar kelompok perlakuan.....	73
Gambar 23. Mekanisme absorpsi SNEDDS.....	76

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 1. Spesifikasi Croduret 50 ss (<i>Polyoxyl 50 Hydrogenated Castor Oil</i>).....	12
Tabel 2. Rasio komposisi minyak, surfaktan dan ko-surfaktan.....	34
Tabel 3. Pembagian kelompok dan perlakuan hewan uji.....	38
Tabel 4. Karakterisasi ekstrak jinten hitam.....	44
Tabel 5. Penetapan kadar timokuinon dalam ekstrak jinten hitam.....	47
Tabel 6. Batas bawah dan batas atas komponen SNEDDS.....	49
Tabel 7. Desain dan hasil respon formula percobaan SNEDDS ekstrak jinten hitam.....	51
Tabel 8. Hasil analisis statistik ANOVA respon kejernihan.....	53
Tabel 9. Hasil analisis statistik ANOVA respon waktu emulsifikasi..	56
Tabel 10. Optimasi formula SNEDDS ekstrak jinten hitam.....	60
Tabel 11. Solusi formula optimal SNEDDS berdasarkan <i>Design Expert 7.1.5</i>	61
Tabel 12. Prediksi dan hasil verifikasi respon formula optimal.....	62
Tabel 13. Data statistik rasio sel makrofag.....	68
Tabel 14. Data statistik indeks fagositosis makrofag.....	70
Tabel 15. Uji <i>extract loading</i> SNEDDS ekstrak jinten hitam.....	77
Tabel 16. Hasil uji kejernihan setelah penyimpanan selama 90 hari (25 ± 2 °C).....	79
Tabel 17. Hasil waktu emulsifikasi setelah penyimpanan selama 90 hari (25 ± 2 °C).....	80
Tabel 18. Hasil uji kejernihan setelah siklus <i>freeze-thaw</i> sebanyak 6 siklus.....	81
Tabel 19. Hasil waktu emulsifikasi setelah siklus <i>freeze-thaw</i> sebanyak 6 siklus.....	82

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1. <i>Certificate of Analysis (CoA) Croduret 50 SS</i>	92
Lampiran 2. Hasil Determinasi Biji Jinten Hitam (<i>Nigella sativa</i> Linn).....	93
Lampiran 3. Hasil Rendemen dan Viskositas Ekstrak Jinten Hitam	94
Lampiran 4. Hasil Kadar Air Ekstrak Jinten Hitam.....	95
Lampiran 5. Hasil Pengujian Asam Lemak Ekstrak Jinten Hitam...	96
Lampiran 6. Data Kurva Baku Timokuinon.....	97
Lampiran 7. Hasil Pengujian Minyak Ikan Hiu Cucut Botol.....	98
Lampiran 8. Data Kelarutan Timokuinon dalam Minyak, Surfaktan, dan Ko-surfaktan.....	99
Lampiran 9. Hasil Optimasi SNEDDS dengan <i>Design Expert 7.1.5.</i> ...	100
Lampiran 10. Hasil Verifikasi Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam.....	102
Lampiran 11. Viskositas Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam	103
Lampiran 12. Hasil Ukuran dan Zeta Potensial Tetesan Nanoemulsi Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam.....	104
Lampiran 13. Hasil Uji Imunostimulan Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam.....	106
Lampiran 14. Hasil <i>Extract Loading</i> SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam	128
Lampiran 15. Stabilitas SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam	131

DAFTAR SINGKATAN

SNEDDS	: <i>Self nano-emulsifying drug delivery system</i>
M/A	: Minyak dalam air
IgM	: Immunoglobulin M
IgG	: Immunoglobulin G
NK	: <i>Natural killer</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
IL	: Interleukin
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
LPS	: Lipopolisakarida
APC	: <i>Antigen Presenting Cells</i>
HLA	: <i>Human Leukocyte Antigen</i>
Th	: <i>T helper</i>
IFN- γ	: Interferon- γ
PEG 400	: Polietilen glikol 400
nm	: nanometer
PI	: <i>Polydispersity Index</i>
PSA	: <i>Particle Size Analyzer</i>
Rpm	: <i>Rotary per Minute</i>
AGF	: <i>Artificial Gastric Fluid</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
cP	: centipoise
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
CI	: <i>Confidence Interval</i>
PI	: <i>Prediction Interval</i>

INTISARI

Jinten hitam (*Nigella sativa*) mengandung senyawa timokuinon yang berefek sebagai imunostimulan. Ekstrak jinten hitam dikembangkan menjadi SNEDDS (*Self-nanoemulsifying Drug Delivery System*) karena masalah kelarutan. Penelitian dilakukan untuk mengetahui karakterisasi SNEDDS ekstrak jinten hitam yang meliputi viskositas, ukuran tetesan nanoemulsi, *extract loading*, dan stabilitas. Pengujian aktivitas imunostimulan SNEDDS meliputi rasio sel makrofag dan indeks fagositosis.

SNEDDS ekstrak jinten hitam dioptimasi dengan metode *Simplex Lattice Design* menggunakan *software Design Expert 7.1.5*, selanjutnya SNEDDS optimal diuji ukuran tetesan nanoemulsi dan zeta potensial, serta uji viskositas. Uji aktivitas imunostimulan dilakukan dengan metode *biolater assay* terhadap tikus *Sprague Dawley* sebanyak 5 tikus/kelompok selama 15 hari dengan pemberian satu kali sehari yaitu kontrol positif (ekstrak meniran 2,7 mg/tikus), kelompok perlakuan yaitu ekstrak jinten hitam dengan dosis 200 mg/kgBB serta SNEDDS ekstrak jinten hitam (200 mg/kgBB), kelompok plasebo berupa formula SNEDDS tanpa ekstrak jinten hitam, dan kontrol normal, selanjutnya dihitung rasio dan indeks fagositosis makrofag. Selanjutnya SNEDDS optimal diuji *extract loading* dan stabilitasnya.

SNEDDS ekstrak jinten hitam optimal mengandung 15% minyak ikan hiu cucut botol, 67,34% surfaktan (10,10% Croduret 50 SS dan 57,24% Tween 80), 17,66% PEG 400 sebagai ko-surfaktan dengan hasil ukuran tetesan nanoemulsi 16,3 nm, PI sebesar 0,202, zeta potensial -43,5 mV, dan viskositas antara 234,69 – 255,71 cP. SNEDDS ekstrak jinten hitam dengan dosis 200 mg/kgBB dapat meningkatkan rasio sel makrofag dan indeks fagositosis dibandingkan dengan ekstrak jinten tanpa formulasi ($P < 0,05$). Hasil *extract loading* sistem SNEDDS mencapai 600 mg ekstrak/g sistem. SNEDDS stabil setelah penyimpanan selama 90 hari pada suhu kamar dan uji *freeze-thawing*.

Kata kunci : Ekstrak jinten hitam, *Simplex Lattice Design*, SNEDDS, aktivitas imunostimulan

ABSTRACT

Black cumin (*Nigella sativa*) contains timokuinon having immunostimulant effect. However, due to solubility problems, the extract was developed into SNEDDS (Self-nanoemulsifying Drug Delivery System). The study was conducted to find out the characterization of SNEDDS black cumin extract which include viscosity, nanoemulsion droplet size, extract loading and stability. Immunostimulant study was conducted to find out the ratio and phagocytosis index of macrophage.

SNEDDS of black cumin extract was optimized using Simplex Lattice Design by Design Expert 7.1.5. The optimal formula then tested the droplet size, zeta potential of nanoemulsion, and viscosity of SNEDDS. Immunostimulant activity test using *biolatest assay* was carried out on Sprague Dawley rats by 5 mice/group for 15 days by administration once a day, there are a positive control (meniran extract 2,7 mg/rat), the treatment group that black cumin extract at dose 200 mg/kgBW and SNEDDS black cumin extract (200 mg/kgBW), the placebo group was SNEDDS without black cumin extract, and the last was normal controls, then calculated the ratio of macrophage and phagocytosis index. Furthermore SNEDDS optimal was tested extract loading and stability test.

The optimal formula of SNEDDS black cumin extract containing 15% Gulper shark liver oil, 67.34% surfactant (10.10% Croduret 50 SS and 57.24% Tween 80), 17.66% PEG 400 as co-surfactant. The results of the droplet size is 16.3 nm, PI 0.202, zeta potential -43.5 mV, viscosity of SNEDDS is 234.69 to 255.71 cP. SNEDDS black cumin extract 200 mg/kgBW can increase the ratio of macrophages and phagocytosis index compared with black cumin extract without formulation ($P < 0.05$). SNEDDS system can load up to 600 mg extract/g system. The SNEDDS is stable after storage for 90 days at room temperature and freeze-thawing stability test.

Keywords: Black cumin extract, Simplex Lattice Design, SNEDDS, immunostimulant activity

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Sistem kekebalan tubuh perlu dijaga agar terhindar dari berbagai macam penyakit. Kekebalan tubuh dapat ditingkatkan dengan pemberian agen imunostimulan berupa obat sintesis maupun herbal, tetapi penggunaan obat sintesis seperti Levamisole, Isoprenosine, Immunocynin memiliki efek samping yang lebih besar, sehingga penggunaan senyawa herbal lebih dipilih untuk meningkatkan ketahanan sistem imun tubuh (Naga Preethi dan Rajeshwari, 2014). Beberapa studi menunjukkan bahwa ekstrak herbal mampu meningkatkan sistem imun tubuh manusia. Salah satu tanaman herbal yang mampu meningkatkan sistem imun adalah jinten hitam (Majdalawieh dkk., 2010; Salem, 2005).

Obat herbal memiliki kelemahan akibat efek farmakologi hanya dapat diperoleh ketika konsentrasinya berada di sekitar rentang terapeutik. Terjadinya fluktuasi konsentrasi terapeutik inilah yang menyebabkan obat herbal menjadi tidak berefek atau terjadi ketoksikan. Selain itu, stabilitas obat herbal secara per oral sangat buruk jika berada pada lingkungan lambung sehingga absorpsinya rendah dan beresiko tinggi mengalami *first pass metabolism*. Permasalahan ini dapat diatasi dengan modifikasi sistem penghantaran obat untuk meningkatkan disolusi atau kelarutan obat serta meningkatkan bioavailabilitasnya dengan melakukan pendekatan formulasi berupa SEDDS (*Self-emulsifying drug delivery system*).

Salah satu tipe SEDDS adalah SNEDDS (*Self nano-emulsifying drug delivery system*) yaitu suatu sistem berupa campuran isotropik antara fase minyak sebesar

20-70%, surfaktan sebesar 30-80%, dan ko-surfaktan sebesar 30-80%, yang ketika tercampur dengan air akan membentuk nanoemulsi M/A (minyak dalam air) secara spontan. Nanoemulsi yang terbentuk akan stabil secara termodinamik dengan ukuran droplet pada rentang kurang dari 100 nm. Dispersi dengan ukuran nano tersebut akan membentuk nanoemulsi yang jernih, cenderung transparan, dan akan memberikan luas permukaan kontak yang optimum sehingga meningkatkan absorpsi dan bioavailabilitas obat herbal (Chaudhary dkk., 2011; Joshi dkk., 2013; Rao dan Shao, 2008; Verma dkk., 2013). Pembuatan formula dengan metode *trial error* atau *one-factor-at-a-time* (OFAT) memerlukan lebih banyak waktu, biaya, dan bahan sehingga tidak efektif. Korelasi antar faktor multivariat lebih efektif menggunakan desain eksperimen statistik (*Design of Experimental/DOE*) dengan metode *Simplex Lattice Design* untuk memperoleh formula optimal karena memerlukan eksperimen lebih sedikit dan memberikan hasil yang tetap (Dash dkk., 2015).

Ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa*) mengandung timokuinon yang memberikan efek imunostimulan, akan tetapi senyawa aktif ini memiliki kelarutan rendah (Ahmad dkk., 2013; Mishra dkk., 2013) sehingga pada penelitian ini ekstrak jinten hitam diformulasi menjadi SNEDDS agar absorpsinya menjadi lebih baik dan meningkatkan bioavailabilitas ekstrak. Fase minyak yang akan digunakan adalah minyak ikan hiu cucut botol (*Centrophorus sp*) mengandung 50-80% skualen yang merupakan minyak hidrokarbon triterpenoid. Skualen memiliki efek anti-kanker, menurunkan kolesterol, antioksidan yang kuat, mampu meningkatkan fungsi sel makrofag, serta meningkatkan jumlah IgM (Güneş, 2013). Optimasi ekstrak jinten

hitam (*Nigella sativa*) menjadi SNEDDS (*Self nano-emulsifying drug delivery system*) dengan fase minyak ikan hiu cucut botol (*Centrophorus sp*) dengan metode *Simplex Lattice Design* diharapkan akan diperoleh ukuran tetesan nanoemulsi kurang dari 100 nm dan waktu emulsifikasi kurang dari 1 menit sehingga akan mudah diabsorpsi dalam tubuh. Bioavailabilitas SNEDDS ekstrak jinten hitam yang lebih tinggi akan mampu meningkatkan rasio dan indeks fagositosis sel makrofag dibandingkan ekstrak jinten hitam tanpa formulasi.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka timbul permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimanakah hasil formula optimal SNEDDS dari ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa L.*) menggunakan minyak ikan hiu cucut botol (*Centrophorus sp*) sebagai fase minyak, dengan surfaktan dan ko-surfaktan dengan metode *Simplex Lattice Design*?
2. Bagaimanakah aktivitas imunostimulan formula optimal SNEDDS ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa L.*) dibandingkan dengan ekstrak jinten hitam?

C. Keaslian Penelitian

Sejauh ini penelitian ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa L.*) menjadi sediaan SNEDDS (*Self nano-emulsifying drug delivery system*) sebagai agen imunostimulan belum pernah dilakukan. Beberapa penelitian yang pernah dilakukan mengenai ekstrak ini sebagai agen imunostimulan adalah sebagai berikut:

1. Penelitian Michel dkk (2011) tentang formulasi dan evaluasi ekstrak air jinten hitam (*Nigella sativa* L.) menjadi kapsul gelatin lunak menghasilkan efek hepatoprotektif.
2. Penelitian ALHaj dkk (2010) tentang pembuatan esensial oil dari ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) menjadi *Solid Lipid Nanoparticle* (SLN).
3. Penelitian Sriningsih dan Wibowo (2009) tentang pemberian minyak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) pada tikus dengan dosis 10 mg/200 g BB; 20 mg/200 g BB; dan 40 mg/200 g BB dapat meningkatkan aktivitas makrofag terhadap infeksi bakteri *S. epidermidis*.
4. Penelitian oleh Santoso dkk., (2012) tentang efek pemberian minyak menguap jinten hitam (*Nigella sativa* L.) sebanyak 0.01% dapat meningkatkan respon imun melalui fagositosis makrofag.
5. Penelitian yang dilakukan oleh Boseila dan Messalam (2011) melaporkan bahwa pemberian minyak, fraksi n-heksan dan metanol dari jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dapat meningkatkan respon imun pada mencit yang diberi vaksin rabies.
6. Penelitian oleh Sarker dkk., (2011) menggunakan ekstrak etanolik jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dapat meningkatkan produksi poliklonal IgM pada percobaan *in vitro*.
7. Penelitian oleh Sugindro dan Djajadisastra (2008) tentang mikroenkapsulasi dan karakterisasi ekstrak etanol jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

D. Manfaat Penelitian

1. Bagi pengembangan ilmu pengetahuan, terutama untuk peneliti di bidang teknologi farmasi, hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan dalam hal formulasi sediaan SNEDDS ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dalam meningkatkan sistem imun tubuh non-spesifik.
2. Bagi industri farmasi di Indonesia, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan produk baru berupa sediaan SNEDDS ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dengan fase minyak ikan hiu cucut botol (*Centrophorus sp*, surfaktan, dan ko-surfaktan yang stabil untuk meningkatkan sistem imun ekstrak jinten hitam yang telah beredar di pasaran.

E. Tujuan Penelitian

Secara umum, penelitian ini bertujuan untuk memperoleh formula optimal SNEDDS ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.), kemudian dilakukan pengujian aktivitas imunostimulan.

Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk:

1. Memperoleh formula optimal SNEDDS ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dengan metode *Simplex Lattice Design* menggunakan minyak ikan hiu cucut botol (*Centrophorus sp*) antara 20-70% sebagai fase minyak, surfaktan antara 30-80%, dan ko-surfaktan antara 0-30%.
2. Mengetahui pengaruh formula optimal SNEDDS ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap rasio dan indeks fagositosis makrofag.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS)

Penggunaan obat per oral masih sangat digemari oleh masyarakat karena alasan kepraktisan. Tetapi kebanyakan obat memiliki kelarutan yang rendah sehingga jika digunakan per oral akan memberikan bioavailabilitas yang kecil sehingga efeknya juga tidak optimal. Beberapa modifikasi telah dilakukan untuk penghantaran obat yang kelarutannya rendah seperti dikompleks dengan siklodekstrin, ukuran diperkecil menjadi mikron, atau dengan dispersi solid. Tetapi beberapa metode tersebut memiliki kelemahan karena membutuhkan peralatan biaya dan produksi yang mahal serta prosesnya sangat kompleks yang dapat mengakibatkan obat yang diproduksi tidak reproduibel (Patel dkk., 2011)

SNEDDS atau *self-nanoemulsifying drug delivery systems* adalah metode penghantaran obat yang dapat diaplikasikan untuk obat atau ekstrak yang biasanya memiliki karakteristik kelarutannya rendah dalam air. SNEDDS diartikan sebagai campuran isotropik dari minyak sintetis atau alami, surfaktan padat atau cair, atau jika dibutuhkan dapat digunakan satu atau lebih ko-surfaktan atau solven hidrofilik, yang memiliki kemampuan untuk membentuk nano emulsi minyak dalam air (M/A) dengan agitasi lemah dalam media berair atau dalam saluran pencernaan. SNEDDS dapat teragitasi dalam saluran pencernaan akibat gerakan lambung atau usus halus sehingga teremulsifikasi secara spontan menjadi nanoemulsi berukuran kurang dari 100 nm dan dapat langsung diabsorpsi (Patel dkk., 2011). Bioavailabilitas obat dapat meningkat tidak hanya karena kecepatan obat terdisolusi tetapi dengan

SNEDDS maka dapat menurunkan resiko obat termetabolisme dalam hati (*first pass effect*), hal ini dikaitkan dari sifat obat yang lipofil dengan komponen minyak sebagai eksipien dalam formulasi sehingga dapat melewati transpor melalui limfatik. Selain itu, obat yang diformulasi menjadi SNEDDS dapat terlindungi dari mekanisme hidrolisis dalam saluran pencernaan. Parameter yang dikaitkan dengan formula SNEDDS antara lain adalah konsentrasi surfaktan, ukuran emulsi yang terbentuk, kemampuan emulsifikasi spontan, dan efektivitas obat untuk diabsorpsi secara oral. Kombinasi minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan yang optimal maka dapat diperoleh formula SNEDDS terbaik (Ahmed dkk., 2014). Formula optimal SNEDDS dapat dimasukkan ke dalam kapsul gelatin lunak atau keras untuk pengujian disolusi secara *in vitro* (Zhao dkk., 2010).

1. Fase minyak

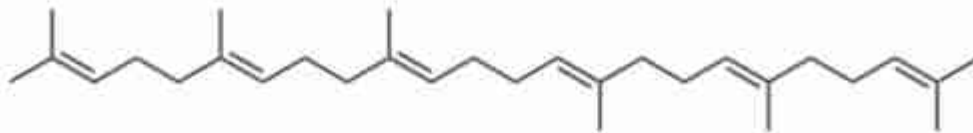
Fase minyak adalah komponen yang penting untuk pembuatan SNEDDS, seperti sifat fisikokimia minyak (bobot molekul, polaritas, dan viskositas) dapat mempengaruhi proses emulsifikasi spontan dari SNEDDS, ukuran globul (M/A), kelarutan obat yang lipofil, dan transpor melewati membran biologi sehingga mempengaruhi bioavailabilitas obat. Minyak dengan rantai hidrokarbon sedang dan minyak dengan rantai hidrokarbon pendek (bobot molekul rendah) akan lebih mudah diemulsifikasikan dibandingkan minyak dengan rantai hidrokarbon panjang (Wadhwa dkk., 2011). Konsentrasi minyak untuk memperoleh formula optimal SNEDDS adalah sebesar 20-70% b/b (Tran dkk., 2014). Contoh minyak yang dapat digunakan adalah minyak ikan hiu cucut botol.

Ikan hiu cucut botol (*Centrophorus sp*) berukuran relatif kecil dengan panjang sekitar 1 meter dan dapat beradaptasi dengan baik pada lingkungan hidupnya (habitat pada kedalaman laut lebih dari 1000 meter). Bagian hati dari ikan hiu cucut botol terdiri dari minyak sebesar 77,2% dari total berat dan konsentrasi skualen di dalam minyak tersebut sebesar 79,6% (Popa dkk., 2014). Minyak hati ikan hiu cucut botol diperoleh dengan cara ekstraksi dari organ hati ikan hiu cucut botol. Hati ikan hiu cucut botol diambil, kemudian dibersihkan dari lemak dan pengotor lainnya, lalu dipotong kecil dan dipanaskan dengan suhu tidak melebihi 80°C. Minyak hati ikan hiu cucut botol dapat diperoleh melalui ekstraksi dengan suatu agen dehidrasi untuk menghilangkan air dengan cara pendinginan dan sentrifugasi untuk menghilangkan bagian yang mengendap (Gupta dkk., 2012).

Minyak ikan hiu mengandung alkilgliserol, skualen, PUFA (*polyunsaturated fatty acids*) yang dapat meningkatkan imunitas tubuh dari infeksi dan kanker (Hajimoradi dkk., 2009^b). Alkilgliserol adalah lemak bioaktif yang terdapat pada sel dan cairan tubuh, merupakan prekursor dari fosfolipid dan berperan pada fungsi serta pembentukan membrane sel darah putih dan makrofag (Deniau dkk., 2010). Alkilgliserol dapat mengaktifkan sistem imun dengan dua mekanisme yaitu menstimulasi sel makrofag sehingga meningkatkan aktivitasnya dalam memfagositosis serta menghambat protein kinase C yaitu kunci regulasi dari pertumbuhan sel. Alkilgliserol juga dapat mengurangi efek dari radiasi kemoterapi karena memiliki kemampuan dalam melindungi sel membran (Gupta dkk., 2012).

Skualen ($C_{30}H_{50}$)_s adalah senyawa organik dengan struktur *30-carbon polyprenyl* simetris mengandung enam unit *prenyl* (isoprenoid atau isoprene) dan

merupakan prekursor untuk pembuatan kolesterol atau steroid lainnya (gambar 1) (Reddy dan Couvreur, 2009).



Gambar 1. Struktur kimia skualen (Matyas dkk., 2000)

Berbagai macam efek farmakologis dapat diperoleh dari penggunaan skualen antara lain sebagai bahan pembawa obat untuk sediaan emulsi bagi obat yang kelarutannya buruk dalam air, dapat melindungi obat, meningkatkan waktu paruh obat, menurunkan toksisitas, dan dapat meningkatkan kemampuan obat untuk permeasi melewati membran sel (Reddy dan Couvreur, 2009). PUFA ternyata telah diteliti memiliki aktivitas pada kematian sel tumor serta mencegah aterosklerosis (Hajimoradi dkk., 2009^c).

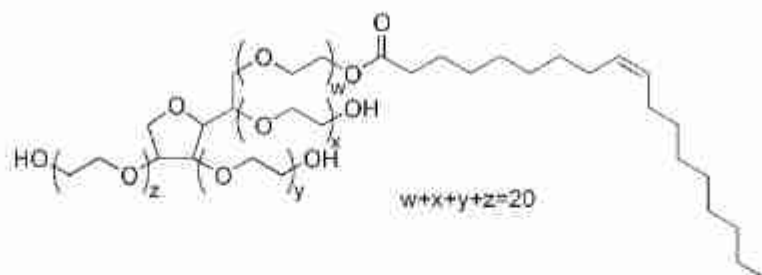
2. Surfaktan

Pemilihan surfaktan juga mempengaruhi formulasi SNEDDS, seperti nilai HLB, viskositas, dan afinitas terhadap fase minyak yang dapat mempengaruhi proses emulsifikasi dan ukuran droplet. Peningkatan konsentrasi surfaktan dapat memperkecil ukuran droplet nanoemulsi, hal ini karena stabilisasi droplet minyak sebagai hasil lokalisasi molekul surfaktan pada antar permukaan air-minyak. Fenomena ini diakibatkan oleh adanya gangguan antarmuka yang ditimbulkan oleh penetrasi air ke dalam droplet minyak dan dimediasi oleh adanya peningkatan konsentrasi surfaktan akan mengeluarkan droplet minyak ke fase air sehingga ukurannya menjadi lebih kecil (Wadhwa dkk., 2011). Formula SNEDDS optimal dapat diperoleh dengan surfaktan sebesar 30-80% b/b (Tran dkk., 2014).

Surfaktan digunakan pada formula untuk meningkatkan bioavailabilitas obat. Mekanisme yang ditunjukkan oleh surfaktan termasuk meningkatkan disolusi obat, meningkatkan permeabilitas epitelial usus halus, meningkatkan permeabilitas *tight junction*, dan menghambat pengeluaran obat oleh P-glikoprotein. Tetapi penggunaan surfaktan dengan jumlah terlalu besar dapat mengiritasi saluran pencernaan atau dapat juga mengubah permeabilitas dinding usus halus menjadi bersifat sebaliknya. Nilai surfaktan dengan HLB dan hidrofilisitas tinggi disukai untuk pembuatan SNEDDS dan dapat memberikan daya sebar yang baik pada lingkungan air (Wadhwa dkk., 2011). Penelitian yang dilakukan oleh Tran dkk., (2014) menggunakan Tween 80 (HLB= 15,0) dan *Cremophor RH 40* (HLB= 14,0) dengan perbandingan 16% dan 34% sebagai komponen surfaktan untuk membuat SNEDDS kuersetin. Formula SNEDDS membutuhkan nilai HLB lebih dari 12 untuk membentuk ukuran tetesan minyak dalam air kurang dari 100 nm dan dapat membentuk penampilan dispersi formula yang jernih (Makadia dkk., 2013).

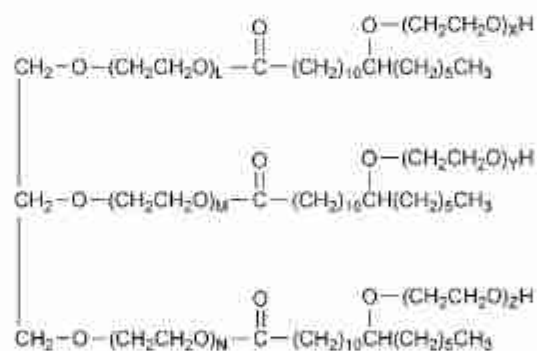
Struktur Tween 80 (*Polysorbate 80/Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate*) adalah campuran dari sebagian ester dari asam lemak, terutama asam oleat, dengan sorbitol dan anhidrida teretoksilasi sekitar 20 mol etilen oksida untuk setiap mol sorbitol dan sorbitol anhidrida (Pharmacopeia, 2008). Tween 80 adalah surfaktan non-ionik hidrofilik dengan nilai HLB sebesar 15,0, digunakan secara luas untuk agen pengemulsi minyak dalam air (M/A). Tween 80 berbentuk minyak berwarna kuning pada suhu 25°C, dengan viskositas sebesar 425 mPa.s (Rowe dkk., 2009). Tween 80 juga terbukti dapat sebagai inhibitor P-glikoprotein sehingga dapat

meningkatkan absorpsi obat (Zhang dkk., 2003). Struktur Tween 80 dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Struktur kimia Tween 80 (Pharmacopeia, 2008)

Croduret 50 SS (*Polyoxyl 50 Hydrogenated Castor Oil*) mengandung terutama ester tri-hidroksistearat dari gliserol teretoksilasi, dengan sejumlah kecil polietilen glikol tri-hidroksistearat dan dari glikol bebas yang sesuai, yang merupakan hasil dari reaksi gliserol tri-hidroksistearat dengan 50 mol etilen oksida. HLB corduret 50 SS adalah 14,1 (Pharmacopeia, 2008) (gambar 3).



Gambar 3. Struktur kimia *Polyoxyl 50 Hydrogenated Castor Oil* (Shah, 2011)

Pada struktur kimia terdapat nilai $E=L+M+N+X+Y+Z$ yaitu jumlah rata-rata mol etilen oksida dari 20 – 100. Pada Croduret 50 SS, jumlah mol etilen oksida adalah 50. Pada penelitian yang dilakukan oleh Hasan dkk., (2015) membuat formula *self-microemulsifying drug delivery system* (SMEDDS) dengan zat aktif kurkumin dan melakukan uji kelarutan menggunakan surfaktan Croduret 50 SS.

Sertifikat analisis Croduret 50 SS dapat dilihat pada lampiran 1 dan spesifikasi Croduret 50 SS berdasarkan USP 32-NF 27 dapat dilihat pada tabel 1.

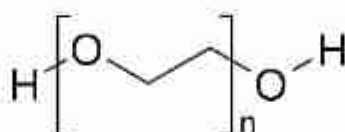
Tabel 1. Spesifikasi Croduret 50 SS (*Polyoxyl 50 Hydrogenated Castor Oil*) (Pharmacopeia, 2008)

Spesifikasi	Persyaratan USP 32-NF 27	Croduret 50 SS
Angka asam	0,0 – 2,0 mg KOH/g	0,5 mg KOH/g
Angka hidroksi	60 – 80 mg KOH/g	72,3 mg KOH/g
Angka iodin	0,0 – 2,0 gI ₂ /100 g	0,8 gI ₂ /100 g
Angka penyabunan	45 – 69 mg KOH/g	53,6 mg KOH/g

3. Ko-surfaktan

Formulasi SNEDDS yang efektif biasanya membutuhkan konsentrasi surfaktan yang tinggi. Surfaktan tidak cukup menurunkan tegangan antar permukaan minyak-air untuk menghasilkan nanoemulsi sehingga diperlukan penambahan molekul amfifilik rantai pendek atau ko-surfaktan untuk membantu menurunkan tegangan permukaan mendekati nol. Ko-surfaktan dapat menembus ke dalam monolayer surfaktan sehingga memberikan fluiditas tambahan sehingga mengganggu fase kristal cair yang terbentuk ketika film surfaktan terlalu kaku (Wankhade dkk., 2010). Ko-surfaktan atau ko-solven seperti etanol, propilen glikol, dan polietilen glikol dibutuhkan untuk memfasilitasi disolusi surfaktan hidrofilik yang konsentrasinya tinggi (Wadhwa dkk., 2011). Fungsi ko-surfaktan pada SNEDDS yaitu dapat memperbesar muatan obat dalam formula, memodulasi waktu emulsifikasi dari SNEDDS, serta dapat memodulasi ukuran tetesan dari nanoemulsi yang terbentuk (Makadia dkk., 2013). Pada penelitian Tran dkk., (2014) membuat formula SNEDDS kuersetin dengan komponen PEG 400 sebagai ko-surfaktan dengan konsentrasi antara 0-30% b/b.

PEG 400 (Polietilen glikol 400) adalah polimer tambahan dari etilen oksida dan air dengan bobot molekul rata-rata sebesar 380 – 420 dengan rumus kimia $H(OCH_2CH_2)_nOH$ (gambar 4), dimana n adalah rata-rata jumlah grup oksietilen. PEG 400 berbentuk cairan kental, tidak berwarna, transparan dan jernih, membeku beku pada 4 - 8° C, pH sekitar 4,0 – 7,0.

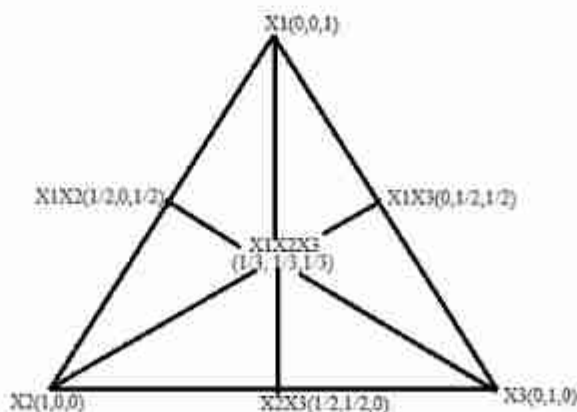


Gambar 4. Struktur kimia PEG 400 (Pharmacopeia, 2008)

B. Simplex Lattice Design

Permasalahan yang biasanya terjadi dalam ranah farmasi adalah ketika komponen untuk formulasi sangat bervariasi sehingga dibutuhkan optimasi untuk memperoleh formula optimal. *Simplex lattice* dapat digunakan untuk menentukan proporsi relatif setiap bahan yang digunakan untuk optimasi formula sehubungan dengan variabel yang ditentukan (Garala Kevin dkk., 2008).

Metode *simplex lattice design* untuk 3 komponen direpresentasikan oleh segitiga sama sisi pada ruang dua dimensi (gambar 5).



Gambar 5. Simplex lattice design untuk 3 komponen (Prajapati dkk., 2009)

Terdapat tiga variabel bebas, satu variabel pada tiap sudut (X_1, X_2, X_3), satu pada pertengahan garis diantara sudut (X_1X_2, X_2X_3, X_1X_3), dan satu pada titik pusat segitiga ($X_1X_2X_3$). Setiap sudut merepresentasikan bahwa formula mengandung konsentrasi maksimum dari 1 komponen, dengan 2 komponen lain pada level minimum. Kemudian titik tengah antara dua sudut merepresentasikan sebuah formula yang mengandung rata-rata dari jumlah minimum dan maksimum dari 2 bahan pada dua sudut segitiga tersebut. Titik tengah segitiga merepresentasikan sebuah formula yang mengandung sepertiga dari masing-masing bahan (Prajapati dkk., 2009).

Hubungan fungsional antara respon (variabel tergantung) dengan komposisi (variabel bebas) dinyatakan dengan persamaan:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{1,2}X_1X_2 + b_{2,3}X_2X_3 + b_{1,3}X_1X_3 + b_{1,2,3}X_1X_2X_3$$

Dimana Y adalah respon (variabel tergantung), b_0 = respon rata-rata aritmatika untuk 7 run, dan b_i adalah koefisien estimasi untuk faktor X_i . Efek utama (X_1, X_2, X_3) merepresentasikan hasil rata-rata perubahan satu faktor pada suatu waktu dari nilai rendah ke tinggi. Hubungan interaksi ($X_1X_2, X_2X_3, X_1X_3, X_1X_2X_3$) menunjukkan bagaimana respon berubah ketika 2 faktor atau lebih berubah secara simultan (Prajapati dkk., 2009).

Perangkat lunak *Design Expert 7.1.5* adalah salah satu program untuk membantu optimasi formula dengan berbagai macam pendekatan, salah satunya adalah metode *Simplex Lattice Design*. Analisis regresi dan analisis variasi (ANOVA) digunakan untuk mendeterminasi koefisien regresi dan signifikansi statistik dari segi model matematika yang sesuai. Pemilihan model yang sesuai

untuk data eksperimen apabila model dinilai paling signifikan dengan $p\text{-value} < 0,05$, nilai koefisien determinasi (R^2) mendekati 1, dan *lack of fit test* menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara model prediksi dan observasi ($p\text{ value} > 0,05$). Selain itu, pada *Design Expert* terdapat grafik kenormalan *internally studentized residual* untuk menentukan normalitas data, dan terdapat grafik *contour plot* untuk menunjukkan kombinasi komponen yang saling mempengaruhi terhadap nilai respon melalui warna-warna yang berbeda.

Tujuan dari optimasi adalah untuk meminimalkan eksperimen yang dilakukan serta menurunkan biaya percobaan dengan hasil maksimum yang diinginkan. Optimasi formula dengan *Design Expert* dilakukan dengan memilih bobot kepentingan tertentu dari nilai 1 hingga 5 berdasarkan kepentingan peneliti. Optimasi dilakukan untuk mendapatkan respon yang sesuai dengan yang diinginkan (*desirability*). Berdasarkan hasil optimasi *Design Expert* dapat diperoleh beberapa solusi dengan berbagai nilai *desirability*. Nilai *desirability* adalah untuk menentukan derajat ketepatan hasil solusi optimal. Nilai *desirability* diharapkan mendekati satu, yang berarti akan semakin tinggi ketepatan optimasi. Setelah solusi formula optimal diperoleh, maka dapat dilakukan verifikasi formula dengan *Design Expert*. Nilai prediksi diperoleh melalui *Point Prediction* yang terdiri dari CI 95% (*Confidence Interval*) yaitu nilai rentang rata-rata hasil observasi pada taraf kepercayaan 95% dan PI 95% (*Prediction Interval*) yaitu rentang nilai prediksi individu hasil observasi pada taraf kepercayaan 95% (Lertsatitthanakorn dkk., 2013; Nurmiah dkk., 2013).

C. Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.)

Jinten hitam atau *Nigella sativa* dikenal sebagai kalonji, dan digunakan sebagai bumbu masakan pada daerah India dan Timur Tengah. Rasa jinten hitam sedikit pahit (Sharma dkk., 2009). Telah banyak penelitian tentang jinten hitam yang berefek sebagai antibakteri, antijamur, antidiabetes, antioksidan, antikanker, antiinflamasi, imunomodulator, aktivitas kardiovaskuler, nefroprotektif, hepatoprotektif, antikonvulsan (Ahmad dkk., 2013).

Klasifikasi ilmiah:

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Magnoliophyta*

Orde : *Ranunculales*

Famili : *Ranunculaceae*

Genus : *Nigella*

Spesies : *sativa* (Sharma dkk., 2009)

N. sativa adalah bunga yang tumbuh tahunan dengan tinggi 20 – 90 cm, dengan daun halus, segmen daun merupakan bagian yang lurus sempit hingga membentuk seperti benang. Bunga bertekstur tipis dan berwarna putih, kuning, merah muda, biru pucat, atau ungu pucat, dengan 5 -10 helai daun bunga. Buah berukuran besar dan membentuk kapsul menggelembung terdiri dari 3 -7 unit kantong yang masing-masing terdiri dari banyak biji.

Biji jinten hitam secara makroskopis berukuran kecil, dikotil, berbentuk segitiga, ukuran 2 –3,5 mm x 1 – 2 mm, berwarna hitam di bagian luar dan berwarna putih di dalamnya, berbau agak harum dan berasa pahit (gambar 6).

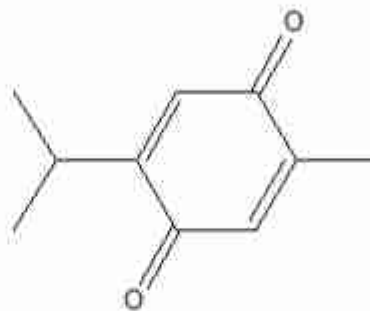
Secara mikroskopis, bagian melintang biji berupa lapisan epidermis tunggal, terdiri atas sel yang berbentuk elips, berdinding tipis, bagian luar dilapisi oleh kutikula papilosa warna coklat tua. Epidermis diikuti oleh 2 – 4 lapisan sel parenkim yang panjang, terdapat lapisan berwarna dengan sel memanjang yang berbentuk persegi panjang. Pada biji jintan hitam secara mikroskopis terlihat berwarna hitam kecokelatan dengan sel parenkim dan gelembung minyak (Ahmad dkk., 2013).



Gambar 6. Biji jintan hitam

Komponen kimia jintan lemak terdiri dari lemak (31 – 35,5% b/b), protein (16 – 19,9% b/b), karbohidrat (33,9%), serat (4,5 – 6,5%) (Boseila dan Messalam, 2011). Komponen lemak dari biji jintan hitam terdiri dari minyak lemak (*fixed oil*) dan minyak atsiri (*volatile oil*). Minyak lemak terdiri dari asam lemak tidak jenuh yaitu asam linoleat (50 – 60%), asam oleat (20%), asam eikodadienoat (3%), dan asam dihimolinoleat (10%), serta asam lemak jenuh yaitu palmitat dan asam stearat dengan total 30% atau kurang. Sterol utama pada biji jintan hitam adalah α -sterol (44 – 45%) dari total sterol di Tunisia dan Iran, diikuti oleh stigmasterol (6,57 – 20,92% dari total sterol) (Cheikh-Rouhou dkk., 2008). Total minyak atsiri sebesar 0,4 – 2,5% (Ali dkk., 2014) dengan komposisi timokuinon, ditimokuinon, *p*-cymene, carvacrol, 4-terpineol, *t*-anethol, longifolene seskuiterpen, α -pinene,

timol, dan lain-lain (Nickavar dkk., 2003). Jinten hitam juga mengandung alkaloid yang terdiri dari dua jenis yaitu alkaloid isokuinolin (*nigellimine* dan *nigellimine N-oxide*) serta alkaloid pirazol (*nigellidine* dan *nigellicine*). Jinten hitam juga mengandung alpha-hederin yaitu triterpene pentasiklik larut air dan saponin yang potensial sebagai anti kanker (Ahmad dkk., 2013).



Gambar 7. Struktur kimia timokuinon (Tubesha dkk., 2013)

Timokuinon adalah komponen dari minyak atsiri (*volatile oil*) yang memiliki efek farmakologis paling utama dari jinten hitam (gambar 7). Jinten hitam memiliki aksi farmakologis yang telah diteliti sejak lama, yaitu antara lain sebagai antibakteri (Halawani, 2009), antikanker (Khan dkk., 2014), antidiabetes (Kaleem dkk., 2006), anti-inflamasi dan analgesik (Bashir dan Qureshi, 2010), antioksidan (Ashraf dkk., 2011), dan yang terutama adalah sebagai imunomodulator (Salem, 2005). Pada penelitian yang dilakukan Sriningsih dan Wibowo (2008) dengan dosis ekstrak etanol jinten hitam sebesar 10, 20, dan 40 mg/200 gram bobot tikus ternyata mampu meningkatkan aktifitas makrofag mencapai 87%. Penelitian yang dilakukan oleh Santoso dkk., (2012) dengan menguji zat utama dalam jinten hitam yaitu minyak atsiri dengan kandungan utama timokuinon sebanyak 0,01% ternyata dapat meningkatkan aktifitas makrofag melalui aktivasi langsung IFN- γ untuk mengaktifkan makrofag. Timokuinon juga dapat mengaktifasi dan meningkatkan

proliferasi sel T sitotoksik (CD8⁺), juga dapat meningkatkan proliferasi dan produksi IFN- γ (Salem dkk., 2011).

D. Sistem Imun

Sistem kekebalan tubuh adalah bagian yang kompleks dari tubuh dan fungsi utamanya adalah untuk membentuk pertahanan dari serangan virus, bakteri, protozoa, dan parasit menular yang disebut mikroorganisme. Pada orang dewasa, sel-sel yang membentuk sistem pertahanan tubuh diproduksi pada sumsum tulang dan beredar di darah dan pembuluh limfatik. Pembuluh limfatik terkecil mengumpulkan cairan getah bening dari jaringan, lalu bergabung bersama melewati kelenjar getah bening di mana agen asing yang terperangkap akan mengarah ke respon imun. Akhirnya satu saluran limfatik utama akan bergabung dengan vena mengembalikan darah kembali ke jantung sehingga getah bening bergabung kembali ke darah. Darah dan getah bening melewati organ seperti limpa dan hati di mana agen asing tadi telah dihancurkan oleh sistem imun (Sompayrac, 2011).

Sistem imun terdiri dari 2 bagian utama yaitu:

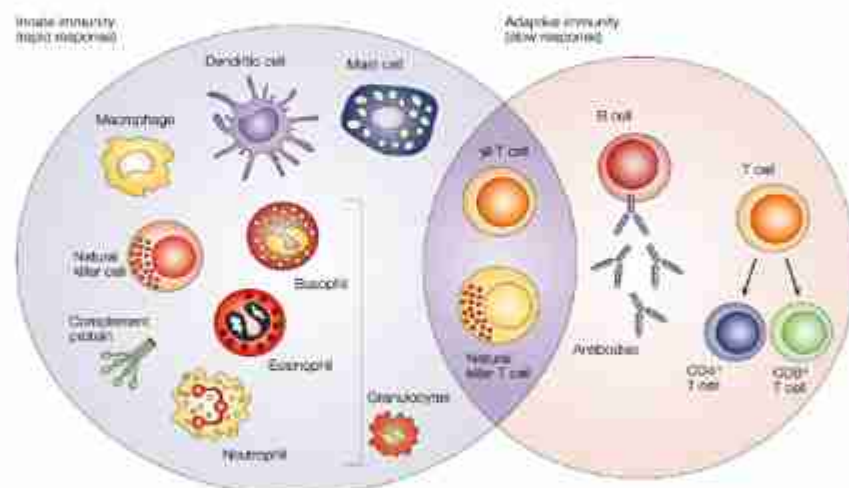
1. Alami (*innate* atau *non-specific*)

Terdiri atas sel *Natural killer* (NK), sel fagosit (neutrofil, monosit, makrofag), sel dendritik, dan granulosit (basofil, sel mast, eosinofil) (gambar 8).

a. Sel *Natural killer* (NK)

Tipe lain dari limfosit yang berperan dalam membunuh sel yang terinfeksi virus. Sel NK dapat bekerja dengan dua cara, yang pertama adalah sel NK memiliki reseptor Fc yang dapat mengenali IgG yang terikat pada sel target dan membunuhnya melalui proses sitotoksik seluler yang bergantung antibodi.

Sedangkan sistem kedua berdasarkan *killer activating receptor* yang akan mengenali molekul berbeda pada permukaan sel target dan *killer-inhibitory receptor* mengenali molekul MHC kelas I pada permukaan sel. Meskipun semua sel normal mengekspresikan MHC kelas I, tetapi ada yang kehilangan kemampuannya untuk mengekspresikan molekul ini, contohnya adalah setelah terinfeksi virus herpes, sel akan kekurangan jumlah MHC kelas I sehingga tidak ada sinyal penghambat dari *killer-inhibitory receptor*, hal ini menyebabkan sel NK dapat memasukan menginsersikan perforin pada membran sel dan memasukkan granzim yang toksik (Delves dan Roitt, 2000).



Gambar 8. Respon imun alami dan adaptif. Fungsi respon imun alami adalah sebagai pertahanan pertama dalam mencegah infeksi yang terdiri dari protein komplemen dan komponen seluler termasuk granulosit (basofil, eosinofil, dan neutrofil), sel mast, makrofag, sel dendritik, dan sel *Natural killer* (NK). Respon imun adaptif memiliki respon yang lambat tetapi memiliki memori pada antigen tertentu, respon imun ini terdiri dari sel B yang menghasilkan antibodi, dan sel T limfosit CD4+ dan CD8+. Sel T *Natural killer* dan sel T $\gamma\delta$ adalah sel limfosit sitotoksik yang merupakan bagian dari respon imun alami dan adaptif (Dranoff, 2004).

b. Sel fagosit.

Terutama adalah monosit (dalam darah) dan makrofag (pada jaringan). Termasuk neutrofil, basofil, dan eosinophil disebut granulosit karena mengandung granul sebagai bahan toksik untuk membunuh bakteri, jamur, dan parasit ukuran

besar. Neutrofil dapat tersirkulasi pada aliran darah dan migrasi pada jaringan jika dibutuhkan, sel ini tidak hidup dalam waktu lama dan dapat diproduksi pada sumsum tulang. Eosinofil mirip seperti neutrophil dan dibutuhkan untuk membunuh mikroorganisme besar seperti parasit. Basofil (ketika dalam darah) dan sel mast (ketika di dalam jaringan) adalah sel pada granulosit, di mana basofil tidak memfagositosis tetapi berperan untuk menarik sel imun lainnya yang terlibat pada alergi. Sel lain adalah monosit (dalam darah) atau makrofag (pada jaringan), makrofag juga termasuk *antigen presenting cells* (APC) yang mempresentasikan antigen pada limfosit sehingga terjadi respon imun (Sompayrac, 2011). Makrofag adalah fagosit mononuklear yang dapat bermigrasi. Makrofag ditemukan dalam jumlah banyak di jaringan konektif, di jaringan submukosa intestinal, di paru-paru, di hati, di limpa, dan sepanjang pembuluh darah spesifik. Fungsi makrofag adalah sebagai pengenalan pathogen (*pathogen-recognitive*) dan sel yang mempresentasikan antigen (*Antigen Presentating scavenger cells*) melalui molekul MHC. Makrofag juga sebagai sumber sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 β , IL-6, TNF- α , dan CXCL8. Sel ini penting dalam proses menelan dan membunuh mikroorganisme serta memulai respon imun selanjutnya. Makrofag dapat membersihkan tubuh dari sel yang mati dan debris. Makrofag mengekspresikan reseptor dipermukaan, yang dapat membedakan berbagai komponen bakteri seperti karbohidrat bakteri (reseptor mannososa, reseptor glukosa), lipid bakteri (reseptor LPS), serta struktur lainnya yang biasanya ditemukan pada permukaan patogen (*toll-like receptors, scavengers receptors*). Pengikatan bakteri pada reseptor makrofag menstimulasi proses penelanan dari patogen pada vesikel intraseluler,

yaitu suatu proses yang disebut fagositosis. Awalnya, reseptor terikat patogen akan dikelilingi oleh membrane dari fagosit. Kemudian diikuti proses internalisasi patogen ke dalam vesikel intraseluler, yang disebut fagosom. Proses perusakan mikroorganisme dalam fagosom terjadi dengan penurunan pH. Selanjutnya, fagosom bergabung dengan lisosom, dimana dapat membunuh patogen melalui enzim lisosomal. Makrofag memproduksi zat toksik untuk membunuh mikroorganisme, termasuk peptida antimikroba, oksida nitrit (NO), anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2). Oksida nitrit dihasilkan oleh *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Superoksida disintesis secara multikomponen, membran-terasosiasi NADPH oksidase pada proses yang dikenal sebagai *respiratory burst*, lebih lanjut dikonversikan oleh enzim superoksida dismutase menjadi H_2O_2 (Schumann, 2012)

c. Sel dendritik

Sel dendritik bekerja sebagai *antigen presenting cells* (APC) ketika mengenali molekul pada mikroorganisme tertentu. Molekul lipopolisakarida pada permukaan bakteri gram negatif merupakan salah satu molekul yang dikenali oleh sel dendritik, sedangkan pada bakteri gram positif yang dikenali oleh sel dendritik adalah asam teikoat. Aktivasi akan menyebabkan sel dendritik mengekspresikan molekul kostimulatori B7 (CD 80 dan CD 86) pada permukaannya yang akan menyediakan sinyal untuk aktivasi limfosit. Sel dendritik yang aktif akan bermigrasi menuju kelenjar getah bening di mana akan mempresentasikan antigen pada sel T. Antigen akan diproses secara intraseluler menjadi peptide pendek oleh proteolitik sebelum dipresentasikan oleh *major-histocompatibility-complex* (MHC)

pada permukaan sel dendritik. Ada 2 kelas molekul MHC yaitu kelas I (HLA-A, HLA-B, dan HLA-C) dan kelas II (HLA-DP, HLA-DQ, dan HLA-DR). Molekul MHC kelas II akan menyampaikan peptida pada reseptor sel T di permukaan sel T-helper (Delves dan Roitt, 2000).

2. Adaptif (*acquired* atau *specific*)

Sistem imun adaptif diperantarai oleh sel limfosit T dan sel limfosit B yang dijelaskan sebagai berikut:

a. Sel limfosit B

Sel ini menetap di kelenjar getah bening dan limpa, sel ini dewasa pada sumsum tulang di mana akan bereaksi pertama pada bagian kecil material asing (disebut pengenalan antigen). Ketika bereaksi dengan antigen, sel B akan menjadi aktif dan melepaskan antibodi spesifik (atau immunoglobulin). Setiap antibodi dapat menempel secara spesifik pada sekuens kimia tertentu dari material asing. Ketika sel B teraktivasi setelah mengenali antigen, sel akan terbagi dua tipe. Tipe pertama adalah sel plasma yang akan membuat dan melepaskan antibodi yang sama dalam jumlah besar ke dalam aliran darah dan akan mati dalam beberapa minggu. Tipe lainnya adalah sel B memori yang dapat hidup selama beberapa tahun. Ketika antigen yang sama datang lagi, sel B ini akan langsung aktif dibandingkan responnya yang pertama sehingga pelepasan antibodi yang spesifik akan lebih efisien. Ada 6 macam immunoglobulin yaitu IgG, IgM, IgA, IgD, dan IgE. IgG akan melawan bakteri dan toksinnya. IgM adalah antibodi pertama yang akan mengenali antigen. IgA terdapat pada permukaan atau secret, seperti saliva. IgA *secretory* memiliki molekul sekretori yang akan melindungi IgA dari pemotongan

enzim proteolitik pada sistem gastrointestinal. IgD terdapat pada permukaan sel B, IgD dan sel B akan mengekspresikan reseptor antigen yang sama. IgE berguna untuk melawan parasit dan berperan pada reaksi alergi. Reaksi antara antibodi yang spesifik dengan antigen akan membantu respon imun menghancurkan mikroorganisme yang disebut imunitas humoral (Delves dan Roitt, 2000)

b. Sel limfosit T

Sel Th (*T helper*) dapat berdiferensiasi menjadi beberapa tipe sel efektor yaitu Th1, Th2, dan sel Th17. Sel ini dikarakterisasi oleh sitokin yang diproduksi. Sel Th1 memproduksi IFN- γ dan mengaktifkan makrofag serta sel lain untuk melawan pathogen intraseluler, sel Th 1-IFN- γ juga menginstruksikan sel B memproduksi antibodi subkelas IgG2. Sel Th2 berperan dalam proteksi parasit multiseluler dan memproduksi IL-4, IL-5, dan IL-13. Sitokin ini mengontrol fungsi eosinofil, basofil, dan epithelia mukosal. IL-4 juga menginstruksikan sel B memproduksi antibodi IgE yang penting untuk melawan parasit melalui efek sel mast dan aktivasi basofil. Sel Th17 memproduksi IL-17 yang berperan dalam mengerahkan neutrofil ke tempat infeksi. Respon sel Th17 termasuk proteksi terhadap bakteri dan jamur ekstraseluler (Medzhitov, 2007).

Sistem imun alami atau *innate immunity* merupakan pertahanan tubuh pertama dalam respon imun. Setelah infeksi, sistem imun alami akan mendeteksi dan menyerang mikroorganisme dalam beberapa menit atau jam, kecuali jika sistem imun alami tidak mampu lagi menyerang mikroorganisme, maka akan dibutuhkan sistem imun adaptif. Makrofag dan granulosit neutrofil merupakan sel fagosit yang paling dominan dalam sistem imun alami (Schumann, 2012).

Keberadaan tiga sub populasi makrofag diusulkan yaitu makrofag teraktivasi, perbaikan jaringan, dan makrofag regulator. Tipe pertama adalah makrofag tipe klasik dengan aktivitas tumorisidal dan mikrobisidal yang akan mengeluarkan sejumlah mediator pro inflamasi dan sitokin, mempresentasikan antigen pada limfosit T, dan berperan pada respon imun seluler. Tipe kedua, diaktifkan oleh IL-4, yang berperan pada perbaikan jaringan dengan menstimulasi fibroblast dan mempromosikan deposisi matriks ekstraseluler. Tipe ketiga memiliki aktivitas regulatori dengan pelepasan IL-10, sebuah sitokin anti-inflamasi. Pada inflamasi, makrofag berperan sebagai APC, berpotensi dalam aktivasi limfosit T dan limfosit B dengan ekspresi molekul kostimulatori, dan pelepasan sitokin pro inflamasi seperti IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , dan kemokin (Cruvinel dkk., 2010).

Imunomodulator adalah suatu zat sintetis atau alami yang dapat memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu atau menekan sistem imun yang terlalu aktif (Naga Preethi dan Rajeshwari, 2014). Golongan imunomodulator dibagi 3 yaitu:

a. *Imunoadjuvan*

Adalah zat yang dapat digunakan dalam kombinasi dengan antigen spesifik untuk menghasilkan kekebalan yang lebih baik dibandingkan jika digunakan sendiri. (Naga Preethi dan Rajeshwari, 2014).

b. *Imunostimulan*

Adalah zat yang digunakan untuk meningkatkan kekebalan tubuh melalui respon imun alami atau adaptif. Imunostimulan dapat meningkatkan fagositosis, sel *Natural killer*, komplemen, lisozim, dan respon antibodi. Aktivasi fungsi

imunologis ini dapat meningkatkan perlindungan terhadap penyakit infeksi. Contoh imunostimulan:

- i) Obat: contohnya adalah Levamisol
- ii) Sitokin : contohnya adalah Interferon (IFN) dan Interleukin (IL) (Naga Preethi dan Rajeshwari, 2014).

c. Imunosupresan

Adalah zat yang dapat menekan sistem imun dan digunakan untuk mengontrol respon imun patologis pada penyakit autoimun, penolakan transplantasi organ, dan lain sebagainya. Contoh obat imunosupresan adalah glukokortikoid, siklosporin, sirolimus, azathioprine, dan lain lain (Naga Preethi dan Rajeshwari, 2014).

E. Landasan Teori

Timokuinon adalah senyawa dalam minyak atsiri ekstrak jinten hitam yang memiliki efek sebagai imunostimulan (Ali dkk., 2014). Penelitian oleh Santoso dkk., (2012) dengan minyak atsiri jinten hitam 0,01% dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Penelitian Sriningsih dan Wibowo (2008) dengan dosis ekstrak etanol jinten hitam 10, 20, dan 40 mg/200 g bobot tikus yang diberikan dua kali sehari ternyata meningkatkan fagositosis makrofag. Penelitian Akrom dan Marsetyawan (2013) ternyata timokuinon yang terkandung dalam ekstrak jinten hitam dengan kadar 6,8; 68; dan 136 mg/kgBB tikus dapat meningkatkan jumlah sel T ($CD4^+$ dan $CD8^+$), meningkatkan jumlah limfosit limpa dan kadar $IFN\gamma$, serta meningkatkan jumlah dan aktivitas fagositosis makrofag.

Penelitian yang dilakukan oleh Ahmed dkk., (2014) melakukan formulasi kuersetin dengan minyak asam linoleate, surfaktan Tween 80 dan Tween 60, serta ko-surfaktan PEG 400 dan propilen glikol, ternyata dapat meningkatkan aktivitasnya sebagai hepatoprotektor. Penelitian Joshi dkk., (2013) dalam memformulasi kurkumin menjadi SNEDDS ternyata dapat meningkatkan efikasinya sebagai neuroprotektor. Penelitian yang dilakukan oleh Shahnaz dkk., (2011) diperoleh hasil apabila nanoemulsi berukuran kurang dari 100 nm akan dapat meningkatkan absorpsi obat menjadi lebih baik. Penelitian oleh Amudha dan Komala (2014) tentang SNEDDS ekstrak *Eclipta alba* memberikan hasil yaitu waktu emulsifikasi kurang dari 1 menit serta nilai *polidispersity index* (PDI) kurang dari 1. Penelitian Tran dkk., (2014) melakukan optimasi SNEDDS dengan konsentrasi minyak sebesar 20-70%, surfaktan antara 30-80%, dan ko-surfaktan antara 0-30%, diperoleh nanoemulsi berbentuk sferis tanpa adanya perubahan, ukuran tetesan kurang dari 200 nm, tidak terjadi endapan, dan zeta potensial lebih dari ± 30 mV agar tidak terjadi agregasi. Penelitian oleh Dash dkk., (2015) melakukan optimasi SNEDDS dengan *Design Expert* dan diperoleh hasil formula optimal mengandung minyak sebesar 30%, surfaktan sebesar 45%, dan ko-surfaktan sebesar 25%.

F. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu:

1. SNEDDS ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dapat dioptimasi dengan metode *Simplex Lattice Design* menjadi formula SNEDDS optimal dengan

komponen minyak ikan hiu cucut botol antara 20-70%, surfaktan antara 30-80%, dan ko-surfaktan antara 0-30%.

2. Formula optimal SNEDDS ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) mampu meningkatkan rasio sel makrofag dan indeks fagositosis makrofag dibandingkan dengan ekstrak jinten hitam.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Bahan

Semua bahan yang digunakan pada penelitian ini memiliki kualitas pro analisis kecuali disebutkan khusus.

- a. Bahan untuk membuat ekstrak jinten hitam antara lain biji jinten hitam (diperoleh dari Pasar Beringharjo) dan etanol 96% (diperoleh dari General).
- b. Bahan untuk uji kelarutan antara lain ekstrak jinten hitam, PEG 400 (diperoleh dari Brataco), propilen glikol, Tween 80, Tween 20, etanol 96% (diperoleh dari General), minyak ikan hiu cucut cotel (diperoleh dari KUD. Cilacap), Croduret 50 SS (*PEG-50 Hydrogenated Castor Oil*) (Croda), plat silikagel 60 F₂₅₄ (Merck), etanol 96% *pro analysis* (Merck), standar timokuinon (Sigma), toluen (Merck), etil asetat (Merck).
- c. Bahan untuk membuat SNEDDS antara lain ekstrak jinten hitam, minyak ikan hiu cucut botol (diperoleh dari KUD. Cilacap), PEG 400 (Brataco), Tween 80 (diperoleh dari General), Croduret 50 SS (*PEG-50 Hydrogenated Castor Oil*) (Croda).
- d. Bahan untuk membuat *artificial gastric fluid* (AGF) terdiri dari akuades (diperoleh dari Brataco), NaCl dan asam sulfat 37% (Merck).
- e. Bahan untuk uji farmakologi terdiri atas tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* umur 8 minggu dengan berat 165 gram $\pm$ 25 gram, ketamin hidroklorida (Pfizer).

- f. Bahan untuk uji imunostimulan antara lain RPMI Medium 1650 *powder* (Gibco), PBS (Gibco), *Fetal Bovine Serum* (Biowest), Pen Strep (*Penicillin Streptomycin*) (Gibco), Fungizone (*Amphotericin B* 250,0 µg/mL) (Gibco), Giemsa (Merck), metanol (Merck), *Latex beads polystyrene* 3,0 µm (Sigma), alkohol 96% kualitas farmasetik (diperoleh dari Brataco).

B. Peralatan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah kompor, oven, neraca analisis digital (Ohaus), alat-alat gelas (pyrex), *stopwatch*, *conical flask* (Iwaki), *vortex mixer* (Thermolyne), *ultrasonicator* (J.P. Selecta), *waterbath* (Mettler), sentrifugator (EBA8), *magnetic stirrer* (Stuart CB162), *yellow tip* (Kan Jian), *blue tip* (LPI), pH meter (HANNA), viscometer Brookfield tipe *cone and plate*, membran filter dengan pori-pori 0,45 µm, kertas saring, *chamber*, TLC scanner (Shimadzu), pipet mikro Socorex® (0,5-10; 5-50; 50-200; 200-1000 µL), *eppendorf tube*, *particle size analyzer* (PSA), spuit 1 mL dan 10 mL (Terumo), spuit oral tikus, plate 24 (Iwaki), kandang tikus (diperoleh dari LPPT), *laminair airflow*, mikroskop *inverted* (Olympus), kulkas, tabung konikal 15,0 mL (Biologix), *coverslip* 13 mm steril (Nunc).

C. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Biji Jinten Hitam

Biji jinten hitam yang diperoleh dari pasar Beringharjo dideterminasi terlebih dahulu. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada untuk membuktikan kebenaran biji jinten hitam yang akan digunakan pada penelitian.

2. Pembuatan Ekstrak Jinten Hitam

Ekstrak diperoleh dengan cara maserasi, yaitu sebanyak 2 kg biji jinten hitam dioven pada suhu 50°C selama 2 jam, lalu digiling hingga halus, hasil gilingan kemudian dimaserasi dengan 12 L etanol 96% hingga seluruh bagian simplisia terendam etanol, lalu disimpan dan diaduk selama 3 hari. Hasil maserasi diambil dan disimpan dalam wadah tertutup rapat, sisa ampas diremaserasi dengan etanol 96% sebanyak 6 L selama 3 hari. Hasil remaserasi kemudian diambil dan digabungkan dengan maserat sebelumnya, lalu disaring dengan kain dan dipanaskan dengan penangas air hingga diperoleh bobot ekstrak konstan (Sugindro dan Djajadisastra, 2008).

3. Karakterisasi Ekstrak

a. Pengamatan organoleptis ekstrak meliputi penampilan fisik, warna dan bau setelah tercapai bobot konstan pada ekstrak.

b. Viskositas

Spindle dipasang pada viskosimeter. Ekstrak jinten hitam dimasukkan ke dalam *cup*. *Spindle* silinder 25 mm yang telah terpasang diarahkan ke dalam *cup* tegak lurus sampai tanda batas. Setelah itu, alat viskosimeter Brookefield tipe *cone and plate* dinyalakan. Kecepatan spindle di atur dari 50; 62,5; 75; 87,5; dan 100 rpm pada suhu 25±1°C dengan interval waktu 10 detik. Hasil viskositas akan langsung dicatat oleh komputer (Eid dkk., 2014).

c. Kadar air

Plat aluminium kosong ditara dalam alat *Moisture Balance*. Sebanyak 1,0 gram ekstrak jinten ditimbang pada plat aluminium tersebut. Alat ditutup, kemudian

alat dinyalakan dan ditunggu hingga suhu 105°C. Hasil kadar air ekstrak yang tertera pada monitor kemudian dicatat.

4. Identifikasi Kuantitatif Ekstrak Etanol Jinten Hitam dengan KLT Densitometri

a. Pembuatan kurva baku timokuinon

Larutan stok timokuinon dibuat sejumlah 10,4 mg/10 mL, kemudian diambil sebanyak 1,0 mL dan dimasukkan dalam labu takar, lalu ditambahkan etanol 96% p.a hingga 5,0 mL. Setelah itu seri larutan baku sebanyak 1, 2, 4, 8, 16, dan 32 µL ditotolkan pada *plate* silikagel 60 F₂₅₄, kemudian dielusi menggunakan fase gerak toluene – etil asetat (98:2) hingga batas atas, lalu *plate* diangkat dan dikeringkan, dan densito dilakukan pada panjang gelombang 256 nm.

b. Uji kuantitatif timokuinon pada ekstrak jinten hitam

Sampel ditimbang dengan seksama sebanyak 200,0 mg lalu diekstraksi dengan etanol 96% p.a hingga 5 mL. Sampel ditotolkan sebanyak 5,0 µL pada *plate* silikagel 60 F₂₅₄ lalu dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah jenuh berisi fase gerak toluene – etil asetat (98: 2). Selanjutnya sampel dielusikan hingga batas atas 8,0 cm lalu diangkat dan dikeringkan, kemudian densito dilakukan pada panjang gelombang 256 nm. Perlakuan dikerjakan sebanyak tiga kali replikasi.

5. Uji Kelarutan Ekstrak Jinten Hitam Dalam Minyak, Surfaktan, dan Kosurfaktan

Prosedur kerja yang digunakan pada tahap ini mengacu pada penelitian Patel dkk., (2011). Pengujian dilakukan dengan menambahkan 200,0 mg ekstrak jinten hitam ke dalam 1,0 gram pembawa (minyak ikan hiu cucut botol, Tween 80,

Croduret 50 SS, Tween 20, PEG 400 dan propilen glikol) secara terpisah. Campuran ini dihomogenkan dengan *vortex* selama 1 menit untuk membantu pelarutan, kemudian dikondisikan dalam *waterbath* pada suhu 45°C selama 10 menit. Proses pelarutan ekstrak dalam pembawa dimaksimalkan dengan alat *ultra sonicator* selama 15 menit dan dibiarkan selama dua hari dalam udara terbuka. Setelah dua hari ekstrak yang tidak terlarut dipisahkan dari ekstrak yang terlarut melalui sentrifugasi 3000 rpm selama 20 menit (EBA8). Supernatan diambil dan ditimbang sebanyak 0,50 gram, dimasukkan ke dalam labu takar dan diekstraksi dengan etanol 96% p.a hingga 5,0 mL. Sampel kemudian ditotolkan sebanyak 5,0 µl pada *plate* silikagel 60 F₂₅₄. Masukkan *plate* ke dalam chamber yang telah jenuh berisi fase gerak toluene – etil asetat (98: 2). Sampel kemudian dielusi hingga batas atas lalu diangkat dan dikeringkan, kemudian densito dilakukan pada panjang gelombang 256 nm (Wagner dkk., 1984). Perlakuan ini dikerjakan sebanyak tiga kali replikasi. Surfaktan dan kosurfaktan yang mampu melarutkan lebih banyak ekstrak jinten hitam merupakan komponen terpilih yang digunakan untuk tahap optimasi selanjutnya.

6. Optimasi Formula SNEDDS dengan *Design Expert 7.1.5*

a. Penentuan komposisi minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan

Optimasi formula SNEDDS menggunakan metode *Simplex Lattice Design* dengan memasukkan batas atas dan batas bawah komponen SNEDDS yaitu minyak ikan hiu cucut botol antara 15-20%, surfaktan antara 65%-70%, dan ko-surfaktan antara 15-20%. Formula hasil *Design Expert 7.1.5* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Rasio komposisi minyak, surfaktan dan ko-surfaktan

<i>Run</i>	Minyak (%)	Surfaktan (%)	Ko-surfaktan (%)	Minyak (g)	Croduret 50 SS (15%) (g)	Tween 80 (85%) (g)	PEG 400 (g)
1	15,000	67,500	17,500	2,250	1,519	8,606	2,625
2	15,000	65,000	20,000	2,250	1,463	8,288	3,000
3	15,000	70,000	15,000	2,250	1,575	8,925	2,250
4	18,333	65,833	15,833	2,750	1,481	8,394	2,375
5	17,500	67,500	15,000	2,625	1,519	8,606	2,250
6	17,500	65,000	17,500	2,625	1,463	8,288	2,625
7	15,833	65,833	18,333	2,375	1,481	8,394	2,750
8	15,000	70,000	15,000	2,250	1,575	8,925	2,250
9	17,500	67,500	15,000	2,625	1,519	8,606	2,250
10	20,000	65,000	15,000	3,000	1,463	8,288	2,250
11	15,833	68,333	15,833	2,375	1,537	8,712	2,375
12	20,000	65,000	15,000	3,000	1,463	8,288	2,250
13	15,000	65,000	20,000	2,250	1,463	8,288	3,000
14	16,667	66,667	16,667	2,500	1,500	8,500	2,500

b. Optimasi formula SNEDDS

Bobot ekstrak jinten hitam sebanyak 200 mg/g sistem ditambahkan ke dalam masing-masing formula sistem SNEDDS yang dibuat sebanyak 15,0 gram (tabel 2). Campuran dihomogenkan dengan *vortex* selama 2 menit, kemudian di sonikasi selama 15 menit. Pengukuran tingkat kejernihan dilakukan dengan cara formula SNEDDS sebanyak 100,0 μ L di masukkan ke dalam labu ukur, ditambahkan akuadest hingga 5,0 mL lalu diukur kejernihan dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 650 nm menggunakan blanko akuadest. Semakin jernih atau transmittan semakin mendekati transmittan akuades (100%) maka diperkirakan tetesan emulsi telah mencapai ukuran nanometer.

Waktu emulsifikasi dilakukan dengan mengambil 1,0 mL SNEDDS kemudian diteteskan ke dalam 250,0 mL media AGF (NaCl 500,0 mg, HCL 37% 1,75 mL, lalu ditambahkan akuades hingga 250,0 mL dengan kondisi pH 1,2)

(Martien dkk., 2006) yang dikondisikan dengan alat *stirrer* 100 rpm pada suhu 37°C. Waktu emulsifikasi dicatat dengan bantuan *stopwatch*. Seluruh formula diuji kejernihan dan waktu emulsifikasi sebagai respon yang dimasukkan ke dalam perangkat lunak *Design Expert* lalu dianalisis hingga diperoleh formula optimal.

7. Verifikasi Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam

Ekstrak jinten hitam ditimbang sebanyak 200,0 mg/g sistem, lalu ditambahkan ke dalam 5,0 g sistem SNEDDS optimal. Formula dihomogenkan dengan *vortex* selama 2 menit, kemudian disonikasi selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan uji kejernihan dan penghitungan waktu emulsifikasi.

Uji kejernihan disiapkan dari 100,0 µL formula SNEDDS optimal yang berisi ekstrak jinten hitam 200,0 mg/g sistem ditambahkan akuades hingga volume akhir 5,0 mL (Patel dkk., 2011). Campuran dihomogenkan dan diukur kejernihannya pada panjang gelombang 650 nm dengan blanko akuades untuk mengetahui tingkat kejernihannya (Patel dkk., 2011). Semakin jernih atau transmittan semakin mendekati transmittan akuades (100%) maka diperkirakan tetesan emulsi telah mencapai ukuran nanometer.

Penghitungan waktu emulsifikasi dilakukan terhadap SNEDDS ekstrak jinten hitam dalam media AGF (*artificial gastric fluid*) sebanyak 250,0 mL suhu 37°C yang dikondisikan di atas *magnetic stirrer* dengan kecepatan 100 rpm. Sebanyak 1,0 mL SNEDDS ekstrak jinten hitam diteteskan ke dalam media secara cepat. Pengamatan dilakukan terhadap waktu yang diperlukan oleh SNEDDS yang berisi ekstrak jinten hitam untuk membentuk nanoemulsi yang ditandai dengan telah tercampurnya ekstrak jinten hitam secara sempurna di dalam media. Formula

SNEDDS optimal di verifikasi berdasarkan hasil analisis *Design Expert 7.1.5*.

8. Uji Viskositas Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam

Spindle dipasang pada viskosimeter. Formula SNEDDS optimal sebanyak 15 g yang mengandung ekstrak jinten hitam 200,0 mg/g sistem dimasukkan ke dalam cup. *Spindle* silinder 25 mm yang telah terpasang diarahkan ke dalam cup tegak lurus sampai tanda batas. Setelah itu, alat viskosimeter Brookefield tipe *cone and plate* dihidupkan. Kecepatan *spindle* di *setting* dari 50; 62,5; 75; 87,5; dan 100 rpm pada suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$ dengan interval waktu 10 detik. Hasil akan langsung dicatat oleh komputer. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali (Eid dkk., 2014).

9. Karakterisasi Ukuran dan Distribusi Ukuran Tetesan Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam

Ukuran dan distribusi tetesan nanoemulsi dikarakterisasi dengan alat *particle size analyzer* (PSA). SNEDDS ekstrak jinten hitam optimal sebanyak 100,0 μl dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL, ditambahkan akuades hingga tanda dan dicampur. Sampel diambil sebanyak 2,0 mL dan dimasukkan ke dalam kuvet untuk dianalisis. Pengukuran zeta potensial dilakukan dengan cara sampel nanoemulsi sebanyak 2,0 mL dimasukkan ke dalam kuvet elektroda dan dimasukkan ke dalam alat PSA.

10. Uji Immunostimulan Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam

a. Pengurusan *Ethical Clearance*

Pengurusan *ethical clearance* diajukan kepada Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM).

b. Pemilihan dan pengelompokan hewan uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus jantan galur *Sprague Dawley* sebanyak 25 ekor, umur 8 minggu dengan berat badan 160 gram $\pm$ 25 gram, kondisi normal, dipelihara secara baku. Hewan uji dipelihara dalam kandang kecil, setiap kandang hanya ditempati oleh lima ekor hewan uji dan diadaptasikan dengan kondisi laboratorium selama 1 minggu kemudian dikelompokkan secara acak. Hewan uji diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM).

c. Kondisi pemeliharaan hewan uji

Pakan standar (pelet) berasal dari PT. Japfa Comfeed Indonesia Tbk. Yang mengandung komponen air maksimal 12%, protein kasar minimal 15%, lemak kasar 3-7%, serat kasar maksimal 6%, abu maksimal 7%, kalsium 0,9-1,1%, fosfor 0,6-0,9%. Kandang berupa kotak yang terbuat dari plastik dan kawat dengan ukuran lubang 1,6 cm² sebagai penutup. Alas kandang terbuat dari sekam yang bersih, kering, tidak beracun, dan tidak menyebabkan alergi. Temperatur kandang untuk pemeliharaan tikus galur *Sprague Dawley* yaitu $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, dengan rata-rata kelembaban relatif $55\pm 5\%$. Intensitas cahaya yang diperlukan adalah 75-125 fc, dengan siklus siang-malam sebanyak 12-12 jam atau 10-14 jam.

d. Uji imunostimulan

Tikus yang telah dipilih kemudian dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok dan setiap kelompok terdiri dari 5 ekor (tabel 3). Perlakuan dilakukan selama 15 hari dengan pemberian ekstrak dan formula SNEDDS 1 kali sehari.

Tabel 3. Pembagian kelompok dan perlakuan hewan uji

Kelompok	Perlakuan
Kelompok 1	Diberi perlakuan dengan formula optimal SNEDDS ekstrak jinten hitam 200 mg/Kg BB tikus per oral
Kelompok 2	Diberi perlakuan dengan dosis ekstrak jinten hitam 200 mg/Kg BB tikus per oral
Kelompok 3	Diberi perlakuan formula SNEDDS tanpa ekstrak jinten hitam (plasebo) per oral
Kelompok 4	Diberi perlakuan ekstrak meniran 0,540 mL/tikus per oral
Kelompok 5	Tanpa perlakuan

Dari kelima kelompok tikus pada hari ke-15, hewan uji dikorbankan dengan pertama kali dianestesi menggunakan 10% ketamine hidroklorida (Ketamil®) dengan dosis 100 mg/KgBB tikus melalui injeksi intra muskular, kemudian dikorbankan dengan dislokasi leher. Tikus diletakkan dalam posisi telentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%, kemudian disuntikkan 10 mL medium RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum, ditunggu selama 3 menit sambil ditepuk-tepuk perlahan. Cairan peritoneum dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan menekan rongga dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi yang dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat disentrifus pada 1200 rpm, 4°C selama 10 menit. Supernatant dibuang, pellet diresuspensi dengan 3,0 mL medium RPMI komplet yang mengandung FBS 10% (v/v). Jumlah sel dihitung dengan *haemocytometer*, kemudian ditambahkan dengan medium komplet sehingga didapatkan suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ /mL. Suspensi sel ditumbuhkan dalam *microcultur* 24 sumuran yang telah diberi *coverslip* bulat. Setiap sumuran diisi 200 μ L (5×10^5 sel),

lalu ditambahkan medium RPMI komplet hingga 1,0 mL. Sel diinkubasi dalam *incubator* CO₂ 5%, 37°C selama 24 jam.

Partikel lateks diresuspensikan dalam PBS sehingga didapatkan konsentrasi $2,5 \times 10^7$ /mL. Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci 2 kali dengan medium RPMI, kemudian ditambahkan suspensi lateks 200,0 μ l (5×10^6 /mL) pada masing-masing sumuran, diinkubasikan dalam *incubator* CO₂ 5%, 37°C selama 60 menit. Sel kemudian dicuci PBS tiga kali, dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan methanol absolut selama 30 detik. Setelah kering dipulas dengan giemsa 20%(v/v). Sel makrofag yang memfagositosis partikel lateks diperiksa dengan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali. Indeks fagositosis (IF) ditentukan dengan membagi jumlah keseluruhan lateks yang difagositosis oleh 100 sel makrofag terhitung. Rasio fagositosis dihitung dari total sel makrofag aktif dibagi oleh 100 makrofag terhitung kemudian dikalikan 100% (Akrom dan Marsetyawan, 2013; Maqsood dkk., 2010; Santoso dkk., 2012; Sriningsih dan Wibowo, 2008; Thirach dan Vanittanakom, 2008; Wijayanti, 1999).

II. Uji *Extract Loading Formula* Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam

Uji dilakukan dengan menambahkan seri bobot ekstrak jinten hitam terhadap formula optimal SNEDDS ekstrak jinten hitam yaitu 300, 400, 500, 600, 700, dan 800 mg/g sistem ke dalam 5,0 gram sistem SNEDDS. Ekstrak dalam sistem SNEDDS dihomogenkan dengan *vortex* selama 2 menit lalu disonikasi selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan uji kejernihan dan penghitungan waktu emulsifikasi.

Uji kejernihan disiapkan dari 100,0 μ L SNEDDS berisi ekstrak jinten hitam berbagai variasi dosis, kemudian ditambahkan akuades hingga volume akhir 5,0 mL

(Patel dkk., 2011). Campuran dihomogenkan dan diukur serapannya pada panjang gelombang 650 nm dengan blanko akuades untuk mengetahui tingkat kejernihannya (Patel dkk., 2011).

Penghitungan waktu emulsifikasi dilakukan terhadap SNEDDS ekstrak jinten hitam dalam media AGF (*artificial gastric fluid*) sebanyak 250,0 mL suhu 37°C yang dikondisikan di atas *magnetic stirrer* dengan kecepatan 100 rpm. Sebanyak 1,0 mL SNEDDS ekstrak jinten hitam ditetaskan ke dalam media secara cepat. Formula SNEDDS yang mampu menampung ekstrak jinten hitam paling banyak apabila memberikan penampilan visual yang masih jernih dan waktu emulsifikasi kurang dari 1 menit.

12. Uji Stabilitas SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam

a. Uji penyimpanan pada suhu ruang selama 90 hari

Uji stabilitas dilakukan dengan cara SNEDDS ekstrak jinten hitam dosis 200; 500; dan 600 mg/g sistem disimpan pada suhu ruang (25°C) selama 90 hari. Selanjutnya diamati jika terjadi perubahan fisik, bau, warna pada sediaan SNEDDS ekstrak jinten hitam berbagai variasi dosis serta dilakukan uji kejernihan dan waktu emulsifikasi sebelum dan setelah perlakuan.

b. Uji *freeze-thawing*

Metode *freeze-thawing* dilakukan dengan cara SNEDDS ekstrak jinten hitam dosis 200; 500; dan 600 mg/g sistem disimpan pada suhu -21°C selama 24 jam kemudian disimpan pada suhu ruang 25°C selama 24 jam (satu siklus). Proses ini diulang hingga 6 siklus, lalu diamati perubahan fisik, warna, bau. Uji kejernihan dan waktu emulsifikasi dilakukan sebelum dan setelah perlakuan.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian untuk formulasi meliputi jenis minyak yaitu minyak ikan hiu cucut botol (*Centrophorus sp*), jenis surfaktan yaitu Tween 80 dan Croduret 50 SS, jenis ko-surfaktan yaitu PEG 400, serta seri konsentrasi surfaktan, ko-surfaktan dan minyak ikan hiu cucut botol (*Centrophorus sp*). Variabel bebas untuk uji aktivitas imunostimulan yaitu dosis ekstrak jinten hitam.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian untuk formulasi yaitu ukuran dan distribusi ukuran tetesan nanoemulsi, potensial zeta tetesan nanoemulsi, waktu emulsifikasi, viskositas dan stabilitas sediaan SNEDDS. Sedangkan, variabel tergantung untuk farmakologi yaitu indeks fagositosis dan rasio fagositosis makrofag.

3. Variabel terkendali

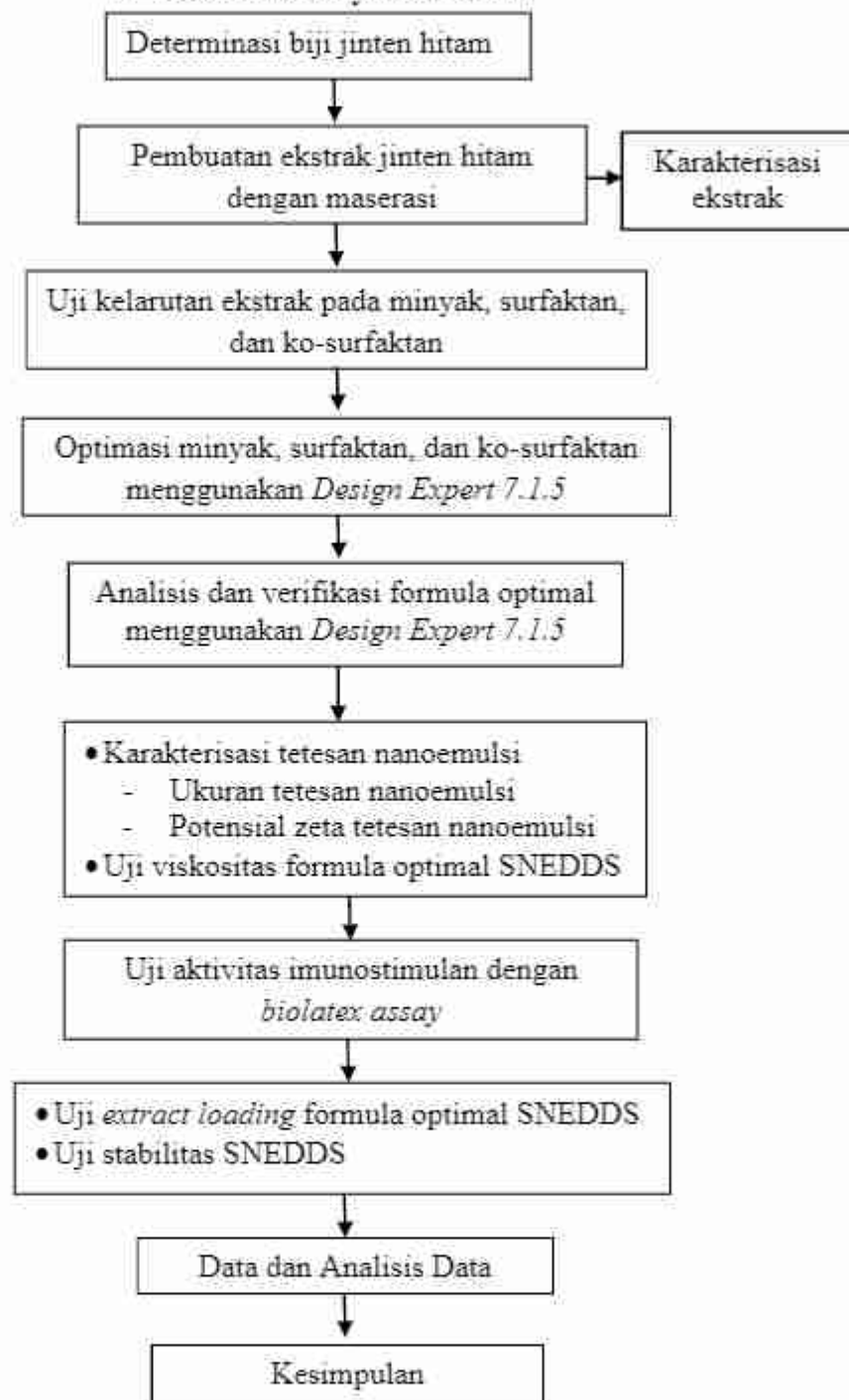
Variabel terkendali pada penelitian untuk formulasi adalah kondisi percobaan yaitu suhu, kecepatan pencampuran, dan waktu pencampuran. Sedangkan, untuk farmakologi yaitu galur hewan uji, jenis kelamin, umur, berat badan, makan dan minum hewan uji, pemeliharaan hewan uji, dan kualitas bahan uji.

E. Analisis Data

1. Ukuran dan distribusi ukuran tetesan nanoemulsi diamati dengan *particle size analyzer* (PSA).
2. Penghitungan waktu emulsifikasi dilakukan menggunakan *stopwatch*.

3. Uji stabilitas termodinamik SNEDDS jinten hitam dengan membandingkan nilai transmitan dan waktu emulsifikasi sebelum dan setelah perlakuan lalu diuji statistik dengan *single sample t-test* (Openstat).
4. Uji aktivitas imunostimulan non-spesifik dengan membandingkan indeks fagositosis dan rasio sel makrofag antar kelompok perlakuan, lalu diuji statistik dengan SPSS 16.0 (*Statistical and Product Service Solution*), data diuji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* dan diuji homogenitas dengan *levene test* kemudian ditentukan analisis statistiknya termasuk parametrik atau non-parametrik. Jika data menunjukkan normal tetapi tidak homogen maka dianalisis dengan *Kruskall Wallis*, dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok.

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 9. Skema penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Biji Jinten Hitam

Hasil determinasi menyatakan bahwa sampel yang digunakan adalah benar yaitu biji jinten hitam yang digunakan merupakan suku tanaman *Ranunculaceae* dengan jenis *Nigella sativa* L. (lampiran 2).

B. Pembuatan Ekstrak Jinten Hitam

Pembuatan ekstrak jinten hitam didasarkan pada penelitian Sugindro dan Djajadisastra (2008) dengan metode maserasi selama 3 hari kemudian menggunakan pelarut etanol 96%. Rendemen yang diperoleh dari proses ekstraksi adalah sebesar 25,34% (lampiran 3). Pada penelitian yang dilakukan oleh Bassim Atta (2003) diperoleh rendemen minyak jinten hitam sebesar 24,76% dengan metode *cold-pressure*, serta sebesar 34,78% dengan metode *soxhlet* menggunakan pelarut petroleum eter. Perbedaan rendemen yang dihasilkan dapat terjadi karena metode penyarian yang berbeda.

C. Karakterisasi Ekstrak Jinten Hitam

Tabel 4. Karakterisasi ekstrak jinten hitam

Karakterisasi	Hasil
Penampilan fisik, warna, bau	Minyak, warna kuning kecoklatan, bau khas minyak atsiri
Viskositas	19,32 – 21,76 cP
Kadar air	1,00%
Asam lemak jenuh	13,66% b/v
Asam lemak tidak jenuh	85,75% b/v

Karakterisasi ekstrak jinten hitam dapat dilihat pada tabel 4. Hasil pemeriksaan organoleptis menunjukkan bahwa ekstrak jinten hitam berupa minyak,

berwarna kuning kecoklatan, dengan bau khas minyak atsiri. Viskositas ekstrak jintan hitam hasil penelitian pada rentang 19,32-21,76 cP. Viskositas ekstrak jinten hitam lebih kecil daripada penelitian yang dilakukan oleh Al-Jumaily dan Al-Jumaily (2015) dengan hasil viskositas ekstrak jinten hitam pada berbagai pelarut yaitu metanol sebesar 40,65 cP, kloroform sebesar 54,38 cP, dan n-heksan sebesar 42,85 cP. Pada penelitian diperoleh viskositas lebih kecil karena terdapat perbedaan metode penyarian, perbedaan viskositas penyari, dan perbedaan metode penguapan ekstrak (lampiran 3). Kadar air ekstrak jinten hitam hasil penelitian diperoleh rata-rata 1,00% (lampiran 4). Berdasarkan *Materia Medika Indonesia* Jilid I, persyaratan kadar air adalah kurang dari 10,00 % (Depkes RI, 2009). Semakin rendah kadar air dalam ekstrak maka meminimalkan mikroorganisme berkembang. Hal ini akan berpengaruh pada kestabilan zat aktif dalam ekstrak jinten hitam.

Asam lemak utama yang terdapat dalam minyak jinten hitam adalah asam lemak jenuh yaitu asam palmitat sebesar 13,26% dan asam heptadekanoat sebesar 0,4%, sedangkan kandungan asam lemak tidak jenuh yaitu asam palmitoleat sebesar 0,25%, asam oleat sebesar 2,41%; asam linoleat sebesar 3,28%; asam trans-9-elaidat (isomer trans dari asam oleat) sebesar 77,27%; dan asam cis-8, 11, 14-eikosatrionat sebesar 2,54%. Total asam lemak jenuh ekstrak jinten hitam pada penelitian adalah sebesar 13,66% b/v sedangkan total asam lemak tidak jenuh sebesar 85,75% (lampiran 5) (Bassim Atta, 2003).

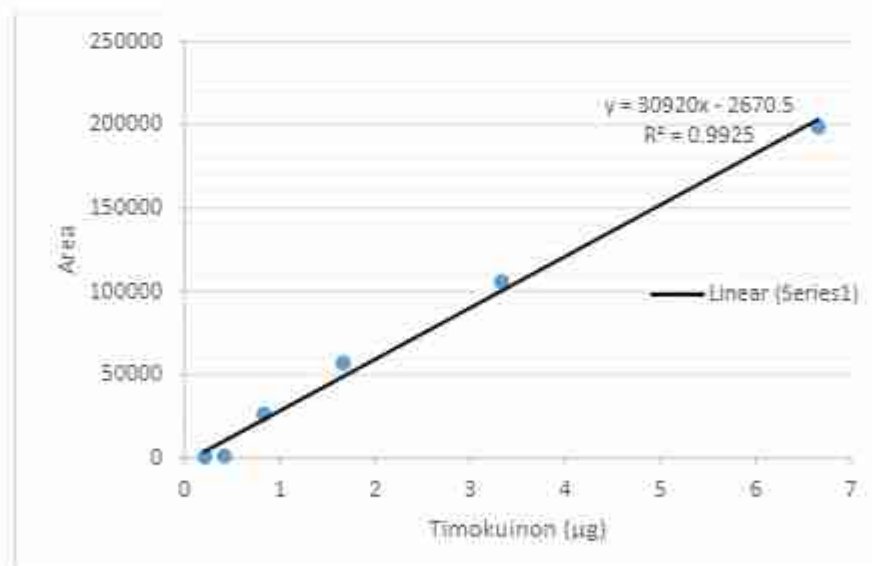
Pada penelitian yang dilakukan oleh Asdadi dkk., (2014) meneliti total asam lemak pada minyak jinten hitam yang berasal dari Maroko, diperoleh hasil bahwa total asam lemak jenuh adalah sebesar $16,8 \pm 0,5\%$ dan total asam lemak tidak jenuh

adalah sebesar $82,9 \pm 0,5\%$. Penelitian yang dilakukan oleh Gharby dkk., (2013) memeriksa kandungan asam lemak minyak jinten hitam dengan metode *cold-press* yaitu total asam lemak jenuh sebesar $16,8 \pm 0,5\%$ dan total asam lemak tidak jenuh sebesar $82,9 \pm 0,5\%$. Apabila digunakan metode ekstraksi pelarut dapat diperoleh total asam lemak jenuh sebesar $15,5 \pm 0,5\%$ dan total asam lemak tidak jenuh sebesar $82,1 \pm 0,5\%$. Hasil penelitian sesuai dengan penelitian yang pernah dilakukan karena kandungan total asam lemak tidak jenuh lebih besar dibandingkan kandungan total asam lemak jenuh pada minyak jinten hitam.

D. Identifikasi Kuantitatif Ekstrak Etanol Jinten Hitam dengan KLT Densitometri

1. Pembuatan kurva baku timokuinon

Kurva baku timokuinon dibuat dari enam seri bobot timokuinon yaitu 0,21; 0,42; 0,83; 1,66; 3,33; dan 6,66 μg (gambar 10).



Gambar 10. Kurva baku timokuinon

Bobot timokuinon dalam sampel kemudian diplotkan terhadap area dan diperoleh persamaan kurva baku yaitu $Y = 30920x - 2670,5$ dengan nilai R^2 sebesar

0,9925. Persyaratan linearitas kurva baku adalah apabila $R^2 > 0,98$ (Muzaffar dkk., 2013). Linearitas menggambarkan kemampuan suatu metode analisis dalam memberikan respon yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Data perhitungan kurva baku dapat dilihat pada lampiran 6.

2. Uji kuantitatif timokuinon dalam ekstrak jinten hitam

Area yang diperoleh dari hasil densitometri kemudian digunakan untuk menghitung kadar timokuinon di dalam ekstrak jinten hitam. Kadar timokuinon kemudian dikalkulasikan dari persamaan kurva regresi $Y = 30920x - 2670,5$ dengan memasukkan nilai area timokuinon sebagai nilai Y dan jumlah timokuinon (μg) dalam sampel sebagai nilai X (tabel 5).

Tabel 5. Penetapan kadar timokuinon dalam ekstrak jinten hitam

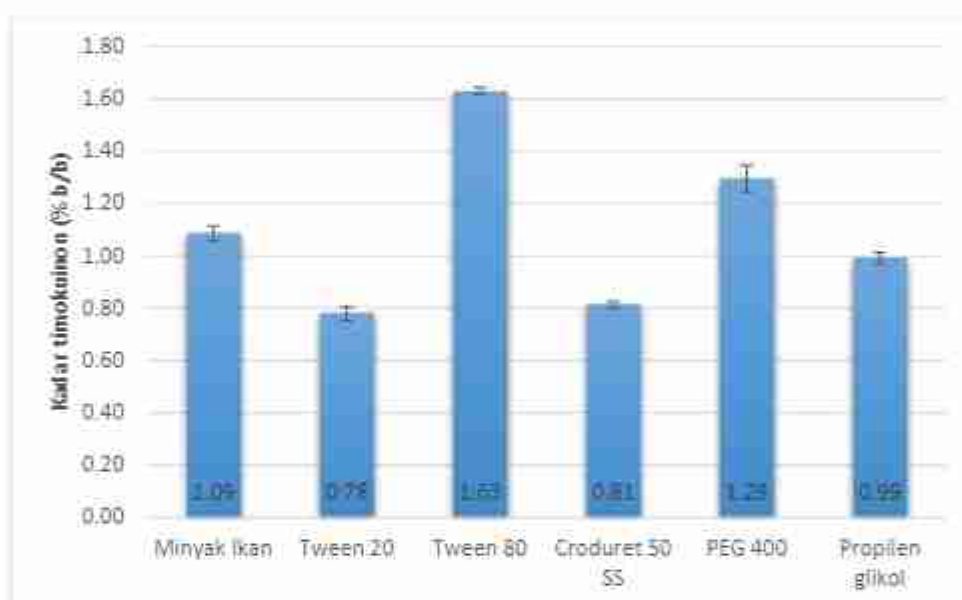
Bobot sampel (μg)	Timokuinon		Kadar Timokuinon (% b/b)
	Area	dalam sampel (μg)	
200,1	114995,2	3,81	1,90
	111525,1	3,69	1,85
	118575,4	3,92	1,96
Rata-rata kadar timokuinon			1,90 $\pm$ 0,06

Berdasarkan perhitungan, diperoleh kadar timokuinon dalam ekstrak jinten hitam sebesar 1,90 $\pm$ 0,06 %b/b dengan nilai RSD sebesar 3,00%. Menurut Ali dkk., (2014) kadar timokuinon dalam ekstrak jinten hitam adalah sebesar 0,4 – 2,5 %. Persyaratan nilai RSD berdasarkan RSD horwitz untuk jumlah analit 1,0 – 10,0 % adalah $\leq 4,0\%$. Presisi menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual yang diukur melalui penyebaran nilai individual terhadap rata-rata ketika metode dilakukan secara berulang pada sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Hasil RSD yang masih memenuhi persyaratan menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan menghasilkan data dengan presisi yang baik (Srivastava, 2010).

E. Uji Kelarutan Ekstrak Jinten Hitam Dalam Minyak, Surfaktan, dan Ko-surfaktan

Timokuinon dalam ekstrak jinten hitam dilarutkan dalam minyak ikan hiu cucut botol, surfaktan yaitu Tween 20, Tween 80, dan Croduret 50 SS, serta dalam ko-surfaktan PEG 400 dan propilen glikol (gambar 11).



Gambar 11. Kelarutan timokuinon dalam minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan

Kelarutan timokuinon dalam minyak ikan hiu cucut botol tergolong tinggi yaitu $1,09 \pm 0,03$ % b/b dengan nilai RSD sebesar 2,63%. Kelarutan timokuinon tergolong tinggi dalam minyak ikan hiu cucut botol karena kandungan utama ekstrak jinten hitam adalah asam trans-9-elaidat (isomer trans dari asam oleat) sebesar 77,27%, sedangkan kandungan utama minyak ikan hiu cucut botol adalah asam oleat sebesar 47,81% (lampiran 7).

Kelarutan timokuinon dalam Tween 80 sebesar $1,63 \pm 0,01$ %b/b dengan nilai RSD sebesar 0,81%, kelarutan timokuinon dalam Croduret 50 SS sebesar $0,81 \pm 0,01$ %b/b dengan nilai RSD sebesar 1,64%, akan tetapi kelarutan timokuinon dalam Tween 20 diperoleh paling kecil diantara jenis surfaktan lainnya yaitu sebesar $0,78 \pm 0,03$ %b/b dengan nilai RSD sebesar 3,38%. Kelarutan timokuinon dalam ko-surfaktan PEG 400 lebih tinggi daripada dalam propilen glikol yaitu sebesar $1,29 \pm 0,05$ %b/b dengan nilai RSD sebesar 3,92%, sedangkan kelarutan timokuinon dalam propilen glikol adalah sebesar $0,99 \pm 0,02$ %b/b dengan nilai RSD sebesar 2,13%. Data perhitungan dan kromatogram dapat dilihat pada lampiran 8.

F. Desain Formula SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam dengan *Design Expert*

7.1.5

Berdasarkan hasil uji kelarutan maka minyak ikan hiu cucut botol dapat digunakan sebagai fase minyak dalam pembuatan SNEDDS ekstrak jinten hitam, sedangkan fase surfaktan yang akan digunakan adalah kombinasi dari tween 80 dan Croduret 50 SS, dan fase ko-surfaktan yang digunakan adalah PEG 400. Optimasi formula SNEDDS menggunakan metode *Simplex Lattice Design*. Batas atas dan batas bawah masing-masing komponen minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan diperoleh berdasarkan percobaan pendahuluan yang dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Batas bawah dan batas atas komponen SNEDDS

Komponen SNEDDS	Batas bawah	Batas atas
Minyak ikan hiu cucut botol	15%	20%
Surfaktan	65%	70%
PEG 400	15%	20%

Pada penelitian digunakan kombinasi surfaktan Croduret 50 SS (*Polyoxyl 50 Hydrogenated Castor Oil*) sebesar 15% dengan Tween 80 sebesar 85% dalam total

surfaktan untuk meningkatkan kejernihan nanoemulsi. Penggunaan Tween 80 tunggal sebagai surfaktan ternyata efisiensi emulsifikasinya lebih rendah dibandingkan *Cremophor RH 40 (Polyoxyl 40 Hydrogenated Castor Oil)*, sehingga penggunaan kombinasi surfaktan ini dibutuhkan untuk membentuk sistem nanoemulsi yang jernih (Tran dkk., 2014). Croduret 50 SS memiliki nilai HLB sebesar 14,1 sedangkan Tween 80 memiliki nilai HLB sebesar 15,0, akan tetapi struktur molekul surfaktan juga berperan pada mekanisme pembentukan nanoemulsi. Croduret 50 SS merupakan minyak kastor terpolietoksilasi yang merupakan campuran asam risinoleat, ester poliglikol, ester poliglikol gliserol, dan poliglikol. Sedangkan Tween 80 adalah turunan dari sorbitol polioksilasi dan asam oleat. Croduret memiliki struktur cabang rantai alkil sedangkan Tween 80 memiliki struktur rantai alkil yang lurus. Perbedaan struktur rantai alkil mempengaruhi penetrasi minyak pada molekul hidrofobik dari surfaktan yang menghasilkan sistem nanoemulsi sehingga pada penelitian digunakan kombinasi Croduret 50 SS dan Tween 80 untuk meningkatkan nilai transmitan sebagai indikasi ukuran nanoemulsi yang semakin kecil, karena struktur alkil Croduret 50 SS yang bercabang akan lebih efektif dalam pembentukan nanoemulsi (Rao dan Shao, 2008)

Surfaktan *Cremophor RH 40 (Polyoxyl 40 Hydrogenated Castor Oil)* biasanya tidak digunakan secara tunggal pada sediaan farmasi tetapi digunakan dengan kombinasi bersama surfaktan yang lain (Strickley, 2004). Pada penelitian yang dilakukan oleh Cuine dkk., (2008), penggunaan *Cremophor RH 40* tunggal ternyata memperpanjang waktu emulsifikasi hingga terdispersi sempurna karena dapat terbentuk gel kental dan menghambat penetrasi air ke dalam molekul

surfaktan. Pada percobaan Shah, (2011) memberikan hasil bahwa penggunaan *polyoxyl 40 hydrogenated castor oil* tunggal memberikan waktu emulsifikasi yang lebih lama dibandingkan Tween 80 tunggal, hal ini terjadi akibat perbedaan karakteristik dari *polyoxyl 40 hydrogenated castor oil* yang berbentuk semi padat pada suhu di bawah 30°C dibandingkan penampilan fisik Tween 80 yang berbentuk cairan kuning. Hal ini yang menjadikan dasar pembuatan formula SNEDDS ekstrak jinten hitam menggunakan kombinasi dua surfaktan yaitu Croduret 50 SS dan Tween 80.

SNEDDS ekstrak jinten hitam dibuat dengan bobot total 15 gram sistem yang mengandung minyak ikan hiu cucut botol, surfaktan (Croduret 50 SS dan Tween 80), PEG 400, serta ekstrak jinten hitam 200 mg/g sistem SNEDDS (tabel 7).

Tabel 7. Desain dan hasil respon formula percobaan SNEDDS ekstrak jinten hitam

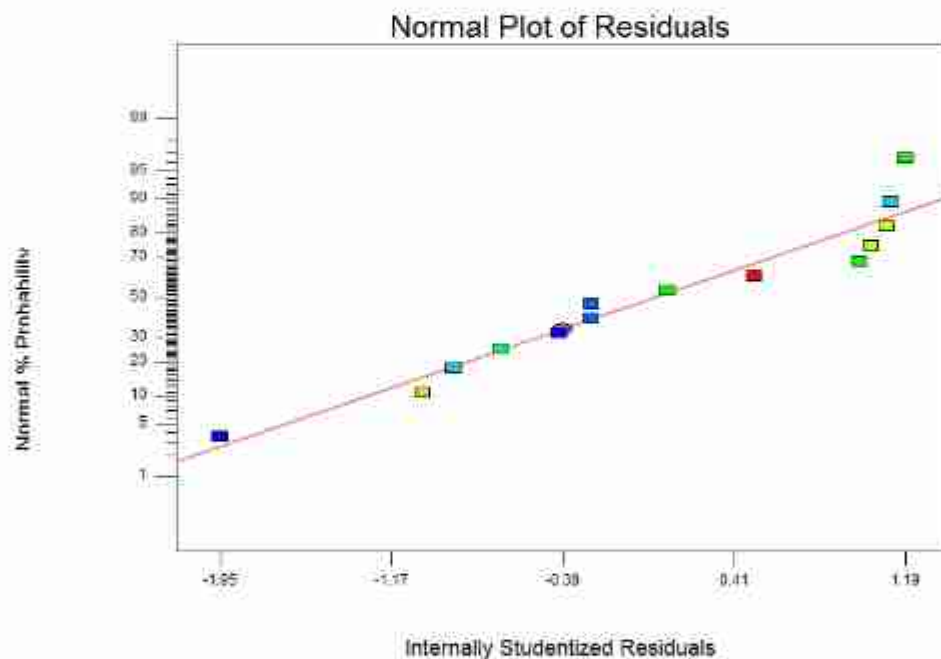
<i>Run</i>	Minyak Ikan (%)	Surfaktan (%)	Co-surfaktan (%)	Transmitan (%)	Waktu emulsifikasi (detik)
1	15,000	67,500	17,500	98,50	52
2	15,000	65,000	20,000	97,80	34
3	15,000	70,000	15,000	98,80	190
4	18,333	65,833	15,833	98,30	90
5	17,500	67,500	15,000	97,90	73
6	17,500	65,000	17,500	98,30	57
7	15,833	65,833	18,333	97,80	55
8	15,000	70,000	15,000	98,60	195
9	17,500	67,500	15,000	97,90	75
10	20,000	65,000	15,000	98,30	143
11	15,833	68,333	15,833	98,50	105
12	20,000	65,000	15,000	98,20	136
13	15,000	65,000	20,000	98,00	36
14	16,667	66,667	16,667	98,00	92

Respon dari 14 *run* percobaan formula SNEDDS ekstrak jinten hitam kemudian dianalisis dengan program *Design Expert 7.1.5* yaitu respon kejernihan

dan waktu emulsifikasi spontan.

1. Kejernihan (persentase transmitan)

Persentase transmitan merupakan faktor yang penting dalam SNEDDS karena merepresentasikan ukuran partikel yang terbentuk dengan melihat kejernihan nanoemulsi. Persentase transmitan yang diperoleh dari hasil percobaan menghasilkan respon kejernihan tinggi yaitu di atas 97%. Persentase transmitan lebih dari 90% menunjukkan bahwa ukuran tetesan minyak dalam air telah berada dalam rentang nanometer (Sagar dkk., 2014).



Gambar 12. Kurva *normal plot of residuals* kejernihan nanoemulsi

Analisis kurva *normal plot of residual* menunjukkan bahwa data terdistribusi normal seperti tampak pada gambar 12. Kurva dibuat dengan mem-plot-kan data *normal % probability* dengan *internally studentized residuals* yang merupakan nilai simpangan baku antara nilai respon hasil prediksi dengan nilai observasi. *Internally studentized residuals* diperoleh dengan cara membagi antara nilai selisih respon

observasi dan respon prediksi dengan nilai standar deviasi dari selisih kedua respon tersebut. Berdasarkan kurva tersebut, terlihat bahwa data menyebar di sekitar garis diagonal dan mengikuti arah garis diagonal yang mengindikasikan bahwa data terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji ANOVA pada *Design Expert* 7.1.5.

Tabel 8. Hasil analisis statistik ANOVA respon kejernihan

<i>Source</i>	<i>p-value</i>	Kemaknaan
Model (kuadratik)	0,0119	Signifikan
<i>Lack of fit test</i>	0,0759	Tidak signifikan

Berdasarkan hasil analisis ANOVA pada tabel 8, diketahui bahwa model yang tepat untuk menerangkan respon kejernihan nanoemulsi adalah model kuadratik. Hal ini terlihat dari *p-value* model kuadratik yaitu 0,0119 ($<0,05$) menunjukkan hasil yang signifikan. Hasil ini diperkuat dengan nilai *lack of fit* sebesar 0,0759 ($>0,05$) yang berarti tidak ada perbedaan bermakna antara data observasi dengan data hasil prediksi dari model yang dibuat (lampiran 9).

Persamaan *simplex lattice design (actual components)* yang diperoleh adalah persamaan linear yang dapat dilihat pada persamaan (1).

$$Y = 5,92209A + 1,4706B - 1,25936C - 0,092190AB + 0,021527AC + 0,016955BC \quad (1)$$

Keterangan:

Y = Kejernihan (% transmitan)

A = komposisi minyak ikan hiu cucut botol

B = komposisi surfaktan (Croduct 50 SS: Tween 80)

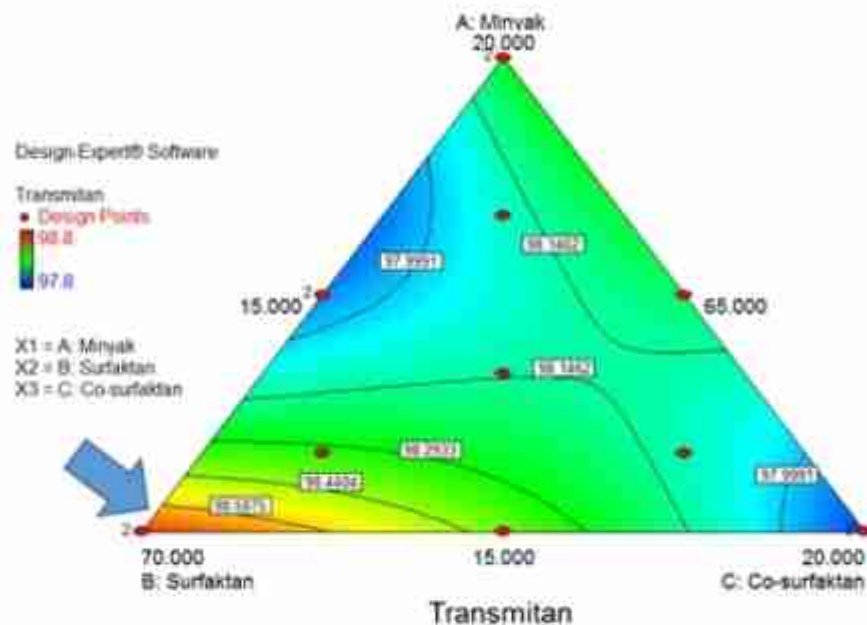
C = komposisi ko-surfaktan

Pengaruh positif (meningkatkan persentase transmitan) diberikan oleh komponen minyak (A), surfaktan (B), minyak dan ko-surfaktan (BC), dan surfaktan-ko-surfaktan (AC), sedangkan pengaruh negatif (menurunkan persentase transmitan) terlihat pada komponen ko-surfaktan (C) dan interaksi antara minyak

dan surfaktan (AB). Minyak dan surfaktan lebih mempengaruhi persentase transmitan dibandingkan pengaruh komponen minyak-ko-surfaktan dan surfaktan-ko-surfaktan, padahal seharusnya peningkatan minyak dapat menurunkan persentase transmitan yang mengindikasikan terjadi peningkatan ukuran tetesan nanoemulsi (Reddy dan Sowjanya, 2015). Hal ini kemungkinan dapat terjadi karena minyak ikan hiu cucut botol mampu melarutkan ekstrak jinten hitam dengan baik sehingga mempengaruhi pembentukan ukuran nanoemulsi dengan optimal yang menyebabkan persentase transmitan semakin tinggi. Komponen surfaktan juga dapat meningkatkan persentase transmitan, hal ini karena fungsi utama dari surfaktan adalah menurunkan tegangan permukaan antara fase minyak dan air sehingga dapat diperoleh ukuran tetesan nanoemulsi semakin kecil.

Ko-surfaktan ternyata dapat menurunkan persentase transmitan jika melihat dari pengaruh negatif yang dihasilkan, walaupun pengaruhnya lebih kecil dibandingkan komponen minyak atau surfaktan. Pada penelitian Zhao dkk., (2010) diperoleh hasil bahwa komponen ko-surfaktan dapat memperbesar ukuran tetesan nanoemulsi karena dapat memperbesar lapisan film antara minyak dan air. Pengaruh komponen minyak-surfaktan juga memberikan interaksi negatif pada kejernihan nanoemulsi walaupun pengaruhnya tidak sebesar komponen ko-surfaktan.

Hubungan antara variabel tergantung (Y_1) dan variabel bebas (A, B, C) dapat dilihat pada *countour plot* untuk respon kejernihan (gambar 13).



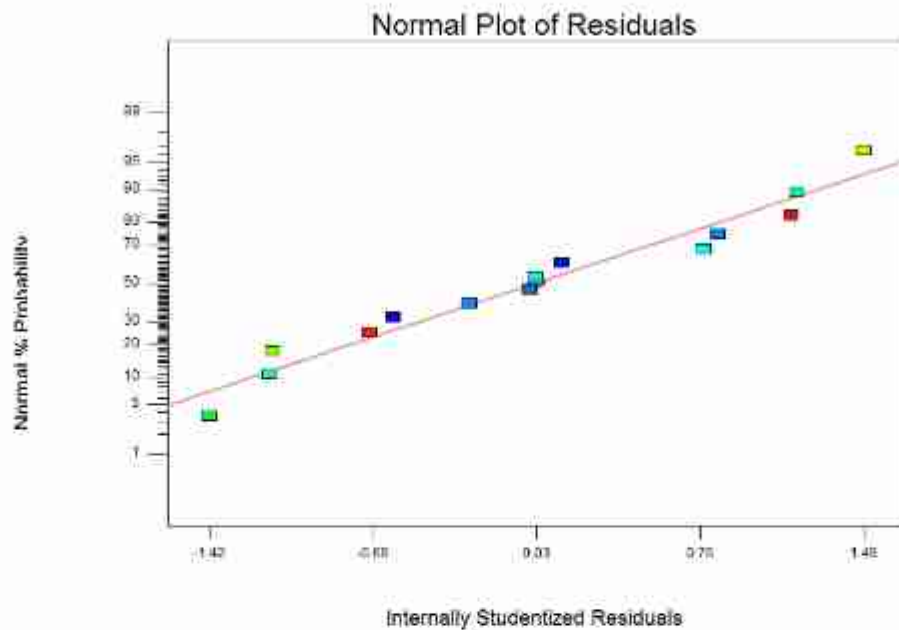
Gambar 13. *Countour plot* untuk respon kejernihan (persentase transmitan)

Pada gambar 13 terlihat tanda panah pada area merah yang dapat memberikan nilai tertinggi dari persentase transmitan. Area merah ini hanya terdapat pada satu sudut segitiga yang merupakan bagian 100% dari komponen surfaktan (titik B). Hasil dari *countour plot* menunjukkan bahwa peningkatan surfaktan dapat memperbesar persentase transmitan. Hal ini sesuai dengan penelitian SNEDDS lainnya bahwa penggunaan surfaktan yang semakin besar dapat meningkatkan kejernihan nanoemulsi dengan cara menurunkan tegangan permukaan antara minyak dengan air sehingga dapat memperkecil ukuran tetesan nanoemulsi (Dash dkk., 2015)

2. Waktu emulsifikasi

Waktu emulsifikasi merupakan faktor yang penting dalam penilaian emulsifikasi spontan dalam sediaan SNEDDS, yaitu SNEDDS harus terdispersi dengan cepat dan sempurna dalam media berair dengan agitasi ringan dalam waktu kurang dari 60 detik (Balakumar dkk., 2013). Respon waktu emulsifikasi formula

kemudian diuji normalitasnya menggunakan *Design Expert 7.1.5* (gambar 14)



Gambar 14. Kurva *normal plot of residuals* respon waktu emulsifikasi

Berdasarkan kurva tersebut, terlihat bahwa data menyebar di sekitar garis diagonal dan mengikuti arah garis diagonal yang mengindikasikan bahwa data terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji ANOVA pada *Design Expert 7.1.5*.

Tabel 9. Hasil analisis statistik ANOVA respon waktu emulsifikasi

<i>Source</i>	<i>p-value</i>	Kemaknaan
Model (<i>special cubic</i>)	<0,0001	Signifikan
<i>Lack of fit test</i>	0,2907	Tidak signifikan

Berdasarkan hasil analisis ANOVA pada tabel 9, diketahui bahwa model *special cubic* merupakan model yang tepat dalam menerangkan respon waktu emulsifikasi SNEDDS, hal ini terlihat dari nilai *p-value* yaitu <0,0001 (<0,05) menunjukkan hasil yang signifikan. Hasil *lack of fit* yang diperoleh sebesar 0,2907 (>0,05) yang berarti tidak ada perbedaan bermakna antara data observasi dengan

data prediksi model yang dibuat. Hasil pengujian waktu emulsifikasi kemudian dianalisis menggunakan program *Design Expert 7.1.5* untuk melihat pengaruh masing-masing komponen ataupun interaksi antar komponen terhadap waktu emulsifikasi SNEDDS yang dihasilkan. Persamaan *simplex lattice design (actual components)* yang diperoleh adalah persamaan linear yang dapat dilihat pada persamaan (2).

$$Y = 9541,17709A + 959,4358B + 9200,31357C - 173,36854AB - 691,90991AC - 168,44272BC + 10,57083ABC \quad (2)$$

Keterangan:

Y = Waktu Emulsifikasi (detik)

A = komposisi minyak ikan hiu cucut botol

B = komposisi surfaktan (Croduct 50 SS: tween 80)

C = komposisi ko-surfaktan

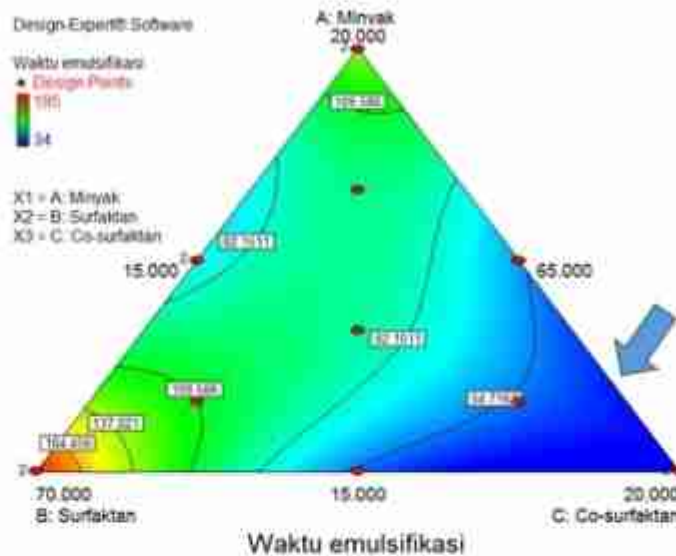
Pengaruh positif (meningkatkan waktu emulsifikasi) terlihat pada komponen minyak (A), surfaktan (B), ko-surfaktan (C), serta interaksi minyak-surfaktan-ko-surfaktan (ABC), dengan komponen minyak (A) serta ko-surfaktan (C) yang berpengaruh paling besar dalam meningkatkan waktu emulsifikasi. Pengaruh negatif (menurunkan waktu emulsifikasi) terlihat pada interaksi minyak dan surfaktan (AB), interaksi minyak dan ko-surfaktan (AC), serta komponen surfaktan dan ko-surfaktan (BC), akan tetapi komponen gabungan antara minyak dan ko-surfaktan dinilai paling berpengaruh dalam menurunkan waktu emulsifikasi.

Komponen minyak ikan hiu cucut botol dinilai dapat meningkatkan waktu emulsifikasi karena apabila dalam formula komponen minyak dinaikkan, maka komponen surfaktan dan ko-surfaktan yang berperan penting dalam emulsifikasi spontan akan semakin kecil, hal ini menyebabkan waktu emulsifikasinya menjadi lebih panjang (Eid dkk., 2014). Pengaruh ko-surfaktan juga memberikan interaksi

yang positif terhadap waktu emulsifikasi. Hal ini terkait dari fungsi utama dari ko-surfaktan yaitu membantu kinerja surfaktan menjadi lebih fleksibel dan meningkatkan fluiditasnya sehingga apabila jumlah ko-surfaktan tinggi, maka surfaktan yang berperan utama dalam pembentukan nanoemulsi spontan akan berkurang dalam formula sehingga dapat memperpanjang waktu emulsifikasinya.

Interaksi antara minyak dan ko-surfaktan ternyata memberikan pengaruh paling besar dalam mempersingkat waktu emulsifikasi SNEDDS dibandingkan komponen minyak-surfaktan serta surfaktan-ko-surfaktan. Hal ini karena pengaruh viskositas gabungan antara minyak dan ko-surfaktan yang lebih rendah dibandingkan viskositas surfaktan. Mekanisme emulsifikasi spontan berhubungan dengan kemudahan penetrasi air pada koloid atau fase gel yang terbentuk pada tetesan nanoemulsi. Viskositas yang tinggi dari surfaktan dapat memperpanjang waktu emulsifikasi karena terjadi pembentukan fase kristal-cair yang kental (gel kristalin) pada lapisan surfaktan-air sehingga dibutuhkan energi berlebih dalam membentuk dispersi emulsi berukuran kecil. Adanya komponen ko-surfaktan atau minyak dengan viskositas lebih kecil dapat meningkatkan fluiditas dari surfaktan dengan cara menembus molekul surfaktan yang kaku atau kental kemudian menciptakan ruangan yang kosong pada molekul surfaktan tersebut, hal ini menyebabkan air semakin mudah terpenetrasi ke dalamnya untuk membentuk nanoemulsi secara spontan (Ruan dkk., 2010).

Hubungan antara variabel tergantung (Y_2) dan variabel bebas (A, B, C) dapat dilihat pada *countour plot* untuk respon waktu emulsifikasi (gambar 15).



Gambar 15. *Countour plot* untuk respon waktu emulsifikasi

Pada gambar 15 terlihat tanda panah pada area biru di sudut C (ko-surfaktan) yang menerangkan bahwa semakin tinggi komposisi ko-surfaktan maka dapat memperkecil waktu emulsifikasi yang dibutuhkan SNEDDS untuk membentuk nanoemulsi spontan. Sedangkan area merah pada sudut B (surfaktan) menerangkan bahwa semakin tinggi komposisi surfaktan dapat meningkatkan waktu emulsifikasinya. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yaitu peningkatan surfaktan dapat memperpanjang waktu emulsifikasinya karena pengaruh viskositasnya yang tinggi dibandingkan ko-surfaktan, sehingga pengaruh ko-surfaktan dapat menurunkan fluiditas surfaktan dan membantu menurunkan tegangan permukaan struktur hidrokarbon antar fase minyak dan air yang menyebabkan waktu emulsifikasi SNEDDS semakin singkat (Eid dkk., 2014; Nepal dkk., 2010; Ruan dkk., 2010).

G. Optimasi dan Verifikasi Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam

Proses optimasi formula dilakukan untuk memperoleh suatu formula optimal

SNEDDS ekstrak jinten hitam berdasarkan respon optimal yang diperoleh jika nilai *desirability* mendekati 1 (Dash dkk., 2015). Komponen yang akan dioptimasi adalah minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan. Setiap komponen dilakukan pembobotan kepentingan untuk memperoleh respon optimal yang diinginkan. Pembobotan ini disebut juga *importance*, di mana terdapat pilihan tanda positif satu (+) hingga tanda positif lima (+++++). Semakin tinggi tingkat kepentingan dari komponen dan respon yang diukur, maka semakin besar bobot kepentingan yang diberikan. Bobot kepentingan dan target respon formula SNEDDS dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Optimasi formula SNEDDS ekstrak jinten hitam

Nama	Target	Lower limit	Upper limit	Importance
Minyak	<i>is in range</i>	15	20	3
Surfaktan	<i>is in range</i>	65	70	3
Ko-surfaktan	<i>is in range</i>	15	20	3
Transmitan	<i>maximize</i>	97,8	98,8	3
Waktu emulsifikasi	<i>minimize</i>	34	195	5

Komponen minyak (15-20%), surfaktan (65-70%), dan ko-surfaktan (15-20%) dioptimalkan dengan target komponen *in range* dan *importance* sebesar tiga (+++). Hal ini dikarenakan pada rentang tersebut, komponen minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan masih memenuhi persyaratan SNEDDS dalam membentuk nanoemulsi spontan. Respon persentase transmitan diberikan bobot kepentingan tiga (+++) dengan target *maximize* yang berarti formula optimal diinginkan untuk diperoleh respon transmitan paling tinggi. Bobot kepentingan diberikan nilai tiga karena nilai persentase transmitan hasil percobaan telah memenuhi persyaratan yaitu > 90% yang berarti telah diperoleh nanoemulsi yang jernih (Sagar dkk., 2014).

Respon waktu emulsifikasi diberikan bobot kepentingan lima (+++++) dengan target *minimize* yang berarti formula diinginkan dapat memberikan waktu emulsifikasi spontan yang paling singkat. Bobot kepentingan untuk respon emulsifikasi diberikan paling besar di antara yang lain karena pada hasil respon sebelumnya diperoleh waktu emulsifikasi yang tinggi hingga mencapai 195 detik, padahal persyaratan emulsifikasi spontan sediaan SNEDDS adalah kurang dari 60 detik (Balakumar dkk., 2013).

Formula yang disarankan oleh program *Design Expert 7.1.5* sebanyak 3 solusi seperti yang terlihat pada tabel 11.

Tabel 11. Solusi formula optimal SNEDDS berdasarkan *Design Expert 7.1.5*

No	M* (%)	S* (%)	K* (%)	Transmitan (%)	Waktu emulsifikasi (detik)	Desirability
1	15,00	67,34	17,66	98,37	47,35	0,768
2	17,39	65,00	17,62	98,19	54,97	0,646
3	16,33	68,66	15,00	98,16	105,39	0,475

Keterangan:

M = Minyak

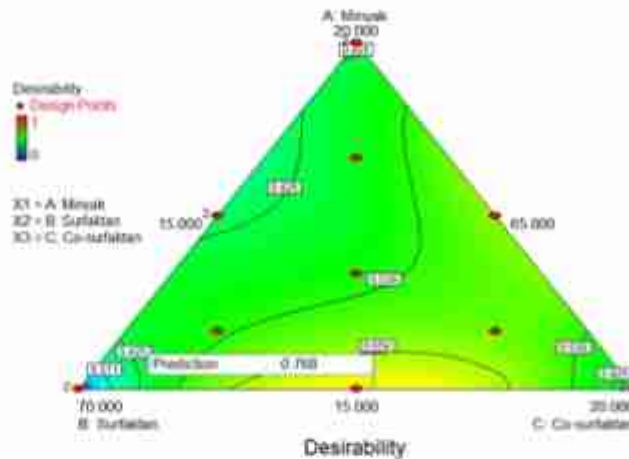
S = Surfaktan

K = Ko-surfaktan

Solusi yang dipilih adalah formula pertama karena memberikan angka *desirability* paling tinggi yang mendekati nilai 1,000. Formula optimal yang disarankan memiliki komposisi minyak sebesar 15%, surfaktan sebesar 67,34%, dan ko-surfaktan sebesar 17,66%. Formula ini diprediksi akan memberikan hasil persentase transmitan sebesar 98,37 %, dan prediksi waktu emulsifikasi sebesar 47,35 detik. Nilai *desirability* dari formula optimal ini adalah sebesar 0,768 yang berarti formula tersebut akan menghasilkan karakteristik paling optimal dan sesuai dengan keinginan peneliti sebesar 76,8%.

Titik perpotongan hasil formula optimal dapat dilihat pada *contour plot* (area

kuning) dengan nilai *desirability* sebesar 0,768 (gambar 16).



Gambar 16. Counture plot formula optimal SNEDDS

Setelah program *Design Expert 7.1.5* merekomendasikan formula optimum dengan nilai *desirability* tertinggi, lalu dilakukan pembuktian dengan melakukan percobaan sebanyak tiga kali replikasi, kemudian hasil observasi dibandingkan terhadap nilai prediksi dari program *Design Expert 7.1.5* tersebut (tabel 12). Hasil verifikasi SNEDDS ekstrak jinten optimal dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 12. Prediksi dan hasil verifikasi respon formula optimal

Respon	Prediksi	Observasi	95% CI		95% PI	
			Low	High	Low	High
Transmitan (%)	98,37	98,00	98,02	98,73	97,82	98,92
		98,20				
		98,30				
Rata-rata±SD		98,17±0,15				
Waktu emulsifikasi (detik)	47,35	50,02	39,06	55,73	35,32	59,47
		49,24				
		49,29				
Rata-rata±SD		49,52±0,44				

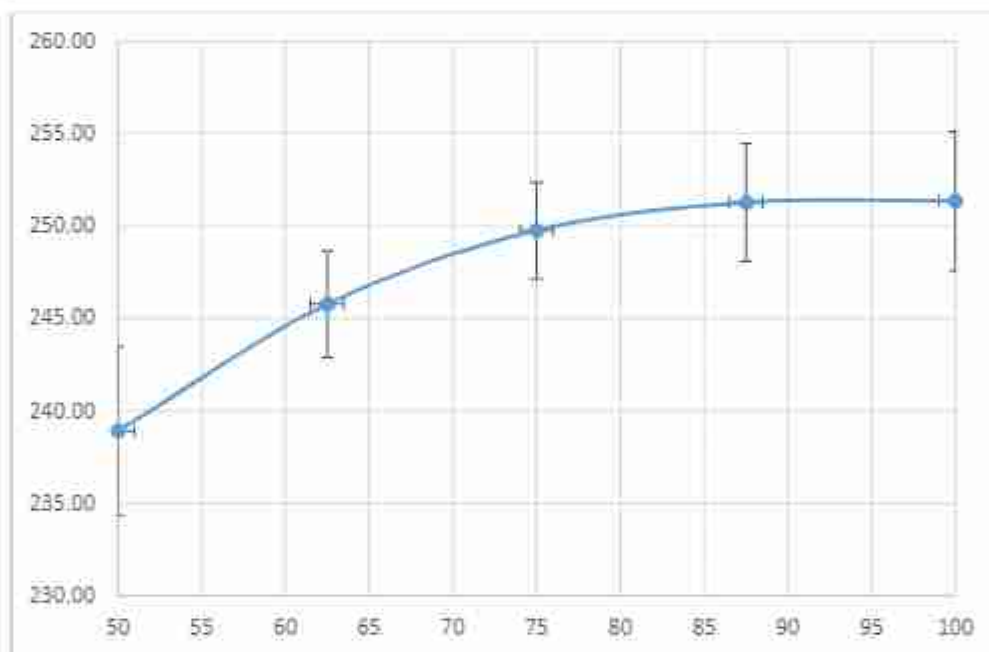
Point prediction pada program *Design Expert 7.1.5* dapat memperkirakan nilai respon hasil observasi dengan taraf kepercayaan 95%. Proses verifikasi ini dengan melihat nilai hasil observasi berada pada rentang *Confidence Interval* (CI) dan *Prediction Interval* (PI). Makna dari 95% CI (*confidence interval*) adalah rentang nilai rata-rata hasil observasi pada taraf kepercayaan 95%, sedangkan 95% PI (*prediction interval*) adalah rentang nilai prediksi individu hasil observasi pada taraf kepercayaan 95%. Rentang nilai PI lebih besar daripada CI karena nilai individu hasil observasi pasti lebih bervariasi dibandingkan nilai rata-rata hasil observasi (Engelen dkk., 2015; Purnomo dkk., 2012).

Hasil respon observasi persentase transmitan adalah sebesar 98,00; 98,20; dan 98,30% dengan rata-rata sebesar $98,17 \pm 0,15\%$. Nilai rata-rata hasil observasi masuk pada rentang CI 95% yaitu antara 98,02 – 98,73%, sedangkan masing-masing nilai individu dari tiga kali replikasi juga masuk pada rentang PI 95% yaitu antara 97,82 – 98,92%. Hasil respon observasi waktu emulsifikasi adalah sebesar 50,02; 49,24; dan 49,29 detik dengan rata-rata sebesar $49,52 \pm 0,44$ detik. Nilai rata-rata hasil observasi masuk pada rentang CI 95% antara 39,06 – 55,73 detik, sedangkan masing-masing nilai individu dari tiga kali replikasi juga masuk pada rentang PI 95% yaitu antara 35,32 – 59,47 detik. Hasil verifikasi nilai observasi masuk pada rentang nilai prediksi mengindikasikan kesesuaian model yang ditentukan oleh program *Design Expert 7.1.5*.

H. Uji Viskositas Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam

Uji viskositas SNEDDS sangat penting untuk mengkarakterisasi sistem SNEDDS secara fisik dan mengontrol stabilitasnya. Pengukuran viskositas

SNEDDS ekstrak jinten hitam ini juga penting untuk mengukur kemampuannya saat proses *filling* ke dalam kapsul gelatin lunak atau keras. Apabila sistem memiliki viskositas sangat rendah maka akan susah dikontrol kecepatannya untuk dituang yang memungkinkan dosis obat menjadi tidak seragam, sedangkan apabila viskositasnya terlalu tinggi maka formula SNEDDS susah dituang ke dalam kapsul. Berdasarkan hasil optimasi sebelumnya, viskositas surfaktan dapat diturunkan dengan kombinasi minyak dan ko-surfaktan sehingga memberikan hasil yang dapat dilihat pada gambar 17.

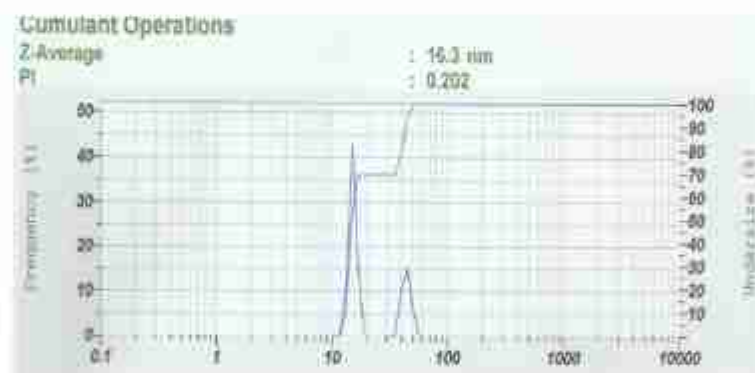


Gambar 17. Viskositas SNEDDS ekstrak jinten hitam

Berdasarkan hasil percobaan diperoleh hasil viskositas SNEDDS ekstrak jinten optimal antara 238,92 – 251,36 cP dengan penambahan kecepatan putar antara 50 rpm hingga 100 rpm (lampiran 11). Formula optimal SNEDDS yang diperoleh akan mudah difilling ke dalam kapsul gelatin lunak atau keras karena viskositasnya kurang dari 10,000 cP (Belhadj dkk., 2013).

I. Karakterisasi Ukuran dan Zeta Potensial Tetesan Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam

Ukuran tetesan nanoemulsi merupakan faktor yang penting dalam formula SNEDDS karena menunjukkan kecepatan dan tingkat pelepasan obat untuk obat diabsorpsi. Selain itu, ukuran yang kecil dari tetesan emulsi dapat mempercepat obat diabsorpsi sehingga meningkatkan bioavailabilitasnya. Sistem nanoemulsi dapat terbentuk oleh peran surfaktan yang menstabilkan lapisan antara minyak dengan air, serta peran ko-surfaktan yang dapat mengembangkan lapisan film antara minyak dengan air sehingga memudahkan penetrasi air membentuk nanoemulsi spontan (Yadav dkk., 2014). Ukuran tetesan nanoemulsi SNEDDS optimal yang mengandung ekstrak jinten hitam 200 mg/g sistem dapat dilihat pada gambar 18 dan lampiran 12.

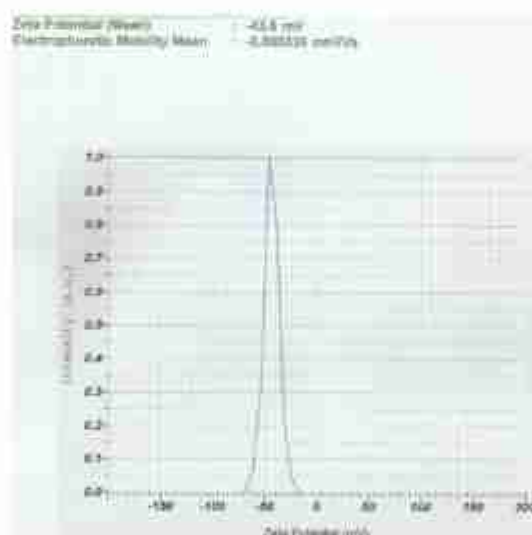


Gambar 18. Ukuran tetesan nanoemulsi SNEDDS ekstrak jinten hitam 200 mg/g

Pada percobaan diperoleh ukuran tetesan nanoemulsi minyak dalam air dengan rata-rata sebesar 16,3 nm dengan nilai *polydispersity index* (PI) sebesar 0,202. Ukuran tetesan masuk pada rentang nanoemulsi yaitu kurang dari 100 nm (Patel dan Patel, 2013). Ukuran tetesan nanoemulsi yang lebih kecil daripada kapiler darah (400 nm) dapat diabsorpsi lebih baik dan meminimalkan

kemungkinan kapiler darah menghalangi proses transport tetesan nanoemulsi (Kumar dkk., 2013). Nilai PI merupakan nilai dari distribusi ukuran tetesan nanoemulsi dengan persyaratan kurang dari 0,3. Pada penelitian diperoleh nilai PI sebesar 0,202 sehingga distribusi ukuran partikelnya dinyatakan seragam sehingga dapat diabsorpsi dengan kecepatan relatif sama dan cepat sehingga meningkatkan bioavailabilitasnya (Balakumar dkk., 2013; Einien dkk., 2012).

Pengukuran zeta potensial juga penting dilakukan untuk mengetahui stabilitas dispersi nanoemulsi dalam media berair. Nilai zeta potensial nanoemulsi SNEDDS ekstrak jinten hitam dapat dilihat pada gambar 19 dan lampiran 12.



Gambar 19. Zeta potensial nanoemulsi SNEDDS ekstrak jinten hitam 200 mg/g

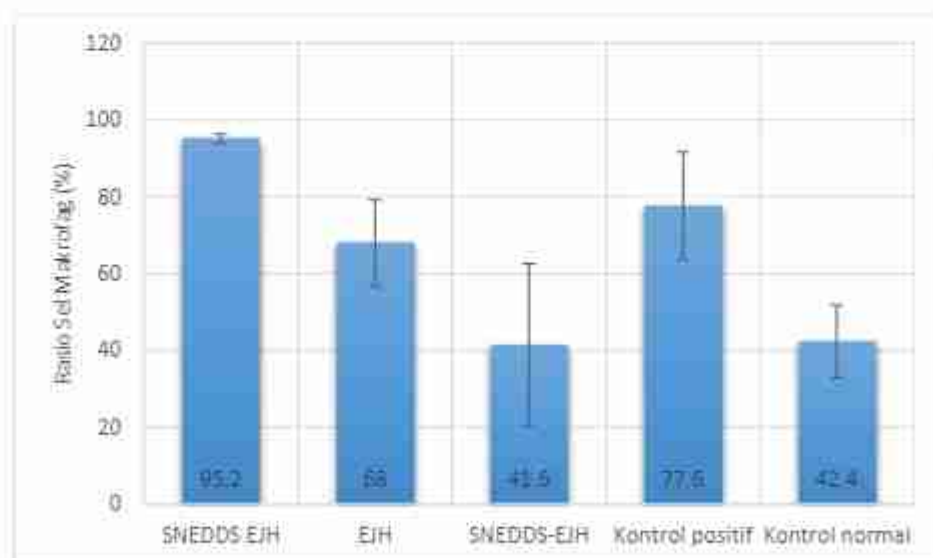
Zeta potensial adalah beda potensial antar permukaan partikel. Nilai beda potensial berhubungan dengan gaya tolak – menolak antar partikel yang berdekatan akibat jenis muatan yang sama dalam dispersi. Partikel atau molekul kecil dengan zeta potensial yang tinggi maka dapat terjadi gaya tolak-menolak antar partikel dan tidak terjadi agregasi sehingga meningkatkan stabilitasnya dalam dispersi. Ketika zeta potensial rendah, maka gaya Tarik-menarik lebih besar daripada gaya tolaknya

yang menyebabkan dispersi dapat pecah dan terjadi flokulasi partikel. Zeta potensial yang tinggi diharapkan dalam formulasi (positif atau negatif) karena mengindikasikan kestabilan sistem (Parmar dkk., 2011).

Pada penelitian SNEDDS yang mengandung ekstrak jinten hitam 200 mg/g ternyata hasil zeta potensial nanoemulsi adalah sebesar -43,5 mV. Nilai zeta potensial yang lebih dari ± 30 mV memberikan kestabilan tetesan nanoemulsi pada sistem sehingga tidak terjadi flokulasi. Muatan negatif dari permukaan tetesan nanoemulsi terjadi akibat adanya asam lemak bebas yang berasal dari komponen SNEDDS yaitu minyak, surfaktan, ko-surfaktan, serta ekstrak jinten hitam yang mengandung asam lemak (Balakumar dkk., 2013).

J. Uji Immunostimulan Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam

Pada penelitian dilakukan uji imunostimulan dengan *biolater assay* menggunakan hewan uji tikus *Sprague-Dawley* dengan nomor *ethical clearance* 330/KEC-LPPT/X/2015 (lampiran 13).



Gambar 20. Rasio sel makrofag (%)

Rasio sel makrofag diteliti untuk mengetahui persentase sel makrofag aktif

yang dapat memfagositosis lateks (gambar 20). Semakin tinggi persentase sel makrofag yang aktif dalam memfagositosis (mendekati 100%) dalam total 100 sel makrofag terhitung maka semakin potensial sebagai imunostimulan.

Data rasio sel makrofag kemudian dianalisis secara statistik dengan SPSS 16.0 yaitu uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* memberikan hasil yang tidak berbeda signifikan antar data ($P>0,05$); akan tetapi data rasio sel makrofag menunjukkan tidak homogen secara statistik ($p<0,05$) sehingga data dianalisis dengan *Kruskal-Wallis Test* dilanjutkan *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan (lampiran 13). Hasil *Kruskal-Wallis Test* menunjukkan data rasio sel makrofag antar kelompok perlakuan berbeda secara signifikan yaitu 0,001 sehingga dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok pada tabel 13.

Tabel 13. Data statistik rasio sel makrofag
Rasio sel makrofag (%) (taraf kepercayaan 95%)

Kelompok	Kelompok	Signifikansi	Kesimpulan
SNEDDS EJH	EJH	0,009	Berbeda signifikan
	SNEDDS-EJH**	0,009	Berbeda signifikan
	Kontrol positif	0,015	Berbeda signifikan
	Kontrol normal	0,009	Berbeda signifikan
EJH*	SNEDDS-EJH	0,76	Tidak berbeda signifikan
	Kontrol positif	0,251	Tidak berbeda signifikan
	Kontrol normal	0,016	Berbeda signifikan
SNEDDS-EJH	Kontrol positif	0,028	Berbeda signifikan
	Kontrol normal	0,917	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif	Kontrol normal	0,009	Berbeda signifikan

Keterangan:

$p<0,05$ = berbeda signifikan

$p>0,05$ = tidak berbeda signifikan

*EJH = Ekstrak Jinten Hitam 200 mg/kgBB

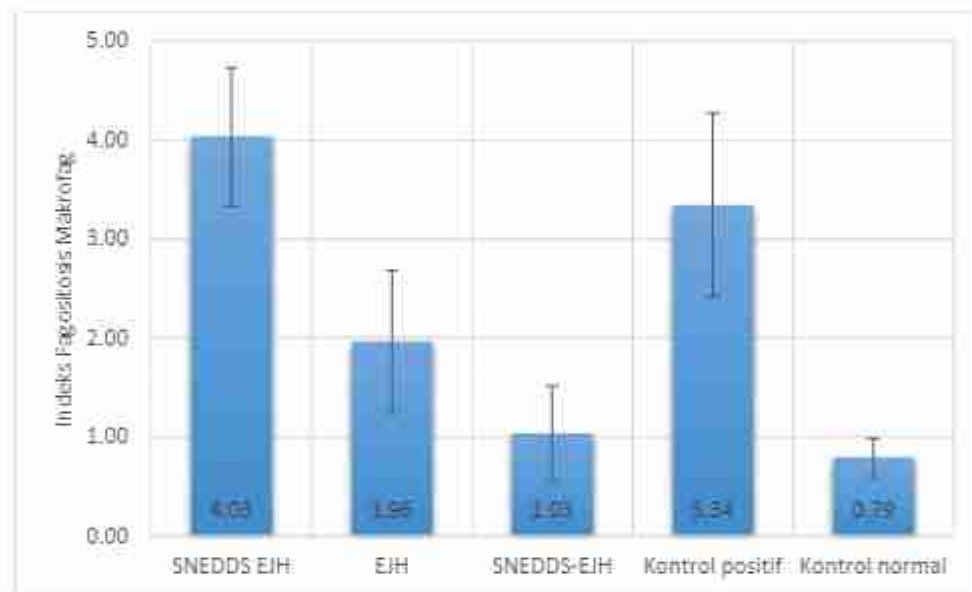
**SNEDDS-EJH = SNEDDS tanpa EJH

Berdasarkan analisis statistik diperoleh hasil rasio sel makrofag yaitu

formulasi ekstrak jinten hitam sebesar 200 mg/kgBB menjadi SNEDDS dengan komposisi minyak ikan hiu cucut botol, surfaktan (Croduct 50 SS dan Tween 80), serta ko-surfaktan PEG 400 ternyata mampu mengaktivasi sel makrofag paling tinggi diantara kelompok perlakuan yang lain yaitu sebesar $95,2 \pm 1,17\%$ dibandingkan kontrol positif yang mengandung ekstrak meniran 2,7 mg/0,54 mL/tikus mengaktivasi sel makrofag sebesar $77,6 \pm 14,01\%$ dan ekstrak jinten hitam 200 mg/kgBB hanya dapat mengaktivasi sel makrofag sebesar $41,6 \pm 21,01\%$. Ekstrak jinten hitam memberikan hasil yang tidak berbeda signifikan dalam meningkatkan rasio sel makrofag jika dibandingkan dengan kontrol positif (signifikansi: 0,251) dan dengan SNEDDS tanpa ekstrak jinten hitam (signifikansi: 0,175). SNEDDS tanpa ekstrak jinten hitam ternyata memberikan hasil yang berbeda signifikan apabila dibandingkan dengan kontrol positif (signifikansi: 0,028) tetapi tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kontrol normal (signifikansi: 0,917). SNEDDS tanpa ekstrak jinten ternyata memberikan efek yang kecil dalam meningkatkan rasio sel makrofag karena SNEDDS tersebut mengandung minyak ikan hiu cucut botol sebesar 15% dalam 1 gram sistem SNEDDS atau 150 mg dalam 1 gram sistem. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hajimoradi dkk., (2009^a) ternyata minyak ikan hiu murni dengan konsentrasi 100 mg/mL dapat meningkatkan produksi nitrit oksida sebagai pertanda adanya aktivitas sel makrofag. Tetapi jika SNEDDS tanpa ekstrak dibandingkan dengan kontrol normal memberikan hasil yang tidak berbeda signifikan, hal ini kemungkinan dapat terjadi karena perbedaan jenis dan habitat ikan hiu pada penelitian Hajimoradi dkk., (2009^a) sehingga terjadi perbedaan kandungan

alkilgliserol dan skualen yang berperan pada peningkatan sistem imun.

Indeks fagositosis adalah kemampuan sel makrofag aktif dalam memfagositosis lateks, semakin banyak lateks yang difagositosis maka kapasitas fagositosisnya semakin tinggi (gambar 21). Data perhitungan dapat dilihat pada lampiran 13.



Gambar 21. Indeks fagositosis makrofag

Tabel 14. Data statistik indeks fagositosis makrofag
Indeks fagositosis makrofag (taraf kepercayaan 95%)

Kelompok	Kelompok	Signifikansi	Kesimpulan
SNEDDS EIJH	EIJH	0,009	Berbeda signifikan
	SNEDDS-EIJH**	0,009	Berbeda signifikan
	Kontrol positif	0,251	Tidak berbeda signifikan
	Kontrol normal	0,009	Berbeda signifikan
EIJH*	SNEDDS-EIJH	0,175	Tidak berbeda signifikan
	Kontrol positif	0,470	Tidak berbeda signifikan
	Kontrol normal	0,009	Berbeda signifikan
SNEDDS-EIJH	Kontrol positif	0,009	Berbeda signifikan
	Kontrol normal	0,602	Tidak berbeda signifikan
Kontrol positif	Kontrol normal	0,009	Berbeda signifikan

Keterangan:

$p < 0,05$ = berbeda signifikan

$p > 0,05$ = tidak berbeda signifikan

*EIJH = Ekstrak Jinten Hitam 200 mg/kgBB

**SNEDDS-EIJH = SNEDDS tanpa EI

Data indeks fagositosis makrofag dianalisis secara statistik dengan SPSS 16.0 dapat dilihat pada tabel 14. Uji normalitas data indeks fagositosis dilakukan dengan *Shapiro-Wilk* memberikan hasil yang tidak berbeda signifikan antar data ($P>0,05$), tetapi data indeks fagositosis makrofag menunjukkan tidak homogen secara statistik ($p<0,05$) sehingga data dianalisis dengan *Kruskal-Wallis Test*. Hasil *Kruskal-Wallis Test* menunjukkan data indeks fagositosis antar kelompok perlakuan berbeda secara signifikan yaitu 0,001 sehingga dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

Berdasarkan hasil analisis statistik, diperoleh hasil bahwa SNEDDS yang mengandung ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan indeks fagositosis makrofag apabila dibandingkan dengan ekstrak jinten tanpa formulasi (signifikansi: 0,009), dan SNEDDS tanpa ekstrak (signifikansi: 0,009) dan hasilnya tidak berbeda secara signifikan apabila dibandingkan dengan kontrol positif berupa ekstrak meniran 7,2 mg/tikus (signifikansi: 0,251). Hasil indeks fagositosis ekstrak jinten hitam tanpa formulasi tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif yaitu ekstrak meniran dalam sediaan sirup (signifikansi: 0,470), hal ini dapat terjadi akibat kelarutan ekstrak yang rendah sehingga lebih sukar diabsorpsi pada usus halus, selain itu terdapat mekanisme metabolisme oleh hati sehingga bioavailabilitasnya dalam darah menurun. Hasil indeks fagositosis antara ekstrak jinten hitam tidak berbeda signifikan (signifikansi: 0,175) karena adanya minyak ikan hiu cucut botol yang terdapat pada komponen SNEDDS sebanyak 15% dalam 1 g sistem kemungkinan memberikan efek imunostimulan seperti penelitian yang pernah dilakukan oleh Hajimoradi dkk., (2009^a) meneliti minyak ikan hiu yang berasal Iran dengan

konsentrasi 100 mg/mL ternyata dapat meningkatkan fungsi dan aktivitas sel makrofag.

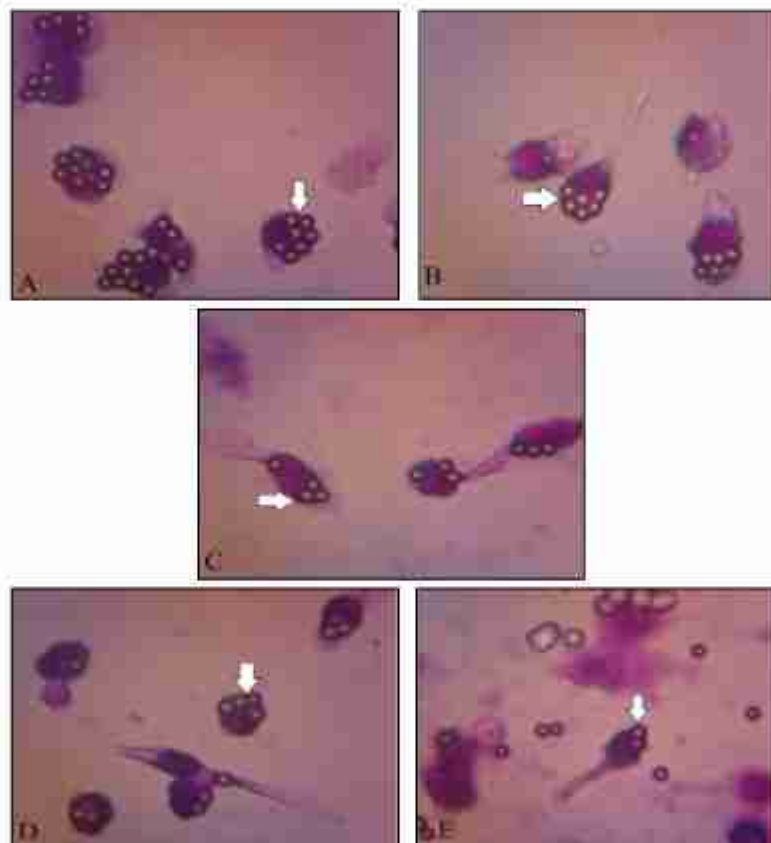
Indeks fagositosis SNEDDS tanpa ekstrak memberikan hasil tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kontrol normal, hal ini dapat terjadi karena perbedaan jenis dan habitat ikan hiu pada penelitian Hajimoradi dkk., (2009²) sehingga terjadi perbedaan kandungan alkilgliserol dan skualen yang berperan pada peningkatan sistem imun.

Penelitian efek imunostimulan dengan menggunakan sel makrofag yang merupakan salah satu jenis sel dalam pertahanan tubuh non-spesifik yang memiliki kemampuan fagositosis karena memiliki reseptor yang lebih rapat pada permukaannya dan terdapat banyak enzim lisosom di dalamnya. Sampel makrofag pada penelitian ini diambil dari cairan peritoneal tikus karena steril dan merupakan sel anaerob sehingga mudah mengontrol lingkungan hidupnya. Selain itu metode isolasi makrofag relatif cepat dan mudah. Suspensi lateks digunakan untuk penelitian aktivitas fagositosis makrofag sebagai partikel yang akan difagosit oleh sel makrofag. Lateks merupakan makromolekul yang dapat dikenali oleh reseptor sel makrofag sehingga dapat difagosit oleh sel makrofag (Santoso dkk., 2012).

Komponen aktif dari ekstrak jinten hitam yang berupa minyak adalah timokuinon (Salem, 2005). Pada tubuh, IFN- γ diproduksi oleh limfosit T atau sel *Natural-Killer* (NK), tergantung dari jenis respon imun yang terjadi. IFN- γ akan disintesis oleh sel NK pada imunitas alami dan oleh limfosit T pada imunitas adaptif. Molekul IFN- γ yang disintesis kemudian akan mengaktivasi sel makrofag untuk memfagositosis. Pada penelitian yang dilakukan oleh Boskabady dkk., (2011)

memeroleh hasil bahwa stimulasi yang berasal dari timokuinon dapat meningkatkan produksi IFN- γ secara langsung, tanpa intervensi dari sel NK atau sel limfosit T. Selain itu IFN- γ juga disekresikan oleh makrofag yang terstimulasi dalam jumlah yang banyak dan kemudian bekerja secara autokrin atau sel makrofag dapat bekerja aktif akibat substansi yang dihasilkan oleh dirinya sendiri di antara populasi makrofag (Santoso dkk., 2012).

Hasil fagositosis makrofag antar kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar 22.



Gambar 22. Fagositosis makrofag antar kelompok perlakuan. (A) Kelompok SNEDDS+Ekstrak jinten Hitam; (B). Kelompok Ekstrak jinten hitam; (C). Kelompok SNEDDS tanpa Ekstrak jinten hitam; (D). Kelompok kontrol positif; (E). Kelompok kontrol normal.

Ketika ekstrak jinten hitam diformulasi menjadi SNEDDS dengan komposisi minyak ikan hiu cucut botol, surfaktan (Croduret 50 SS dan Tween 80), dengan ko-

surfaktan PEG 400 ternyata efek imunostimulan lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak jinten tanpa formulasi, bahkan diperoleh hasil dapat meningkatkan rasio makrofag aktif lebih tinggi dibandingkan kontrol positif meskipun hasil indeks fagositosisnya tidak berbeda secara signifikan.

Permasalahan utama dalam pemberian obat rute oral adalah adanya lapisan air yang tidak teraduk pada epitelial (*unstirred aqueous layer*) serta permeabilitas membran yang buruk menyebabkan obat sulit diabsorpsi. Formula SNEDDS dengan komposisi utama minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan dapat meningkatkan bioavailabilitas obat dengan kelarutan yang rendah (Balakrishnan dkk., 2009). Minyak yang digunakan pada penelitian adalah minyak ikan hiu cucut botol yang merupakan trigliserida rantai panjang yang berfungsi untuk melarutkan ekstrak jinten hitam berupa minyak dengan lipofilisitas yang tinggi. Selain itu penggunaan minyak rantai panjang adalah sifatnya yang lipofil ($\log P > 5$) sehingga dapat diabsorpsi melalui jalur limfatik menyebabkan dapat terhindar dari metabolisme hati dan meminimalkan efek hepatotoksik (Li dkk., 2011).

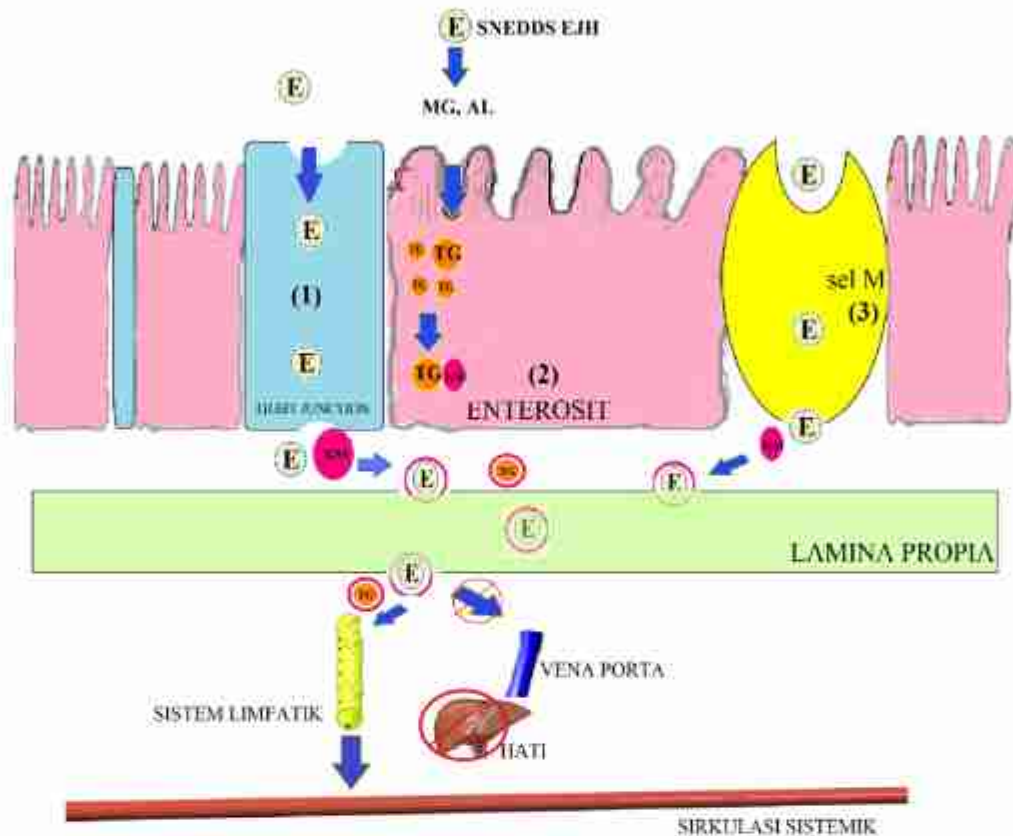
Surfaktan yang berasal dari SNEDDS dapat meningkatkan permeabilitas membran dengan merusak lapisan *lipid bilayer* dari sel epitel. Monomer surfaktan dapat melekatkan molekulnya pada membran sel sehingga memberikan efek lebih polar pada membran lipid. Surfaktan juga berperan dalam membuka *tight junction* antar sel epitel dengan cara interaksi dengan bagian polar dari *lipid bilayer*, memodifikasi ikatan hidrogen dan ionik antar grup, sekaligus dapat memasukkan molekul lipofilnya pada *bilayer* sehingga membran sel terbuka (Li dkk., 2011). Croduret 50 SS dan Tween 80 dapat meningkatkan absorpsi karena memiliki

kemampuan menghambat transport efluks p-glikoprotein yaitu suatu protein yang dapat mengeluarkan obat setelah diabsorpsi, dapat menghambat enzim sitokrom untuk metabolisme obat, serta dapat diabsorpsi melalui limfatik sehingga beberapa mekanisme ini juga dapat meningkatkan bioavailabilitas dari SNEDDS (Avachat dan Patel, 2015).

SNEDDS yang mengandung senyawa lipofil dapat meningkat absorpsinya melalui transport limfatik dengan menstimulasi terproduksi kilomikron yaitu lipoprotein yang membawa trigliserida dari usus halus menuju ke jaringan untuk nutrisi pada tubuh. SNEDDS yang mengandung komponen minyak akan teremulsifikasi pada lambung serta adanya hidrolisis mengubah lipid menjadi monogliserida dan asam lemak, kemudian akan diabsorpsi melalui enterosit dan akan terjadi re-esterifikasi menjadi trigliserida lagi dan akan berinteraksi dengan kilomikron di usus halus. Adanya komponen surfaktan yang berperan dalam membuka *tight-junction* membran epitel memudahkan kilomikron menembus membran sel.

Kemungkinan lain yang dapat terjadi pada transport limfatik adalah transport oleh sel epitel membran yaitu sel M (*microfold cell*) yaitu sel yang ditemukan pada epitelium folikel *Peyer's patch*, sebuah jaringan limfatik yang disebut GALT (*gut-associated lymphoid tissue*). Nanoemulsi dari SNEDDS dapat ditranspor melalui sel M yang berada pada jaringan limfatik di usus halus yang akan memfasilitasi transitis untuk diabsorpsi. Hal ini juga berkaitan dengan ukuran yang kecil dari nanoemulsi (<100 nm) sehingga absorpsinya meningkat pada saluran gastrointestinal. SNEDDS yang diabsorpsi melalui sistem limfatik akan dibawa ke

sirkulasi sistemik dengan kilomikron seperti yang terlihat pada gambar 23.



Gambar 23. Mekanisme absorpsi SNEDDS. Tiga kemungkinan transport SNEDDS ekstrak jinten hitam (E) oleh kilomikron (KM): (1) Mekanisme paraseluler dengan membuka *tight junction* sel enterosit; (2) Mekanisme transeluler dengan digesti SNEDDS E/H menjadi monogliserida (MG) dan asam lemak (AL) lalu di re-esterifikasi menjadi trigliserida (TG) dan berinteraksi dengan kilomikron (KM); (3) Melalui sel M pada sel membran epitel dari Peyer's patches. SNEDDS E/H yang berinteraksi dengan kilomikron akan menuju sistem limfatik sehingga meningkatkan bioavailabilitas (Shahnaz dkk., 2011)

Trigliserida rantai panjang yang digunakan dapat bergabung dengan kilomikron, kemudian diabsorpsi melalui jalur limfatik sehingga terhindar dari metabolisme oleh hati dan mencegah hepatotoksik. Ketika trigliserida telah dilepaskan, maka sisa-sisa kilomikron akan diambil oleh hati, dimana lipid dan kolesterol yang tersisa diekskresikan dalam empedu atau dibuat menjadi lipoprotein lainnya (Shahnaz dkk., 2011). Berbagai macam mekanisme absorpsi inilah yang menyebabkan formula SNEDDS ekstrak jinten hitam dapat meningkatkan efek imunostimulan lebih baik dibandingkan ekstrak tanpa formulasi.

K. Uji *Extract Loading* Formula Optimal SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam

Uji *extract loading* dilakukan untuk formula SNEDDS ekstrak jinten hitam yang optimal dengan tujuan apabila mampu memuat dosis besar dalam sistem SNEDDS maka pemberiannya dapat diminimalkan tanpa mengurangi dosisnya dibandingkan dengan ekstrak murni tanpa formulasi.

Dosis ekstrak ditingkatkan dari formula optimal SNEDDS optimal yaitu 200 mg/g menjadi 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, dan 800 mg ekstrak jinten hitam dalam 1 gram sistem SNEDDS. Penampilan fisik formula SNEDDS diamati apabila terjadi pemisahan pada formula, kemudian diuji kejernihan dan waktu emulsifikasi yang masih memenuhi persyaratan nanoemulsi spontan dalam media berair. Hasil uji penampilan fisik, kejernihan, dan waktu emulsifikasi dapat dilihat pada tabel 15.

Tabel 15. Uji *extract loading* SNEDDS ekstrak jinten hitam

Dosis ekstrak (per 1 gram sistem)	Penampilan fisik	Kejernihan (% transmitan)	Waktu emulsifikasi (detik)
300 mg	Tidak memisah	$97,10 \pm 0,36$	$43,12 \pm 0,29$
400 mg	Tidak memisah	$95,60 \pm 0,17$	$37,73 \pm 0,28$
500 mg	Tidak memisah	$92,10 \pm 0,36$	$32,85 \pm 0,25$
600 mg	Tidak memisah	$89,67 \pm 0,45$	$25,68 \pm 0,65$
700 mg	Tidak memisah	$76,60 \pm 0,46$	$20,03 \pm 0,21$
800 mg	Tidak memisah	$65,23 \pm 0,45$	$15,52 \pm 0,44$

Pada penelitian diperoleh hasil bahwa tidak terjadi pemisahan dari sistem SNEDDS ekstrak jinten hitam hingga dosis maksimal sebesar 800 mg/g sistem SNEDDS. Tetapi pada uji kejernihan diperoleh hasil bahwa sistem hanya mampu menampung ekstrak jinten hitam maksimal sebesar 600 mg/g sistem SNEDDS dengan nilai persentase transmitan yaitu $89,67 \pm 0,45\%$ dengan penampilan

nanoemulsi yang masih jernih dalam media AGF (lampiran 14). Suatu formula SNEDDS memenuhi persyaratan nanoemulsi apabila persentase transmitan pada nilai sekitar 90% atau lebih dan penampilannya masih jernih dalam media berair (Sagar dkk., 2014).

Waktu emulsifikasi diperoleh semakin singkat seiring peningkatan dosis ekstrak jinten hitam, hal ini akibat penambahan ekstrak jinten hitam yang berupa minyak sehingga menyebabkan viskositas sistem menjadi lebih rendah yang berpengaruh pada mudahnya air terpenetrasi ke dalam sistem untuk membentuk nanoemulsi secara spontan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Ahmed dkk., (2014) melakukan *drug loading* yaitu kuersetin dalam sistem SNEDDS ternyata mampu memuat kuersetin hampir dua kali lipat dari dosis awal yaitu sebesar 18,6 – 32 mg/g sistem akan tetapi digunakan dosis kuersetin sebesar 15 mg/g sistem untuk meminimalkan resiko pengendapan. Pada penelitian, sistem SNEDDS sesuai untuk memuat ekstrak menjadi 3 kali lipat dari formula optimal yaitu dari dosis 200 mg/g menjadi 600 mg/g sistem SNEDDS dengan penampilan yang masih jernih dalam media AGF serta waktu emulsifikasi menjadi lebih singkat.

L. Uji Stabilitas SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam

Perbedaan antara emulsi biasa dan nanoemulsi adalah stabilitas kinetik yang merefleksikan stabilitas termodinamik antara dua sistem yaitu fase air dan fase minyak. Sistem SNEDDS jika teremulsifikasi dalam media berair akan membentuk sistem nanoemulsi di mana sistem ini harus stabil dan tidak akan terjadi pengendapan obat, pemisahan atau pecahnya fase antar minyak dan air. Penyimpanan dalam jangka waktu lama perlu diteliti untuk mengetahui stabilitas

sistem SNEDDS yang dapat menyebabkan obat mengendap dari sistem atau terjadi pemisahan fase akibat sistem surfaktan dan ko-surfaktan yang tidak stabil sehingga menyebabkan perubahan karakter dari nanoemulsi yang diharapkan. Penelitian stabilitas dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu penyimpanan selama 3 bulan pada suhu ruang atau dengan *metode freeze-thawing* (metode pembekuan-pencairan) untuk melihat jika terjadi pemisahan fase SNEDDS atau perubahan karakter nanoemulsi yang meliputi kejernihan dan waktu emulsifikasi spontan dalam media berair (Parmar dkk., 2011).

Hasil pengujian stabilitas pada SNEDDS ekstrak jinten hitam sebesar 200 mg, 500 mg, dan 600 mg/g sistem pada suhu ruang 25 ± 2 °C selama 90 hari kemudian dilanjutkan uji kejernihan dan uji waktu emulsifikasi untuk melihat perbedaan karakteristik nanoemulsi yang terbentuk (tabel 16).

Tabel 16. Hasil uji kejernihan setelah penyimpanan selama 90 hari (25 ± 2 °C)

Ekstrak Jinten Hitam	Penampilan SNEDDS	% Transmittan Hari ke-0	% Transmittan Hari ke-90	P value
200 mg/g	Jernih, tidak memisah	$98,17 \pm 0,15$	$98,20 \pm 0,17$	0,789
500 mg/g	Jernih, tidak memisah	$92,10 \pm 0,36$	$92,00 \pm 0,26$	0,574
600 mg/g	Jernih, tidak memisah	$89,67 \pm 0,45$	$89,83 \pm 0,42$	0,577

Keterangan:

$P < 0,05$ = berbeda signifikan

$p > 0,05$ = tidak berbeda signifikan

Pengujian hanya dilakukan pada ketiga dosis tersebut karena berdasarkan formula optimal menggunakan dosis ekstrak 200 mg/g serta hasil *extract loading* maksimal dapat menampung dosis ekstrak sebesar 500 mg/g serta 600 mg/g sistem. Hasil uji stabilitas selama 90 hari pada SNEDDS memberikan hasil yaitu penampilan visualnya tetap jernih dan tidak terjadi pemisahan fase. Uji kejernihan

sebelum dan setelah penyimpanan ternyata tidak memberikan perbedaan signifikan secara statistik (lampiran 15).

Waktu emulsifikasi dilakukan terhadap SNEDDS ekstrak jinten hitam setelah uji stabilitas selama 90 hari pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$ yang dapat dilihat pada tabel 17.

Tabel 17. Hasil waktu emulsifikasi setelah penyimpanan selama 90 hari ($25 \pm 2^\circ\text{C}$)

Ekstrak Jinten Hitam	Penampilan nanoemulsi	Waktu emulsifikasi (detik) Hari ke-0	Waktu emulsifikasi (detik) Hari ke-90	<i>P value</i>
200 mg/g	Jernih	$49,52 \pm 0,44$	$50,38 \pm 0,46$	0,084
500 mg/g	Jernih	$32,85 \pm 0,25$	$33,29 \pm 0,39$	0,190
600 mg/g	Jernih	$25,68 \pm 0,65$	$26,09 \pm 0,36$	0,187

Keterangan:

$P < 0,05$ = berbeda signifikan

$p > 0,05$ = tidak berbeda signifikan

Berdasarkan hasil uji stabilitas selama 90 hari pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$ diperoleh hasil bahwa SNEDDS yang mengandung ekstrak jinten hitam sebesar 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, dan 600 mg/g sistem ternyata penampilan nanoemulsi yang diperoleh tetap jernih dan waktu emulsifikasi tidak berbeda signifikan antara sebelum uji stabilitas dan setelahnya.

Metode *freeze-thaw* dilakukan dengan menyimpan SNEDDS ekstrak jinten hitam dosis 200 mg, 500 mg, dan 600 mg/g sistem pada suhu -21°C selama 24 jam, kemudian pada suhu 25°C selama 24 jam (satu siklus) dilanjutkan sentrifugasi 5000 rpm selama 30 menit untuk mengetahui apakah terjadi pemisahan fase atau perubahan kejernihan serta waktu emulsifikasi setelah uji stabilitas dilakukan. Hasil uji kejernihan dapat dilihat pada tabel 18.

Tabel 18. Hasil uji kejernihan setelah siklus *freeze-thaw* sebanyak 6 siklus

Ekstrak Jinten Hitam	Penampilan SNEDDS setelah sentrifugasi	% Transmittan sebelum siklus	% Transmittan siklus ke-6	<i>P-value</i>
200 mg/g	Jernih, tidak memisah	98,13 ± 0,15	98,03 ± 0,06	0,102
500 mg/g	Jernih, tidak memisah	92,27 ± 0,25	92,17 ± 0,31	0,633
600 mg/g	Jernih, tidak memisah	89,93 ± 0,06	89,87 ± 0,06	0,225

Keterangan:

 $P < 0,05$ = berbeda signifikan $p > 0,05$ = tidak berbeda signifikan

Hasil uji stabilitas dengan metode *freeze-thaw* bertujuan untuk menguji formula SNEDDS apabila penyimpanan dilakukan pada suhu ekstrem yaitu -21°C dan 25°C dengan dosis ekstrak 200 mg, 500 mg, dan 600 mg/g sistem SNEDDS. Setelah uji *freeze-thaw* sebanyak 6 siklus dilanjutkan uji sentrifugasi (Parmar dkk., 2011) diperoleh hasil yaitu penampilan visualnya tetap jernih dan tidak terjadi pemisahan fase. Pada uji kejernihan sebelum dan setelah penyimpanan ternyata tidak memberikan perbedaan signifikan secara statistik (lampiran 15). Berdasarkan uji *freeze-thaw* maka formula SNEDDS ekstrak jinten hitam dengan peningkatan dosis hingga 600 mg/g tetap stabil serta kejernihannya tidak berubah setelah penyimpanan pada kondisi ekstrem.

Kemudian dilakukan pengujian waktu emulsifikasi terhadap SNEDDS ekstrak jinten hitam setelah uji *freeze-thaw* yang dapat dilihat pada tabel 19.

Tabel 19. Hasil waktu emulsifikasi setelah siklus *freeze-thaw* sebanyak 6 siklus

Ekstrak Jinten Hitam	Penampilan nanoemulsi	Waktu emulsifikasi sebelum siklus (detik)	Waktu emulsifikasi siklus ke-6 (detik)	<i>P value</i>
200 mg/g	Jernih, tidak memisah	49,78 ± 0,46	49,88 ± 0,57	0,790
500 mg/g	Jernih, tidak memisah	43,67 ± 0,11	43,89 ± 0,38	0,422
600 mg/g	Jernih, tidak memisah	25,32 ± 0,10	25,08 ± 0,43	0,436

Keterangan:

$P < 0,05$ = berbeda signifikan

$p > 0,05$ = tidak berbeda signifikan

Berdasarkan hasil uji *freeze-thaw* sebanyak 6 siklus diperoleh hasil bahwa SNEDDS yang mengandung ekstrak jinten hitam sebesar 200 mg, 500 mg, dan 600 mg/g sistem tidak berbeda signifikan antara sebelum uji *freeze-thaw* dan setelahnya.

Berdasarkan hasil uji stabilitas selama 90 hari dan uji *freeze-thaw* ternyata formula SNEDDS tetap memberikan hasil yang stabil sehingga dapat diproduksi dalam skala lebih besar.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Berdasarkan hasil penelitian dengan metode *Simplex Lattice Design* diperoleh formula optimal SNEDDS ekstrak jinten hitam 200 mg/g sistem yang mengandung 15% minyak ikan hiu cucut botol, 67,34% surfaktan yang mengandung 10,10% Croduret 50 SS dan 57,24% Tween 80, serta 17,66% PEG 400 sebagai ko-surfaktan. SNEDDS optimal memiliki karakteristik viskositas kurang dari 10,000 cP, ukuran nanoemulsi sebesar 16,3 nm dengan *polydispersity index* (PI) 0,202, zeta potensial sebesar -43,5 mV, dan SNEDDS stabil ketika disimpan selama 90 hari pada suhu ruang dan stabil setelah uji stabilitas dengan teknik *freeze-thaw*.
2. SNEDDS ekstrak jinten hitam dengan dosis 200 mg/kgBB memberikan hasil rasio sel makrofag sebesar $95,2 \pm 1,17\%$ dan indeks fagositosis sebesar $4,03 \pm 0,07\%$. Hasil uji imunostimulan non-spesifik SNEDDS ekstrak jinten hitam lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak jinten hitam tanpa formulasi.

B. Saran

1. Sistem SNEDDS dapat menggunakan minyak trigliserida rantai sedang (contoh: miglyol) sehingga memudahkan penetrasi air dalam membentuk nanoemulsi dan mempersingkat waktu emulsifikasi.
2. Surfaktan dapat menggunakan *cremophor EL* dengan viskositas lebih rendah agar emulsifikasi spontan dapat terjadi dengan waktu kurang dari 30 detik.

3. Perlu dilakukan uji stabilitas dipercepat pada suhu 40°C dengan RH 75% untuk mengetahui stabilitas fisik (pemisahan fase atau perubahan warna sediaan) dan stabilitas kimiawi dengan menganalisis kadar zat aktif timokuinon setelah penyimpanan.
4. Dapat dilanjutkan penelitian efek SNEDDS ekstrak jinten hitam terhadap sistem imun spesifik.
5. Formula SNEDDS ekstrak jinten hitam perlu dilakukan uji toksisitas akut dan kronis.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Najmi, A. K., Siddique, N. A., dkk., 2013. A Review on Therapeutic Potential of *Nigella sativa*: A Miracle Herb. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, **3**: 337–352.
- Ahmed, O. A., Badr-Eldin, S. M., Tawfik, M. K., Ahmed, T. A., El-Say, K. M., dan Badr, J. M., 2014. Design and Optimization of Self-Nanoemulsifying Delivery System to Enhance Quercetin Hepatoprotective Activity in Paracetamol-Induced Hepatotoxicity. *Journal of pharmaceutical sciences*, **103**: 602–612.
- Akrom dan Marsetyawan, 2013. 'Mekanisme Kemopreventif Ekstrak Heksan Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* Lor) Pada Tikus Sprague Dawley Diinduksil 7,12 Dimethylbenz(a)anthracene: Kajian Antioksidan dan Imunomodulator', Universitas Gadjah Mada.
- ALHaj, N. A., Shamsudin, M. N., Alipiah, N. M., Zamri, H. F., Bustamam, A., Ibrahim, S., dkk., 2010. Characterization of *Nigella sativa* L. Essential Oil-Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, **5**: 52.
- Ali, A., Muhee, H., dan Al-Leban, W. S., 2014. Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Affects Some Parameter in Male Albino Rats. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences*, **4**: 59–68.
- Al-Jumaily, E. F. dan Al-Jumaily, A. J. S., 2015. The Chemical Composition of The Fixed and Folatle Oils of *Nigella sativa* L. and Its Physico-Chemical Properties. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, **2**: 906–917.
- Amudha, P. dan Komala, M., 2014. Formulation and In Vitro Evaluation of Self Nanoemulsion Containing *Eclipta alba* Extract. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, **5**: 882–885.
- Asdadi, A., Harhar, H., Gharby, S., Bouzoubaâ, Z., El, A., dan Hassani, L. M. I., 2014. Chemical Composition and Antifungal Activity of *Nigella Sativa* L. Oil Seed Cultivated In Morocco. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, **3**: 09–15.
- Ashraf, S. S., Rao, M. V., Kaneez, F. S., Qadri, S., Al-Marzouqi, A. H., Chandranath, I. S., dkk., 2011. *Nigella sativa* Extract as a Potent Antioxidant for Petrochemical-Induced Oxidative Stress. *Journal of chromatographic science*, **49**: 321–326.
- Avachat, A. M. dan Patel, V. G., 2015. Self Nanoemulsifying Drug Delivery System of Stabilized Ellagic Acid-phospholipid Complex with Improved Dissolution and Permeability. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **23**: 276–289.
- Balakrishnan, P., Lee, B.-J., Oh, D. H., Kim, J. O., Hong, M. J., Jee, J.-P., dkk., 2009. Enhanced oral Bioavailability of Dexibuprofen by a Novel Solid Self-emulsifying Drug Delivery System (SEDDS). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **72**: 539–545.
- Balakumar, K., Raghavan, C. V., dan Abdu, S., 2013. Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) of Rosuvastatin Calcium: Design, Formulation,

- Bioavailability and Pharmacokinetic Evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **112**: 337–343.
- Bashir, M.U. dan Qureshi, H.J., 2010. Analgesic Effect of *Nigella sativa* Seeds Extract on Experimentally Induced Pain in Albino Mice. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, **20**: 464–467.
- Bassim Atta, M., 2003. Some Characteristics of *Nigella* (*Nigella sativa* L.) Seed Cultivated in Egypt and Its Lipid Profile. *Food Chemistry*, **83**: 63–68.
- Belhadj, Z., Zhang, S., Zhang, W., dan Junlin, W., 2013. Formulation Development and Bioavailability Evaluation of a Self-nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) of Atorvastatin Calcium. *International Journal Pharmaceutics*, **29**: 2051–5782.
- Boseila, A.A. dan Messalam, A.A., 2011. Immunostimulant Effect of Different Fractions of *Nigella sativa* L. Seeds against Rabies Vaccine. *Nature and Science*, **9**: 90–96.
- Boskabady, M.-H., Keyhanmanesh, R., Khameneh, S., Doostdar, Y., dan Khakzad, M.-R., 2011. Potential Immunomodulation Effect of the Extract of *Nigella sativa* on Ovalbumin Sensitized Guinea Pigs. *Journal of Zhejiang University Science B*, **12**: 201–209.
- Chaudhary, B., Maheshwari, K., dan Patel, D., 2011. Self-emulsifying Drug Delivery System: A Novel Approach for Enhancement of Bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research (JPSBR)*, **1**: 31–36.
- Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Lognay, G., Blecker, C., Deroanne, C., dan Attia, H., 2008. Sterol Composition of Black Cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo Pine (*Pinus halepensis* Mill.) Seed Oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**: 162–168.
- Cruvinel, W. de M., Mesquita Júnior, D., Araújo, J.A.P., Catelan, T.T.T., Souza, A.W.S. de, Silva, N.P. da, dkk., 2010. Immune System: Part I. Fundamentals of Innate Immunity with Emphasis on Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammatory Response. *Revista brasileira de reumatologia*, **50**: 434–447.
- Cuine, J.F., McEvoy, C.L., Charman, W.N., Pouton, C.W., Edwards, G.A., Benameur, H., dkk., 2008. Evaluation of the Impact of Surfactant Digestion on the Bioavailability of Danazol After Oral Administration of Lipidic Self-emulsifying Formulations to Dogs. *Journal of pharmaceutical sciences*, **97**: 995–1012.
- Dash, R.N., Mohammed, H., Humaira, T., dan Ramesh, D., 2015. Design, Optimization and Evaluation of Glipizide Solid Self-nanoemulsifying Drug Delivery for Enhanced Solubility and Dissolution. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **23**: 528–540.
- Delves, P.J. dan Roitt, I.M., 2000. The Immune System. *The New England Journal of Medicine*, **343**: 37–49.
- Deniau, A.-L., Mosset, P., Pédrone, F., Mitre, R., Bot, D.L., dan Legrand, A.B., 2010. Multiple Beneficial Health Effects of Natural Alkylglycerols from Shark Liver Oil. *Marine Drugs*, **8**: 2175–2184.
- Depkes RI, 2009. *Materia Medika Indonesia*, I ed. Depkes RI, Jakarta.

- Dranoff, G., 2004. Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy. *Nature Reviews Immunology*, **4**: 11–22.
- Eid, A.M., El-Enshasy, H.A., Aziz, R., dan Elmarzugi, N.A., 2014. The Preparation and Evaluation of Self-nanoemulsifying Systems Containing Swietenia Oil and an Examination of its Anti-Inflammatory Effects. *International journal of nanomedicine*, **9**: 4685–4695.
- Einien, M.A., El Mahrouk, G., dan Elkasabgy, N., 2012. Design and In-Vitro Evaluation of Olanzapine-Loaded Self Nanoemulsifying Drug Delivery System. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, **2**: 12–32.
- Engelen, A., Budijanto, S., dan others, 2015. Optimasi Proses dan Formula pada Pengolahan Mi Sagu Kering (Metroxylon sagu) (Process and Formula Optimizations on Dried Sago Noodle Processing). *Jurnal Agritech Fakultas Teknologi Pertanian UGM*, **35**.
- Garala Kevin, C., Ekshinge Vinit, B., Jarag Ravindra, J., dan Shinde Anil, J., 2008. Fast-disintegrating Aceclofenac Tablets: Formulation Development Using Simplex Lattice Design. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, **32**: 77–81.
- Gharby, S., Harhar, H., Guillaume, D., Roudani, A., Boulbaroud, S., Ibrahim, M., dkk., 2013. Chemical Investigation of *Nigella sativa* L. Seed Oil Produced in Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, **14**: 172–177.
- Güneş, F.E., 2013. Medical Use of Squalene as a Natural Antioxidant. *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences*, **3**: 221–229.
- Gupta, P., Singhal, K., Jangra, A.K., Nautiyal, V., dan Pandey, A., 2012. Shark Liver Oil: A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, **1**: 1 – 15.
- Hajimoradi, M., Daneshmandi, S., dan Hassan, Z.M., 2009^a. Effect of Shark Liver Oil on Nitric Oxide Production and MTT Reduction by Peritoneal Macrophages from BALB/c Mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, **41**: 64–70.
- Hajimoradi, M., Daneshmandi, S., Mohammad, H., dan Roudbari, M., 2009^b. Effect of Shark Liver Oil on Peritoneal Murine Macrophages in Responses to Killed-Candida albicans. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, **12**: 179–183.
- Hajimoradi, M., Hassan, Z.M., Pourfathollah, A.A., Daneshmandi, S., dan Pakravan, N., 2009^c. The Effect of Shark Liver Oil on the Tumor Infiltrating Lymphocytes and Cytokine Pattern in Mice. *Journal of ethnopharmacology*, **126**: 565–570.
- Halawani, E., 2009. Antibacterial Activity of Thymoquinone and Thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and Their Interaction with Some Antibiotics. *Advances in Biological Research*, **3**: 148–52.
- Hasan, N.M., Hayajneh, F.M., Khaleel, M.A., Alharthi, S.A., Shahada, H.M., dan Almalki, H.F., 2015. Development of Potential Self-microemulsifying Lipid Formulation for the Oral Administration of Curcumin. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, **4**: 590–602.

- Joshi, R.P., Negi, G., Kumar, A., Pawar, Y.B., Munjal, B., Bansal, A.K., dkk., 2013. SNEDDS Curcumin Formulation Leads to Enhanced Protection from Pain and Functional Deficits Associated with Diabetic Neuropathy: An Insight into its Mechanism for Neuroprotection. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **9**: 776–785.
- Kaleem, M., Kirmani, D., Asif, M., Ahmed, Q., dan Bano, B., 2006. Biochemical Effects of *Nigella sativa* L Seeds in Diabetic Rats. *Indian journal of experimental biology*, **44**: 745.
- Khan, F., Kalamegam, G., Gari, M., Abuzenadah, A., Chaudhary, A., Al Qahtani, M., dkk., 2014. Evaluation of the Effect of *Nigella sativa* Extract on Human Hepatocellular Adenocarcinoma Cell Line (HepG2) In Vitro. *BMC Genomics*, **15**: P63.
- Kumar, R.S., Syamala, U.S., Punukollu Revathi, S.D., Raghuveer, P., dan Gowthamarajan, K., 2013. Self Nanoemulsifying Drug Delivery System of Olanzapine for Enhanced Oral Bioavailability: In Vitro, In Vivo Characterisation and In Vitro-In Vivo Correlation. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, **5**.
- Lertsatitthanakorn, P., Aromdee, C., dan Khunkitti, W., 2013. Formulation Optimization of Citronella Grass Oil Solid Lipid Particles using Mixture Design. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **5**: 396–402.
- Li, W., Yi, S., Wang, Z., Chen, S., Xin, S., Xie, J., dkk., 2011. Self-nanoemulsifying drug delivery system of persimmon leaf extract: Optimization and bioavailability studies. *International Journal of Pharmaceutics*, **420**: 161–171.
- Majdalawieh, A.F., Hmaidan, R., dan Carr, R.I., 2010. *Nigella sativa* Modulates Splenocyte Proliferation, Th1/Th2 Cytokine Profile, Macrophage Function and NK Anti-Tumor Activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **131**: 268–275.
- Makadia, H.A., Bhatt, A.Y., Parmar, R.B., Paun, J.S., dan Tank, H.M., 2013. Self-nano emulsifying drug delivery system (SNEDDS): Future aspects. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, **3**: 21–27.
- Martien, R., Loretz, B., dan Schnürch, A.B., 2006. Oral Gene Delivery: Design of Polymeric Carrier Systems Shielding Toward Intestinal Enzymatic Attack. *Biopolymers*, **83**: 327–336.
- Matyas, G.R., Wassef, N.M., Rao, M., dan Alving, C.R., 2000. Induction and Detection of Antibodies to Squalene. *Journal of immunological methods*, **245**: 1–14.
- Medzhitov, R., 2007. Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response. *Nature*, **449**: 819–826.
- Michel, C.G., Nesseem, D.I., El-Sayed, N.S., dan El-Alfy, T.S., 2011. Bioactive aqueous extract of *Nigella sativa* L. seed waste: Formulation and evaluation. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **3**: 213–225.
- Mishra, S.B., Pandey, H., dan Pandey, A.C., 2013. Nanosuspension of *Phyllanthus amarus* Extract for Improving Oral Bioavailability and Prevention of

- Paracetamol Induced Hepatotoxicity in Sprague–Dawley Rats. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, **4**: 035007.
- Muzaffar, I., Prawez, A., dan Md Tarique, A., 2013. High Performance Liquid Chromatographic Method with Fluorescence Detection for the Estimation of Thymoquinone in *Nigella sativa* Extracts and Marketed Formulations. *Open Access Scientific Reports*, **2**: 1–6.
- Naga Preethi, N. dan Rajeshwari, P., 2014. An Overview On Immunomodulators. *International Journal of Current Pharmaceutical & Clinical Research*, **4**: 108–114.
- Nepal, P.R., Han, H.-K., dan Choi, H.-K., 2010. Preparation and In Vitro–In Vivo Evaluation of Witepsol® H35 Based Self-nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) of Coenzyme Q 10. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **39**: 224–232.
- Nickavar, B., Mojab, F., Javidnia, K., dan Amoli, M.R., 2003. Chemical Composition of the Fixed and Volatile Oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, **58**: 629–631.
- Nurmiah, S., Syarief, R., Sukarno, S., Peranginangin, R., dan Nurmata, B., 2013. Aplikasi Response Surface Methodology Pada Optimalisasi Kondisi Proses Pengolahan Alkali Treated Cottonii (ATC). *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, **8**: 9–22.
- Parmar, N., Singla, N., Amin, S., dan Kohli, K., 2011. Study of Cosurfactant Effect on Nanoemulsifying Area and Development of Lercanidipine Loaded (SNEDDS) Self Nanoemulsifying Drug Delivery System. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **86**: 327–338.
- Patel, J., Kevin, G., dan Patel, A., 2011. Design and Development of Self-Nanoemulsifying Delivery System for Telmisartan for Oral Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, **1**: 112–118.
- Patel, M.J. dan Patel, S.S., 2013. Optimization of Lovastatin Self-Nanoemulsifying Solid Dosage Form. *Ars Pharm*, **54**: 07–15.
- Pharmacopeia, U.S., 2008. *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 37–NF 32)*. The United States Pharmacopeial Convention.
- Popa, O., Băbeanu, N.E., Popa, I., dan Niță, S., 2014. Methods for Obtaining and Determination of Squalene from Natural Sources: A Review. *BioMed Research International*, **2015**: 1–16.
- Prajapati, S.T., Patel, L.D., dan Patel, C.N., 2009. Floating Matrix Tablets of Domperidone: Formulation and Optimization using Simplex Lattice Design. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, **33**: 113–22.
- Purnomo, E.H., Sitanggang, A.B., Agustin, D.S., Hariyadi, P., dan Hartono, S., 2012. Formulation and Process Optimization of Muffin Produced from Composite Flour of Corn, Wheat, and Sweet Potato. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, **13**: 165 – 172.
- Rao, S.V.R. dan Shao, J., 2008. Self-nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) for Oral Delivery of Protein Drugs: I. Formulation Development. *International journal of pharmaceuticals*, **362**: 2–9.

- Reddy, L.H. dan Couvreur, P., 2009. Squalene: A natural Triterpene for Use in Disease Management and Therapy. *Advanced drug delivery reviews*, **61**: 1412–1426.
- Reddy, M.S. dan Sowjanya, N., 2015. Formulation and in-vitro Characterization of Solid Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (s-SNEDDS) Of Simvastatin. *Journal Pharmaceutical Sciences and Research*, **7**: 40–48.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Quinn, M.E., Association, A.P., Press, P., dan others, 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical press London.
- Ruan, J., Liu, J., Zhu, D., Gong, T., Yang, F., Hao, X., dkk., 2010. Preparation and Evaluation of Self-nanoemulsified Drug Delivery Systems (SNEDDS) of Matrine Based on Drug-phospholipid Complex Technique. *International journal of pharmaceutics*, **386**: 282–290.
- Sagar, K., Kendre, P., Pande, V., dan Chaundhari, V., 2014. Design, Development, and Characterization of Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) of Nateglinide. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **3**: 794–811.
- Salem, M.L., 2005. Immunomodulatory and Therapeutic Properties of the *Nigella sativa* L. Seed. *International Immunopharmacology*, **5**: 1749–1770.
- Salem, M.L., Alenzi, F.Q., dan Attia, W.Y., 2011. Thymoquinone, the active ingredient of *Nigella sativa* seeds, enhances survival and activity of antigen-specific CD8-positive T cells in vitro. *British journal of biomedical science*, **68**: 131.
- Santoso, M.A.A., Handajani, J., dan Jonarta, A.L., 2012. Effect of the Exposure Time of 0, 01% Blackseed (*Nigella sativa* Linn.) Volatile Oil on The Phagocytic Activity of Macrophage Cells in vitro. *The Indonesian Journal of Dental Research*, **119** – 131.
- Sarker, M.M.R., Mazumder, M.E.H., dan Rashid, M.H.O., 2011. In Vitro Enhancement of Polyclonal IgM Production by Ethanolic Extract of *Nigella sativa* L. Seeds in Whole Spleen Cells of Female BALB/c Mice. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, **14**: 73–77.
- Schumann, J., 2012. The Impact of Macrophage Membrane Lipid Composition on Innate Immune Response Mechanisms, dalam: *Inflammation, Chronic Diseases and Cancer - Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Bases*. INTECH Open Access Publisher, hal. 31–52.
- Shah, I., 2011. 'Development and Characterization of Oil-in-water Nanoemulsions from Self-microemulsifying Mixtures', . The University of Toledo.
- Shahnaz, G., Hartl, M., Barthelmes, J., Leithner, K., Sarti, F., Hintzen, F., dkk., 2011. Uptake of Phenothiazines by the Harvested Chylomicrons Ex Vivo model: Influence of Self-nanoemulsifying Formulation Design. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **79**: 171–180.
- Sharma, N.K., Ahirwar, D., Jhade, D., dan Gupta, S., 2009. Medicinal and Pharmacological Potential of *Nigella sativa*: a review. *Ethnobotanical Leaflets*, **2009**: 11.
- Sompayrac, L.M., 2011. *How the Immune System Works*. John Wiley & Sons.

- Sriningsih dan Wibowo, A.E., 2008. *Effect of Nigella Sativa L. Oil on Rat-Peritoneum Macrophage Phagocyte Activity*. The International Seminar on Chemistry, Jatinangor.
- Sriningsih dan Wibowo, A.E., 2009. Efek Imunostimulan Ekstrak Meniran (*Phyllanthus Niruri* L.) Secara In Vivo Pada Tikus. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 7: 15–18.
- Srivastava, M., 2010. *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*. Springer Science & Business Media.
- Strickley, R.G., 2004. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. *Pharmaceutical research*, 21: 201–230.
- Sugindro, M.E. dan Djajadisastra, J., 2008. Pembuatan dan Mikroenkapsulasi Ekstrak Etanol Biji Jinten Hitam Pahit (*Nigella sativa* Linn.). *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 5: 57–66.
- Tran, T.H., Guo, Y., Song, D., Bruno, R.S., dan Lu, X., 2014. Quercetin-Containing Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for Improving Oral Bioavailability. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103: 840–852.
- Tubessa, Z., Imam, M.U., Mahmud, R., dan Ismail, M., 2013. Study on the Potential Toxicity of a Thymoquinone-Rich Fraction Nanoemulsion in Sprague Dawley Rats. *Molecules*, 18: 7460–7472.
- Verma, H., Prasad, S.B., dan Yashwant, S.H., 2013. Herbal Drug Delivery System: A Modern Era Prospective. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 4: 88–101.
- Wadhwa, J., Nair, A., dan Kumria, R., 2011. Self-emulsifying Therapeutic System: a Potential Approach for Delivery of Lipophilic Drugs. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47: 447–465.
- Wagner, H., Bladt, S., dan Zgainski, E., 1984. *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Wankhade, V., Pande, S., Tapar, K., dan Bobade, N., 2010. Design and Evaluation of Self-nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) for Gliclazide. *Der Pharmacia Lett*, 2: 132–43.
- Yadav, P.S., Yadav, E., Verma, A., dan Amin, S., 2014. Development, Characterization, and Pharmacodynamic Evaluation of Hydrochlorothiazide Loaded Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems. *The Scientific World Journal*, 2014: 1–10.
- Zhang, H., Yao, M., Morrison, R.A., dan Chong, S., 2003. Commonly Used Surfactant, Tween 80, Improves Absorption of P-glycoprotein Substrate, Digoxin, in Rats. *Archives of Pharmacol Research*, 26: 768–772.
- Zhao, Y., Wang, C., Chow, A.H., Ren, K., Gong, T., Zhang, Z., dkk., 2010. Self-nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) for Oral Delivery of Zedoary Essential Oil: Formulation and Bioavailability Studies. *International journal of pharmaceutics*, 383: 170–177.