



**MODIFIKASI KRISTAL NARINGENIN MELALUI PEMBENTUKAN
KOKRISTAL NARINGENIN-ASAM FUMARAT DENGAN PERBEDAAN
RASIO STOIKIOMETRI UNTUK MENINGKATKAN KELARUTAN**

*diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan memperoleh gelar Sarjana pada
program studi Farmasi*

SKRIPSI

Oleh

**Putri Fadillah Tri Cahyani
202210101005**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN
TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI FARMASI
2024**



**MODIFIKASI KRISTAL NARINGENIN MELALUI PEMBENTUKAN
KOKRISTAL NARINGENIN-ASAM FUMARAT DENGAN PERBEDAAN
RASIO STOIKIOMETRI UNTUK MENINGKATKAN KELARUTAN**

*diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan memperoleh gelar Sarjana pada
program studi Farmasi*

SKRIPSI

Oleh

**Putri Fadillah Tri Cahyani
202210101005**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN
TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI FARMASI
2024**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan untuk :

1. Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan segala rahmat, hidayah, dan nikmat-Nya kepada orang-orang yang berjuang dalam kebaikan dan menuntut ilmu;
2. Kedua orangtua penulis, Ibu Hanik dan Bapak Sugiono yang telah merawat, membesarkan, mendoakan, serta selalu memberikan dukungan dengan penuh cinta dan kasih sayang yang tidak pernah putus;
3. Saudara kandung penulis, Milatur dan Fidinina yang selalu ikut serta dalam memberikan nasehat, dukungan, dan semangat;
4. Keluarga besar penulis yang ikut serta dalam memberikan nasehat, dukungan, dan semangat;
5. Ibu Dr. apt. Budipratiwi Wisudyaningsih, S.Farm, M.Sc dan ibu apt. Kuni Zu'aimah B., S.Farm., M.Farm. yang telah berkenan meluangkan waktu, tenaga serta pikiran dalam membimbing penulis hingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik;
6. Seluruh Bapak Ibu guru TK Dharma Wanita, SDN Tempurejo 2, SMPN 3 Kediri, dan SMAN 3 Kediri serta seluruh dosen dan staf akademik Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah membagikan ilmunya selama kuliah di jenjang sarjana farmasi ini;
7. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember

MOTTO

“Orangtua di rumah menanti kepulanganmu dengan hasil yang membanggakan jangan kecewakan mereka. Simpan keluhmu, sebab letihmu tak sebanding dengan perjuangan mereka menghidupimu.” – Ika df.

“Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum, sebelum mereka mengubah keadaan diri mereka sendiri” – QS. Ar-Rad 11

“Intansurullahu yansurkum

Wahai orang-orang yang beriman! Jika kamu menolong agama Allah, niscaya Dia akan menolongmu” – QS. Muhammad 7

PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Putri Fadillah Tri Cahyani

NIM : 202210101005

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Modifikasi Kristal Naringenin Melalui Pembentukan Kokristal Naringenin-Asam Fumarat Dengan Perbedaan Rasio Stoikiometri Untuk Meningkatkan Kelarutan" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 04 Juli 2024

Yang Menyatakan,



Putri Fadillah Tri Cahyani

202210101005

ABSTRACT

Naringenin is a flavonoid compound that is often found in grapes, tomatoes, lemons, cherries and citrus fruits from the Rutaceae family. Naringenin has many pharmacological activities, namely as an antioxidant, anticancer, antiviral, antihyperlipidemia, anti-inflammatory and anti-infection. Various studies have been carried out regarding the pharmacological activity of naringenin, so this compound has the potential to be developed as a candidate for active pharmaceutical ingredients, but there are challenges in developing naringenin as an active pharmaceutical ingredient. Naringenin has low solubility in water, namely 4.38-46 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The aim of this research is to improve the physicochemical characteristics of naringenin in the solubility aspect by developing a cocrystal product. The initial stage of this research was determining the coformer through a computational approach using ChemBioDraw Ultra 12.0 software and the fumaric acid coformer was chosen because it has the smallest energy minimize value, namely -466,457 kcal/mol. Then preparation of naringenin-fumaric acid cocrystals in ratios of 1:1 and 1:3 was carried out using the solvent evaporation method. Next, the cocrystal samples were characterized using crystallinity analysis (PXRD), thermal analysis (DSC), infrared spectroscopy analysis (FTIR), and crystal surface morphology (SEM) analysis as well as solubility tests. The results of PXRD, DSC, FTIR, and SEM characterization of the 1:1 and 1:3 ratio naringenin-fumaric acid cocrystals showed changes in diffractogram patterns, changes in endothermic peaks, shifts in wave numbers of hydroxyl-carbonyl functional groups, and differences in crystal morphology compared to the constituent components (naringenin and fumaric acid). The solubility test results showed that the 1:1 ratio of naringenin-fumaric acid cocrystals provided an increase in solubility of $13,00 \pm 0.198 \text{ mg}/\text{L}$, while the 1:3 ratio of naringenin-fumaric acid cocrystals provided an increase in solubility of $10,503 \pm 0.044 \text{ mg}/\text{L}$. Based on the results of this research, it is proven that naringenin can be modified in cocrystal form with a fumaric acid coformer at a ratio of 1:1 and 1:3 as proven by initial computational results. The cocrystals formed showed increased solubility and differences in physicochemical characteristics. The difference in the stoichiometric ratio between naringenin and fumaric acid affects the physicochemical characteristics and solubility of naringenin by lowering the crystal lattice energy.

Keywords: Naringenin; Cocrystal; Solubility; Ratio Stoichiometry

RINGKASAN

Modifikasi Kristal Naringenin Melalui Pembentukan Kokristal Naringenin-Asam Fumarat Dengan Perbedaan Rasio Stoikiometri Untuk Meningkatkan Kelarutan: Putri Fadillah Tri Cahyani:202210101005;2024, 85 halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

Naringenin merupakan salah satu senyawa golongan flavonoid yang sering ditemukan pada anggur, tomat, lemon, ceri, dan buah jeruk dari family Rutaceae. Naringenin memiliki banyak aktivitas farmakologi yaitu sebagai antioksidan, antikanker, antivirus, antihiperlipidemia, antiinflamasi dan antiinfeksi. Berbagai penelitian mengenai aktivitas farmakologi naringenin telah banyak dilakukan, sehingga senyawa ini berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat bahan aktif farmasi namun terdapat tantangan dalam pengembangan naringenin sebagai bahan aktif farmasi. Naringenin memiliki kelarutan yang rendah dalam air yaitu sebesar 4,38-46 $\mu\text{g/mL}$ (Anna *et al.*, 2022). Berdasarkan kelarutannya naringenin termasuk golongan BCS (*Biopharmaceutical Classification System*) kelas II yang artinya kelarutan dalam air rendah tetapi permeabilitasnya tinggi sehingga menyebabkan bioavailabilitasnya rendah dan efek terapeutik yang diinginkan tidak tercapai pada penggunaan sediaan oral (Fang., 2023). Penelitian ini akan mengembangkan produk kokristal naringenin dengan tujuan untuk memperbaiki karakteristik fisikakimia naringenin dalam aspek kelarutan.

Kokristal adalah padatan berbentuk kristal yang mengandung dua atau lebih molekul berbeda (bahan aktif dan koformer) dalam rasio stoikiometri tertentu untuk membentuk kristal baru dengan kelarutan yang lebih baik dalam air dibandingkan senyawa murni tanpa mengubah aktivitas farmakologinya. Perubahan sifat fisikakimia pada sistem kokristal disebabkan karena adanya interaksi antara bahan aktif dengan koformer. Interaksi ini disebut interaksi nonkovalen seperti ikatan hidrogen, ikatan π - π^* , dan gaya *van der Waals*.

Penentuan koformer dilakukan melalui pendekatan komputasi menggunakan empat kandidat koformer yang dapat membentuk supramolekular *heterosynthon* dan *homosynthon* dengan naringenin. Koformer yang dipilih adalah koformer yang dapat membentuk ikatan hidrogen dengan naringenin yang

memiliki nilai *energy minimize* paling kecil, yaitu asam fumarat -466,457 kcal/mol. Semakin rendah *energy minimize*, maka ikatan hidrogen antara naringenin dan koformer semakin mudah terjadi dan bersifat lebih stabil.

Perbandingan rasio stoikiometri menjadi menjadi salah satu hal yang harus diperhatikan dalam pembentukan kokristal. Pembentukan kokristal dengan rasio yang berbeda akan mempengaruhi peningkatan kelarutan, sehingga dalam penelitian ini digunakan perbandingan rasio untuk mengetahui perbedaan peningkatan kelarutan. Preparasi kokristal naringenin-asam fumarat dilakukan dengan metode *solvent evaporation* menggunakan pelarut etanol pa. Metode ini cukup efektif dalam pembentukan kokristal, karena memberikan rata-rata peningkatan kelarutan yang tinggi.

Berdasarkan hasil karakterisasi PXRD dalam penelitian ini, sampel kokristal naringenin-asam fumarat pada kedua rasio menunjukkan adanya perubahan pola difraktogram dibandingkan dengan senyawa murni. Hasil karakterisasi DSC, sampel kokristal naringenin-asam fumarat pada kedua rasio (1:1 dan 1:3) memiliki puncak endotermik yang berbeda dibandingkan dengan naringenin murni. Masing-masing sampel memiliki titik lebur sebesar 253,60°C pada naringenin, kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:1 sebesar 241, 67°C dan kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:3 sebesar 241, 61°C. Hasil karakterisasi FTIR menunjukkan adanya pergeseran renggangan bilangan gelombang yang menandakan adanya interaksi antara gugus C=O dan OH pada komponen kokristal. Hasil analisis morfologi permukaan dari masing-masing sampel kokristal dilakukan menggunakan analisis *Scanning Electron Microscope* (SEM) dan didapatkan hasil morfologi naringenin berbentuk prismatic sedangkan kokristal keduanya berbentuk jarum.

Berdasarkan hasil penelitian ini membuktikan bahwa naringenin dapat dimodifikasi dalam bentuk kokristal dengan koformer asam fumarat pada rasio 1:1 dan 1:3 yang dibuktikan dari komputasi. Kokristal yang terbentuk menunjukkan peningkatan kelarutan dan perbedaan karakteristik fisikakimia. Perbedaan rasio antara naringenin dan asam fumarat akan mempengaruhi karakteristik fisikakimia dan kelarutan.

PRAKATA

Puji syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kepada Allah Subhanallahu Wa Ta'ala yang telah melimpahkan berkah, rahmat, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Modifikasi Kristal Naringenin Melalui Pembentukan Kokristal Naringenin-Asam Fumarat Dengan Perbedaan Rasio Stoikiometri Untuk Meningkatkan Kelarutan”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi persyaratan kelulusan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat, hidayah, dan nikmat-nya kepada orang-orang yang berjuang dalam kebaikan dan menuntut ilmu;
2. Ibu Umi Hanik dan Bapak Sugiono yang telah mendoakan, merawat dan membesarkan serta selalu memberikan dukungan dengan penuh cinta dan kasih sayang serta doa yang tidak pernah putus;
3. Mbak Mila, Mbak Nina, Meme, Salman, Mas Kris, dan Mas Iksan yang selalu memberikan dukungan dan semangat.
4. Bapak Dr. apt. Nuri, S.Si., M.Si. selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
5. Bapak Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D. selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing dan membantu dalam proses perkuliahan dari awal hingga akhir;
6. Ibu Dr. apt. Budipratiwi Wisudyaningsih, S.Farm., M.Sc., dan Ibu apt. Kuni Zu'aimah Barikah, S.Farm., M.Farm., yang telah berkenan meluangkan waktu, tenaga, serta pikiran dalam membimbing penulis hingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik;
7. Bapak Dr. apt. Yudi Wicaksono, S.Si., M.Si. dan Ibu apt. Lusia Oktora R. K. S., S.F., M.Sc. selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak masukan, kritik dan saran yang sangat berguna untuk membangun penulisan skripsi ini;

8. Bapak Ibu guru Taman Kanak-Kanak hingga Sekolah Menengah Atas serta seluruh dosen dan staf akademik Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah membagikan ilmunya selama kuliah di jenjang sarjana farmasi;
9. Ibu Itus, Mbak Hani, dan Mbak Indri yang telah membantu penulis selama penelitian di Laboratorium; dan
10. Teman-teman kelompok penelitian, Novita Febrianti, Anifatul Nur Faizah, dan Rizki Ika yang selalu mendukung, baik ketika sedih maupun senang, saling menguatkan, saling tolong menolong dan selalu siap sedia membantu baik selama proses di laboratorium maupun di luar laboratorium;
11. Teman seperjuangan “YANGYUD PRIDE” Novita, Lia, Valen, Farida, Devany, Anif, Kikik yang memberikan hiburan, semangat dan dukungan;
12. Teman-teman PPM Syafiurrohman Jember (Tyas, Arini, Syifa, Rima, Renanda, Icha, Mbak Amalia, Mbak Ervyana, dan Mas Candra) yang selalu mendukung, menemani, saling tolong menolong, dan menanyakan progress skripsi selama penulis menulis skripsi;
13. Semua pihak yang membantu penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik, lancar, dan di waktu yang tepat.

Jember, 04 Juli 2024

Penulis

DAFTAR ISI

PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN ORISINALITAS	v
HALAMAN PERSETUJUAN	Error! Bookmark not defined.
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Naringenin	5
2.2 Asam Fumarat	6
2.3 Kelarutan	7
2.4 Kokristal	7
2.5 Metode <i>Solvent Evaporation</i>	8
2.6 Karakterisasi Kokristal	9
2.6.1 <i>Powder X-Ray Diffraction (PXRD)</i>	9
2.6.2 <i>Differential Scanning Calorimetry (DSC)</i>	9
2.6.3 <i>Spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR)</i>	10
2.6.4 <i>Scanning Electron Microscopy (SEM)</i>	10
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	11

3.1	Lokasi dan Waktu Penelitian	11
3.2	Rancangan Penelitian.....	11
3.3	Bahan Penelitian.....	11
3.4	Alat Penelitian.....	11
3.5	Alur Penelitian.....	12
3.6	Prosedur Penelitian	12
3.6.1	Penentuan Koformer dengan Pendekatan Komputasi.....	12
3.6.2	Preparasi Kokristal Naringenin-Asam Fumarat dengan Metode <i>Solvent Evaporation</i>	13
3.6.3	Karakterisasi Kokristal.....	13
3.6.4	Uji Kelarutan.....	15
3.6.5	Analisis Statistik	16
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1.	Hasil Pendekatan Komputasi untuk Penentuan Koformer	18
4.2.	Hasil Preparasi Kokristal Naringenin-Asam Fumarat dengan Metode <i>Solvent Evaporation</i>	19
4.3.	Hasil Karakterisasi Kokristal.....	20
4.3.1.	<i>Powder X-Ray Diffraction</i> (PXRD)	20
4.3.2.	Differential Scanning Calorimetry (DSC)	22
4.3.3.	<i>Fourier Transform InfraRed</i> (FTIR).....	24
4.3.4.	Scanning Electron Microscopy (SEM)	26
4.4.	Uji Kelarutan	28
4.4.1.	Hasil Penentuan Panjang Gelombang Pengukuran Spektrofotometer UV-Vis	28
4.4.2.	Hasil Pembuatan Kurva Baku Kelarutan	29
4.4.3.	Hasil Pengujian Kelarutan Kokristal.....	29
BAB 5.	PENUTUP	33
5.1.	Kesimpulan	33
5.2.	Saran.....	33

DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN.....	40

DAFTAR TABEL

Tabel 4. 1 Hasil analisis koformer pada pendekatan komputasi	18
Tabel 4.2 Perbandingan sudut 2θ difraktogram.	20
Tabel 4. 3. Data Termodinamik Hasil Pengujian DSC	24
Tabel 4. 4 Perbandingan bilangan gelombang (cm^{-1}) spektra inframerah.	26
Tabel 4. 5. Hasil Pengukuran serapan larutan standar naringenin	29
Tabel 4. 6. Hasil uji kelarutan	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Struktur Kimia Naringenin.....	5
Gambar 2. 2 Struktur Kimia Asam Fumarat	6
Gambar 3. 1 Alur Penelitian.....	12
Gambar 4. 1 Hasil komputasi ikatan hidrogen.....	19
Gambar 4. 2 Hasil serbuk kokristal naringenin-asam fumarat.....	20
Gambar 4. 3. Perbandingan difraktogram	21
Gambar 4. 4. Hasil termogram DSC	23
Gambar 4. 5 Hasil spektra FTIR	25
Gambar 4. 6 Hasil SEM pada perbesaran 1500x	27
Gambar 4. 7. Kurva serapan naringenin dan asam fumarat	28
Gambar 4. 8. Kurva Baku Naringenin dengan pelarut etanol-aquadest.....	29

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Naringenin merupakan salah satu senyawa golongan flavonoid yang sering ditemukan pada anggur, tomat, lemon, ceri, dan buah jeruk dari family *Rutaceae*. Naringenin memiliki banyak aktivitas farmakologi yaitu sebagai antioksidan, antikanker, antivirus, antihiperlipidemia, antiinflamasi dan antiinfeksi (Salehi *et al.*, 2019; Pawan *et al.*, 2021; Erlund *et al.*, 2001, Ji Cai *et al.*, 2023; Cui W *et al.*, 2019). Berbagai penelitian mengenai aktivitas farmakologi naringenin telah banyak dilakukan, sehingga senyawa ini berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat bahan obat.

Salah satu permasalahan naringenin dalam pengembangan kandidat obat adalah memiliki karakteristik fisikokimia yang kurang baik yaitu kelarutan yang rendah dalam air sebesar 4,38 - 46 $\mu\text{g/mL}$ (Anna *et al.*, 2022). Berdasarkan kelarutannya naringenin termasuk golongan BCS (*Biopharmaceutical Classification System*) kelas II yang artinya kelarutan dalam air rendah tetapi permeabilitasnya tinggi sehingga menyebabkan bioavailabilitasnya rendah dan efek terapeutik yang diinginkan tidak tercapai pada penggunaan sediaan oral (Fang., 2023). Hasil penelitian *in vivo* menunjukkan bioavailabilitas naringenin hanya 4% ketika pemberian oral pada kelinci (Hsiu, 2002).

Strategi formulasi berdasarkan sifat senyawa yang sukar larut seperti log P dan T_m , maka senyawa dapat diklasifikasikan menjadi *grease ball* dan *brick dust compound*. Senyawa yang memiliki lipofilisitas yang relatif rendah ($\log P < 3$) dan T_m yang tinggi ($> 200^\circ\text{C}$) diklasifikasikan sebagai *brick dust compound*. Naringenin termasuk kedalam senyawa *brick dust compound* karena memiliki nilai log P 2,52 dan T_m 251°C , maka untuk meningkatkan kelarutannya dapat dilakukan modifikasi *solid-state* (Berga *et al.*, 2023).

Modifikasi kristal adalah perubahan susunan internal kristal yang berbeda dengan bentuk kristal awal. Modifikasi kristal berpengaruh terhadap sifat fisika kimia bahan aktif. Modifikasi kristal digunakan dalam upaya untuk mengubah kelarutan dan laju disolusi obat (Indra *et al.*, 2021). Metode upaya peningkatan kelarutan suatu bahan aktif obat yang sukar larut dalam air diantaranya dengan cara pembentukan garam, dispersi padat, dan kokristal (Dewi *et al.*, 2021). Dipilih metode kokristal karena kokristal dapat dilakukan pada semua jenis obat, baik yang bersifat asam, basa, dapat terion atau tidak dapat terion, serta dapat mengubah sifat fisik material karena adanya perubahan susunan internal kristal tanpa mengubah aktivitas farmakologi obat (Bruni *et al.*, 2013). Kokristal adalah padatan berbentuk kristal yang mengandung dua atau lebih molekul berbeda dalam rasio stoikiometri tertentu untuk membentuk kristal baru dengan kelarutan yang lebih baik dalam air dibandingkan senyawa murni (Wisudyaningsih *et al.*, 2019).

Pembentukan kokristal memerlukan koformer yang dapat membentuk ikatan hidrogen dengan zat aktif sehingga kelarutan dapat meningkat (Apsari & Chaerunisa, 2020). Koformer yang digunakan harus bersifat tidak toksik, mudah larut dalam air, dapat berikatan secara non kovalen dengan bahan aktif (Mirza *et al.*, 2008) dan termasuk dalam kelompok GRAS (*Generally Regarded as Safe*) serta mengandung gugus fungsi yang dapat membentuk ikatan hidrogen yang kuat (Yadav *et al.*, 2009). Studi penelitian terdahulu menunjukkan bahwa kokristal naringenin berhasil dibuat menggunakan beberapa koformer seperti betain, nikotinamid, isonikotinamid, kafein, karbamazepin, dan asam pikolinat (Cui *et al.*, 2019b). Untuk menentukan kandidat koformer yang akan digunakan dalam penelitian ini maka dilakukan pendekatan komputasi dengan software *ChemBioDraw Ultra 12.0*. Pendekatan komputasi ini bertujuan untuk mengetahui potensi terbentuknya ikatan hidrogen antara naringenin dan koformer melalui *energy minimize* yang nilainya paling

rendah. Dipilih asam fumarat sebagai koformer karena memiliki nilai *energy minimize* yang paling rendah.

Perbedaan rasio stoikiometri dapat mempengaruhi peningkatan kelarutan kokristal. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa perbedaan rasio stoikiometri tertentu dapat menghasilkan kelarutan yang berbeda, penelitian tersebut yaitu kokristal naringenin-isonikotinamid dan kokristal naringenin-asam pikolinat dengan bahan aktif yang sama memberikan perbedaan peningkatan kelarutan. Pada kokristal naringenin-isonikotinamid rasio 1:2 peningkatan kelarutannya lebih baik, sedangkan kokristal naringenin-asam pikolinat rasio 1:1 memberikan peningkatan kelarutan yang lebih baik (Luo *et al.*, 2018)

Metode yang digunakan dalam pembentukan kokristal pada penelitian ini yaitu *solvent evaporation*. Metode *solvent evaporation* dilakukan dengan mencampurkan zat aktif dan koformer dengan rasio stoikiometri tertentu, yang masing-masing dilarutkan dalam pelarut yang sesuai dan hasilnya dibiarkan menguap.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk melakukan pembentukan kokristal naringenin-asam fumarat pada rasio 1:1 dan 1:3 dengan metode *solvent evaporation*. Selanjutnya, kokristal yang terbentuk dikarakterisasi menggunakan PXRD (*Powder X-Ray Diffractometer*), DSC (*Differential Scanning Calorimetry*), FTIR (*Fourier Transform Infrared*), SEM (*Scanning Electron Microscope*) dan uji kelarutan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka rumusan masalah pada penelitian ini sebagai berikut:

1. Apakah naringenin dan koformer asam fumarat rasio stoikiometri 1:1 dan 1:3 dapat membentuk kokristal dengan metode *solvent evaporation* berdasarkan hasil karakterisasi (PXRD, DSC, FTIR, SEM)?

2. Bagaimana pengaruh perbedaan rasio stoikiometri terhadap kelarutan pada pembuatan kokristal naringenin-asam fumarat rasio stoikiometri 1:1 dan 1:3 dengan metode *solvent evaporation*?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Dapat membuktikan pembentukan kokristal naringenin dan koformer asam fumarat rasio stoikiometri 1:1 dan 1:3 dengan metode *solvent evaporation* berdasarkan hasil karakterisasi (PXRD, DSC, FTIR, SEM).
2. Dapat mengetahui pengaruh perbedaan rasio stoikiometri terhadap kelarutan pada pembuatan kokristal naringenin-asam fumarat rasio stoikiometri 1:1 dan 1:3 dengan metode *solvent evaporation*.

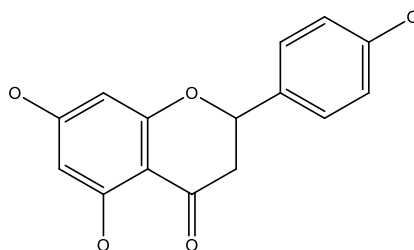
1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat dalam pengembangan naringenin dengan bentuk kokristal naringenin-asam fumarat untuk memperoleh karakteristik kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan naringenin murni, sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitasnya dalam upaya pengembangan naringenin sebagai salah satu kandidat *Active Pharmaceutical Ingredients* (API).

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Naringenin

Naringenin (*2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-(4 hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one*) merupakan salah satu flavonoid yang paling banyak ditemukan pada buah-buahan seperti jeruk, tomat, anggur, lemon, dan ceri (Salehi *et al.*, 2019). Naringenin memiliki aktivitas farmakologi sebagai antioksidan, antikanker, antivirus, antihiperlipidemia, antiinflamasi dan antiinfeksi (Salehi *et al.*, 2019; Pawan *et al.*, 2021; Erlund *et al.*, 2001, Ji Cai *et al.*, 2023; Cui W *et al.*, 2019).



Gambar 2. 1 Struktur Kimia Naringenin

Naringenin memiliki rumus molekul $C_{15}H_{12}O_5$ dengan berat molekul sebesar 272,26 g/mol (Ismat Muzamil *et al.*, 2022). Naringenin merupakan serbuk hablur berwarna putih dengan titik lebur $251^{\circ}C$, nilai pKa 7,05 dan nilai log P sebesar 2,52 (Pubchem, 2023; Madureira *et al.*, 2023). Panjang gelombang UV maksimum naringenin yaitu pada 288 nm (Jha, Shah, Talele, *et al.*, 2020). Kelarutan naringenin dalam air sebesar 4,38 - 46 $\mu g/mL$, dalam etanol sebesar 50 mg/mL, dan dalam *olive oil* sebesar 20 mg/mL (Anna *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2014; Yeo *et al.*, 2021)

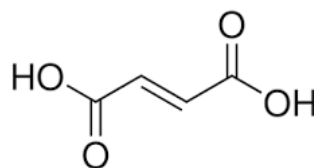
Berdasarkan uraian diatas naringenin memiliki kelarutan yang rendah dalam air sehingga menyebabkan bioavailabilitas yang rendah. Naringenin diklasifikasikan BCS kelas II karena memiliki kelarutan yang rendah dalam air tetapi permeabilitasnya tinggi. Kelarutan yang rendah dapat mempengaruhi absorpsi obat sehingga dapat menurunkan bioavailabilitas dan berpengaruh pada efektivitas terapi. Bioavailabilitas naringenin secara oral sekitar 5,81% dan hanya sejumlah kecil yang

diserap di saluran pencernaan karena kelarutannya yang rendah (Kanaze et al., 2007).

Naringenin rentan terdegradasi karena oksidasi, suhu tinggi dan cahaya, terutama sinar UV (Ioannou *et al.*, 2018). Saat terkena cahaya dan suhu, naringenin bisa rusak dan terdegradasi. Naringenin stabil pada pH 3,5; 6,5; 8,5 dan pada suhu 250°C (Lucas-Abellán *et al.*, 2019; Ja, Shah, & Amin, 2020).

2.2 Asam Fumarat

Asam fumarat (*2-butenedioic acid, fumaric acid, allomaleic acid*) merupakan golongan asam karboksilat yang ditemukan pada tanaman genus *Fumaria*. Dalam industri, asam fumarat dimanfaatkan sebagai produk makanan dan minuman, deterjen, serta bahan eksipien dalam sediaan obat (Mrowietz *et al.*, 2018). Karakteristik fisikokimia asam fumarat ($C_4H_4O_4$) berupa padatan kristal berwarna putih, tidak berbau, rasa sedikit asam, berat molekul 116,07, titik leleh 286°C, masa jenis 1.625 kg/m³, memiliki nilai pKa 3,03 pada suhu 18°C. Kelarutan asam fumarat dalam air sebesar 7,0 mg/mL pada suhu 25°C sedangkan pada pelarut organik memiliki kelarutan sebesar 54,4 gram/L dalam etanol 95%, 16,9 gram/L dalam aseton pada suhu 29,7°C dan dalam benzena 0,03 gram/L (Yang *et al.*, 2020). Panjang gelombang UV asam fumarat yaitu pada 204-210 nm.



Gambar 2. 2 Struktur Kimia Asam Fumarat

Asam fumarat digunakan sebagai koformer dalam pembentukan kokristal karena termasuk kedalam senyawa golongan GRAS (*Generally Regarded as Safe*). Penelitian terdahulu membuktikan penggunaan koformer asam fumarat dengan berberin dalam pembentukan kokristal dapat meningkatkan kelarutan dan disolusi (Yang *et al.*, 2020).

2.3 Kelarutan

Kelarutan merupakan jumlah maksimum zat terlarut (*solute*) yang dapat larut dalam media pelarut (*solvent*) dengan tekanan dan suhu tertentu hingga kondisi jenuh (Apsari dan Chaerunisa, 2020). Kelarutan menjadi salah satu parameter fisikokimia yang mempengaruhi bioavailabilitas suatu sediaan obat. Obat akan memberikan efek terapeutik jika dalam bentuk terlarut sehingga dapat menembus membran. Kelarutan dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain : ionisasi zat, suhu, pH pelarut, dan jenis pelarut (Byrn *et al.*, 2017).

Berdasarkan *Biopharmaceutical Classification System* (BCS), kemampuan obat larut dalam air diklasifikasikan menjadi beberapa kelas sebagai berikut (Chavda *et al.*, 2010):

- Kelas I : kelarutan tinggi–permeabilitas tinggi
- Kelas II : kelarutan rendah–permeabilitas tinggi
- Kelas III : kelarutan tinggi–permeabilitas rendah
- Kelas IV : kelarutan rendah–permeabilitas rendah

Senyawa obat yang sulit larut dalam air bergantung pada kemampuan obat untuk membentuk ikatan hidrogen dengan air. Air dapat melarutkan API yang mengandung alkohol, fenol, aldehid, serta senyawa lain dengan atom oksigen dan nitrogen (Sinko, 2011). Pada pembentukan kokristal kelarutan API dipengaruhi oleh kekuatan kisi kristal, interaksi *solute – solvent*, dan titik leleh (Thakuria *et al.*, 2013).

2.4 Kokristal

Kokristal adalah padatan berbentuk kristal yang mengandung dua atau lebih molekul berbeda (bahan aktif dan koformer) dalam rasio stoikiometri tertentu yang terbentuk melalui ikatan non kovalen tanpa menyebabkan kerusakan struktur molekul sehingga efek farmakologinya tetap (Wisudyaningih *et al.*, 2019). Dalam pembentukan kokristal terdapat interaksi ikatan hidrogen, gaya Van der Waals, dan interaksi $\pi - \pi^*$ (Kumar & Nanda, 2017). Interaksi antara API dan koformer akan membentuk kisi kristal dengan energi yang lebih rendah dibandingkan kisi

kristal sebelumnya. Gugus-gugus fungsi yang dapat berinteraksi dengan molekul air pada koformer berperan dalam meningkatkan afinitas API dengan air sehingga kelarutan API meningkat (Thakuria *et al.*, 2013).

Berdasarkan analisis kokristal oleh *Cambridge Structural Database* (CSD) API dan koformer dapat membentuk kokristal melalui ikatan hidrogen (Sopyan *et al.*, 2021). Ikatan hidrogen merupakan gaya antar molekul pada atom H, N, O, F. Ikatan hidrogen memiliki energi *minimize* yang lebih kecil dibandingkan ikatan non-kovalen lainnya. Energi *minimize* yang kecil menandakan adanya ikatan hidrogen yang lebih stabil sehingga hal ini menjadi pertimbangan pemilihan koformer dalam pembentukan kokristal.

Koformer menjadi komponen penting yang harus ada pada pembentukan kokristal. Senyawa yang dapat digunakan sebagai koformer adalah senyawa yang memiliki gugus asam karboksilat, amida, atau alkohol karena gugus-gugus tersebut memungkinkan adanya interaksi dengan API pada pembentukan kokristal.

Rasio stoikiometri merupakan perbandingan molaritas dari mol reaktan dan produk yang terlibat dalam reaksi kimia. Adanya variasi stoikiometri yang berbeda memberikan perbedaan dalam membentuk sifat fisikokimia yang spesifik (Thakuria *et al.*, 2013). Penelitian terdahulu dalam pengembangan kokristal meloksikam-asam paraaminobenzoar menunjukkan perbedaan laju pelarutan dari ketiga kokristal disebabkan karena perbedaan rasio stoikiometri dari kokristal 1:1; 1:2; dan 2:1 (Haeria *et al.*, 2018). Kokristal dengan rasio stoikiometri yang berbeda antara senyawa-senyawa dalam kisi akan membentuk sifat fisikokimia berdasarkan komposisi stoikiometri. Dalam sistem kokristal pemilihan rasio stoikiometri dapat mempengaruhi peningkatan kelarutan API.

2.5 Metode *Solvent Evaporation*

Prinsip metode *solvent evaporation* yaitu melarutkan bahan aktif dan koformer pada rasio stoikiometri tertentu menggunakan pelarut yang sesuai dan kelarutannya pada pelarut harus hampir sama atau kongruen

(Barikah, 2018). Pada metode *solvent evaporation* harus dilakukan pengadukan secara konstan untuk memfasilitasi interaksi molekuler antara API dan koformer, kemudian pelarut dibiarkan menguap hingga membentuk padatan yang disebut kokristal.

Pada proses pelarutan diharapkan terjadi interaksi pada gugus akseptor-donor hidrogen dari API dan koformer sehingga terbentuk ikatan hidrogen (Hairunnisa *et al.*, 2019). Keuntungan dari metode *solvent evaporation* antara lain : proses yang dilakukan mudah, sederhana, dan memberikan rata-rata peningkatan kelarutan yang lebih tinggi. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa metode *solvent evaporation* dapat membentuk kokristal kuersetin-isonikotinamid, ketoprofen-asam malonat, dan kuersetin-asam maleat (Wisudyaningsih *et al.*, 2021; Wicaksono *et al.*, 2017; Herawati, 2022).

2.6 Karakterisasi Kokristal

2.6.1 Powder X-Ray Diffraction (PXRD)

Powder X-Ray Diffraction (PXRD) merupakan metode karakterisasi kokristal meliputi struktur dan ukuran kristal dari material padatan yang digunakan untuk menganalisis fase padatan dari struktur kisi kristal. Pada struktur kristal terdapat informasi susunan kristal (*crystal packing*) dan perubahan puncak difraksi. Hasil karakterisasi berupa difraktogram. Terbentuknya kokristal ditandai dengan adanya pola difraksi yang berbeda antara kokristal dengan komponen penyusun kokristal (Wicaksono *et al.*, 2017).

2.6.2 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Differential Scanning Calorimetry (DSC) digunakan untuk analisis sifat termal kokristal. Pengukuran termal pada DSC dilakukan pada rentang suhu 30-300°C dengan kecepatan pemanasan 10°C per menit (Gozali *et al.*, 2012). Hasil karakterisasi DSC berupa termogram yang menunjukkan titik lebur dan energi peleburan sampel. Terbentuknya kokristal ditandai dengan adanya puncak endotermik

baru berupa titik lebur yang berbeda dengan titik lebur komponen penyusun kokristal (Tsaniyah, 2020).

2.6.3 Spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Fourier Transform Infrared (FTIR) adalah alat yang digunakan untuk mengamati pergeseran gugus fungsi dari pembentukan kokristal (Qiao *et al.*, 2011). Analisis spektroskopi FTIR bertujuan untuk menentukan gugus fungsi kimia dalam sampel, sehingga gugus fungsi yang berbeda akan menyerap frekuensi karakteristik radiasi IR. Adanya perubahan intensitas transmitansi atau penyerapan akan menghasilkan spektrum IR. Radiasi IR akan diserap dan menghasilkan suatu vibrasi molekuler sehingga vibrasi dalam bilangan gelombang tersebut, akan menunjukkan gugus atau ikatan kimia yang spesifik (Schultheiss & Newman, 2009). Bilangan gelombang daerah serapan FTIR berkisar $4000-400\text{ cm}^{-1}$ (Setyawan *et al.*, 2017).

2.6.4 *Scanning Electron Microscopy* (SEM)

Scanning Electron Microscopy (SEM) digunakan untuk menganalisis karakteristik morfologi kristal sehingga dapat melihat perbedaan morfologi antara zat aktif murni dengan kokristal (Setyawan *et al.*, 2015). SEM memiliki kemampuan perbesaran hingga ≥ 100.000 kali. Kokristal terbentuk apabila terdapat perubahan permukaan padatan kristal yang berbeda dengan morfologi komponen penyusunnya. Jika terdapat perubahan bentuk, jenis permukaan dan ukuran partikel, dapat dikatakan bahwa terdapat interaksi pada padatan campuran kokristal (Padrela *et al.*, 2014).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasetika dan Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember pada Maret 2024 – Juni 2024.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian laboratoris eksperimental yang dilakukan di laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember. Tahapan dari penelitian ini yaitu studi pustaka kandidat bahan aktif dan koformer, kemudian penentuan koformer menggunakan metode komputasi untuk mengetahui potensi terbentuknya ikatan hidrogen dan energi *minimize* dari naringenin-asam fumarat. Kemudian dilakukan pembuatan kokristal dengan metode *solvent evaporation* pada rasio 1:1 dan 1:3. Selanjutnya kokristal dikarakterisasi (PXRD, DSC, FTIR, SEM, uji kelarutan), dan analisis data.

3.3 Bahan Penelitian

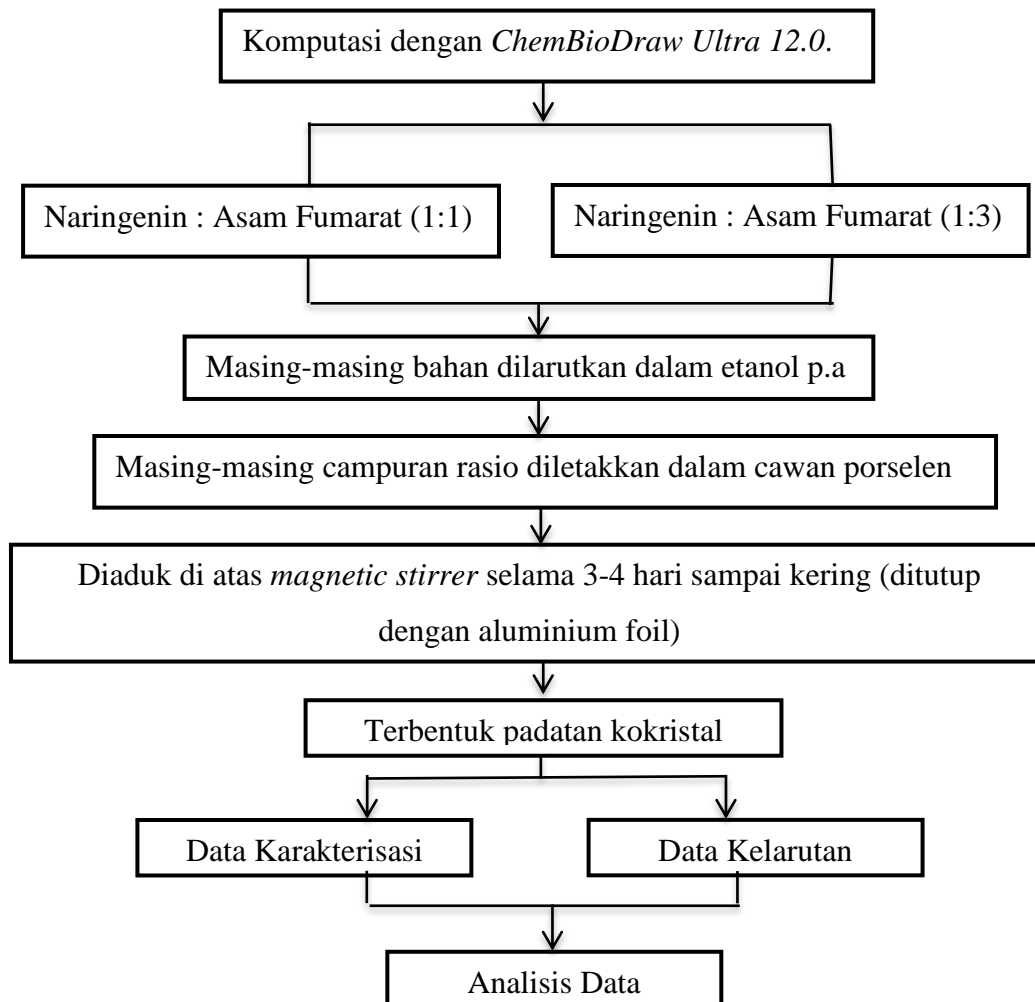
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi naringenin *pro analysis* (Tokyo Chemical Indsutri ®, Jepang), Asam Fumarat *pro analysis* (Merck, Jerman), etanol *pro analysis* Emsure® (Merck, Jerman), aquadest (CV. Makmur Sejati)

3.4 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi Difraktometer sinar-X serbuk (Philip Xpert Pro PW3373/00, Belanda), *Differential Scanning Calorimeter* (Mettler Toledo, Switzerland), spektroskopi FTIR (Jasco FT-IR/5300, Jepang), *Scanning Electron Microscope* (Hitachi, Jepang), spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10S), neraca analitik (Precisa ES 225 SM-DR), *hot plate magnetic stirrer*, termometer, membran filter 0,45µm, *chamber* uji kelarutan dan cawan porselin.

3.5 Alur Penelitian

Alur dalam penelitian ini ditunjukkan sebagai berikut :



Gambar 3. 1 Alur Penelitian

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Penentuan Koformer dengan Pendekatan Komputasi

Penentuan koformer dilakukan dengan studi pustaka untuk mencari kandidat koformer yang selanjutnya dilakukan pendekatan komputasi dengan *software ChemBioDraw Ultra 12.0.* Didapatkan hasil komputasi berupa prediksi ikatan hidrogen dan nilai *energy minimize* antara naringenin dengan koformer (asam fumarat, asam adipat, asam dipikolinat dan asam oksalat). Syarat penentuan koformer yang dipilih dari hasil komputasi adalah nilai *energy minimize* yang rendah.

3.6.2 Preparasi Kokristal Naringenin-Asam Fumarat dengan Metode

Solvent Evaporation

Preparasi awal yaitu menimbang naringenin rasio 1:1 dan 1:3 (280,441 mg dan 175,518 mg) dan asam fumarat (119,558 mg dan 224,481 mg). Kemudian, hasil penimbangan rasio 1:1 dan 1:3 dilarutkan secara terpisah dengan etanol (5,6 ml dan 3,5 ml) sesuai dengan kelarutan masing-masing bahan dan diaduk hingga homogen. Masing-masing larutan dituang ke dalam cawan secara bersamaan, kemudian ditutup dengan *aluminium foil* dan diberi lubang kecil (25 lubang). Larutan naringenin-asam fumarat diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 100 rpm hingga pelarut menguap sempurna dan menghasilkan serbuk kokristal yang dikehendaki. Kemudian kokristal dimasukkan ke dalam vial coklat dan disimpan di desikator. Selanjutnya, hasil serbuk kokristal dilakukan pengujian karakterisasi (PXRD, DSC, FTIR, SEM) dan uji kelarutan.

3.6.3 Karakterisasi Kokristal

3.6.3.1. Karakterisasi dengan *Powder X-Ray Diffractometer (PXRD)*

PXRD dilakukan untuk mengetahui struktur kisi kristal menggunakan *Philip X'Pert diffractometer*. Pengujian ini dilakukan dengan memasukkan serbuk sampel (naringenin, asam fumarat, kokristal 1:1 dan kokristal 1:3) kedalam rongga holder dari *X-ray diffractometer*, lalu diratakan dengan sepatula, diatur tegangan *X-ray diffractometer* pada 40 kV arus 30 mA dan kecepatan memindai $2\theta = 10^\circ/\text{menit}$ dengan rentang 2θ pada $5-50^\circ$ (Altomare *et al.*, 2017). Hasil PXRD berupa difraktogram. Terbentuknya kokristal ditunjukkan dengan adanya profil difraktogram yang berbeda, puncak interferensi yang baru dan puncak difraksi spesifik dari komponen penyusunnya yang hilang (Wisudyaningih *et al.*, 2019).

3.6.3.2. Karakterisasi dengan *Differential Scanning Calorimetry (DSC)*

DSC digunakan untuk mengetahui karakteristik termal suatu material. Karakterisasi ini dilakukan dengan memasukkan 3-5 mg sampel (naringenin, asam fumarat, kokristal 1:1 dan kokristal 1:3) ke dalam aluminium pan, kemudian dianalisis termal dengan alat DSC pada rentang suhu 25°C–300°C dengan kecepatan pemanasan 10°C.min⁻¹ dibawah aliran gas nitrogen 50 mL.min⁻¹ (Luo et al., 2018). Hasil DSC berupa data termodinamika khususnya titik lebur dan entalpi peleburan. Data termodinamika tersebut akan menunjukkan adanya satu puncak endotermik baru yaitu titik lebur kokristal yang berbeda dengan titik lebur komponen penyusunnya (Masuda *et al.*, 2012).

3.6.3.3. Karakterisasi dengan *Fourier Transform Infrared*

Spectrophotometer (FTIR)

FTIR digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi dan adanya interaksi intermolekul antara molekul naringenin dan asam fumarat. Ditimbang sampel (naringenin, asam fumarat, kokristal 1:1 dan kokristal 1:3) sebanyak 5 mg dan dimasukkan pada papan sampel FTIR (Alpha Bruker). Spektrum bilangan gelombang diatur sebesar 400 cm⁻¹ hingga 4000 cm⁻¹ (Setyawan *et al.*, 2017). Pembentukan kokristal ditandai dengan spektra FTIR yang berbeda. Hal ini menunjukkan adanya pergeseran frekuensi serapan dari gugus fungsi tertentu pada naringenin murni, sehingga terjadi interaksi pembentukan ikatan hidrogen antara naringenin dengan asam fumarat (Bruni *et al.*, 2013, Masuda *et al.*, 2012)

3.6.3.4. Karakterisasi dengan *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

Analisis SEM dilakukan untuk membandingkan morfologi kokristal dengan komponen penyusunnya (naringenin, asam fumarat, kokristal 1:1 dan kokristal 1:3). Sampel sebanyak 2 mg diletakkan pada holder aluminium dan diamati pada tegangan 15kV dan arus pemeriksaan 12 mA (Wicaksono *et al.*, 2017). Pembentukan kokristal fase baru ditandai dengan terbentuknya padatan dengan morfologi dan topografi

permukaan yang berbeda dengan komponen penyusunnya (Allam *et al.*, 2013).

3.6.4 Uji Kelarutan

3.6.4.1. Penentuan Panjang Gelombang Sampel

Penentuan panjang gelombang naringenin murni dilakukan dengan *scanning* spektrofotometri UV-Vis. Dibuat larutan baku induk naringenin dan asam fumarat dengan menimbang masing-masing sebanyak 10 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL (1000 ppm) dan dilarutkan dengan etanol sampai homogen, lalu dikocok sampai larut. Kemudian dibuat larutan baku kerja naringenin dan asam fumarat dengan konsentrasi 25 ppm. *Scanning* larutan naringenin murni dan asam fumarat dengan spektrofotometri UV-Vis pada rentang panjang gelombang 200-400 nm. Hasil *scanning* menunjukkan panjang gelombang yang memiliki nilai absorbansi maksimum, selanjutnya dilakukan *overlay* hasil *scanning* antara panjang gelombang naringenin murni dan asam fumarat dan dipilih panjang gelombang naringenin yang asam fumarat tidak memberikan serapan.

3.6.4.2. Pembuatan Kurva Baku Naringenin

Tahap awal dilakukan pembuatan larutan baku induk naringenin 1000 ppm, kemudian larutan baku induk tersebut diencerkan untuk membuat baku kerja (2, 4, 6, 8, 12, dan 14 ppm) dengan pelarut *aquadest*. Kemudian larutan baku kerja diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kemudian, dilakukan *plotting* kadar naringenin pada masing-masing serapan baku kerja, sehingga didapatkan persamaan kurva baku $y=bx+a$.

3.6.4.3. Penentuan Waktu Kelarutan Jenuh Naringenin

Penentuan waktu kelarutan jenuh hanya dilakukan pada naringenin murni. Uji kelarutan jenuh dilakukan untuk mengetahui waktu kelarutan jenuh naringenin. Waktu kelarutan jenuh adalah waktu yang menunjukkan absorbansi naringenin tertinggi dan konstan.

Pertama ditimbang naringenin murni sebanyak 20 mg. Sampel dimasukkan ke dalam *chamber* uji kelarutan yang berisi 50 ml pelarut aquadest, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* kecepatan 150 rpm/menit pada suhu $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Pengambilan sampel dilakukan sebanyak 5 ml pada menit ke-60, 120, 180, 240, dan 300. Sampel yang telah diambil dalam *chamber* didiamkan selama 5 menit, kemudian sampel disaring menggunakan kertas *whattman* berukuran $0,45 \mu\text{m}$ dengan bantuan spuit injeksi. Sampel yang disaring kemudian ditentukan absorbansinya pada panjang gelombang maksimum naringenin dengan spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya kadar dihitung menggunakan persamaan kurva baku.

3.6.4.4. Uji Kelarutan Naringenin

Uji kelarutan naringenin dilakukan menggunakan alat uji kelarutan dengan prosedur pengujian yang sama dengan prosedur penentuan waktu kelarutan jenuh. Namun waktu pengambilan larutan uji hanya dilakukan pada waktu kelarutan jenuhnya saja. Uji kelarutan dilakukan pada sampel kokristal 1:1 dan 1:3 dengan replikasi sebanyak 3 kali dalam aquadest. Uji kelarutan dilakukan untuk mengetahui perbedaan kelarutan antara kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:1 dan 1:3 dengan naringenin murni. Pembentukan kokristal diharapkan dapat menghasilkan kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan komponen penyusunnya.

3.6.5 Analisis Statistik

Pengujian analisis statistik dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan hasil yang bermakna, akibat perbedaan rasio stoikiometri pada uji kelarutan dari naringenin dan kokristal rasio 1:1 dan 1:3. Dalam pengujian ini menggunakan perangkat lunak SPSS 22.0 *for windows*. Pertama dianalisis statistik *Shapiro-Wilk* untuk menganalisis distribusi data yang diuji. Jika signifikansi $>0,05$ maka terdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas (jika signifikansi $>0,05$ maka sampel yang diuji dikatakan homogen). Uji data ini menggunakan *one-way*

ANOVA untuk membandingkan perbedaan rata-rata kelarutan 3 kelompok sampel (naringenin, kokristal 1:1 dan kokristal 1:3). Perbedaan bermakna apabila nilai $p < 0,05$, sebaliknya apabila nilai $p > 0,05$ maka perbedaan dianggap tidak bermakna (Nuryadi, 2017). Apabila terdapat perbedaan bermakna, dilanjutkan tes *post hoc* (LSD) untuk mengetahui perbedaan antar formula.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Pendekatan Komputasi untuk Penentuan Koformer

Penentuan koformer dalam pembentukan kokristal naringenin-asam fumarat dilakukan melalui metode pendekatan komputasi untuk memprediksi potensi terbentuknya ikatan hidrogen antara naringenin dengan masing-masing kandidat koformer dengan melihat nilai *energy minimize* yang dihasilkan untuk menentukan kekuatan interaksinya. Pada penelitian ini pendekatan komputasi dilakukan menggunakan *software ChemBioDraw Ultra 12.0*. Pada empat kandidat molekul senyawa yang berpotensi sebagai koformer diantaranya asam dipikolinat, asam adipat, asam fumarat, dan asam oksalat. Pemilihan empat kandidat ini berdasarkan beberapa referensi jurnal penelitian yang memiliki kemampuan berinteraksi dengan molekul naringenin melalui pembentukan ikatan hidrogen. Hasil analisis komputasi dapat dilihat pada lampiran 4.4

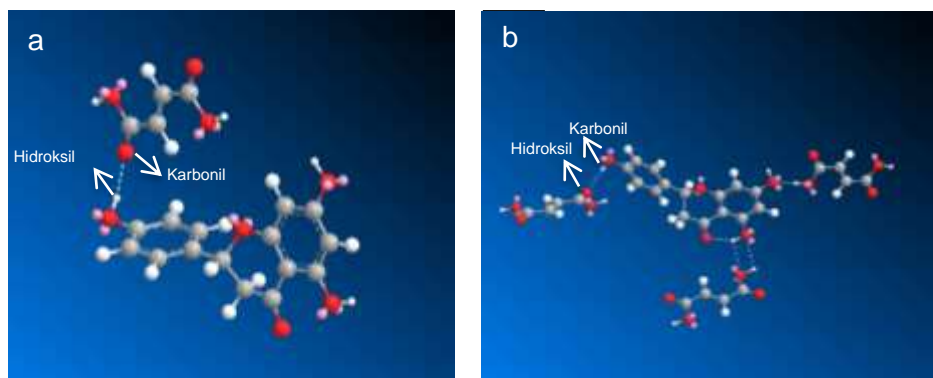
Hasil pendekatan komputasi menunjukkan interaksi antara bahan aktif naringenin dengan koformer asam fumarat dapat membentuk ikatan hidrogen dengan nilai *energy minimize* yang paling rendah yaitu sebesar -46,4577 kcal/mol dibandingkan dengan kandidat koformer yang lainnya. Nilai *energy minimize* yang rendah menunjukkan terbentuknya ikatan hidrogen yang lebih stabil (Pihko, 2009). Dengan demikian pada penelitian ini digunakan asam fumarat sebagai koformer dalam preparasi kokristal naringenin.

Tabel 4. 1 Hasil analisis koformer pada pendekatan komputasi

Kandidat Koformer	<i>Energy Minimize</i> (kcal/mol)
Asam adipat	-19.9755
Asam oksalat	65.4924
Asam dipikolinat	65.2228
Asam fumarat	-46.4577

Berdasarkan hasil komputasi, telah diprediksi bahwa naringenin dan koformer asam fumarat berinteraksi melalui terbentuknya ikatan hidrogen antara gugus OH naringenin dengan C=O karboksilat pada asam fumarat membentuk interaksi O-H \cdots O yang secara umum sering terjadi pada pembentukan kokristal farmasetik (Cao *et al.*, 2018).

Hasil komputasi antara naringenin-asam fumarat dapat dilihat pada 4.1a (rasio 1:1) menunjukkan terjadinya ikatan hidrogen antara gugus hidroksil cincin A naringenin dengan gugus karbonil pada asam fumarat. Gambar 4.1b pada rasio 1:3 menunjukkan adanya ikatan hidrogen antara gugus hidroksil naringenin dengan gugus karbonil asam fumarat.



Gambar 4. 1 Hasil komputasi ikatan hidrogen antara molekul naringenin dan asam fumarat pada rasio 1:1 dan 1:3

4.2. Hasil Preparasi Kokristal Naringenin-Asam Fumarat dengan Metode *Solvent Evaporation*

Preparasi kokristal naringenin-asam fumarat menggunakan metode *solvent evaporation* dengan perbandingan stoikiometri 1:1 dan 1:3. Prinsip metode *solvent evaporation* yaitu melarutkan komponen penyusun kokristal dengan rasio stoikiometri tertentu menggunakan pelarut yang sama dan diaduk konstan hingga pelarut menguap sempurna (Barikah, 2018). Proses pelarutan dari komponen penyusun tersebut diharapkan membentuk interaksi molekuler, terutama ikatan hidrogen yang umum terjadi dalam proses kokristalisasi. Pelarut yang digunakan dalam pembuatan kokristal naringenin-asam fumarat yaitu etanol *pro analysis* (p.a) karena pelarut tersebut memiliki kemurnian yang tinggi mencapai 99% dan kecepatan pengeringan kokristal hanya memerlukan waktu 3-4

hari. Padatan kokristal dianggap sudah kering apabila ketika dituang tidak ada bagian yang masih lengket atau berair. Padatan kokristal yang telah kering dilakukan perhitungan rendemen untuk mengetahui berat total kokristal yang dihasilkan. Hasil rendemen kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:1 dan 1:3 sebanyak 99,2% dan 96%. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 4.7. Hasil kokristal naringenin-asam fumarat secara organoleptis berupa serbuk kristalin berwarna putih. Masing-masing serbuk kokristal dimasukkan ke dalam vial coklat kemudian disimpan di dalam desikator. Hasil serbuk kokristal dapat dilihat pada gambar 4.2.



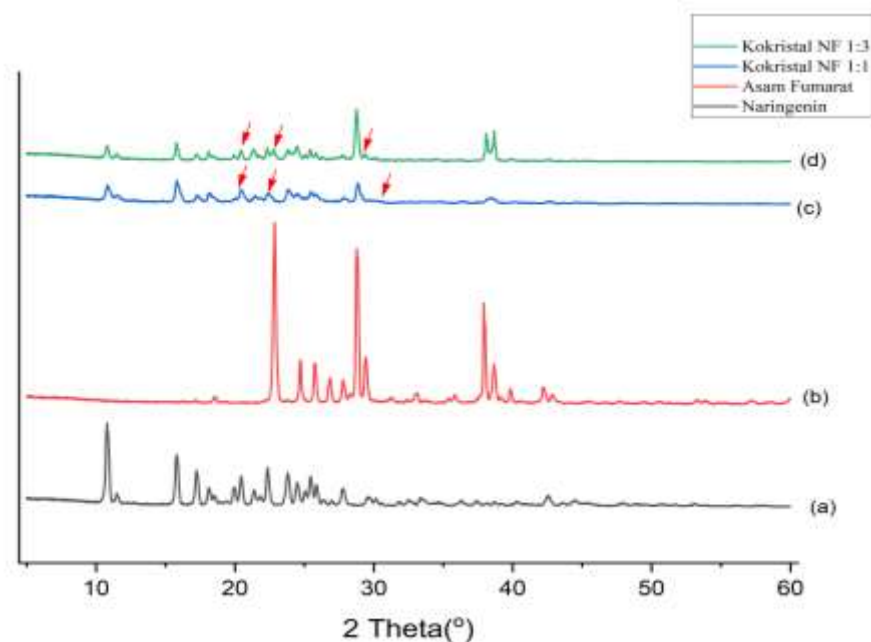
Gambar 4. 2 Hasil serbuk kokristal naringenin-asam fumarat

4.3. Hasil Karakterisasi Kokristal

4.3.1. Powder X-Ray Diffraction (PXRD)

Karakterisasi Powder X-Ray Diffraction (PXRD) digunakan untuk menganalisis fase padatan baru pada struktur kisi kristal yang ditampilkan dalam suatu pola difraksi. Analisis ini dilakukan pada rentang sudut 2θ (5° - 60°). Analisis PXRD digunakan untuk mengetahui adanya pembentukan fase kristalin baru yang ditandai dengan adanya puncak difraksi baru pada sudut 2θ dalam difraktogram yang berbeda dengan puncak difraksi bahan awal (Bruni et al., 2013). Hasil karakterisasi PXRD dapat dilihat pada gambar 4.3. Data difraksi pada posisi 2θ dari masing-masing sampel dapat dilihat pada tabel 4.2. Hasil penelitian ini didapatkan puncak spesifik difraktogram naringenin

pada 12,7225; 20,0310; 21,8473; 26,3298 dan puncak spesifik difraktogram asam fumarat terdapat pada 16,2445; 26,7020; 28,2540; 33,1460; 35,7791; 37,9102; 39,7774; 40,5543; 44,1245. Sampel kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:1 menghasilkan bentuk kristalin baru yang berbeda dari kedua bahan awal, dengan puncak difraksi 2θ yang spesifik pada sudut 19,9589; 22,4220; 30,3796. Kristalin baru juga muncul pada sampel kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:3 dengan puncak-puncak difraksi yang berbeda dari komponen penyusunnya yaitu 19,9308; 22,8055; 29,3491. Berdasarkan hasil overlay difraktogram PXRD, sampel hasil kokristal naringenin-asam fumarat menunjukkan pola puncak difraksi yang berbeda dengan komponen penyusunnya yaitu naringenin dan asam fumarat. Hasil difraktogram campuran sampel ini menunjukkan bahwa sampel membentuk suatu fase kristalin baru atau kokristal dari bahan awal (Chadha *et al.*, 2012). Kokristal naringenin-asam fumarat dengan rasio stoikiometri yang berbeda, menunjukkan puncak difraksi baru di daerah sudut 2θ yang sama, namun dengan intensitas yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa dengan rasio stoikiometri yang berbeda, tetap terbentuk kokristal naringenin-asam fumarat.



Gambar 4. 3. Perbandingan difraktogram (a)Naringenin, (b) Asam Fumarat, (c) Kokristal naringenin-asam fumarat 1:1, (d) Kokristal naringenin-asam fumarat 1:3

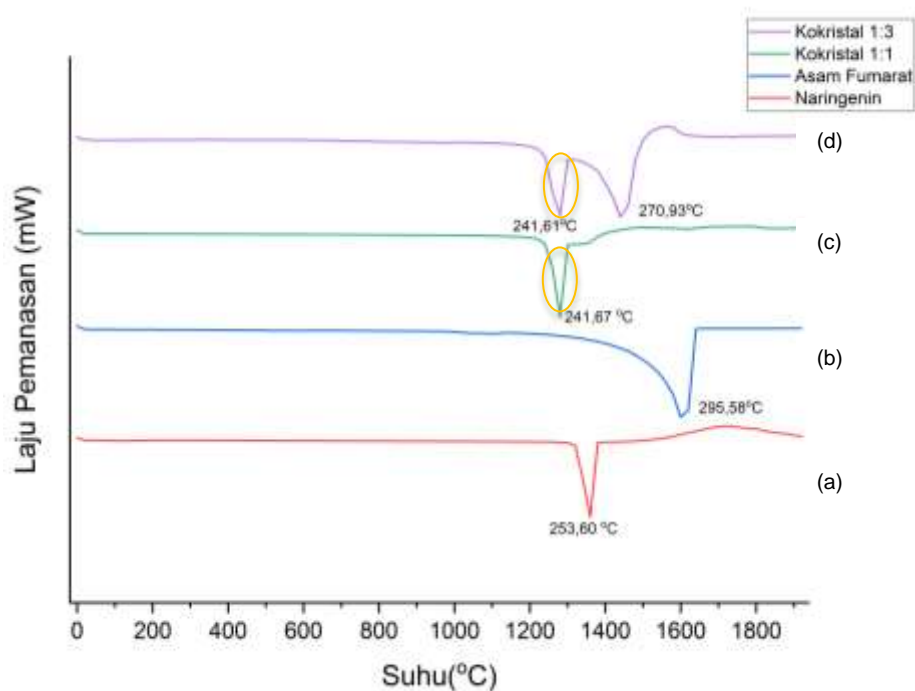
Tabel 4.2. Perbandingan sudut 2θ difraktogram naringenin, asam fumarat, kokristal naringenin-asam fumarat (1:1) dan kokristal naringenin-asam fumarat (1:3)

Naringenin Sudut 2θ	Asam Fumarat Sudut 2θ	Kokristal 1:1 Sudut 2θ	Kokristal 1:3 Sudut 2θ
-	16,2445	-	-
12,7225	-	-	-
-	-	19,9589	19,9308
-	26,7020	-	-
-	-	22,4220	22,8055
-	28,2540	-	-
20,0310	-	-	-
21,8473	-	-	-
-	-	30,3796	29,3491
-	33,1460	-	-
-	35,7791	-	-
-	37,9102	-	-
26,3298	-	-	-
-	39,7774	-	-

4.3.2. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Analisis termal menggunakan DSC merupakan teknik yang digunakan untuk mengetahui karakteristik termal pada kokristal. Analisis ini dilakukan pada rentang suhu 30-300°C dengan kecepatan pemanasan 10°C/menit. Data hasil pengujian DSC berupa data termodinamika yang menunjukkan titik leleh dan entalpi peleburan (Qiao *et al.*, 2011). Terbentuknya kokristal naringenin-asam fumarat terkonfirmasi apabila terdapat puncak endotermik baru yang berbeda dengan komponen penyusunnya (Bruni *et al.*, 2013). Perbedaan titik lebur menandakan adanya interaksi pada masing-masing komponen bahan aktif dengan koformer, sehingga terjadi perubahan pada struktur kristal (Buddhadev dan Garala, 2021). Termogram DSC pada gambar 4.4 menunjukkan adanya puncak endotermik yang berbeda antara naringenin, asam fumarat, dan kokristal naringenin-asam fumarat pada dua rasio stoikiometri. Pada termogram kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:1 dan rasio 1:3 terbentuk puncak endotermik baru pada suhu lebur 241,67°C dan 241,61°C, sedangkan suhu

lebur naringenin ($253,60^{\circ}\text{C}$) dan asam fumarat ($295,58^{\circ}\text{C}$) tidak terlihat pada termogram kokristal naringenin-asam fumarat. Terbentuk kokristal apabila titik lebur sampel berada diantara bahan aktif dan koformernya, atau bisa lebih rendah daripada bahan awal yang digunakan (Kumar & Nanda, 2017). Pada kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:3 terdapat dua puncak endotermik baru yaitu pada suhu lebur $241,61^{\circ}\text{C}$ dan $270,93^{\circ}\text{C}$. Hal ini dimungkinkan karena terdapat asam fumarat dalam bentuk bebas yang tidak berikatan dengan naringenin sehingga terdapat sisa asam fumarat yang melebur kembali. Asam fumarat memiliki stabilitas termal dibawah 300°C (Cao *et al.*, 2015). Secara teoritis senyawa yang memiliki titik lebur dan entalpi yang rendah menunjukkan kelarutan semakin meningkat (Chaudhari *et al.*, 2018). Data suhu lebur naringenin, asam fumarat, dan kokristal naringenin-asam fumarat dengan dua rasio stoikiometri secara lengkap dapat dilihat pada tabel 4.3. *Overlay* kurva DSC dapat dilihat pada gambar 4.4. Masing-masing kurva termogram DSC dari naringenin, asam fumarat, dan kokristal pada lampiran 4.9.



Gambar 4. 4. Hasil termogram DSC (a) Naringenin; (b) Asam Fumarat; (c) Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:1; (d) Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:3

Tabel 4. 3. Data Termodinamik Hasil Pengujian DSC

Sampel	Suhu Lebur (°C)
Naringenin (NRN)	253,60°C
Asam Fumarat (AF)	295,58°C
Kokristal NRN-AF (1:1)	241, 67°C
Kokristal NRN-AF (1:3)	241, 61°C

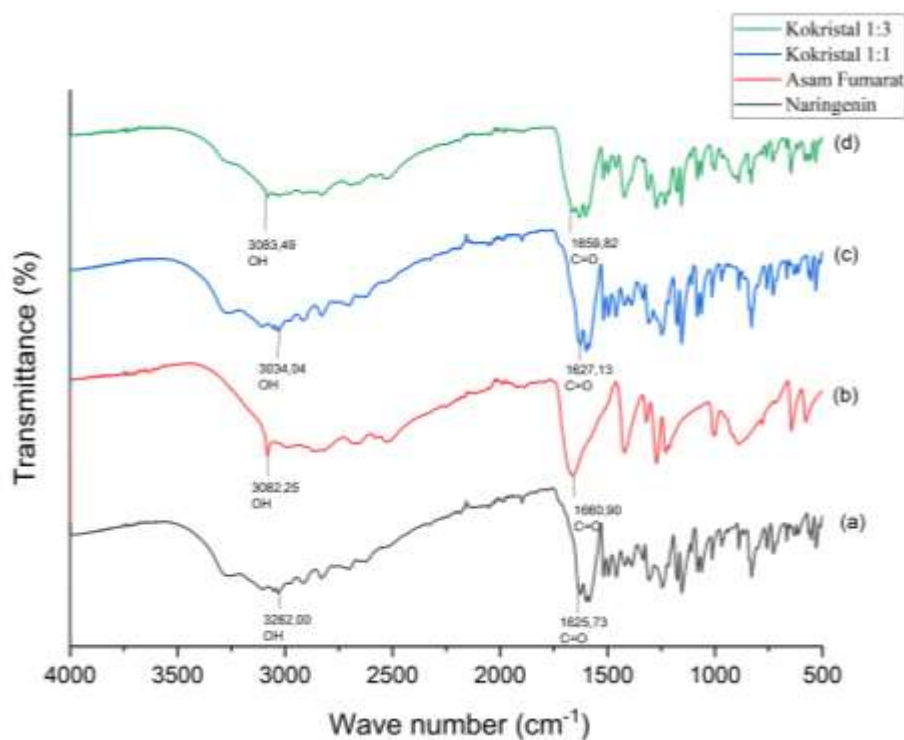
Berdasarkan hasil *overlay* kurva DSC, sampel hasil kokristal naringenin-asam fumarat menunjukkan perbedaan titik lebur dengan komponen penyusunnya yaitu naringenin dan asam fumarat. Data titik lebur atau suhu lebur tersebut mengindikasikan terbentuknya kokristal, namun belum dapat dipastikan secara 100% sehingga perlu menganalisis data karakterisasi lainnya seperti PXRD, FTIR, dan SEM. Secara teoritis senyawa yang memiliki titik lebur dan entalpi yang lebih rendah kelarutannya akan meningkat. Hasil data termogram kokristal naringenin-asam fumarat pada kedua rasio menunjukkan titik lebur yang lebih rendah jika dibandingkan dengan senyawa murni, sehingga dapat memungkinkan pembentukan kokristal akan memberikan peningkatan kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan naringenin murni.

4.3.3. *Fourier Transform InfraRed (FTIR)*

Analisis data *Fourier Transform InfraRed (FTIR)* digunakan untuk memperkirakan konformasi kimia serta interaksi intermolekuler dengan membandingkan spektrum bahan murni dan kokristal. Karakterisasi ini dilakukan pada rentang bilangan gelombang 400 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} (Setyawan *et al.*, 2017). Kokristal farmasetik terbentuk melalui interaksi antara bahan aktif dan koformer yang membentuk ikatan nonkovalen (ikatan hidrogen).

Berdasarkan hasil pendekatan komputasi, telah diprediksi bahwa antara naringenin dan asam fumarat dapat berinteraksi melalui terbentuknya ikatan hidrogen antara gugus OH naringenin dengan gugus CO asam fumarat membentuk interaksi $\text{O-H}\cdots\text{O}$ yang banyak terjadi pada pembentukan kokristal farmasetik. Ikatan hidrogen yang terjadi pada

kokristal naringenin-asam fumarat dapat diamati melalui spektra FTIR. Bilangan gelombang gugus OH pada naringenin mengalami pergeseran dari $3262,00\text{ cm}^{-1}$ menjadi $3034,04\text{ cm}^{-1}$ pada spektra inframerah kokristal rasio 1:1 dan $3083,49\text{ cm}^{-1}$ pada spektra inframerah kokristal rasio 1:3. Pergeseran bilangan gelombang gugus C=O pada naringenin juga bergeser dari $1625,73\text{ cm}^{-1}$ menjadi $1627,13\text{ cm}^{-1}$ pada spektra inframerah kokristal rasio 1:1 dan $1659,82\text{ cm}^{-1}$ pada spektra inframerah kokristal rasio 1:3. Spektra inframerah naringenin, asam fumarat, kokristal naringenin asam fumarat (1:1) dan kokristal naringenin-asam fumarat (1:3) dapat dilihat pada gambar 4.6 dan tabel 4.5. Data masing-masing sampel selengkapnya terdapat pada lampiran 4.11.



Gambar 4. 5 Hasil spektra FTIR (a) Naringenin; (b) Asam Fumarat; (c)Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:1; (d) Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:3

Tabel 4. 4 Perbandingan bilangan gelombang (cm^{-1}) spektra inframerah naringenin, asam fumarat, dan kokristal naringenin-asam fumarat pada dua rasio stoikiometri.

Gugus Fungsi	Naringenin (cm^{-1})	Asam Fumarat (cm^{-1})	Kokristal naringenin-asam fumarat	
			Kokristal 1:1	Kokristal 1:3
C=O	1625,73	1660,90	1627,13	1659,82
OH	3262,00	3082,25	3034,04	3083,49

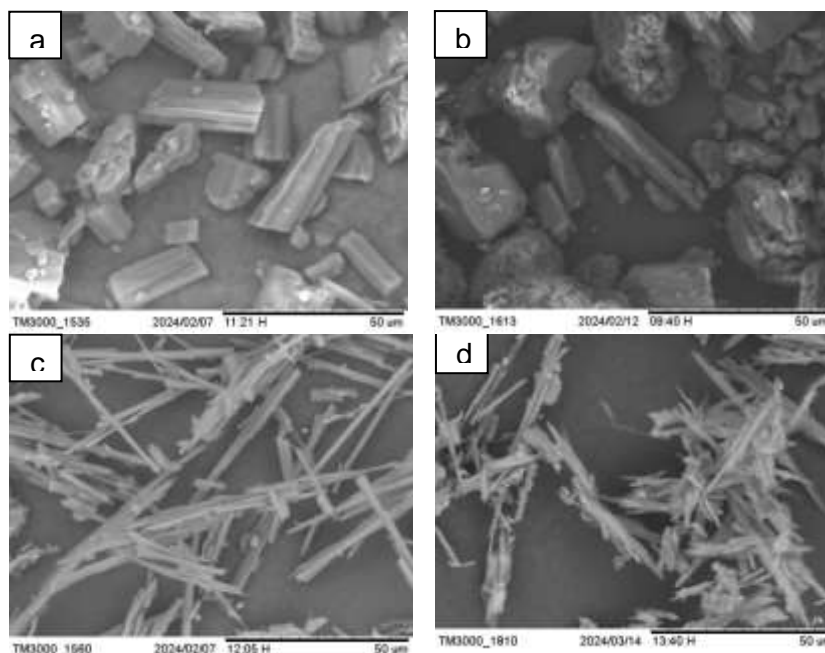
Berdasarkan tabel dan gambar di atas menunjukkan bahwa spektra FTIR antara naringenin, asam fumarat, dan kokristal terdapat pergeseran puncak serapan bilangan gelombang gugus fungsi yang menandakan adanya interaksi nonkovalen seperti ikatan hidrogen antara naringenin dan asam fumarat pada gugus O-H dan C=O sebagai indikasi terbentuknya kokristal naringenin-asam fumarat.

Berdasarkan hasil karakterisasi FTIR dapat disimpulkan bahwa pembentukan kokristal naringenin-asam fumarat terjadi interaksi intermolekuler melalui ikatan hidrogen yang melibatkan gugus fungsi dari naringenin dan gugus fungsi dari asam fumarat. Spektra FTIR dengan profil mirip antara kokristal naringenin-asam fumarat dengan komponen penyusunnya, namun terjadi pergeseran bilangan gelombang sehingga menandakan terbentuknya kokristal naringenin-asam fumarat. Hal ini mendukung hasil pengujian PXRD dan DSC yang mengindikasikan terbentuknya kokristal.

4.3.4. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Karakterisasi SEM dilakukan untuk mengamati habit kristal, ukuran dan permukaan partikel suatu padatan (Shaikh *et al.*, 2018). Karakteristik fisika kimia suatu padatan dipengaruhi oleh bentuk dan ukuran kristal. Analisis permukaan kristal dilakukan pada perbesaran 1500 x. Hasil analisis morfologi permukaan kristal menunjukkan bahwa kokristal naringenin-asam fumarat memiliki bentuk dan ukuran yang berbeda dibandingkan dengan komponen penyusunnya. Naringenin menunjukkan habit kristal *prismatic*,

dan asam fumarat menunjukkan habit kristal bentuk *prismatic* memanjang tidak beraturan dan memiliki permukaan kasar. Hal ini sesuai dengan karakteristik morfologi naringenin dan asam fumarat dalam pustaka (Cui *et al.*, 2019; Hiendrawan *et al.*, 2015). Hasil analisis SEM dapat dilihat pada gambar 4.7.



Gambar 4. 6 Hasil SEM pada perbesaran 1500x (a) Naringenin (b) Asam Fumarat (c) Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:1 (d) Kokristal Naringenin – Asam Fumarat 1:3

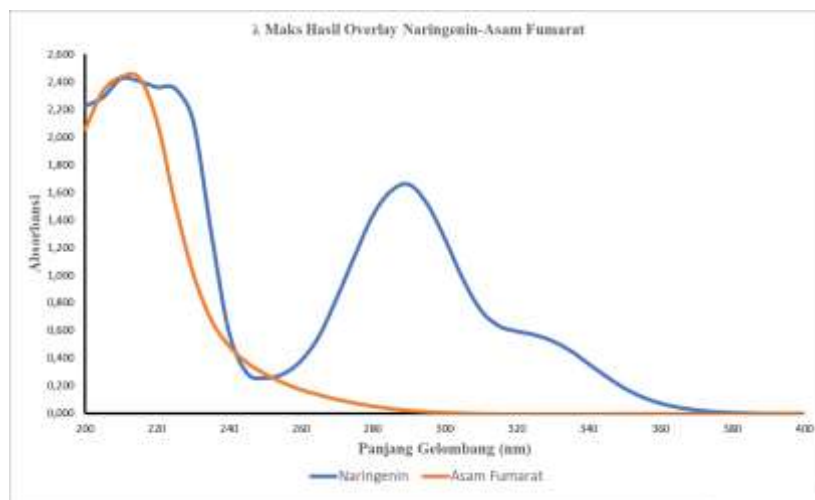
Kokristal naringenin-asam fumarat pada gambar 4.6 menunjukkan habit kristal yang berbeda dengan kedua komponen penyusunnya. Kokristal dengan rasio 1:1 memiliki bentuk jarum panjang, sedangkan kokristal dengan rasio 1:3 memiliki bentuk kristal jarum yang lebih pendek daripada kokristal 1:1. Perubahan bentuk, ukuran, dan permukaan kristal yang dapat diamati pada morfologi permukaan kristal mengonfirmasi bahwa telah terbentuk kokristal naringenin-asam fumarat menggunakan metode *solvent evaporation*. Perbedaan rasio dalam pembuatan kokristal menjadi salah satu faktor yang berpengaruh pada pembentukan kristal, sehingga menghasilkan kokristal dengan permukaan dan ukuran yang berbeda. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa dengan perbedaan rasio stoikiometri dapat membentuk kokristal dengan bentuk dan ukuran yang berbeda, seperti yang terlihat pada kokristal rasio 1:3 yang memiliki bentuk kristal yang lebih kecil daripada rasio

1:1. Dengan bertambahnya molar koformer dalam sistem kokristal, maka akan mengintervensi tahapan pertumbuhan kristal dalam pembentukan kokristal (Wisudyaningih, 2019).

4.4. Uji Kelarutan

4.4.1. Hasil Penentuan Panjang Gelombang Pengukuran Spektrofotometer UV-Vis

Hasil *overlay* kurva serapan naringenin dan asam fumarat digunakan untuk penentuan *scanning* panjang gelombang maksimum, maka dapat dilihat pada gambar 4.7 dan data selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 4.12.



Gambar 4. 7. Kurva serapan naringenin dan asam fumarat

Berdasarkan hasil pengukuran panjang gelombang, naringenin memberikan serapan panjang gelombang maksimum pada 289 nm, hal ini sesuai dengan literatur yaitu naringenin memiliki panjang gelombang maksimum pada 288 nm (Jha, Shah, Talele, *et al.*, 2020). Berdasarkan hasil kurva serapan, asam fumarat tidak memberikan serapan pada panjang gelombang 289 nm, sehingga panjang gelombang 289 nm dipilih sebagai panjang gelombang pengukuran karena asam fumarat tidak memberikan serapan, tetapi naringenin masih memberikan serapan yang cukup tinggi.

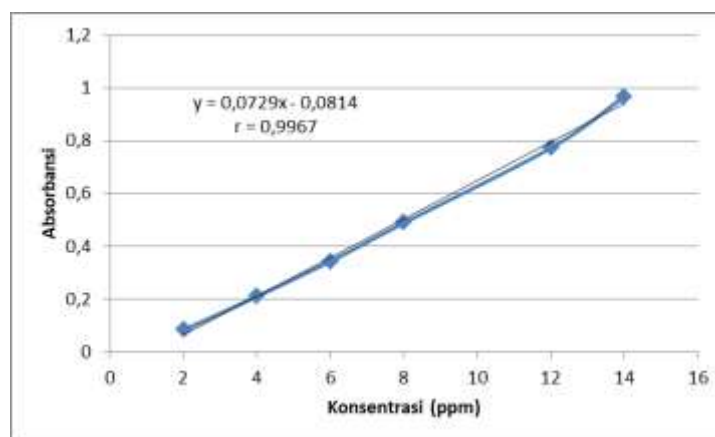
4.4.2. Hasil Pembuatan Kurva Baku Kelarutan

Pembuatan kurva baku dilakukan melalui pengukuran serapan pada larutan naringenin dengan konsentrasi 2; 4; 6; 8; 12; dan 14 ppm pada panjang gelombang pengukuran 289 nm. Hasil pengukuran serapan larutan standar dapat dilihat pada tabel 4.5 dan gambar 4.8.

Tabel 4. 5. Hasil Pengukuran serapan larutan standar naringenin dalam etanol-akuades

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
2	0,083
4	0,210
6	0,343
8	0,489
12	0,773
14	0,967

Hasil kurva baku naringenin dapat dilihat pada gambar 4.8. Kurva baku yang dihasilkan memiliki nilai slope sebesar 0,0729 dan nilai intersep sebesar 0,0814. Hasil persamaan regresi yang diperoleh yaitu $y = 0,0729x - 0,0814$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9967. Perhitungan konsentrasi larutan baku induk larutan dapat dilihat pada lampiran 4.13.



Gambar 4. 8. Kurva Baku Naringenin dengan pelarut etanol-aquadest

4.4.3. Hasil Pengujian Kelarutan Kokristal

Uji kelarutan dalam pembentukan kokristal bertujuan untuk mengetahui perbedaan kelarutan antara senyawa murni naringenin dengan hasil kokristal yang telah dibuat. Hasil uji kelarutan naringenin murni, sampel kokristal naringenin-asam fumarat dengan perbandingan rasio stoikiometri 1:1 dan 1:3 ditunjukkan pada tabel 4.6 dan data selengkapnya dapat dilihat

pada lampiran 4.15. Data hasil uji kelarutan dianalisis statistik dengan *one way* ANOVA untuk mengamati adanya perbedaan yang bermakna pada hasil uji kelarutan. Persyaratan uji ANOVA satu arah harus memiliki data yang terdistribusi normal dan homogen. Hasil uji normalitas dan uji homogenitas yang telah dilakukan menunjukkan nilai $p > 0,05$ yang artinya data kelarutan terdistribusi normal dan homogen, hasil uji normalitas dan uji homogenitas dapat dilihat pada lampiran 4.16. Hasil uji *one way* ANOVA menunjukkan nilai sig sebesar 0,00 yang artinya nilai $p < 0,05$ sehingga menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada hasil uji kelarutan. Selanjutnya dilakukan uji *post hoc* (LSD dan Bonferroni) untuk mengetahui letak perbedaan bermakna pada data kelarutan. Adanya perbedaan bermakna terdapat pada nilai rata-rata kelarutan dari ketiga sampel yaitu nilai rata-rata kelarutan naringenin murni sebesar $3,077 \pm 0,035$ mg/L; kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:1 sebesar $13 \pm 0,198$ mg/L; kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:3 sebesar $10,503 \pm 0,044$ mg/L. Hal ini menunjukkan ketiga sampel memberikan perbedaan yang bermakna, artinya hasil pembentukan kokristal naringenin-asam fumarat dengan dua rasio stoikiometri yang berbeda menggunakan metode *solvent evaporation* dengan pelarut etanol dapat meningkatkan kelarutan naringenin secara signifikan dengan nilai sig sebesar 0,00.

Sampel kokristal naringenin-asam fumarat (1:1) dan (1:3) mengalami peningkatan kelarutan masing-masing sebesar 4,22 kali dan 3,41 kalinya dari naringenin murni, sehingga sistem kokristal yang terjadi dapat meningkatkan kelarutan naringenin. Hasil uji kelarutan menunjukkan bahwa kokristal naringenin-asam fumarat pada kedua rasio memiliki kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan naringenin murni. Kokristal naringenin-asam fumarat termasuk agak sukar larut, sedangkan naringenin termasuk sukar larut dalam air. Pembentukan kokristal dapat mempengaruhi perubahan kisi kristal yang ditunjukkan dari hasil uji PXRD, DSC, FTIR, dan SEM sehingga kelarutan dapat meningkat (Thakuria *et al.*, 2013). Kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:1 memiliki nilai rata-rata

kelarutan yang lebih besar dibandingkan dengan kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:3, hal ini dimungkinkan karena berdasarkan hasil karakterisasi DSC pada kokristal rasio 1:3 terdapat asam fumarat dalam bentuk bebas yang tidak berikatan dengan naringenin sedangkan pada kokristal rasio 1:1 semua asam fumarat berikatan dengan naringenin serta hasil PXRD menunjukkan bahwa kokristal rasio 1:1 memberikan puncak difraksi dengan intensitas yang lebih tinggi dibandingkan kokristal rasio 1:3, sehingga hal ini berpengaruh pada peningkatan kelarutan.

Kelarutan suatu senyawa obat dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya interaksi intermolekuler, termodinamika kelarutan, suhu, ionisasi *solute-solvent*, dan pH pelarut. Pada penelitian ini uji kelarutan dilakukan pada kondisi suhu dan pelarut yang sama yaitu suhu 37°C dalam pelarut aquadest. Berdasarkan interaksi intermolekuler sampel kokristal dapat dilihat melalui hasil karakterisasi FTIR yaitu adanya interaksi nonkovalen (ikatan hidrogen) antara naringenin dan asam fumarat pada gugus O-H dan C=O sebagai indikasi terbentuknya kokristal naringenin-asam fumarat, sedangkan parameter termodinamika kelarutan ditunjukkan melalui hasil karakterisasi DSC. Perbedaan suhu lebur kokristal naringenin-asam fumarat (1:1) disebabkan karena perbedaan rasio sampel akibat penurunan energi kisi kristal dengan kokristal naringenin-asam fumarat (1:3).

Jika dianalisis dari habit kristal, masing-masing sampel menunjukkan adanya perbedaan habit kristal yang menyebabkan perubahan pada nilai kelarutannya. Kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:1 memiliki habit kristal jarum (*acicular*) dengan ukuran yang lebih kecil dan panjang, dibandingkan kokristal rasio 1:3.

Berdasarkan hasil karakterisasi dan uji kelarutan naringenin dan kokristal naringenin-asam fumarat, maka dapat dinyatakan bahwa setiap parameter yang dilakukan pada uji karakterisasi meliputi analisis kristalinitas, termal, vibrasi transisional dan morfologi kristal, mampu menjelaskan fenomena kelarutan yang terjadi pada kokristal naringenin-

asam fumarat yang dibuat dengan metode *solvent evaporation* dalam pelarut etanol.

Tabel 4. 6. Hasil uji kelarutan Naringenin, Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:1 dan 1:3 dalam pelarut aquadest

Kelarutan (mg/L)			
Replikasi	Naringenin Murni	Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:1	Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:3
1	3,037	12,899	10,471
2	3,091	12,872	10,485
3	3,105	13,229	10,554
Rata-rata±SD	3,077± 0,035	13,00±0,198	10,503±0,044

BAB 5. PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan:

1. Naringenin dan koformer asam fumarat dapat dibentuk menjadi kokristal naringenin-asam fumarat dengan metode *solvent evaporation* berdasarkan hasil karakterisasi (PXRD, DSC, FTIR, dan SEM). Analisis kristalinitas kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:1 dan 1:3 menunjukkan profil difraktogram baru di daerah sudut 2θ yang sama, namun dengan intensitas yang berbeda. Analisis termal sampel kokristal rasio 1:1 dan 1:3 menunjukkan puncak endotermik baru yang berbeda dengan komponen penyusunnya, analisis FTIR menunjukkan sampel kokristal terjadi interaksi intermolekuler melalui ikatan hidrogen yang ditandai dengan pergeseran bilangan gelombang, dan analisis SEM menunjukkan sampel kokristal rasio 1:1 dan 1:3 mengalami perubahan morfologi dibandingkan dengan komponen penyusunnya. Berdasarkan hasil karakterisasi kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:1 dan 1:3 berhasil dilakukan pengembangan kokristal.
2. Perbedaan rasio stoikiometri kokristal naringenin-asam fumarat yang dibuat dengan metode *solvent evaporation* dalam pelarut etanol p.a. berpengaruh terhadap nilai kelarutan. Pada kokristal rasio 1:1 menunjukkan peningkatan kelarutannya $13 \pm 0,198 \text{ mg/L}$, lebih besar dibandingkan dengan kokristal rasio 1:3 ($10,503 \pm 0,044 \text{ mg/L}$) dan naringenin murni ($3,077 \pm 0,035 \text{ mg/L}$).

5.2.Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan:

1. Uji stabilitas kokristal naringenin-asam fumarat rasio 1:3 terhadap pengaruh pemanasan.

2. Uji stabilitas kokristal naringenin-asam fumarat terhadap pengaruh waktu dan kelembaban pada waktu tertentu.

DAFTAR PUSTAKA

- Allam, A. N., Naggar, V. F., & El Gamal, S. S. 2013. Formulation and physicochemical characterization of chitosan/Acyclovir co-crystals. *Pharmaceutical Development and Technology*, 18(4), 856–865.
- Altomare, A., Cuocci, C., Gatta, G. D., Moliterni, A., & Rizzi, R. 2017. Methods of crystallography: Powder x-ray diffraction. *European Mineralogical Union Notes in Mineralogy*, 19(June 2021), 79–138.
- Aprilia, P. 2022. *Pengaruh Perbedaan Rasio Stoikiometri Kokristal Kuersetin-Asam Fumarat Terhadap Kelarutan Dan Laju Disolusi*. Dalam Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember
- Apsari, K. dan A. Y. Chaerunisa. 2020. Review jurnal: upaya peningkatan kelarutan obat. *Farmaka Journal*. 18(2):56–68.
- Barikah, K. Z. (2018). Traditional and novel methods for cocrystal formation: A mini review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 9(1), 79–82.
- Berga M, Logviss K, Lauberte L, Paulausks A, Mohylyuk V. Flavonoids in the Spotlight: Bridging the Gap between Physicochemical Properties and Formulation Strategies. *Pharmaceuticals*. 2023;16(10).
- Bruni, G., Maietta, M., Maggi, L., Mustarelli, P., Ferrara, C., Berbenni, V., Milanese, C., Girella, A., & Marini, A. 2013. Preparation and physicochemical characterization of acyclovir cocrystals with improved dissolution properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(11), 4079–4086.
- Buddhadev, S. S. dan K. C. Garala. 2021. Pharmaceutical cocrystals—a review. *Proceedings*. 62(1):1-14
- Byrn, S. R., G. Zografi, dan X. S. Chen. 2017. Solubility and dissolution. *Solid State Properties of Pharmaceutical Materials*. (249–264)
- Cai, J., Wen, H., Zhou, H., Zhang, D., Lan, D., Liu, S., Li, C., Dai, X., Song, T., Wang, X., He, Y., He, Z., Tan, J., & Zhang, J. 2023. Naringenin: A flavanone with anti-inflammatory and anti-infective properties. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 164(March)
- Cao, F., G. L. Amidon, N. Rodríguez-Hornedo, dan G. E. Amidon. 2018. Mechanistic basis of cocrystal dissolution advantage. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 107(1):380–389

- Chavda, H. V., C. N. Patel, dan I. S. Anand. 2010. Biopharmaceutics classification system. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 1(1):62–69.
- Cui, W., He, Z., Zhang, Y., Fan, Q., & Feng, N. 2019. Naringenin Cocrystals Prepared by Solution Crystallization Method for Improving Bioavailability and Anti-hyperlipidemia Effects. *AAPS PharmSciTech*, 20(3), 115.
- Dewi, F. A., Sopyan, I., & Rusdiana, T. 2021. Pemilihan Jenis Koformer dan Metode Preparasi dalam Sistem Penghantaran Sediaan Ko-Amorf. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 8(3),
- Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G., & Aro, A. 2001. Human nutrition and metabolism: Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *Journal of Nutrition*, 131(2), 235–241.
- Fang, R., Liao, Y., Qiu, H., Liu, Y., Lin, S., & Chen, H. 2023. Chitosan Oligosaccharide Modified Bovine Serum Albumin Nanoparticles for Improving Oral Bioavailability of Naringenin. *Current drug delivery*, 10.2174/1567201820666230718143726. Advance online publication.
- Gozali, D., Bahti, H. H., & Soewandhi, S. N. 2012. Jurnal Sains Materi Indonesia Dengan Isonikotinamid dan Karakterisasinya. *Sains Material Indonesia*, 15(4), 103–110.
- Hairunnisa, H., Sopyan, I., & Gozali, D. 2019. Ko-Kristal: Nikotinamid Sebagai Koformer. *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, 10(2), 113.
- Haeria, Tahar N, Zakir A. Pembentukan, Karakterisasi, Dan Uji Disolusi Kokristal Meloksikam Dengan Asam Paraaminobenzoat. *Jf Fik Uinam*. 2018;6(36):17–24.
- Herawati, E. 2022. *Pembentukan Kokristal Kuersetin-Asam Maleat Metode Solvent Evaporation Sebagai Upaya Peningkatan Kelarutan Dan Disolusi*. Dalam Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember
- Hsiu SL, Huang TY, Hou YC, Chin DH, Lee Chao PD. Comparison of Metabolic Pharmacokinetics of Naringin and Naringenin in Rabbits. *Life Sciences*. 2002; 70 (13): 1481-1489
- Indra, I., Rahman, R., & Yulianti, R. 2021. Karakterisasi Karbamazepin Hasil Rekrystalisasi Berbagai Pelarut Organik dengan Metode Slow Evaporation. *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 8(3).

- Ioannou, I., M'hiri, N., Chaaban, H., Boudhrioua, N. M., & Ghoul, M. 2018. Effect of the process, temperature, light and oxygen on naringin extraction and the evolution of its antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(12), 2754–2760.
- Ismat Muzamil, M. M., Helal Uddin, A. B. M., Sarker, Z. I., Janakiraman, A. K., & Bin, L. K. 2022. Effect of Concentration of Lipid and Temperature on the Formation of Naringenin Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *European Chemical Bulletin*, 11(9), 21–28.
- Jha, D. K., Shah, D. S., Talele, S. R., & Amin, P. D. 2020. Correlation of two validated methods for the quantification of naringenin in its solid dispersion: HPLC and UV spectrophotometric methods. *SN Applied Sciences*, 2(4), 1–11
- Kanaze FI, Bounartzi MI, Georgarakis M, Niopas I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur J Clin Nutr*. 2007. ;61:472–7.
- Karagianni, A., Malamatari, M., & Kachrimanis, K. 2018. Pharmaceutical cocrystals: New solid phase modification approaches for the formulation of APIs. *Pharmaceutics*, 10(1), 1–30.
- Lucas-Abellán, C., Pérez-Abril, M., Castillo, J., Serrano, A., Mercader, M. T., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A., & Núñez-Delicado, E. 2019. Effect of temperature, pH, β - and HP- β -cds on the solubility and stability of flavanones: Naringenin and hesperetin. *Lwt*, 108(November 2018), 233–239.
- Madureira, 2023. Naringenin and Hesperidin as Promising Alternatives for Prevention and Co-Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *Antioxidants*, 12(3).
- Masuda, T., Yoshihashi, Y., Yonemochi, E., Fujii, K., Uekusa, H., & Terada, K. 2012. Cocrystallization and amorphization induced by drug-excipient interaction improves the physical properties of acyclovir. *International Journal of Pharmaceutics*, 422(1–2), 160–169.
- Mrowietz, U., P. J. Morrison, I. Suhrkamp, M. Kumanova, & B. Clement. 2018. The pharmacokinetics of fumaric acid esters reveal their in vivo effects. *Trends in Pharmacological Sciences*. 39(1):1–12.
- National Center for Biotechnology Information 2023. PubChem Compound Summary for CID 439246, Naringenin. Retrieved November 23, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naringenin>.
- Nuryadi. 2017. *Dasar-Dasar Statistik Penelitian*. Yogyakarta: Sibuku Media.

- Pihko, P. 2009. Introduction. In : Pihko,p., ed. *Hydrogen Bonding in Organic Synthesis*. Hoboken: John Willey and Sons. pp.1–4.
- Qiao, N., M. Li, W. Schlindwein, N. Malek, A. Davies, dan G. Trappitt. 2011. Pharmaceutical cocrystals: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*. 419(1–2):1–11.
- Setyawan, D., Oktavia, I. P., Farizka, R., & Sari, R. 2017. Çözücü Buharlaştırma İle Hazırlanan Kersetin-Süksinik Asit Ko-Kristalinin in Vitro Çözünme Testi Ve Fizikokimyasal Karakterizasyonu. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(3), 280–284.
- Setyawan, D., Wardhana, N. K., & Sari, R. 2015. Solubility, dissolution test and antimalarial activity of artesunate nicotinamide co-crystal prepared by solvent evaporation and slurry methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(2), 164–166.
- Shimono, K., Kadota, K., Tozuka, Y., Shimosaka, A., & Shirakawa, Y. 2015. European Journal of Pharmaceutical Sciences Kinetics of co-crystal formation with caffeine and citric acid via liquid-assisted grinding analyzed using the distinct element method. *European Journal Of Pharmaceutical Sciences*. 76, 217–224.
- Sinko, P. J. 2011. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 7th Ed*. Philadelphia: Lipp incott Williams & Wilkins.
- Sopyan, I., Alvin, B., Insan Sunan, K. S., & Cikra Ikhda, N. H. S. 2021. Systematic review: Cocrystal as efforts to improve physicochemical and bioavailability properties of oral solid dosage form. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 13(1), 43–52.
- Stasiłowicz-Krzemień, A., Gołębiowski, M., Płazińska, A., Płaziński, W., Miklaszewski, A., Żarowski, M., Adamska-Jernaś, Z., & Cielecka-Piontek, J. 2022. The Systems of Naringenin with Solubilizers Expand Its Capability to Prevent Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2).
- Thakuria, R., Delori, A., Jones, W., Lipert, M. P., Roy, L., & Rodríguez-Hornedo, N. 2013. Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 101–125.
- Tsaniyah, S. F. 2020. *Pengaruh Pembentukan Kokristal Atorvastatin-Asam Dipikolinat Dengan Metode Liquid Assisted Grinding Terhadap Kelarutan Dan Laju Disolusi*. Dalam Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.

- Wicaksono, Y., Setyawan, D., & Siswandono. 2017. Formation of ketoprofen-malonic acid cocrystal by solvent evaporation method. *Indonesian Journal of Chemistry*, 17(2), 161–166.
- Wisudyaningsih, B., Setyawan, D., & Siswandono. 2019. Co-crystallization of quercetin and isonicotinamide using solvent evaporation method. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18(4), 672–702. 3
- Budipratiwi Wisudyaningsih. 2019. *Rekayasa Kristal Kuersetin Dengan Pembentukan Kokristal Kuersetin-Isonikotinamida Sebagai Upaya Peningkatan Kelarutan Dan Laju Disolusi*. Dalam Disertasi. Surabaya:Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Yadav, A. V., Shete, A. S., Dabke, A. P., Kulkarni, P. V., & Sakhare, S. S. 2009. Co-crystals: A novel approach to modify physicochemical properties of active pharmaceutical ingredients. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(4), 359–370
- Yang, D. 2020. Solubility and stability advantages of a new cocrystal of berberine chloride with fumaric acid. *ACS Omega*. 5(14):8283–8292.
- Yeo, E., Yew Chieng, C. J., Choudhury, H., Pandey, M., & Gorain, B. 2021. Tocotrienols-rich naringenin nanoemulgel for the management of diabetic wound: Fabrication, characterization and comparative in vitro evaluations. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*
- Zhou, L., Zhang, P., Yang, G., Lin, R., Wang, W., Liu, T., Zhang, L., & Zhang, J. 2014. Solubility of chrysin in ethanol and water mixtures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 59(7), 2215–2220.

LAMPIRAN

4.1. Sertifikat Analisis Bahan Aktif Naringenin



Certificate of Analysis

TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.
 T-PLUS Nishinomiya-Kohjimachi
 16-12 Nishinomiya-Kohjimachi, Chuoh-ku, Tokyo 103-8001, Japan

Exp. Date - Aug 15, 2025

Chemical Name: Naringenin

Product Number: M6072

CAS No.: 67804-48-2

Lot: 09HE

Tests	Results	Specifications
Appearance	Almost white powder	White to Light yellow to Light orange powder to crystal
Purity(HPLC)	98.7 area%	min. 93.0 area%
Purity(Resonanceless titration)	99.6 %	min. 93.0 %

TGI Lot numbers are 4-6 characters in length. Characters listed after the first 4-6 characters are control numbers for internal purpose only.

The contents of the specifications are subject to change without advance notice. The specification values displayed here are the most up to date values. There may be cases where the product labels display a different specification, however, the product quality still meets the latest specification.


Customer Service:

TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD

E-mail: globalbusiness@TCIchemicals.com

Takuya Nishio
 Quality Assurance Department Manager

4.2. Sertifikat Analisis Bahan Koformer Asam Fumarat



Specification

8.00269.0100 Fumaric acid for synthesis

Specification		
Assay (acidimetric)	≥ 99.0	%
Identity (IR)	passed	test.

Dr. Oliver Schmal
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

4.3. Sertifikat Analisis Bahan Pelarut Etanol



Certificate of Analysis

1.00983.2500 Ethanol absolute for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Batch I1174283

	Spec. Values		Batch Values	
Purity (GC)	≥ 99.9	%	99.9	%
Identity (IR)	conforms		conforms	
Appearance	conforms		conforms	
Color	≤ 10	Hazen	< 5	Hazen
Solubility in water	conforms		conforms	
Acidity or alkalinity	≤ 30	ppm	≤ 30	ppm
Titration acid	≤ 0.0002	meq/g	0.0001	meq/g
Titration base	≤ 0.0002	meq/g	< 0.0002	meq/g
Density (d 20 °C/20 °C)	0.790 - 0.793		0.791	
UV absorption	conforms		conforms	
Aldehydes (as Acetaldehyde)	≤ 0.001	%	≤ 0.001	%
Fusel oils	conforms		conforms	
Substances reducing potassium permanganate (as O)	≤ 0.0002	%	≤ 0.0002	%
Substances reducing permanganate (ACS)	conforms		conforms	
Carbonyl compounds (as CO)	≤ 0.003	%	≤ 0.003	%
Readily carbonizable substances	conforms		conforms	
Acetone, Isopropyl Alcohol (ACS)	conforms		conforms	
Acetone (GC)	≤ 0.001	%	< 0.001	%
Ethylmethylketone (GC)	≤ 0.02	%	< 0.01	%
Isoamyl alcohol (GC)	≤ 0.05	%	< 0.01	%
2-Propanol (GC)	≤ 0.01	%	< 0.01	%
Higher alcohols (GC)	≤ 0.01	%	< 0.01	%
Volatile impurities (GC) (Acetaldehyde and Acetal)	≤ 10	ppm	< 10	ppm
Volatile impurities (GC) (Benzene)	≤ 2	ppm	< 1	ppm
Volatile impurities (GC) (Methanol)	≤ 100	ppm	< 50	ppm
Volatile impurities (GC) (Total of other impurities)	≤ 300	ppm	< 100	ppm
Volatile impurities (GC) (disregard limit)	≤ 9	ppm	9	ppm
Chloride (Cl)	≤ 0.3	ppm	0.1	ppm
Nitrate (NO ₃)	≤ 0.3	ppm	< 0.1	ppm
Phosphate (PO ₄)	≤ 0.3	ppm	< 0.1	ppm
Sulfate (SO ₄)	≤ 0.3	ppm	< 0.1	ppm
Ag (Silver)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Al (Aluminium)	≤ 0.00005	%	≤ 0.00005	%
As (Arsenic)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Au (Gold)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Ba (Barium)	≤ 0.00001	%	≤ 0.00001	%
Be (Beryllium)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Bi (Bismuth)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Ca (Calcium)	≤ 0.00005	%	≤ 0.00005	%

Certificate of Analysis

1.00983.2500 Ethanol absolute for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Batch I1174283

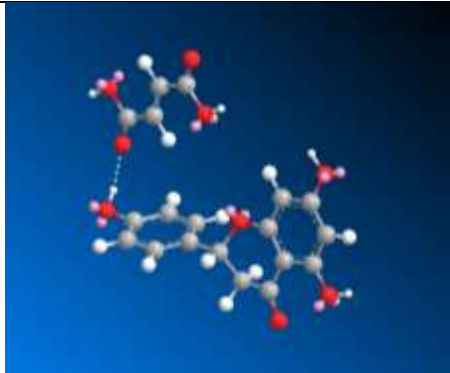
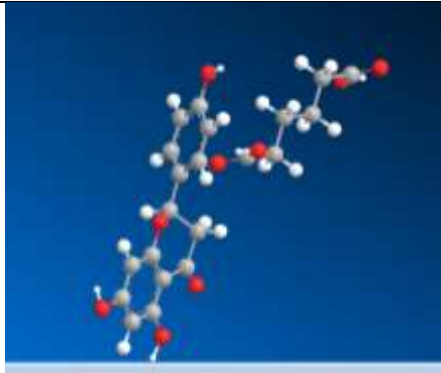
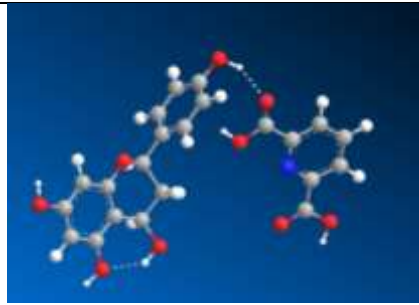
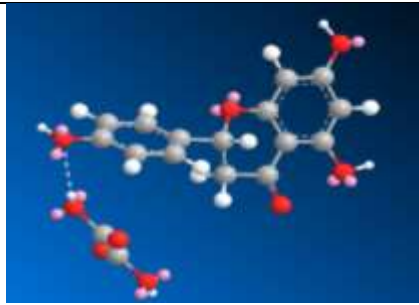
Cd (Cadmium)	≤ 0.000005	%	≤ 0.000005	%
Co (Cobalt)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Cr (Chromium)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Cu (Copper)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Fe (Iron)	≤ 0.00001	%	≤ 0.00001	%
Ga (Gallium)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
In (Indium)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Li (Lithium)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.00001	%	≤ 0.00001	%
Mn (Manganese)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Mo (Molybdenum)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Ni (Nickel)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Pb (Lead)	≤ 0.00001	%	≤ 0.00001	%
Pt (Platinum)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Sb (Antimony)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Sn (Tin)	≤ 0.00001	%	≤ 0.00001	%
Ti (Titanium)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Tl (Thallium)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
V (Vanadium)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Zn (Zinc)	≤ 0.00001	%	≤ 0.00001	%
Zr (Zirconium)	≤ 0.000002	%	≤ 0.000002	%
Evaporation residue	≤ 0.0005	%	< 0.0001	%
Water	≤ 0.1	%	< 0.1	%

Date of release (DD.MM.YYYY) 14.10.2021
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 30.09.2026

Jeannette David
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

4.4. Hasil analisis komputasi dengan *ChemBioDraw Ultra 12.0*

Asam Fumarat	Asam Adipat
 <p>Nilai : -46.4577 kcal/mol</p>	 <p>Nilai : -19.9755 kcal/mol</p>
Asam Dipikolinat	Asam Oksalat
 <p>Nilai : 65.2228 kcal/mol</p>	 <p>Nilai : 65.4924 kcal/mol</p>

4.5. Hasil Perhitungan Penimbangan Preparasi Sampel dengan Metode Solvent Evaporation

1. Perhitungan bahan kokristal naringenin-asam fumarat sebanyak 400 mg (1:1) dan (1:3)

- Jumlah massa bahan aktif (naringenin) dalam satu mol
 - BM naringenin = 272,26 g/mol
 - BM asam fumarat = 116,07 g/mol

a. Kokristal Rasio 1:1

$$\text{Naringenin} = \frac{272,26}{272,26 + 116,07} \times 400 \text{ mg} = 280,441 \text{ mg}$$

$$\text{Asam Fumarat} = \frac{116,07}{116,07 + 272,26} \times 400 \text{ mg} = 119,558 \text{ mg}$$

b. Kokristal Rasio 1:3

$$\text{Naringenin} = \frac{272,26}{(272,26 + (116,07 \times 3))} \times 400 \text{ mg} = 175,518 \text{ mg}$$

$$\text{Asam Fumarat} = \frac{(116,07 \times 3)}{((116,07 \times 3) + 272,26)} \times 400 \text{ mg} = 224,481 \text{ mg}$$

4.6. Hasil Perhitungan Kelarutan Sampel dengan Metode Solvent**Evaporation**

a. Rasio 1:1

- Kelarutan Naringenin + Etanol (50 mg/ml)

$$= \frac{280,4418 \text{ mg}}{50 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 5,6088 \text{ ml}$$

- Kelarutan Asam Fumarat + Etanol (54,4 g/l)

$$= \frac{119,5581 \text{ mg}}{54400 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,0022 \text{ ml}$$

b. Rasio 1:3

- Kelarutan Naringenin + Etanol (50 mg/ml)

$$= \frac{175,518 \text{ mg}}{50 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 3,5103 \text{ ml}$$

- Kelarutan Asam Fumarat + Etanol (54,4 g/l)

$$= \frac{224,481 \text{ mg}}{54400 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 0,0041 \text{ ml}$$

4.7. Hasil Perhitungan Rendemen Kokristal Naringenin-Asam Fumarat

a. Rasio 1:1 = Cawan berisi kokristal – cawan kosong

$$= 86360,5 \text{ mg} - 85963,7$$

$$= 396,8 \text{ mg}$$

$$\% \text{ rendemen} = \frac{396,8 \text{ mg}}{400 \text{ mg}} \times 100\% = 99,2\%$$

b. Rasio 1:3 = Cawan berisi kokristal – cawan kosong

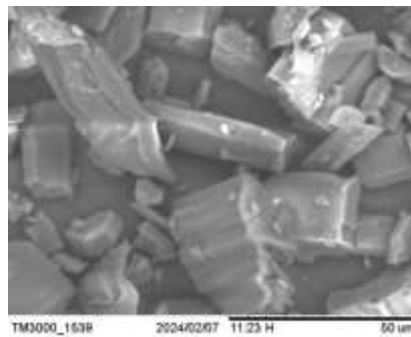
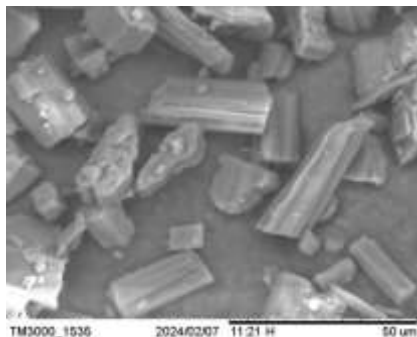
$$= 73764 \text{ mg} - 73380 \text{ mg}$$

$$= 384 \text{ mg}$$

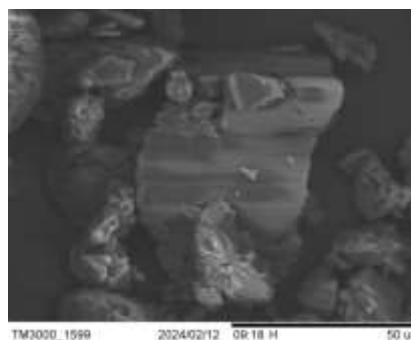
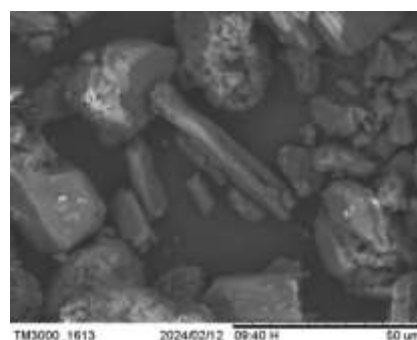
$$\% \text{ rendemen} = \frac{384 \text{ mg}}{400 \text{ mg}} \times 100\% = 96\%$$

4.8. Hasil Karakterisasi dengan SEM

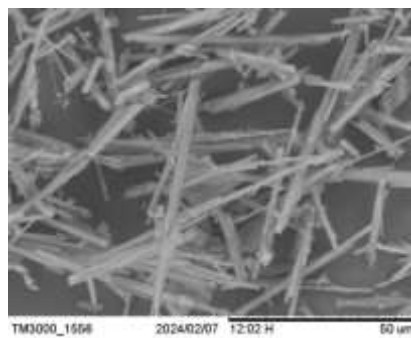
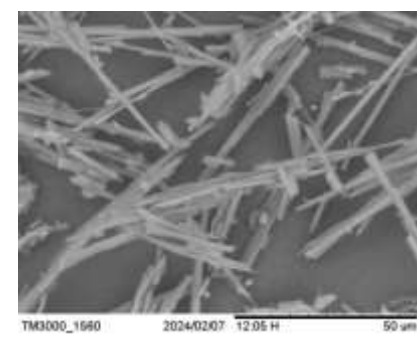
4.8.1 Naringenin TCI



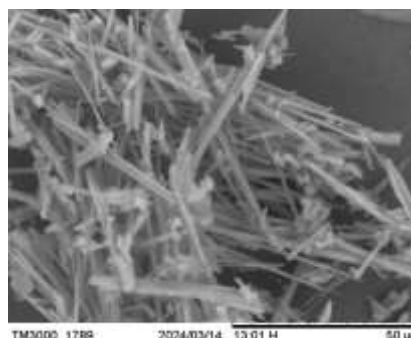
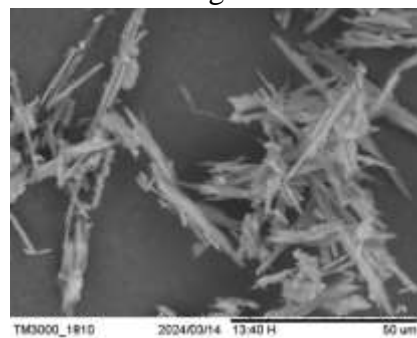
4.8.2 Asam Fumarat



4.8.3 Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:1

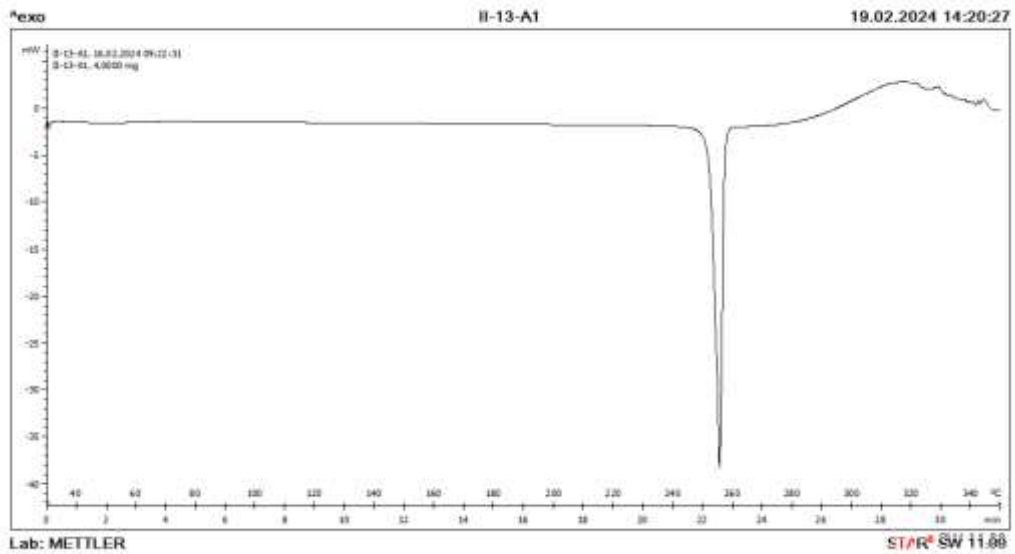
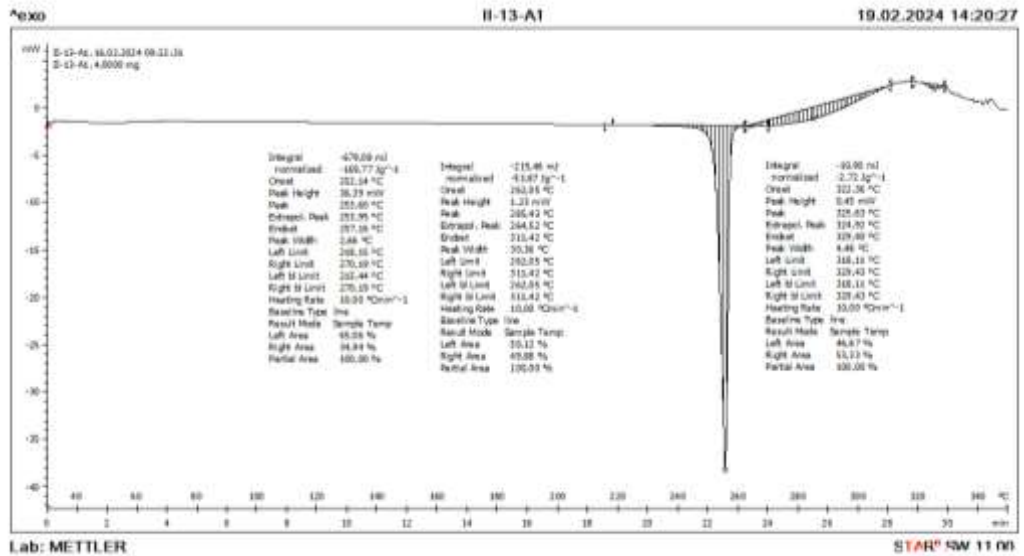


4.8.4 Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:3

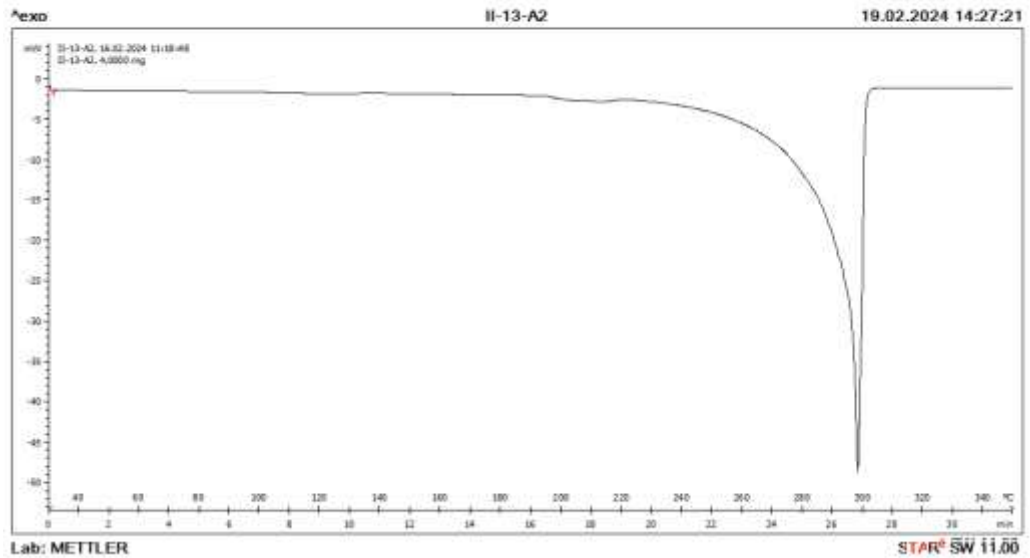
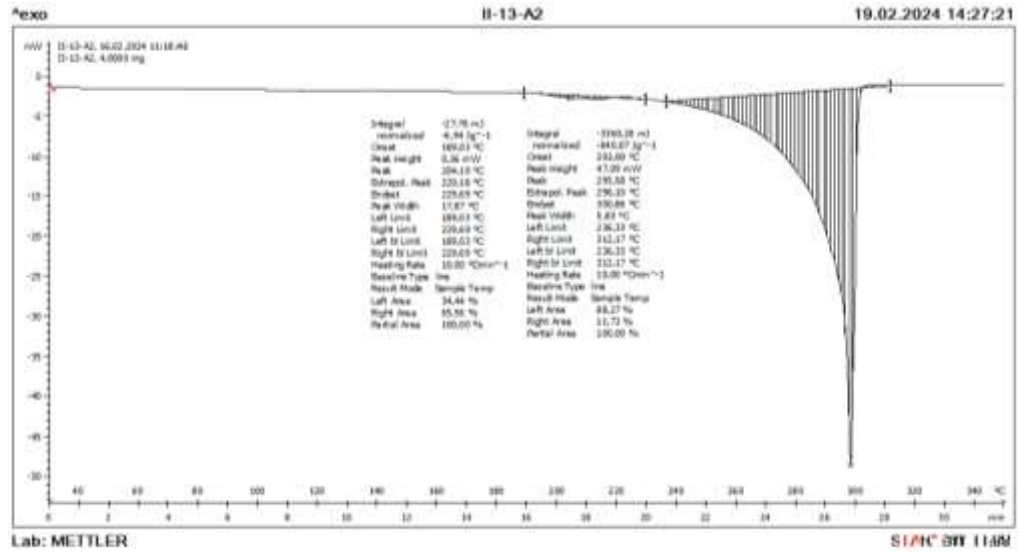


4.9. Hasil Karakterisasi dengan DSC

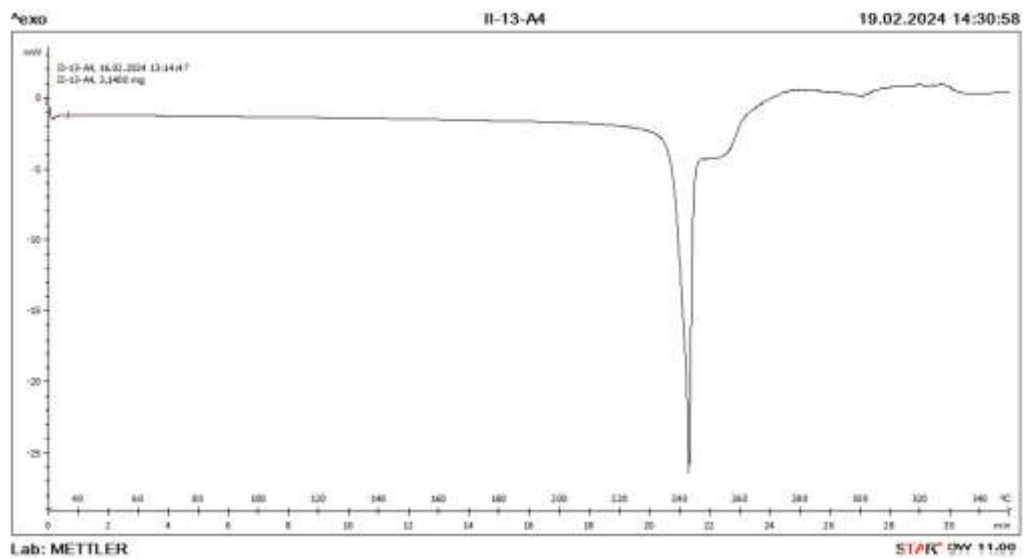
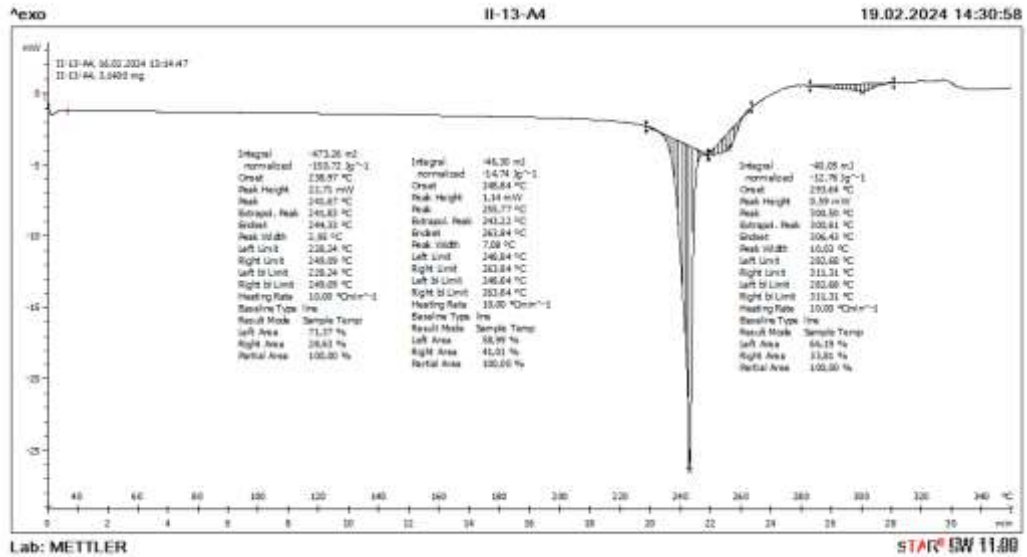
4.9.1 Termogram Naringenin TCI



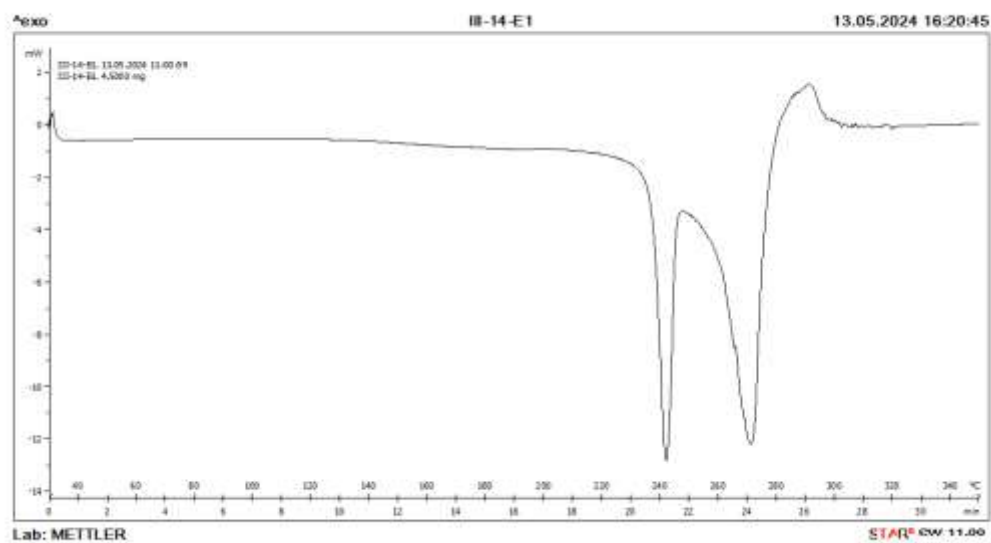
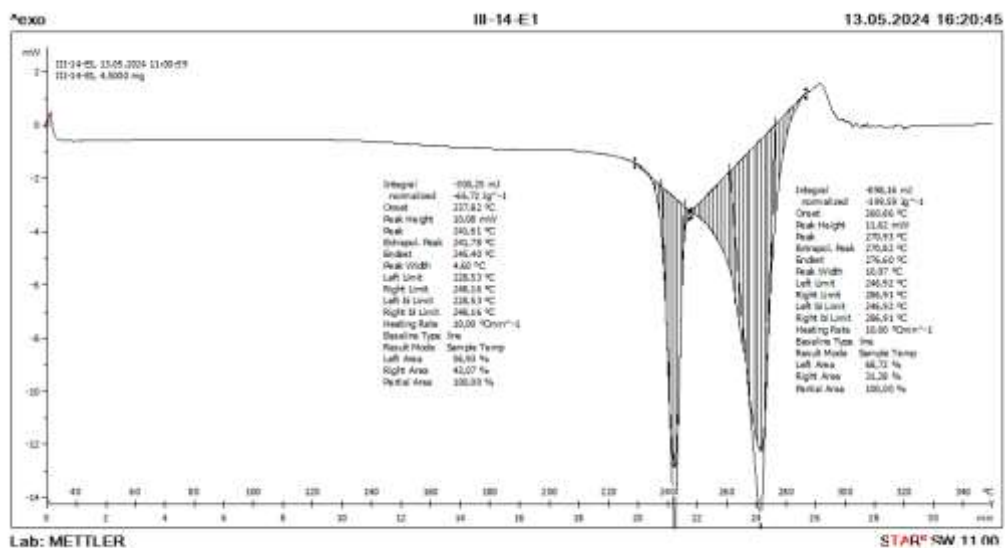
4.9.2 Termogram Asam Fumarat



4.9.3 Termogram Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:1



4.9.4 Termogram Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:3



4.10. Hasil Karakterisasi dengan PXRD (Difraksi Sinar-X)

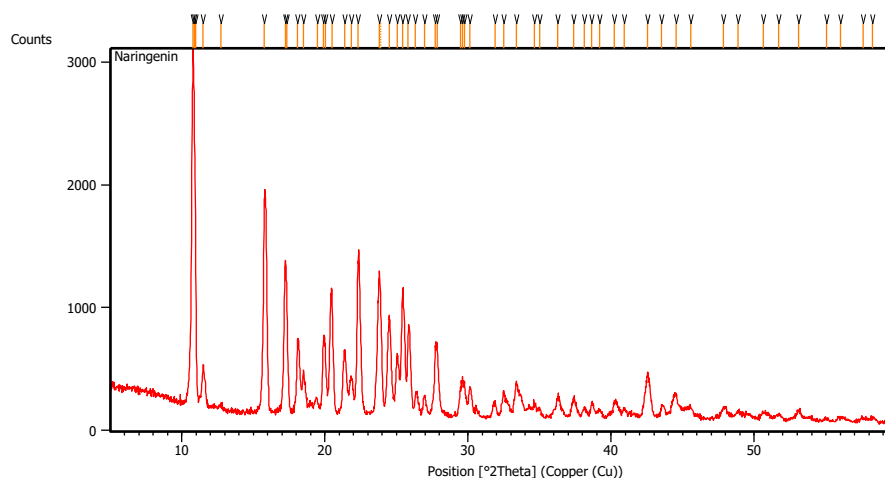
4.10.1. Difraktogram Naringenin

Measurement Conditions: (Bookmark 1)

Dataset Name Naringenin
 File name E:\DATA PENGUJIAN-XRD\Pengujian
 2024\Februari\Putri-XRD\Naringenin\Naringenin .xrdml
 Comment Configuration=Reflection-Transmission Spinner,
 Owner=User-1, Creation date=1/15/2016 11:44:36 AM

Goniometer=PW3050/60 (Theta/Theta); Minimum
 step size 2Theta:0.001; Minimum step size Omega:0.001
 Sample stage=Reflection-Transmission Spinner
 PW3064/60; Minimum step size Phi:0.1
 Diffractometer system=XPERT-PRO
 Measurement program=C:\PANalytical\Data
 Collector\Programs\Scan 5-60.xrdmp, Identifier={8A8347CE-6B12-
 4A32-9514-CEA67FAC992A}
 Measurement Date / Time 2/23/2024 8:31:29 AM
 Operator Institut Teknologi
 Raw Data Origin XRD measurement (*.XRDML)
 Scan Axis Gonio
 Start Position [$^{\circ}$ 2Th.] 5.0084
 End Position [$^{\circ}$ 2Th.] 59.9864
 Step Size [$^{\circ}$ 2Th.] 0.0170
 Scan Step Time [s] 10.1600
 Scan Type Continuous
 PSD Mode Scanning
 PSD Length [$^{\circ}$ 2Th.] 2.12
 Offset [$^{\circ}$ 2Th.] 0.0000
 Divergence Slit Type Fixed
 Divergence Slit Size [$^{\circ}$]1.0000
 Specimen Length [mm]10.00
 Measurement Temperature [$^{\circ}$ C] 25.00
 Anode Material Cu
 K-Alpha1 [\AA] 1.54060
 K-Alpha2 [\AA] 1.54443
 K-Beta [\AA] 1.39225
 K-A2 / K-A1 Ratio 0.50000
 Generator Settings 30 mA, 40 kV
 Diffractometer Type 0000000011119014
 Diffractometer Number0
 Goniometer Radius [mm] 240.00
 Dist. Focus-Diverg. Slit [mm]91.00
 Incident Beam Monochromator No
 Spinning No

Main Graphics, Analyze View: (Bookmark 2)



Peak List: (Bookmark 3)

Pos. [$^{\circ}$ 2Th.]	Height [cts]	FWHM Left [$^{\circ}$ 2Th.]	d-spacing [\AA]	Rel. Int. [%]
10.7537	2628.34	0.1338	8.22721	100.00
10.8608	2515.46	0.0669	8.14626	95.71
10.9426	1524.03	0.0669	8.08555	57.98
11.4931	338.82	0.0836	7.69951	12.89
12.7225	33.18	0.2007	6.95811	1.26
15.7418	1563.09	0.1171	5.62968	59.47
17.2271	1235.13	0.1506	5.14750	46.99
17.3248	1021.82	0.0836	5.11871	38.88
18.1005	610.02	0.1171	4.90104	23.21
18.4945	341.77	0.0669	4.79750	13.00
19.4581	119.41	0.1338	4.56205	4.54
19.8841	568.36	0.0669	4.46526	21.62
20.0310	513.95	0.0669	4.43284	19.55
20.4856	994.79	0.2175	4.33550	37.85
21.3811	514.21	0.2007	4.15588	19.56
21.8473	297.60	0.2007	4.06825	11.32
22.2871	1131.71	0.1673	3.98895	43.06
23.7818	1129.49	0.1428	3.73843	42.97
23.8819	984.09	0.1020	3.73224	37.44
24.4905	818.69	0.1632	3.63183	31.15
25.0505	501.14	0.1428	3.55189	19.07
25.4479	1030.11	0.1836	3.49732	39.19

25.8134	635.24	0.1836	3.44862	24.17
26.3298	167.17	0.1224	3.38215	6.36
26.9422	163.00	0.2040	3.30665	6.20
27.6970	539.14	0.1020	3.21822	20.51
27.8443	584.70	0.1224	3.20153	22.25
29.4485	213.93	0.1632	3.03068	8.14
29.5972	293.56	0.1224	3.01579	11.17
29.7400	268.21	0.1224	3.00163	10.20
30.1138	234.14	0.2040	2.96522	8.91
31.9104	111.27	0.3264	2.80225	4.23
32.4945	214.00	0.1020	2.75320	8.14
33.3601	274.80	0.1224	2.68371	10.46
34.6283	106.17	0.2040	2.58828	4.04
35.0178	71.35	0.2448	2.56038	2.71
36.2588	157.03	0.2856	2.47554	5.97
37.3943	156.65	0.2448	2.40293	5.96
38.1286	78.42	0.3264	2.35833	2.98
38.6392	118.07	0.2856	2.32833	4.49
39.1995	68.11	0.3264	2.29633	2.59
40.2033	126.30	0.2448	2.24128	4.81
40.9048	76.83	0.2040	2.20445	2.92
42.5394	367.01	0.3264	2.12345	13.96
43.5248	113.01	0.1632	2.07763	4.30
44.5409	209.57	0.3264	2.03256	7.97
45.5824	96.00	0.3264	1.98851	3.65
47.8520	108.32	0.2448	1.89936	4.12
48.8727	76.02	0.3264	1.86205	2.89
50.6166	68.63	0.3264	1.80192	2.61

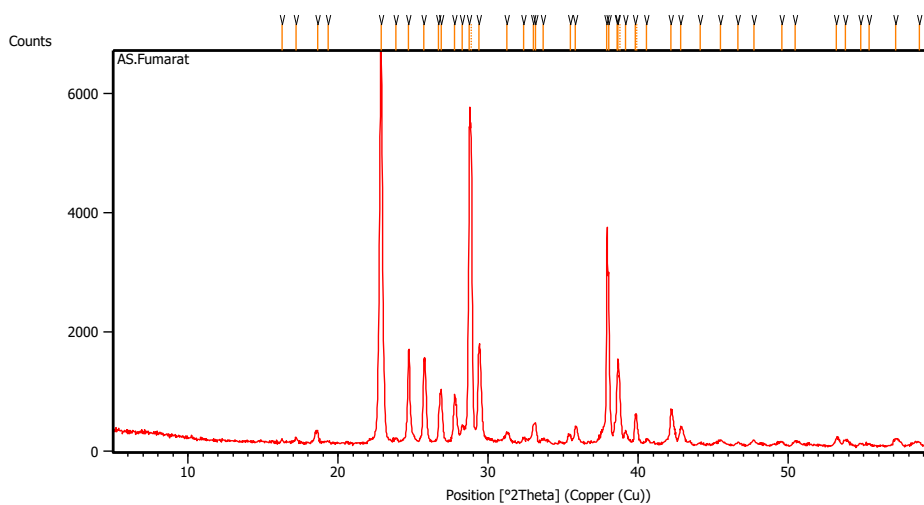
4.10.2. Difraktogram Asam Fumarat

Measurement Conditions: (Bookmark 1)

Dataset Name	AS.Fumarat
File name	E:\DATA PENGUJIAN-XRD\Pengujian 2024\Februari\Putri-XRD\AS.Fumarat\AS.Fumarat.rd
Comment	Configuration=Reflection-Transmission Sp Goniometer=PW3050/60 (Theta/Theta); Mini
Measurement Date / Time	2/22/2024 3:41:00 PM
Raw Data Origin	PHILIPS-binary (scan) (.RD)
Scan Axis	Gonio

Start Position [$^{\circ}2\text{Th.}$] 5.0084
End Position [$^{\circ}2\text{Th.}$] 59.9864
Step Size [$^{\circ}2\text{Th.}$] 0.0170
Scan Step Time [s] 10.1500
Scan Type Continuous
Offset [$^{\circ}2\text{Th.}$] 0.0000
Divergence Slit Type Fixed
Divergence Slit Size [$^{\circ}$] 1.0000
Specimen Length [mm] 10.00
Receiving Slit Size [mm] 12.7500
Measurement Temperature [$^{\circ}\text{C}$] -273.15
Anode Material Cu
K-Alpha1 [\AA] 1.54060
K-Alpha2 [\AA] 1.54443
K-Beta [\AA] 1.39225
K-A2 / K-A1 Ratio 0.50000
Generator Settings 30 mA, 40 kV
Diffractometer Type XPert MPD
Diffractometer Number 1
Goniometer Radius [mm] 200.00
Dist. Focus-Diverg. Slit [mm] 91.00
Incident Beam Monochromator No
Spinning No

Main Graphics, Analyze View: (Bookmark 2)



Peak List: (Bookmark 3)

Pos. [$^{\circ}2\theta$.]	Height [cts]	FWHM Left [$^{\circ}2\theta$.]	d-spacing [\AA]	Rel. Int. [%]
16.2445	49.06	0.1338	5.45657	0.75
17.1894	90.63	0.1338	5.15871	1.39
18.6448	172.16	0.0669	4.75916	2.64
19.3396	24.13	0.3346	4.58975	0.37
22.8609	6531.61	0.2175	3.89012	100.00
23.8625	91.80	0.1673	3.72906	1.41
24.6795	1498.53	0.1338	3.60743	22.94
25.7232	1391.68	0.0836	3.46337	21.31
26.7020	483.62	0.0669	3.33861	7.40
26.8818	898.02	0.0502	3.31668	13.75
27.7550	756.71	0.0502	3.21429	11.59
28.2540	296.53	0.1171	3.15864	4.54
28.7408	5331.09	0.1428	3.10367	81.62
28.8749	4946.21	0.0816	3.09724	75.73
29.3631	1513.89	0.2244	3.03930	23.18
31.2462	192.86	0.2448	2.86029	2.95
32.3691	96.21	0.1632	2.76358	1.47
32.9925	326.67	0.1224	2.71278	5.00
33.1460	352.02	0.1020	2.70056	5.39
33.6330	73.54	0.4080	2.66256	1.13
35.4793	134.73	0.1224	2.52812	2.06
35.7791	261.24	0.1224	2.50762	4.00
37.9102	3458.77	0.0816	2.37141	52.95
38.0212	2754.64	0.0816	2.36474	42.17
38.5679	1050.81	0.0612	2.33247	16.09
38.6519	1430.74	0.0816	2.32759	21.90
38.7530	1030.54	0.0612	2.32753	15.78
39.1245	218.36	0.2448	2.30056	3.34
39.7774	463.31	0.1224	2.26430	7.09
39.8844	468.51	0.0612	2.26408	7.17
40.5543	90.01	0.2448	2.22269	1.38
42.1673	557.33	0.1632	2.14132	8.53
42.8190	288.43	0.3672	2.11023	4.42
44.1245	26.94	0.4080	2.05077	0.41
45.4686	78.46	0.4080	1.99323	1.20
46.6131	44.06	0.3264	1.94692	0.67

47.6786	91.50	0.1632	1.90587	1.40
49.5464	56.27	0.3264	1.83830	0.86
50.4286	71.79	0.2856	1.80819	1.10
53.1979	129.26	0.3672	1.72040	1.98
53.7989	100.32	0.3264	1.70259	1.54
54.8163	36.79	0.2448	1.67338	0.56
55.3947	33.35	0.2448	1.65726	0.51
57.1513	121.43	0.5712	1.61043	1.86
58.6995	62.24	0.5712	1.57159	0.95

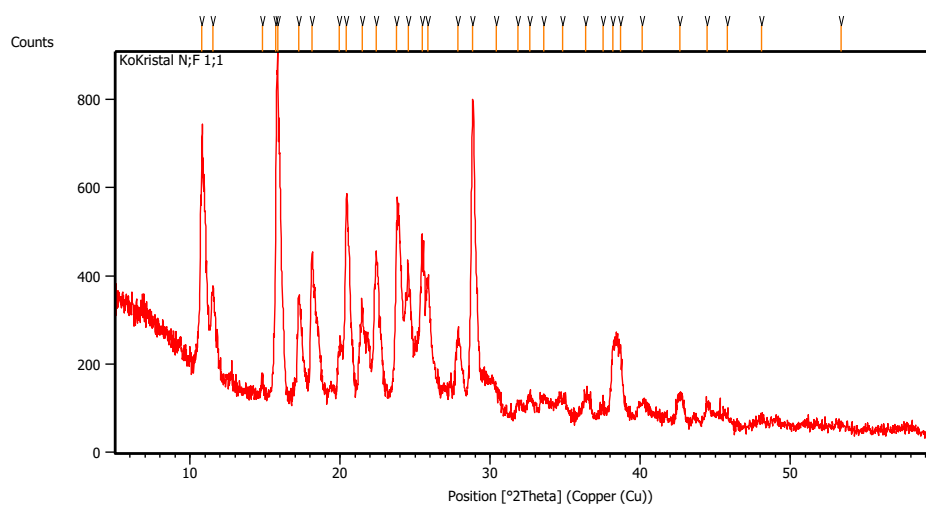
4.10.3. Difraktogram Kokristal 1:1

Measurement Conditions: (Bookmark 1)

Dataset Name KoKristal N;F 1;1
 File name E:\DATA PENGUJIAN-XRD\Pengujian
 2024\Februari\Putri-XRD\KoKristal N;F 1;1\KoKristal N;F 1;1.xrdml
 Comment Configuration=Reflection-Transmission Spinner,
 Owner=User-1, Creation date=1/15/2016 11:44:36 AM
 Goniometer=PW3050/60 (Theta/Theta); Minimum
 step size 2Theta:0.001; Minimum step size Omega:0.001
 Sample stage=Reflection-Transmission Spinner
 PW3064/60; Minimum step size Phi:0.1
 Diffractometer system=XPERT-PRO
 Measurement program=C:\PANalytical\Data
 Collector\Programs\Scan 5-60.xrdmp, Identifier={8A8347CE-6B12-
 4A32-9514-CEA67FAC992A}
 Measurement Date / Time 2/23/2024 8:49:32 AM
 Operator Institut Teknologi
 Raw Data Origin XRD measurement (*.XRDML)
 Scan Axis Gonio
 Start Position [$^{\circ}2\text{Th.}$] 5.0084
 End Position [$^{\circ}2\text{Th.}$] 59.9864
 Step Size [$^{\circ}2\text{Th.}$] 0.0170
 Scan Step Time [s] 10.1600
 Scan Type Continuous
 PSD Mode Scanning
 PSD Length [$^{\circ}2\text{Th.}$] 2.12
 Offset [$^{\circ}2\text{Th.}$] 0.0000
 Divergence Slit Type Fixed
 Divergence Slit Size [$^{\circ}$]1.0000

Specimen Length [mm] 10.00
 Measurement Temperature [°C] 25.00
 Anode Material Cu
 K-Alpha1 [Å] 1.54060
 K-Alpha2 [Å] 1.54443
 K-Beta [Å] 1.39225
 K-A2 / K-A1 Ratio 0.50000
 Generator Settings 30 mA, 40 kV
 Diffractometer Type 0000000011119014
 Diffractometer Number 0
 Goniometer Radius [mm] 240.00
 Dist. Focus-Diverg. Slit [mm] 91.00
 Incident Beam Monochromator No
 Spinning No

Main Graphics, Analyze View: (Bookmark 2)



Peak List: (Bookmark 3)

Pos. [°2Th.]	Height [cts]	FWHM Left [°2Th.]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]
10.7976	520.54	0.1004	8.19382	71.06
11.4977	180.05	0.2007	7.69643	24.58
14.8147	41.42	0.1004	5.97983	5.65
15.7204	516.85	0.1004	5.63731	70.55
15.8243	732.56	0.0502	5.60051	100.00
17.2249	225.40	0.0836	5.14815	30.77

18.1328	326.19	0.1840	4.89239	44.53
19.9589	117.05	0.1338	4.44869	15.98
20.4249	467.09	0.1338	4.34824	63.76
21.4653	215.15	0.1338	4.13977	29.37
22.4220	329.89	0.3011	3.96526	45.03
23.7463	389.49	0.1004	3.74704	53.17
24.5226	317.42	0.1673	3.63015	43.33
25.4589	391.46	0.0502	3.49873	53.44
25.8550	281.23	0.1673	3.44602	38.39
27.8332	166.78	0.2676	3.20544	22.77
28.8321	709.06	0.1171	3.09662	96.79
30.3796	55.03	0.6691	2.94232	7.51
31.8651	25.68	0.2676	2.80846	3.50
32.6431	38.42	0.2007	2.74328	5.24
33.5724	38.20	0.4015	2.66944	5.21
34.7995	40.28	0.5353	2.57807	5.50
36.3647	45.84	0.2676	2.47062	6.26
37.4940	30.32	0.3346	2.39876	4.14
38.1617	158.32	0.1673	2.35831	21.61
38.6631	160.02	0.2676	2.32888	21.84
40.1098	41.72	0.5353	2.24815	5.70
42.6279	62.22	0.4015	2.12100	8.49
44.4671	48.48	0.2676	2.03745	6.62
45.7779	24.78	0.5353	1.98212	3.38
48.0567	19.94	0.4015	1.89332	2.72
53.3613	6.36	0.8029	1.71694	0.87

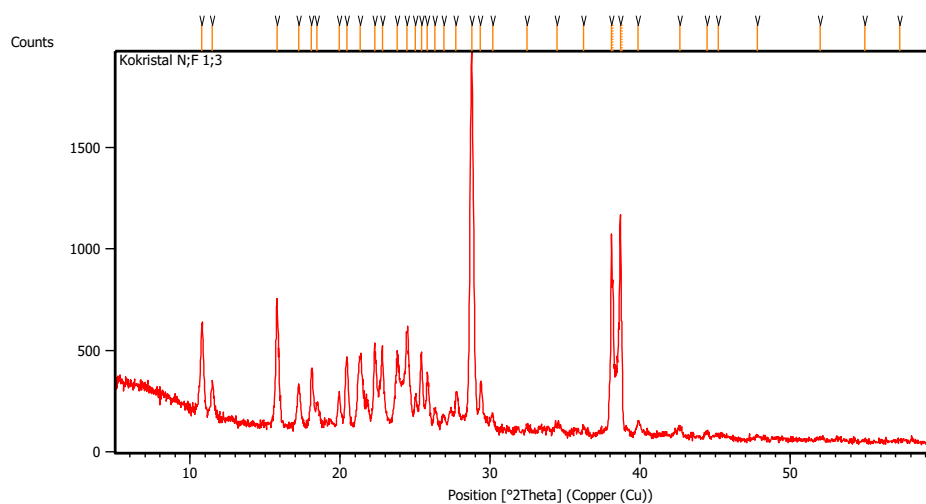
4.10.4. Difraktogram Kokristal 1:3

Measurement Conditions: (Bookmark 1)

Dataset Name	Kokristal N;F 1;3
File name	E:\DATA PENGUJIAN-XRD\Pengujian 2024\Maret\Putri F\Kokristal N;F 1;3\Kokristal N;F 1;3.rd
Comment	Configuration=Reflection-Transmission Sp Goniometer=PW3050/60 (Theta/Theta); Mini
Measurement Date / Time	3/25/2024 1:07:00 PM
Raw Data Origin	PHILIPS-binary (scan) (.RD)
Scan Axis	Gonio
Start Position [$^{\circ}2\theta$.]	5.0084
End Position [$^{\circ}2\theta$.]	59.9864

Step Size [°2Th.]	0.0170
Scan Step Time [s]	10.1500
Scan Type	Continuous
Offset [°2Th.]	0.0000
Divergence Slit Type	Fixed
Divergence Slit Size [°]	1.0000
Specimen Length [mm]	10.00
Receiving Slit Size [mm]	12.7500
Measurement Temperature [°C]	-273.15
Anode Material	Cu
K-Alpha1 [Å]	1.54060
K-Alpha2 [Å]	1.54443
K-Beta [Å]	1.39225
K-A2 / K-A1 Ratio	0.50000
Generator Settings	30 mA, 40 kV
Diffractometer Type	XPert MPD
Diffractometer Number	1
Goniometer Radius [mm]	200.00
Dist. Focus-Diverg. Slit [mm]	91.00
Incident Beam Monochromator	No
Spinning	No

Main Graphics, Analyze View: (Bookmark 2)

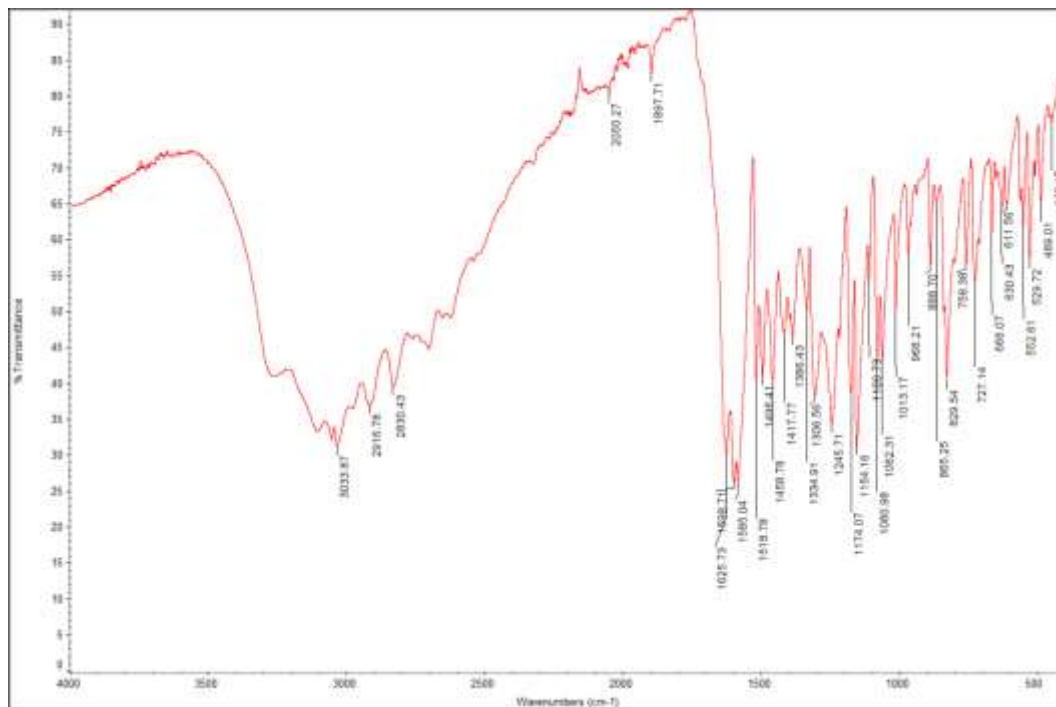


Peak List: (Bookmark 3)

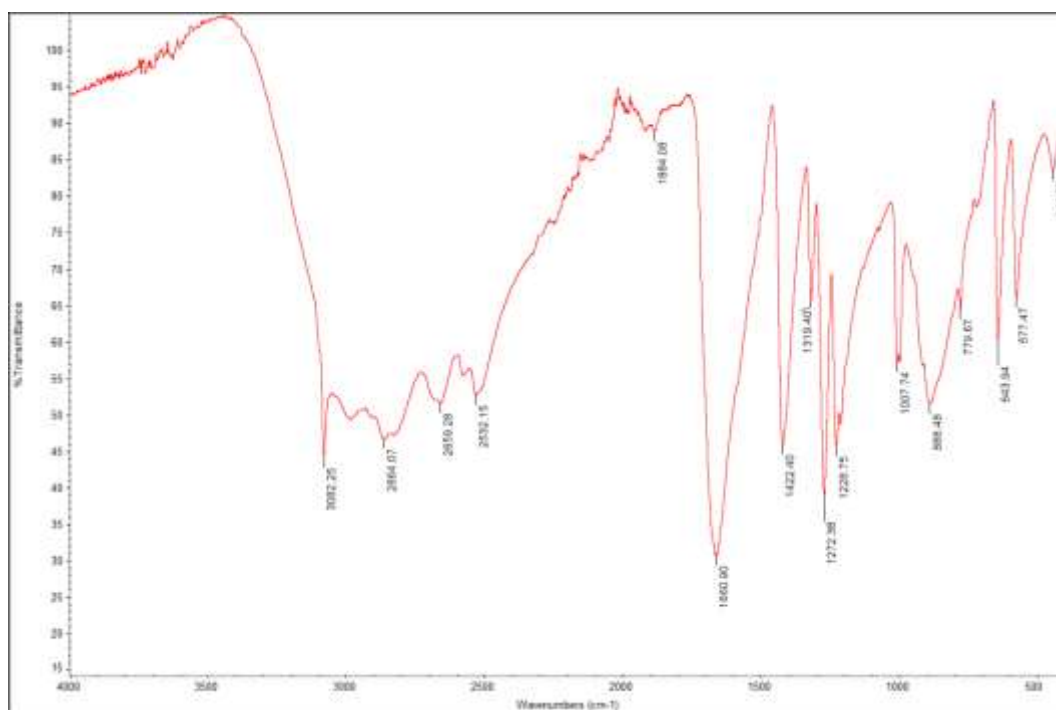
Pos. [$^{\circ}2\theta$.]	Height [cts]	FWHM Left [$^{\circ}2\theta$.]	d-spacing [\AA]	Rel. Int. [%]
10.7626	429.65	0.1338	8.22039	22.87
11.4777	155.97	0.1338	7.70978	8.30
15.7866	582.59	0.1004	5.61382	31.01
17.2304	208.64	0.1171	5.14651	11.10
18.0667	250.17	0.1171	4.91014	13.31
18.4713	107.49	0.1004	4.80348	5.72
19.9308	153.54	0.1673	4.45491	8.17
20.4543	346.84	0.2007	4.34206	18.46
21.3457	353.44	0.3011	4.16270	18.81
22.2859	384.11	0.1004	3.98917	20.44
22.8055	409.45	0.0669	3.89944	21.79
23.7982	350.80	0.1338	3.73899	18.67
24.4619	489.75	0.1673	3.63902	26.07
25.0225	164.83	0.1171	3.55875	8.77
25.4048	383.23	0.1171	3.50606	20.40
25.8095	275.57	0.1004	3.45199	14.67
26.3073	106.55	0.2007	3.38779	5.67
26.8958	72.52	0.2342	3.31498	3.86
27.7236	192.85	0.1171	3.21786	10.26
28.7607	1878.90	0.2175	3.10414	100.00
29.3491	231.45	0.1004	3.04324	12.32
30.1494	93.94	0.1004	2.96425	5.00
32.4632	32.41	0.2676	2.75807	1.72
34.4679	44.79	0.3346	2.60211	2.38
36.2223	38.39	0.2007	2.48000	2.04
38.0705	983.97	0.0816	2.36180	52.37
38.1861	691.85	0.0612	2.36076	36.82
38.6679	1092.01	0.0816	2.32667	58.12
38.7790	490.66	0.0612	2.32603	26.11
39.8563	78.71	0.2040	2.25999	4.19
42.6494	53.13	0.2448	2.11823	2.83
44.4234	30.77	0.2448	2.03767	1.64
45.2001	17.90	1.3056	2.00444	0.95
47.7744	17.68	0.6528	1.90227	0.94
51.9672	9.77	0.4896	1.75822	0.52
54.9326	6.42	0.4896	1.67011	0.34
57.2746	11.57	1.3056	1.60726	0.62

4.11. Hasil Karakterisasi dengan FTIR

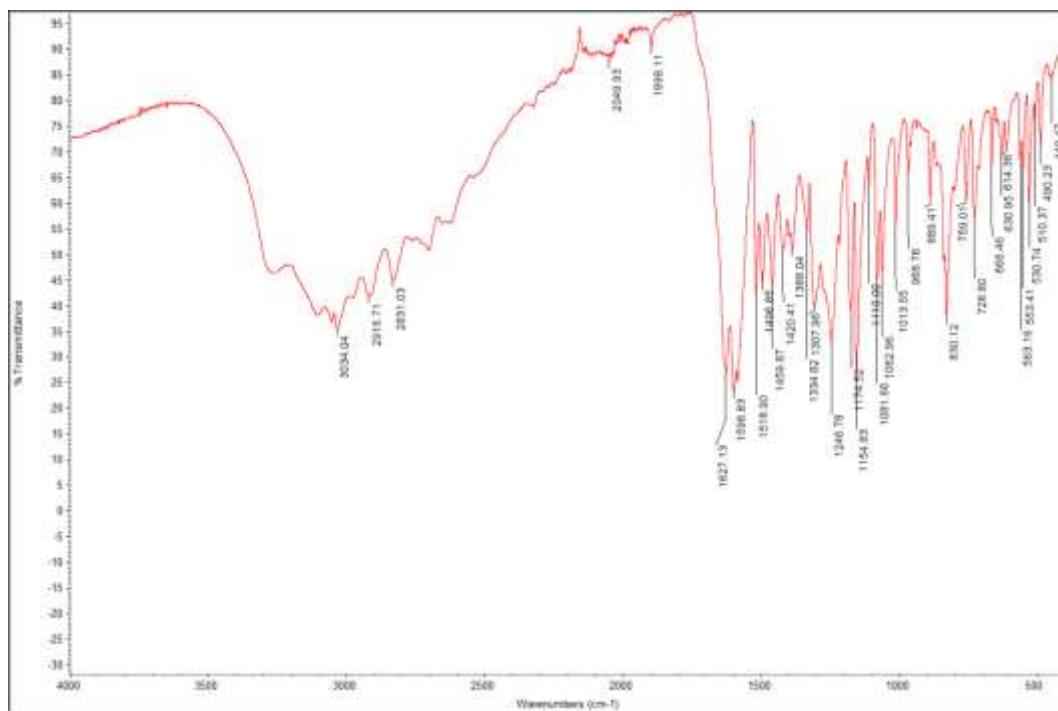
4.11.1. Naringenin



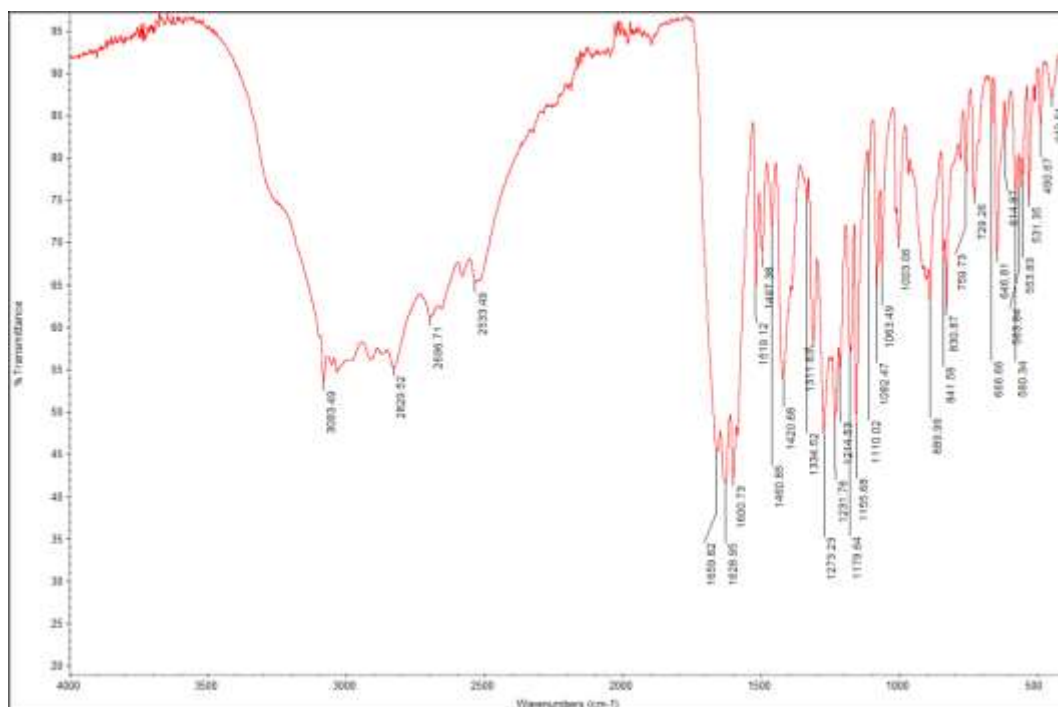
4.11.2. Asam Fumarat



4.11.3. Kokristal 1:1



4.11.4. Kokristal 1:3



4.12. Perhitungan Data Hasil Scanning Panjang Gelombang

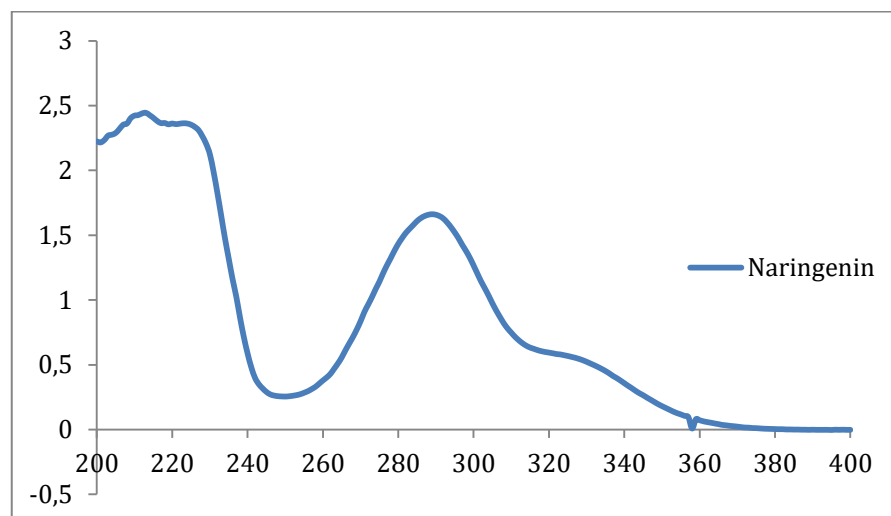
- Naringenin = $\frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 1000 \text{ ppm}$

Maka menimbang naringenin 10 mg dilarutkan dalam etanol kemudian sampai tanda batas meniskus aduk sampai homogen. Kemudian diencerkan menjadi 100 ppm, 50 ppm, dan 25 ppm lalu *discanning* panjang gelombang.

Berikut data hasil *scanning* Naringenin 25 ppm :

200	2,224	250	0,255	300	1,266	350	0,181
201	2,216	251	0,257	301	1,204	351	0,167
202	2,235	252	0,261	302	1,143	352	0,153
203	2,269	253	0,266	303	1,089	353	0,139
204	2,276	254	0,273	304	1,033	354	0,127
205	2,289	255	0,284	305	0,974	355	0,117
206	2,320	256	0,296	306	0,919	356	0,106
207	2,353	257	0,312	307	0,869	357	0,097
208	2,362	258	0,330	308	0,821	358	0,008
209	2,404	259	0,354	309	0,781	359	0,080
210	2,423	260	0,379	310	0,748	360	0,072
211	2,427	261	0,402	311	0,716	361	0,064
212	2,440	262	0,430	312	0,689	362	0,058
213	2,445	263	0,470	313	0,666	363	0,053
214	2,427	264	0,511	314	0,647	364	0,047
215	2,406	265	0,557	315	0,633	365	0,042
216	2,382	266	0,613	316	0,623	366	0,036
217	2,365	267	0,665	317	0,613	367	0,033
218	2,366	268	0,716	318	0,605	368	0,029
219	2,356	269	0,773	319	0,599	369	0,026
220	2,362	270	0,836	320	0,594	370	0,023
221	2,357	271	0,907	321	0,589	371	0,019
222	2,361	272	0,964	322	0,583	372	0,016

223	2,364	273	1,021	323	0,580	373	0,015
224	2,362	274	1,084	324	0,574	374	0,012
225	2,353	275	1,142	325	0,568	375	0,011
226	2,336	276	1,208	326	0,561	376	0,009
227	2,311	277	1,268	327	0,554	377	0,007
228	2,264	278	1,323	328	0,545	378	0,006
229	2,206	279	1,381	329	0,535	379	0,005
230	2,125	280	1,433	330	0,523	380	0,004
231	1,987	281	1,477	331	0,510	381	0,003
232	1,826	282	1,517	332	0,497	382	0,003
233	1,652	283	1,549	333	0,483	383	0,001
234	1,477	284	1,579	334	0,468	384	0,001
235	1,320	285	1,609	335	0,452	385	0,000
236	1,165	286	1,632	336	0,434	386	0,000
237	1,027	287	1,648	337	0,414	387	-0,001
238	0,865	288	1,658	338	0,397	388	-0,001
239	0,716	289	1,662	339	0,378	389	-0,002
240	0,589	290	1,658	340	0,358	390	-0,001
241	0,480	291	1,647	341	0,338	391	-0,002
242	0,398	292	1,628	342	0,319	392	-0,002
243	0,350	293	1,598	343	0,299	393	-0,002
244	0,318	294	1,562	344	0,281	394	-0,002
245	0,291	295	1,521	345	0,265	395	-0,003
246	0,272	296	1,476	346	0,247	396	-0,001
247	0,263	297	1,425	347	0,230	397	-0,002
248	0,258	298	1,378	348	0,213	398	-0,001
249	0,256	299	1,326	349	0,196	399	-0,002
						400	-0,002



- Asam Fumarat = $\frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 1000 \text{ ppm}$

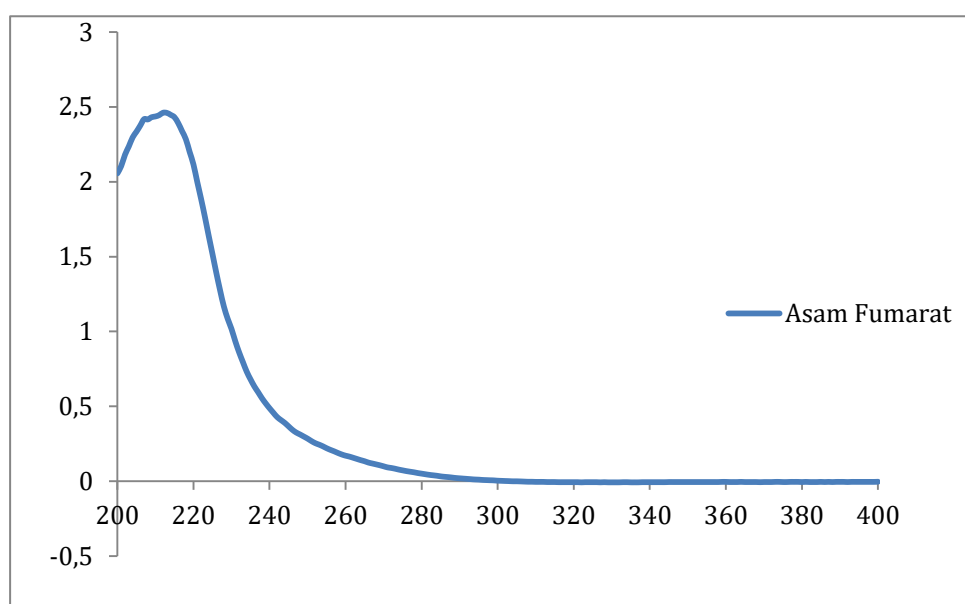
Maka menimbang naringenin 10 mg dilarutkan dalam etanol kemudian sampai tanda batas meniskus aduk sampai homogen. Kemudian diencerkan menjadi 100 ppm, 50 ppm, dan 25 ppm lalu *discanning* panjang gelombang.

Berikut data hasil scanning Asam Fumarat 25 ppm :

200	2,056	250	0,285	300	0,004	350	-0,005
201	2,105	251	0,269	301	0,003	351	-0,005
202	2,181	252	0,255	302	0,002	352	-0,005
203	2,236	253	0,245	303	0,001	353	-0,005
204	2,296	254	0,234	304	0,000	354	-0,005
205	2,334	255	0,221	305	0,000	355	-0,005
206	2,375	256	0,210	306	-0,001	356	-0,005
207	2,418	257	0,200	307	-0,002	357	-0,005
208	2,416	258	0,189	308	-0,003	358	-0,005
209	2,431	259	0,179	309	-0,003	359	-0,004
210	2,436	260	0,171	310	-0,004	360	-0,004
211	2,445	261	0,165	311	-0,004	361	-0,005
212	2,461	262	0,157	312	-0,004	362	-0,005
213	2,460	263	0,149	313	-0,005	363	-0,005

214	2,447	264	0,141	314	-0,005	364	-0,004
215	2,431	265	0,134	315	-0,005	365	-0,005
216	2,391	266	0,125	316	-0,006	366	-0,005
217	2,338	267	0,119	317	-0,006	367	-0,005
218	2,284	268	0,113	318	-0,006	368	-0,005
219	2,199	269	0,107	319	-0,006	369	-0,006
220	2,115	270	0,100	320	-0,006	370	-0,005
221	1,998	271	0,093	321	-0,006	371	-0,005
222	1,886	272	0,089	322	-0,007	372	-0,005
223	1,766	273	0,084	323	-0,006	373	-0,004
224	1,640	274	0,078	324	-0,006	374	-0,004
225	1,517	275	0,073	325	-0,006	375	-0,005
226	1,393	276	0,068	326	-0,006	376	-0,005
227	1,275	277	0,064	327	-0,007	377	-0,004
228	1,167	278	0,060	328	-0,006	378	-0,004
229	1,085	279	0,055	329	-0,007	379	-0,004
230	1,017	280	0,051	330	-0,007	380	-0,005
231	0,935	281	0,047	331	-0,007	381	-0,004
232	0,861	282	0,043	332	-0,007	382	-0,005
233	0,796	283	0,040	333	-0,006	383	-0,005
234	0,732	284	0,037	334	-0,006	384	-0,005
235	0,681	285	0,033	335	-0,007	385	-0,004
236	0,634	286	0,030	336	-0,007	386	-0,005
237	0,595	287	0,028	337	-0,007	387	-0,004
238	0,555	288	0,025	338	-0,006	388	-0,005
239	0,520	289	0,022	339	-0,006	389	-0,004
240	0,488	290	0,020	340	-0,006	390	-0,004
241	0,458	291	0,018	341	-0,006	391	-0,004
242	0,429	292	0,016	342	-0,006	392	-0,005
243	0,409	293	0,014	343	-0,006	393	-0,004

244	0,390	294	0,012	344	-0,006	394	-0,004
245	0,367	295	0,011	345	-0,005	395	-0,004
246	0,344	296	0,009	346	-0,005	396	-0,004
247	0,326	297	0,008	347	-0,005	397	-0,004
248	0,313	298	0,007	348	-0,005	398	-0,004
249	0,299	299	0,006	349	-0,005	399	-0,004
						400	-0,003



4.13. Hasil Pengukuran Serapan Kurva Baku

Secara teoritis naringenin ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam labu ukur 10 ml. Dengan demikian didapatkan konsentrasi larutan baku induk naringenin = $\frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ ppm} = 1000 \text{ ppm}$.

Kemudian diencerkan dengan aquadest menjadi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 12 ppm, dan 14 ppm.

Kemudian diencerkan dengan aquadest menjadi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 12 ppm, dan 14 ppm.

- 2 ppm $\rightarrow \frac{0,1 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times 1000 = 2 \text{ ppm}$, dipipet 100 μl larutan baku induk dimasukkan dalam labu ukur 50 ml lalu ditambahkan aquadest sampai tanda batas.

- b. $4 \text{ ppm} \rightarrow \frac{0,2 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times 1000 = 4 \text{ ppm}$, dipipet 200 μl larutan baku induk dimasukkan dalam labu ukur 50 ml lalu ditambahkan aquadest sampai tanda batas.
- c. $6 \text{ ppm} \rightarrow \frac{0,3 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times 1000 = 6 \text{ ppm}$, dipipet 300 μl larutan baku induk dimasukkan dalam labu ukur 50 ml lalu ditambahkan aquadest sampai tanda batas.
- d. $8 \text{ ppm} \rightarrow \frac{0,4 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times 1000 = 8 \text{ ppm}$, dipipet 400 μl larutan baku induk dimasukkan dalam labu ukur 50 ml lalu ditambahkan aquadest sampai tanda batas.
- e. $12 \text{ ppm} \rightarrow \frac{0,6 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times 1000 = 12 \text{ ppm}$, dipipet 600 μl larutan baku induk dimasukkan dalam labu ukur 50 ml lalu ditambahkan aquadest sampai tanda batas.
- f. $14 \text{ ppm} \rightarrow \frac{0,7 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times 1000 = 14 \text{ ppm}$, dipipet 700 μl larutan baku induk dimasukkan dalam labu ukur 50 ml lalu ditambahkan aquadest sampai tanda batas.

4.14. Perhitungan Berat Bahan Untuk Uji Kelarutan

- a. Kokristal naringenin 1:1

$$= \frac{400 \text{ mg}}{280,4418} \times 20 \text{ mg}$$

$$= 28,5264 \text{ mg kokristal setara dengan } 20 \text{ mg naringenin}$$

- b. Kokristal naringenin 1:3

$$= \frac{400 \text{ mg}}{175,518} \times 20 \text{ mg}$$

$$= 45,5793 \text{ mg kokristal setara dengan } 20 \text{ mg naringenin}$$

4.15. Hasil Uji Kelarutan

Untuk uji kelarutan masing-masing sampel ditimbang seberat 20 mg dan dilarutkan dalam aquadest.

Sampel	Absorbansi	Kadar	Rata-Rata	SD
Naringenin	0,140	3,037	3,077	0,035
	0,144	3,091		
	0,145	3,105		
Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:1	0,859	12,899	13	0,198
	0,857	12,872		
	0,883	13,229		
Kokristal Naringenin-Asam Fumarat 1:3	0,682	10,471	10,503	0,044
	0,683	10,485		
	0,688	10,554		

• **Peningkatan Kelarutan Kokristal Naringenin-Asam Fumarat (1:1)**

$$= 13:3,077 = 4,22 \text{ kali}$$

• **Peningkatan Kelarutan Kokristal Naringenin-Asam Fumarat (1:3)**

$$= 10,503:3,077 = 3,41 \text{ kali}$$

4.15.1. Contoh Perhitungan Uji Kelarutan

a. Perhitungan uji kelarutan pada sampel kokristal Naringenin-Asam

Fumarat rasio 1:1 replikasi 1

Berat sampel : 20 mg

Serapan : 0,859

b. Perhitungan konsentrasi (ppm) dalam aquadest pada panjang

gelombang 289 nm dengan persamaan regresi $\rightarrow y = 0,0729x -$

0,0814; $r = 0,9967$. Maka,

Kokristal Naringenin-Asam Fumarat rasio 1:1 replikasi 1

$$y = 0,0729x - 0,0814$$

$$0,859 = 0,0729x - 0,0814$$

$$x = 12,899$$

4.16. Hasil Uji Statistika Data Kelarutan

Tests of Normality

	Sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kelarutan	NRN	.311	3	.	.897	3	.375
	NRN-AF 1:1	.361	3	.	.806	3	.130
	NRN-AF 1:3	.327	3	.	.872	3	.302

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Kelarutan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.979	2	6	.016

ANOVA

Kelarutan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	159.827	2	79.913	5604.454	.000
Within Groups	.086	6	.014		
Total	159.912	8			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kelarutan

	(I) Sampel	(J) Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	NRN	NRN-AF 1:1	-9.922333*	.097498	.000	-10.16090	-9.68376
		NRN-AF 1:3	-7.425667*	.097498	.000	-7.66424	-7.18710
	NRN-AF 1:1	NRN	9.922333*	.097498	.000	9.68376	10.16090
		NRN-AF 1:3	2.496667*	.097498	.000	2.25810	2.73524
	NRN-AF 1:3	NRN	7.425667*	.097498	.000	7.18710	7.66424
		NRN-AF 1:1	-2.496667*	.097498	.000	-2.73524	-2.25810
Bonferroni	NRN	NRN-AF 1:1	-9.922333*	.097498	.000	-10.24285	-9.60181
		NRN-AF 1:3	-7.425667*	.097498	.000	-7.74619	-7.10515
	NRN-AF 1:1	NRN	9.922333*	.097498	.000	9.60181	10.24285
		NRN-AF 1:3	2.496667*	.097498	.000	2.17615	2.81719
	NRN-AF 1:3	NRN	7.425667*	.097498	.000	7.10515	7.74619
		NRN-AF 1:1	-2.496667*	.097498	.000	-2.81719	-2.17615

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

