

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini bila tidak dinyatakan lain, memiliki kemurnian *pharmaceutical grade*, antara lain asam p-metoksisinamat, setil alkohol, asam oleat, tween 80, propilenglikol, etanol pro analisis, dan aquadest. Dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$ dibuat dari $C_2H_4O_2$ (asam asetat glasial) dan $C_2H_3NaO_2$ (Natrium asetat anhidrat) pro analisis. Dapar fosfat pH $7,4 \pm 0,05$ dibuat dari Na_2HPO_4 (Narium fosfat dibasa) dan NaH_2PO_4 (natrium fosfat monobasa) pro analisis.

4.2 Alat Penelitian

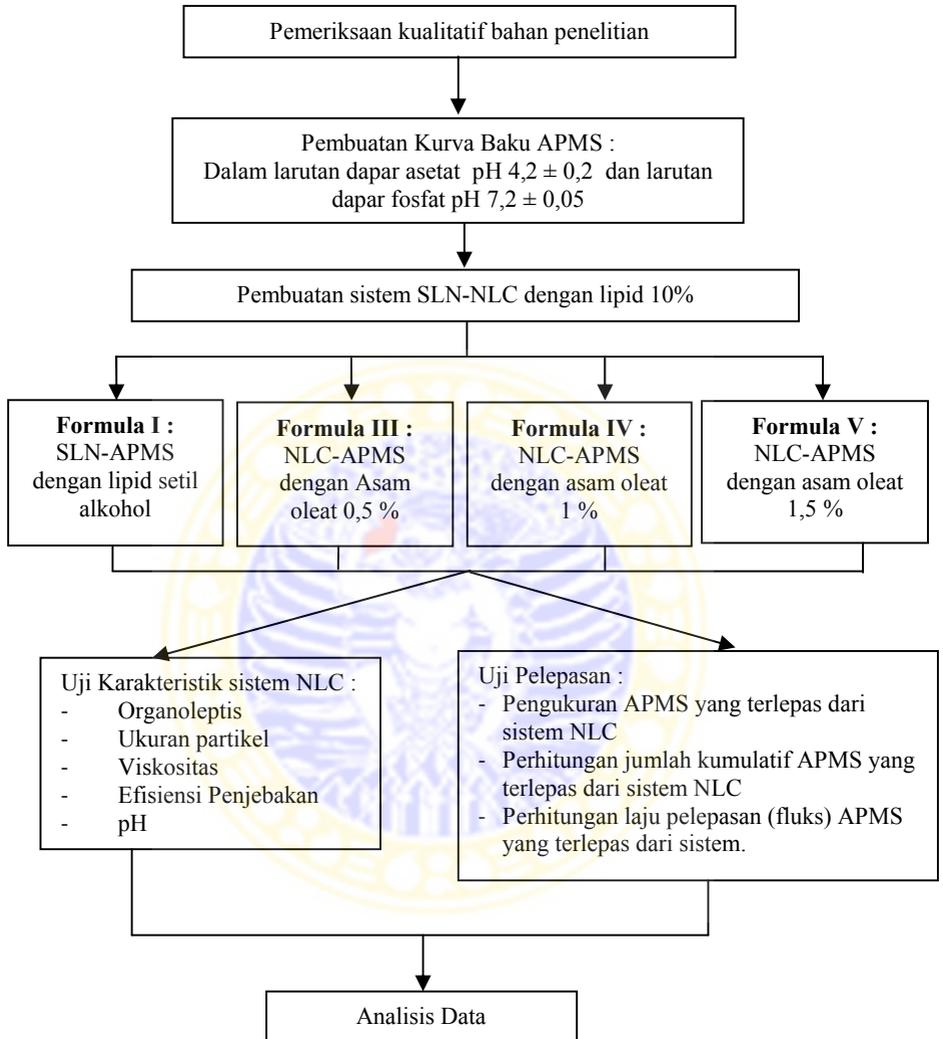
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *Ultra-Turax High Shear Homogenizer*, *One Fourier Transform Infrared (FTIR)*, *Spektrometer Perkin Elmer Instrument*, *Differential Thermal Analysis (DTA)*, *Delsa™ Nano Submicron Particle Size and Zeta Potential Dynamic Light Scattering*, pH meter, *Double Beam UV Spectrophotometer Shimadzu UV-1800*, rangkaian alat uji disolusi (pengaduk bentuk *paddle*) Erweka Tipe DT 820, sel difusi dengan membran selofan, *magnetik stirrer*, *hot plate* Dragon Lab MS H-Pro, neraca analitik, penangas air, dan alat-alat gelas.

4.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan tujuan menentukan pengaruh kadar asam oleat (0%; 0,5%; 1%; 1,5%) pada pelepasan APMS dari sistem NLC.

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan analisis kualitatif bahan penelitian, yaitu APMS, setil alkohol, dan asam oleat. Kemudian dilakukan pembuatan kurva baku APMS dalam larutan dapar asetat $4,2 \pm 0,2$ dan dalam larutan dapar fosfat $7,4 \pm 0,05$. Tahap selanjutnya adalah pembuatan sistem NLC, yang kemudian diuji karakteristiknya dan uji pelepasan APMS dari sistem NLC. Penentuan uji pelepasan dilakukan dengan mengamati nilai serapan APMS pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometri UV-Vis, sehingga diperoleh nilai serapan yang kemudian digunakan untuk mengetahui profil dan laju pelepasan (fluks) APMS dari sistem NLC. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Tahap akhir merupakan analisis data menggunakan *one way ANNOVA*.

Skema kerja dapat dilihat pada gambar 4.1



Gambar 4. 1 Skema Kerja Penelitian

4.3.1 Analisis kualitatif bahan penelitian

Pemeriksaan kualitatif bahan penelitian meliputi APMS, setil alkohol, dan asam oleat. Pemeriksaan dilakukan berdasarkan sertifikat analisis srta pemeriksaan berikut:

1. Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis dilakukan secara visual meliputi pemeriksaan bentuk, warna, dan bau. Hasil yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan sertifikat analisis.

2. Spektra serapan inframerah

Pemeriksaan ini dilakukan dengan menggunakan teknik pellet KBr pada panjang gelombang (λ) 400-4000 cm^{-1} . Sebanyak 1 mg zat digerus dengan 100 mg serbuk KBr kering kemudian ditekan/dikompressi dengan penekan hidrolis yang dilengkapi dengan alat penarik uap air agar diperoleh lempeng tipis yang ditembus cahaya. Lempeng dipindai pada panjang gelombang 400-4000 cm^{-1} . Spektra inframerah yang diperoleh dari sampel dibandingkan dengan spektra inframerah dari pustaka (Depkes RI, 1995).

3. Pemeriksaan suhu lebur

Penentuan suhu lebur dilakukan dengan alat Differential Thermal Analysis (DTA). Bahan ditimbang 3-5 mg dan dimasukkan ke dalam *sample pan*, kemudian ditutup. *Sample pan* kemudian dimasukkan dalam *sample holder*. Sebagai *sample pan* digunakan *Aluminium crucible* dengan suhu maksimal 350°C. Program pemanasan dijalankan dengan laju 5°C/menit, waktu kesetimbangan setelah suhu awal melebur tercapai. Hasil pengujian suhu lebur yang diperoleh dibandingkan dengan pustaka (Depkes RI, 1995: O'Neil 2001).

4.3.2 Pembuatan kurva baku APMS dalam larutan dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$

a. Pembuatan larutan dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$

Untuk penentuan efisiensi pengebakan digunakan larutan dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$ yang dibuat dengan menambahkan 368 mL asam asetat 0,2 M (diperoleh dengan mengencerkan 11,5 mL asam asetat glasial dalam 1 L aqua bebas CO₂) ke dalam 132 mL Na asetat 0,2 M (diperoleh dengan melarutkan 16,4 gram Na asetat anhidrat dalam 1 L aqua bebas CO₂) kemudian ditambahkan 5,8 gram NaCl dan selanjutnya ditambahkan aquadest hingga volum 1 L.

b. Pembuatan larutan baku induk APMS 100 ppm

Ditimbang dengan seksama 10,0 mg APMS, dilarutkan dalam 10,0 mL etanol kemudian ditambahkan larutan dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$ sampai volume 100,0 mL pada labu ukur dan dikocok sampai homogen.

c. Pembuatan larutan baku kerja APMS

Dibuat larutan baku kerja PAMS melalui pengenceran larutan baku induk APMS dengan larutan dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$ sehingga diperoleh larutan baku kerja dengan konsentrasi 0,15; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 dan 12,0 ppm. Larutan ini kemudian digunakan untuk menentukan panjang gelombang maksimal APMS dan membuat kurva baku. Digunakan larutan blanko dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$.

Tabel IV. 1 Larutan Baku Kerja APMS dalam dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$

Kadar APMS dalam Larutan ($\mu\text{g/mL}$)	Volume Larutan Baku Induk yang Dipipet (mL)	Volume akhir Pengenceran dengan Dapar Asetat pH $4,2 \pm 0,2$
1,0	0,5	50,0
2,0	0,5	25,0
4,0	1,0	25,0
5,0	0,5	10,0
8,0	2,0	25,0
12,0	3,0	10,0

d. Penentuan panjang gelombang maksimal

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan menggunakan larutan baku kerja APMS konsentrasi 2,0 dan 12,0 $\mu\text{g/mL}$. nilai absorpsi tiap-tiap konsentrasi diamati dengan spektrofotometri UV-VIS pada rentang panjang gelombang 200-400 nm. Sebagai blanko digunakan dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang dengan serapan maksimum.

e. Penentuan persamaan kurva baku

Kurva baku dibuat dengan melakukan pengukuran larutan baku kerja pada panjang gelombang maksimum terhadap blanko yang berisi media solusi. Dari hasil pengamatan dibuat kurva serapan vs kadar, kemudian dibuat persamaan regresi $y = bx + a$ (kadar sebagai aksis dan serapan sebagai ordinat). Linieritas ditunjukkan dengan harga r , dikatakan linier bila harga r yang diperoleh lebih besar dari nilai r tabel.

4.3.3 Pembuatan kurva baku APMS dalam larutan dapar fosfat

a. Pembuatan larutan dapar fosfat pH $7,4 \pm 0,05$

Sebagai media difusi digunakan larutan dapar fosfat pH $7,4 \pm 0,05$ yang dibuat dengan menambahkan 50,0 mL NaH_2PO_4 0,2 M

(diperoleh dengan melarutkan 27,589 gram NaH_2PO_4 dalam 1 L aqua bebas CO_2) ke dalam 450,0 mL NaH_2PO_4 0,1 M (diperoleh dengan melarutkan 14,196 NaH_2PO_4 dalam 1 L aqua bebas CO_2) dan ditambahkan aquadest hingga volume 1 L.

b. Pembuatan larutan baku induk APMS 100 ppm

Ditimbang dengan seksama 10,0 mg APMS, dilarutkan dalam 10,0 mL etanol kemudian ditambahkan larutan dapar fosfat pH $7,2 \pm 0,05$ sampai volume 100,0 mL pada labu ukur dan dikocok sampai homogen.

c. Pembuatan larutan baku kerja APMS

Dibuat larutan baku kerja APMS melalui pengenceran larutan baku induk APMS dengan larutan dapar fosfat pH $7,2 \pm 0,05$ sehingga diperoleh larutan baku kerja dengan konsentrasi 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10; 12,0; 15,0; 20,0 dan 30,0 $\mu\text{g/mL}$. Larutan ini kemudian digunakan untuk menentukan panjang gelombang maksimal APMS dan membuat kurva baku. Digunakan larutan blanko dapar fosfat pH $7,2 \pm 0,05$.

Tabel IV. 2 Larutan Baku Kerja APMS dalam Dapar Fosfat pH $7,2 \pm 0,05$

Kadar APMS dalam Larutan ($\mu\text{g/mL}$)	Volume Larutan Baku Induk yang Dipipet (mL)	Volume akhir Pengenceran dengan Dapar Asetat pH $4,2 \pm 0,2$
0,5	0,5	100,0
1,0	0,5	50,0
2,0	0,5	25,0
4,0	1,0	25,0
6,0	3,0	50,0
8,0	2,0	25,0
10,0	1,0	10,0
12,0	3,0	25,0
15,0	15,0	100,0
20,0	2,0	10,0

d. Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan menggunakan larutan baku kerja APMS konsentrasi 2,0 dan 12,0 µg/mL. nilai absorpsi tiap-tiap konsentrasi diamati dengan spektrofotometri UV-VIS pada rentang panjang gelombang 200-400 nm. Sebagai blanko digunakan dapar fosfat pH $7,2 \pm 0,05$. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang dengan serapan maksimum.

e. Penentuan persamaan kurva baku

Kurva baku dibuat dengan melakukan pengukuran larutan baku kerja pada panjang gelombang maksimum terhadap blanko yang berisi media solusi. Dari hasil pengamatan dibuat kurva serapan vs kadar, kemudian dibuat persamaan regresi $y = bx + a$ (kadar sebagai aksis dan serapan sebagai ordinat). Linieritas ditunjukkan dengan harga r , dikatakan linier bila harga r yang diperoleh lebih besar dari nilai r tabel.

4.3.4 Pembuatan NLC

a. Formulasi sistem NLC

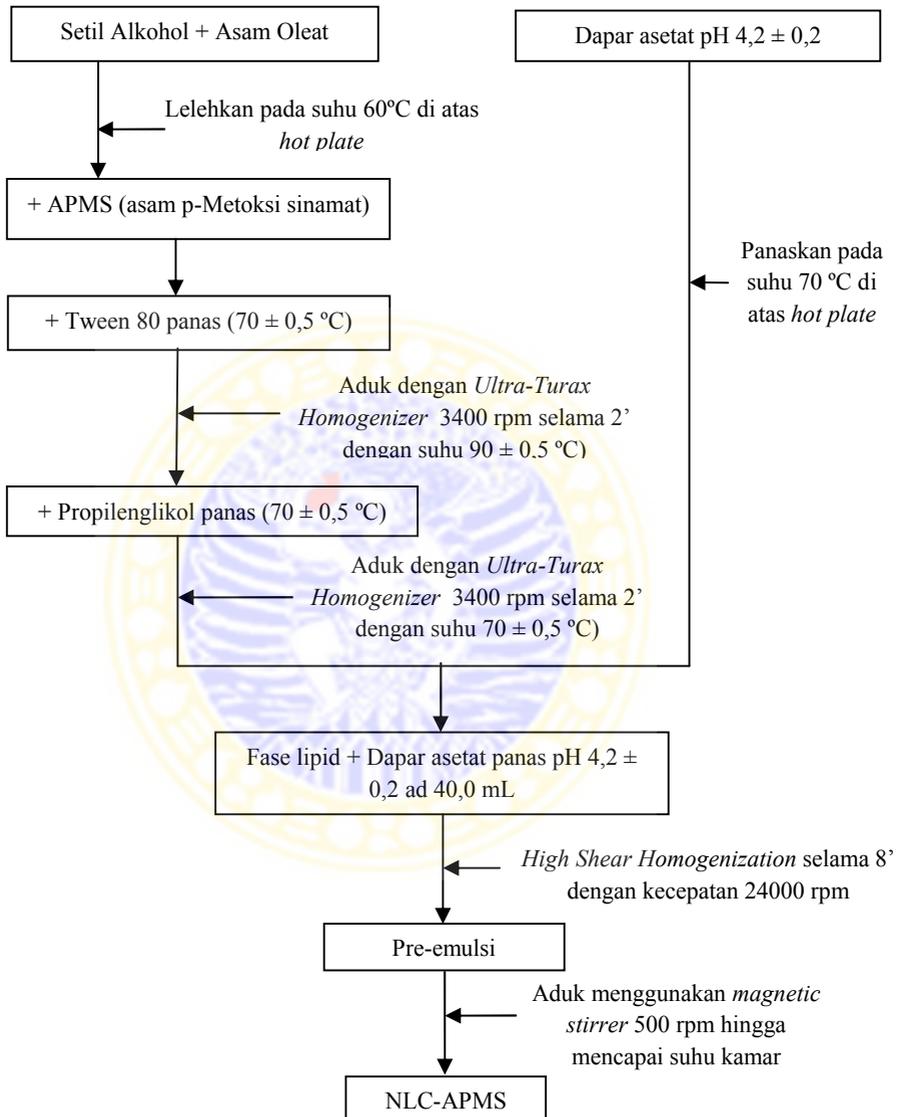
Tabel IV. 3 Formulasi Sistem NLC

Bahan	Fungsi	Konsentrasi Formula			
		I	II	III	IV
APMS	Bahan aktif	8,7 %*	8,7 %	8,7 %	8,7 %
Setil alkohol	Lipid padat	10 %	9,5 %	9 %	8,5 %
Asam oleat	Lipid cair	-	0,5 %	1 %	1,5 %
Tween 80	Surfaktan	12 %	12 %	12 %	12 %
propilenglikol	Ko-surfaktan	20 %	20 %	20 %	20 %
Dapar asetat	Fase air	Ad 40 mL	Ad 40 mL	Ad 40 mL	Ad 40 mL

Keterangan : *% b/v

b. Cara pembuatan NLC

NLC-APMS dibuat dengan melebur lipid pada suhu 60°C menggunakan hot plate dalam gelas beker, kemudian ditambahkan APMS sambil diaduk perlahan dengan menggoyang-goyangkan beker hingga APMS larut. Lalu ditambahkan tween 80 panas, kemudian diaduk dengan Ultra-Turax *High Shear Homogenizer* dengan kecepatan 3200 rpm selama 2 menit pada suhu $60 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Setelah ditambahkan propilenglikol panas dan diaduk lagi dengan kecepatan dan waktu yang sama, lalu ditambahkan dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$ panas hingga volum 20,0 mL. setelah itu dilakukan *High Shear Homogenization* selama 8 menit dengan kecepatan 24000 rpm. Tahap selanjutnya adalah tahap pendinginan yang dilakukan dengan cara memindahkan emulsi tersebut dari *High Shear Homogenizer* ke atas *hot plate*, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 500 rpm hingga mencapai suhu kamar. Tahap akhir adalah penimbangan NLC yang diperoleh untuk mengetahui berat akhir NLC. Skema pembuatan sistem SLN maupun NLC dapat dilihat pada gambar 4.2.



Gambar 4. 2 Skema Pembuatan NLC dengan Metode High Shear Homogenization

4.3.5 Uji homogenitas dan perolehan kembali APMS dalam sistem SLN dan NLC

Uji homogenitas dan perolehan kembali dilakukan dengan menimbang 50,0 mg sediaan SLN atau NLC APMS pada gelas beker, kemudian ditambahkan 1 mL etanol dan ± 5 mL dapar asetat. Campuran tersebut kemudian disonikasi selama 30 menit untuk merusak sistem SLN dan NLC sehingga baik APMS yang terjebak dalam matrik maupun yang berada pada fase air dapat terlarut. Setelah disonikasi, ditambahkan dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$ ad tepat tanda dalam labu ukur 25,0 mL. Larutan disaring menggunakan kertas saring, kemudian dipipet 5,0 mL dan diencerkan kembali ad 25,0 mL dalam labu ukur 25,0 mL. Hasil pengenceran disaring menggunakan milipore. Larutan yang telah disaring kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 200-400 nm. Serapan yang diperoleh dikonversikan menjadi kadar dengan memasukkan ke dalam persamaan garis regresi yang telah diperoleh dalam larutan dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$. Dilakukan tiga kali repliasi untuk setiap sediaan kemudian dihitung nilai simpangan baku dan % KV nya.

4.3.6 Uji karakteristik NLC

1. Pemeriksaan organoleptis NLC

Pemeriksaan organoleptis dilakukan secara visual meliputi pemeriksaan warna, bau, dan konsistensi SLN.

2. Pemeriksaan ukuran NLC

Pemeriksaan ukuran partikel rata-rata dan distribusi ukuran partikel NLC dilakukan dengan menggunakan DelsaTM Nano. Sistem NLC yang diencerkan menggunakan aqua bebas CO₂ kemudian dimasukkan dalam kuvet dan

dilakukan pengamatan pada sudut 165° dan suhu 25°C . Data yang dihasilkan merupakan ukuran partikel yang dihitung dari fluktuasi rata-rata intensitas hamburan cahaya.

3. Penentuan pH

Penentuan pH dilakukan menggunakan alat pH meter dengan cara sebagai berikut : pH meter dikalibrasi menggunakan larutan dapar standar pH 4,0 lalu elektroda dibersihkan dan dikeringkan. Ditimbang 1 gram NLC lalu diencerkan dengan 9 mL aqua bebas CO_2 , diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Kemudian elektroda dimasukkan ke dalam NLC yang telah diencerkan, terakhir amati dan catat angka yang ditunjukkan oleh pH meter.

4. Penentuan viskositas

Penentuan viskositas dilakukan untuk melihat kekentalan NLC yang dihasilkan akibat pengaruh penambahan bahan lain seperti surfaktan dan akibat pengaruh metode pembuatan. Pengukuran viskositas dilakukan menggunakan alat *viscometer Brookfield Cone and Plate* dengan kecepatan putar 20 rpm. sejumlah sampel dimasukkan ke dalam gelas kemudian dicelupi rotor yang sesuai. Alat dijalankan dan amati angka yang tertera pada skala.

5. Uji efisiensi penjemakan

Uji efisiensi penjemakan dilakukan dengan menimbang 100 mg dispersi NLC yang diencerkan dengan 10,0 mL dapar asetat pH $4,2 \pm 0,2$ dan ditempatkan pada tabung kaca, kemudian disentrifugasi selama 45 menit dengan kecepatan

1000 rpm. Supernatant diambil dan dianalisis dengan spektrofotometer untuk mengetahui APMS yang tidak terjebak. Selanjutnya kadar APMS yang tidak terjebak dalam sistem NLC (C_f) dihitung dengan persamaan kurva baku. Jumlah bahan aktif yang terjebak dalam NLC ($DE = Drug\ Entrapment$) dihitung dengan rumus :

$$DE (\%) = \left(\frac{C_t - C_f}{C_t} \right) \times 100\%$$

C_t adalah konsentrasi awal APMS yang digunakan dalam membuat suspensi. Selanjutnya dihitung rata-rata dan harga simpangan baku efisiensi penjebakan APMS dalam sistem NLC.

4.3.7 Uji pelepasan APMS dari sistem NLC

a. Pembuatan media disolusi

Media disolusi yang digunakan adalah dapar fosfat pH $7,4 \pm 0,05$. Cara pembuatan dapar fosfat adalah dengan menambahkan 50,0 mL NaH_2PO_4 0,2 M (diperoleh dengan melarutkan 27,589 gram NaH_2PO_4 dalam 1 L aqua bebas CO_2) ke dalam 450,0 mL NaH_2PO_4 0,1 M (diperoleh dengan melarutkan 14,196 NaH_2PO_4 dalam 1 L aqua bebas CO_2) dan ditambahkan aquadest hingga volume 1 L.

b. Penyiapan membran difusi

Membran difusi yang digunakan dalam uji pelepasan APMS dari sistem NLC ini adalah membran selofan. Cara preparasinya adalah dengan menggunting membran sesuai ukuran disk kemudian direndam

dengan aquadest satu malam (± 12 jam). Sesaat sebelum digunakan, membran ditiriskan sampai tidak ada air yang menempel.

c. Perangkat alat uji pelepasan

Alat dan perlengkapan yang digunakan dalam laju pelepasan APMS dari sistem NLC adalah rangkaian alat uji disolusi *Hanson-Research* SR-6 yang dilengkapi dengan sel difusi serta pengaduk berbentuk *paddle*.

Sel difusi terbuat dari bahan *stainless steel* berbentuk silinder pipih. Tempat penampung sampel mempunyai garis tengah 2,9 cm dengan tebal 0,4 cm. sebagai pengaman untuk mencegah kebocoran, sel difusi dilengkapi dengan karet penyekat berbentuk ring sebagai penghubung antara tempat sampel dengan penghubungnya.

d. Penyiapan sel difusi

Gelas arloji dan sudip ditimbang dalam kondisi kosong kemudian NLC-APMS ditimbang ± 2 gram. Selanjutnya sel difusi diisi dengan NLC-APMS dan permukaannya diratakan dengan sudip. Menimbang kembali gelas arloji dan sudip beserta sisa NLC-APMS, kemudian dihitung jumlah NLC-APMS yang masuk pada sel difusi. Diatasnya dipasang ring penyekat dari karet untuk mencegah kebocoran, lalu diklem dengan lempengan sel yang lain dengan rapat.

e. Pengukuran APMS yang terlepas dari sistem SLN dan NLC

Sel difusi yang telah berisi NLC-APMS dimasukkan dalam tabung uji disolusi yang berisi larutan dapar fosfat pH $7,4 \pm 0,05$ sebanyak 500 mL. suhu percobaan diatur pada $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, *paddle* diputar dengan kecepatan 100 rpm. Larutan sampel diambil sebanyak 5,0 mL menggunakan spuit injeksi pada waktu 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600 dan 660 menit. Setiap

pengambilan sampel diganti dengan larutan dapar fosfat pH $7,4 \pm 0,05$ dengan jumlah dan suhu yang sama. Cuplikan diamati serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimum APMS sesuai penentuan panjang gelombang maksimum APMS dalam dapar fosfat. Konsentrasi APMS dalam cuplikan dihitung dengan menggunakan persamaan regresi kurva baku APMS dalam dapar fosfat pH $7,4 \pm 0,05$. Untuk memperhitungkan pengenceran 5,0 mL media pelepasan, kadar terukur dikoreksi dengan persamaan Wurster :

$$C_n = C'n + \frac{V_s}{V_m} \sum (C_s)$$

Keterangan :

- C_n : Kadar sebenarnya setelah dikoreksi
- C'n : Kadar terbaca (hasil perhitungan dari nilai serapan sample yang terbaca pada spektrofotometer dalam ppm)
- C_s : kadar terbaca dari sampel sebelumnya
- V_s : Volume sampel
- V_m : Volume media

f. Penentuan jumlah kumulatif APMS yang terlepas dari sistem SLN dan NLC

Penentuan jumlah kumulatif APMS yang terlepas dari sistem NLC per satuan luas membran ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) tiap waktu diperoleh dari konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{mL}$) yang diperoleh setiap waktu ditambah koreksi Wurster kemudian dikalikan dengan jumlah media (500 mL) dan selanjutnya dibagi luas permukaan membran.

g. Penentuan profil pelepasan APMS dari sistem SLN dan NLC

Dibuat kurva hubungan antara jumlah kumulatif APMS yang terlepas per satuan luas membran ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) terhadap akar waktu ($\text{menit}^{1/2}$) dari setiap sistem NLC.

h. Penentuan kecepatan pelepasan (fluks) APMS dari sistem SLN dan NLC

Dari gambar profil pelepasan APMS yang dihasilkan, ditentukan keadaan steady state terlebih dahulu, selanjutnya dibuat persamaan regresi pada daerah steady state tersebut. Berdasarkan hukum difusi Higuchi, *slope* dari persamaan regresi tersebut merupakan kecepatan pelepasan (fluks) APMS dari sistem NLC. Kondisi *steady state* adalah kondisi dimana membran berada dalam keadaan jenuh atau proses difusi sudah berjalan konstan.

4.4 Analisis Data

4.4.1 Perhitungan parameter pelapasan APMS dari sistem NLC

a. Penentuan Jumlah Kumulatif APMS yang Terlepas dari Sistem NLC

Penentuan jumlah kumulatif APMS yang terlepas per satuan luas membran tiap waktu ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), dihitung dari konsentrasi yang diperoleh setiap waktu ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ditambah faktor koreksi Wurster kemudian dikalikan dengan jumlah media (500 mL) dan selanjutnya dibagi luas permukaan membran. Langkah berikutnya dibuat kurva hubungan antara jumlah kumulatif APMS yang terlepas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) terhadap akar waktu (menit^{1/2}).

b. Penentuan profil pelepasan APMS dari sistem NLC

Profil pelepasan APMS pada suhu $32^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ merupakan rerata hubungan antara jumlah APMS yang terlepas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) vs akar waktu (menit^{1/2}). Data diperoleh dari replikasi tiga kali pengamatan.

c. Penentuan kecepatan pelepasan (fluks) APMS dari sistem NLC

Dari kurva yang dihasilkan antara jumlah kumulatif APMS yang terlepas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) vs akar waktu ($\text{menit}^{1/2}$) jika mengikuti persamaan linier maka fluks ditentukan dengan menghitung slope dari persamaan garis linier. Namun, jika kurva yang dihasilkan mengikuti persamaan non linier, maka fluks ditentukan dengan menghitung area dibawah kurva pelepasan APMS. Area dibawah kurva dihitung menggunakan rumus trapesium.

4.4.2 Analisis statistika

Harga laju pelepasan (Fluks) APMS dianalisis dengan statistika menggunakan metode analisis varian (ANOVA) satu arah untuk mengetahui apakah ada perbedaan fluks yang bermakna antara sistem SLN dan NLC. Dari hasil analisis tersebut diperoleh nilai harga F hitung yang kemudian dibandingkan dengan F table dan dilakukan uji HSD (*Honestly Significant Difference*).