

Optimization of low energy nanoemulsion of Grape seed oil formulation using D-Optimal Mixture Design (DMD)

Optimasi Formulasi Nanoemulsi Minyak Biji Anggur Energi Rendah dengan D-Optimal Mixture Design (DMD)

Fatimah Siyam Handayani¹, Bambang H. Nugroho^{1,2}, Siti Zahliyatul Munawiroh^{1,2*}

¹Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Islam Indonesia, Jl. Kaliurang Km 14,5, Sleman DIY

²Nanopharmacy Research Center, Laboratorium Teknologi Farmasi, Jurusan Farmasi, FMIPA UII

*Corresponding author. Email: sitizahliyatul@uui.ac.id

Abstract

Low energy nanoemulsion preparation is an effective method in nanosized droplets formation. The composition and ratio of each phase played key role in formulation of low energy nanoemulsion. This present work is aimed to optimize, formulate and evaluate low-energy nanoemulsions using D-Optimal Mixture Design (DMD). The independent variables were grape seed oil as oil phase (X_1) and Tween 80:PEG (X_2) as surfactant-cosurfactant (S-mix) and water as aqueous phase (X_3). The response (dependent) variables were particles size (Y_1), polydispersity index (PDI) (Y_2) and zeta potential (Y_3). The low energy nanoemulsions were prepared using Phase Inversion Composition (PIC). The obtained data experiments were analyzed by ANOVA analyses showed a significant model for particle size response following the quadratic model. Three optimum formulas were obtained and verification between prediction and observation of the responses bias (%) was less than 10%. The low-energy nanoemulsion of grape seed oil can be optimized using D-Optimal Mixture Design (DMD) and prepared using Phase Inversion Composition (PIC) technique.

Keywords: low energy nanoemulsion, Phase Inverse Composition (PIC), D-Optimal Mixture Design (DMD)

Intisari

Pembuatan nanoemulsi dengan energi rendah adalah metode yang efektif dalam pembentukan tetapan emulsi yang berukuran nano. Komposisi dan rasio setiap fase memainkan peran penting dalam pembentukan nanoemulsi dengan energi rendah. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan, merumuskan dan mengevaluasi nanoemulsi energi rendah menggunakan D-Optimal Mixture Design (DMD). Variabel bebas yang digunakan adalah minyak biji anggur sebagai fasa minyak (X_1) dan Tween 80: PEG (X_2) sebagai surfaktan-cosurfaktan (campuran S) dan air sebagai fasa air (X_3). Variabel respon (dependen) adalah ukuran partikel (Y_1), indeks polidispersitas (PDI) (Y_2) dan potensial zeta (Y_3). Nanoemulsi berenergi rendah disiapkan menggunakan teknik *Phase Inversion Composition* (PIC). Eksperimen data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ANOVA menunjukkan model yang signifikan untuk respon ukuran partikel mengikuti model kuadrat. Tiga formula optimal diperoleh dan dilakukan verifikasi antara prediksi dan pengamatan pada 3 respon (Y_1 , Y_2 dan Y_3) menunjukkan nilai bias (%) kurang dari 10%. Nanoemulsi energi rendah dari minyak biji anggur dapat dioptimalkan menggunakan *D-Optimal Design* (DMD) dan disiapkan menggunakan teknik *Phase Inversion Composition* (PIC).

1. Pendahuluan

Emulsi dengan ukuran droplet yang berada pada skala nanometrik (20-200 nm) disebut dalam literatur sebagai mini emulsi, nanoemulsi, ultrafine emulsi, submikron emulsi dan lain sebagainya (Solans, dkk, 2005) dapat menjadi alternatif penyelesaian masalah pada ketersediaan hayati dari obat-obatan yang berada pada *BCS (Biopharmaceutical Classification System) Class II* yakni obat-obat yang mempunyai permeabilitas tinggi namun kelarutan yang

rendah (Pouton, 2006). Nanoemulsi ini juga tidak stabil secara termodinamika dan secara umum terdiri dari bagian minyak, surfaktan dan air (Mason, dkk, 2006; Sonnneville-Aubrun, dkk., 2004; Tadros, dkk, 2004). Namun untuk dapat memperkecil ukuran droplet hingga berskala nano, biasanya ditambahkan ko-surfaktan (Kozlom & Helfrich, 1992).

Dilihat dari jumlah energi yang terlibat, pembuatan nanoemulsi bisa dilakukan dengan menggunakan energi rendah atau menggunakan energi tinggi. Pembuatan nanoemulsi dengan energi rendah bisa menggunakan metode pembalikan fase (Phase Inversion Composition (PIC)), temperature pembalikan fase (Phase Inversion Temperature (PIT)) dan juga emulsifikasi spontan (Anton, dkk, 2008; Anton & Vandamme, 2009; McClements & Rao, 2011). Pada metode energi rendah, pembentukan nanoemulsi ini sangat tergantung dari kondisi lingkungan (komposisi, temperature dan pengadukan) yang kemudian bisa membentuk kondisi metastabil (Rao & McClements, 2010; Sadurní, dkk, 2005). Ada beberapa kelebihan dari metode energi rendah ini di antaranya lebih efektif dalam membentuk droplet dengan ukuran yang sangat kecil, tidak membutuhkan peralatan yang spesifik dan hemat energi, serta sederhana untuk dilakukan. Dalam pembuatan nanoemulsi, faktor yang berpengaruh adalah komposisi campuran minyak, surfaktan-kosurfaktan dan air. Sehingga untuk menghasilkan sediaan yang optimal, studi optimasi dilakukan untuk mendapatkan rasio minyak, surfaktan-kosurfaktan yang tepat.

Pada penelitian ini akan dilakukan optimasi pembuatan nanoemulsi dari minyak biji anggur dengan surfaktan tween 80 dan kosurfaktan Polietilen Glikol 400 (PEG 400) dengan energi rendah (PI) dengan D-optimal Mixture Design (DMD) untuk optimasi formula.

2. Metodologi Penelitian

2.1. Alat dan Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak biji anggur (*pharmaceutical/ food grade* Henan Kunhua Biological Technology Co., Ltd., Cina), tween 80 (kualitas farmasetis Brataco, Indonesia), polietilen glikol 400 (PEG 400) (kualitas farmasetis Brataco, Indonesia, dan aquades (kualitas pro analisa Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Islam Indonesia).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *blue tip*, *yellow tip*, botol kaca 2,5 mL, peralatan gelas (Pyrex dan Iwaki), mikropipet (Terumo Scientific dan Finnippipe), pH-meter (Molab WTW series), *safe-lock mikrofuge tube* 2 mL (Eppendorf), ultrasonik homogenizer model 300 VT (BioLogics, Inc., Manassas, VA), viskometer *Brookfield* DV-2T (Brookfield Enggining Laboratories, USA), vortex, dan *Particle Size Analyzer* (HORIBA SZ 100).

2.2. Cara penelitian

2.2.1. Metode Energi Rendah (PIC)

2.2.1.1. Pembuatan Diagram Fase Terner

Diagram fase semu terner yang terdiri dari minyak (minyak biji anggur), smix (campuran surfaktan (Tween 80) dan ko-surfaktan (propilen glikol)) dan aquadestilata (air). Tween 80 dan propilen glikol dicampur (Smix) dan diobservasi dalam rasio volume yang berbeda (1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1, 4:1, dst). Minyak dan rasio Smix tertentu sebanyak 1 mL dicampur dengan bantuan vortex dalam rasio volume mulai dari 1:9 sampai 1:1 untuk mendapatkan 9 kombinasi yang berbeda seperti 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1. Aquadestilata digunakan sebagai fase air. Fase air ditambahkan perlahan-lahan. Penambahan air yang bervariasi dilakukan untuk menghasilkan konsentrasi air yang berkisar 5% - 95% dari volume total dengan interval penambahan air sebanyak 5% (Shafiq-un-Nabi, dkk, 2007). Pada setiap penambahan air dihomogenkan dengan bantuan vortex. Setiap penambahan fase air, keadaan fisik dari campuran dilihat apakah jernih atau keruh. Keberadaan zona nanoemulsi dapat diilustrasikan dengan membangun diagram semu fase terner menggunakan software *Triplot 4.1.2*. Ditentukan pula batas bawah dan batas atas dari masing-masing komponen untuk kemudian digunakan dalam membuat eksperimen desain dengan menggunakan *software Design Expert*.

2.2.1.2. Studi Optimasi dengan D-Optimal Mixture Design (DMD)

Batas bawah dan batas atas yang diperoleh dari Desain percobaan yang digunakan pada studi optimasi ini adalah *D-optimal Mixture Design* (DMD) dengan bantuan *Design Expert software* (version 10.0). Pada desain ini, variabel independennya adalah jumlah minyak (X_1 , %), jumlah Smix (X_2 , %) dan jumlah air (X_3 , %). Sedangkan variabel dependennya adalah ukuran partikel (Y_1), indeks polidispersitas (Y_2) dan zeta potensial (Y_3).

Persamaan polinomial yang dihasilkan oleh desain eksperimental ini adalah sebagai berikut:

$$y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_4X_1X_2 + A_5X_2X_3 + A_6X_1X_3 + A_7X_1^2 + A_8X_2^2 + A_9X_3^2 + E \quad (3.1)$$

Di mana $A_0 - A_9$ adalah koefisien - koefisien dari masing-masing variabel dan interaksi, dan E adalah error.

Model yang digunakan dipilih berdasarkan kebermaknaan dari nilai p-value model, ketidakbermaknaan dari nilai Lack of Fit dan mempertimbangkan nilai Adj-R² dan R².

Optimasi numerik dilakukan untuk mengetahui formulasi yang optimal dengan kriteria jumlah minyak (X_1) yang tinggi, Smix (X_2) yang rendah, dan air (X_3) pada renang tertentu,

ukuran partikel rata-rata (Y1) dan indeks polidispersitas (PDI) (Y2) yang rendah namun zeta potensial (Y3) yang tinggi. Hasil formula optimal diverifikasi selanjutnya formula optimal yang menghasilkan bias respon antara prediksi dan hasil observasi yang paling rendah (<10%) akan dibandingkan dengan formula optimal dari energi tinggi dengan analisis statistik ANOVA.

2.2.2. *Evaluasi Sediaan Nanoemulsi*

2.2.2.1 *Organoleptis*

Diamati terjadinya perubahan bentuk, warna, dan bau. Pemeriksaan dilakukan setiap 1 minggu selama 4 minggu. Sediaan diamati secara visual apakah terjadi perubahan secara visual atau terjadi pemisahan fase atau tidak.

2.2.2.2. *Uji pH*

Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH meter pada suhu ruang. Pertama-tama elektroda dikalibrasi dengan dapar standar pH 4, pH 7 dan pH 9, kemudian elektroda dibilas dengan aquades dan dikeringkan menggunakan tisu dan di ulangi pada semua standar pH 4, pH 7 dan pH 9. Elektroda dicelupkan kedalam sediaan hingga nilai pH muncul pada alat. Hasil pH dicatat dan dilakukan 3 kali replikasi.

2.2.3. *Karakterisasi Nanoemulsi*

2.2.3.1. *Ukuran Partikel dan Indeks Polidispersitas*

Sediaan nanoemulsi diambil sebanyak 1 mL diencerkan dengan aqua pro injeksi sebanyak 250 ml. Pada penggunaan *Particle Size Analyzer* (PSA), sampel nanoemulsi yang telah diencerkan dimasukkan kedalam kuvet, kemudian dilakukan pengukuran ukuran globul dan PDI.

2.2.3.2. *Zeta Potensial*

Zeta potensial di ukur dengan menggunakan PSA. Pengukuran zeta potensial dilakukan pada suhu 25°C. Sebanyak 1 mL nanoemulsi diencerkan dalam air sebanyak 250 mL, lalu dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dilakukan pengukuran terhadap zeta potensial. Suatu formulasi nanoemulsi dikatakan stabil apabila memiliki nilai zeta potensial yang tinggi yaitu diatas ± 30 mV (Eid, dkk, 2013).

3. **Analisis Hasil**

Data yang diperoleh dianalisis dengan secara statistik ANOVA untuk mendapatkan model respon yang digunakan untuk mendapatkan formula optimal. Formula optimal

3.1. *Hasil dan Pembahasan*

3.1.1. *Pembuatan Diagram Fase*

Pembuatan diagram fase bertujuan untuk menentukan area nanoemulsi dari campuran antara minyak biji anggur, smix (Tween 80 dan PEG 400) dan fase air. Metode titrasi dengan

penambahan fase air pada rentang 5 – 95%. Hasil yang didapatkan dari pembuatan diagram fase dapat dilihat pada tabel 1

Tabel 1. Hasil pembuatan diagram fase

Perbandingan smix (Tween 80:PEG 400)	Perbandingan minyak: smix								
	1:9	1:8	1:7	1:6	1:5	1:4	1:3	1:2	1:1
1:1	NE	NE	E	NE	E	E	E	E	E
1:2	E	E	E	E	E	E	E	E	E
1:3	E	E	E	E	E	E	E	E	E
1:4	E	E	E	E	E	E	E	E	E
1:5	E	E	E	E	E	E	E	E	E
5:1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	E	E	E
4:1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	E	E	E
3:1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	E	E	E
2:1	NE	NE	NE	NE	NE	E	E	E	E
4:3	NE	NE	NE	E	E	E	E	E	E
3:4	E	E	E	E	E	E	E	E	E
3:2	NE	NE	NE	E	E	E	E	E	E
2:3	E	E	E	E	E	E	E	E	E

Keterangan : E : Emulsi; NE: Nano Emulsi

Pada saat optimasi diagram fase, akhir titrasi ditandai dengan penambahan fase air sebanyak 95%. Luas wilayah nanoemulsi yang terbentuk akan ditandai dengan larutan yang tetap jernih dan transparan dari awal hingga akhir titrasi berdasarkan pengamatan visual (Abd-Allah, dkk., 2010). Menurut Shafiq-un formula yang baik adalah formula yang menghasilkan area terbesar dari diagram fase atau secara visual menghasilkan sediaan yang jernih mulai dari penambahan fase air awal hingga akhir (Shafiq-un-Nabi, dkk., 2007).

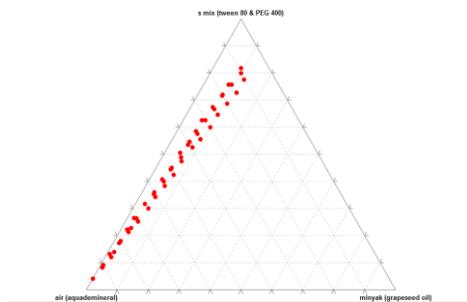
Dari tabel 1 didapatkan bahwa terbentuk nanoemulsi pada perbandingan minyak dan smix 1:4 dengan maksimal minyak yang dapat digunakan adalah 18,18%. Semakin besar perbandingan minyak dan smix yang digunakan (1:9) semakin banyak pula terbentuk area nanoemulsi pada beberapa perbandingan smix yang digunakan dan sebaliknya akan tetapi semakin besar perbandingan yang digunakan maka konsentrasi smix yang digunakan semakin besar pula. Pada perbandingan smix didapatkan bahwa jumlah Tween 80 yang lebih besar atau sama dibandingkan dengan PEG 400 akan membentuk area nanoemulsi, akan tetapi jumlah Tween 80 dan PEG 400 dengan perbandingan sama hanya terjadi pada perbandingan 1:9, 1:8 dan 1:6 dan untuk jumlah PEG 400 yang lebih besar pada semua perbandingan yang digunakan tidak terbentuk area nanoemulsi. Terjadi peningkatan viskositas (fase bikontinyu) ditengah tengah penitrasi yang menyerupai gel, hal ini dapat disebabkan karena terjadi perubahan dari sistem nanoemulsi a/m ke m/a, namun dengan penambahan fase air yang semakin banyak fase gel yang terbentuk lama-lama menghilang dan pada akhirnya terbentuk dispersi nanoemulsi dengan viskositas rendah, jernih dan transparan (Abd-Allah, dkk., 2010), Peningkatan viskositas ini terjadi pada perbandingan 1:9 (5:1), 1:8 (4:1); 1:5 (5:1, 2:1); 1:4 (5:1). Visualisasi diagram fase dibuat dengan *software Triplot* dan dapat dilihat pada gambar 4.1 (titik merah: nanoemulsi dan hijau : bikontinyu).

Pada gambar 1 didapatkan bahwa perbandingan smix 3:1 (C) didapatkan area nanoemulsi yang paling luas dan tidak terjadi fase bikontinyu pada prosesnya dan hasil yang didapatkan jernih secara visual dari awal hingga akhir titrasi. Luas wilayah nanoemulsi tergantung pada kemampuan surfaktan atau smix dalam melarutkan fase minyak. Hal ini disebabkan komposisi Tween 80 yang lebih banyak akan semakin menurunkan tegangan antarmuka dua cairan yang tidak saling bercampur dan dibantu dengan adanya penambahan PEG 400 akan lebih membantu menurunkan tegangan antarmuka melalui peningkatan fluiditas antarmuka sehingga meningkatkan entropi sistem. Peningkatan fluiditas dan entropi ini membantu dalam pembentukan nanoemulsi yang stabil secara termodinamika (Elnaggar, dkk., 2009). Surfaktan atau smix dapat meningkatkan dispersi entropi, menurunkan tegangan antar muka, meningkatkan luas area nanoemulsi sehingga menurunkan energi bebas sistem ke nilai yang paling rendah akan menghasilkan nanoemulsi yang stabil dan menghasilkan nanoemulsi yang stabil dan menghasilkan wilayah nanoemulsi yang luas (Baboota, dkk., 2007).

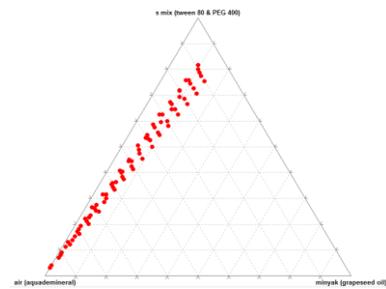
Tabel 2. Batas atas dan bawah untuk metode energi rendah

Komponen	Batasan Bawah	Batasan Atas
Minyak (%)	0,95	18,8
Smix (%)	3,81	72,73
Air (%)	9,09	95,24

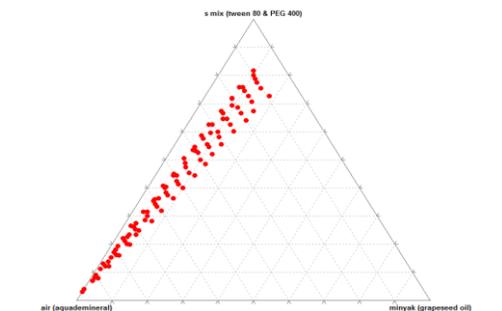
Dari gambar 1 dapat dilihat daerah yang menunjukkan terbentuknya area nanoemulsi dengan titik berwarna merah dan terbentuk area bikontinyu dengan warna hijau. Sehingga dari gambar visualisasi diagram fase dapat digunakan untuk menentukan batas atas dan batas bawah konsentrasi minyak, smix (Tween 80 dan PEG 400) dan air yang dapat dimasukkan kedalam *software Design Expert (D-Optimal Mixture Design)* untuk pembuatan nanoemulsi dengan menggunakan metode energi rendah.



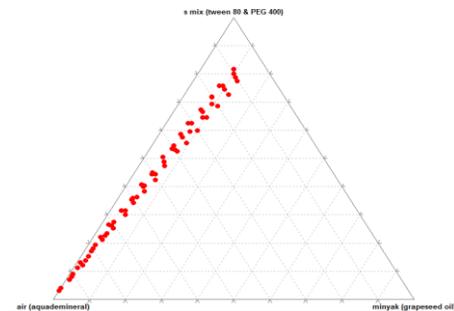
A smix (1:1)



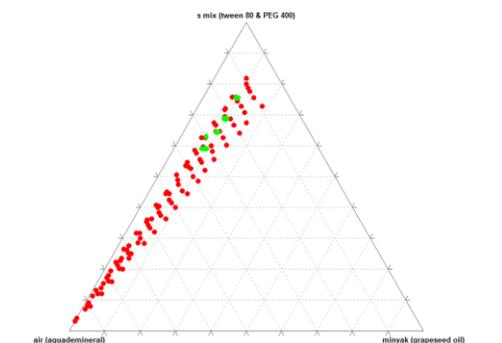
B smix (2:1)



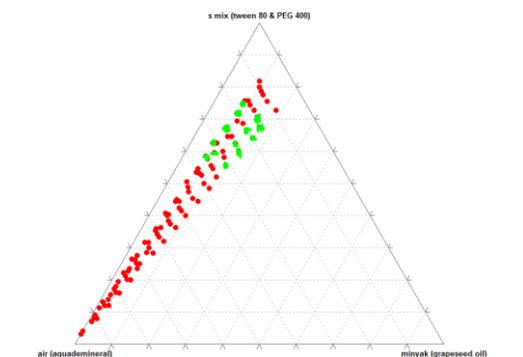
C smix (3:1)



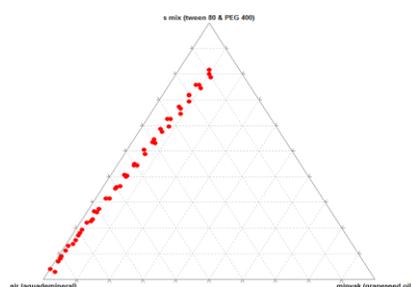
D smix (3:2)



E smix (4:1)



F smix (5:1)



E smix (4:3)

Gambar 1. Diagram Fase

3.1.2. Metode Energi Rendah

3.1.2.1. Optimasi Dengan *D-Optimal Mixture Design (DMD)*

Optimasi pendahuluan dilakukan untuk mengetahui pengaruh variabel independen. Berdasarkan data yang telah dihasilkan dari pembuatan diagram terner didapatkan batas atas dan batas bawah konsentrasi minyak, smix dan air yang akan dimasukkan ke dalam *Software* pada tabel 2. setelah batas batas konsentrasi dimasukkan ke dalam *Software Design Expert* dengan model desain *D-Optimal Mixture Design* didapatkan 12 percobaan seperti pada tabel 3 beserta hasil respon karakterisasi yang didapat.

Tabel 3. Desain formula energi rendah dan hasil respon yang didapat

Run	Minyak (%)	Smix (%)	Air (%)	Ukuran Partikel (nm)	PDI	Zeta Potensial (mV)
1	18,18	47,26	34,56	123,20	0,544	-35,2
2	8,03	34,1	57,87	116,53	0,654	-37,9
3	0,95	22,08	76,97	21,90	0,389	-32,6
4	0,95	70,6	28,45	22,80	0,515	-28,9
5	0,95	52,04	47,01	21,00	0,496	-29,3
6	16,03	3,81	80,16	105,30	0,333	-38,2
7	11,57	72,73	15,70	117,00	0,580	-35,9
8	11,57	72,73	15,70	150,50	0,473	-24,1
9	8,01	34,10	57,89	103,75	0,440	-42,8
10	18,18	58,89	22,93	118,20	0,398	-35,3
11	8,01	34,1	57,89	133,75	0,542	-49,4
12	0,95	3,81	95,24	102,60	0,662	-43,5

Dari hasil preparasi yang dilakukan sesuai dengan desain yang dibuat didapatkan nanoemulsi minyak biji anggur dengan respon ukuran partikel antara 21,0 nm – 150,5 nm, PDI antara 0,389 – 0,662, Zeta Potensial antara -24,1mV sampai 49,6 mV, dengan komposisi minyak antara 0,95 % - 18,18%, Smix 3,81% - 72,73%, dan air 15,7% - 95,24%. *D-Optimal Mixture Design* adalah suatu rancangan dimana dapat menentukan model penelitian agar mendapatkan suatu rancangan yang optimal dengan respon yang diinginkan, keuntungan *D-Optimal* adalah memperkecil hasil optimasi formula, dapat menginformasikan secara statistik antara variabel dan respon.

3.1.3. Analisis Statistik Nanoemulsi Metode Energi Rendah

Data eksperimen yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) untuk menentukan model yang terbaik dari tiga variabel independen. Analisis statistik nilai parameter, termasuk penyesuaian nilai *F*, nilai *P*, koefisien korelasi berganda (R^2), dan *lack of fit*, yang dihasilkan oleh *software Design Expert* digunakan untuk mengevaluasi dan memilih model terbaik terhadap respon.

Parameter yang dianalisis dengan ANOVA menunjukkan nilai yang signifikan dan valid. Untuk nilai ukuran partikel (Y_1) nilai *P value* < dibanding tingkat signifikansi (0,05) menandakan model yang signifikan dimana respon ukuran partikel dipengaruhi oleh komponen nanoemulsi (%minyak, % smix dan % air). R^2 dengan nilai 0,8745 menunjukkan kecocokan yang baik dari polinomial yang dihasilkan untuk data respon. Nilai *lack of fit* model adalah 0,5753 yang tidak signifikan menunjukkan bahwa model yang diusulkan sesuai. *Design Expert* menyarankan model Quadratic untuk ukuran partikel dengan nilai $F = 1,63$ mengartikan model yang signifikan.

Tabel 4. *Analysis of Variance* (ANOVA) metode energi rendah

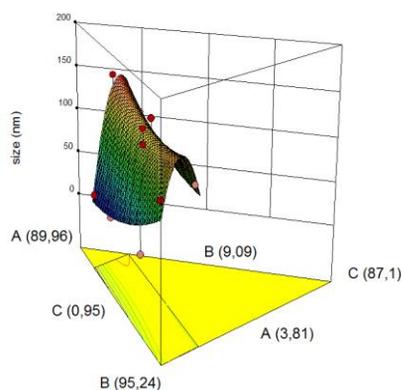
Respon	<i>F value</i>	<i>P value</i>	R^2	<i>Lack of fit</i>	Model
Ukuran Partikel (Y_1)	1,63	0,0112 (signifikan)	0,8745	0,5753 (tidak signifikan)	Quadratic
PDI (Y_2)	1,96	0,3653 (tidak signifikan)	0,6264	0,3556 (tidak signifikan)	Special Cubic
Zeta Potensial (Y_3)	0,76	0,1162 (tidak signifikan)	0,3802	0,6724 (tidak signifikan)	Linier

Untuk mengevaluasi kontribusi dari masing-masing tiga komponen dan efek kuantitatif dari proporsi yang berbeda dan variabel formulasi pada respon ukuran partikel (Y_1), model respon

permukaan dikalkulasi dengan software Design Expert. Persamaan akhir dari model menggambarkan ukuran partikel nanoemulsi dapat ditulis sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Ukuran Partikel (Y}_1\text{)} = & +11,94(\text{A}) +83,33(\text{B}) -3919,34(\text{C}) -86,90(\text{AB}) +5722,78(\text{AC}) \\ & +5062,59(\text{BC}) \end{aligned} \quad (4.1)$$

Dimana A merupakan jumlah smix, B merupakan jumlah air dan C merupakan jumlah minyak. Nilai positif dari masing-masing komponen dalam persamaan regresi merepresentasikan efek yang menguntungkan dalam optimasi karena bersifat sinergis, sementara nilai negatif menunjukkan hubungan antagonis antara faktor dan respon (Elnaggar, dkk., 2009). Berdasarkan hasil dari persamaan untuk ukuran partikel, didapatkan bahwa konsentrasi air dan smix memiliki efek sinergis atau meningkatnya konsentrasi dari air dan smix akan menurunkan nilai ukuran partikel sementara nilai minyak memiliki nilai antagonis terhadap respon atau semakin meningkat konsentrasi minyak maka akan semakin besar ukuran partikel yang dihasilkan. Untuk visualisasi optimalisasi nanoemulsi, analisis respon diplotkan dalam model grafik 3D seperti gambar 2.



Gambar 2. Diagram 3D mengilustrasikan pengaruh komposisi nanoemulsi terhadap ukuran partikel

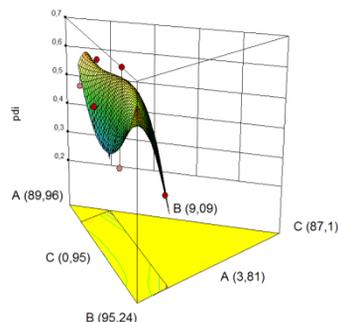
Bioavailabilitas dari sediaan berbasis lemak akan meningkat dengan menurunnya ukuran partikel suatu sediaan. Terdapat beberapa kemungkinan yang dapat meningkatkan bioavailabilitas ini, pertama ukuran partikel yang kecil memiliki luas permukaan yang lebih besar dan oleh karena itu dapat mempercepat pencernaan oleh enzim sehingga isi dapat segera terlepas dan lebih mudah untuk diabsorpsi, kedua ukuran partikel yang kecil dapat dengan mudah melakukan penetrasi ke membran mukosa pada epitelium, ketiga ukuran partikel yang

sangat kecil dapat melewati membran mukosa dengan mekanisme *paracellular* dan *transcellular*, keempat semakin kecilnya ukuran partikel maka akan meningkatkan absorpsinya.

Untuk nilai PDI (Y_2) nilai p value > dibanding tingkat signifikansi (0,05) menandakan model yang tidak signifikan dimana PDI tidak dipengaruhi oleh variabel komposisi nanoemulsi (% minyak, % smix dan % air). R^2 dengan nilai 0,6264 menunjukkan kecocokan yang kurang baik dari polinomial yang dihasilkan untuk data respon. Nilai *lack of fit* model adalah 0,3556 yang tidak signifikan menunjukkan bahwa model yang diusulkan sesuai. *Design Expert* menyarankan model *special cubic* untuk PDI dengan nilai $F=1,96$ mengartikan model yang signifikan. Persamaan akhir dari model menggambarkan ukuran partikel dan PDI nanoemulsi dapat ditulis sebagai berikut:

$$PDI (Y_2) = +0,83(A) + 0,63(B) - 4,23(C) - 1,13(AB) + 2,52(AC) + 3,82(BC) + 16,01(ABC) \quad (4.2)$$

Dimana A merupakan jumlah smix, B merupakan jumlah air dan C merupakan jumlah minyak. Berdasarkan hasil dari persamaan untuk PDI, didapatkan bahwa konsentrasi smix dan air memiliki efek sinergis, sementara nilai konsentrasi minyak memiliki efek antagonis terhadap respon. Untuk visualisasi optimalisasi nanoemulsi, analisis respon diplotkan dalam model grafik 3D seperti gambar 3



Gambar 3 Diagram 3D mengilustrasikan pengaruh komposisi nanoemulsi terhadap PDI

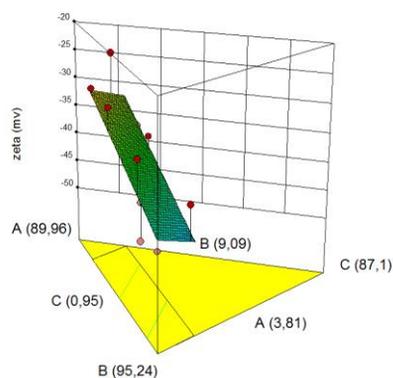
Nilai indeks polidispersitas kurang dari 0,3 bersifat monodispersi, yaitu menunjukkan bahwa ukuran partikel mempunyai satu bentuk yang seragam dan distribusi partikel yang sempit. Nilai indeks polidispersitas dari 0,3 – 0,7 bersifat polidispersi yaitu, menunjukkan bahwa ukuran partikel seragam tetapi memiliki bentuk yang berbeda dan distribusi partikel yang lebar, sedangkan nilai indeks polidispersitas lebih dari 0,7 bersifat superdispersi, yaitu

menunjukkan bahwa ukuran partikel tidak seragam dan bentuk yang berbeda serta distribusi partikel yang menyebar. Nilai indeks polidispersitas sangatlah penting karena berhubungan dengan keseragaman ukuran dari nanoemulsi, nilai indeks polidispersitas yang kecil menunjukkan keseragaman ukuran yang semakin baik, beberapa peneliti menganggap nilai indeks polidispersitas dibawah 0,3 menunjukkan monodispersitas atau keseragaman ukuran yang baik (Das & Chaudhury, 2011).

Untuk nilai (Y_3) nilai p value > dibanding tingkat signifikansi (0,05) menandakan model yang tidak signifikan dimana zeta potensial tidak dipengaruhi oleh komposisi dalam nanoemulsi (% minyak, % smix dan % air). R^2 dengan nilai 0,3802 menunjukkan kecocokan yang kurang baik dari polinomial yang dihasilkan untuk data respon. Nilai *lack of fit* model adalah 0,6725 yang tidak signifikan menunjukkan bahwa model yang diusulkan sesuai. *Design Expert* menyarankan model *linier* untuk zeta potensial dengan nilai $F=0,76$ mengartikan model yang signifikan. Persamaan akhir dari model menggambarkan zeta potensial nanoemulsi dapat ditulis sebagai berikut:

$$\text{Zeta Potensial } (Y_3) = -0,24496(A) -42243(B) -0,57742(C) \quad (4.3)$$

Dimana A merupakan jumlah smix, B merupakan jumlah air dan C merupakan jumlah minyak. Berdasarkan hasil dari persamaan untuk zeta potensial, koefisien A, B dan C menunjukkan hubungan antagonis atau memberikan efek yang tidak sinergis terhadap nilai zeta potensial. Untuk visualisasi optimalisasi nanoemulsi, analisis respon diplotkan dalam model grafik 3D seperti gambar 4.



Gambar 4. Diagram 3D mengilustrasikan pengaruh komposisi nanoemulsi terhadap Zeta Potensial.

Nilai zeta potensial menunjukkan keseluruhan muatan suatu partikel dalam suatu media yang spesifik, stabilitas dari sistem nanodispersi dapat diprediksi dengan menggunakan nilai zeta potensial. Tingginya nilai zeta (negatif atau positif) dapat menjaga dari agregasi partikel dengan gaya tolak menolak dari partikel terdispersi sehingga dapat menstabilkan diri, pada kasus yang lain rendahnya nilai zeta potensial menyebabkan semakin mudah terjadinya flokulasi (agregasi atau sedimentasi) antar partikel. Nilai zeta potensial -30mV sudah cukup untuk mempertahankan stabilitas dari sistem dispersi nanoemulsi (Das & Chaudhury, 2011). Rentang nilai zeta potensial yang dapat memprediksi stabilitas penyimpanan sediaan yaitu, nilai potensial zeta $> 30\text{mV}$ menunjukkan bahwa sediaan memiliki stabilitas elektrostatik yang baik, $5 - 15\text{mV}$ menunjukkan limited flocculation, dan $3 - 5\text{mV}$ menunjukkan maximum flocculation (Heurtault, 2003).

Muatan atau potensial zeta partikel atau globul ditentukan melalui pengukuran kecepatan saat partikel bergerak dikarenakan elektroforesis. Partikel yang memiliki potensial zeta akan berpindah tempat menuju elektroda yang bermuatan berlawanan. Kecepatan gerakan partikel sebanding dengan kekuatan medan dan potensial zetanya. Apabila kekuatan medan listrik diketahui, maka hanya perlu mengukur kecepatan gerakan menggunakan sinar Dropper electrophoresis dan kemudian menerapkan teori-teori yang ditetapkan untuk menghitung zeta potensial (Fanun, 2010). Potensial zeta mempunyai penerapan praktis dalam kestabilan sistem yang mengandung partikel-partikel terdispersi karena potensial inilah yang mengatur derajat tolak menolak antara partikel-partikel terdispersi yang bermuatan sama dan saling berdekatan (Martin, dkk., 1993).

Faktor faktor yang mempengaruhi nilai zeta potensial adalah adanya perubahan pH, konduktivitas, dan perubahan konsentrasi karena adanya penambahan zat tambahan seperti surfaktan ionik atau polimer. Faktor penting yang paling mempengaruhi potensial zeta adalah pH, nilai pH yang rendah akan menghasilkan nilai zeta potensial bernilai positif dan apabila nilai pH tinggi akan menghasilkan nilai zeta potensial rendah atau negatif. Zeta potensial juga dipengaruhi oleh komponen dalam nanoemulsi khususnya surfaktan yang berlokasi pada antarmuka dua cairan yang saling tidak bercampur. Pada penelitian ini menggunakan surfaktan Tween 80 yang merupakan surfaktan nonionik sehingga cenderung menurunkan nilai zeta potensial (Fanun, 2010). Kebanyakan partikel yang terdispersi dalam air menjadi bermuatan negatif karena adsorpsi yang lebih menyukai ion hidroksil (Martin, dkk., 1993).

3.1.4. Formula optimal

Dari hasil optimasi *D-Optimal Mixture Design* kemudian dilakukan pembuatan formula optimal yang didapat dari software dengan kriteria yang ditetapkan seperti pada tabel 5, diambil 3 formula optimal dan dilakukan 3 kali replikasi pada tiap formula dan dilakukan karakterisasi berupa ukuran partikel, PDI dan zeta potensial.

Tabel 5. Kriteria desain formula optimal *D-Optimal Mixture Design*

Varibel Independen dan Dependen	Kriteria
Minyak (A)	<i>Minimize</i>
Smix (B)	<i>Minimize</i>
Air (C)	<i>In range</i>
Ukuran partikel (Y ₁)	<i>Minimize</i>
PDI (Y ₂)	<i>Minimize</i>
Zeta Potensial (Y ₃)	<i>Maximize</i>

Tabel 6. Formula optimal metode energi rendah

Formula	Komposisi formula		
	Minyak (%)	Smix (%)	Air (%)
1	9,4	54,8	35,8
2	9,1	51,6	39,3
3	8,6	46,2	46,2

Formula optimal ditentukan dengan menganalisis efek dari variabel independen terhadap respon. Kriteria yang digunakan adalah ukuran partikel yang kecil, nilai PDI yang kecil dan nilai zeta potensial diatas -25mV dengan menggunakan *Design Expert* didapatkan 3 formula optimal dipilih berdasarkan nilai *desirability* yang paling besar dan dengan prediksi respon yang telah disiapkan. Nilai dari prediksi formula optimal dibandingkan nilai dengan sebenarnya yang didapat dan hitung simpangan yang dihasilkan, nilai simpangan yang baik adalah < 10%. Nilai simpangan dilihat pada tabel 6.

Tabel 7. Hasil verifikasi formula optimal metode energi rendah

Formula	Target	Hasil observasi	Bias	
1	Ukuran partikel	60,4	59,6±5,08	1,32%
	PDI	0,613	0,634±0,05	3,42%
	Zeta Potensial	-29,9	-28,8±3,4	3,6%
2	Ukuran partikel	68,5	70,4±12,5	1,9%
	PDI	0,491	0,540±0,02	9,9%
	Zeta Potensial	-32,81	29,7±1,94	9,4%
3	Ukuran partikel	68,5	66,06±1,68	3,5%
	PDI	0,491	0,597±0,09	8,75%

Zeta potensial	32,8	32,7±1,50	0,3%
----------------	------	-----------	------

Pemilihan formula optimal didasarkan pada nilai bias <10%, pada hasil verifikasi didapatkan hasil semua formula memiliki bias dibawah 10% sehingga semua formula bisa dikatakan optimal, dipilih 1 formula yang memiliki tingkat bias paling rendah atau ketepatan yang mendekati target yang akan digunakan sebagai formula optimal yang akan dibandingkan dengan formula dari metode energi tinggi. Digunakan formula 1 dengan ukuran partikel 59,6 dengan bias 1,32%, PDI 0,634 dengan bias 3,42% dan zeta potensial -28,8 dengan bias 3,6% sebagai formula metode energi rendah yang akan digunakan sebagai perbandingan formula.

3.1.5. Karakterisasi formula optimal

Evaluasi organoleptis dilakukan untuk mengetahui kondisi fisik sediaan nanoemulsi minyak biji anggur, pengamatan organoleptis dilakukan tepat setelah sediaan dibuat. Evaluasi organoleptis didasarkan pada proses pengindraan, evaluasi organoleptis ini dilakukan dengan mengamati sediaan nanoemulsi secara makroskopik menggunakan panca indra untuk mendiskripsikan bentuk, warna dan bau dari sediaan nanoemulsi. Hasil sediaan nanoemulsi dapat dilihat pada gambar 5 dan pada tabel 8.



(Formula 1)



(Formula 2)



(Formula 3)

Gambar 5. Sediaan Nanoemulsi Metode Energi Rendah

Tabel 8. Hasil uji Organoleptis Formula Energi rendah

Formulasi	Parameter Organoleptis		
	Bentuk	Warna	Bau

1	Cairan	Transparan kekuningan	Khas Tween 80
2	Cairan	Transparan kekuningan	Khas Tween 80
3	Cairan	Transparan kekuningan	Khas Tween 80

Keterangan: Formula 1 mengandung minyak biji anggur sebanyak 9,4%, Smix sebanyak 54,8% dan air sebanyak 35,8%
 Formula 2 mengandung minyak biji anggur sebanyak 9,1%, Smix sebanyak 51,6% dan air sebanyak 39,3%
 Formula 3 mengandung minyak biji anggur sebanyak 8,6%, Smix sebanyak 46,2% dan air sebanyak 46,2%

Berdasarkan hasil evaluasi sediaan nanoemulsi minyak biji anggur formula 1, 2 dan 3 memperlihatkan bahwa sediaan nanoemulsi memiliki bentuk berupa cairan, berwarna dan berbau khas Tween 80. Evaluasi sediaan nanoemulsi yang dibuat pada semua formula menunjukkan hasil berupa sediaan yang transparan dan satabil karena tidak terjadi pemisahan fase pada formula yang dibuat. Nanoemulsi dengan ukuran kecil (nm) akan menghasilkan sediaan yang jernih atau transparan atau sedikit berkabut, sehingga sangat cocok untuk digunakan dalam industri baik makanan ataupun obat (McClements, 2011).

3.2. Hasil Evaluasi pH Metode Energi Rendah

Evaluasi pH dilakukan bertujuan untuk mengetahui tingkat keasaman sediaan nanoemulsi minyak biji anggur. Evaluasi pH dilakukan dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi.

Tabel 9. Nilai pH nanoemulsi minyak biji anggur formula energi rendah

Formula	Replikasi	Nilai pH*
1	1	6,35±0,943
	2	6,72±1,120
	3	6,71±0,363
2	1	6,74±0,837
	2	6,7±0,149
	3	7,13±0,896
3	1	7,08±1,940
	2	7,05±0,141
	3	7,09±0,00

Keterangan: *= X±SD; X: 3 replikasi

Formula 1 mengandung minyak biji anggur sebanyak 9,4%, Smix sebanyak 54,8% dan air sebanyak 35,8%

Formula 2 mengandung minyak biji anggur sebanyak 9,1%, Smix sebanyak 51,6% dan air sebanyak 39,3%

Formula 3 mengandung minyak biji anggur sebanyak 8,6%, Smix sebanyak 46,2% dan air sebanyak 46,2%

Pada tabel 8 Menunjukkan bahwa formula 1 memiliki nilai pH paling rendah dan termasuk dalam asal lemah, sedangkan untuk pH 2 pada replikasi 1 dan 2 menunjukkan hasil pH formula

adalah asam lemah, dan pada formula 3 menunjukkan bahwa pH netral. Perbedaan ini mungkin disebabkan karena variasi surfaktan (Tween 80) yang digunakan sehingga mempengaruhi nilai pH sediaan. Tween 80 memiliki pH dalam rentang 6-8 sehingga semakin semakin meningkat konsentrasi Tween 80 maka akan meningkatkan pH sediaan.

4. Kesimpulan

Nanoemulsi minyak biji Anggur (*Vitis vinifera L.*) energi rendah dapat dibuat dengan teknik pembalikan fase komposisi (PIC). *D-Optimal Design* (DMD) dapat digunakan untuk optimasi formula nanoemulsi minyak biji Anggur.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Hibah AIPT Universitas Islam Indonesia atas dukungan finansial terselenggaranya penelitian ini.

Daftar pustaka

- Abd-Allah F.I., Dawaba H.M. & Ahmed A.M. (2010). Development of a microemulsion-based formulation to improve the availability of poorly water-soluble drug. *Drug Discov Ther.* 4:257-66.
- Anton, N., & Vandamme, T. F. (2009). The universality of low-energy nano-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics.* 377(1-2):142-147.
- Anton, N., Benoit, J., & Saulnier, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates: a review. *Journal of Controlled Release.* 128(3): 185-199.
- Baboota, S., Shakeel, F., Ahuja, A., Ali, J., & Shafiq, S. (2007). Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. *Acta pharmaceutica.* 57(3): 315-332.
- Das S., & Chaudhury A. (2011). Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech.* 12(1): 62-76.
- Eid, A. M. M., Elmarzugi, N. A., & El-Enshasy, H. A. (2013). Preparation and evaluation of olive oil nanoemulsion using sucrose monoester. *International Journal of Pharmacy Pharmaceutical Science.* 5, 434-440.
- Elnaggar, Y. S., El-Massik, M. A., & Abdallah, O. Y. (2009). Self-nanoemulsifying drug delivery systems of tamoxifen citrate: design and optimization. *International journal of pharmaceutics.* 380(1): 133-141.
- Fanun, M. (Ed.). (2010). *Colloids in drug delivery* (Vol. 150). CRC Press.
- Heurtault, B. (2003). Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials.* 24(23): 4283-300.
- Kozlov, M.M. & Helfrich, W. (1992). Effects of a cosurfactant on the stretching and bending elasticities of a surfactant monolayer, *Langmuir.* 8:2792-2797.
- Martin A, James, S. & Arthur C. (1993). *Farmasi Fisik: Dasar-Dasar Kimia Fisik Dalam Ilmu Farmasetik* Jilid 2 diterjemahkan oleh Yoshita. Jakarta: UI-Press; 1993. 972-990 p.
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics-Condensed Matter,* 18(41): 635-666.

- McClements DJ. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*. **7**(6): 2297-316.
- McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **51**(4): 285-330.
- Pouton, C. W. (2006). Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **29**(3-4): 278-287.
- Rao, J. J., & McClements, D. J. (2010). Stabilization of phase inversion temperature nanoemulsions by surfactant Displacement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**(11): 7059-7066.
- Shafiq-un-Nabi, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ali, J., Baboota, S., Ahuja, A., Rop, K., & Ali, M. (2007). Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: a technical note. *AAPS pharmscitech*, **8**(2): 12-17.
- Solans, C., Garcia-Dominguez, J. J., & Friberg, S. E. (1981). *Proc. Jornadas CED, XII*, 509.
- Tadros, T., Izquierdo, R., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nanoemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. **108**(09): 303-318.