

FORMULASI DAN KARAKTERISASI SEDIAAN NANOEMULSI VITAMIN A

Formulation and Characterization of Vitamin A Nanoemulsion

Annis Catur Adi¹, Nelly Setiawaty², Atsarina Larasati Anindya³, Heni Rachmawati^{2,3*}

¹Departemen Gizi Kesehatan, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

²Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung, Indonesia

³Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung, Indonesia

E-mail: h_rachmawati@fa.itb.ac.id

ABSTRAK

Vitamin A merupakan zat gizi penting yang mendukung fungsi penglihatan, pertumbuhan dan peningkatan daya tahan tubuh. Vitamin A tidak dapat disintesis oleh tubuh sehingga harus dipenuhi melalui makanan atau suplemen. Namun, pembuatan sediaan vitamin A oral sering terhambat oleh absorpsi yang buruk karena sifatnya yang hidrofob, dan kerentanan terhadap degradasi oleh cahaya dan oksigen, terutama pada suhu tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk membuat sediaan nanoemulsi vitamin A dengan kapasitas pemuatan tinggi menggunakan metode nanoemulsifikasi spontan yang diharapkan dapat meningkatkan absorpsi melalui mukosa intestinal serta memperlambat proses degradasi vitamin A. Nanoemulsi dibuat dengan komposisi gliseril monooleat, Cremophor RH-40, dan PEG 400 dengan perbandingan 1:8:1, kemudian dititrasi dengan fasa air. Karakterisasi sediaan meliputi evaluasi ukuran globul, distribusi ukuran, potensial zeta, morfologi partikel, efisiensi penjeratan, stabilitas fisik dan kadar sediaan, dan uji penetrasi *ex vivo* menggunakan usus kelinci albino galur New Zealand. Kadar vitamin A sebanyak 16,67% dalam nanoemulsi masih dapat menghasilkan emulsi transparan dan berukuran nanometer. Globul yang dihasilkan berbentuk sferis dengan ukuran $58,10 \pm 2,00$ nm dan potensial zeta -0,69 mV. Efisiensi penjeratan vitamin A dalam sediaan nanoemulsi sebesar >95%. Nanoemulsi yang dihasilkan relatif stabil secara fisik dan memiliki kadar yang stabil setelah disimpan pada suhu ruang selama 10 hari, serta meningkatkan kecepatan penetrasi pada mukosa intestinal secara signifikan dibandingkan vitamin A bebas. Secara keseluruhan, Nanoemulsi vitamin A yang dikembangkan mempunyai kemampuan penjeratan vitamin A hingga 16,67% dan terbukti meningkatkan absorpsi pada mukosa intestinal serta memperlambat degradasi vitamin A.

Kata kunci: nanoemulsi, Cremophor RH-40, vitamin A, zeta potensial

ABSTRACT

Vitamin A is an essential nutrient to support the function of vision, growth, and immune system. Vitamin A cannot be synthesized in the body hence must be obtained through foods or supplements. However, oral administration of vitamin A is often hindered by poor absorption due to its hydrophobic nature and by its easily degradable nature by light and oxygen, particularly at high temperature. This study aimed to prepare a self-assembly vitamin A nanoemulsion with a high loading capacity to improve vitamin A absorption across intestinal mucosa and to slow down its degradation process. The nanoemulsion was composed by glyceryl monooleate, Cremophor RH-40, and PEG 400 (1:8:1), then titrated with aqueous phase. The nanoemulsion characterization included globule size evaluation, size distribution, zeta potential, globule morphology, entrapment efficiency, physical and chemical stabilities, and ex vivo penetration test on New Zealand albino rabbit intestines. The vitamin A nanoemulsion was found to form transparent and nano-sized emulsions even when loaded with 16.67% vitamin A. The formula also produced 58.1 ± 2.0 nm spherical globules with -0.69 mV zeta potential. Entrapment efficiency of vitamin A in the nanoemulsion was higher than 95%. The nanoemulsion shows stable after storage for 10 days at room temperature, as well as able to increase penetration rate compared to free vitamin A. Taken together, our established vitamin A nanoemulsion has a good stability and was proved to increase vitamin A absorption through intestinal mucosa while simultaneously decreased the vitamin A degradation rate.

Keywords: nanoemulsion, Cremophor RH-40, vitamin A, potential zeta

PENDAHULUAN

Vitamin A merupakan salah satu zat gizi penting yang dibutuhkan dalam mendukung fungsi penglihatan, pertumbuhan dan peningkatan daya tahan tubuh. Karena vitamin A tidak dapat disintesis oleh tubuh, maka vitamin A didapat melalui makanan ataupun suplemen (Imdad *et al.*, 2010).

Hingga saat ini, kasus defisiensi vitamin A merupakan salah satu masalah gizi yang perlu mendapat perhatian. Data yang dilaporkan oleh Imdad, *et al.* (2010) terkait dengan suplementasi vitamin A pada berbagai negara rawan mikronutrien bagi anak balita, dimaksudkan untuk mencegah morbiditas dan mortalitas akibat buruk dari defisiensi vitamin A.

Defisiensi vitamin A dapat terjadi karena kandungan vitamin A dalam makanan yang dikonsumsi tidak mencukupi kebutuhan tubuh dalam jangka waktu yang lama atau karena absorpsi dan transpor vitamin A yang kurang baik dalam tubuh. Defisiensi vitamin A menimbulkan beberapa tanda khas seperti menurunnya ketahanan tubuh terhadap infeksi, keratinisasi, hambatan terhadap pertumbuhan, serta gangguan pada mata yaitu xeroftalmia yang dapat berujung pada kebutaan (Sumardjo, 2009).

Dengan tingginya prevalensi defisiensi vitamin A, perlu dilakukan berbagai upaya untuk mencegah dan mengatasi masalah gizi ini. Prinsip dasar pencegahan dan penanggulangannya yaitu menyediakan vitamin A yang cukup untuk tubuh, salah satunya dengan pemberian suplemen vitamin A.

Vitamin A merupakan vitamin yang bersifat hidrofobik. Selama pencernaan, ester vitamin A

dihidrolisis menjadi retinol oleh enzim pankreatik dan intestinal, kemudian diemulsifikasi oleh garam empedu membentuk misel hingga dapat diabsorpsi oleh sel-sel mukosa intestinal. Ketika terjadi gangguan pada enzim pankreatik dan intestinal, maka absorpsi vitamin A juga akan terganggu. Selain itu, vitamin A juga sensitif terhadap oksidasi, isomerisasi, dan polimerisasi saat berada dalam bentuk larutan dengan adanya cahaya dan oksigen, terutama pada suhu yang tinggi (Zhang *et al.*, 2018).

Untuk mengatasi keterbatasan karakteristik farmasetik vitamin A, pada penelitian ini dilakukan pengembangan sediaan vitamin A dalam bentuk nanoemulsi. Pengembangan sediaan nanoemulsi ditujukan untuk meningkatkan absorpsi vitamin A menembus mukosa intestinal dengan adanya penggunaan surfaktan dan kosurfaktan. Hal ini dikarenakan surfaktan dan kosurfaktan dapat menginduksi perubahan permeabilitas pada sel mukosa intestinal dan menggantikan peranan garam empedu dalam proses emulsifikasi sehingga vitamin A tetap dapat diabsorpsi walaupun terjadi gangguan pada enzim pankreatik dan intestinal (Taha *et al.*, 2009). Peningkatan kecepatan absorpsi juga diperoleh melalui modifikasi ukuran sampai pada skala nanometer yang menyebabkan peningkatan luas permukaan spesifik globul yang berkontak dengan sel mukosa intestinal. Selain itu, melalui pengembangan ini vitamin A juga dapat terlindungi dari paparan kondisi eksternal karena berada dalam sistem pembawa sehingga dapat meningkatkan kestabilan dan memperlambat degradasi vitamin A selama proses penyimpanan serta mencegah terjadinya degradasi

Tabel 1 Varian Jumlah Vitamin A yang Diinkorporasi ke dalam Fasa Minyak

Parameter	Variabel														
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
Vitamin A*	0	0,01	0,03	0,05	0,06	0,4	1	2	5	6	7	8	9	10	
GMO-Cremophor RH40-PEG 400*	1:8:1														

*: rasio dalam b/b

saat penghantaran vitamin A ke sisi absorpsinya (Sauvant *et al.*, 2011).

Pembuatan nanoemulsi vitamin A dilakukan dengan mencampurkan gliseril monooleat, Cremophor RH-40, dan PEG 400 perbandingan 1:8:1. Melalui penelitian ini diharapkan kapasitas pemuatan vitamin A dalam nanoemulsi tersebut dapat ditingkatkan, dapat meningkatkan absorpsi serta mencegah atau memperlambat degradasi vitamin A.

METODE

Bahan

Vitamin A palmitat (PT Kimia Farma), gliseril monooleat (GMO), Cremophor RH-40, polietilen glikol 400 (PEG 400), sudan III, HCl pH 1,2, air deion, 2-propanol, dapar fosfat pH 6,8 dan 7,4, uranil asetat, dan usus kelinci albino galur New Zealand (diperoleh dari Laboratorium Hewan Sekolah Farmasi ITB).

Pembuatan Nanoemulsi Vitamin A secara Spontan

Pembuatan nanoemulsi diawali dengan pembentukan fasa minyak yang merupakan campuran gliseril monooleat sebagai minyak, Cremophor RH-40 sebagai surfaktan, dan PEG 400 sebagai kosurfaktan pada perbandingan 1:8:1. Sejumlah vitamin A (Tabel 1) ditambahkan ke dalam fasa minyak, diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 2 jam dan disonikasi

selama 1 jam. Nanoemulsi yang mengandung vitamin A dicampurkan dengan air deion sebagai fasa luar dan diaduk ringan dengan pengaduk magnetik (Rasaputri, 2010).

Evaluasi Ukuran Globul, Distribusi Ukuran, dan Potensial Zeta

Sejumlah 2 gram nanoemulsi vitamin A dicampurkan dengan 5 mL air deion dan diaduk ringan dengan pengaduk magnetik hingga terbentuk nanoemulsi yang ditandai dengan terbentuknya campuran yang transparan. Kemudian dilakukan penentuan ukuran globul dan distribusi ukuran sediaan menggunakan *photon correlation spectroscopy*, serta pengukuran potensial zeta menggunakan *electrophoretic light scattering*. Selanjutnya dilakukan analisis pengaruh jumlah vitamin A yang diinkorporasikan ke dalam nanoemulsi terhadap ukuran globul, distribusi ukuran, dan potensial zeta (Rasaputri, 2010).

Morfologi Sediaan

Penentuan morfologi nanoemulsi dilakukan menggunakan mikroskop elektron transmisi (*transmission electron microscopy/TEM*). Nanoemulsi vitamin A dicampurkan dengan air deion kemudian diteteskan sebanyak 10 µL di atas spesimen. Alat *grid* mesh 400 diletakkan di atas spesimen yang sudah terdapat tetesan sediaan nanoemulsi dan dibiarkan selama 1 menit. Sisa

tetes sediaan pada *grid* dibersihkan menggunakan kertas saring. Kemudian diteteskan sebanyak 10 µL urasil asetat di atas *grid* dan sisa tetes dibersihkan kembali menggunakan kertas saring. *Grid* dibiarkan selama 30 menit hingga kering dan dimasukkan ke alat TEM untuk dianalisa (Rasaputri, 2010).

Efisiensi Penjeratan

Efisiensi penjeratan vitamin A dalam sediaan nanoemulsi dilakukan melalui pengamatan visual. Sediaan diberi pewarna sudan III kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Sudan III merupakan pewarna senyawa hidrofobik sehingga vitamin A yang tidak terjerat akan terwarnai. Penambahan sudan III dilakukan pada sediaan nanoemulsi vitamin A serta pada sediaan pembanding yaitu nanoemulsi yang mengandung vitamin A yang tidak terjerat (vitamin A bebas). Hasil pewarnaan oleh sudan III pada kedua sediaan dibandingkan (Rasaputri, 2010).

Uji Stabilitas Fisik Sediaan dengan Tantangan Sentrifugasi

Kestabilan fisik sediaan nanoemulsi dibandingkan terhadap sediaan emulsi konvensional. Kedua sediaan diberi pewarna sudan III dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit. Hasil sentrifugasi kedua sediaan diamati secara visual (Rasaputri, 2010).

Uji Stabilitas Sediaan Terhadap Pengaruh Penyimpanan

Stabilitas fisik nanoemulsi vitamin A ditentukan selama 10 hari pada suhu ruang. Sampel diambil setiap hari dan ditentukan ukuran globul, distribusi ukuran, dan kadarnya.

Uji Stabilitas Sediaan Terhadap Pengaruh HCl pH 1,2

Pengaruh pH lambung terhadap stabilitas fisik globul nanoemulsi ditentukan secara *in vitro* dengan cara mencampurkan 2 gram nanoemulsi vitamin A ke dalam 5 mL larutan HCl pH 1,2. Parameter yang diukur meliputi penampilan visual, ukuran globul, distribusi ukuran, dan kadar (Rasaputri, 2010).

Uji Penetrasi secara *ex Vivo*

Uji penetrasi vitamin A dilakukan secara *ex vivo* pada usus kelinci albino galur New Zealand dengan 3 sediaan yang berbeda, yaitu kontrol negatif (sediaan nanoemulsi tanpa vitamin A), sediaan nanoemulsi vitamin A (formula H), dan sediaan pembanding (vitamin A tanpa diformulasi). Usus kelinci sepanjang 5 cm diisi dengan 0,3 mL sediaan (setara dengan 14,26 mg vitamin A pada sediaan nanoemulsi) dan 0,3 mL dapar fosfat pH 6,8. Uji dilakukan dengan meletakkan usus yang telah berisi sediaan di dalam labu Erlenmeyer yang berisi 50 mL dapar fosfat pH 7,4 dan dikocok dengan *shaker* kecepatan 100 ppm pada suhu 37°C. Sejumlah sampel diambil pada menit ke-20, 55, 80, 105, 130, dan 155. Setiap pengambilan sampel dilakukan pengembalian dapar fosfat pH 7,4 dengan jumlah yang sama yaitu 2 mL. Sampel yang diperoleh ditentukan kadarnya dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 326 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Nanoemulsi Vitamin A secara Spontan

Pembuatan nanoemulsi sangat dipengaruhi oleh sifat minyak, surfaktan dan kosurfaktan yang digunakan serta konsentrasi dan perbandingan dari

bahan-bahan tersebut (Kyatanwar *et al.*, 2010). Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Dita (2010), telah dilakukan optimasi formula untuk menghasilkan nanoemulsi dengan menggunakan GMO sebagai minyak, Cremophor RH-40 sebagai surfaktan, dan PEG 400 sebagai kosurfaktan dengan perbandingan 1:8:1.

Untuk membentuk nanoemulsi spontan, dibutuhkan minyak berupa asam lemak dengan panjang rantai karbon sedang dan memiliki nilai HLB yang tinggi ataupun asam lemak rantai karbon panjang yang dikombinasikan dengan surfaktan tertentu. GMO merupakan asam lemak jenuh yang mengandung rantai karbon 21 dan memiliki nilai HLB 3 (Rao dan Shao, 2008). Oleh karena itu, GMO dapat digunakan sebagai minyak dalam pembuatan nanoemulsi spontan. Surfaktan yang digunakan sebaiknya merupakan surfaktan nonionik dan memiliki nilai HLB 15-21. Penggunaan Cremophor RH-40 dalam pembuatan nanoemulsi vitamin A merupakan pilihan yang tepat karena Cremophor RH-40 merupakan surfaktan nonionik sehingga toksisitasnya relatif rendah dan memiliki nilai HLB sekitar 14-16.

Selain itu, Cremophor RH-40 memiliki struktur alkil yang bercabang yang dapat berpenetrasi ke minyak membentuk lapisan surfaktan sehingga mampu membentuk emulsi secara spontan (Rao dan Shao, 2008).

Selain minyak dan surfaktan, kosurfaktan juga berpengaruh terhadap pembentukan nanoemulsi. PEG 400 mampu menyisip pada ruang antar molekul surfaktan di lapisan film globul. Hal ini menyebabkan terbentuknya konformasi rapat antarmuka yang menghasilkan

tegangan permukaan yang rendah dan menyebabkan terbentuknya nanoemulsi yang stabil. Penggunaan GMO, Cremophor RH-40 dan PEG 400 sebagai minyak, surfaktan dan kosurfaktan terbukti mampu membentuk nanoemulsi secara spontan. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi kapasitas pemuatan vitamin A dalam nanoemulsi dengan cara menginkorporasikan vitamin A ke dalam fasa minyak dengan jumlah yang bervariasi (Tabel 1). Parameter jumlah vitamin A yang dapat diinkorporasikan ditentukan melalui pengamatan transparansi sediaan.

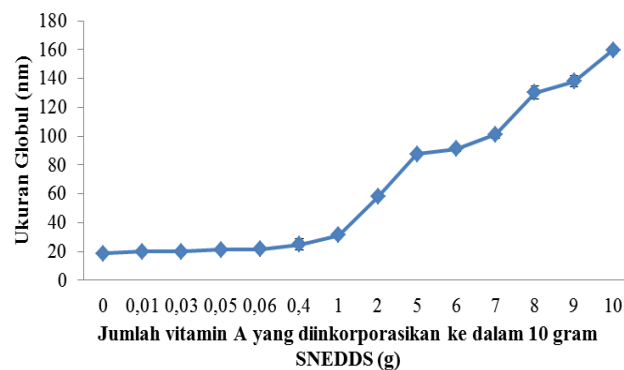
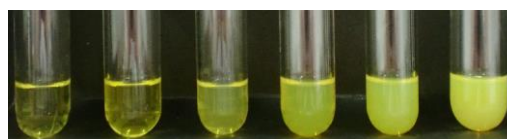
Evaluasi Ukuran Globul, Distribusi Ukuran, dan Potensial Zeta

Hasil evaluasi ukuran globul, distribusi ukuran, serta pengamatan visual dari sediaan nanoemulsi vitamin A dapat dilihat pada Tabel 2, Gambar 1 dan Gambar 2. Dari hasil evaluasi pada Tabel 2 diketahui bahwa semakin banyak jumlah vitamin A yang diinkorporasikan ke dalam fasa minyak, maka ukuran globul yang terbentuk semakin meningkat. Hal ini menyebabkan adanya batasan jumlah vitamin A yang dapat diinkorporasikan ke dalam fasa minyak untuk menghasilkan sediaan dengan ukuran globul yang diinginkan. Nanoemulsi dengan ukuran kurang dari 100 nm masih dapat terbentuk pada formula J. Namun untuk menghasilkan nanoemulsi yang jernih dan transparan hanya dapat terbentuk hingga formula H. Indeks polidispersitas bernilai <0,5 pada semua formula menunjukkan globul yang terbentuk berukuran cukup seragam. Rentang nilai indeks polidispersitas yang dapat diterima adalah 0 (partikel monodispersi) sampai

Tabel 2 Hasil Evaluasi Fisik Sediaan

Formula	Ukuran Globul (nm)	PI	Pengamatan Visual*
A	18,70 ± 0,50	0,314 ± 0,006	JT
B	20,00 ± 0,30	0,276 ± 0,003	JT
C	20,05 ± 0,49	0,356 ± 0,004	JT
D	21,10 ± 1,80	0,235 ± 0,004	JT
E	21,50 ± 0,90	0,252 ± 0,017	JT
F	24,77 ± 3,93	0,260 ± 0,029	JT
G	31,23 ± 0,93	0,323 ± 0,003	JT
H	58,10 ± 2,01	0,326 ± 0,021	JT
I	87,55 ± 1,20	0,317 ± 0,028	AK
J	91,10 ± 1,90	0,291 ± 0,041	AK
K	101,10 ± 2,70	0,294 ± 0,009	AK
L	130,25 ± 4,45	0,274 ± 0,013	K
M	138,10 ± 3,90	0,310 ± 0,023	K
N	159,70 ± 2,60	0,277 ± 0,021	K

*setelah pendispersian 2 g fasa minyak yang mengandung vitamin A dalam 5 mL air deion
J = jernih, T = transparan, AK = agak keruh, K = keruh

**Gambar 1** Grafik Hubungan Jumlah Vitamin A yang Diinkorporasikan ke dalam Fasa Minyak terhadap Ukuran Globul.**Gambar 2** Karakteristik Visual Sediaan Formula G, H, I, J, K, dan L

0,5 (distribusi ukuran partikel lebar). Indeks polidispersitas ini memberikan informasi mengenai kestabilan fisik suatu sistem dispersi.

Nilai indeks polidispersitas yang rendah menunjukkan bahwa sistem dispersi yang terbentuk bersifat lebih stabil untuk jangka panjang (Gao *et al.*, 2008). Dengan demikian

formula H merupakan formula yang mampu membentuk nanoemulsi yang jernih dan transparan dengan ukuran kurang dari 100 nm dan indeks polidispersitas kurang dari 0,5 sehingga formula ini akan dikembangkan lebih lanjut.

Kemampuan vitamin A untuk diinkorporasikan ke dalam fasa minyak cukup

tinggi. Hal ini terlihat pada formula H yang masih dapat membentuk campuran yang transparan dengan globul berukuran kurang dari 100 nm, di mana formula H merupakan nanoemulsi yang mengandung vitamin A sebanyak 16,67%. Kemampuan inkorporasi yang tinggi ini dikarenakan vitamin A bersifat lipofilik sehingga mudah larut atau bercampur dalam minyak dan dapat dianggap sebagai bagian dari fasa minyak. Pengukuran potensial zeta dilakukan pada 3 formula yang berbeda untuk melihat pengaruh jumlah zat aktif yang diinkorporasikan ke dalam fasa minyak terhadap nilai potensial zeta yang dihasilkan (Tabel 3). Potensial zeta dapat digunakan sebagai indikator parsial yang menunjukkan kestabilan dari suatu sistem yang mengandung partikel-partikel terdispersi melalui adanya gaya tolak-menolak antara partikel yang bermuatan sama ketika berdekatan. Ketika terdisosiasi dalam medium pendispersi, ion berlawanan akan mendekat ke permukaan partikel dan bertindak sebagai penahan yang mengurangi gaya tarik-menarik elektrostatik antar partikel yang dapat menyebabkan partikel-partikel bergabung (Ujhelyi *et al.*, 2018). Nilai potensial zeta yang tinggi (di atas ± 30 mV) disarankan untuk dicapai pada sediaan emulsi konvensional untuk mencegah terjadinya koalesensi. Namun, nilai tersebut hanya berdasarkan percobaan dan tidak dapat dipercaya sepenuhnya untuk digunakan dalam memprediksi kestabilan nanoemulsi karena terdapat berbagai variasi nilai potensial zeta nanoemulsi (Zhao *et al.*, 2013).

Dari Tabel 3 terlihat adanya kecenderungan penurunan nilai potensial zeta seiring dengan

Tabel 3 Pengaruh Jumlah Vitamin A terhadap Potensial Zeta

Formula	Potensial Zeta (mV) (rata±S.B., n=3)
F	-1,44±0,20
H	-0,70±0,03
I	-0,34±0,26

peningkatan jumlah vitamin A yang terkandung dalam sediaan. Potensial zeta yang dimiliki oleh ketiga formula tersebut bernilai negatif dan mendekati nol, yaitu berada dalam rentang 0 hingga -2. Nilai negatif menunjukkan muatan permukaan globul yang bermuatan negatif. Nilai dari potensial zeta sangat bergantung pada komposisi penyusun dan medium pendispersinya (Zhang, 2018).

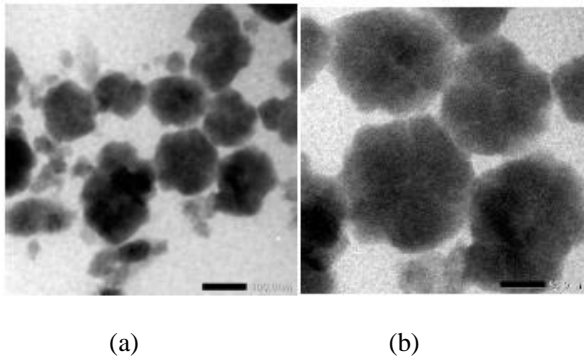
Nilai potensial zeta yang mendekati nol pada sediaan nanoemulsi vitamin A dapat dikarenakan komposisi penyusun terbesarnya adalah Cremophor RH-40 yang merupakan surfaktan nonionik dan kosurfaktan yang digunakan juga nonionik. Sedangkan nilai negatif mungkin disebabkan oleh asam lemak bebas yang terdapat pada sediaan SNEDDS (Kyantawar *et al.*, 2010).

Morfologi Sediaan

Melalui karakterisasi menggunakan TEM, diperoleh bentuk globul sediaan nanoemulsi vitamin A (formula H) sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 3. Dari Gambar 3 dapat terlihat bahwa globul yang berada di dalam sistem nanoemulsi vitamin A (formula H) memiliki ukuran globul kurang dari 100 nm dan bentuk yang relatif sferis. Selain itu, dari gambar tersebut juga dapat dilihat bahwa distribusi ukuran globul cukup merata.

Efisiensi Penjeratan

Penentuan efisiensi penjeratan vitamin A di dalam sediaan nanoemulsi dilakukan secara kualitatif melalui pengamatan secara visual. Sediaan nanoemulsi vitamin A yang telah dibuat

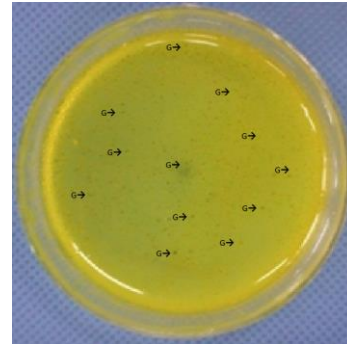


Gambar 3 Bentuk Globul Sediaan Nanoemulsi Vitamin A Hasil Analisis Tem dengan Perbesaran (a) 40.000 Kali, dan (b) 80.000 Kali

memiliki penampilan visual berupa cairan berwarna kuning jernih dan transparan. Sedangkan sebagai pembandingan, dilakukan lagi penambahan vitamin A pada sediaan nanoemulsi vitamin A yang telah terbentuk. Penambahan vitamin A ini menyebabkan terbentuknya globul vitamin A yang tidak berada dalam sistem nanoemulsi sehingga dapat dilihat secara kasat mata (Gambar 4).

Globul tersebut menunjukkan bahwa vitamin A yang ditambahkan tidak terjerat (vitamin A bebas). Hal ini dikarenakan pada saat awal pembuatan nanoemulsi telah terjadi stabilisasi globul yang mengandung vitamin A akibat dari lokalisasi molekul surfaktan dan kosurfaktan pada antarmuka minyak dan air sehingga vitamin A yang ditambahkan lagi tidak dapat bergabung dengan globul yang telah terbentuk sebelumnya.

Selain itu, jumlah surfaktan dan kosurfaktan yang tersisa tidak cukup untuk melingkupi permukaan vitamin A dalam membentuk globul vitamin A yang stabil.



Gambar 4 Penampilan Visual Sediaan Nanoemulsi Vitamin A yang Mengandung Vitamin A Tidak Terjerat. G→ Menunjukkan Globul Vitamin A yang Tidak Terjerat (Vitamin A Bebas).

Untuk memperjelas ada tidaknya vitamin A yang tidak terjerat dalam sediaan nanoemulsi, maka dilakukan pewarnaan dengan menggunakan sudan III. Sudan III merupakan pewarna larut lemak yang dapat mewarnai senyawa lipofilik sehingga dapat digunakan sebagai pewarna vitamin A. Nanoemulsi vitamin A yang dibuat dengan formula H dan N diberi pewarna sudan III kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Penambahan sudan III juga dilakukan pada sediaan pembandingan yaitu sediaan nanoemulsi yang mengandung vitamin A yang tidak terjerat.

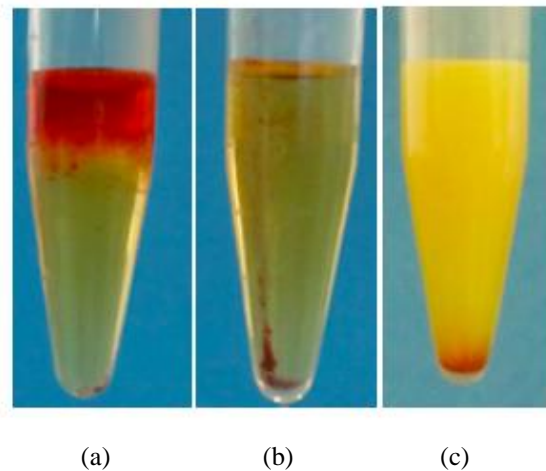
Pada hasil sentrifugasi yang ditunjukkan oleh Gambar 5a terlihat bahwa pada sediaan pembandingan akan terbentuk lapisan merah di bagian atas. Lapisan atas tersebut merupakan vitamin A yang tidak terjerat karena vitamin A

memiliki bobot jenis yang lebih rendah dibandingkan dengan bobot jenis sediaan. Vitamin A bebas dapat berkontak langsung dengan sudan sehingga keberadaannya dalam sediaan dapat diketahui dengan terbentuknya lapisan merah di bagian atas yang merupakan hasil pewarnaan oleh sudan III.

Hasil sentrifugasi sediaan nanoemulsi vitamin A formula H (Gambar 5b) memperlihatkan tidak terdapat lapisan merah di bagian atas. Namun warna sediaan berubah dari kuning menjadi kuning kemerahan akibat adanya penetrasi sudan ke dalam sistem nanoemulsi sehingga mewarnai globul yang masih terdispersi merata dalam sediaan. Karena tidak adanya vitamin A bebas yang dapat diwarnai, maka sebagian besar sudan III yang diberikan ke dalam sediaan akan mengalami pengendapan di dinding dan dasar tabung Eppendorf. Penentuan efisiensi penjeratan sediaan nanoemulsi vitamin A belum dapat ditentukan secara kuantitatif karena sulitnya memisahkan globul vitamin A terhadap vitamin A yang tidak terjerat.

Namun berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui bahwa pembentukan nanoemulsi dengan menggunakan GMO, Cremophor RH-40, dan PEG 400 (1:8:1) akan menghasilkan sediaan yang memiliki efisiensi penjeratan yang tinggi (>95 %). Berdasarkan hasil pengamatan visual dan hasil penelitian sebelumnya, efisiensi penjeratan vitamin A pada sediaan nanoemulsi formula H diperkirakan >95%. Hal ini juga diperkuat oleh hasil pengujian pada formula N (Gambar 5c) yang mengandung vitamin A dengan jumlah 5 kali lebih banyak dibandingkan dengan formula H dan masih tidak memperlihatkan adanya lapisan merah

yang menunjukkan keberadaan vitamin A bebas. Penjeratan yang tinggi dapat dikarenakan vitamin A mudah bercampur dengan minyak dan jumlah



Gambar 5 Hasil sentrifugasi pada sediaan yang diberi pewarna sudan III (a) sediaan pembanding, (b) formula H, dan (c) formula N.

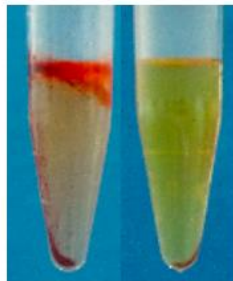
surfaktan yang diberikan ke dalam sediaan mencukupi untuk melingkupi seluruh permukaan minyak dan vitamin A.

Uji Stabilitas Fisik Sediaan dengan Tantangan Sentrifugasi

Uji sentrifugasi merupakan salah satu indikator kestabilan fisik sediaan semisolid. Uji ini bertujuan untuk meningkatkan ketidakstabilan kinetika emulsi dengan menggunakan sentrifuga untuk mempercepat pemisahan partikel fase terdispersi dengan gaya gravitasi (Kowalska *et al*, 2015).

Pada sediaan emulsi konvensional terbentuk lapisan merah di bagian atas tabung Eppendorf sebagai hasil pewarnaan fase minyak oleh sudan III dan pada lapisan bawah terlihat bening seperti air (Gambar 6a). Hasil sentrifugasi tersebut menunjukkan telah terjadi pemisahan yang sempurna pada fasa minyak dan fase air pada sediaan emulsi. Sedangkan pada sediaan

nanoemulsi tidak memperlihatkan terjadinya pemisahan antara kedua fasa tersebut (Gambar 6b). Hal ini menunjukkan bahwa nanoemulsi memiliki kestabilan fisik yang relatif lebih stabil dibandingkan dengan emulsi konvensional.



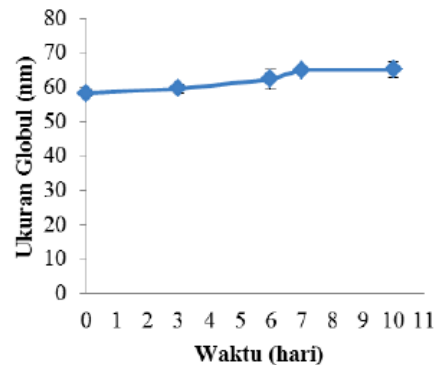
Gambar 6 Hasil Uji Sentrifugasi pada (a) Sediaan Emulsi Vitamin A Konvensional dan (b) Nanoemulsi Vitamin A.

Uji Stabilitas Sediaan terhadap Pengaruh Penyimpanan

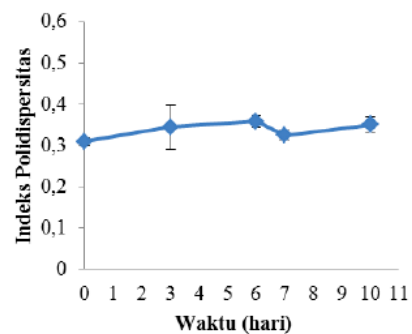
Uji stabilitas dilakukan untuk melihat kestabilan sediaan selama penyimpanan. Uji ini dilakukan pada suhu ruang. Hasil uji stabilitas fisik sediaan nanoemulsi vitamin A ditunjukkan pada Gambar 7.

Ukuran dan indeks polidispersitas vitamin A dalam sediaan nanoemulsi selama 10 hari pengujian menunjukkan nilai yang relatif stabil di mana ukuran globul berada dalam rentang 58-66 nm dengan indeks polidispersitas sekitar 0,3-0,4. Hal ini dapat dikarenakan jumlah surfaktan yang diberikan ke dalam sediaan cukup untuk melingkupi seluruh permukaan minyak dan vitamin A sehingga memberikan halangan sterik dan gaya tolak menolak antar globul untuk bergabung membentuk globul yang berukuran lebih besar (Gao *et al.*, 2008). Selain dilakukan uji stabilitas fisik, juga dilakukan uji terhadap

kestabilan kadar vitamin A dalam sediaan nanoemulsi. Pembanding yang digunakan adalah emulsi konvensional vitamin A. Hasil uji stabilitas



(a)



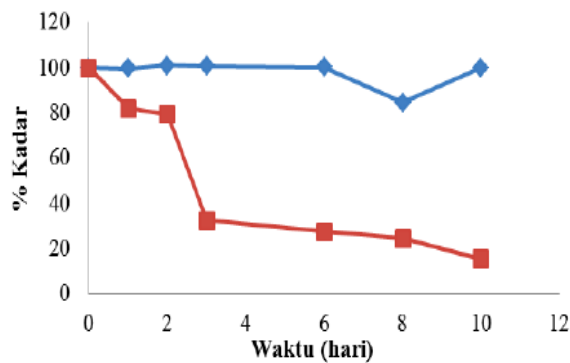
(b)

Gambar 7 Stabilitas Fisik Sediaan Nanoemulsi Vitamin A (Formula H) Selama 10 Hari Penyimpanan Suhu Ruang. (a) Ukuran Globul; (b) Indeks Polidispersitas

kadar sediaan nanoemulsi vitamin A ditunjukkan pada Gambar 8.

Dari Gambar 8 dapat terlihat bahwa selama 10 hari penyimpanan, kadar vitamin A pada sediaan nanoemulsi tidak mengalami perubahan yang signifikan, sedangkan pada emulsi konvensional terjadi penurunan kadar yang signifikan dimulai dari hari kedua ($P < 0,05$; data diolah dengan *software* SPSS 17.0). Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa sediaan nanoemulsi vitamin A memiliki kestabilan kadar yang lebih

baik dibandingkan dengan emulsi konvensional vitamin A. Pada saat awal pembentukan sediaan nanoemulsi dan emulsi konvensional, vitamin A berada dalam globul yang dilindungi oleh surfaktan dan kosurfaktan sehingga kontak langsung vitamin A dengan lingkungan luar dapat dikurangi.



Gambar 8 Stabilitas Kadar Vitamin A Selama 10 Hari Penyimpanan Pada Suhu Ruang. —◆— Formula H; —■— Emulsi Vitamin A

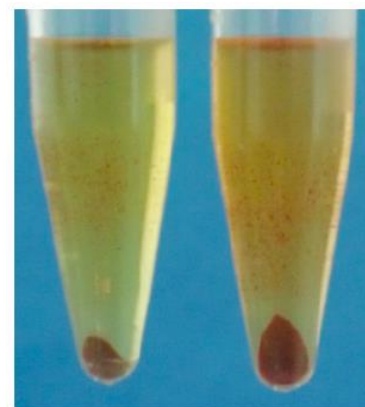
Sediaan emulsi konvensional memiliki kestabilan fisik yang rendah (hasil uji pada Gambar 6a) yang cenderung menyebabkan vitamin A tidak lagi dilindungi oleh surfaktan sehingga terpapar langsung ke lingkungan luar. Vitamin A mudah mengalami oksidasi, isomerisasi, dan polimerisasi saat berada dalam bentuk larutan dengan adanya cahaya dan oksigen, terutama pada suhu yang tinggi (Zhang, 2018). Oleh karena itu, vitamin A yang sudah tidak dilindungi oleh surfaktan akan mengalami degradasi sehingga kadarnya di dalam sediaan menurun. Sedangkan sediaan nanoemulsi memiliki kestabilan fisik yang relatif stabil (Gambar 6b) yang menyebabkan vitamin A tetap berada dalam bentuk globul yang dilindungi oleh surfaktan dan kosurfaktan sehingga degradasi

vitamin A dapat dicegah dan kadar vitamin A dapat dipertahakan.

Uji Stabilitas Sediaan terhadap Pengaruh HCl pH 1,2

Pengujian stabilitas sediaan dalam HCl pH 1,2 perlu dilakukan, di mana pH tersebut mencerminkan pH lambung. Hasil evaluasi sediaan pada pH 1,2 yang meliputi penampilan visual, ukuran globul, distribusi ukuran, dan kadar ditunjukkan pada Tabel 4.

Dari hasil evaluasi sediaan terlihat bahwa ukuran globul, indeks polidispersitas dan kadar sediaan pada pH 1,2 tidak berbeda secara signifikan terhadap sediaan nanoemulsi tanpa pengaruh pH ($P < 0,05$; data diolah dengan *software* SPSS 17.0). Hasil pengamatan visual selama 2 minggu juga menunjukkan bahwa sediaan pada pH 1,2 memiliki tampilan visual yang sama seperti sediaan nanoemulsi tanpa pengaruh pH dan tidak mengalami pemisahan fasa antara fasa minyak dan cair (Gambar 9a).



(a) (b)

Gambar 9 Tampilan Visual Formula H* (Kiri) dan Formula H** (Kanan) (a) Sebelum Disentrifugasi dan (b) Setelah Diberi Pewarna Sudan Iii dan Disentrifugasi.

Tabel 4 Perbandingan Karakteristik Sediaan

Formula	Ukuran Globul (nm) (rata±S.B., n=3)	IP (rata±S.B., n=3)	Kadar (ppm) (rata±S.B., n=3)	Pengamatan selama 2 Minggu
Formula H*	58,10 ± 2,00	0,326 ± 0,021	50440,93±3727,65	Stabil
Formula H**	54,50 ± 0,50	0,320 ± 0,010	52311,71±4812,63	Stabil

* setelah pendispersian 2 g fasa minyak yang mengandung vitamin A dalam 5 mL air deion

** setelah pendispersian 2 g fasa minyak yang mengandung vitamin A dalam 5 mL larutan HCl pH 1,2

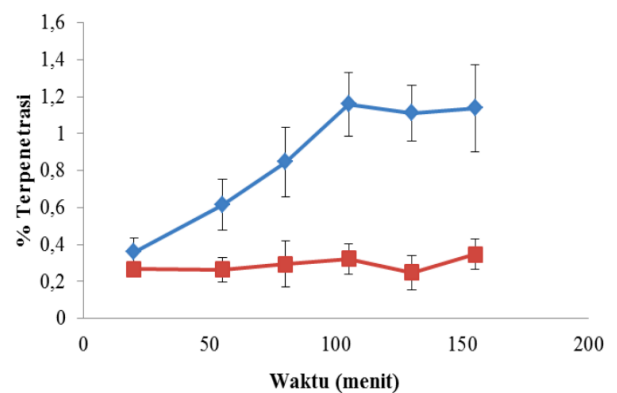
Hal ini dibuktikan dari hasil sentrifugasi sediaan yang telah diberi pewarna sudan III dan tidak membentuk 2 lapisan yang terpisah (Gambar 9b).

Uji Penetrasi secara *Ex Vivo*

Uji penetrasi vitamin A secara *ex vivo* dilakukan untuk membandingkan kecepatan penetrasi vitamin A di usus pada sediaan nanoemulsi terhadap vitamin A tanpa adanya formulasi. Hasil penetrasi vitamin A diperoleh dengan cara mengukur vitamin A menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 326 nm.

Dari gambar 10 dapat dilihat bahwa pada waktu ke-55 hingga ke-155 menit telah terjadi peningkatan yang cukup signifikan pada jumlah vitamin A di formula H yang berpenetrasi melalui usus, sedangkan pada vitamin A tanpa formulasi peningkatan yang terjadi sangat kecil. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa sediaan nanoemulsi memiliki kecepatan penetrasi yang lebih baik secara signifikan dibandingkan dengan vitamin A tanpa formulasi ($P < 0,05$; data diolah dengan *software* SPSS 17.0). Hal ini dikarenakan sediaan nanoemulsi mengandung surfaktan dan kosurfaktan yang dapat menginduksi perubahan permeabilitas pada sel mukosa intestinal sehingga proses penetrasi akan berjalan lebih mudah. Selain itu juga, dapat dikarenakan dari pengaruh ukuran globul di mana ukuran globul yang kecil dapat

meningkatkan luas permukaan spesifik globul yang berkontak dengan sel mukosa intestinal (Rao dan Shao, 2008).



Gambar 10 Kurva Penetrasi Vitamin A pada Usus. —◆— Formula H; —■— Vitamin A tanpa Formulasi

KESIMPULAN

Formulasi sediaan nanoemulsi vitamin A dengan komposisi gliseril monooleat (GMO), Cremophor RH 40 dan PEG 400 dengan kapasitas pemuatan vitamin A sebesar 16,67% terhadap bobot total SNEDDS Vitamin A berhasil dibuat dengan bentuk globul yang sferis berukuran 58,10±2,00 nm, distribusi ukuran globul 0,326±0,021, potensial zeta -0,69 mV, serta efisiensi penjeratan >95%. Sediaan nanoemulsi yang dihasilkan menunjukkan kestabilan fisik yang baik pada tantangan sentrifugasi, selama penyimpanan pada suhu ruang, dan pada pH 1,2.

Sediaan nanoemulsi vitamin A juga berhasil memperlambat degradasi vitamin A dan meningkatkan absorpsi di dalam mukosa intestinal secara signifikan dibandingkan sediaan emulsi konvensional.

DAFTAR PUSTAKA

- Gao, L., Zhang, D., & Chen, M. (2008). Drug nanocrystals for formulation of poorly soluble drugs and its application as potential drug delivery system. *J Nanopart Res*, 10(5), 851–852.
- Imdad, A., Herzer, K., Mayo-Wilson, E., Yakoob, M. Y., & Bhutta, Z. A. (2010). Vitamin a supplementation for preventing morbidity and mortality in children from 6 months to 5 years of age. The Cochrane Collaboration and published in *The Cochrane Library*, Issue 12. doi: 10.1002/14651858.CD008524.pub2
- Kyatanwar, A. U., Jadhav, K. R., & Kadam, V. J. (2010). Self micro-emulsifying drug delivery system (SMEDDS): Review. *J Pharm Res*, 3(1): 75-83.
- Kowalska, M., Ziomek, M., & Zbikowska, A. (2015). Stability of cosmetic emulsion containing different amount of hemp oil. *Int J Cosmet Sci*, 37(4): 408 – 416.
- Rao, S. V. R., & Shao, J. (2008). Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs : I. Formulation Development, *Int J Pharm*, 362(2-3), 7-8.
- Rasaputri, D. H. (2010). *Pengembangan Self-Nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) untuk penghantaran oral interferon alfa 2b: Formulasi, karakterisasi dan uji stabilitas fisik* (Thesis). Sekolah Farmasi ITB, Bandung.
- Sauvant, P., Cansell, M., Sassi, A. H., & Atgie, C. (2011). Vitamin a enrichment: Caution with encapsulation strategies used for food applications, *Food Res Int*, 46(2), 469-479. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.025>
- Sumardjo, D. (2009). *Pengantar kimia buku panduan kuliah mahasiswa kedokteran dan program strata I Fakultas Bioeksakta*, Jakarta: EGC.
- Taha, E. I., Al-Saidan, S., Samy, A. M., & Khan, M. A. (2009). Preparation and in vitro characterization of self-nanoemulsified drug delivery system (SNEDDS) of all-trans-retinol acetate, *Int J Pharm*, 285(1-2), 109-113.
- Ujhelyi, Z., Vecsernyes, M., Feher, P., Kosa, D., Arany P., Nemes D., ... Bacskay I. (2018) Physico-chemical characterization of self-emulsifying drug delivery systems. *Drug Discov Today*, 27: 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.06.005>
- Zhang, G., Meng, F., Guo, Z., Guo, T., Peng, H., Xiao, J., Liu, B., ... Zhang, J. (2018). Enhanced stability of vitamin A palmitate microencapsulated by γ -cyclodextrin metal-organic frameworks, *J Microen*, 35(3): 249–258.
- Zhao, L., Wei, Y., Huang, Y., He, B., Zhou, Y., & Fu J. (2013) Nanoemulsion improves the oral bioavailability of baicalin in rats: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Int J Nanomedicine*, 8(1): 3769–3779. <https://doi.org/10.2147/IJN.S51578>