

Optimasi Nanoemulsi A/M/A Ekstrak Etanol Daun Binahong dan Konjugat AG-Kitosan Menggunakan Desain *Box-Behnken*

(Optimization of W/O/W Multiple Nanoemulsion of Madeira Vein Leaves Extract and Glycolic Acid-Chitosan Conjugate Using Box-Behnken Design)

TRI SUCIATI¹, MALINDA PRIHANTINI^{1,2*}, IRDA FIDRIANNYA¹

¹Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Indonesia

²Universitas Wahid Hasyim, Semarang Indonesia

*Penulis korespondensi, Hp : 085624645411

e-mail: malinda.prihantini@gmail.com

Diterima 20 Agustus 2018, Disetujui 12 September 2019

Abstrak: Penuaan dini pada kulit yang ditandai dengan kerutan-kerutan halus dapat diatasi dengan merangsang produksi kolagen dan menghambat degradasinya, dan juga mengurangi penumpukan korneosit. Daun Binahong telah terbukti menginduksi produksi kolagen dan menghambat degradasinya, sementara asam glikolat meningkatkan deskuamasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengoptimalkan formula nanoemulsi ganda A/M/A dari ekstrak daun Binahong dalam fase A1 dan asam glikolat dalam fase A2. Asam glikolat ditambahkan setelah terkonjugasi dengan kitosan untuk mengurangi efek menyengat pada kulit. Nanoemulsi ganda A/M/A dibuat melalui dua langkah emulsifikasi: A1/M emulsi primer menggunakan penghomogen kecepatan tinggi, dan emulsi sekunder menggunakan pengaduk magnetik. A1/M dioptimalkan termasuk pemilihan kosurfaktan dan konsentrasi ekstrak, diikuti oleh optimasi emulsi sekunder menggunakan metodologi permukaan respon yang terdiri dari 2-level faktorial dan desain *Box-Behnken*. A1/M terdiri dari ekstrak, polisorbate 80 sebagai surfaktan, PEG 400 sebagai kosurfaktan dan isopropil miristat sebagai fase minyak. Faktorial 2 tingkat memberikan tiga faktor penting: waktu sonikasi A1/M, konsentrasi A1/M, dan waktu pengadukan emulsifikasi sekunder. Optimalisasi *Box-Behnken* untuk ukuran bola di bawah 400 nm diperoleh waktu sonikasi A1/M 6-10 menit, konsentrasi A1/M 12-16%, dan waktu pengadukan emulsifikasi sekunder 32-42 menit.

Kata kunci: Daun Binahong, asam glikolat, kitosan, nanoemulsi, A/M/A, *Box-Behnken*, desain faktorial.

Abstract: Skin premature aging which is characterized by fine wrinkles can be overcome by stimulating collagen production and inhibiting its degradation, and also reducing corneocyte buildup. Madeira vein has been shown to induce collagen production and inhibit its degradation, while glycolic acid increase desquamation. The aim of this research was to optimize W/O/W multiple nanoemulsion formula of Madeira vein-leaves extract in W1 phase and glycolic acid in W2 phase. Glycolic acid was added after conjugated with chitosan to reduce its stinging effect on skin. The W/O/W multiple nanoemulsion was prepared through two emulsification steps: W1/O primary emulsion using high speed homogenizer, and the secondary emulsion using magnetic stirrer. W1/O was optimized including the selection of co surfactant and extract concentration, followed by secondary emulsion optimization using response surface methodology consisted of 2-level factorial and Box-Behnken design. The W1/O consisted of extract, polysorbate 80 as surfactant, PEG 400 as co surfactant and isopropyl myristate as oil phase. The 2-level factorial gave the three significant factors: W1/O sonication time, W1/O concentration, and secondary emulsification stirring time. Box-Behnken optimization for globule size below 400 nm was obtained by 6-10 minutes W1/O sonication time, 12-16% W1/O concentration, and 32-42 minutes stirring time of secondary emulsification.

Keywords: Madeira vein, glycolic acid, chitosan, nanoemulsion, W/O/W, Box-Behnken, factorial design.

PENDAHULUAN

PENUAAN kulit adalah terjadinya perubahan struktur dan penurunan fungsi kulit disebabkan oleh faktor endogen dan eksogen⁽¹⁾. Penuaan kulit ditandai dengan munculnya kerutan halus dan menurunnya elastisitas kulit akibat penumpukan stratum korneum dan penurunan produksi kolagen serta peningkatan degradasi kolagen pada lapisan dermis^(2,3). Ekstrak etanol daun binahong (EEDB) mampu meningkatkan produksi kolagen⁽⁴⁾ serta memiliki aktivitas antioksidan⁽⁵⁾ untuk menghambat degradasi kolagen melalui penghambatan pembentukan ROS (*reactive oxygen species*) dalam menginduksi matriks metaloproteinase (MMP). Bahan lain yang mampu mengatasi gejala penuaan kulit adalah asam glikolat (AG) dengan cara menurunkan kohesi interselular antar korneosit sehingga memicu deskuamasi⁽⁶⁾. Namun, AG memiliki efek menyengat di kulit sehingga dilakukan konjugasi dengan kitosan (KS) sebagai golongan aminosakarida untuk mengurangi efek menyengat tersebut⁽⁷⁾.

Sistem nanoemulsi ganda air dalam minyak dalam air (A/M/A) merupakan sistem penghantaran yang dapat memformulasi dua bahan aktif berbeda dalam satu formula⁽⁸⁾. Ukuran dibawah 400 nm dari globul emulsi dapat memfasilitasi bahan aktif berefek pada sintesis kolagen di dermis⁽⁹⁾. Teknik statistika multifaktor, *response surface methodology* (RSM) merupakan teknik optimasi yang lebih komprehensif dibandingkan teknik ovat (*one-variable-at-a-time*) karena menggambarkan efek keseluruhan dari setiap faktor, termasuk interaksi antarfaktor terhadap respon serta lebih efektif dan efisien⁽¹⁰⁾.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Simplisia daun binahong (Lembang Kabupaten Bandung), Asam Glikolat (hibah PT. Paragon Technology & Innovation), Kitosan bobot molekul rendah (17 kDa) (preparasi di Laboratorium Farmasetika ITB), etanol 96% (Brataco), isopropil miristat (IPM) (BASF), polisorbate 80 (Brataco), PEG 400 (Laboratorim Farmasi ITB), sorbitan monolaurat (Laboratorim Farmasi ITB), *Cremophor* RH-40 (BASF), dan *aquideion* (Laboratorim Kimia ITB).

METODE. Karakterisasi Simplisia. Karakterisasi simplisia dalam rangka standardisasi mutu simplisia meliputi penentuan kadar air simplisia, penentuan kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol menurut pedoman Farmakope Herbal Indonesia⁽¹¹⁾.

Ekstraksi. Simplisia daun binahong diekstraksi menggunakan refluks dengan pelarut etanol 96%

selama 2 jam sejak pelarut mendidih. Ekstrak cair dipekatkan menggunakan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental.

Karakterisasi Ekstrak. Karakterisasi EEDB meliputi penentuan bobot jenis, penapisan fitokimia, pengamatan pola kromatogram dan penetapan flavonoid total. Bobot jenis ekstrak 1% ditentukan menggunakan piknometer. Penapisan fitokimia untuk mengecek keberadaan flavonoid, kuinon, saponin, tanin, alkaloid, dan steroid/ triterpenoid. Pengamatan pola kromatogram menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF254, fase gerak kloroform-asam asetat-metanol (9:0.5:0.5), dan pengamatan di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Penetapan flavonoid total menggunakan Metode 2 Farmakope Herbal Indonesia⁽¹¹⁾.

Pembuatan Konjugat AG-KS. Larutan konjugat dibuat dengan melarutkan AG-KS 1:1, diikuti sonikasi selama 10 menit.

Optimasi Formula Nanoemulsi Primer A1/M. Formula A1/M dioptimasi dari penelitian Dwiani (2012) meliputi pemilihan kosurfaktan dan optimasi dosis ekstrak menggunakan metode ovat⁽¹²⁾. Pembentukan nanoemulsi primer dengan mencampur fase air dan fase minyak pada suhu 60-70°C menggunakan *magnetic stirrer* kecepatan 550 rpm selama 1 menit, dilanjutkan Ultraturax pada 10.000 rpm selama 5 menit.

Optimasi Formula Nanoemulsi Ganda A/M/A Menggunakan Desain Eksperimen. Tahap awal dilakukan percobaan pendahuluan menggunakan metode fraksional faktorial 2-level untuk menentukan faktor bebas yang paling signifikan sebagai dasar menentukan faktor pada RSM desain *Box-Behnken*. Pembuatan nanoemulsi ganda A/M/A dilakukan dengan mencampurkan emulsi primer A1/M, surfaktan (*Cremophor* RH 40 – Span 20 4:1), dan propilen glikol ke dalam larutan konjugat AG-KS sebagai fase A2, diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada kecepatan 550 rpm selama 30-50 menit.

Evaluasi Organoleptik, pH, Ukuran Globul, dan Potensial Zeta. Uji organoleptik dilakukan melalui pengamatan secara visual sedangkan pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter yang telah terkalibrasi. Pengukuran ukuran globul dan potensial zeta diukur menggunakan Delsa TM Nano C, Beckman Coulter.

Penentuan Tipe Emulsi. Uji tipe emulsi dilakukan dengan metode pewarnaan menggunakan pewarna larut air metilen biru dan diamati menggunakan mikroskop polarisasi (Olympus BX50) perbesaran 20x10.

Uji Stabilitas Fisik Sentrifuga. Uji stabilitas fisik

menggunakan metode sentrifuga selama 30 menit pada kecepatan 13000 rpm. Sediaan dikatakan stabil jika tidak terjadi pemisahan fasa setelah sentrifugasi⁽¹³⁾.

Uji Penetrasi Menggunakan Sel Difusi. Uji difusi dilakukan terhadap sediaan nanoemulsi ganda A/M/A hasil optimasi dan emulsi primer A1/M, menggunakan sel difusi model aliran dengan membran kertas Whatmann no 1 (diameter membran 9 cm, diameter pori 11 μ m) yang telah direndam dalam cairan Spangler selama 15 menit 24 jam sebelum digunakan⁽¹⁴⁾. Pengambilan sampel dilakukan setiap jam selama 8 jam sebanyak 3 mL. Kadar terdifusi diukur dengan metode total flavonoid.

Uji Iritasi Kulit. Uji iritasi kulit dilakukan terhadap kelinci albino jantan sehat dengan bobot 2,5-3,5 kg. Pengujian dilakukan dengan uji pendahuluan terhadap 1 ekor kelinci dan dilanjutkan dengan penambahan 2 ekor kelinci. Parameter yang diamati terjadinya eritema dan edema lalu dihitung skor iritasinya^(15,16).

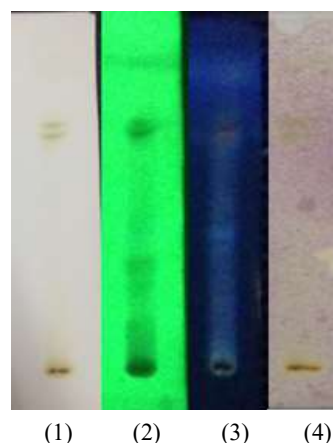
HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Simplisia. Kadar air simplisia kering daun binahong sebesar 5,00 % (v/b). Kadar air simplisia lebih dari 10% dapat memicu terjadinya reaksi enzimatik dan menyebabkan pertumbuhan mikroba yang dapat mengakibatkan kerusakan pada simplisia sehingga menurunkan mutu simplisia. Kadar sari larut air sebesar 25,02% dan kadar sari larut etanol 5,43%.

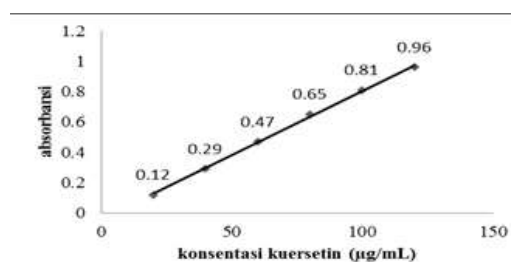
Ekstraksi. Rendemen EEDB pekat yang diperoleh adalah 14,61%. Rendemen EEDB pekat dari simplisia yang tumbuh di lokasi yang sama adalah sebesar 12,07%⁽¹⁷⁾. Hasil menunjukkan simplisia daun suji yang tumbuh di Perkebunan Manoko Lembang dan diekstraksi menggunakan refluks dengan pelarut etanol 96% memiliki nilai rendemen yang hampir sama. Perbedaan yang terjadi kemungkinan karena waktu panen yang berbeda.

Karakterisasi Ekstrak. Bobot jenis EEDB 1% adalah 0,93 gram/mL. Hasil penapisan fitokimia EEDB positif mengandung golongan senyawa flavonoid, fenol, dan steroid/triterpenoid. Hasil penapisan fitokimia EEDB yang berasal dari lokasi tumbuh yang sama mengandung senyawa flavonoid, saponin, alkaloid, dan steroid/triterpenoid⁽¹⁷⁾. Adanya perbedaan kandungan senyawa karena waktu panen yang berbeda. Pola kromatogram EEDB pada Gambar 1 menunjukkan hasil penyemprotan dengan DPPH 0,2% memberikan warna kuning dengan latar belakang ungu sehingga disimpulkan EEDB mengandung senyawa antioksidan. Berdasarkan kurva

kalibrasi kuersetin pada Gambar 2 diperoleh regresi $y = 0,0085x - 0,044$ dengan koefisien korelasi (R^2) sebesar 0,9989. Hasil penetapan flavonoid total pada ekstrak adalah 2,47% ekivalensi kuersetin.



Gambar 1. Kromatogram lapis tipis pemantauan ekstrak, (1) di bawah sinar tampak, (2) di bawah sinar UV λ 254 nm, (3) di bawah sinar UV λ 366 nm, (4) disemprot DPPH 0,2% dalam metanol.



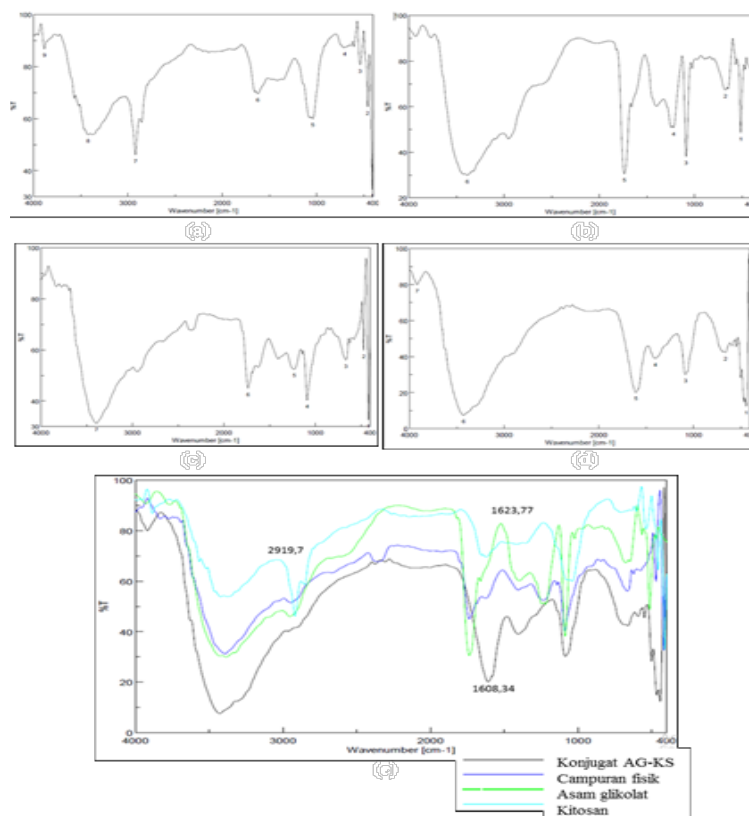
Gambar 2. Kurva kalibrasi kuersetin.

Konjugat AG-KS. Pada data inframerah di Gambar 3, tiga hal yang dapat mengindikasikan suatu reaksi terjadi adalah muncul atau hilangnya puncak baru, pergeseran puncak, dan perubahan intensitas puncak. Intensitas serapan suatu spektrum inframerah pada kadar zat yang sama menandakan kekuatan momen dipolnya. Kekuatan momen dipol menyatakan kepolaran dari suatu zat berdasarkan elektronegativitas relatif atom-atom yang terlibat dalam ikatan tersebut bergantung pada besarnya perbedaan muatan dan jarak antara kedua muatan⁽¹⁸⁾.

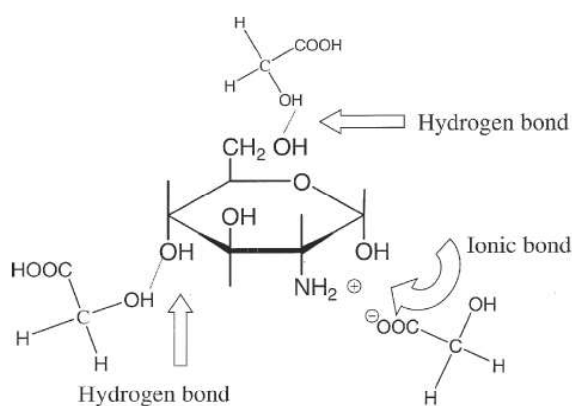
Pada spektrum konjugat AG-KS muncul pita baru pada 1608,34 cm^{-1} yang menunjukkan pergeseran ikatan N-H karena terjadi interaksi ionik antara gugus amina dari KS—yang mengalami protonasi sehingga bermuatan positif—dengan gugus C=O karboksilat dari AG yang bermuatan negatif pada Gambar 4. Hal ini didukung dengan hilangnya ikatan

C=O karboksilat dari AG pada bilangan gelombang 1735,62 cm⁻¹. Selain itu, tingkat serapan inframerah ikatan hidrogen pada bilangan gelombang 3200-3600

cm⁻¹ mengalami peningkatan pada spektrum konjugat AG-KS dibandingkan dengan spektrum AG dan KS, serta campuran fisik keduanya.



Gambar 3. Spektrum inframerah karakterisasi pembentukan konjugat AG-KS: (a) KS, (b) AG, (c) campuran fisik AG-KS, (d) konjugat AG-KS, (e) overlay spektrum KS, AG, campuran fisik dan konjugat AG-KS.



Gambar 4. Interaksi antara AG dengan KS pada konjugat AG-KS⁽⁴²⁾.

Formula Nanoemulsi Primer A1/M. Pembuatan nanoemulsi ganda A/M/A dilakukan dengan metode dua tahap emulsifikasi⁽¹⁹⁾. Berdasarkan hasil optimasi

pada Tabel 1 dipilih PEG 400 sebagai kosurfaktan dalam formula karena dapat memberikan emulsi yang jernih dan stabil serta tidak terjadi pemisahan

fasa. Hasil optimasi penambahan jumlah ekstrak ditampilkan pada Tabel 2. Dipilih formula P3.3 karena mengandung konsentrasi ekstrak paling besar dan tidak menunjukkan pemisahan fasa. Berdasarkan hasil optimasi didapatkan formula A1/M yang optimum terdiri dari EEDB 5%, aquadeion 10%, polisorbat 80 27,5%, PEG 400 12,5%, dan IPM 45%.

IPM merupakan minyak non-trigliserida berat molekul rendah, dengan karakteristik polaritas tinggi, tegangan antarpermukaan rendah dan viskositas rendah. Minyak dengan karakteristik tersebut menguntungkan dalam pembuatan nanoemulsi karena lebih mudah menghasilkan ukuran nano dibandingkan dengan minyak mineral dan minyak tumbuhan yang memiliki ukuran molekul besar⁽²⁰⁾.

IPM juga meningkatkan penetrasi percutan melalui mekanisme menginduksi ketidakteraturan pada struktur SC yang rigid dengan cara bagian polar dari gugus ester pada IPM berinteraksi dengan bagian polar dari membran interselular SC sedangkan bagian alkilnya berinteraksi dengan sel korneosit. Hal ini membuat fluiditas lipid membran interselular pada SC meningkat sehingga lebih mudah untuk dilewati⁽²¹⁾. Metode pencampuran dalam pembuatan A1/M merupakan metode pencampuran berenergi tinggi. Proses emulsifikasi menggunakan metode ini dapat memecah droplet menjadi globul-globul berukuran kecil dan mengusir gelembung udara dari dalam media sehingga menghasilkan daerah dengan aliran hidrodinamik yang kuat di sekitar fase air⁽²²⁾.

Tabel 1. Optimasi pemilihan kosurfaktan.

	Jumlah bahan dalam sediaan (% b/b)		
	P1	P2	P3
Aquadeion	10	10	10
Polisorbat 80	27,5	27,5	27,5
Gliserin	12,5	0	0
Propilen glikol	0	12,5	0
PEG 400	0	0	12,5
Isopropil Miristat ad	100	100	100
Pengamatan	Translusen	Translusen	Jernih

Tabel 2. Optimasi jumlah ekstrak.

Formula	Jumlah bahan dalam sediaan (% b/b)		
	P3.1	P3.2	P3.3
Ekstrak	0,5	2	5
Aquadeion	10	10	10
Polisorbat 80	27,5	27,5	27,5
PEG 400	12,5	12,5	12,5
Isopropil Miristat ad	100	100	100
Pengamatan	Kuning jernih, stabil	Kuning kehitaman, stabil	Hitam pekat, stabil

Formula Nanoemulsi Ganda A/M/A Menggunakan Desain Eksperimen. Formula nanoemulsi A/M/A terdiri dari emulsi primer A1/M, surfaktan, peningkat viskositas, dan larutan konjugat AG-KS sebagai fase A2. Pada pembuatan emulsi ganda A/M/A diperlukan dua emulgator yaitu emulgator HLB rendah untuk stabilisasi permukaan A1/M dan emulgator HLB lebih tinggi untuk

stabilisasi permukaan M/A2⁽²³⁾. Dalam penelitian ini digunakan kombinasi surfaktan polisorbat 80 - PEG 400 27.5% : 12.5% dengan HLB 13,94 sebagai emulgator A1/M dan kombinasi Cremophor RH 40 - Span 20 4:1 dengan HLB 14,52 sebagai emulgator kedua. Polimerik surfaktan lebih dipilih dibandingkan surfaktan monomer karena dapat meningkatkan pelingkupan fase dalam selama proses emulsifikasi

sehingga memberikan enkapsulasi yang lebih baik⁽²⁴⁾. Pada tahap emulsifikasi pertama digunakan ultrasonikasi, sedangkan pada tahap kedua digunakan magnetic stirrer karena pada tahap ini globul yang terbentuk dapat rusak dan air yang telah terenkapsulasi pada fase dalam dapat keluar sehingga sebaiknya digunakan metode pencampuran berenergi rendah⁽²⁵⁾.

Hasil uji pendahuluan optimasi formula A/M/A menggunakan desain fraksional faktorial 2-level tercantum pada Tabel 3. Respon ukuran globul dianalisa efek paretonya untuk mengidentifikasi faktor yang paling signifikan diantara keempat faktor

bebas tersebut. Hasilnya hanya penambahan propilen glikol yang signifikan mempengaruhi ukuran globul nanoemulsi A/M/A ($P 0,022$, $\alpha 0,05$). Namun, ukuran globul merupakan pengaruh beberapa faktor yang saling terkait, sehingga dipilih ketiga faktor (A, B, D) untuk dilanjutkan ke tahap Box-Behnken. Waktu dan kecepatan pencampuran atau waktu sonikasi perlu dioptimasi selama proses pembuatan dalam rangka efisiensi proses⁽²⁶⁾. Dengan pertimbangan efisiensi, dipilih kecepatan pengadukan pada nilai minimum yaitu 550 rpm, konsentrasi surfaktan 10%. Hasil desain uji Box-Behnken ditampilkan pada Tabel 4. dan parameter statistiknya pada Tabel 5.

Tabel 3. Desain fraksional faktorial 2-level formula nanoemulsi ganda A/M/A⁽²⁾.

Formula	Faktor					Respon Ukuran
	Sonikasi	A1/M	Smix (%)	Waktu	Kecepatan	
1	5	10	10	50	550	832,8
2	10	20	10	50	1100	Invalid
3	10	10	5	30	550	322,4
4	10	10	10	30	1100	Invalid
5	5	20	5	30	1100	1165,9
6	5	10	5	50	1100	355,0
7	5	20	10	30	550	1589,3
8	10	20	5	50	550	Invalid

Tabel 4. Hasil uji Box-Behnken formula nanoemulsi ganda A/M/A.

Formula	Faktor			Respon Ukuran globul (nm)
	Sonikasi	A1/M	Waktu pengadukan (menit)	
1	7,5	20	30	506,9
2	10,0	15	30	552,0
3	10,0	15	50	331,0
4	5,0	15	30	1252,5
5	7,5	10	50	1020,6
6	7,5	20	50	1186,2
7	5,0	20	40	1189,5
8	10,0	20	40	814,6
9	7,5	15	40	324,7
10	5,0	15	50	561,1
11	5,0	10	40	354,5
12	7,5	15	40	302,3
13	7,5	10	30	642,8
14	10,0	10	40	276,2
15	7,5	15	40	294,9

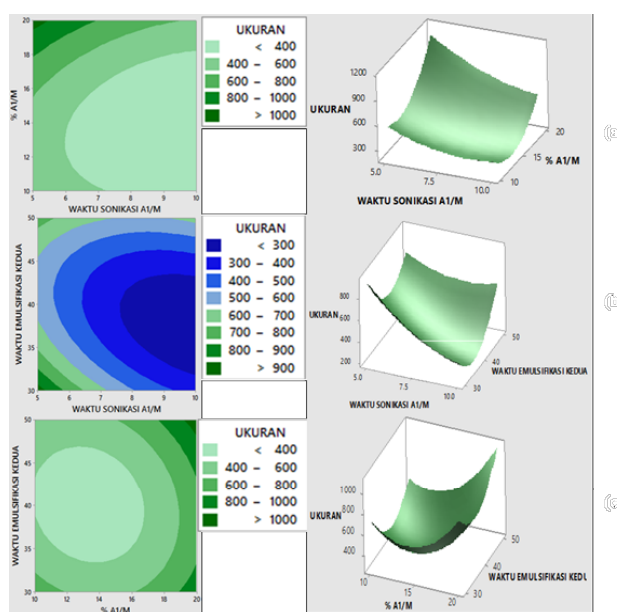
Tabel 5. Parameter statistika hasil uji *Box-Behnken* formula nanoemulsi ganda A/M/A.

Source	Df	Sum square	Mean square	F value	P value
Model	9	8476910	941879	2,66	0,147
η_1	1	4836672	4836672	13,66	0,014
η_2	1	1062007	1062007	3,00	0,144
η_3	1	138391	138391	0,39	0,559
η_1^2	1	1211675	1211675	3,42	0,124
η_2^2	1	15311	15311	0,04	0,843
η_3^2	1	832565	832565	2,35	0,186
η_{12}	1	255177	255177	0,72	0,435
η_{13}	1	208986	208986	0,59	0,477
η_{23}	1	2338	2338	0,01	0,938
Lack of fit	3	1076561	358854	1,04	0,526
Pure error	2	693386	346693		
Total	14				

*p<0,05

Berdasarkan analisis efek utama dari setiap faktor terhadap ukuran globul terlihat bahwa semakin lama waktu sonikasi A1/M, ukuran globul nanoemulsi ganda A/M/A yang dihasilkan semakin kecil karena terjadi pemecahan droplet menjadi ukuran yang lebih kecil melalui mekanisme disrupsi⁽²⁷⁾. Pembentukan nanoemulsi dipengaruhi oleh kesetimbangan antara disrupsi dan koalesen. Meningkatnya konsentrasi

emulsi primer membuat surfaktan dalam formula tidak cukup lagi untuk dapat teradsorpsi pada permukaan droplet yang baru terbentuk sehingga mengakibatkan pecahnya droplet selama proses emulsifikasi yang akibatnya kembali menaikkan ukuran globul. Pembentukan ukuran globul yang lebih besar seiring dengan meningkatnya waktu pengadukan mengakibatkan terjadinya *over-processing* selama tahap emulsifikasi yang memicu koalesen⁽²⁶⁾.



Gambar 5 Grafik kontur 2 dimensi dan 3 dimensi desain *Box-Behnken* nanoemulsi ganda A/M/A terhadap respon ukuran, (1) waktu sonikasi A1/M terhadap %A1/M, (2) waktu sonikasi A1/M terhadap waktu emulsifikasi kedua, (3) %A1/M terhadap waktu emulsifikasi kedua.

Hasil analisa pengaruh interaksi antar faktor terhadap respon digambarkan dalam pada Gambar 5. Berdasarkan grafik tersebut, nanoemulsi ganda dengan ukuran dibawah 400 nm dapat dihasilkan melalui formula A1/M sebanyak 12-16%, waktu sonikasi A1/M selama 6-10 menit, dan waktu emulsifikasi kedua menggunakan magnetic stirer selama 32-42 menit. Dari ketiga model matematik, ditentukan formula optimum melalui nilai turunan pertama dari masing-masing fungsi untuk tiap variabel. Nilai minimum atau maksimum dari satu persamaan diperoleh saat gradien t dari nilai turunan pertama sama dengan nol⁽²⁸⁾. Hasil turunan pertama untuk setiap faktor atau formula optimum yaitu konsentrasi A1/M 14%, waktu sonikasi A1/M 10 menit, dan waktu emulsifikasi kedua selama 38 menit.

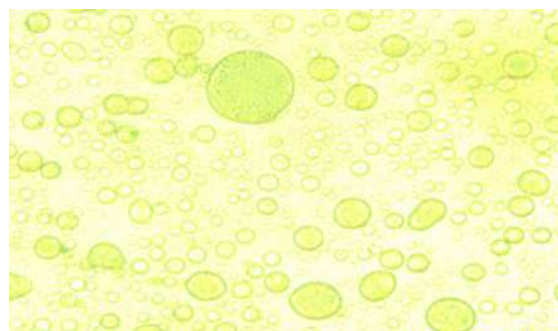
Pengamatan Organoleptik, pH, Ukuran Globul, dan Potensial Zeta. Hasil uji organoleptik terhadap sediaan hasil optimasi memiliki karakteristik encer, berwarna coklat, jernih, beraroma khas aromatik dan ekstrak. Sediaan berada pada pH 4,34 dengan ukuran globul sebesar 214 ± 104 nm. Jika dibandingkan dengan prediksi ukuran menurut desain *Box-Behnken* maka galatnya sebesar 5,13%. Hasil analisis potensial zeta terhadap sediaan optimum didapatkan nilai -6,18 mV, larutan konjugat AG-KS -2,10 mV, dan larutan KS +15,69 mV. Muatan negatif pada sediaan dan larutan konjugat AG-KS kemungkinan disebabkan oleh AG bebas yang tidak terkonjugasi dengan KS. Suatu sistem koloid dengan nilai potensial zeta absolut (negatif maupun positif) diatas 30 mV stabil secara elektrik karena nilai tersebut mengindikasikan derajat tolak-menolak antar muatan sejenis dalam sistem dispersi^(29,30).

Tipe Emulsi. Hasil uji tipe emulsi ditampilkan pada Gambar 6. Berdasarkan gambar tersebut dapat dinyatakan bahwa tipe nanoemulsi ganda yang terbentuk adalah tipe air dalam minyak dalam air (A/M/A), ditandai dengan warna biru pada bagian luar globul (fase A2) yang didalamnya tersusun atas beberapa globul kecil (fase minyak) yang pada bagian tengahnya tampak titik-titik berwarna biru (fase A1). Emulsi ganda hasil optimasi termasuk kategori tipe C yang sangat menguntungkan dalam sistem penghantaran obat karena dapat memberikan pelepasan terkontrol dari bahan yang terenkapsulasi dibandingkan dengan tipe A dan B⁽³¹⁾.

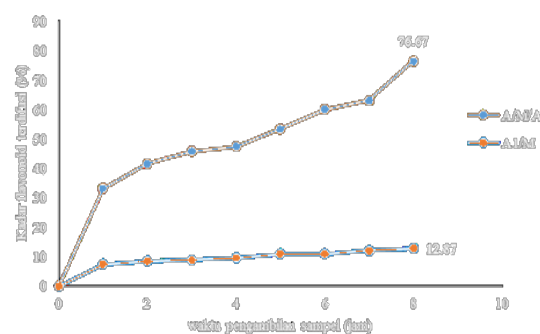
Stabilitas Fisik Sediaan. Hasil uji stabilitas fisik menggunakan metode sentrifuga tidak terjadi pemisahan fase pada sediaan. Hal tersebut mengindikasikan secara fisik sediaan stabil selama 1 tahun.

Uji Penetrasi Menggunakan Sel Difusi. Hasil uji penetrasi terhadap sediaan ditampilkan pada

Gambar 7, dengan kadar flavonoid terpenetrasi hingga jam ke-8 untuk sediaan optimum nanoemulsi ganda A/M/A mencapai 76,67% dan untuk emulsi primer A1/M mencapai 12,86%. Rendahnya kadar flavonoid terpenetrasi pada sistem A1/M karena minyak sebagai fase terluar dari sistem memiliki koefisien partisi yang rendah di cairan penerima sehingga jumlah flavonoid di cairan penerima sebanding dengan partisi dari minyak pembawanya di cairan penerima, akibatnya kadar flavonoid yang terukur di cairan penerima cenderung konstan tiap waktu pengambilan sampel⁽³²⁾



Gambar 6. Nanoemulsi ganda A/M/A hasil optimasi.



Gambar 7. Profil difusi sediaan nanoemulsi ganda A/M/A dan emulsi primer A1/M.

Uji Iritasi Kulit. Hasil uji iritasi sediaan terhadap 3 ekor kelinci memberikan nilai indeks iritasi primer sebesar 0,41 dan termasuk dalam kategori iritasi sangat ringan⁽²¹⁾. Eritema tingkat 1 dan 2 yang muncul pada ketiga kelinci selama pengamatan pada jam ke-24, 48, dan 72 kemungkinan karena AG bebas yang belum terkonjugasi.

SIMPULAN

Sediaan nanoemulsi ganda A/M/A terdiri dari emulsi primer A1/M yang mengandung EEDB 5%, polisorbitat 80 27,5%, PEG 400 12,5% dan isopropil miristat 45%. Hasil optimasi *Box-Behnken* terhadap formula

nanoemulsi ganda A/M/A untuk mendapatkan ukuran globul dibawah 400 nm terdiri dari waktu sonikasi A1/M 6-10 menit, konsentrasi A1/M 12-16%, surfaktan 10%, peningkat viskositas 2,5%, kecepatan dan waktu pengadukan tahap emulsifikasi kedua adalah 550 rpm selama 32-42 menit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada pihak-pihak yang sudah membantu dalam penyediaan bahan penelitian: PT. BASF Indonesia dan PT. Paragon Technology and Innovation.

DAFTAR PUSTAKA

- Ganceviciene, Ruta, et al., 2012, Skin anti-aging strategies. *Dermato-endocrinology*, 4(3): 308-19.
- Baumann L., 2009, *Cosmetic dermatology principle and practice 2nd ed*, New York: The McGraw-Hill Companies. p. 3-8, 34-8.
- Draeos ZD., 2016, *Cosmetic dermatology products and procedure 2nd ed*, West Sussex: John Wiley & Sons, p. 5.
- Raust AA., 2012, Pengembangan formula matriks berbasis mikropartikel kitosan sebagai sistem penghantaran EEDB untuk kultivasi sel fibroblast [tugas akhir], Bandung: Program Sarjana Institut Teknologi Bandung.
- Amanda P., 2012, Isolasi suatu senyawa antioksidan dari ekstrak etil asetat daun binahong (*Anredera Cardifolia* (Ten.) Steenis [tugas akhir], Bandung: Program Sarjana, Institut Teknologi Bandung.
- Sharad, J., 2013, Glycolic acid peel therapy – a current review, *Dove Press Journal: Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 6, 281-8.
- Rosen M., 2005, *Delivery system handbook for personal care and cosmetic products: technology, applications and formulations*, New York: William Andrew, p. 881-908.
- Kovács, A., Erős, I., & Csóka, I., 2016, Optimization and development of stable w/o/w cosmetic multiple emulsions by means of the Quality by Design approach, *International Journal of Cosmetic Science*, 38 (2), 128-38.
- Verma, D. D., Verma, S., Blume, G., & Fahr, A., 2003, Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin, *International Journal of Pharmaceutics*, 258 (1-2), 141-51.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliviera, E. P, Villar, L. S., dan Escaleira, L.A., 2008, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76, 965 – 77.
- Kementerian Kesehatan RI. Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2011, *Suplemen II Farmakope Herbal Indonesia edisi II*, Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Dwiani, R. R. S., 2012, Formulasi emulsi ganda A/M/A α – Arbutin dan uji aktivitas inhibisi sediaan terhadap enzim tirosinase, Tugas akhir Program Sarjana, Institut Teknologi Bandung.
- Pamudji, J. S., Mauludin, R., Indriani, N., 2016, Development of nanostructured lipid carrier formulation containing of retinyl palmitate, *Int J Pharm Pharm Sci*, 8 (2), 256-60.
- Tofani, R. P., Sumirtapura, Y. C., & Darijanto, S. T., 2016, Formulation, characterisation, and in vitro skin diffusion of nanostructured lipid carriers for deoxyarbutin compared to a nanoemulsion and conventional cream. *Scientia Pharmaceutica*, 84 (4), 634-45.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI), 2014, Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan no 7 tentang pedoman uji toksisitas nonklinik secara in vivo, BPOM RI, Jakarta.
- OECD, 2015, Acute dermal irritation/corrosion. in OECD guidelines for the testing of chemicals section 4 no. 404, OECD, Paris.
- Raust, A., A., 2017, Pengembangan formula matriks berbasis mikropartikel kitosan sebagai sistem penghantaran ekstrak etanol daun binahong untuk kultivasi sel fibroblas, Tugas akhir Program Sarjana, Institut Teknologi Bandung.
- Watson, David G., 2005, *Pharmaceutical Analysis 2nd ed.*, United Kingdom, Oxford, 135, 195.
- Mahmood, T., Akhtar, N., & Manickam, S., 2014, Interfacial film stabilized W/O/W nano multiple emulsions loaded with green tea and lotus extracts: systematic characterization of physicochemical properties and shelf-storage stabilit, *Journal of nanobiotechnology*, 12 (1), 20.
- Wang, Y., 2014, Preparation of Nano- and Microemulsion using Phase Inversion and Emulsion Titration Methods, Thesis Master of Food and Technology, Massey University, 6 – 36.
- Eichner, A., Stahlberg, S., Sonnenberger, S., Lange, S., Dobner, B., Ostermann, A., & Neubert, R. H., 2017, Influence of the penetration enhancer isopropyl myristate on stratum corneum lipid model membranes revealed by neutron diffraction and ^2H NMR experiments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1859 (5), 745-55.
- Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A. C., Texier, I., Vinet, F., Poulin, P., & Bibette, J., 2011, How to prepare and stabilize very small nanoemulsions, *Langmuir*, 27(5), 1683-92.
- Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C., & Runkel, F., 2009, Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 338 (1), 184-92.
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N., 2004, Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters, *Advances in Colloid and Interface Science*, 108, 29-41.
- Schuch, A., Deiters, P., Henne, J., Köhler, K., &

- Schuchmann, H. P., 2013, Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: droplet breakup and release of water, *Journal of colloid and interface science*, 402, 157-64.
26. Rezaee, M., Basri, M., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., Chaibakhsh, N., & Karjiban, R. A., 2014, Formulation development and optimization of palm kernel oil esters-based nanoemulsions containing sodium diclofenac. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 539.
27. Ngan, C. L., Basri, M., Lye, F. F., Masoumi, H. R. F., Tripathy, M., Karjiban, R. A., & Abdul-Malek, E., 2014, Comparison of process parameter optimization using different designs in nanoemulsion-based formulation for transdermal delivery of fullerene, *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4375.
28. Saddler, David, Shea, Julia, Ward, Derek., 2011, 12 B Stationary Points and Turning Points, *Cambridge 2 Unit Mathematics Year 11*, Cambridge University Press, 318.
29. Grumezescu A. M., 2016, Emulsions nanotechnology in the agri-food industry vol. 3, Academic Press Elsevier, London, 18-9.
30. Ribeiro, R. C. D. A., Barreto, S. M. A. G., Ostrosky, E. A., Rocha-Filho, P. A. D., Veríssimo, L. M., & Ferrari, M., 2015, Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) mill extract as moisturizing agent, *Molecules*, 20 (2), 2492-509.
31. Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A., 2015, Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation, *International journal of pharmaceutics*, 496 (2), 173-90.
32. Ferreira, L. A. M., Seiller, M., Grossiord, J. L., Marty, J. P., & Wepierre, J., 1995, Vehicle influence on in vitro release of glucose: w/o, w/o/w and o/w systems compared, *Journal of controlled release*, 33 (3), 349-56.