

ARTIKEL PENELITIAN

**FORMULASI EMULSI AIR-DALAM-MINYAK-DALAM-AIR (A/M/A)
UNTUK STABILISASI ANTIOKSIDAN**

**WATER-IN-OIL-IN-WATER (W/O/W) EMULSION FORMULATION
FOR ANTIOXIDANT STABILIZATION**

Heuw Olivia Maria, Dion Notario, Erna Wulandari*

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya,
Jl. Pluit Raya No. 2, Jakarta 14440

* **Korespondensi:** erna.wulandari@atmajaya.ac.id

ABSTRACT

Introduction: *Hydrophilic antioxidants offer significant therapeutic benefits; however, their application is limited by their susceptibility to degradation. Therefore, an effective delivery system is required to enhance their stability.*

Methods: *In this study, vitamin C was used as the model drug and formulated into a water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion using a two-step emulsification technique. The internal phase was formulated with 5% polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and was prepared at 55°C with stirring at 700 rpm, while the external phase was prepared at 55°C and 600 rpm, using combinations of Tween 20 and Span 80 as emulsifiers. The stability study was conducted at room temperature (RT) and 40°C. Vitamin C stability was assessed based on the percentage of remaining concentration obtained from a calibration curve, which was then used to determine the reaction order and calculate the t_{90} values. A 1% vitamin C solution and W/O emulsion were used as comparators.*

Results: *The W/O/W emulsion showed phase separation after 7 days at RT and 3 days at 40°C. The t_{90} values were 2.94 days (RT) and 1.85 days (40°C). ANOVA results indicated significant differences in t_{90} values between formulations ($p < 0.05$). The physical instability indicated the loss of the emulsion stability to encapsulate vitamin C, thereby accelerating the degradation rate.*

Conclusion: *In this study, the W/O/W emulsions did not improve the vitamin C stability compared to 1% vitamin C solution and W/O emulsion due to formulation factors, such as the selection and innate stability of the emulgator and the osmotic pressure of the system.*

Key Words: *antioxidant, emulsion, water-in-oil-in-water, W/O/W, stability*

ABSTRAK

Pendahuluan: Senyawa antioksidan hidrofilik memiliki banyak manfaat, namun aplikasinya masih terbatas dikarenakan sifatnya yang mudah terdegradasi. Oleh karena itu, dibutuhkan sistem yang dapat meningkatkan stabilitas antioksidan hidrofilik.

Metode: Pada penelitian ini, dilakukan penelitian eksperimental formulasi dengan pemodelan menggunakan vitamin C yang akan distabilkan dengan sistem emulsi ganda A/M/A. Emulsi A/M/A dibuat dengan metode emulsifikasi dua tahap. Fase internal dibuat menggunakan emulgator poligliserol polirisinoleat (PGPR) 5% pada suhu 55°C dan diaduk dengan kecepatan 700 rpm. Fase eksternal dibuat pada suhu yang sama dengan kecepatan pengadukan 600 rpm menggunakan emulgator kombinasi Tween 20 (3,48%) dan Span 80 (6,52%). Uji stabilitas vitamin C pada emulsi A/M/A dilakukan pada suhu ruang dan 40°C. Stabilitas vitamin C dievaluasi dari persen sisa kadar yang diperoleh melalui kurva baku, yang kemudian digunakan untuk menentukan kinetika orde dan nilai t_{90} .

Hasil: Karakterisasi fisik emulsi A/M/A menunjukkan terjadinya pemisahan fase setelah 7 hari pada suhu ruang dan setelah 3 hari pada suhu 40°C. Nilai t_{90} yang diperoleh sebesar 2,94 hari pada suhu ruang dan 1,85 hari pada suhu 40°C. Hasil analisis ANOVA menunjukkan adanya perbedaan signifikan nilai t_{90} antar formula ($p < 0,05$). Ketidakstabilan fisik pada emulsi mengindikasikan menurunnya kemampuan emulsi A/M/A dalam mengenkapsulasi vitamin C, sehingga mempercepat laju degradasinya.

Simpulan: Dalam penelitian ini, emulsi A/M/A yang dibuat tidak meningkatkan vitamin C dibandingkan dengan larutan vitamin C 1% dan emulsi A/M yang diinduksi oleh faktor formulasi, misalnya pemilihan dan stabilitas dari emulgator serta tekanan osmotik sistem.

Kata Kunci: antioksidan, air-dalam-minyak-dalam-air, A/M/A, emulsi, stabilitas

PENDAHULUAN

Antioksidan merupakan senyawa yang bermanfaat dalam industri farmasi dan kesehatan. Senyawa antioksidan banyak dimanfaatkan untuk suplemen kesehatan, sebagai bahan aktif dalam sediaan kosmetik, dan untuk memperpanjang umur simpan sediaan farmasi. Antioksidan merupakan senyawa yang bekerja dengan mendonorkan elektron kepada radikal bebas, sehingga dapat menstabilkan senyawa radikal bebas yang memiliki elektron tidak berpasangan.¹ Meskipun memiliki banyak manfaat, aplikasi antioksidan masih terbatas dikarenakan sifatnya yang tidak stabil dan mudah terdegradasi.² Maka, dibutuhkan sebuah sistem yang dapat meningkatkan stabilitas antioksidan. Antioksidan hidrofilik merupakan senyawa antioksidan yang larut dalam air. Beberapa contoh senyawa antioksidan hidrofilik adalah glutathion, senyawa polifenol, dan vitamin C.³ Pada penelitian ini, pemodelan dilakukan menggunakan vitamin C. Vitamin C bekerja sebagai antioksidan melalui penetralan radikal bebas dengan pendonoran elektron.⁴

Sediaan emulsi merupakan salah satu sistem yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas antioksidan. Emulsi adalah sistem terdispersi dari dua cairan yang tidak saling bercampur.⁵ Sistem emulsi ganda air-minyak-air (A/M/A) merupakan sistem yang terdiri dari globul air (fase internal) yang terdispersi dalam globul minyak yang terdispersi dalam fase kontinu air eksternal.⁶ Sistem A/M/A distabilkan oleh dua lapis emulgator: (1) pada fase internal antarmuka air dan minyak, dan (2) pada fase eksternal antar muka emulsi

A/M dengan fase air luar. Pemilihan emulgator merupakan hal yang krusial dan dipilih berdasarkan *Hydrophilic Lipophilic Balance* (HLB) dari minyak yang digunakan. Sistem A/M/A dapat digunakan untuk melindungi senyawa yang mudah terdegradasi. Hal ini disebabkan oleh karakteristik emulsi ganda yang dapat mengenkapsulasi zat aktif pada fase internal, yang berfungsi sebagai lapisan pelindung untuk melindungi zat aktif dari lingkungan eksternal.⁷ Salah satu contoh sistem emulsi ganda adalah aplikasinya dalam industri pangan. Sistem ini digunakan untuk meningkatkan stabilitas berbagai produk pangan seperti keju dan susu.⁸ Pada industri pangan, sistem emulsi ganda dimanfaatkan untuk mengenkapsulasi probiotik pada fase internal, serta dapat digunakan untuk melindungi bahan aktif selama proses pencernaan.⁹ Mengingat sifatnya yang hidrofilik, maka model antioksidan (vitamin C) dienkapsulasi pada fase air internal. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi stabilitas vitamin C dengan membandingkan sisa kadar dan nilai t_{90} sediaan A/M/A dengan larutan vitamin C 1% dan emulsi standar air dalam minyak (A/M). Evaluasi karakteristik fisik meliputi uji organoleptis, pH, ukuran droplet, tipe emulsi, dan stabilitas emulsi juga dilakukan.

METODE

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental laboratorium. Emulsi A/M/A dibuat menggunakan metode emulsifikasi dua tahap, diawali dengan pembuatan fase internal menggunakan variasi emulgator. Variasi emulgator dengan hasil terbaik kemudian di-

gunakan untuk pembuatan emulsi A/M/A. Karakterisasi fisik emulsi dan uji stabilitas vitamin C akan dilakukan pada hari ke-0, 1, 3, 7, dan 10. Stabilitas vitamin C pada emulsi A/M/A akan dibandingkan dengan larutan vitamin C 1% dan emulsi pembanding A/M. Hasil uji stabilitas akan dibandingkan dengan nilai t_{90} dan signifikansinya akan diuji menggunakan *one-way ANOVA* dan *post hoc*.

Larutan vitamin C 1% dibuat dengan menimbang 0,1 gram vitamin C yang dilarutkan dalam 10 mL akuades. Larutan ini disebut sebagai F1.

Emulsi A/M sebagai formula pembanding (F2) dibuat dengan rasio air:minyak 25:75. Fase minyak terdiri dari 65% w/w minyak sacha inchi, 5% w/w Span 20, dan 5% w/w *shea butter* yang dipanaskan hingga 55°C. Fase air mengandung 1% w/w vitamin C, 3% w/w gliserol, dan 21% w/w akuades. Koreksi pH dilakukan pada fase air menggunakan larutan NaOH 1 M. Fase air ditambahkan ke dalam fase minyak pada suhu 55°C dan diaduk dengan kecepatan 600 rpm.

Prosedur pembuatan emulsi A/M/A mengacu pada metode di literatur dengan perubahan yang relevan yaitu jenis emulgator dan eksipien tambahan untuk menyesuaikan dengan HLB fase minyak yang digunakan.^{10, 11} Formulasi tersaji pada Tabel 1. Fase internal (A1) disiapkan dengan melarutkan vitamin C dengan gliserol dan larutan NaCl 0,1 M. Kemudian, pH fase A1 dikoreksi dengan NaOH 1 M, kemudian diaduk hingga homogen. Fase minyak kemudian disiapkan dengan mencampurkan *shea butter* dengan minyak sacha inchi pada suhu 55°C. Poligliserol polirisinoleat

(PGPR) dan Miglyol 812 ditambahkan ke dalam campuran tersebut, kemudian diaduk hingga homogen. Emulsi A1/M diperoleh dengan mencampurkan fase A1 ke dalam fase minyak pada suhu 55°C menggunakan *hot-plate* dengan kecepatan 700 rpm selama 10 menit. Variasi emulgator lipofilik pada fase A1/M dipilih berdasarkan pengamatan organoleptik. Emulgator lipofilik terpilih selanjutnya digunakan untuk membuat emulsi A/M/A.

Fase eksternal (A2) disiapkan dengan melarutkan NaCl 0,1 M dan CMC-Na dilarutkan pada suhu 55°C. Setelah larutan homogen, emulgator dan *phenoxyethanol* ditambahkan. Emulsi A/M/A (F3, F4, dan F5) dibuat dengan menambahkan A1/M secara perlahan ke dalam fase A2, kemudian diaduk pada kecepatan 600 rpm selama 10 menit hingga homogen.

Evaluasi karakteristik fisik mencakup uji organoleptis, pH, ukuran droplet, dan tipe emulsi. Uji stabilitas tahap awal dilakukan dengan menyimpan sediaan pada suhu 25°C dan 40°C selama 10 hari. Selama pengujian, kemasan ditutup rapat untuk mencegah masuknya oksigen dan dilapisi dengan *aluminium foil* untuk menghindari paparan cahaya yang menginduksi fotolisis. Jumlah sisa kadar vitamin C diukur pada hari ke-0, 1, 3, 7, dan 10 menggunakan spektrofotometer UV/Visible. Pengujian mengacu pada metode di literatur dengan perubahan yang sesuai.¹² Sampel sebanyak 0,5 mL diambil dan dicampurkan dengan 1 mL akuades. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit hingga terdapat pemisahan fase air dan minyak. Dari hasil sentrifugasi tersebut, 100

μL fase air diambil dan dilarutkan dalam 5 mL akuades, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Hasil pengenceran disaring menggunakan saringan nilon 0,45 μm , dan filtrat yang diperoleh diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV/Visible. Nilai absorbansi yang diperoleh kemudian digunakan untuk menghitung kadar vitamin C menggunakan kurva kalibrasi konsentrasi terhadap absorbansi. Detail metode pembuatan kurva kalibrasi dan hasilnya tersaji pada Lampiran 1.

Perhitungan t_{90} dilakukan untuk menggambarkan waktu yang dibutuhkan hingga kadar vitamin C tersisa 90% dari konsentrasi awal. Perhitungan mengacu pada metode dalam literatur.¹³ Nilai t_{90} diperoleh dengan menghitung konsentrasi sediaan terlebih dahulu. Konsentrasi sediaan dapat diperoleh dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \text{Absorbansi} - \frac{\text{Intercept}}{\text{Slope}}$$

Setelah diperoleh nilai konsentrasi, persen sisa kadar dapat diperoleh dengan rumus:

$$\% \text{ Sisa Kadar} = \left(\frac{\text{Konsentrasi Hari X}}{\text{Konsentrasi Hari 0}} \right) \times 100\%$$

Penentuan kinetika orde kemudian dilaku-

kukan dengan membuat plot waktu (x) terhadap persen sisa kadar (y) untuk kinetika orde 0, dan plot waktu (x) terhadap ln persen sisa kadar (y) untuk kinetika orde 1. Hasil dari kedua kinetika orde dibandingkan menggunakan nilai R^2 . Kinetika orde terpilih merupakan orde dengan R^2 terbesar. Setelah ditentukan kinetika orde untuk tiap sediaan, diperoleh nilai t_{90} untuk kinetika orde 0 dengan rumus:

$$t_{90} \text{ Orde } 0 = \frac{0,1C_0}{k}$$

dengan C_0 adalah konsentrasi awal (100%) dan k adalah konstanta laju reaksi orde 0.

Nilai t_{90} orde 1 diperoleh dengan rumus:

$$t_{90} \text{ Orde } 1 = \frac{0,105}{k}$$

dengan k adalah konstanta laju reaksi orde 1.

Uji *one-way* ANOVA dilakukan untuk menentukan adanya perbedaan signifikan nilai t_{90} antar formula. Perbedaan nilai t_{90} yang signifikan ditandai dengan nilai $p < 0,05$. Bila terdapat perbedaan signifikan antar formula, dilakukan analisis *post hoc* untuk analisis lebih lanjut perbedaan nilai t_{90} antar formula.¹⁴ Uji statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak *Jeffrey's Amazing Statistic Program* (JASP).

Tabel 1. Formula Fase Internal Emulsi dan A/M/A Final

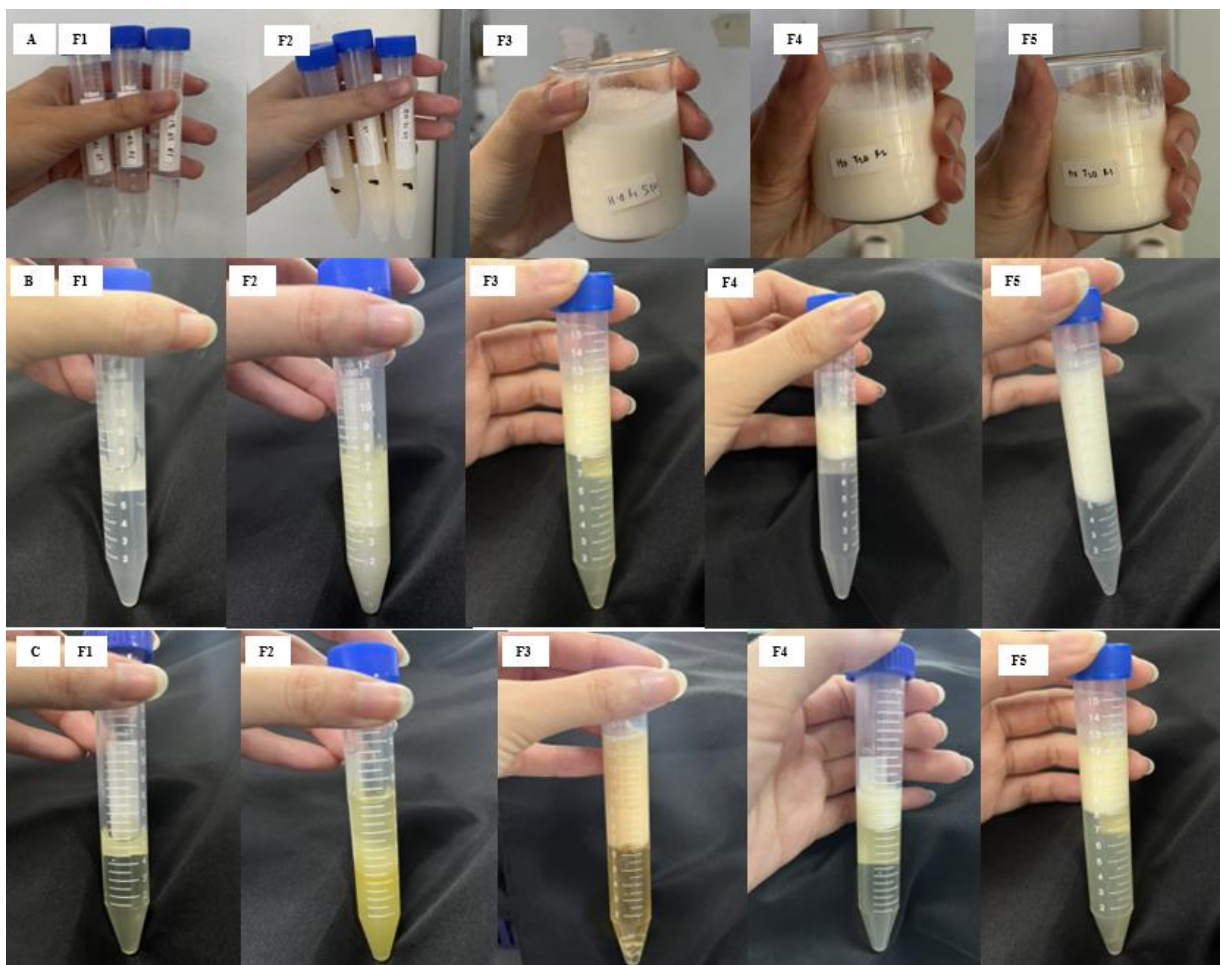
Formula	Bahan	Komposisi (%w/w)	Fungsi
Fase Internal			
Fase air internal (A1)	Vitamin C	1	Zat aktif
	Gliserol	3	Ko-surfaktan
Fase minyak (M)	Larutan NaCl 0,1 M	21	Tekanan osmotik
	PGPR : Miglyol 812	10 (1:1; 1:3; 3:1)	Emulgator
	<i>Shea butter</i>	5	Emolien
	Minyak sacha inchi	60	Pelarut
A/M/A			
Fase internal (A1/M)	A1/M	20	Fase internal
Fase air eksternal (A2)	Emulgator*	5-10	Emulgator
	CMC-Na	0,5	Agen pengental
	Phenoxyethanol	1	Pengawet
	Larutan NaCl 0,1 M	68,5 - 73,5	Tekanan osmotik

* F3: Span 20 (5%), F4: Tween 20 (5%), F5: Tween 20 (3,48%) dan Span 80 (6,52%)

Formulasi Emulsi Air-dalam-Minyak-dalam-Air (A/M/A) untuk Stabilisasi Antioksidan



Gambar 1A. Hasil Pengamatan Fase Internal



Gambar 1B. Hasil Pengamatan Organoleptis Emulsi

- (A) Pengamatan organoleptis H-0
- (B) Pengamatan organoleptis H+10 suhu ruang
- (C) Pengamatan organoleptis H+10 suhu 40°C

HASIL

Gambar 1A menunjukkan hasil pengamatan visual fase internal dari tiga variasi emulgator yang diuji. Hasilnya menunjukkan

penggunaan PGPR 5% menghasilkan fase internal terbaik. Sebaliknya, konsentrasi PGPR sebesar 7,5% menghasilkan emulsi yang terlalu berminyak, dan konsentrasi 2,5% PGPR

menghasilkan emulsi yang terlalu encer.

Hasil pengamatan organoleptis pada hari ke-0 menunjukkan larutan F1 berupa larutan jernih, sedangkan F2, F3, F4, dan F5 membentuk emulsi cair berwarna putih, homogen, dan berbau khas Sacha inchi (Gambar 1B). Larutan F1 tetap jernih pada suhu ruang hingga hari ke-10, tetapi berubah kekuningan di hari ke-7 pada suhu 40°C. Formula F2 dan F4 mengalami pemisahan sejak hari ke-1 pada suhu ruang dan 40°C. Formula F3 stabil hingga hari ke-3 pada suhu ruang, tetapi memisah pada hari ke-1 pada suhu 40°C. Formula F5 tetap stabil hingga hari ke-7 pada suhu ruang tetapi hanya 3 hari pada suhu 40°C. Semua formula mengalami perubahan warna menjadi kekuningan, khususnya pada suhu 40°C.

Pengamatan mikroskopik emulsi dilakukan dengan metode pewarnaan untuk menentukan tipe emulsi yang ditandai dengan migrasi pewarna ke fase yang relevan. Pewarna metilen biru akan terdistribusi ke fase air, sedangkan Sudan III terdistribusi ke fase minyak. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 400 kali. Hasil yang diperoleh tersaji pada Gambar 2. Pada hari ke-0 (H0), F2 yang merupakan emulsi air dalam minyak tampak sebagai droplet biru dengan latar belakang tidak berwarna pada pewarnaan dengan metilen biru (Gambar 2A) dan droplet tidak berwarna pada latar belakang berwarna merah saat diwarnai dengan Sudan III (Gambar 2B). Pada F3, F4, dan F5 teramati droplet kecil yang terenkapsulasi di dalam droplet berukuran lebih besar dan relevan dengan pewarnaan yang digunakan,

mengindikasikan terbentuknya struktur emulsi ganda (Gambar 2A dan 2B). Pengukuran droplet pada hari ke-0 terangkum pada Tabel L1 pada Lampiran 2 yaitu $1,632 \pm 0,457 \mu\text{m}$; $1,223 \pm 0,488 \mu\text{m}$; $2,075 \pm 0,640 \mu\text{m}$; dan $1,113 \pm 0,447 \mu\text{m}$ untuk sediaan F2, F3, F4, dan F5 secara berurutan. Pada hari ke-10, penampakan mikroskopik tipe emulsi menunjukkan distribusi pewarna yang mirip dengan hari ke-0, tetapi ukuran droplet berubah menjadi $3,188 \pm 1,511 \mu\text{m}$; $2,259 \pm 0,765 \mu\text{m}$; $3,968 \pm 1,744$; dan $2,105 \pm 0,806 \mu\text{m}$ untuk F2, F3, F4, dan F5 secara berurutan (Gambar L2 pada Lampiran 3). Hal ini menunjukkan penggabungan droplet fase terdispersi (koalesensi) sehingga membesar dan menginduksi difusi vitamin C menuju fase air eksternal sehingga tidak terlindungi, meskipun secara mikroskopik emulsi masih terindikasi berupa dispersi A/M/A.

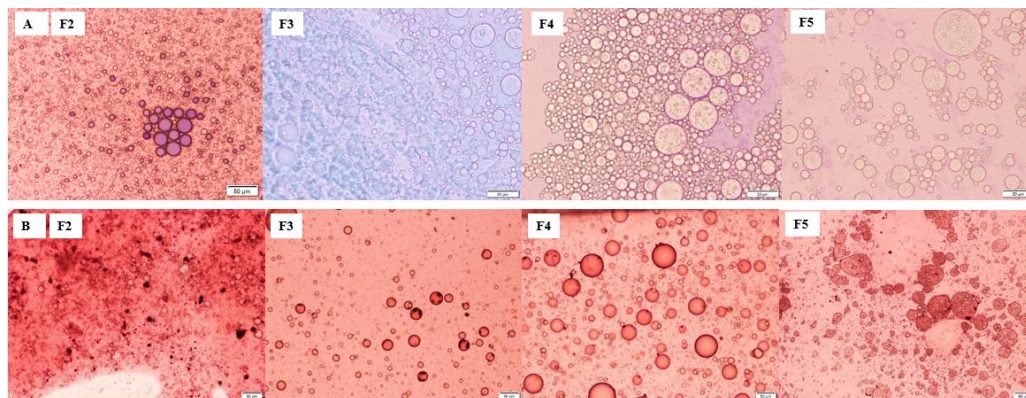
Seluruh formula menunjukkan penurunan kadar vitamin C setelah uji stabilitas 10 hari (Gambar 3). Pada uji stabilitas suhu ruang, F2 mempertahankan kadar vitamin C tertinggi (77,180%), diikuti F1 (66,119%), F5 (61,687%), F4 (39,607%), dan F3 (27,041%). Pada uji stabilitas suhu 40°C, F2 juga menunjukkan kadar vitamin C tertinggi (72,531%), diikuti F1 (63,311%), F5 (36,373%), F4 (32,036%), dan F3 (31,624%).

Nilai t_{90} menunjukkan waktu yang diperlukan hingga 10% vitamin C terdegradasi. Nilai t_{90} umum digunakan sebagai prediktor kadaluwarsa obat, dan pada penelitian ini digunakan untuk menilai stabilitas vitamin C. Penyimpanan dilakukan pada 2 suhu untuk membandingkan laju degradasi pada 2 kon-

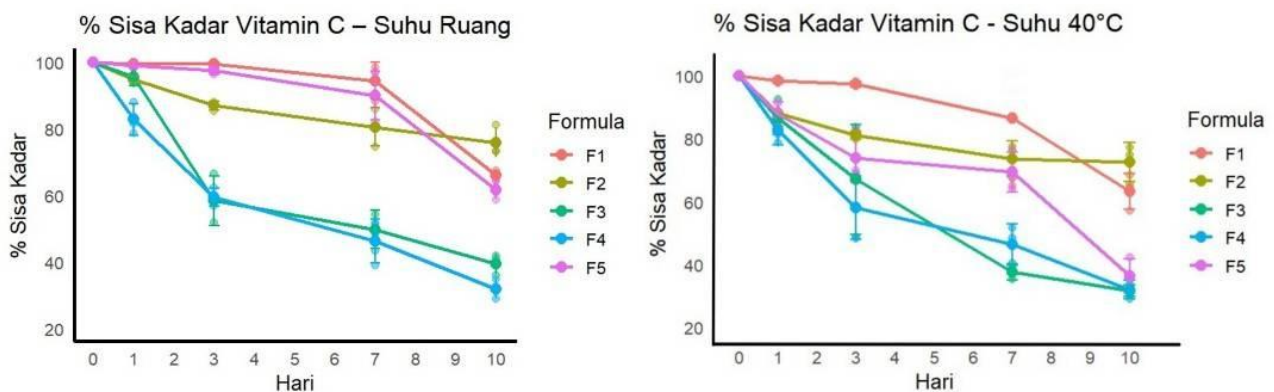
disi yang berbeda. Secara umum, penyimpanan pada suhu tinggi akan lebih cepat merusak emulsi dan berujung pada nilai t_{90} yang lebih rendah. Pada suhu ruang, F1 mengalami degradasi sebanyak 10% dalam 3,19 hari pada suhu ruang, sedangkan F2 dalam 4,25 hari (Gambar 4 dan Tabel L2, Lampiran 4). Nilai t_{90} emulsi F3, F4, dan F5 masing-masing adalah 0,81 hari; 1,16 hari; dan 2,94 hari. Pada suhu 40°C, F1 mengalami degradasi sebesar 10% dalam 3,14 hari, sedangkan F2 dalam 3,83 hari. Nilai t_{90} untuk F3, F4, dan F5 masing-masing adalah 0,88 hari; 0,99 hari; dan 1,85 hari.

Hasil analisis ANOVA pada kondisi uji suhu ruang dan 40°C menunjukkan adanya

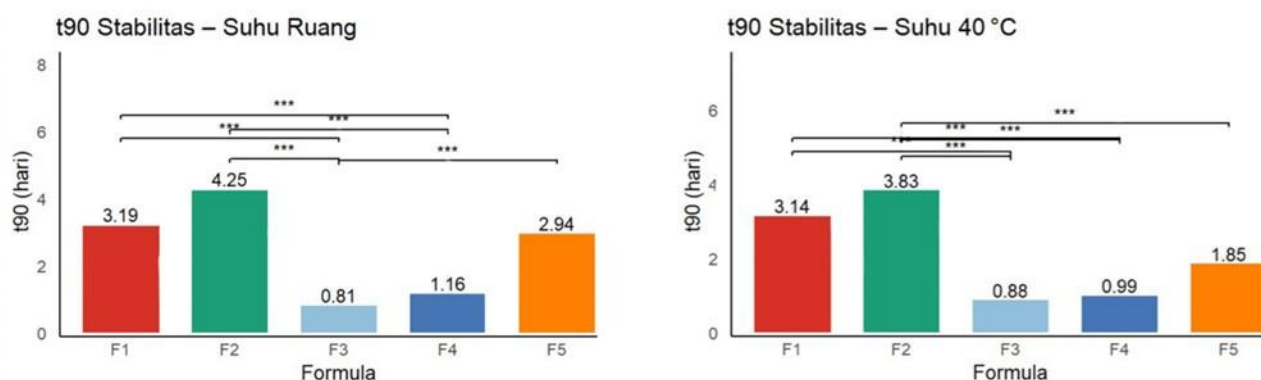
perbedaan rerata nilai t_{90} signifikan, ditandai dengan nilai $p < 0,001$. Analisis *post hoc* dilakukan untuk mengidentifikasi formula dengan perbedaan nilai t_{90} yang signifikan. Pada penyimpanan suhu ruang, nilai t_{90} F2 secara signifikan lebih tinggi dibandingkan F3 ($p=0,002$) dan F4 ($p=0,003$) (Tabel L3 pada Lampiran 5). Formula F5 menunjukkan perbedaan signifikan terhadap F3 ($p=0,0017$) sedangkan F1 menunjukkan perbedaan signifikan dengan F3 ($p=0,019$) dan F4 ($p=0,047$). Sementara itu, pada suhu 40°C, nilai t_{90} F2 signifikan lebih tinggi dibandingkan ketiga emulsi ganda, yaitu F5 ($p=0,026$); F3 ($p=0,002$); dan F4 ($p=0,002$) (Tabel L4 pada Lampiran 6).



Gambar 2. Hasil Pengamatan Mikroskopik Emulsi pada H-0 dengan Perbesaran 400 Kali (A) dengan pewarnaan metilen biru (B) dengan pewarnaan Sudan III



Gambar 3. Grafik Persen Sisa Kadar Vitamin C di dalam Sistem



Gambar 4. Grafik t₉₀ Vitamin C dalam Sistem

DISKUSI

Pembuatan emulsi ganda diawali dengan membuat fase internal. Tiga proporsi emulgator fase internal PGPR yaitu 2,5%; 5%; dan 7,5% diuji dan hasilnya menunjukkan variasi PGPR 5% merupakan formula fase internal terbaik (Tabel 2). Pemilihan rasio PGPR 5% sejalan dengan temuan Wang, *et al.* dan Hady, *et al.* yang melaporkan rasio PGPR optimal pada emulsi ganda sebesar 5%.^{11,15} Berdasarkan temuan Wang, *et al.* PGPR menghasilkan emulsi A/M/A yang lebih stabil dibandingkan dengan Span 80, lesitin, dan gliseril monostearat (GMS). Stabilitas ini dikaitkan dengan kemampuan PGPR dalam menghasilkan lapisan antarmuka yang lebih kuat, ditandai dengan nilai potensial zeta tertinggi dibandingkan emulgator lainnya.¹⁵ Selain itu, PGPR lebih mudah terdispersi dalam fase minyak dibandingkan emulgator lainnya, sehingga menghasilkan sistem emulsi yang lebih stabil. Fase internal kemudian diemulsikan lebih lanjut dengan emulgator eksternal yang pemilihannya didasari oleh nilai HLB komponen minyak yang digunakan: Span 20 (F3), Tween 20 (F4), dan kombinasi Tween 20 dan Span 80 (F5). Pada tahap ini, emulsi ganda A/M/A

berhasil dibuat sebagaimana teramati pada Gambar 2A dan 2B.

Pemisahan fase, perubahan warna, dan membesarnya ukuran droplet merupakan beberapa faktor yang menandakan terjadinya instabilitas fisik pada emulsi.⁶ Pemisahan fase ditandai dengan adanya pemisahan lapisan yang jelas antara fase minyak dan air. Pada H-0, seluruh sediaan emulsi (F2, F3, F4, dan F5) tampak homogen (Gambar 1A). Pemisahan fase terdeteksi paling cepat pada emulsi F2 dan F4, dengan pemisahan terjadi pada H+1 baik pada suhu ruang dan 40°C, diikuti F3 (H+3 pada suhu ruang; H1 pada 40°C), dan F5 (H+7 pada suhu ruang; H+1 pada suhu 40°C). Selain itu, instabilitas emulsi juga dapat ditandai dengan perbesaran ukuran droplet. Seluruh emulsi menunjukkan terjadinya perbesaran ukuran droplet pada H+10.

Instabilitas vitamin C dapat diamati secara makroskopis, dengan perubahan warna terjadi pada sediaan yang semula putih menjadi putih-kekuningan hingga kuning. Perubahan warna terjadi akibat reaksi oksidasi.¹⁶ Pada hari ke-0, F1 berupa larutan jernih dan seluruh emulsi (F2, F3, F4, dan F5) berwarna putih. Perubahan warna diamati pada seluruh

formula, dengan urutan formula yang memiliki perubahan paling minimal hingga paling signifikan: F5, F1, F4, F2, dan F3. Formula F3 menunjukkan perubahan paling signifikan, ditandai dengan perubahan warna pada H+3 menjadi putih-kekuningan pada penyimpanan suhu ruang. Perubahan warna ini diduga terjadi karena hidrolisis emulgator Span 20, terdiri dari gugus ester yang rentan terhidrolisis, sehingga berpotensi menurunkan efektivitasnya sebagai emulgator.¹⁷

Pada suhu ruang, formula dengan t_{90} tertinggi adalah F2, diikuti oleh F1, F5, F4, dan F3, dengan nilai t_{90} secara berurutan: $4,250 \pm 1,498$; $3,186 \pm 0,590$; $2,943 \pm 0,404$; $1,163 \pm 0,042$; dan $0,814 \pm 0,055$ hari. Urutan yang sama juga diperoleh pada suhu 40°C , namun dengan nilai t_{90} yang lebih rendah akibat meningkatnya laju degradasi seiring dengan peningkatan suhu. Nilai t_{90} pada suhu 40°C secara berurutan adalah sebagai berikut: $3,831 \pm 1,117$; $3,137 \pm 0,922$; $1,853 \pm 0,189$; $0,992 \pm 0,0073$; dan $0,822 \pm 0,060$ hari. Penelitian Moussa, *et al.* mengemukakan adanya peningkatan stabilitas vitamin C menggunakan sistem emulsi sebagai sistem pelindung.¹² Penelitian ini menunjukkan temuan yang sama, yaitu t_{90} F2 lebih tinggi dibandingkan t_{90} F1 pada suhu ruang dan 40°C . Sistem emulsi mampu meningkatkan stabilitas vitamin C dikarenakan adanya sistem yang berfungsi sebagai lapisan pelindung, sehingga menghambat terjadinya degradasi. Pelindung yang dimaksud pada F2 adalah fase minyak sebagai fase kontinu emulsi A/M.

Namun, target peningkatan stabilitas dengan penambahan fase pelindung melalui

pembentukan A/M/A tidak tercapai pada penelitian ini sebab nilai t_{90} F2 lebih tinggi dibandingkan F3, F4, dan F5. Secara umum, emulsi ganda memiliki efektivitas lebih tinggi dalam melindungi zat aktif dari degradasi dibandingkan dengan emulsi konvensional maupun larutan.¹⁸ Hal ini dikarenakan keberadaan dua lapisan antarmuka pada emulsi ganda yang berperan sebagai lapisan pelindung tambahan.

Rendahnya nilai t_{90} pada F3, F4, dan F5 disebabkan oleh sistem emulsi yang tidak stabil. Sistem emulsi secara alami bersifat tidak stabil secara termodinamik. Emulsi konvensional (A/M) relatif lebih mudah distabilkan dibandingkan emulsi ganda yang memiliki lebih banyak fase terdispersi.¹⁹ Pemisahan fase merupakan salah satu tanda ketidakstabilan emulsi. Terjadinya pemisahan pada emulsi ganda menandakan hilangnya kemampuan emulsi ganda dalam mengenkapsulasi vitamin C. Instabilitas A/M/A memungkinkan terjadinya perpindahan vitamin C dari fase internal menuju eksternal, sehingga vitamin C tidak lagi terlindungi dan lebih rentan terhadap degradasi. Instabilitas pada emulsi ganda dapat terjadi melalui berbagai mekanisme, di antaranya melalui difusi diakibatkan oleh pecahnya fase antara (dalam emulsi A/M/A fase antara yang dimaksud adalah fase minyak),²⁰ dan instabilitas yang disebabkan oleh koalesens pada fase internal.²¹ Pecahnya fase antara dapat disebabkan oleh ketidakseimbangan tekanan osmotik. Tekanan osmotik lebih tinggi pada fase internal menyebabkan masuknya air dari fase eksternal, menyebabkan pembengkakan droplet internal (*swelling*) hingga fase internal pecah. Sedangkan,

tekanan osmotik lebih tinggi pada fase eksternal menyebabkan penyusutan droplet fase internal.²² Dari segi formulasi, instabilitas dapat disebabkan oleh Tween 20 yang merupakan surfaktan non-ionik yang digunakan pada fase eksternal emulsi. Degradasi oksidatif menghasilkan senyawa peroksida yang dapat berkontribusi dalam mempercepat terjadinya reaksi oksidasi, sehingga dapat mempercepat laju degradasi vitamin C pada sistem emulsi.²⁰ Selain itu, Span 20 juga rentan mengalami hidrolisis, sehingga turut berkontribusi terhadap instabilitas emulsi.

Penelitian ini memiliki keterbatasan yaitu tidak dilakukannya studi difusi vitamin C dari fase air internal ke fase air eksternal sehingga koalesensi yang berujung pada pecahnya emulsi tidak dapat diamati dengan mendalam. Keterbatasan yang lain adalah tidak adanya pengamatan stabilitas fase *intermediate*, mengingat fase ini akan distabilkan ulang pada saat emulsifikasi tahap kedua. Namun, berkaca dari hasil penelitian ini, uji stabilitas fase internal A/M perlu dilakukan sebelum dilanjutkan ke pembuatan emulsi ganda A/M/A.

Stabilitas emulsi A/M/A dapat ditingkatkan dengan meningkatkan rasio fase antara (dalam konteks emulsi A/M/A adalah fase minyak). Fase antara berperan sebagai sawar untuk melindungi senyawa terenkapsulasi agar tetap berada di fase internal.²⁰ Rasio fase antara yang terlalu kecil menghasilkan pembatas tipis di antara fase internal dan eksternal, sehingga memungkinkan terjadinya pelepasan vitamin C dari fase internal menuju eksternal.²³ Peningkatan fase minyak harus diim-

bangi dengan penyesuaian emulgator, untuk memastikan emulsi tetap terdispersi.²⁴

Peningkatan stabilitas juga dapat dilakukan dengan penambahan agen *stabilizer*. Agen pengental dapat ditambahkan untuk meningkatkan viskositas emulsi. Peningkatan viskositas dapat memperlambat laju perpindahan senyawa terenkapsulasi dari fase internal menuju eksternal dan memperlambat terjadinya koalesensi.²⁵ Penambahan *gelling agent* dapat dilakukan untuk meningkatkan stabilitas emulsi. Penambahan *gelling agent* dapat memberikan sawar tambahan yang dapat memperlambat laju terjadinya koalesensi.

SIMPULAN

Penelitian ini menghasilkan tiga formula emulsi ganda A/M/A (F3, F4, dan F5), dengan kombinasi Tween 20 dan Span 80 (F5) menunjukkan stabilitas yang lebih baik dibandingkan emulsi ganda lainnya. Meskipun demikian, sistem emulsi ganda yang dikembangkan belum mampu meningkatkan stabilitas vitamin C dibandingkan dengan larutan vitamin C 1% (F1) dan emulsi konvensional A/M (F2). Ketidakstabilan emulsi A/M/A pada penelitian ini dipengaruhi oleh faktor tonisitas dan pemilihan emulgator pada formula sehingga emulsi pecah dan zat aktif terdifusi terlalu dini ke fase eksternal. Optimasi lebih lanjut diperlukan untuk emulsi A/M/A. Peningkatan stabilitas emulsi ganda dapat dilakukan dengan penambahan agen penstabil, penyesuaian rasio fase minyak, serta analisis kadar peroksida untuk meminimalisasi kemungkinan terjadinya degradasi oksidatif. Pengembangan lebih lanjut pada emulsi ganda A/M/A dapat

dilakukan berdasarkan hasil emulsi A/M yang diperoleh pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*. 2015;5(2):545-89.
- Van Tran V, Moon JY, Lee YC. Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: challenges and development strategies. *J Control Release*. 2019;300:114-40.
- Chandimali N, Bak SG, Park EH, Lim HJ, Won YS, Kim EK, et al. Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. *Cell Death Discov*. 2025;11(1):19.
- Gęgotek A, Skrzydlewska E. Ascorbic acid as antioxidant. *Vitam Horm*. 2023;121:247-70.
- Tadros TF. *Emulsions: formation, stability, industrial applications*. Berlin: De Gruyter; 2016.
- Koubaa M, Roohinejad S, Sharma P, Nikmaram N, Hashemi SS, Abbaspourrad A, et al. Multiple emulsions. In: Roohinejad S, Greiner R, Oey I, Wen J, editors. *Emulsion-based systems for delivery of food active compounds: formation, application, health and safety*. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons; 2018. p. 69-103.
- Díaz-Ruiz R, Martínez-Rey L, Laca A, Álvarez JR, Gutiérrez G, Matos M. Enhancing trans-resveratrol loading capacity by forcing W1/O/W2 emulsions up to its colloidal stability limit. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020;193:111130.
- Klojďová I, Feldeková E, Kumherová M, Veselá K, Horáčková Š, Štětina J. Preparation of water-in-oil-in-water multiple emulsions with potential use in food industry. *Chem Eng Technol*. 2020;43(3):523-30.
- Klojďová I, Štětina J, Horáčková Š. W/O/W multiple emulsions as the functional component of dairy products. *Chem Eng Technol*. 2019;42(4):715-27.
- Sanhueza L, García P, Giménez B, Benito JM, Matos M, Gutiérrez G. Encapsulation of pomegranate peel extract (*Punica granatum L.*) by double emulsions: effect of the encapsulation method and oil phase. *Foods*. 2022;11(3):310.
- Hady E, Youssef M, Aljahani AH, Aljumayi H, Ismail KA, El-Damaty ES, et al. Enhancement of the stability of encapsulated pomegranate (*Punica granatum L.*) peel extract by double emulsion with carboxymethyl cellulose. *Crystals*. 2022;12(5):622.
- Al Haushey L, Moussa N. The shelf life of vitamin C in a W/O emulsion according to the Q10 method. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2015;30(2):33-9.
- Pertiwi D, Desnita R, Luliana S. Pengaruh pH terhadap stabilitas alpha arbutin dalam gel niosom. *Majalah Farmaseutik*. 2020;16(1):91-100.
- Ramadon D, Pramesti SS, Anwar E. Formulation, stability test and in vitro penetration study of transthesosomal gel containing green tea (*Camellia sinensis L. Kuntze*) leaves extract. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2017;9(5):91-6.
- Wang J, Shi A, Agyei D, Wang Q. Formulation of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions containing trans-resveratrol. *RSC Adv*. 2017;7(57):35917-27.
- Jutkus RAL, Li N, Taylor LS, Mauer LJ. Effect of temperature and initial moisture content on the chemical stability and color change of various forms of vitamin C. *Int J Food Prop*. 2015;18(4): 862-79.
- Fiume MM, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, et al. Safety assessment of sorbitan esters as used in cosmetics. *Int J Toxicol*. 2019;38(2 Suppl):60S-80S.
- Gallarate M, Carlotti ME, Trotta M, Bovo S. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. *Int J Pharm*. 1999;188(2): 233-41.
- Weber J, Buske J, Mäder K, Garidel P, Diederichs T. Oxidation of polysorbates: an underestimated degradation pathway? *Int J Pharm X*. 2023;6: 100202.
- Agrawal A, Kulkarni S, Sharma SB. Recent advancements and applications of multiple emulsions. *International Journal of Advanced Pharmaceutics*. 2015;4(6):94-103.
- Florence AT, Whitehill D. The formulation and stability of multiple emulsions. *Int J Pharm*. 1982;11(4):277-308.
- Abate AR, Weitz DA. High-order multiple emulsions formed in poly(dimethylsiloxane) microfluidics. *Small*. 2009;5(18):2030-2.

23. Singh N, Garud N, Joshi R, Akram W. Technology, recent advancement, and application of multiple emulsions: an overview. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2021;15(3):301-11.
24. Al-Yaqoobi AM, Al-Dulaimi SL, Salman RH. Explore the impact of surfactant type on the stability and separation efficiency of oil-water emulsions of real wastewater from Al-Basrah crude oil using microbubble air flotation. *Journal of Ecological Engineering*. 2024;25(5):367-78.
25. Iancu MN, Chevalier Y, Popa M, Hamaide T. Internally gelled W/O and W/O/W double emulsions. *e-Polymers*. 2009;9(1):1184.