

FORMULASI DAN STABILITAS MIKROEMULSI O/W SEBAGAI PEMBAWA FUCOXANTHIN

Formulation and Stability of O/W Microemulsion as Fucoxanthin Delivery

Lutfi Suhendra¹, Sri Raharjo², Pudji Hastuti², Chusnul Hidayat²

¹Jurusan Teknologi Industri, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Kabupaten Badung, Bali

²Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281
Email: lutfisuhendra@hotmail.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh mikroemulsi minyak dalam air (o/w) yang mengandung fucoxanthin yang stabil dan jernih untuk diaplikasikan dalam sistem makanan *aqueous*. Virgin coconut oil (VCO) digunakan sebagai fase minyak dan kombinasi Tween 80, Tween 20 dan Span 80 sebagai surfaktan non ionik yang masing-masing mempunyai nilai HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) tinggi, medium dan rendah. Formulasi mikroemulsi o/w ditentukan nilai HLB akhir masing-masing 13,5; 14, dan 14,5. Masing-masing nilai HLB tersebut ditentukan tiga formula yang berbeda. Semua formulasi mikroemulsi kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C selama 5 jam, disentrifugasi pada kecepatan 4500 rpm selama 30 menit, diinkubasi pada pH yang berbeda (3,5; 4,5 dan 6,5), diencerkan dengan akuades dan stabilitas diuji secara fotooksidasi. Mikroemulsi paling stabil selanjutnya dipilih dan digunakan untuk pembawa fucoxanthin sebagai antioksidan hidrofobik dalam sistem *aqueous*. Fotooksidasi ditentukan dengan menempatkan mikroemulasi di bawah sinar fluoresensi 4000 lux selama 4 jam pada suhu ruang. Angka peroksida diukur setiap jam menggunakan metode feri thiosianat. Mikroemulsi o/w yang stabil diperoleh pada HLB 14,5 dengan rasio minyak : surfaktan = 3 : 17 dan rasio minyak + surfaktan : air = 35 : 65. Rasio Tween 80 : Tween 20 : Span 80 adalah 92.0 : 2.5 : 5.5. Mikroemulsi fucoxanthin yang diperoleh stabil pada pH 3,5 sampai 6,5 dan bahkan setelah perlakuan pemanasan, sentrifugasi dan pengenceran. Namun angka peroksida meningkat selama fotooksidasi. Fucoxanthin dalam mikroemulasi lebih dari 12 ppm tidak efektif untuk menghambat fotooksidasi dalam mikroemulsi o/w.

Kata kunci: Mikroemulsi, fucoxanthin, fotooksidasi, surfaktan

ABSTRACT

The objective of this study was to obtain a clear and stable oil-in-water (o/w) microemulsion containing fucoxanthin which is intended for aqueous food system application. Virgin coconut oil (VCO) was used as the oil phase and combination of Tween 80, Tween 20 and Span 80 were selected as nonionic surfactant having high, medium, and low HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) values, respectively. The o/w microemulsions were formulated to have the final HLB values of 13.5, 14.0, and 14.5. For each HLB value, three different microemulsion formulas were determined. All of the formulated microemulsions were then subjected to oven heating at 105 °C for 5 hour, centrifugation at 4500 rpm for 30 min, incubation at different pH (3.5, 4.5, and 6.5), water dilution, and photooxidation to evaluate its stability. The most stable microemulsion was then selected and used to deliver fucoxanthin as a hydrophobic antioxidant in aqueous system. Photo-oxidation was performed by exposing the microemulsions under fluorescent light at 4,000 lux for up to 4 hours at room temperature. Peroxide values were measured every hour using ferric thiocyanate method. Stable o/w microemulsions were obtained when its HLB value was 14.5, the ratio of oil:surfactants was 3:17, and the ratio of (oil + surfactants) : water was 35 : 65. The ratio of Tween 80 : Tween 20 : Span 80 was 92.0 : 2.5 : 5.5. Fucoxanthin microemulsion was remained stable at pH range from 3.5 to 6.5 even after heating treatment, centrifugation, and water dilution. However, there were increased peroxide values of these microemulsions after being

subjected to photooxidation. The presence of fucoxanthin (over 12 ppm) in the microemulsion could not effectively inhibit photooxidation of the o/w microemulsion.

Keywords: Microemulsions, fucoxanthin, photooxidation, surfactant

PENDAHULUAN

Fucoxanthin merupakan karotenoid perairan yang mempunyai kemampuan sebagai anti kanker (Kotake-Nara dkk., 2001; Hosokawa dkk., 2006; Hosokawa dkk., 2004), anti inflammatory (Shiratori dkk., 2005), anti obesitas (Maeda dkk., 2005; Maeda dkk., 2006), dan antioksidan kuat (Nomura dkk., 1997; Sachindra dkk., 2007). Fucoxanthin terdapat pada alga cokelat keemasan (*Chrysophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Prymnesiophyceae* dan *Phaeophyceae*), yang berfungsi sebagai pigmen penangkap cahaya yang digunakan untuk fotosintesis dan mempunyai kelarutan rendah dalam air (Lee, 2008). Fucoxanthin mempunyai struktur meliputi alenik, karbonil terkonjugasi, epoksi, dan gugus asetil pada molekulnya (Heo dan Jeon, 2009).

Fucoxanthin mempunyai kemampuan sebagai makanan fungsional. Hal ini sangat menarik untuk diaplikasikan dalam industri makanan. Namun fucoxanthin dan derivat karotenoid lainnya mudah rusak oleh oksigen, cahaya dan panas, mempunyai sifat kelarutan yang rendah dalam air dan sedikit larut dalam minyak pada suhu kamar dan menyebabkan sulit diterapkan pada produk makanan, farmasi dan kesehatan (Yuan^a dkk., 2008; McCleman dkk., 2007). Fucoxanthin sulit diabsorpsi dalam tubuh, mudah disekresikan lewat feses dan urin, dan sangat sedikit ditemukan dalam plasma darah (Wang dkk., 2008; Lin dkk., 2009; Cui dkk., 2009). Kelarutan dan bioavailabilitas karotenoid seperti fucoxanthin dapat diperbaiki dengan menggunakan teknik mikroemulsi *oil in water* (o/w) (Wang dkk., 2008; Yuan^b dkk., 2008).

Mikroemulsi merupakan dispersi isotropik yang terdiri dari fase minyak dan fase air yang distabilkan oleh molekul surfaktan dan/atau ko-surfaktan pada lapisan antar muka (Lin dkk., 2009). Mikroemulsi berpotensi sebagai sistem pembawa yang telah diaplikasikan pada industri makanan, farmasi, nutrisi dan kosmetik karena transparansinya, meningkatkan *palability*, *deserability*, bioaktif, mudah preparasinya dan mempunyai stabilitas lebih baik (McCleman dkk., 2007). Mikroemulsi menggunakan campuran ko-surfaktan seperti alkohol, tidak sesuai untuk diaplikasikan dalam makanan, karena alkohol rantai pendek atau medium dapat mengakibatkan toksis dan iritasi (Flanagan dan Singh 2006). Ko-surfaktan juga menyebabkan mikroemulsi menjadi rapuh sehingga partisi yang dilarutkan ke luar melalui ko-surfaktan pada daerah antar muka ke dalam fase kontinue

(Warisnoicharoen dkk., 2000). Surfaktan nonionik seperti gula ester, polyoxyethylene sorbitan ester (tween) dan polyoxyethylene eter telah digunakan secara luas di bidang farmasi yang mempunyai toksisitas relatif rendah tetapi berpotensi menimbulkan iritasi (Flanagan dan Singh, 2006). Campuran surfaktan (tween, span, dan garam asam lemak) dan phospholipids (lecithin) telah banyak digunakan di industri makanan dalam sistem pangan (McClements, 2008).

Pembentukan mikroemulsi dengan stabilitas tinggi dalam sistem pangan sangat kompleks yang dipengaruhi oleh fase minyak dan jenis surfaktan, suhu, pH dan pengenceran (Cho dkk., 2008; Cui dkk., 2009). Mikroemulsi o/w dipengaruhi oleh campuran kombinasi jenis surfaktan hidrofilik dan lipofilik, dan minyak. Mikroemulsi o/w mempunyai stabilitas dan kelarutan tinggi apabila diperoleh campuran dengan perbandingan tepat dapat digunakan sebagai pembawa senyawa bioaktif fucoxanthin. Keseimbangan hidrofilik lipofilik (HLB) adalah konsep yang mendasari metode semi empirik untuk memilih pengemulsi yang tepat atau kombinasi pengemulsi pada stabilitas emulsi (Hiemenz dan Rejogopalan, 1997). Stabilitas dan kelarutan mikroemulsi yang terbentuk sangat penting untuk meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas fucoxanthin yang mudah preparasinya dalam aplikasi sistem pangan.

Virgin Coconut Oil (VCO) kaya asam lemak rantai medium terutama asam laurat (46,89-48,03 %) (Marina^a dkk., 2009) berpotensi sebagai fase minyak pada pembuatan mikroemulsi o/w. VCO mempunyai aktivitas antioksidan (Marina^b dkk., 2009; Seneviratne dkk., 2009), menurunkan *low density lipoprotein* (LDL) dan meningkatkan *high density lipoprotein* (HDL) (Nevin dan Rajamohan, 2004).

Uraian tersebut menggambarkan bahwa fucoxanthin merupakan senyawa bioaktif penting yang mudah rusak oleh oksidasi, cahaya dan panas, absorpsi tidak efektif dan aplikasi dalam sistem pangan sulit diterapkan. Pembentukan mikroemulsi o/w menggunakan beberapa jenis surfaktan nonionik dapat meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas fucoxanthin yang mudah dalam preparasinya dan mempunyai stabilitas lebih baik. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh formulasi mikroemulsi yang stabil dari campuran VCO (*Virgin Coconut Oil*) dan surfaktan non ionik sebagai pembawa senyawa bioaktif fucoxanthin.

METODE PENELITIAN

Fucoxanthin diperoleh dari Oryza LTD Japan, Pewarna sintetis FD&C red No. 3 (erythrosine) komersial dari Yogyakarta, Span 80, Tween 20, Tween 80, asam sitrat dan Na-sitrat dari Merck, VCO diperoleh dari Fakultas MIPA Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Formulasi Mikroemulsi

Mikroemulsi dibuat dari campuran surfaktan dari jenis surfaktan hidrofilik (Tween 20 dan Tween 80) dan lipofilik (Span 80). Selanjutnya campuran surfaktan diatur HLB-nya (v/v/v) pada kisaran 13,5; 14 dan 14,5. HLB tersebut masing-masing dibuat sebanyak tiga formula berbeda mendekati kisaran HLB yang telah ditentukan dengan perbandingan dari campuran ketiga jenis surfaktan. Formulasi surfaktan tersebut dicampur dengan VCO dengan perbandingan 85:15 (v/v). Selanjutnya campuran surfaktan dan VCO ditambahkan air tetes demi tetes dan diaduk menggunakan pengaduk magnet pada suhu $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai larutan terlihat jernih pada kadar air 90 %. Mikroemulsi yang terbentuk diamati secara visual yaitu terbentuknya campuran transparan yang mempunyai fase tunggal. Mikroemulsi yang terbentuk diuji dengan pemanasan oven pada suhu $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 5 jam. Mikroemulsi dikatakan stabil jika terbentuknya mikroemulsi dapat diamati secara visual, yaitu tidak terbentuk gel dan saat digojok selama 1 menit tidak keruh dan tetap transparan. Selanjutnya dipilih salah satu formulasi mikroemulsi o/w yang mempunyai stabilitas terhadap panas untuk dilakukan pembuatan mikroemulsi o/w dengan teknik pengukuran konduktivitas, selanjutnya mikroemulsi diuji stabilitasnya.

Preparasi Mikroemulsi Fucoxanthin

Preparasi mikroemulsi fucoxanthin dilakukan dengan 2 cara yaitu: pertama, fucoxanthin dilarutkan dalam VCO dan ditambah surfaktan, kemudian ditambahkan air tetes demi tetes hingga konsentrasi fucoxanthin mencapai 600 ppm. Kedua, fucoxanthin ditambahkan dalam mikroemulsi hingga konsentrasi fucoxanthin mencapai 600 ppm. Mikroemulsi fucoxanthin yang terbentuk dari teknik pengisian fucoxanthin yang mempunyai kelarutan tinggi selanjutnya dianalisis kenampakan dan stabilitasnya.

Efek Fotooksidasi terhadap Mikroemulsi Fucoxanthin

Untuk mempelajari pengaruh fotooksidasi terhadap mikroemulsi fucoxanthin dan mikroemulsi tanpa fucoxanthin maka dilakukan percobaan sebagai berikut: pertama fucoxanthin dilarutkan dalam VCO dan ditambah surfaktan, kemudian ditambahkan air tetes demi tetes hingga konsentrasi fucoxanthin mencapai 600 ppm. Larutan mikroemulsi

fucoxanthin tersebut diencerkan 50 kali dan 100 kali sehingga diperoleh mikroemulsi fucoxanthin 6 ppm dan 12 ppm. Selanjutnya ditambahkan eritrosin sehingga masing-masing larutan mengandung eritrosin 5 ppm sebagai sensitiser. Kontrol larutan mikroemulsi dengan/tanpa fucoxanthin tidak ditambahkan eritrosin. Sebanyak 15 mL sampel diambil dan dimasukkan ke dalam botol berukuran 50 mL yang dilengkapi dengan penutup karet yang terbungkus aluminium foil. Sampel tersebut kemudian diletakkan dan disimpan di dalam kotak pencahayaan yang telah dilengkapi lampu fluoresense dengan intensitas cahaya 4.000 lux (Lee dan Min, 1988). Angka peroksida diukur dengan metoda feri thiosianat tiap interval waktu 1 jam selama 4 jam (Kikuzaki dkk., 1993; Chapman dan Mackay dalam Adnan 1980).

Pengujian Stabilitas Mikroemulsi

Stabilitas mikroemulsi terhadap pemanasan, sentrifugasi, dan perubahan pH dilakukan menurut metoda yang dilaporkan oleh Cho dkk. (2008). Pengujian stabilitas terhadap pemanasan dilakukan dengan memanaskan sampel mikroemulsi (15 mL) pada suhu $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 5 jam dalam oven. Stabilitas terhadap sentrifugasi dilakukan dengan mengambil sampel mikroemulsi (10 mL) dan disentrifugasi pada 4500 rpm selama 30 menit. Pengujian stabilitas terhadap pH dilakukan dengan mengencerkan mikroemulsi dengan media air dan buffer sitrat (pH 3,5; 4,5 dan akuades pH 6,5) dengan proporsi 1:1. 1:9 dan 1:99. Stabilitas mikroemulsi diamati berdasarkan turbiditas dan ketampakan ada atau tidaknya gel. Turbiditas mikroemulsi diukur dengan spektrometer UV-VIS pada panjang gelombang 502 nm dengan rumus: turbiditas x panjang kuvet = $2.303 \times$ absorbansi (Cho dkk., 2008). Konduktivitas mikroemulsi ditentukan pada suhu kamar menggunakan konduktivitasmeter dan akuades sebagai pembanding.

Pengaruh Pengenceran terhadap Mikroemulsi (Lin dkk., 2009)

Larutan mikroemulsi mengandung fucoxanthin 600 ppm (diencerkan 50 dan 100 kali dengan media buffer sitrat (pH 3,5; 4,5) dan akuades pH 6,5. Stabilitas mikroemulsi fucoxanthin selanjutnya diukur dengan metode spektrometer pada panjang gelombang 458 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Formulasi Mikroemulsi

Formulasi perbandingan surfaktan hidrofilik (Tween 80 dan Tween 20) dan lipofilik (Span 80) ditunjukkan pada Tabel 1. Mikroemulsi yang terbentuk diinkubasi 24 jam

menunjukkan kestabilan dengan kenampakan transparan dan turbiditas kurang dari 1 %. Formulasi 1, 2, 3 dan 4 mempunyai stabilitas mikroemulsi yang tinggi setelah pemanasan (5 jam, 105 °C) dengan kenampakan transparan dan turbiditas kurang dari 1 %. Formula 1, 2, 3, dan 4 mempunyai turbiditas sama setelah pemanasan dan Formulasi 1 dipilih untuk dilakukan uji stabilitas. Formulasi 1 dipilih berdasarkan stabilitasnya terhadap panas dan mempunyai konsentrasi Tween 20 rendah. Hal ini disebabkan konsentrasi Tween 20 tinggi menyebabkan mikroemulsi tidak terbentuk (data tidak ditampilkan). Cho dkk. (2008) melaporkan bahwa mikroemulsi tidak terbentuk dari campuran Tween 20 (38,8 % (b/b)) dan minyak kanola (5,4 % (b/b)).

Emulsi berbasis lipid terbentuk secara spontan dalam larutan dengan variasi stabilitas bentuk struktur termodinamik yang disebut sebagai kumpulan koloid (misel, bilayer, vesicles, misel yang terbalik). Struktur ini terbentuk untuk meminimalkan kontak yang tidak bersesuaian antara nonpolar ekor pada molekul pengemulsi dan polar pada molekul air (Boca dkk., 1994). Jenis sekumpulan koloid yang dibentuk tergantung prinsip polaritas dan molekul geometri pada molekul pengemulsi. Kekuatan ikatan koloid relatif lemah, dan mempunyai kedinamisan tinggi dan struktur yang fleksibel (Israelachvili, 1994).

Tween 20 kemungkinan dapat meningkatkan stabilitas mikroemulsi pada konsentrasi rendah, namun pada konsentrasi tinggi mikroemulsi tidak terbentuk. VCO dan Tween 20, keduanya mempunyai kandungan asam laurat, sehingga VCO akan mudah larut dalam droplet, karena mempunyai polaritas sama. Bayrak dan Iscan (2005) melaporkan kesesuaian panjang rantai asam lemak antara surfaktan dan fase minyak

merupakan faktor penting dalam pembentukan mikroemulsi. Konsentrasi Tween 20 semakin tinggi dalam campuran surfaktan diduga menyebabkan VCO yang larut semakin tinggi dalam droplet dan membentuk droplet berukuran besar. Droplet berukuran besar diduga menyebabkan larutan menjadi keruh dan nilai turbiditas lebih dari 1 %. Campuran surfaktan dengan perbandingan tepat pada panjang rantai hidrokarbon yang bervariasi kemungkinan dapat mengatur kelarutan VCO menjadi optimum di dalam droplet, sehingga droplet terbentuk berukuran kecil, mikroemulsi menjadi stabil dan meningkatkan kelarutannya. Cho dkk. (2008) melaporkan bahwa campuran surfaktan dengan nilai HLB yang berbeda dapat meningkatkan stabilitas, karena membentuk partikel kecil dan dapat meningkatkan kelarutan.

Formulasi 1, 2, 3, dan 4 mempunyai stabilitas mikroemulsi yang tinggi setelah pemanasan (5 jam, 105 °C) dengan kenampakan transparan dan turbiditas kurang dari 1 %. Pada mikroemulsi o/w, HLB rendah cenderung berada dibagian dalam sedangkan HLB lebih tinggi cenderung berada bagian luar dengan ekor hidrokarbon saling berdekatan yang dapat meningkatkan partisi lapisan antar muka (Cho dkk., 2008). Span 80 (HLB = 4,3) bersifat hidrofobik kemungkinan berada dibagian dalam dan Tween 80 (HLB = 15) kemungkinan berada bagian luar, sedangkan Tween 20 (HLB = 16,7) kemungkinan berada bagian paling luar diantara Tween 80. Tween 20 keberadaan diantara Tween 80 pada bagian luar diduga membentuk partisi lebih rapat pada bagian antar muka mikroemulsi. Sinergisme surfaktan (Tween 80, Tween 20 dan Span 80) dengan perbandingan yang tepat mampu menjaga stabilitas mikroemulsi yang diakibatkan oleh pemanasan.

Tabel 1. Stabilitas mikroemulsi pada variasi formulasi dari beberapa perbandingan surfaktan tween 20, tween 80 dan span 80 pada kadar air 90 % setelah inkubasi 24 jam dan setelah pemanasan 105 °C selama 5 jam

HLB	Formula	Tween 80 (% v/v)	Span 80 (% v/v)	Tween 20 (% v/v)	Perbandingan Minyak (VCO)-Surfaktan (15:85 v/v)			
					Inkubasi 24 jam		Dipanaskan (5 jam, 105 °C)	
					Turbiditas (%)	Kenampakan	Turbiditas (%)	Kenampakan
14.5	1	92	5,5	2,5	0.1336 ^a	Transparan	0.1520 ^a	Transparan
	2	89,5	5,5	5	0.1405 ^a	Transparan	0.1658 ^a	Transparan
	3	87	5,5	7,5	0.1497 ^a	Transparan	0.1877 ^a	Transparan
14	4	88	9,5	2,5	0.1508 ^a	Transparan	0.1601 ^c	Transparan
	5	85	10	5	0.1739 ^a	Transparan	1.4198 ^d	Keruh
	6	82	10,5	7,5	0.1508 ^a	Transparan	0.5827 ^e	Keruh
13.5	7	83	14,5	2,5	0.2038 ^a	Transparan	2.6726 ^f	Keruh
	8	80	15	5	0.2165 ^a	Transparan	2.0934 ^b	Keruh
	9	77	15,5	7,5	0.1635 ^a	Transparan	0.4491 ^b	Keruh

Keterangan: huruf *superscript* yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikan 95 %

Pengaruh Peningkatan Perbandingan Konsentrasi VCO dengan Surfaktan

Tabel 2 menunjukkan mikroemulsi dengan kadar air 90 % pada perbandingan campuran minyak (VCO)–surfaktan (v/v) yaitu 15:85; 20:80 dan 25:75. Konsentrasi VCO meningkat menyebabkan turbiditas meningkat dan kenampakan cenderung menjadi keruh. Konsentrasi VCO meningkat menyebabkan bentuk misel menjadi semakin menggelembung, karena semakin banyak VCO yang terlarut dalam misel, sehingga menyebabkan nilai turbiditas meningkat. Perbandingan campuran (VCO)–surfaktan (v/v) yang diuji semua menunjukkan nilai turbiditas kurang dari 1 %.

Tabel 2. Mikroemulsi pada variasi campuran minyak (VCO)–surfaktan (v/v), perbandingan surfaktan Tween 80:Span 80:Tween 20 = 92:5,5: 2,5 (% v/v) dan kadar air 90 % selama inkubasi 24 jam

Minyak:surfaktan (v/v)	Turbiditas (%)	Kenampakan
15:85	0.1370 ^a	Transparan
20:80	0.2856 ^b	Jernih
25:75	0.7370 ^c	Keruh

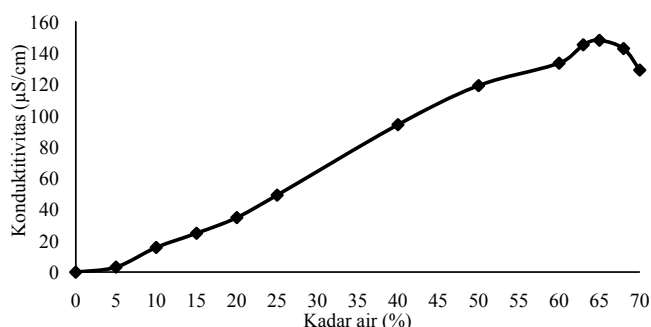
Keterangan: huruf *superscript* yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 95 %

Campuran (VCO)–surfaktan (v/v) dengan perbandingan 25:75 dengan nilai turbiditas kurang dari 1% menunjukkan kenampakan keruh. Konsentrasi VCO meningkat, maka konsentrasi surfaktan menjadi rendah. Konsentrasi surfaktan rendah menyebabkan kapasitasnya melarutkan VCO menurun, sehingga VCO yang tidak terlarutkan oleh surfaktan dalam misel diduga berada dalam fase air, hal ini kemungkinan menyebabkan larutan menjadi keruh. Molekul nonpolar biasanya tidak larut atau hanya sedikit larut di air dan larut dalam larutan surfaktan yang bergabung ke dalam misel atau tipe kelompok koloid lainnya (Dickinson dan McClements, 1995). Tiga faktor penting yang menentukan sifat fungsional mikroemulsi adalah lokasi pelarut dalam misel, jumlah maksimum bahan yang dapat larut per satuan berat surfaktan, dan tingkat proses pelarutan (Dickinson dan McClements, 1995).

Konduktivitas Elektrik

Konduktivitas elektrolit merupakan salah satu pendekatan untuk menentukan perilaku pembentukan mikroemulsi w/o-bikontinyu-mikroemulsi o/w atau sebaliknya (Spermath dkk., 2007; Feng-Feng dkk., 2005; Zhong dkk., 2009). Pembentukan mikroemulsi o/w pada formulasi 1 dengan perbandingan minyak (VCO)-surfaktan (15:85 v/v) dilakukan dengan menggunakan pendekatan nilai konduktivitas seperti ditunjukkan pada Gambar 1. Mikroemulsi w/o terbentuk

pada campuran minyak (VCO)-surfaktan (15:85 v/v) pada kandungan air antara 20 %-50 % dengan ditandai slope yang tajam. Pada kandungan air 50 % hingga 65 %, slope mulai menurun. Pada kisaran kadar air ini diduga mikroemulsi w/o membentuk fase bikontinyu. Mikroemulsi o/w diduga sudah terbentuk pada kadar air 65 %. Mikroemulsi o/w yang terbentuk tidak berubah oleh penambahan air hingga mencapai kadar air 70 %. Pada kadar air > 65 %, konsentrasi mikroemulsi o/w yang terbentuk menurun, sehingga nilai konduktivitas menurun.



Gambar 1. Konduktivitas pada berbagai kadar air pada HLB 14,5 dengan perbandingan minyak-surfaktan (15:85 v/v) dan perbandingan surfaktan Tween 80:Span 80:Tween = 20: 92:5,5: 2,5 (% v/v)

Selanjutnya untuk mengklarifikasi dugaan tersebut dibuat mikroemulsi dengan kadar air 61 %, 63 %, 65 % dan 67 %, hasil klarifikasi ditunjukkan pada Tabel 3. Campuran minyak-surfaktan dengan kandungan air hingga 61 % menunjukkan belum terbentuk mikroemulsi. Mikroemulsi mulai terbentuk setelah campuran minyak-surfaktan mempunyai kandungan air lebih dari 63 %. Stabilitas mikroemulsi o/w dengan kandungan air 63 %, 65 % dan 67 % terhadap pemanasan (5 jam, 105 °C) tinggi. Larutan tidak terpisah, tidak terbentuk gel dan tetap transparan dengan nilai turbiditas di bawah 1 %. Pengujian stabilitas mikroemulsi o/w selanjutnya dipilih mikroemulsi dengan kadar air 65 %.

Tabel 3. Stabilitas mikroemulsi (minyak–surfaktan (15:85 v/v), perbandingan surfaktan Tween 80:Span 80:Tween 20 = 92:5,5: 2,5 (% v/v) dan variasi kadar air 61 %, 63 %, 65 % dan 67 %) terhadap pemanasan 105 °C selama 5 jam setelah 24 jam inkubasi.

Kadar air (%)	Inkubasi 24 jam		Pemanasan (5 jam, 105 °C)	
	Turbiditas (%)	Kenampakan	Turbiditas (%)	Kenampakan
61	1.0191	Jernih	-	Terbentuk gel
63	0.2441 ^b	monofase	0.4353 ^d	Monofase
65	0.2165 ^{ab}	monofase	0.4019 ^c	monofase
67	0.1969 ^a	monofase	0.3973 ^c	Monofase

Keterangan: huruf *superscript* yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 95 %

Stabilitas Mikroemulsi O/W

Mikroemulsi biasanya diaplikasikan dalam sistem tidak dalam bentuk mikroemulsi. Aplikasi mikroemulsi dalam sistem ini menyebabkan konsentrasi air meningkat dan konsentrasi surfaktan menjadi rendah, sehingga mikroemulsi menjadi rapuh dan terdegradasi (Warisnoicharoen dkk., 2000; Flanagan dkk., 2006). Pengenceran mikroemulsi digunakan untuk mengetahui kemampuannya sebagai pembawa nutrisi atau obat-obatan adalah sangat penting, maka mikroemulsi o/w selama 6 jam dievaluasi stabilitasnya dengan menentukan laju perubahan turbiditasnya terhadap pengaruh pengenceran dan pH. Hasil evaluasi laju turbiditas mikroemulsi o/w disajikan pada Tabel 4.

Laju turbiditas selama 0 jam hingga 6 jam mikroemulsi (minyak–surfaktan (15:85 v/v), Formulasi 1 dan kadar air 65 %) terhadap pH dan pengenceran ditunjukkan pada Tabel 4. Laju turbiditas selama 6 jam pada variasi pH dan pengenceran slope persamaan regresi menunjukkan nilai mendekati 0. Hal ini menunjukkan bahwa mikroemulsi yang terbentuk tidak ada perubahan turbiditas dan mempunyai kestabilan yang tinggi terhadap pH dan pengenceran.

Tabel 4. Laju turbiditas mikroemulsi (minyak–surfaktan (15:85 v/v), perbandingan surfaktan Tween 80:Span 80:Tween 20 = 92:5,5: 2,5 (% v/v) dan kadar air 65 %) terhadap pH dan pengenceran selama 0 jam hingga 6 jam

pH	Pengenceran	Laju perubahan turbiditas (%/jam)
3,5	1:1	-0,003
	1:9	0
	1:99	0
4,5	1:1	0
	1:9	-0,001
	1:99	-0,001
Akuades (pH 6,5)	1:1	0,001
	1:9	0
	1:99	-0,000

Keterangan: laju perubahan turbiditas mendekati angka 0 menunjukkan tidak ada perubahan turbiditas selama 6 jam

Uji pemanasan terhadap mikroemulsi merupakan pengujian yang paling kritis. Hal ini disebabkan surfaktan pada suhu tinggi dapat menyebabkan larutan menjadi keruh yang disebut sebagai titik awan (*cloud*). Suhu tinggi menyebabkan dehidrasi meningkat pada bagian hidrofil, sehingga molekul pengemulsi teragregat. Agregat cukup besar mempunyai kemampuan memencarkan cahaya, sehingga menyebabkan larutan kelihatan menjadi keruh. Suhu di atas titik awan (*cloud*), menyebabkan agregat tumbuh menjadi besar dan mengendap yang dipengaruhi oleh gravitasi. Titik awan

(*cloud*) semakin tinggi disebabkan meningkatnya hidrofobik pada molekul surfaktan. Peningkatan hidrofobik disebabkan bagian hidrokarbon meningkat panjangnya atau ukuran kelompok hidrofil menurun (Aveyard dkk., 1990). Uji stabilitas pemanasan mikroemulsi terhadap larutan yang belum/sudah diencerkan menunjukkan nilai turbiditas tidak signifikan dengan turbiditas sebelum dipanaskan, kenampakan transparan dan nilai turbiditas di bawah 1 % (Tabel 5).

Tabel 5. Stabilitas mikroemulsi (minyak–surfaktan (15:85 v/v), perbandingan surfaktan Tween 80:Span 80:Tween 20 = 92:5,5: 2,5 (% v/v) dan kadar air 65%) terhadap sentrifugasi, pemanasan (105 °C selama 5 jam), pH dan pengenceran setelah 24 jam inkubasi

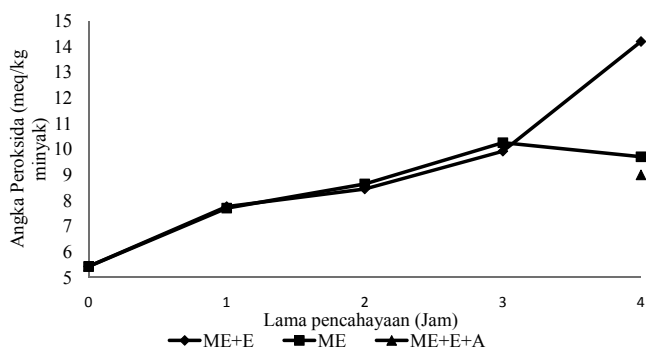
Perlakuan	Turbiditas (%)	Keterangan
Inkubasi 24 jam	0.2349 ^f	Transparan
Sentrifugasi (4500 rpm, 30 menit)	0.1881 ^e	Transparan
Pemanasan (105 °C, 5 jam)	0.4107 ^g	Transparan
pH 3,5		
1:1	0.1635 ^d	Transparan
1:9	0.1436 ^c	Transparan
1:99	0.1059 ^{ab}	Transparan
pH 4,5		
1:1	0.1443 ^c	Transparan
1:9	0.1182 ^b	Transparan
1:99	0.0952 ^a	Transparan
Akuades (pH=6,5)		
1:1	0.1459 ^c	Transparan
1:9	0.1497 ^{cd}	Transparan
1:99	0.0990 ^a	Transparan

Keterangan: huruf supercript yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikan 95 %

Pengaruh Fotooksidasi terhadap Mikroemulsi O/W

Asam lemak bebas yang terdispersi dalam air, akan membentuk misel, di mana bagian polar berada dalam fase air, dan bagian non polar ke fase minyak. Molekul pengemulsi mengatur sendiri lokasi kutub polar di permukaan dan non polar di bagian dalam misel. Oleh karena itu, interaksi pengemulsi dan lipid dalam misel mempengaruhi kestabilan oksidatif lipid. Oksidasi minyak dalam emulsi mempunyai mekanisme berbeda dengan oksidasi minyak dalam bentuk curah. Hal ini disebabkan oleh sifat-sifat wilayah antar muka globula, perilaku prooksidan, antioksidan terpartisi ke dalam minyak, dan pH fase air pada sistem emulsi (McClement dan Decker, 2000). Oksigen yang terdapat pada fase minyak mempunyai kemampuan untuk memulai proses oksidasi. Konsentrasi oksigen meningkat dalam fase air menyebabkan laju difusi oksigen meningkat dan hal ini sudah lebih dari

cukup untuk digunakan mengoksidasi lemak dalam emulsi (Duh dkk., 1999). Angka peroksida mikroemulsi yang tidak diencerkan pada variasi perlakuan yang dikenai cahaya flouresense 4000 lux selama 4 jam ditunjukkan pada Gambar 2.



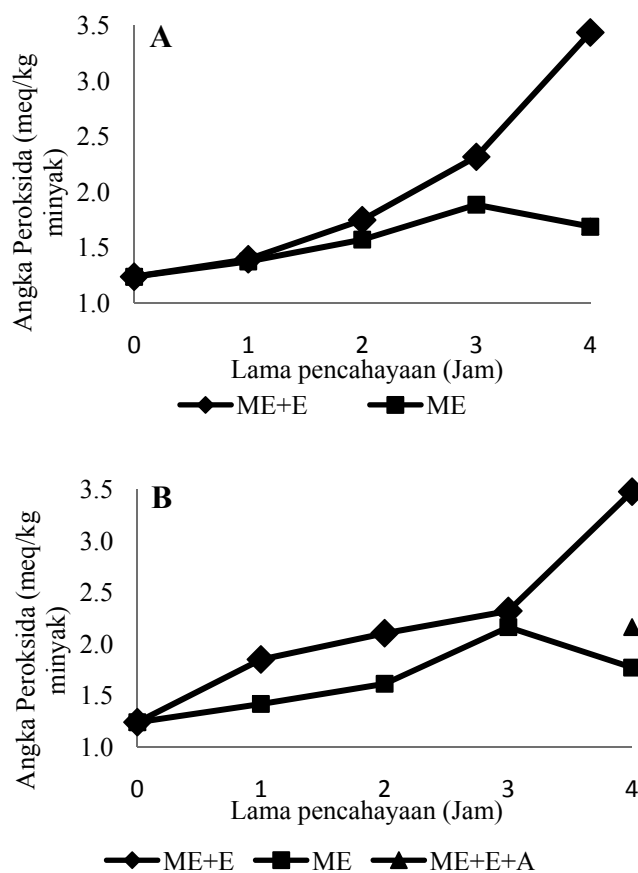
Gambar 2. Angka peroksida mikroemulsi pada variasi perlakuan yang diberi cahaya flouresense 4000 lux selama 4 jam. ME+E: Mikroemulsi diberi eritrosin 5 ppm, ME: Mikroemulsi tanpa diberi eritrosin dan ME+E+A: Mikroemulsi diberi eritrosin 5 ppm terhindar dari cahaya

ME (mikroemulsi tanpa diberi eritrosin) dan ME+E+A (mikroemulsi diberi eritrosin 5 ppm terhindar dari cahaya) setelah fotooksidasi 4 jam menunjukkan angka peroksida tidak signifikan ($P > 0,05$). Hal ini kemungkinan mikroemulsi pada ME tanpa eritrosin dan ME+E+A terjadi autooksidasi yang menyebabkan terbentuknya peroksida meningkat dengan cepat hingga paparan cahaya 3 jam. Peroksida yang terbentuk menurun setelah 3 jam. Penurunan angka peroksida ini kemungkinan disebabkan oleh terbentuknya droplet yang lebih besar atau penggabungan antar droplet setelah sebagian asam lemak yang ada di dalam surfaktan dan VCO mengalami oksidasi. Penggabungan antar droplet ini menyebabkan mikroemulsi mempunyai kemampuan melindungi dari oksidasi oleh oksigen triplet. ME+E (mikroemulsi diberi eritrosin 5 ppm) dan ME mempunyai angka peroksida tidak signifikan ($P > 0,05$) selama 3 jam.

Fotooksidasi ME+E meningkat tajam setelah 3 jam. Hal ini kemungkinan ME+E pada fotooksidasi 3 jam terjadi proses autooksidasi di dalam misel, dimana oksigen singlet yang terbentuk oleh sensitiser eritrosin tidak mampu menembus misel tersebut. Oksidasi asam lemak di dalam misel menyebabkan misel tidak stabil. Hal ini menyebabkan mikroemulsi dengan sendirinya membentuk droplet yang lebih besar atau penggabungan antar droplet. Penggabungan antar droplet ini terjadi setelah sebagian asam lemak yang ada di dalam surfaktan dan VCO mengalami oksidasi. Perubahan stabilitas ini kemungkinan menyebabkan misel banyak yang terbuka dan oksigen singlet dengan cepat mengoksidasi asam

lemak tidak jenuh dari VCO maupun surfaktan. Oksidasi ini menyebabkan peroksida dalam larutan mikroemulsi meningkat.

Pengaruh fotooksidasi terhadap mikroemulsi yang diencerkan 50 kali dan 100 kali yang ditunjukkan pada Gambar 3 mempunyai pola yang sama terhadap mikroemulsi yang tidak diencerkan. Angka peroksida mikroemulsi pengenceran 50 kali dan 100 kali setelah fotooksidasi selama 4 jam sama. Hasil ini mengindikasikan bahwa konsentrasi mikroemulsi o/w rendah (pengenceran 100 kali) mempunyai kemampuan dan efektifitas menghambat terbentuknya peroksida sama dengan konsentrasi mikroemulsi o/w tinggi (pengenceran 50 kali).



Gambar 3. Angka peroksida mikroemulsi pada variasi perlakuan yang diberi cahaya flouresense 4000 lux selama 4 jam. A: pengenceran 50x terhadap mikroemulsi, dan B: pengenceran 100x terhadap mikroemulsi. ME+E: mikroemulsi eritrosin 5 ppm, ME: mikroemulsi tanpa diberi eritrosin dan ME+E+A: mikroemulsi diberi eritrosin 5 ppm terhindar dari cahaya

Yazu dkk. (1996) telah menunjukkan kestabilan oksidasi lebih tinggi pada EPA dibandingkan dengan asam laurat dalam misel *aqueous*. Akan tetapi, konsep berdasarkan perbedaan polaritas radikal peroksi tidak dapat menjelaskan kestabilan oksidatif α -linolenat lebih tinggi dibandingkan

dengan γ -linolenat dalam misel cairan dan pengaruh spesifik Tween 20 pada oksidasi DHA dalam misel *aqueus*.

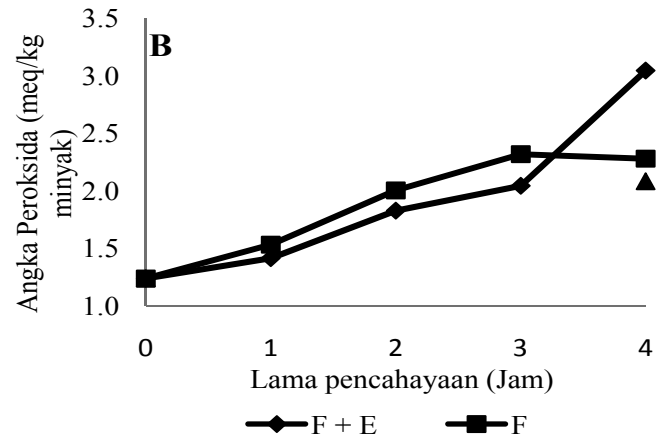
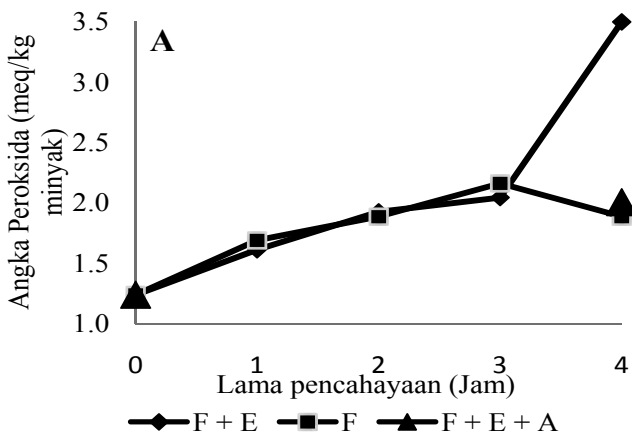
Metode Pelarutan Fucoxanthin dalam Mikroemulsi

Mikroemulsi yang telah diuji kestabilannya dan berhasil dengan baik, digunakan untuk membawa senyawa bioaktif fucoxanthin. Kelarutan fucoxanthin yang ditambahkan dalam campuran VCO dan surfaktan, dan selanjutnya ditambah air 65 % pada pemanasan 70 °C dan di pengaduk magnet mempunyai kelarutan lebih baik dibandingkan fucoxanthin yang ditambahkan ke dalam mikroemulsi dengan kadar air 65 % pada pemanasan 70 °C dan di pengaduk magnet.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa bioaktif lutein (Amar dkk., 2005), likopen dalam minyak jожoba (Garti dkk., 2004) dan likopen dalam limonene (Spernath dkk., 2002) diperoleh kelarutan lebih baik dengan menggunakan senyawa bioaktif dicampur dengan minyak, dicampur dengan surfaktan dan selanjutnya ditambah dengan air dibandingkan senyawa bioaktif langsung ditambahkan ke dalam mikroemulsi.

Pengaruh Fotooksidasi terhadap Mikroemulsi Fucoxanthin

Pengaruh fotooksidasi terhadap mikroemulsi fucoxanthin ditunjukkan pada Gambar 4 mempunyai pola sama dengan mikroemulsi baik yang diencerkan 50x maupun 100x. Pengenceran 50x (12 ppm) pada perlakuan F+E mempunyai kemampuan lebih baik dalam menurunkan angka peroksida setelah 3 jam fotooksidasi dibandingkan pengenceran 100x (6 ppm). Konsentrasi mikroemulsi fucoxanthin lebih tinggi akan lebih mampu melindungi droplet yang terdispersi dari fotooksidasi, sehingga lebih efektif dan lebih mampu menghambat terbentuknya peroksida.



Gambar 4. Angka peroksida mikroemulsi pada variasi perlakuan yang diberi cahaya flouresense 4000 lux selama 4 jam. A: Pengenceran 100x dari mikroemulsi fucoxanthin 600 ppm, B: Pengenceran 50 kali dari mikroemulsi fucoxanthin 600 ppm, F+E: Mikroemulsi fucoxanthin diberi eritrosin 5 ppm, F: Mikroemulsi fucoxanthin tanpa diberi eritrosin dan F+E+A: Mikroemulsi fucoxanthin diberi eritrosin 5 ppm terhindar dari cahaya

KESIMPULAN

Mikroemulsi o/w dengan formulasi minyak VCO dan campuran surfaktan (Tween 80, Tween20, Span 80) mempunyai kestabilan tinggi sebagai pembawa senyawa bioaktif fucoxanthin. Formula mikroemulsi terstabil dalam penelitian ini adalah mikroemulsi dari campuran minyak VCO–surfaktan (15:85 v/v), perbandingan surfaktan Tween 80:Span 80:Tween 20: 92:5,5: 2,5 (% v/v) dengan kadar air 65 %.

DAFTAR PUSTAKA

Adnan. M. (1980). *Lipid Properties and Stability of Partially Defatted Peanuts*. Ph.D. Thesis Univ. of Illinois, Urbana-Champaign.

Amar, L., Aserin, A. dan Garti, N. (2003). Solubilizations patterns of lutein and lutein esters in food grade nonionic microemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 4775-4781.

Aveyard, R., Binks, B.P., Clark, S. dan Fletcher P.D.I. (1990). Cloud points, solubilization and interfacial tensions in systems containing nonionic surfactants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnolog* **48**:161.

Bayrak, Y., dan Iscan, M. (2005). Studies on the phase behavior of the system non-ionic surfactant/alcohol/

- alkane/H₂O. *Colloids and Surfaces a: Physicochemical and Engineering Aspects* **268**:99–103.
- Boca-Raton, F.L, Evans, D.F. dan Wennerstrom, H. (1994). *The Colloid Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*. VCH Publishers, New York.
- Cho, Y.H., Kim, S., Bae, E.K., Mok, C.K. dan Park, J. (2008). Formulation of a cosurfactant-free o/w microemulsion using nonionic surfactant mixtures. *Journal of Food Science* **73**: 115-121.
- Cui, J., Yu, B., Zhao, Y., Zhu, W., Li, H., Lou, H. dan Zhai, G. (2009). Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutical* **371**: 148-155.
- Dickinson, E dan McClements, D.J. (1995). *Advances in Food Colloids*. Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Duh, P.D., Yen, W.J. dan Yen, G.J. (1999). Oxidative stability of polyunsaturated fatty acid and soybean oil in an aqueous solution with emulsifiers. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **78**: 201-204.
- Garti, N., Shevachmanb, M. dan Shanib, A. (2004). Solubilization of lycopene in jojoba oil microemulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **81**: 873-877.
- Feng-Feng Lv., Li-Qiang, Z. dan Chen-Ho, T. (2005). Phase behavior of the microemulsions and stability of the chloramphenicol in the microemulsion-based ocular drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* **301**: 237-246.
- Flanagan, J., dan Singh, H. (2006). Microemulsions: a potential delivery system for bioactive in food. *Journal of Critical Reviews on Food Science and Nutrition* **4**:221–237.
- Hiemenz, P.C. dan Rejogopalan, R. (1997). *Principles of Colloid and Surface Science*. 3rd edition. Dekker, New York.
- Heo, S-J. dan Jeon, Y-J. (2009). Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-binded cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **95**: 101–107.
- Hosokawa, M., Bhaskar, N., Shashima, T. dan Miyashita, K. (2006). Fucoxanthin as a bioactive and nutritionally beneficial carotenoid: a review. *Caroteneoid Science* **10**: 15-28.
- Hosokawa, M., Kudo, M., Maeda, H., Kohno, H., Tanaka, T., dan Miyashita, K. (2004). Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the ppargamma ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochimica Biophysica Acta* **1675**(1-3): 113-9.
- Israelachvili, J. (1994). The science and applications of emulsions an overview. *Colloids Surface a* **91**:1.
- Kotake-Nara, E., Kushiro, M., Zhang, H., Sugawara, T., Miyashita, K. dan Nagao, A. (2001). Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *Journal of Nutrition* **131**(12): 3303-6.
- Kikuzaki, H. dan Nakatami, N. (1993). Antioxidant effects of some ginger constituents. *Journal of Food Science* **58**(6):1407-1410.
- Lee, R.E. (2008). *Phycology*. Cambridge University Press, New York.
- Lee, E.C. dan Min, D.B. (1988). Quenching mechanism of β -carotene on the chlorophyll sensitized photooxidation of soybean oil. *Journal of Food Science* **53**:1894–1895.
- Lin, C.C., Lin, H.Y., Chen, H.C., Yu, M.W. dan Lee, M.H. (2009). Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. *Food Chemistry* **116**: 923–928.
- McClements, D.J., Decker, E.A. dan Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science* **72**: 109-124.
- McClements, D.J. (2008). Lipid-based emulsions and emulsifiers.. *Dalam: Akoh, C.C. dan Min, D.B. (eds.). Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, hal 63-97, Marcel Dekker, New York.
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Takahashi, N., Kawada, T. dan Miyashita, K. (2006). Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *International Journal of Molecular Medicine* **18**(1): 147-52.
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K. dan Miyashita, K. (2005). Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **332**(2): 392-7.
- Marina^a, A.M., Man, Y.B.C. dan Amin, I. (2009). Virgin coconut oil: emerging functional food oil. *Journal of Food Science and Technology* **20**: 1-7.
- Marina^b, A. M., Che Man, Y. B., Nazimah, S. A. H. dan Amin, I. (2009). Chemical properties of virgin coconut oil.

- Journal of the American Oil Chemists' Society* **86**: 301-307.
- Nevin, K. G. dan Rajamohan, T. (2004). Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vivo LDL oxidation. *Clinical Biochemistry* **37**: 830-835.
- Nomura, T., Kikuchi, M., Kubodera, A. dan Kawakami, Y. (1997). Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Journal of Biochemistry and Molecular Biology International* **42**(2): 361-70.
- Sachindra, N.M., Sato, E., Maeda, H., Hosokawa, M., Niwano, Y., Kohno, M. dan Miyashita, K. (2007). Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(21):8516-22.
- Seneviratne, K. N., Hapuarachchi, C. D. dan Ekanayake, S. (2009). Comparison of the phenolic-dependent antioxidant properties of coconut oil extracted under cold and hot conditions. *Food Chemistry* **114**: 1444-1449.
- Shiratori, K., Ohgami, K., Ilieva, I., Jin, X.H., Koyama, Y., Miyashita, K., Yoshida, K., Kase, S. dan Ohno, S. (2005). Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Experimental Eye Research* **81**(4): 422-8.
- Spemath, A., Yagmur, A., Aserin, A., Hoffman, R.E. dan Garti, N. (2002). Food grade microemulsions base on nonionic emulsifiers: media to enhance lycopene solubilization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **108**: 303-308.
- Spemath, A., Aserin, A., Ziserman, L., Danino, D. dan Garti, N. (2007). Phosphatidylcholin embedded microemulsions: physical properties and improved caco-2 cell permeability. *Journal of Controlled Release* **119**: 279-290.
- Wang, X., Jiang, Y. Wang, Y.W., Huang, M.T., Hoa, C.T. dan Huang, Q. (2008). Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through o/w nanoemulsions. *Food Chemistry* **108**:419-424.
- Warisnoicharoen, W., Lansley, A.B. dan Lawrence, M.J. (2000). Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behavior. *International Journal of Pharmaceutical* **198**:7-27.
- Yazu, K., Yamamoto, Y., Ukegawa, K. dan Niki, E. (1996). Mechanism of lower oxidative stability of eicosapentaenoate than linoleate in aqueous micells. *Lipids* **31**: 337.
- Yuan^a, Y., Gao, Y., Zhao, J. dan Mao, L. (2008). Optimisation of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food Research International* **107**: 1300-1306.
- Yuan^b, Y., Gao, Y., Zhao, J. dan Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International* **41**: 61-68.
- Zhong, F., Yu, M., Lou, C., Shoemaker, C.F., Li, Y., Xia, S. dan Ma, J. (2009). Formation and characterization of oil/s and cs/water microemulsions. *Food Chemistry* **115**: 539-544.