

Fabrikasi dan Karakterisasi Nanoemulsi Polivinilpirolidon / Ekstrak Sirih (*Piper betle l.*) Untuk Penghantar Obat Dalam Aplikasi Biomedis

Novi Centia Wangi
Fakultas Teknik Elektro
Purwokerto, Indonesia

novicentiawangi@student.telkomuniversity.ac.id

Adanti Wido Paramadini, S.T., M.Eng.
Fakultas Teknik Elektro
Purwokerto, Indonesia

adanti@student.telkomuniversity.ac.id

Ajeng Dyah Kurniawati, S.TP., M.Sc.
Fakultas Rekayasa Industri
Purwokerto, Indonesia

ajengk@student.telkomuniversity.ac.id

Daun sirih (*Piper betle L.*) memiliki sifat antibakteri dan antioksidan, namun efisiensi penyerapan senyawa aktifnya masih rendah (0,307A). Untuk mengatasinya, dikembangkan nanoemulsi berbasis Polivinilpirolidon (PVP) dengan empat variasi konsentrasi: N1 (0%), N2 (1%), N3 (2,5%), dan N4 (5%). Penelitian ini mengevaluasi aktivitas antibakteri, stabilitas fisikokimia, serta dampak konsentrasi PVP terhadap performa nanoemulsi. Hasil menunjukkan bahwa N3 dan N4 memiliki stabilitas terbaik dengan viskositas 1020 cP dan 1960 cP, ukuran partikel 175 nm dan 150 nm, PDI 0,30 dan 0,25, serta potensial zeta -28 mV dan -32 mV. Aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* menunjukkan zona hambat 0,727 cm (N3) dan 0,623 cm (N4), sedangkan terhadap *S. aureus* masing-masing sebesar 1,68 cm dan 2,07 cm. Morfologi menunjukkan tetesan homogen. Kesimpulannya, formulasi N3 dan N4 terbukti paling stabil dan efektif dalam menghantarkan senyawa aktif daun sirih, menjadikannya kandidat potensial untuk sistem penghantaran obat alami dalam terapi medis.

Kata Kunci : Daun sirih, Nanoemulsi, PVP, Penghantar Obat

I. PENDAHULUAN

Daun sirih telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional karena kandungan senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, tanin, minyak atsiri, dan steroid yang bersifat antibakteri dan antioksidan [1]. Namun, efisiensi penyerapan senyawa fenol dari ekstrak daun sirih masih tergolong rendah. Berdasarkan hukum Lambert-Beer dan hasil spektrofotometri UV-Vis, nilai serapan rata-rata

molekul surfaktan di sekitarnya [4]. Fokus utama dari penelitian ini adalah karakterisasi nanoemulsi akhir selain prosedur pembuatan. Pengujian stabilitas fisik, penilaian morfologi berbasis mikroskop, analisis ukuran partikel *Particle Size Analyzer* (PSA), pengukuran muatan permukaan uji *Zeta Potensi Analyzer*, pengujian viskositas, dan evaluasi aktivitas antibakteri merupakan beberapa teknik karakterisasi [10].

Dengan menambahkan PVP sebagai penstabil pada formulasi nanoemulsi berbasis ekstrak daun sirih,

penelitian ini berupaya mengetahui bagaimana perubahan konsentrasi PVP mempengaruhi sifat fisikokimia nanoemulsi dan aktivitas antibakteri. Analisis stabilitas, ukuran partikel, viskositas, potensi zeta, dan khasiat antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* merupakan bagian dari evaluasi. Temuan penelitian ini diharapkan dapat membantu terciptanya sistem pemberian obat yang lebih stabil dan efisien berdasarkan bahan alami untuk digunakan dalam industri biomedis.

II. KAJIAN TEORI

a) Daun Sirih (*Piper betle l.*)

Daun sirih (*Piper betle L.*) telah lama digunakan sebagai obat tradisional di Asia dan terbukti mampu menghambat pertumbuhan berbagai bakteri Gram-positif, Gram-negatif, serta jamur resisten obat. Kandungannya meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin yang berpotensi memiliki efek farmakologis. Meski demikian, pemanfaatan daun sirih hijau sebagai obat herbal masih terbatas [11] [12] [13].

b) Polivinil Prolidon (PVP)

Povidone digunakan dalam ekstrak daun sirih karena memiliki aliran yang baik, sudut diam rendah, serta meningkatkan kompartibilitas dan mengurangi butiran halus [14] [15]. Sebagai polimer nanoemulsi, povidone juga memenuhi syarat penting seperti biodegradabilitas, biokompatibilitas, stabilitas, dan pelepasan obat terkontrol [16].

c) Nanoemulsi

Surfaktan amfifilik, yang memiliki sifat hidrofilik dan hidrofobik, berfungsi untuk menstabilkan dua fase berbeda, seperti minyak dalam air atau sebaliknya. Surfaktan mengurangi tegangan antar muka dan mencegah agregasi tetesan, sementara ko-surfaktan memperkuat lapisan dengan menyesuaikan diri di antara titik struktural yang lebih lemah [4].

Komponen lainnya dalam nanoemulsi termasuk minyak, pengawet, antioksidan, dan kemoprotektan. Pengawet yang digunakan harus memiliki toksisitas

rendah, stabilitas panas dan penyimpanan yang baik, serta kompatibilitas dan sifat antibakteri untuk memastikan efisiensi dan keamanan nanoemulsi [17] [18].

d) Metode Emulsifikasi Spontan

Adalah pencampuran secara langsung menggunakan energi rendah [19][4].

e) Uji Stabilitas

Pengujian ini bertujuan memastikan kualitas, keamanan, dan efektivitas produk selama masa simpan, dengan mengevaluasi parameter seperti kadar air, kekerasan, pH, viskositas, disintegrasi, disolusi, dan cemaran mikroba agar produk tetap homogen dan sesuai standar farmasi [20].

f) Uji Viskositas

Pengujian yang dilakukan untuk mengukur ketahanan suatu cairan terhadap aliran [18].

Parameter uji viskositas meliputi viskositas dinamis (η) dengan satuan cP atau Pa.s. Rentang viskositas ideal untuk nanoemulsi adalah 10–2000 cP. Deviasi standar digunakan untuk menunjukkan seberapa tersebar data terhadap nilai rata-rata. Standar deviasi dihitung dengan rumus:

$$\sigma = \sqrt{\varepsilon \frac{(xi-\bar{x})^2}{n-1}} \quad (1)$$

- xi adalah masing-masing nilai viskositas,
- $\bar{x}$ adalah rata-rata viskositas,
- n adalah jumlah sampel.

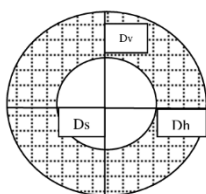
g) Pengamatan Morfologi

Untuk mengamati dan memahami bentuk, struktur, serta ukuran suatu material atau organisme pada skala mikroskopis [21]. Parameter yang diamati dalam uji morfologi meliputi bentuk, ukuran, distribusi ukuran partikel, serta tekstur permukaan [22].

h) Uji Antibakteri

adalah metode evaluasi yang digunakan untuk menentukan apakah suatu bahan atau zat mempunyai kapasitas untuk menghentikan pertumbuhan bakteri [23].

Diameter zona hambat dapat diukur dengan rumus :



$$\frac{(Dv-Ds)+(Dh-Ds)}{2} \quad (2)$$

Dh : Diameter horizontal
Dv : Diameter vertikal
Ds : Diameter sumuran

i) Uji PSA

Pengujian untuk menentukan distribusi ukuran partikel dalam rentang nano hingga mikrometer [24] [25]. mengukur ukuran rata-rata partikel dan rentangnya [27]. Partikel yang lebih besar dan bulat cenderung lebih mudah mengalir, sementara partikel kecil meningkatkan viskositas suspensi [26].

Polydispersity index (PdI) mengukur dispersi ukuran tetesan minyak dalam nanoemulsi, dengan nilai PdI antara 0,1-0,7 menunjukkan monodispers [28].

j) Uji Zeta Potensial

Uji Potensial Zeta digunakan untuk menentukan muatan permukaan partikel dalam suspensi atau larutan, dengan Zeta Sizer sebagai instrumennya [29]. Nilai potensial zeta yang tinggi (lebih dari ± 30 mV) menunjukkan stabilitas emulsi [30], namun jika terlalu tinggi, dapat menyebabkan agregasi terbalik [31].

III. METODE

a) Alat dan Bahan

Penelitian nanoemulsi ini menggunakan berbagai instrumen seperti gelas ukur, pipet, pengaduk magnet hot plate, mikroskop binokular, pengukur zeta, viskometer, dan pengukur partikel untuk analisis sifat fisikokimia, pemanasan, sterilisasi, dan pencampuran. Komponen utama meliputi aquades (fase air), PVP K30 (polimer), Tween 80 (surfaktan), gliserin (kosurfaktan), minyak kedelai (fase minyak), dan minyak sirih (bahan aktif). Media pertumbuhan bakteri menggunakan kaldu nutrisi PA untuk menilai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, dengan kaca objek dan penutup untuk pengamatan mikroskopis.

b) Formulasi Nanoemulsi

Variasi formulasi dilakukan untuk menilai pengaruh komposisi terhadap stabilitas dan karakteristik nanoemulsi. Tabel 3.3 merangkum komposisi sampel formulasi yang diuji.

TABEL 1
VARIASI FORMULASI NANOEMULSI

Sampel	Aqueous phase %	Oil phase %		Surfactant	Co-surfactant	PVP	Total%
		Soybean oil %	p. betle essential oil %				
N1	30	5	5	30	30	0	100
N2	29	5	5	30	30	1	100
N3	27,5	5	5	30	30	2,5	100
N4	25	5	5	30	30	5	100

c) Fabrikasi Nanoemulsi

Dimulai dengan melarutkan PVP dalam aquades. Fase minyak disiapkan dari campuran minyak sirih, minyak kedelai, Tween 80, dan gliserin. Larutan PVP ditambahkan bertahap ke fase minyak sambil diaduk magnetik hingga terbentuk sistem nanoemulsi air dalam minyak atau minyak dalam air.



GAMBAR 1
PROSES HOMOGENESIS MENGGUNAKAN HOTPLATE STIRRER

Setelah semua komponen homogen, sampel di homogenisasi lanjutan menggunakan vortex mixer.



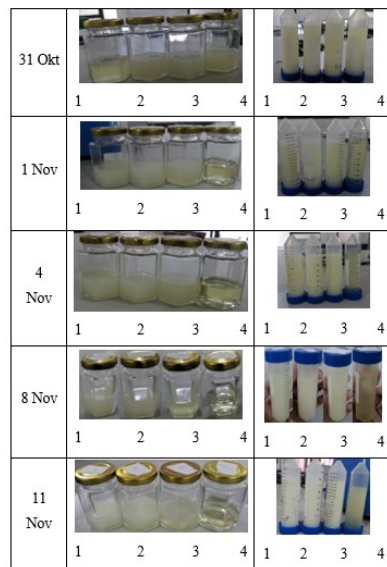
GAMBAR 2
PROSES VORTEX SELAMA 20 MENIT SETELAH
DILAKUKAN *STIRRER*

Hasil akhir disimpan untuk karakterisasi lebih lanjut.

d) Karakterisasi Nanoemulsi.

1) Uji Stabilitas

Pengamatan organoleptik di Laboratorium *Basic Science* Kampus *Telkom University* Purwokerto dilakukan untuk mengevaluasi stabilitas fisik dengan parameter warna, kejernihan, fase, homogenitas, bau, dan konsistensi. Sampel disimpan pada suhu kamar ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) selama 14 hari untuk uji siklus dan menentukan batas fase potensial.



GAMBAR 3
PENGAMATAN STABILITAS SAMPEL SELAMA 14 HARI

2) Uji Viskositas

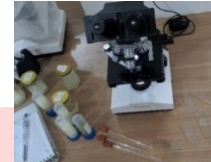
Viskositas nanoemulsi diukur menggunakan viskometer di Laboratorium Fisika *Telkom University* Kampus Purwokerto. Sampel ditempatkan dalam wadah ukur dan dicatat kekentalannya setelah pembacaan stabil, dengan pengukuran dilakukan tiga kali untuk memperoleh nilai rata-rata.



GAMBAR 4
PENGUJIAN DENGAN *VISCOMETER BROOKFIELD*

3) Pengamatan Morfologi

Morfologi nanoemulsi diamati menggunakan mikroskop optik. Pengujian dilakukan di Laboratorium *Basic Science* Universitas Telkom Kampus Purwokerto. Langkah kerja dimulai dengan sampel ditetaskan pada kaca preparat dan diamati pada perbesaran yang sesuai untuk menganalisis bentuk dan distribusi partikel.



GAMBAR 5
ALAT DAN BAHAN PENGAMATAN MORFOLOGI

4) Uji Antibakteri

Laboratorium *Basic Science* Kampus *Telkom University* Purwokerto dijadikan sebagai tempat pelaksanaan prosedur uji antimikroba. Prosesnya dimulai dengan menimbang tiga gram media NA, kemudian dilarutkan dalam aquades dengan cara dipanaskan hingga mendidih dan disterilkan.



GAMBAR 6
PELARUTAN NA DAN AQUADES DENGAN
MAGNETIC STIRRER SAMPAI MENDIDIH

Sterilisasi dilakukan dengan dua metode: oven untuk alat gelas pada suhu 150°C selama 2 jam, dan autoklaf untuk NA serta blue tip pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, NA dituangkan dan didinginkan.



GAMBAR 7
PENUANGAN NA PADA MEDIA CAWAN PETRI

Setelah media diinokulasi dengan mikroorganisme uji, lubang dengan diameter tertentu dibuat.



GAMBAR 8

PEMBUATAN SUMUR YANG AKAN DIISI DENGAN SAMPEL

Sampel dimasukkan ke dalam sumur dimana media telah diisi dengan bakteri *SA* dan *E-Coli*, dengan total ada 4 cawan petri dan per cawan petri berisikan 2 sampel.



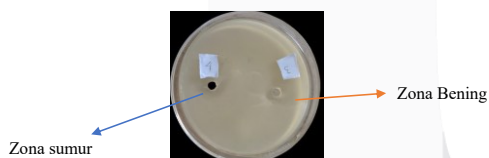
GAMBAR 9
MEDIA YANG SUDAH DIBERI BAKTERI *SA* DAN *E-COLI*

Setelah sampel siap, proses selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.



GAMBAR 10
PROSEDUR INKUBASI 24 JAM PADA SUHU KAMAR

Zona hambat diukur berdasarkan selisih antara zona bening dan zona sumur. Karena bentuknya tidak simetris, pengukuran dilakukan dengan tiga diagonal untuk mewakili resistensi bakteri secara akurat.



GAMBAR 11
HASIL YANG MENUNJUKKAN ADANYA ZONA HAMBAT

5) Uji PSA

Pengujian dilakukan di Laboratorium UII dengan mengencerkan 1 mL nanoemulsi menggunakan 250 mL Aqua Pro. Ukuran partikel dan PDI diukur menggunakan PSA setelah sampel ditempatkan dalam kuvet.

6) Uji Zeta Potensial

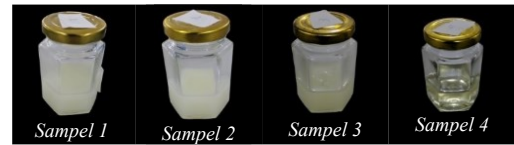
Pengujian di Laboratorium UII menggunakan Zeta Sizer untuk mengukur potensi zeta pada suhu 25°C. 1 mL nanoemulsi diencerkan dalam 250 mL air, dan nilai potensi zeta di atas ± 30 mV menunjukkan stabilitas.

IV. PEMBAHASAN

a) Fabrikasi Nanoemulsi

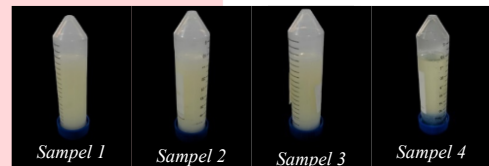
Penelitian ini dimulai dengan fabrikasi nanoemulsi dengan formulasi sesuai dengan tabel 4.1 Gambar di

bawah menunjukkan hasil akhir dari proses fabrikasi nanoemulsi. Proses pembuatan dilakukan pada tanggal 29 oktober 2024.



GAMBAR 12
NANOEMULSI SEBELUM DI VORTEX

Pada gambar menunjukkan kurang tercampur, fase terpisah dan tidak stabil namun setelah diberikan perlakuan vortex, terlihat bahwa larutan menjadi lebih homogen.



GAMBAR 13
HASIL NANOEMULSI SEBELUM DAN SETELAH DI VORTEX

Hal ini mengindikasikan bahwa proses vortex efektif menjadikan emulsi yang lebih stabil [32]. Dari hasil diatas dapat di analisis formulasi berdasarkan konsentrasi PVP

TABEL 2
VARIASI FORMULASI NANOEMULSI

Sampel	Aqueous phase %	Oil phase %		Surfactant	Co-surfactant	PVP	Total%
		Soybean oil %	p. beetle essential oil %				
N1	30	5	5	30	30	0	100
N2	29	5	5	30	30	1	100
N3	27,5	5	5	30	30	2,5	100
N4	25	5	5	30	30	5	100

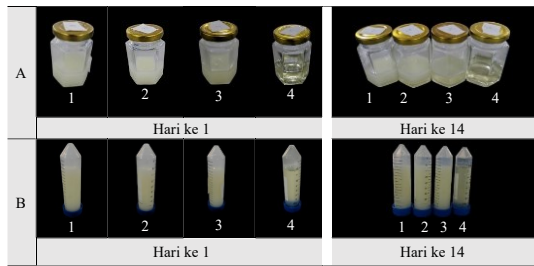
Stabilitas nanoemulsi meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi PVP; N1 tanpa PVP menunjukkan pemisahan fase yang cepat [32][34], N2 dengan 1% PVP mulai menunjukkan sedikit peningkatan stabilitas meski masih terbatas, N3 dengan 2,5% PVP tampil lebih stabil dan homogen setelah vortex [34]. sementara N4 dengan 5% PVP menunjukkan stabilitas tertinggi dan tampilan emulsi paling homogen [33] [35].

Hasil observasi menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi PVP meningkatkan stabilitas dan homogenitas nanoemulsi [34], dengan tidak adanya pemisahan fase pada sampel dengan konsentrasi PVP lebih tinggi setelah proses vortex [36][37].

b) Karakterisasi Nanoemulsi

1) Uji Stabilitas

Pengamatan harian selama 14 hari, Pengujian dilakukan dari tanggal 29 Oktober dan diakhiri dihari ke 14 pada 11 November 2024.



GAMBAR 14
KENAMPAKAN SAMPEL HARI KE-1 SAMPAI HARI
KE-14

Pengamatan langsung terhadap sampel dilakukan untuk mencari per harinya. Parameter berikut digunakan untuk melakukan observasi ini

TABEL 3
PENGAMATAN HARIAN

Parameter Pengamatan	Hari Ke 1 (29/10/2024)								Hari Ke 3 (31/10/2024)							
	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B
Warna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejernihan	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
Pemisahan Fase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Homogenitas	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Bau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Konsistensi	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Parameter Pengamatan	Hari Ke 4 (01/11/2024)								Hari Ke 7 (04/11/2024)							
	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B
Warna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejernihan	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
Pemisahan Fase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Homogenitas	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Bau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Konsistensi	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Parameter Pengamatan	Hari Ke 11 (08/11/2024)								Hari Ke 14 (11/11/2024)							
	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B
Warna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejernihan	J	J	J	J	J	J	J	J	J	AK	J	J	J	J	J	J
Pemisahan Fase	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Homogenitas	STH	STH	STH	H	H	H	H	H	STH	STH	STH	H	H	H	H	H
Bau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Konsistensi	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K

Keterangan:

Sampel A menunjukkan hasil sebelum di-vortex
Sampel B menunjukkan hasil setelah di-vortex

Berdasarkan hasil uji stabilitas ini, formulasi yang paling stabil adalah N3 dan N4 [40]. Ditunjukkan pada kandungan PVP pada N3 dan N4 memberikan kestabilan tinggi, terutama terhadap pemisahan fase, kejernihan, dan homogenitas [41]. Formulasi dengan PVP yang lebih rendah (N1 dan N2) lebih rentan terhadap ketidakstabilan dibandingkan N3 dan N4, meskipun proses vorteks membantu menstabilkan emulsi untuk sementara [32]. Selain itu, N4 memiliki hasil tertinggi baik dari segi stabilitas

kimia maupun fisik serta merupakan formulasi paling stabil dengan konsentrasi PVP 5%. N3 mempunyai kestabilan yang cukup tinggi dengan kandungan PVP 2,5% , oleh karena itu dapat juga menjadi pertimbangan jika diperlukan efektivitas biaya dan pengurangan viskositas. Untuk pembuatan nanoemulsi yang stabil dalam jangka waktu yang lama, maka formulasi N3 dan N4 direkomendasikan [18].

2) Uji Viskositas

Pengujian ini menggunakan viskometer Pengujian dilakukan pada tanggal 4 November 2024.

TABEL 4
HASIL UJI VISKOSITAS

Sampel	Viskositas (cP)
1A	774.0
2A	730.0
3A	1120
4A	2070
1B	678.0
2B	684.0
3B	1020
4B	1960

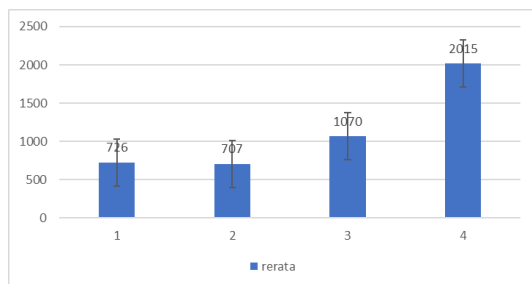
Keempat sampel yang diperiksa memiliki temuan pengukuran viskositas yang berkisar antara 707,0 hingga 2015,0 cP. Sampel 2 memiliki nilai viskositas terendah yaitu sebesar $707,0 \pm 32,53$ cP, sedangkan sampel 4 memiliki nilai viskositas terbesar yaitu sebesar $2015,0 \pm 77,78$ cP. Tabel di bawah ini menampilkan hasil pengukuran viskositas secara lengkap.

TABEL 5
RERATA HASIL PENGUKURAN VISKOSITAS

Sampel	Rerata $\pm$ Standar Deviasi (cP)
1	$726,0 \pm 67,88$
2	$707,0 \pm 32,53$
3	$1070,0 \pm 70,71$
4	$2015,0 \pm 77,78$

Keterangan: Nilai merupakan rerata dari dua sampel A dan B

Hasil pengukuran menunjukkan variasi standar deviasi antara sampel, dengan sampel 2 memiliki deviasi terendah ($32,53$ cP), menandakan keseragaman yang lebih tinggi, sementara sampel 4 memiliki deviasi tertinggi ($77,78$ cP), menunjukkan variasi data yang lebih besar.



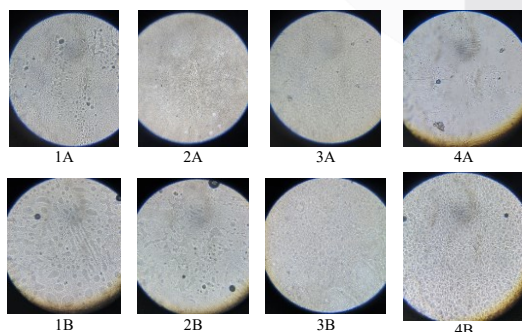
GAMBAR 15
DIAGRAM BATANG VISKOSITAS SAMPEL DENGAN STANDAR DEVIASI

Formulasi N1 tanpa PVP memiliki viskositas paling rendah, yakni 774 cP sebelum vortex dan turun menjadi 678 cP setelah vortex, menunjukkan emulsi yang encer dan kurang stabil secara fisik [42]. Pada N2 dengan 1% PVP, viskositas meningkat sedikit (730 cP menjadi 684 cP), menandakan bahwa meski belum signifikan, PVP mulai berkontribusi dalam meningkatkan kekentalan dan stabilitas emulsi [43]. Peningkatan viskositas lebih jelas terlihat pada N3 (2,5% PVP) dengan nilai 1120 cP sebelum vortex dan 1020 cP sesudahnya, menunjukkan peran PVP sebagai agen pembentuk struktur yang membantu mencegah koalesensi droplet [44]. Sementara itu, N4 dengan 5% PVP menunjukkan viskositas tertinggi, yakni 2070 cP sebelum dan 1960 cP setelah vortex, mencerminkan terbentuknya jaringan kuat dalam fase kontinu air yang memberikan stabilitas fisik tinggi terhadap gangguan mekanik [45].

Formulasi N4 menunjukkan stabilitas terbaik dengan viskositas tinggi [46], cocok untuk emulsi yang butuh ketahanan fase. Jika viskositas tinggi dianggap kurang praktis, N3 bisa jadi alternatif dengan stabilitas baik dan tekstur lebih cair [44].

3) Pengamatan Morfologi

Pengamatan dilakukan pada tanggal 8 November dan 11 November 2024 hasil pengamatan dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



GAMBAR 16
KENAMPAKAN SAMPEL DI BAWAH MIKROSKOP DENGAN PEMBESARAN 25X

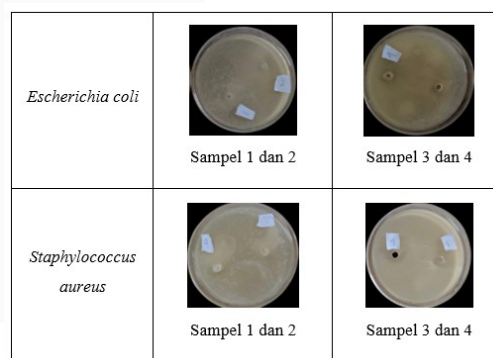
Pada sampel N1A, droplet minyak tampak besar dan tidak merata karena tanpa PVP, yang

menyebabkan tegangan permukaan tinggi dan memicu koalesensi awal [48][49][50]. Setelah vortex (N1B), distribusi sedikit membaik namun ukuran droplet tetap besar dan sistem tetap tidak stabil tanpa stabilizer [48][50]. N2A menunjukkan droplet lebih kecil dan mulai merata, menandakan efek 1% PVP dalam menurunkan tegangan permukaan [48][50]. Setelah vortex (N2B), droplet lebih seragam, meski masih ditemukan droplet besar karena konsentrasi PVP yang belum optimal [50]. N3A memperlihatkan ukuran droplet kecil dan distribusi merata berkat pengaruh PVP 2,5% [48], dan setelah vortex (N3B), droplet tetap kecil dan seragam, menunjukkan stabilitas tinggi [50][51]. N4A memiliki droplet sangat kecil dan sangat merata sejak awal, karena PVP 5% efektif menurunkan tegangan permukaan dan meningkatkan viskositas [48][50]. Setelah vortex (N4B), ukuran dan distribusi droplet tetap stabil, menjadikan N4 sistem paling stabil di antara semua sampel [48][50].

Disimpulkan formulasi terbaik untuk aplikasi yang membutuhkan ketahanan tinggi terhadap separasi fase adalah N4 dengan 5% PVP, sedangkan N3 dengan 2,5% PVP dapat menjadi pilihan yang lebih cair dan cocok untuk aplikasi yang memerlukan viskositas lebih rendah [52][14].

4) Uji Antibakteri

Pengujian dilakukan pada 19 Desember 2024 menggunakan sampel yang disimpan sejak 29 Oktober 2024 (hari ke-52). Bakteri uji terdiri dari *Staphylococcus aureus* (Gram positif) dan *Escherichia coli* (Gram negatif) [53][54].



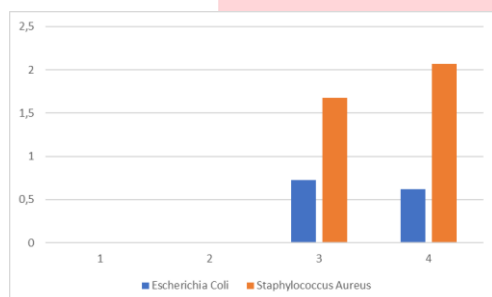
GAMBAR 17
HASIL PENGUJIAN DENGAN BAKTERI SA DAN E-COLI

Dari hasil paling baik yang didapat pada sampel 3 dan 4 menunjukkan adanya zona hambat selanjutnya dapat dihitung zona bening dan zona sumur untuk mendapatkan zona hambatnya [55].

TABEL 6
DIAMETER ZONA HAMBAT

Sampel	<i>Escherichia Coli</i>				<i>Staphylococcus Aureus</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Zona Bening (cm)	0	0	1,32	1,113	0	0	2,59	2,8283
Zona Sumur (cm)	0	0	0,593	0,49	0	0	0,91	0,7616
Zona Hambat (cm)	0	0	0,727	0,623	0	0	1,68	2,0667

Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa pada hari ke-52, sampel 3 dan 4 masih aktif menghambat *S. aureus* dengan zona hambat masing-masing 1,68 cm dan 2,07 cm, di mana sampel 4 lebih efektif. Namun, efektivitas terhadap *E. coli* lebih rendah, ditandai dengan zona hambat yang lebih sempit, menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih kuat terhadap bakteri Gram positif [56].



GAMBAR 18
GRAFIK ZONA HAMBAT NANOEMULSI

Dari hasil yang didapat, meskipun sampel telah disimpan selama 52 hari, aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* tetap signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa aktif dalam sampel memiliki stabilitas yang cukup baik dalam jangka waktu tertentu. Oleh karena itu, disimpulkan bahwa jika menggunakan sampel yang lebih baru, efektivitas antibakteri dapat lebih meningkat [57].

5) Uji PSA

Pengujian dilakukan pada sampel 3 dan 4, yang telah dipilih berdasarkan hasil terbaik uji dilakukan tanggal 20 desember 2024.

TABEL 7
HASIL UJI PSA

Parameter	Sampel 3	Sampel 4
Ukuran partikel rata-rata	175 nm	150 nm
PDI	0,30	0,25

Hasil analisis ukuran partikel menunjukkan bahwa sampel 3 dan 4 memiliki rata-rata ukuran partikel masing-masing 175 nm dan 150 nm, dengan nilai Indeks Polidispersitas (PDI) sebesar 0,30 dan 0,25. Berdasarkan kriteria Jusnita (2014), nanoemulsi dikatakan terbentuk bila ukuran partikel <200 nm dan PDI antara 0,2–0,6, yang berarti kedua sampel memenuhi syarat

sebagai nanoemulsi stabil terhadap pertumbuhan partikel dan fragmentasi gravitasi [10].

Nilai PDI yang lebih rendah pada sampel 4 dibandingkan sampel 3 menunjukkan distribusi ukuran partikel yang lebih seragam dan homogen, yang berkontribusi pada kestabilan sistem. Hal ini menandakan bahwa formulasi sampel 4 memiliki potensi lebih baik untuk aplikasi penghantaran obat karena lebih tahan terhadap pemisahan fase dan lebih stabil dalam jangka panjang.

6) Uji Zeta Potensial

Pada sediaan emulsi, nilai potensial zeta lebih besar dari ± 30 mV dianggap baik. Berdasarkan muatan permukaan partikel pada tanggal uji 20 Desember 2024 [58].

TABEL 8
UJI ZETA POTENSIAL

Parameter	Sampel 3	Sampel 4
Zeta potensial	-28 mv	-32 mv
Stabilitas	Stabil (Cukup Baik)	Sangat Stabil

Hasil uji potensi zeta menunjukkan sampel 4 memiliki nilai -32 mV dan sampel 3 sebesar -28 mV. Nilai di atas ± 30 mV mengindikasikan stabilitas tinggi [30]. Kandungan pada sampel 4 memberikan stabilitas lebih baik dan ukuran partikel lebih kecil [59]. Sebaliknya, penurunan PVP pada sampel 3 menyebabkan distribusi partikel lebih lebar dan stabilitas menurun karena mendekati batas bawah stabilitas elektrostatik [60]. Secara keseluruhan, nilai potensi zeta tinggi dan ukuran partikel kecil menunjukkan kestabilan emulsi yang optimal.

V. KESIMPULAN

Penelitian sintesis dan karakterisasi nanoemulsi PVP/ekstrak daun sirih menunjukkan bahwa formulasi N3 dan N4 memiliki stabilitas fisikokimia terbaik. Keduanya menunjukkan ketahanan terhadap pemisahan fasa, distribusi tetapan seragam (0,30 mV dan 0,25 mV), ukuran partikel kecil (175 nm dan 150 nm), viskositas ideal (1020 cP dan 1960 cP), serta nilai zeta potensial -28 mV dan -32 mV yang menandakan stabilitas koloid tinggi. Uji antibakteri menunjukkan zona hambat terhadap *E. coli* sebesar 0,727 cm (N3) dan 0,623 cm (N4), serta terhadap *S. aureus* sebesar 1,68 cm (N3) dan 2,0667 cm (N4). Hasil ini menunjukkan efektivitas penghantaran bahan aktif dan potensi besar formulasi ini untuk aplikasi biomedis sebagai sistem penghantaran obat yang stabil dan efisien.

REFERENSI

- [1] Dwi Saryanti, Dian Nugraheni, and Nisa Sindi Astuti, "Preparation and Characterization of Betel Leaves (*Piper betle* Linn) Extract Nanoparticle with Ionic Gelation Method," *Journal of Tropical*

- Pharmacy and Chemistry*, vol. 5, no. 1, pp. 15–20, 2020, doi: 10.25026/jtpc.v5i1.224.
- [2] A. Primadimanti, L. Amura, and A. M. Ulfa, "ANALISIS SENYAWA FENOLIK PADA EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU (Piper betle L.)," *Jurnal Farmasi Malahayati*, vol. 3, no. 1, pp. 23–31, 2020, doi: 10.33024/jfm.v3i1.2363.
 - [3] Y. Hisprastin and R. F. Nuwarda, "REVIEW: PERBEDAAN EMULSI DAN MIKROEMULSI PADA MINYAK NABATI," *Farmaka*, 2013.
 - [4] Y. Singh *et al.*, "Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 252, pp. 28–49, 2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.03.008.
 - [5] Z. A. A. Aziz *et al.*, "Enrichment of Eucalyptus oil nanoemulsion by micellar nanotechnology: transdermal analgesic activity using hot plate test in rats' assay," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-50134-y.
 - [6] M. Zieba *et al.*, "Polymeric carriers for delivery systems in the treatment of chronic periodontal disease," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 7, pp. 1–21, 2020, doi: 10.3390/polym12071574.
 - [7] D. J. S. Putra, "Penggunaan Polivinil Piroolidon (PVP) Sebagai Bahan Pengikat Pada Formulasi Tablet Ekstrak Daun Sirih (Piper betle L.)," *Jurnal Farmasi Udayana*, vol. 8, no. 1, p. 14, 2019, doi: 10.24843/jfu.2019.v08.i01.p03.
 - [8] H. Nazli, B. Mesut, and Y. Özsoy, "In vitro evaluation of a solid supersaturated self nanoemulsifying drug delivery system (Super-snedds) of aprepitant for enhanced solubility," *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 11, 2021, doi: 10.3390/ph14111089.
 - [9] N. Hegde, K. Juvele, S. Puri, A. Chavan, and S. Shah, "Box-Behnken design based optimization of polyvinylpyrrolidone stabilized valproic acid nanoemulsion and evaluation of its anticancer potential," *Colloid Polym Sci*, vol. 302, no. 10, pp. 1523–1539, 2024, doi: 10.1007/s00396-024-05283-6.
 - [10] D. A. Puspitasari, N. Rahmawati, N. K. Putri, and M. Fajar, "Nanoemulsi Ekstrak Wortel dan Virgin Coconut Oil sebagai suplemen ProVitamin A untuk Mencegah Kekurangan Vitamin A," *agriTECH*, vol. 42, no. 1, p. 65, 2022, doi: 10.22146/agritech.47743.
 - [11] N. M. D. M. W. Nayaka *et al.*, "Piper betle (L): Recent review of antibacterial and antifungal properties, safety profiles, and commercial applications," *Molecules*, vol. 26, no. 8, pp. 1–21, 2021, doi: 10.3390/molecules26082321.
 - [12] R. K. Gupta, P. Guha, and P. P. Srivastav, "Phytochemical and biological studies of betel leaf (Piper betle L.): Review on paradigm and its potential benefits in human health," 2023. doi: 10.1016/j.chnaes.2022.09.006.
 - [13] N. A. ZarĀġā, -ġ,ġah, S. Syachruddin, and K. Kusmiyati, "The Effect of Green Betel Leaves (Piper betle L.) Extract on Wounding Healing in Mice (Mus musculus L.)," *Jurnal Biologi Tropis*, 2021, doi: 10.29303/jbt.v21i1.2282.
 - [14] D. J. S. Putra, "Penggunaan Polivinil Piroolidon (PVP) Sebagai Bahan Pengikat Pada Formulasi Tablet Ekstrak Daun Sirih (Piper betle L.)," *Jurnal Farmasi Udayana*, 2019, doi: 10.24843/jfu.2019.v08.i01.p03.
 - [15] M. Abdassah, "Nanopartikel Dengan Gelasi Ionik Farmaka," 15 (1): 45-52, *Farmaka*, 2017.
 - [16] M. Zieba *et al.*, "Polymeric carriers for delivery systems in the treatment of chronic periodontal disease," 2020. doi: 10.3390/polym12071574.
 - [17] Y. Nakama, *Chapter 15 Surfactants*. 2017.
 - [18] S. Rafique, N. G. Das, and S. K. Das, "Nanoemulsions: An emerging technology in drug delivery," in *Emerging Technologies for Nanoparticle Manufacturing*, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-50703-9_17.
 - [19] C. Solans, D. Morales, and M. Homs, "Spontaneous emulsification," 2016. doi: 10.1016/j.cocis.2016.03.002.
 - [20] S. Salman, A. Y. D. Nanda, D. A. H. Irawan, N. Y. Wahyudi, and N. O. E. Megrian, "Perkembangan Uji Stabilitas Berdasarkan Parameter pada Sediaan Suspensi dengan Berbagai Bahan Aktif yang Berbeda," *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, vol. 6, no. 2, pp. 633–639, 2023, doi: 10.36490/journal-jps.com.v6i2.99.
 - [21] G. Tj Sulungbudi *et al.*, "Majalah Polimer Indonesia Pembuatan Nanopartikel Magnetik Terlapis Kitosan untuk Aplikasi Biomedis," vol. 19, no. 2, pp. 107–116, 2016.
 - [22] A. Nikmah and R. Kurniawan, "Sintesis Hydroxyapatite Nanoparticle dari Limbah Cangkang Bekicot dan Aktivitas Antibakterinya sebagai Kandidat Material Biomedis," *Jurnal Sains dan Edukasi Sains*, vol. 7, no. 1, pp. 23–28, 2024, doi: 10.24246/juses.v7i1p23-28.
 - [23] Y. R. Rishliani, *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Nanas (Ananas Comosus (L.) Merr.) Terhadap Propionibacterium Acnes*. 2022.
 - [24] I. I. Latumakulita and S. Suparno, "Characterization of Silver Nanoparticle Electrolysis Method with UV-Vis Spectrometer, Atomic Absorption Spectrophotometer, and Particle Size Analyzer," *Kasuari: Physics Education Journal (KPEJ)*, vol. 5, no. 1, pp. 42–52, 2022, doi: 10.37891/kpej.v5i1.178.
 - [25] R. Dwistika, "Karakteristik Nanopartikel Perak Hasil Produksi dengan Teknik Elektrolisis Berdasarkan Uji Spektrofotometer UV-VIS dan Particle Size Analyzer (PSA)," *Universitas Negeri Yogyakarta*, pp. 1–76, 2018.
 - [26] Horiba, "Horiba Scientific - A GUIDEBOOK TO PARTICLE SIZE ANALYSIS," *Horiba Instruments, Inc*, 2012.
 - [27] G. T. Sulungbudi, W. Z.L., R. Salam, and M. Mujamilah, "Pengendalian Suhu Ultrasonikasi Pada Pelapisan Nanopartikel Magnet (Fe₃O₄) Dengan Kitosan," *Jurnal Kimia dan Kemasan*, vol. 39, no. 2, p. 95, 2017, doi: 10.24817/jkk.v39i2.2838.
 - [28] L. Dwi Hanifah, M. Fajar Pradipta, and N. Cahyandaru, "Optimasi Kondisi Proses Pembuatan

- Nanoemulsi Minyak Serai Wangi Dengan Metode Taguchi Sebagai Antijamur Pada Cagar Budaya,” *Jurnal Konservasi Cagar Budaya*, vol. 16, no. 2, pp. 131–147, 2022, doi: 10.33374/jurnalkonservasicagarbudaya.v16i2.293.
- [29] V. Uskoković, Z. Castiglione, P. Cubas, L. Zhu, W. Li, and S. Habelitz, “Zeta-potential and particle size analysis of human amelogenins,” *J Dent Res*, 2010, doi: 10.1177/0022034509354455.
- [30] F. S. Handayani, B. H. Nugroho, and S. Z. Munawiroh, “Optimization of low energy nanoemulsion of Grape seed oil formulation using D-Optimal Mixture Design (DMD) Optimasi Formulasi Nanoemulsi Minyak Biji Anggur Energi Rendah dengan D-Optimal Mixture Design (DMD),” *Jurnal Ilmiah Farmasi*, vol. 14, no. 1, pp. 17–34, 2018, [Online]. Available: <http://journal.uui.ac.id/index.php/JIF>
- [31] A. Serrano-Lotina, R. Portela, P. Baeza, V. Alcolea-Rodriguez, M. Villarroel, and P. Ávila, “Zeta potential as a tool for functional materials development,” *Catal Today*, 2023, doi: 10.1016/j.cattod.2022.08.004.
- [32] A. Roy and P. Guha, “Formulation and characterization of betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil based nanoemulsion and its in vitro antibacterial efficacy against selected food pathogens,” *J Food Process Preserv*, vol. 42, no. 6, pp. 1–7, 2018, doi: 10.1111/jfpp.13617.
- [33] Yenny Meliana, *Peran Teknologi Nanoemulsi untuk Pengembangan Mutu Kosmetik dari Herbal Asli Indonesia*, no. November. 2022. doi: 10.55981/brin.716.
- [34] R. T. Sari, “UJI STABILITAS DAN ANTIBAKTERI SPRAY NANOEMULSI EKSTRAK BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea* L.) DENGAN VARIASI POLIETILEN GLIKOL (PEG) 400,” *Skripsi Farmasi*, vol. 8, no. 1, pp. 25–41, 2023, [Online]. Available: <https://repository.malahayati.ac.id/index.php/skfarmasi/article/view/2094>
- [35] D. Formulasi *et al.*, “OPTIMASI KONSENTRASI TWEEN 80 DAN PROPILENGLIKOL DALAM FORMULASI NANOEMULSI MINYAK ATSIRI SEREH WANGI (*Cymbopogon nardus* L.),” 2022.
- [36] D. Andriani, M. Saiful Amin, S. Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, and K. Kunci, “FORMULASI NANOEMULGEL MINYAK ATSIRI PALMAROSA (*Cymbopogon martinii*) DAN AKTIVITAS ANTIINFLAMASINYA,” *Cendekia Journal of Pharmacy*, vol. 7, no. 2, pp. 150–158, 2023, [Online]. Available: <http://cjp.jurnal.stikescendekiautamakudus.ac.id>
- [37] A. Gawin-Mikołajewicz, U. Nawrot, K. H. Malec, K. Krajewska, K. P. Nartowski, and B. L. Karolewicz, “The Effect of High-Pressure Homogenization Conditions on the Physicochemical Properties and Stability of Designed Fluconazole-Loaded Ocular Nanoemulsions,” *Pharmaceutics*, 2024, doi: 10.3390/pharmaceutics16010011.
- [38] S. A. Wulansari, R. Sumiyani, and N. L. D. Aryani, “Pengaruh Konsentrasi Surfaktan Terhadap Karakteristik Fisik Nanoemulsi Dan Nanoemulsi Gel Koenzym Q10,” *Jurnal Kimia Riset*, vol. 4, no. 2, p. 143, 2019, doi: 10.20473/jkr.v4i2.16164.
- [39] M. Maharini, R. Rismarika, and Y. Yusnelti, “Pengaruh konsentrasi PEG 400 sebagai kosurfaktan pada formulasi nanoemulsi minyak kepayang,” *Chempublish Journal*, vol. 5, no. 1, pp. 1–14, 2020, doi: 10.22437/chp.v5i1.7604.
- [40] F. B. de Carvalho-Guimarães, K. L. Correa, T. P. de Souza, J. R. Rodriguez Amado, R. M. Ribeiro-Costa, and J. O. C. Silva-Júnior, “A Review of Pickering Emulsions: Perspectives and Applications,” 2022. doi: 10.3390/ph15111413.
- [41] P. Franco and I. De Marco, “The use of poly(N-vinyl pyrrolidone) in the delivery of drugs: A review,” 2020. doi: 10.3390/POLYM12051114.
- [42] M. E. Rowe, R.C., Sheskey, P.J. Quinn, “Rowe, R.C., Sheskey, P.J. and Quinn, M.E. (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th Edition, Pharmaceutical Press,” *Revue des Nouvelles Technologies de l'Information*, 2009.
- [43] D. J. McClements, *Food Emulsions: PRINCIPLES, PRACTICES, AND TECHNIQUES, THIRD EDITION*. 2015. doi: 10.1201/b18868.
- [44] Y. Tian, J. Zhou, C. He, L. He, X. Li, and H. Sui, “The Formation, Stabilization and Separation of Oil–Water Emulsions: A Review,” 2022. doi: 10.3390/pr10040738.
- [45] T. F. Tadros, “Emulsion Formation, Stability, and Rheology,” in *Emulsion Formation and Stability*, 2013. doi: 10.1002/9783527647941.ch1.
- [46] M. N. Yukuyama, D. D. M. Ghisleni, T. J. A. Pinto, and N. A. Bou-Chacra, “Nanoemulsion: Process selection and application in cosmetics - A review,” 2016. doi: 10.1111/ics.12260.
- [47] Brookfield, “More Solutions to Sticky Problems,” *Syria Studies*.
- [48] L. Yi *et al.*, “Physical mechanisms for droplet size and effective viscosity asymmetries in turbulent emulsions,” *J Fluid Mech*, 2022, doi: 10.1017/jfm.2022.881.
- [49] T. F. Tadros, A. Vandamme, B. Leveck, K. Booten, and C. V. Stevens, “Stabilization of emulsions using polymeric surfactants based on inulin,” *Adv Colloid Interface Sci*, 2004, doi: 10.1016/j.cis.2003.10.024.
- [50] G. M. P. Nidhi Bhatt * 1, Raj K. Prasad1, Kuldeep Singh1, “Stability study of O/W emulsions using zeta potential,” *J Chem Pharm Res*, vol. 2, no. 1, pp. 512–527, 2010, [Online]. Available: www.jocpr.com
- [51] J. Waeterschoot, E. Kayahan, J. Breukers, J. Lammertyn, and X. Casadevall i Solvas, “The effects of droplet stabilization by surfactants and nanoparticles on leakage, cross-talk, droplet stability, and cell adhesion,” *RSC Adv*, vol. 14, no. 33, pp. 24115–24129, 2024, doi: 10.1039/d4ra04298k.
- [52] R. Y. Safitri, W. S. Bhagawan, and C. N. Primiani, “Penggunaan Polivinil Prolidon (PVP) sebagai

Bahan Pengikat pada Formula Granul : Literatur Review,” vol. 4, no. 1, pp. 14–22, 2024.

- [53] K. Salimiyan rizi, “MXene nanosheets as a novel nanomaterial with antimicrobial applications: A literature review,” 2022. doi: 10.1016/j.molstruc.2022.132958.
- [54] D. Lesuisse and M. Tabart, “1.2 Importance of Chirality in the Field of Anti-infective Agents,” in *Comprehensive Chirality*, 2012. doi: 10.1016/B978-0-08-095167-6.00112-9.
- [55] G. Alouw, F. Fatimawali, and J. S. Lebang, “UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN KERSEN (*Muntingia calabura* L.) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Pseudomonas aeruginosa* DENGAN METODE DIFUSI SUMURAN,” *Jurnal Farmasi Medica/Pharmacy Medical Journal (PMJ)*, vol. 5, no. 1, p. 36, 2022, doi: 10.35799/pmj.v5i1.41430.
- [56] F. SUNNY, T. H. KURNIATI, and A. HATMANTI, “Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Senyawa Antibakteri Yang Berasosiasi Dengan Karang Batu Dari Perairan Bitung Dan Spons Dari Selat Makassar,” *Bioma*, vol. 11, no. 1, p. 42, 2015, doi: 10.21009/bioma11(1).5.
- [57] Y. Lestari, P. Ardiningsih, and Nurlina, “Aktivitas Antibakteri Gram Positif Dan Negatif Dari Ekstrak Dan Fraksi Daun Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) Asal Pesisir Sungai Kakap Kalimantan Barat,” *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, vol. 5, no. 4, pp. 1–8, 2016.
- [58] E. D. Hastuti and S. Sukarno, “Formulasi Sediaan Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Ekstrak Etil Asetat Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) Serta Uji Stabilitas Fisik,” *Cendekia Journal of Pharmacy*, vol. 4, no. 2, pp. 131–137, 2020, doi: 10.31596/cjp.v4i2.106.
- [59] Wa Ode Sitti Zubaydah *et al.*, “Formulasi dan Karakterisasi Nanoemulsi Ekstrak Etanol Buah Wualae (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith),” *Lansau: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, vol. 1, no. 1, pp. 22–37, 2023, doi: 10.33772/lansau.v1i1.4.
- [60] R. Restiana and Y. Cahyana, “Karakterisasi Fisikokimia dan Stabilitas Emulsi Pickering Menggunakan Tepung dan Pati Ganyong Termomodifikasi Dry-Heat sebagai Emulsifier,” *Jurnal Teknotan*, vol. 17, no. 3, p. 173, 2023, doi: 10.24198/jt.vol17n3.3.