

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Daun *Muntingia calabura* L. (kersen) merupakan salah satu bahan alam yang potensial sebagai sumber antioksidan alami. Senyawa bioaktif seperti flavonoid dan polifenol dalam daun kersen diketahui memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas, yang berperan penting dalam mencegah kerusakan oksidatif sel serta penyakit degeneratif. Studi terbaru menunjukkan nilai IC_{50} daun *Muntingia calabura* L. yang rendah, mengindikasikan kuatnya aktivitas antioksidan dari ekstrak daun tersebut. Pemanfaatan daun kersen masih terbatas pada penggunaan tradisional, sehingga diperlukan standarisasi ekstrak untuk menjamin konsistensi kadar senyawa aktif pada daun kersen. Secara molekuler, flavonoid dalam daun kersen bekerja dengan cara mendonorkan atom hidrogen kepada radikal bebas untuk menstabilkan molekul yang reaktif tersebut. Efektivitas ekstrak sering kali terkendala oleh rendahnya kelarutan dalam air dan kerentanan terhadap degradasi lingkungan seperti cahaya dan suhu. Oleh karena itu, eksplorasi teknologi penghantaran menjadi sangat krusial untuk mempertahankan integritas fungsional senyawa-senyawa fenolik tersebut sebelum mencapai target biologis, sehingga menjadikan ekstrak daun kersen sebagai kandidat menarik untuk dikembangkan lebih lanjut dalam formulasi teknologi penghantaran bioaktif seperti nanoemulsi (Abidin et al., 2024).

Nanoemulsi merupakan sistem dispersi berukuran nano (20–200 nm) yang telah berkembang pesat sebagai salah satu teknologi penghantaran paling menjanjikan dalam meningkatkan stabilitas, bioavailabilitas, dan efektivitas senyawa bioaktif lipofilik. Sistem ini memiliki luas permukaan yang lebih besar dibandingkan emulsi konvensional, sehingga meningkatkan interaksi antara senyawa aktif dengan medium targetnya. Nanoemulsi umumnya bersifat transparan karena ukuran dropletnya lebih kecil dari panjang gelombang cahaya tampak, yang sekaligus meminimalisir terjadinya fenomena pemisahan fase seperti creaming atau sedimentasi. Penurunan ukuran partikel hingga skala nano juga memperluas area permukaan kontak secara signifikan, sehingga memfasilitasi penyerapan senyawa aktif melalui membran biologis secara lebih cepat dan efisien. Selain itu, penggunaan surfaktan yang tepat dalam sistem nanoemulsi berfungsi menurunkan tegangan antarmuka secara drastis, sehingga menciptakan stabilitas kinetik yang lebih tinggi dibandingkan emulsi biasa. Keunggulan fisikokimia tersebut menjadikan nanoemulsi sebagai sistem penghantaran yang ideal, khususnya untuk ekstrak tumbuhan dengan karakteristik kelarutan yang kompleks, termasuk antioksidan berbasis minyak seperti minyak zaitun (*Olea europaea*) yang kaya asam lemak tak jenuh dan polifenol (Thakur et al., 2024).

Minyak zaitun (*Olea europaea*) dikenal luas memiliki sifat antioksidan dan antiradang yang kuat berkat kandungan senyawa aktifnya, seperti oleuropein, hidroksitirosol, dan oleocanthal. Kandungan asam oleat yang tinggi dalam minyak zaitun tidak hanya berfungsi sebagai fase minyak dalam sistem nanoemulsi, tetapi juga berperan sebagai peningkat penetrasi (penetration enhancer) alami yang membantu penyerapan senyawa aktif ke dalam membran biologis. Sinergi antara antioksidan eksogen dari ekstrak daun

kersen dan antioksidan endogen dari minyak zaitun diharapkan dapat memberikan perlindungan ganda terhadap stres oksidatif. Penelitian terkini dalam jurnal internasional menunjukkan bahwa emulsifikasi minyak zaitun ke dalam sistem nanoemulsi mampu memperbaiki stabilitas senyawa antioksidan sekaligus mempertahankan aktivitasnya dalam berbagai produk fungsional seperti kosmetik. Profil lipid minyak zaitun yang biokompatibel dengan lipid kulit dan membran sel manusia juga menjadikannya pembawa yang aman untuk aplikasi topikal maupun oral. Dengan mengintegrasikan minyak zaitun ke dalam formulasi, stabilitas kimia flavonoid dalam ekstrak daun kersen dapat ditingkatkan melalui mekanisme enkapsulasi di dalam droplet minyak, sehingga mendukung pentingnya penggabungan minyak zaitun dalam nanoemulsi ekstrak daun kersen untuk optimasi aktivitas antioksidan (Montoro-Alonso et al., 2024).

Optimasi formulasi nanoemulsi merupakan aspek yang krusial untuk mencapai ukuran droplet yang optimal, stabilitas fisik yang tinggi, serta aktivitas antioksidan yang maksimal. Metode statistik seperti *Response Surface Methodology* (RSM) banyak digunakan untuk menentukan komposisi surfaktan, kosurfaktan, dan fase minyak yang paling optimal sehingga sistem nanoemulsi yang dihasilkan lebih efisien dan stabil. RSM memungkinkan evaluasi interaksi kompleks antar variabel formulasi secara simultan dengan jumlah percobaan yang lebih sedikit namun tetap menghasilkan data yang akurat. Parameter kritis seperti rasio HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) dan konsentrasi minyak harus diseimbangkan secara presisi untuk mencegah terjadinya pematangan Ostwald (*Ostwald ripening*) pada droplet. Melalui pemodelan matematika, titik optimal yang menghasilkan ukuran partikel terkecil dengan indeks polidispersitas yang rendah dapat diprediksi secara sistematis dan terukur. Pendekatan ini menjamin bahwa setiap komponen dalam nanoemulsi bekerja secara sinergis untuk menghasilkan sistem yang stabil secara termodinamika selama masa penyimpanan, sehingga RSM sangat relevan diterapkan dalam penelitian yang berfokus pada optimasi formulasi nanoemulsi berbasis minyak zaitun untuk ekstrak daun kersen (Wan Ishak dan Zulfakar, 2022).

Nanoemulsi tidak hanya meningkatkan stabilitas senyawa bioaktif, tetapi juga terbukti mampu memperkuat kinerja antioksidan melalui peningkatan bioavailabilitas dan distribusi fase minyak-air yang lebih merata. Studi pada sistem nanoemulsi dengan ekstrak polifenol menunjukkan bahwa nanoemulsi mampu meningkatkan aktivitas antioksidan secara signifikan dibandingkan ekstrak bebas, sehingga memperlihatkan potensi teknologi nano sebagai strategi penghantaran bioaktif yang efektif. Peningkatan efikasi tersebut terjadi karena sistem nano mampu melindungi senyawa polifenol dari oksidasi dini sebelum sempat berinteraksi dengan radikal bebas target. Distribusi droplet yang merata dalam medium pendispersi memastikan bahwa setiap molekul antioksidan tersedia secara biologis dalam konsentrasi yang efektif pada tingkat seluler. Selain itu, enkapsulasi dalam struktur nano juga mampu mencegah terjadinya degradasi akibat perubahan pH atau paparan enzim tertentu, khususnya apabila digunakan secara oral. Hal tersebut sangat relevan untuk dikaji dalam konteks daun kersen yang kaya polifenol, sehingga formulasi nanoemulsi berbasis minyak zaitun berpotensi membawa efek sinergis yang bermakna dalam peningkatan aktivitas antioksidan (Wang et al., 2023).

Dengan demikian, penelitian ini bertujuan melakukan optimasi formulasi nanoemulsi ekstrak daun kersen berbasis minyak zaitun dan uji aktivitas antioksidan untuk

menghasilkan sistem penghantaran antioksidan yang efektif, stabil, dan berpotensi aplikasi luas di bidang pangan fungsional, kosmetik, dan farmasi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura*) berdasarkan nilai IC_{50} ?
2. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi Tween-80, waktu sonikasi, dan konsentrasi ekstrak daun kersen terhadap ukuran serta aktivitas antioksidan nanoemulsi yang dioptimasi?
3. Bagaimana karakteristik fisikokimia (ukuran partikel, indeks polidispersitas, potensial zeta, dan pH) serta aktivitas antioksidan dari nanoemulsi ekstrak daun kersen berbasis minyak zaitun pada formulasi optimal?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menganalisis aktivitas antioksidan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura*) berdasarkan nilai IC_{50} menggunakan metode DPPH
2. Mengoptimasi formulasi nanoemulsi ekstrak daun kersen berbasis minyak zaitun dengan memvariasikan konsentrasi Tween-80, waktu sonikasi, dan konsentrasi ekstrak daun kersen menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) berdasarkan respons ukuran partikel dan aktivitas antioksidan
3. Mengevaluasi karakteristik fisikokimia (ukuran partikel, indeks polidispersitas, potensial zeta, dan pH) serta aktivitas antioksidan dari nanoemulsi ekstrak daun kersen berbasis minyak zaitun pada formulasi optimal.

1.4 Manfaat Penelitian

Secara praktis, penelitian ini dapat menjadi dasar dalam pengembangan produk farmasi, kosmetik, maupun pangan fungsional berbasis bahan alam dengan sistem nanoemulsi. Formulasi yang telah dioptimasi berpotensi menghasilkan sediaan dengan stabilitas yang lebih baik, penyerapan yang lebih tinggi, serta efektivitas antioksidan yang meningkat dibandingkan ekstrak konvensional.

1.5 Landasan Teori

1.5.1 Tanaman Kersen

Daun *Muntingia calabura* L. mengandung beragam senyawa fitokimia seperti flavonoid, tanin, dan polifenol yang secara signifikan berkontribusi pada aktivitas antioksidan. Senyawa-senyawa yang terkandung pada daun kersen (**Gambar 1**) menunjukkan kemampuan dalam menetralkan radikal bebas melalui mekanisme donasi elektron atau hidrogen sehingga dapat mencegah kerusakan oksidatif biomolekul penting dalam tubuh.



Gambar 1. Daun kersen (*Muntingia calabura* L.)
(Sumber: UMSIDA, 2025)

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak daun dari tanaman obat memiliki kandungan antioksidan yang tinggi dan berpotensi untuk dikembangkan menjadi agen antiradikal bebas yang efektif secara farmakologis, seperti metode uji DPPH dan ABTS yang umum digunakan untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan ekstrak tumbuhan (da Silva et al., 2023). Formulasi ekstrak tanaman ke dalam sistem nano seperti nanoemulsi telah terbukti meningkatkan stabilitas dan efektivitas senyawa bioaktif tersebut dalam aplikasi nyata. Nanoemulsi dengan ukuran droplet yang lebih kecil, dapat meningkatkan luas permukaan kontak antara senyawa antioksidan dengan radikal bebas sehingga aktivitas antioksidan ekstrak daun kersen menjadi lebih efisien dibandingkan bentuk non-nano. Sistem nano ini juga meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas fitokimia tanaman yang larut dalam minyak maupun air (da Silva et al., 2023).

1.5.2 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menunda atau mencegah oksidasi molekul lain dengan cara menangkap atau menetralkan radikal bebas, sehingga menghambat reaksi berantai yang merusak biomolekul. Aktivitas antioksidan biasanya diukur melalui berbagai metode *in vitro* seperti DPPH, ABTS, dan FRAP, yang mengevaluasi kemampuan senyawa untuk menyumbangkan elektron/hidrogen atau menghambat oksidasi tertentu. Penelitian pada nanoemulsi berbasis minyak menunjukkan bahwa nanoemulsi dapat mempertahankan dan meningkatkan aktivitas antioksidan saat diuji dengan metode DPPH, dibandingkan dengan senyawa non-nanoemulsi, karena distribusi partikel yang lebih homogen dan stabilitas yang lebih baik (da Silva et al., 2023). Metode uji DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) adalah uji standar untuk menentukan aktivitas antioksidan, yang bekerja melalui perubahan warna ungu DPPH menjadi kuning saat bereaksi dengan senyawa pereduksi. Nilai IC_{50} yang diperoleh dari DPPH menunjukkan konsentrasi di mana 50 % radikal bebas terinhibisi, memberikan indikator kuat tentang potensi antioksidan. Reformulasi ekstrak alami menjadi nanoemulsi telah dilaporkan meningkatkan kemampuan radikal *scavenging*, sehingga nanoemulsi sering dipilih dalam penelitian antioksidan untuk aplikasi farmasi dan pangan fungsional.

1.5.3 Nanoemulsi

Nanoemulsi adalah sistem penghantaran berbasis lipid yang terdiri atas minyak, surfaktan, kosurfaktan, dan air dengan ukuran droplet antara 20–200 nm dan biasanya terdiri dari fase minyak, fase air, surfaktan, dan ko-surfaktan. Ukuran droplet nano yang sangat kecil memberikan keuntungan berupa luas permukaan yang lebih besar sehingga efek bioaktif senyawa yang terenkapsulasi dapat meningkat. Dalam konteks aktivitas antioksidan, nanoemulsi dapat meningkatkan stabilitas senyawa yang peka terhadap degradasi oksidatif, cahaya, atau temperatur dan memastikan distribusi yang lebih merata dalam medium aplikasi (Nikita dan Agnihotri, 2025).

Studi sistematis menunjukkan bahwa nanoemulsi berbasis minyak nabati seperti minyak zaitun cukup efektif dalam menjaga stabilitas dan mencegah oksidasi lipid maupun komponen bioaktif lainnya dalam berbagai aplikasi industri, termasuk pangan, kosmetik, dan farmasi. Nanoemulsi juga dapat membantu menurunkan laju oksidasi senyawa antioksidan alami melalui sistem penghantaran yang stabil dan terkontrol, sehingga memperpanjang masa simpan bioaktif tersebut (Nikita dan Agnihotri, 2025).

1.5.4 Minyak Zaitun (*Olea europaea*)

Minyak zaitun (*Olea europaea*) merupakan sumber utama polifenol lipofilik yang kuat, seperti *hydroxytyrosol* dan *oleuropein*, yang telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan dan efek protektif terhadap stres oksidatif. Dalam studi klinis, konsumsi minyak zaitun kaya polifenol dikaitkan dengan peningkatan status antioksidan dalam tubuh manusia, menunjukkan potensi fitokimia minyak ini untuk mencegah pembentukan radikal bebas dan stres oksidatif komponen minor dalam minyak zaitun juga termasuk vitamin E (*α-tocopherol*) dan senyawa fenolik lain yang memberikan aktivitas antioksidan sinergis, sehingga mampu melindungi lipid dari oksidasi (Sarapis et al., 2022).

1.5.5 Optimasi dan Karakterisasi Nanoemulsi

Optimasi formula nanoemulsi umumnya dilakukan melalui pendekatan statistik seperti *Response Surface Methodology* (RSM) untuk menentukan kondisi terbaik dalam menghasilkan ukuran partikel kecil, indeks polidispersitas rendah, dan zeta potensial stabil. Optimasi ini penting karena parameter fisik nanoemulsi mempengaruhi kestabilan sistem dan efisiensi penghantaran senyawa bioaktif seperti antioksidan (Fallah et al., 2023).

Karakterisasi setelah optimasi mencakup pengukuran ukuran droplet, PDI, dan zeta potensial untuk memastikan nanoemulsi yang terbentuk stabil dan homogen. Sebagai hasilnya, nanoemulsi yang teroptimasi biasanya menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan dibandingkan formulasi awal, yang dapat dihubungkan dengan distribusi partikel yang lebih merata dan kemampuan lebih baik dalam menjaga senyawa aktif dari degradasi oksidatif (Fallah et al., 2023).

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan bahan berupa daun kersen (*Muntingia calabura* L.), etanol (*Merck*), akuades, serbuk DPPH (Himedia), asam askorbat (Himedia), FeCl_3 1% dan 5% (*Merck*), larutan Pb asetat (*Merck*), HCl (*Merck*), pereaksi Mayer, kloroform (*Merck*), minyak zaitun (Borges), Tween 80 (Smart-Lab), dan sorbitol (Smart-Lab).

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas, *rotary evaporator* (Heidolph Labotaro 4000), spektrofotometer *UV-Vis* (Pg Instrumen T60), *Particle Size Analyzer* (PSA) (Horiba Scientific, Nanoparticle Analyzer SZ-100), *Thermogravimetric Analysis* (Simultaneous Thermal Analyzers 8000), timbangan analitik (Ohaus), pipet mikro, statif, klem, vortex, pH meter (Lutron pH-208), *magnetic stirrer*, *magnetig bar*, sentrifus (800-1 Centrifugal Machine), lemari pendingin, dan buret.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2025 hingga Februari 2026 di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Kimia Radiasi, Laboratorium Kimia Fisika, Laboratorium Kimia Analitik Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Botani Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, dan Laboratorium Badan Riset dan Inovasi Nasional.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Simplisia Daun Kersen

Preparasi simplisia daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dilakukan dengan metode pengeringan alami mengacu pada prosedur Sirait *et al.* (2023). Daun kersen segar yang berwarna hijau tua dipetik dan disortasi untuk memisahkan daun yang rusak, menguning, atau terserang hama. Daun yang telah lolos sortasi dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kontaminan berupa debu dan kotoran, kemudian ditiriskan. Selanjutnya, dikering-anginkan pada suhu ruang (25-30°C) selama 24 jam untuk mengurangi kadar air permukaan. Proses pengeringan dilanjutkan dengan menjemur daun ditempat teduh yang terlindung dari sinar matahari langsung selama 7 hari hingga daun menjadi rapuh saat diremas (Sirait *et al.*, 2023). Daun kering selanjutnya dihaluskan menggunakan *blender* dan diayak menggunakan ayakan mesh 60 untuk memperoleh serbuk simplisia yang homogen. Serbuk simplisia disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari kelembapan hingga digunakan pada tahap ekstraksi. Proses penghalusan dan pengayakan ini bertujuan untuk memperbesar luas permukaan partikel sehingga meningkatkan efisiensi kontak antara pelarut dan bahan aktif selama proses ekstraksi. Selain itu, penyimpanan dalam wadah tertutup rapat penting untuk mencegah degradasi senyawa bioaktif akibat paparan udara, cahaya, dan kelembapan yang dapat menurunkan kualitas simplisia. (Depkes RI, 2008).

2.4.2 Ekstraksi Daun Kersen

Ekstraksi daun kersen dilakukan dengan metode maserasi mengacu pada prosedur Rahmah et al., (2024) dengan modifikasi. Serbuk simplisia daun kersen ditimbang sebanyak 300 g menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke dalam wadah maserasi berupa bejana kaca berwarna gelap. Pelarut etanol 96% sebanyak 3000 mL ditambahkan ke dalam bejana dengan perbandingan bahan terhadap pelarut 1:10 (b/v). Campuran dibiarkan terendam selama 3×24 jam dalam kondisi bejana tertutup rapat dan terlindung dari paparan cahaya matahari langsung, sambil dilakukan pengadukan secara periodik setiap 8 jam untuk meningkatkan efisiensi kontak antara pelarut dan matriks simplisia (Syarif et al., 2020).

Setelah 3 hari, filtrat disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 1. Residu yang tersisa selanjutnya diremaserasi dengan penambahan 3000 mL etanol 96% segar selama 1×24 jam. Proses maserasi diulang sebanyak 3 kali untuk memaksimalkan rendemen ekstraksi senyawa bioaktif (Syarif et al., 2020). Seluruh filtrat dari tahap maserasi dan remaserasi dikumpulkan menjadi satu, kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan rotasi 100 rpm dan tekanan vakum hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang dihasilkan ditimbang dan disimpan dalam wadah tertutup pada suhu 4°C kemudian dihitung rendemen yang dihasilkan menggunakan rumus pada persamaan (1) hingga digunakan untuk analisis selanjutnya (Rahmah et al., 2024).

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak kering (g)}}{\text{Berat simplisia awal (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4.3 Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Kersen

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kersen. Pengujian meliputi identifikasi senyawa fenolik, tanin, terenoid/steroid, saponin, flavonoid, dan alkaloid dengan mengacu pada prosedur standar yang telah divalidasi (Harborne, 1987; Innaya et al., 2024).

a. Uji Fenolik

Sebanyak 1 mL ekstrak sampel daun kersen dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 4 tetes larutan FeCl_3 5% (b/v). Campuran dihomogenkan dengan menggoyang-goyangkan tabung secara perlahan. Hasil uji dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna larutan menjadi hijau kehitaman atau biru kehitaman, yang menandakan adanya gugus hidroksil pada cincin aromatik yang membentuk kompleks ion Fe^{3+} (Harborne, 1987; Innaya et al., 2024).

b. Uji Tanin

Sebanyak 0,5 mL ekstrak sampel daun kersen dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl_3 5%. Hasil uji dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna menjadi hijau kecoklatan (menandakan tanin terkondensasi) atau biru kehitaman (menandakan tanin terhidrolisis). Reaksi ini terjadi akibat pembentukan kompleks antara senyawa tanin dengan ion besi(III) (Innaya et al., 2024).

c. Uji Terpenoid/Steroid

Pengujian terpenoid dan steroid dilakukan menggunakan reaksi Liebermann-Burchard. Sebanyak 1 mL ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 4 tetes asam asetat anhidrida (CH_3COOH anhidrida) dan 2 tetes H_2SO_4 pekat secara perlahan melalui dinding tabung. Hasil uji positif steroid ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau atau biru, sedangkan hasil uji positif terpenoid ditandai dengan perubahan warna menjadi merah atau ungu kemerahan + (Harborne, 1987; Innaya et al., 2024).

d. Uji Saponin

Sebanyak 1 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 mL akuades, kemudian dikocok kuat selama 1 menit. Setelah itu, ditambahkan 2 tetes HCl 2N. Hasil uji dinyatakan positif mengandung saponin apabila terbentuk busa yang stabil dengan ketinggian minimal 1 cm dan bertahan selama ± 7 menit setelah penambahan asam. Pembentukan busa yang stabil mengindikasikan adanya glikosida saponin yang bersifat amfifilik (Prasetyo et al., 2023).

e. Uji Flavonoid

Sebanyak 2 mL ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL larutan timbal(II) asetat [$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$] 10%. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk endapan berwarna kuning, yang mengindikasikan adanya senyawa flavonoid. Reaksi ini terjadi karena flavonoid membentuk kompleks tidak larut dengan ion Pb^{2+} (Innaya et al., 2024).

f. Uji Alkaloid

Sebanyak 2 mL ekstrak sampel diasamkan dengan penambahan 1 mL HCl 2N dan 9 mL akuades. Campuran dipanaskan di atas penangas air pada suhu 60°C selama 2 menit, kemudian didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat diambil sebanyak 3 tetes dan ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer (larutan kalium merkuri iodida). Adanya senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih kekuningan hingga kuning muda. Endapan ini terbentuk akibat reaksi antara nitrogen pada alkaloid dengan logam berat dari pereaksi Mayer (Ferdinan et al., 2021).

2.4.4 Analisis Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kersen

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) secara spektrofotometri UV-Vis mengacu pada prosedur Pertiwi et al. (2024) dengan modifikasi. Metode DPPH dipilih karena sederhana, cepat, sensitif, dan hanya memerlukan sedikit sampel.

a. Pembuatan Larutan Induk DPPH 0,4 mM

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 7,8 mg menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dengan sedikit etanol pro analisis (p.a) dalam gelas kimia. Larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan dihindarkan menggunakan etanol p.a hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan induk DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM. Larutan induk disimpan dalam wadah berwarna gelap dan digunakan segera setelah pembuatan untuk menghindari degradasi (Pertiwi et al., 2024).

b. Pembuatan Larutan Induk Asam Askorbat 50 mg/L

Asam askorbat ditimbang sebanyak 5 mg menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dengan sedikit etanol p.a dalam gelas kimia. Larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan didapatkan etanol p.a hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 mg/L. Selanjutnya, larutan ini dipipet sebanyak 25 mL ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan etanol p.a. hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan induk asam askorbat dengan konsentrasi 50 mg/L (Pertiwi et al., 2024).

c. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Daun Kersen 100 mg/L

Ekstrak kental daun kersen ditimbang sebanyak 10 mg menggunakan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke dalam vial kaca dan dilarutkan dengan etanol p.a. Larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan dihomogenkan dengan etanol p.a. hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan induk ekstrak dengan konsentrasi 100 mg/L (Pertiwi et al., 2024).

d. Penentuan Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat

Larutan stok asam askorbat 50 mg/L dibuat menjadi 5 seri konsentrasi, yaitu 0,5; 1; 2; 4; dan 8 mg/L. Masing-masing konsentrasi diperoleh dengan memipet larutan induk 50 mg/L secara berturut-turut sebanyak 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; dan 0,8 mL ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Setiap tabung ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a. hingga 5 mL. Larutan dihomogenkan dengan vorteks dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang di tempat gelap. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya (± 517 nm) (Pertiwi et al., 2024).

e. Pembuatan Larutan Kontrol

Larutan kontrol dibuat dengan memipet 4 mL etanol p.a. ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM. Larutan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang di tempat gelap, kemudian absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Nilai absorbansi kontrol ini digunakan sebagai acuan dalam perhitungan persen inhibisi (Pertiwi et al., 2024).

f. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kersen

Larutan sampel ekstrak dibuat menjadi 5 seri konsentrasi, yaitu 0,5; 1; 2; 4; dan 8 mg/L. Masing-masing konsentrasi diperoleh dengan memipet larutan induk ekstrak 100 mg/L secara berturut-turut sebanyak 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; dan 0,4 mL ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Setiap tabung ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a. hingga 5 mL. Campuran didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang di tempat gelap, kemudian absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Pertiwi et al., 2024). Aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai persen inhibisi yang dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (2):

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (2)$$

Nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50%*) dihitung berdasarkan persamaan regresi linear $y = ax + b$, di mana konsentrasi larutan uji (mg/L) sebagai sumbu-x dan persen inhibisi (%) sebagai sumbu-y. Nilai IC_{50} diperoleh dengan mensubstitusikan $y = 50$ ke dalam persamaan regresi tersebut, sehingga diperoleh rumus (3) (Pertiwi et al., 2024):

$$IC_{50} = \frac{50-b}{a} \quad (3)$$

Berdasarkan persamaan regresi linear, di mana nilai IC_{50} diperoleh dari hasil substitusi pada persamaan garis lurus. Dalam hal ini, a merupakan *slope* yang menunjukkan laju perubahan respon terhadap konsentrasi, sedangkan b merupakan *intercept*.

2.4.5 Formulasi Nanoemulsi Ekstrak Daun Kersen

Formulasi sistem nanoemulsi ekstrak daun kersen dioptimasi menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) berdasarkan model desain Box-Behnken (Box-Behnken Design/BBD) mengacu pada prosedur Luu et al., (2025). Desain Box-Behnken dipilih karena memerlukan jumlah percobaan yang lebih sedikit dibandingkan desain faktorial penuh, namun tetap mampu mengevaluasi efek utama, efek interaksi, dan efek kuadratik dari faktor-faktor yang dioptimasi (Mahmoud dan McConville, 2023).

Tiga faktor independen digunakan dalam desain ini, yaitu: (1) jumlah surfaktan Tween 80, (2) waktu sonikasi, dan (3) konsentrasi ekstrak daun kersen. Masing-masing faktor dianalisis pada tiga level, yaitu level rendah (-1), level tengah (0), dan level tinggi (+1). Rentang kondisional dari ketiga faktor ditentukan berdasarkan hasil percobaan satu faktor (*one-factor-at-a-time*) pada tahap pendahuluan. Kombinasi level tengah (0) merepresentasikan kondisi optimal awal yang menghasilkan ukuran partikel dan *Polydispersity Index* (PDI) terbaik pada percobaan pendahuluan, sedangkan level -1 dan +1 mewakili batas bawah dan batas atas dari kondisi tersebut (Luu et al., 2025).

Desain BBD menghasilkan 15 kombinasi percobaan (*runs*) yang mencakup 12 percobaan faktorial dan 3 titik pusat (*center points*) untuk memperkirakan pure error. Data respons dianalisis menggunakan model polinomial orde kedua (kuadratik) untuk menentukan korelasi antara variabel respons dan faktor independen. Signifikansi model dievaluasi melalui analisis varians (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 95% ($p < 0,05$) (Luu et al., 2025).

2.4.6 Optimasi Formulasi Nanoemulsi menggunakan Respon RSM Berdasarkan % Inhibisi Aktivitas Antioksidan

Response Surface Methodology (RSM) diterapkan untuk mengoptimasi formulasi nanoemulsi dengan parameter respons berupa persen inhibisi aktivitas antioksidan, mengacu pada pendekatan Ullah et al. (2022). RSM merupakan kumpulan teknik matematika dan statistika yang digunakan untuk memodelkan dan menganalisis permasalahan yang melibatkan variabel respons yang dipengaruhi oleh beberapa variabel independen, dengan tujuan mengoptimasi respons tersebut (Myers et al., 2016).

Desain Box-Behnken digunakan untuk mengatur kombinasi level faktor, meliputi konsentrasi minyak, konsentrasi surfaktan, dan kecepatan pengadukan. Nilai respons yang diukur dimodelkan ke dalam persamaan polinomial kuadratik sebagai berikut (4):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (4)$$

Dimana Y adalah variabel respons, β_0 adalah konstanta, β_i adalah koefisien linear, β_{ii} adalah koefisien kuadratik, β_{ij} adalah koefisien interaksi, X_i dan X_j adalah variabel independen, serta ε adalah error eksperimen (Myers et al., 2016; Ullah et al., 2022).

Kualitas model dievaluasi berdasarkan koefisien determinasi (R^2), adjusted R^2 , dan predicted R^2 . Nilai R^2 yang tinggi ($>0,90$) menunjukkan kecocokan model yang baik terhadap data eksperimen. Setelah model polinomial divalidasi, nilai prediksi optimum ditentukan dan diverifikasi melalui eksperimen konfirmasi untuk memastikan bahwa kondisi optimum yang dipilih menghasilkan formulasi nanoemulsi dengan performa terbaik (Ullah et al., 2022).

2.4.7 Karakterisasi Fisik Nanoemulsi

a. Analisis pH

Pengukuran pH sediaan nanoemulsi dilakukan menggunakan pH meter digital yang telah dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan standar dapar pH 4,0 dan pH 7,0. Kalibrasi dilakukan hingga nilai pembacaan stabil dan sesuai dengan nilai pH standar. Elektroda kemudian dicelupkan ke dalam sediaan nanoemulsi pada suhu ruang ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) dan nilai pH dicatat setelah pembacaan stabil. Pengukuran dilakukan secara triplo untuk memperoleh data yang representatif (Widyastuti dan Saryanti, 2023).

b. Analisis Ukuran Partikel, PDI dan Zeta Potensial

Karakterisasi ukuran partikel, indeks polidispersitas (PDI), dan zeta potensial nanoemulsi dilakukan menggunakan instrumen *Dynamic Light Scattering* (DLS)/*Particle Size Analyzer* (PSA). Sebelum pengukuran, sampel nanoemulsi diencerkan dengan akuades pada rasio yang sesuai hingga memenuhi rentang sensitivitas instrumen agar intensitas hamburan cahaya dapat diperoleh secara akurat. Pengukuran dilakukan pada suhu 25°C dengan sudut deteksi 173° (backscattering). Setiap sampel diukur sebanyak tiga kali pengulangan. Ukuran partikel dinyatakan sebagai Z-average diameter (nm), PDI menggambarkan distribusi ukuran partikel (nilai $<0,3$ menunjukkan distribusi yang homogen), dan zeta potensial (mV) menunjukkan stabilitas elektrostatis sistem (Grzeszczak et al., 2025).

c. Uji Viskositas

Pengujian viskositas sediaan nanoemulsi dilakukan menggunakan viskometer Brookfield dengan rotor/spindle nomor 62 dan 63. Rotor dipasang pada alat viskometer dengan memutar searah jarum jam hingga terpasang dengan benar. Sediaan nanoemulsi sebanyak 80 mL dituangkan ke dalam cup viskometer. Pengunci diatur ke posisi belakang dan alat dinyalakan sehingga rotor mulai berputar. Nilai viskositas dibaca dari skala pada rotor nomor 62 dan dinyatakan dalam satuan centipoise (cP). Pengukuran dilakukan pada suhu ruang ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) secara triplo (Rahma et al., 2025).

2.4.8 Uji Stabilitas Fisik Nanoemulsi dengan Sentrifugasi

Uji stabilitas sentrifugal dilakukan untuk mengevaluasi stabilitas fisik sediaan nanoemulsi terhadap gaya gravitasi yang dipercepat, mengacu pada prosedur Marwa et al. (2023). Sampel nanoemulsi sebanyak 15 mL dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi,

kemudian disentrifugasi menggunakan sentrifus berkecepatan tinggi pada 4000 rpm selama 15 menit. Setelah proses sentrifugasi selesai, sampel diamati secara visual untuk mendeteksi ada atau tidaknya tanda-tanda ketidakstabilan seperti pemisahan fase (*creaming, sedimentation, coalescence, atau phase separation*). Nanoemulsi dinyatakan stabil apabila tidak menunjukkan pemisahan fase setelah sentrifugasi (Marwa et al., 2023).

2.4.9 Analisis menggunakan TGA

Analisis termogravimetri (TGA) dilakukan untuk mengevaluasi stabilitas termal formulasi nanoemulsi ekstrak daun kersen, mengacu pada prosedur Joshi et al., (2024). Sampel nanoemulsi sebanyak kurang lebih 1 mg ditimbang dan ditempatkan dalam cawan (pan) aluminium tertutup yang memiliki lubang perforasi (*perforated lid*). Analisis dilakukan menggunakan instrumen *thermogravimetric analyser* dengan kondisi pemanasan dari suhu 30°C hingga 600°C dengan laju pemanasan 10°C/menit di bawah atmosfer gas nitrogen *inert* dengan laju alir 100 mL/menit. Termogram yang dihasilkan menunjukkan profil penurunan massa sampel sebagai fungsi suhu, yang digunakan untuk mengidentifikasi tahapan dekomposisi termal dan stabilitas termal formulasi nanoemulsi (Joshi et al., 2024).

2.4.10 Analisis Aktivitas Antioksidan Formulasi Optimum

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) secara spektrofotometri UV-Vis mengacu pada prosedur Pertiwi et al., (2024) dengan modifikasi. Metode DPPH dipilih karena sederhana, cepat, sensitif, dan hanya memerlukan sedikit sampel.

a. Pembuatan Larutan Induk DPPH 0,4 mM

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 7,8 mg menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dengan sedikit etanol pro analisis (p.a) dalam gelas kimia. Larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan dihindarkan menggunakan etanol p.a hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan induk DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM. Larutan induk disimpan dalam wadah berwarna gelap dan digunakan segera setelah pembuatan untuk menghindari degradasi (Pertiwi et al., 2024).

b. Pembuatan Larutan Kontrol

Larutan kontrol dibuat dengan memipet 1 mL larutan DPPH 0,4 mM ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 4 mL etanol p.a. hingga volume total 5 mL. Larutan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang di tempat gelap, kemudian absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Nilai absorbansi kontrol ini digunakan sebagai acuan dalam perhitungan persen inhibisi (Pertiwi et al., 2024).

c. Penentuan Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat

Padatan asam askorbat ditimbang sebanyak 0,2 g ke dalam gelas kimia, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a. sebanyak 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 2% (w/v). Sampel selanjutnya diambil sebanyak 4 mL dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM. Campuran dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang di

tempat gelap. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Khotimah et al., 2023; Islamiyati et al., 2024).

d. Penentuan Aktivitas Antioksidan Nanoemulsi

Sediaan nanoemulsi hasil optimasi dipipet sebanyak 0,2 g ke dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a. sebanyak 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 2% (w/v). Sampel selanjutnya diambil sebanyak 4 mL dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM. Campuran dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang di tempat gelap. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Khotimah et al., 2023; Islamiyati et al., 2024). Aktivitas antioksidan sediaan nanoemulsi dinyatakan sebagai persen inhibisi yang dihitung menggunakan rumus pada persamaan (1).

Hasil persen inhibisi sediaan nanoemulsi selanjutnya dibandingkan dengan nilai persen inhibisi ekstrak murni dan asam askorbat untuk mengevaluasi apakah formulasi nanoemulsi mampu mempertahankan atau meningkatkan aktivitas antioksidan dari ekstrak daun kersen (Khotimah et al., 2023).

2.4.11 Uji Antibakteri Nanoemulsi

Uji aktivitas antibakteri diawali dengan sterilisasi seluruh alat secara aseptik untuk mencegah kontaminasi. Alat berbahan logam disterilkan menggunakan metode flambing dengan nyala api spiritus. Alat berbahan plastik disterilkan menggunakan etanol 70% (v/v), sedangkan peralatan kaca disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 20 menit. Seluruh proses pengerjaan dilakukan di dalam laminar air flow yang telah disterilkan terlebih dahulu menggunakan alkohol 70%.

Larutan kontrol positif disiapkan dengan melarutkan 250 mg amoksisilin ke dalam 5 mL akuades steril. Nanoemulsi diaplikasikan masing-masing sebanyak 1 mL, kemudian dilarutkan dengan 1 mL akuades dan dihomogenkan dengan pengadukan selama 5 menit. Medium Nutrient Agar disiapkan dengan melarutkan 5 gram serbuk nutrient agar ke dalam akuades, lalu dipanaskan hingga larut sempurna dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium tersebut selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri dengan volume 15–20 mL dan dibiarkan mengeras pada suhu ruang.

Kultur murni *S. aureus* diinkubasi pada permukaan medium Nutrient Agar selama 48 jam pada suhu 37°C dalam kondisi anaerob. Koloni bakteri yang telah tumbuh kemudian disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9% steril sebanyak 10 mL. Kertas cakram steril direndam dalam larutan nanoemulsi selama 15 menit, lalu diletakkan di atas medium Nutrient Agar dalam cawan petri yang telah diinokulasi dengan suspensi bakteri. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi selesai, diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong sebagai indikator aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri dikategorikan sebagai lemah apabila diameter zona hambat yang dihasilkan berukuran kurang dari 5 mm, sedang apabila diameter zona hambat berada pada rentang 5–10 mm, kuat apabila diameter berada pada rentang 11–20 mm, dan sangat kuat apabila diameter zona hambat melebihi 20 mm. Penentuan kategori ini penting dilakukan untuk menilai efektivitas formulasi nanoemulsi dalam mendistribusikan senyawa aktif ke dalam dinding sel bakteri target (Aprilia et al., 2025).