

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Era globalisasi telah mendorong perubahan signifikan pada gaya hidup masyarakat, termasuk meningkatnya konsumsi makanan dan minuman cepat saji yang menjadi bagian dari pola makan modern di berbagai negara (Fox *et al.*, 2019). Indonesia tidak terlepas dari fenomena tersebut. Menurut Badan Pusat Statistik (2024), sebanyak 35,7% masyarakat Indonesia mengonsumsi makanan dan minuman cepat saji secara rutin (BPS, 2024). Pola konsumsi tersebut dikategorikan sebagai pola makan yang tidak sehat karena cenderung menyebabkan asupan karbohidrat berlebihan tanpa diimbangi oleh zat gizi lain yang dibutuhkan tubuh (Micha *et al.*, 2017). Dalam jangka panjang, pola makan yang tidak seimbang tersebut menjadi faktor risiko utama terjadinya penyakit degeneratif, salah satunya ialah diabetes melitus (Lopez-Portillo *et al.*, 2022). World Health Organization (2021) melaporkan bahwa penyakit degeneratif telah menjadi penyebab utama kematian di dunia, mencapai 74% dari seluruh kematian global, dengan diabetes melitus sebagai salah satu faktor penyumbang terbesar (WHO, 2021).

Diabetes melitus merupakan penyakit kronis yang termasuk dalam golongan gangguan metabolik, ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah secara persisten (American Diabetes Association, 2024). Kondisi ini terjadi ketika pankreas tidak mampu memproduksi insulin dalam jumlah yang memadai (diabetes melitus tipe 1), atau ketika tubuh tidak dapat memanfaatkan insulin secara efektif yang dikenal sebagai resistensi insulin (diabetes melitus tipe 2) (Cepeda *et al.*, 2023; Prasetyo, 2025). Kedua kondisi tersebut menyebabkan hiperglikemia, yaitu kadar glukosa darah yang melebihi ambang batas normal (Młynarska *et al.*, 2025). Hiperglikemia yang berlangsung kronis mengakibatkan kerusakan serius pada berbagai sistem tubuh, khususnya pada sistem saraf (neuropati diabetik) dan pembuluh darah (angiopati diabetik), yang pada akhirnya meningkatkan risiko komplikasi berupa penyakit kardiovaskular, gagal ginjal, dan etinopati, (Li *et al.*, 2023; Zheng *et al.*, 2018).

Secara global, prevalensi diabetes melitus telah mencapai proporsi epidemi. Berdasarkan data dari International Diabetes Federation (2024), jumlah penderita diabetes melitus di dunia telah mencapai 589 juta jiwa dan diproyeksikan meningkat menjadi 853 juta jiwa pada tahun 2050 (IDF, 2024). Tren serupa juga terjadi di Indonesia yang menempati peringkat kelima di dunia sebagai negara dengan jumlah penderita diabetes terbanyak, setelah India, Tiongkok, Amerika Serikat, dan Pakistan (IDF, 2024). Data menunjukkan bahwa sebanyak 20,4 juta penduduk Indonesia mengidap diabetes melitus dengan prevalensi mencapai 11,3%. Angka tersebut diprediksi akan terus meningkat menjadi 23,3 juta jiwa pada tahun 2030 dan 28,5 juta jiwa pada tahun 2045 (IDF, 2024). Kondisi ini menunjukkan bahwa diabetes

melitus telah menjadi krisis kesehatan nasional yang memerlukan penanganan komprehensif, baik secara preventif maupun kuratif.

Penderita diabetes melitus tipe 2 saat ini paling mendominasi dengan karakteristik resistensi insulin dan peningkatan glukosa darah pascaprandial. Salah satu pendekatan terapeutik yang efektif dalam pengendalian diabetes melitus tipe 2 ialah melalui penghambatan aktivitas enzim α -amilase (Kashtoh dan Baek, 2023). Enzim α -amilase merupakan enzim pencernaan yang berperan dalam hidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik pada pati, menghasilkan oligosakarida yang selanjutnya dipecah menjadi glukosa dan maltosa oleh enzim α -glukosidase (Kaur *et al.*, 2021). Pada kondisi normal, proses ini berlangsung secara terkendali untuk memenuhi kebutuhan energi tubuh. Namun, pada penderita diabetes melitus, aktivitas enzim α -amilase yang berlebihan mengakibatkan pemecahan karbohidrat yang terlalu cepat sehingga menyebabkan lonjakan kadar glukosa darah secara postprandial (Sun *et al.*, 2020). Penghambatan aktivitas enzim α -amilase menjadi strategi yang penting untuk mengontrol kadar glukosa darah pascamakan pada penderita diabetes melitus tipe 2 (Kashtoh dan Baek, 2023).

Penghambatan enzim α -amilase telah dilakukan secara klinis menggunakan obat-obatan sintesis, seperti akarbose (*acarbose*), miglitol, dan voglibosa (Hussain *et al.*, 2025) yang bekerja secara kompetitif di usus halus, sehingga memperlambat absorpsi glukosa dan menurunkan kadar glukosa darah postprandial (Barrientos-Ávalos *et al.*, 2024). Akan tetapi, penggunaan akarbose dalam jangka panjang menimbulkan efek samping berupa gangguan gastrointestinal, meliputi dispepsia, flatulensi, mual, muntah, kembung, diare, dan sembelit (Barrientos-Ávalos *et al.*, 2024). Efek samping tersebut disebabkan oleh akumulasi karbohidrat yang tidak tercerna di usus besar, yang kemudian difermentasi oleh bakteri kolon dan menghasilkan gas berlebihan (Dong *et al.*, 2022). Keterbatasan obat sintesis tersebut mendorong eksplorasi terhadap bahan alam sebagai alternatif agen penghambat enzim α -amilase yang lebih aman dengan efek samping yang minimal.

Pemanfaatan tanaman herbal sebagai agen antidiabetes telah menjadi perhatian luas dalam bidang farmakologi. Tanaman herbal diketahui mengandung berbagai senyawa bioaktif yang mampu menghambat enzim pencernaan karbohidrat serta memiliki potensi untuk mencegah komplikasi vaskular terkait diabetes (Chahrour *et al.*, 2025). Selain itu, penggunaan tanaman herbal umumnya menghasilkan efek samping yang lebih rendah dibandingkan obat-obatan sintesis (Choudhury *et al.*, 2022). Salah satu tumbuhan herbal yang berpotensi dikembangkan sebagai agen antidiabetes ialah kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) (Saranani *et al.*, 2023).

Kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) merupakan tumbuhan dari famili Asteraceae yang tumbuh secara liar dan melimpah di wilayah tropis, termasuk Indonesia (Omokhua *et al.*, 2020). Daun kirinyuh mengandung berbagai metabolit sekunder, terutama senyawa flavonoid, seperti kuersetin, kaempferol, dan apigenin (Ogunniran *et al.*, 2023). Senyawa-senyawa flavonoid tersebut telah terbukti secara ilmiah memiliki aktivitas sebagai penghambat enzim α -amilase dan α -glukosidase melalui mekanisme pengikatan pada sisi aktif enzim, sehingga berpotensi sebagai agen antidiabetes (Ali *et al.*, 2024; Proença *et al.*, 2022). Secara khusus, kuersetin

dilaporkan memiliki aktivitas inhibisi enzim α -amilase yang kuat dengan nilai IC₅₀ yang lebih rendah dibandingkan kaempferol dan apigenin (Proença *et al.*, 2022).

Penelitian mengenai aktivitas antidiabetes daun kirinyuh telah dilakukan sebelumnya oleh Akinwunmi *et al.* (2017) yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kirinyuh memiliki kemampuan menghambat enzim α -amilase. Namun, hasil penelitian tersebut mengindikasikan bahwa daya inhibisi enzim α -amilase oleh ekstrak daun kirinyuh masih tergolong rendah (Akinwunmi *et al.*, 2017). Rendahnya aktivitas inhibisi tersebut diduga berkaitan dengan keterbatasan bioavailabilitas senyawa aktif dari ekstrak daun kirinyuh, khususnya senyawa flavonoid yang bersifat hidrofobik sehingga memiliki kelarutan yang rendah dalam sistem tubuh (Maher *et al.*, 2023). Keterbatasan ini menunjukkan perlunya strategi formulasi yang mampu meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas senyawa aktif dari daun kirinyuh agar aktivitas antidiabetesnya menjadi lebih optimal.

Salah satu pendekatan formulasi yang dapat mengatasi keterbatasan tersebut ialah melalui pengembangan sediaan penghantaran obat berbasis nanoemulsi. Nanoemulsi merupakan sistem dispersi koloid yang terdiri dari fase minyak, fase air, dan surfaktan dengan ukuran droplet pada rentang 20–200 nm (Shaker *et al.*, 2019). Sistem nanoemulsi memiliki beberapa keunggulan sebagai sediaan penghantaran obat, yaitu stabilitas termodinamika yang baik, luas permukaan yang besar, serta kemampuan meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas senyawa aktif yang bersifat hidrofobik (Jusnita dan Nasution, 2019; Singh *et al.*, 2017). Daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) diketahui mengandung senyawa flavonoid dengan aktivitas antioksidan dan penghambatan enzim α -amilase yang signifikan, namun kelarutan dan absorpsi senyawa tersebut dalam sistem biologis masih terbatas akibat sifat hidrofobiknya (Akinwunmi *et al.*, 2017). Kondisi ini menjadi urgensi nyata untuk mengembangkan sediaan penghantaran yang mampu mengoptimalkan bioavailabilitas senyawa aktif tersebut. Dengan demikian, formulasi ekstrak daun kirinyuh dalam bentuk nanoemulsi diharapkan mampu meningkatkan kelarutan senyawa flavonoid sehingga aktivitas penghambatan enzim α -amilase menjadi lebih efektif dan terukur secara farmakologis.

Selain penggunaan nanoemulsi, penambahan enzim papain ke dalam formulasi juga merupakan strategi yang menjanjikan untuk meningkatkan aktivitas antidiabetes sekaligus antioksidan. Papain merupakan enzim proteolitik yang diisolasi dari getah buah pepaya (*Carica papaya* L.) dan memiliki spektrum substrat yang luas (Vatić *et al.*, 2020). Urgensi penggunaan papain dalam konteks ini didukung oleh fakta bahwa stres oksidatif merupakan faktor utama yang memperburuk resistensi insulin dan kerusakan sel beta pankreas pada diabetes melitus, sehingga diperlukan agen yang secara simultan mampu menghambat pencernaan karbohidrat sekaligus menekan radikal bebas (Abdullah *et al.*, 2020). Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa enzim papain memiliki potensi terapeutik sebagai agen antidiabetes melalui kemampuannya dalam menurunkan aktivitas enzim pencernaan karbohidrat, termasuk enzim α -amilase (Abdullah *et al.*, 2020). Khirzin *et al.* (2020) secara spesifik melaporkan bahwa enzim papain menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap enzim α -amilase secara *in vitro*. Di

sisi lain, papain juga dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan melalui mekanisme pemecahan protein oksidatif dan pengurangan beban radikal bebas dalam sistem biologis, yang menjadikannya kandidat ideal dalam formulasi antidiabetes berbasis bahan alam (Vatić et al., 2020). Dengan demikian, kombinasi antara ekstrak daun kirinyuh yang kaya flavonoid sebagai antioksidan dan penghambat α -amilase, serta enzim papain yang memiliki aktivitas inhibisi enzim α -amilase dan potensi antioksidan, berpotensi menghasilkan efek sinergis ganda dalam pengendalian kadar glukosa darah sekaligus perlindungan terhadap kerusakan oksidatif.

Berdasarkan tinjauan literatur yang telah dilakukan, penelitian mengenai formulasi nanoemulsi ekstrak daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dengan penambahan enzim papain sebagai agen antidiabetes melalui penghambatan enzim α -amilase dan aktivitas antioksidan belum pernah dilaporkan. Kesenjangan ilmiah ini menjadi urgensi utama yang mendasari perlunya penelitian ini dilakukan, mengingat diabetes melitus merupakan penyakit kronis dengan komplikasi oksidatif yang memerlukan pendekatan terapi multitarget. Penelitian-penelitian sebelumnya umumnya hanya menguji ekstrak kasar daun kirinyuh tanpa optimasi sistem penghantaran (Akinwunmi et al., 2017), atau menguji enzim papain secara terpisah tanpa dikombinasikan dengan ekstrak tanaman herbal (Khirzin et al., 2020), sehingga potensi sinergis keduanya dalam sistem nanoemulsi belum pernah dieksplorasi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan mengevaluasi nanoemulsi ekstrak etanol daun kirinyuh dengan variasi formulasi dan penambahan enzim papain, serta menguji aktivitas antidiabetes dan antioksidannya menggunakan metode inhibisi enzim α -amilase secara *in vitro*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmiah yang signifikan dalam pengembangan sediaan farmasi berbasis bahan alam yang bekerja secara multitarget untuk penanganan diabetes melitus.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini ialah sebagai berikut:

1. bagaimana karakteristik fisik nanoemulsi dari ekstrak etanol daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dengan penambahan enzim papain?
2. bagaimana formulasi nanoemulsi ekstrak etanol daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dengan penambahan enzim papain yang memiliki stabilitas fisik optimal?
3. bagaimana pengaruh penambahan enzim papain terhadap aktivitas inhibisi enzim α -amilase pada nanoemulsi ekstrak etanol daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

1. menganalisis karakteristik fisik nanoemulsi dari ekstrak etanol daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dengan penambahan enzim papain

2. menentukan formulasi nanoemulsi ekstrak etanol daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dengan penambahan enzim papain yang memiliki stabilitas fisik optimal
3. mengevaluasi aktivitas antidiabetes nanoemulsi ekstrak etanol daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dengan penambahan enzim papain melalui inhibisi enzim α -amilase.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat memberikan manfaat berupa informasi ilmiah tentang formulasi sediaan nanoemulsi ekstrak daun kirinyuh dengan penambahan enzim papain dan bromelain sebagai antidiabetes melalui uji inhibisi enzim α -amilase, sehingga pemanfaatan daun kirinyuh untuk pengobatan diabetes melitus lebih optimal.

1.5 Landasan Teori

1.5.1 Diabetes Melitus

Diabetes melitus adalah gangguan metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa dalam darah, akibat insulin tidak dapat diproduksi dengan baik (Tamiru *et al.*, 2022). Kasus diabetes melitus sering terjadi di Indonesia. Berdasarkan data *International Diabetes Federation* (IDF) pada tahun 2024, Indonesia menduduki peringkat ke 5 dengan prevalensi kasus penyakit diabetes tertinggi di dunia yang mencapai 11,3%. Penyebab diabetes melitus meningkat ialah dikarenakan pola makan yang buruk dan aktivitas fisik yang kurang tepat, sehingga dapat memicu terjadinya resistensi insulin yang berdampak pada peningkatan kadar gula darah (Yang *et al.*, 2025).

Adapun gejala dari penyakit diabetes melitus ini yaitu seringnya buang air kecil, terutama pada malam hari (poliuria). Hal ini dikarenakan kadar gula darah melebihi ambang ginjal, sehingga gula akan dikeluarkan melalui urine (Kwakye, 2025). Kemudian, nafsu makan yang meningkat (polifagi) dan merasa kurang tenaga, juga menjadi gejala dari diabetes melitus serta pada saat berat badan menjadi turun. Ketika tubuh tidak mampu mendapatkan energi yang cukup dari gula karena kekurangan insulin, tubuh akan bergegas mengolah lemak dan protein yang ada di dalam tubuh untuk diubah menjadi energi, sehingga menyebabkan berat badan menurun (Blanco dan Blanco., 2022).

Diabetes melitus tipe 2 merupakan bentuk diabetes yang paling banyak ditemukan dan menyumbang sekitar 90–95% dari seluruh kasus diabetes melitus. Penyakit ini ditandai oleh terjadinya resistensi insulin pada jaringan perifer yang diikuti dengan penurunan fungsi sel β pankreas dalam memproduksi insulin secara adekuat (Pereira *et al.*, 2024). Pada tahap awal, pankreas masih mampu meningkatkan produksi insulin sebagai respons terhadap resistensi insulin, namun seiring waktu kemampuan tersebut menurun sehingga terjadi hiperglikemia kronis. Diabetes melitus tipe 2 umumnya berkaitan erat dengan faktor gaya hidup, seperti pola makan tinggi kalori dan karbohidrat sederhana, obesitas, serta kurangnya

aktivitas fisik, yang pada akhirnya meningkatkan risiko komplikasi metabolik dan kardiovaskular (Al-Mhanna *et al.*, 2024).

1.5.2 Tanaman Kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.)

Tanaman kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) merupakan gulma yang tumbuh tersebar pada berbagai daerah di Indonesia. Keberadaan tanaman kirinyuh sangat mudah dijumpai karena merupakan salah satu tanaman liar. Tanaman kirinyuh diklasifikasikan ke dalam satu jenis tumbuhan dari family *Asteraceae*. Tanaman kirinyuh dianggap sebagai tumbuhan yang merugikan tumbuhan lain dikarenakan pertumbuhannya yang sangat cepat dan dapat menekan pertumbuhan tanaman lain di sekitarnya, sehingga sifatnya lebih mendominasi (Danong *et al.*, 2021). Menurut *Plants of The World Online* (2024) taksonomi tanaman kirinyuh ialah sebagai berikut;

Regnum: Plantae

Divisio: Spermatophyta

Kelas: Equisetopsida

Subkelas: Magnoliidae

Ordo: Asterales

Famili: Asteraceae

Genus: *Chromolaena*

Spesies: *Chromolaena odorata* L.



Gambar 1. (a) Tanaman Kirinyuh (b) Daun Kirinyuh

Sumber: Khairi, 2022, Greeners.co, <https://www.greeners.co/flora-fauna/tanaman-kirinyuh-gulma-yang-populer-sebagai-obat-herbal/>

Meskipun dianggap gulma, kirinyuh dimanfaatkan sebagai obat tradisional, seperti luka, sakit maag, diare, dan diabetes. Hal ini disebabkan oleh daun kirinyuh memiliki beberapa kandungan senyawa utama seperti tanin, fenol, flavanoid, dan saponin. Flavonoid merupakan komponen utama yang berperan dalam aktivitas antidiabetes daun kirinyuh dengan mekanisme meliputi pencegahan kerusakan serta memperbaiki sel beta pankreas dan pemecahan karbohidrat menjadi glukosa, sehingga penghambatannya dapat mencegah lonjakan glukosa darah setelah makan (Olawale *et al.*, 2021). Selain itu, kandungan flavonoid kirinyuh juga

dilaporkan dapat meningkatkan kadar GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*), yaitu hormon yang merangsang sekresi insulin sekaligus menghambat glukagon (Han *et al.*, 2022). Kandungan flavonoid yang terdapat pada daun kirinyuh seperti kuersetin, kaempferol, dan apigenin (Ogunniran *et al.*, 2023). Berdasarkan hasil analisis komputasional, senyawa flavonoid pada daun kirinyuh seperti kuersetin dilaporkan sebagai komponen utama yang berperan dalam aktivitas penghambatan α -amilase dengan mekanisme interaksi pada sisi aktif enzim (Kikiowo *et al.*, 2020). Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Akinwunmi *et al.* (2017), menunjukkan bahwa ekstrak daun kirinyuh memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -amilase melalui penurunan proses hidrolisis pati menjadi glukosa, sehingga berpotensi menekan peningkatan kadar glukosa darah setelah konsumsi karbohidrat. Daun kirinyuh tidak hanya kaya flavonoid, tetapi juga memiliki profil farmakognostik yang baik dan aman untuk digunakan sebagai bahan baku obat (Gaspersz dkk., 2022).

1.5.3 Enzim Papain

Enzim papain adalah enzim proteolitik yang berasal dari buah pepaya (*Carica papaya*). Enzim papain merupakan biokatalisator yang membantu memecah protein menjadi fragmen protein yaitu peptida dan asam amino. Enzim ini termasuk protease sulfhidril dengan aktivitas yang bergantung pada gugus sulfhidril di sisi aktifnya, serta memiliki bobot molekul sekitar 23.000 Dalton (Prihatini dan Dewi, 2021). Enzim papain terdiri dari 211 asam amino, dan suhu optimum papain berkisar antara 50-60°C, serta pH optimum antara 5-7 (Atacan *et al.*, 2018). Sifat yang sangat menarik dari papain ketika terpapar suhu yang tinggi, pelarut organik, serta reagen-reagen yang dapat menyebabkan denaturasi, enzim papain tetap dapat menjaga kestabilannya (Khirzin dkk., 2020).

Enzim papain banyak dimanfaatkan dalam bidang kesehatan salah satunya ialah sebagai antidiabetes. Bertindak melalui mekanisme penghambatan enzim alfa-amilase. Enzim papain dapat membantu menurunkan penyerapan glukosa dan mengontrol kadar gula darah, sehingga enzim papain memiliki peran sebagai inhibitor alfa-amilase yang bermanfaat dalam pengelolaan diabetes. Sifat ini menjadikan papain tidak hanya berguna dalam pencernaan protein, tetapi juga sebagai agen terapeutik dalam pengaturan metabolisme glukosa. Selain menghambat enzim alfa-amilase, papain juga bersifat antioksidan. Enzim papain mampu menurunkan stres oksidatif, yaitu kondisi ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh yang sering terjadi pada pasien diabetes. Penekanan stres oksidatif membuat papain dapat membantu melindungi sel beta pankreas dari kerusakan dan mempertahankan kemampuannya dalam memproduksi insulin (Khirzin dkk., 2020).

1.5.4 Inhibisi Enzim α -amilase

Enzim α -amilase merupakan enzim yang memainkan peran utama dalam pencernaan pati yaitu menghasilkan glukosa dan maltosa, menyebabkan peningkatan kadar

glukosa. Peningkatan glukosa tersebut dapat menimbulkan dampak negatif bagi penderita diabetes, sehingga mengurangi tingkat pencernaan pati oleh penghambatan enzim seperti α -amilase adalah cara terbaik untuk pengelolaan diabetes (Kodagoda *et al.*, 2023). Pengujian inhibisi enzim α -amilase adalah uji untuk mengetahui penurunan aktivitas enzim α -amilase dalam memecah pati sehingga hasilnya adalah penurunan daya cerna pati (Munawaroh *et al.*, 2020).

Penghambatan alfa-amilase dapat dilakukan dengan cara pembentukan kompleks antara inhibitor dan enzim sehingga aktivitas enzim berkurang, atau dengan memperlambat difusi glukosa dari sisi aktif enzim. Senyawa-senyawa seperti flavonoid, fenol, dan tanin yang terdapat dalam ekstrak tumbuhan mampu berikatan dengan residu asam amino pada sisi aktif alfa-amilase sehingga mencegah enzim memecah substrat pati menjadi glukosa. Dengan demikian, penghambatan ini menunda pencernaan karbohidrat dan penyerapan glukosa, yang berdampak pada penurunan lonjakan gula darah setelah makan (Iheagwam *et al.*, 2025).

Pengujian inhibisi enzim α -amilase metode DNS (3,5-dinitrosalisilat) digunakan untuk mengevaluasi aktivitas enzim α -amilase secara tidak langsung melalui pengukuran jumlah gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis pati (Cao *et al.*, 2019). Enzim α -amilase mengkatalisis pemutusan ikatan α -1,4-glikosidik pada pati sehingga menghasilkan maltosa dan glukosa yang memiliki gugus aldehida bebas. Gugus aldehida ini selanjutnya mereduksi senyawa DNS menjadi 3-amino-5-nitrosalisilat, yang ditandai dengan terbentuknya warna merah-jingga (Chavan *et al.*, 2024). Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan, sehingga mencerminkan tingkat aktivitas α -amilase. Keberadaan senyawa inhibitor, seperti flavonoid, menyebabkan penurunan aktivitas enzim α -amilase sehingga jumlah gula pereduksi yang terbentuk berkurang dan intensitas warna hasil reaksi DNS menurun. Dengan demikian, metode DNS memungkinkan penilaian kemampuan senyawa flavonoid dalam menghambat aktivitas α -amilase berdasarkan penurunan pembentukan gula pereduksi hasil hidrolisis pati (Sun *et al.*, 2020).

1.5.5 Nanoemulsi

Nanoemulsi adalah sediaan penghantaran berbasis lipid yang terdiri dari tetesan minyak yang sangat kecil ukuran antara 20 hingga 200 nanometer yang terdispersi dalam fase air dan distabilkan oleh surfaktan dan kosurfaktan.. Ukuran partikel nanoemulsi yang sangat kecil ini membuatnya memiliki luas permukaan yang besar sehingga meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas zat aktif, terutama yang sulit larut dalam air (Nikita dan Agnihotri, 2025). Nanoemulsi bersifat stabil secara fisik, tidak stabil secara termodinamika, transparan, serta memiliki kemampuan penetrasi yang baik ke dalam jaringan (Giacone *et al.*, 2020).

Kombinasi komponen pada nanoemulsi seperti jenis surfaktan dan kosurfaktan sangat menentukan stabilitas dan efektivitas nanoemulsi dalam mengantarkan zat aktif secara optimal. Surfaktan berperan menurunkan tegangan antarmuka antara

fase minyak dan air serta membentuk lapisan pelindung di sekitar droplet nano sehingga mencegah terjadinya koalesensi. Sementara itu, kosurfaktan berfungsi meningkatkan fleksibilitas dan fluiditas lapisan antarmuka, mempercepat proses emulsifikasi, serta membantu pembentukan droplet berukuran nano yang lebih seragam (Kelidari *et al.*, 2025).

Selain meningkatkan bioavailabilitas, nanoemulsi juga memiliki potensi terapeutik yang signifikan, terutama dalam pengembangan obat herbal dan zat aktif alami. Nanoemulsi mampu menurunkan dosis zat aktif yang dibutuhkan sekaligus memperpanjang waktu pelepasan obat, sehingga meningkatkan keamanan dan efisiensi pengobatan (Vakili-Ghartavol dan Arouiee, 2025). Misalnya pada penelitian yang dilakukan oleh Budaya *et al* (2025), nanoemulsi ekstrak daun krokot menunjukkan kemampuan menghambat enzim alfa-amilase lebih dibandingkan ekstrak kasar daun krokot. Hal tersebut menjadikan nanoemulsi menjadi pilihan sediaan farmasi yang potensial untuk terapi diabetes (Budaya *et al.*, 2025).

1.5.6 Kitosan

Kitosan adalah biopolimer alami yang diperoleh dari deasetilasi kitin, senyawa yang banyak ditemukan dalam eksoskeleton hewan laut seperti udang dan kepiting. Senyawa ini memiliki sifat biodegradabel, biokompatibel, dan tidak toksik, sehingga sangat potensial digunakan dalam berbagai bidang, terutama farmasi dan lingkungan. Kitosan bersifat kationik karena memiliki gugus amina bebas, yang memungkinkannya membentuk ikatan ionik dengan senyawa bermuatan negatif seperti sodium tripolyphosphate (STP) (Sari dkk., 2019). Kitosan memiliki gugus amina ($-NH_2$) dan hidroksil ($-OH$) yang dapat menyumbangkan proton atau elektron untuk menetralkan radikal bebas seperti DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Mekanisme ini memungkinkan kitosan berperan sebagai antioksidan dengan menghambat reaksi oksidasi yang dapat merusak sel (Lukiyono dkk., 2020).

Dalam penelitian, kitosan digunakan untuk membentuk partikel nano melalui metode gelasi ionik. Variasi massa kitosan terbukti memengaruhi yield (hasil) dan ukuran partikel nanoemulsi yang dihasilkan semakin besar massa kitosan, semakin tinggi yield yang diperoleh. Karena kemampuannya membentuk struktur nano, bersifat antimikroba, dan mampu mengontrol pelepasan zat aktif, kitosan sangat cocok digunakan sebagai bahan dasar dalam pembuatan sediaan penghantaran obat, pengawet alami, serta bahan aktif dalam kosmetik dan produk kesehatan lainnya (Sari dkk., 2019).

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium klorida (AlCl_3) 10%, asam sulfat (H_2SO_4) pekat, asam klorida (Merck), *aluminium foil*, tablet akar bosa 50 mg (Dexa), akuades, amilum 1%, buffer posfat pH 6,9, *butylated hydroxytoluene* (BHT), asam asetat 1% (Merck), daun kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.), dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck), enzim α -amilase, enzim papain, etanol p.a (Merck), etil asetat (Merck), HCl 2 N (Merck), FeCl_3 1%, kertas saring, kalium asetat 1 M (Merck), kitosan, kuersetin (Merck), logam magnesium (Merck), n-heksana (Merck), *plastic wrap*, propilen glikol Merck), reagen DNS (Merck), reagen Dragendorff, span 80, *tissue*, tween 80, dan *virgin coconut oil* (VCO).

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayakan 100 mesh, *bulb*, *blender*, batang pengaduk, botol kaca, cawan porselin, corong, erlenmeyer (Iwaki), gelas kimia (Iwaki), gelas ukur (Pyrex), *hotplate*, inkubator, kuvet, labu ukur (Iwaki), *magnetic stirrer*, *magnetic bar*, mikropipet (100-1000 μL), neraca analitik, oven, pH meter, *particle size analyzer* (PSA) (NKT-N9), plastik hitam, *plastic wrap*, pipet tetes, pipet skala, plat KLT, *rotary evaporator* (Model HS-2000NS), rak tabung, sonikator (Elmasonic), spektrofotometer UV-Vis (Model T60), tabung reaksi, *thermogravimetric analysis* (TGA) (Simultaneous Thermal Analyzer 8000), toples kaca, viskometer Brookfield (AMETEK) dan *vortex*.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

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

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Determinasi Sampel Tanaman Kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.)

Tanaman yang akan digunakan dalam penelitian terlebih dahulu dilakukan determinasi terlebih dahulu untuk memastikan kebenaran identitas taksonomi sampel serta menghindari kesalahan pengambilan sampel. Determinasi sampel tanaman kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) dilakukan di Laboratorium Botani,

Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

2.4.2 Preparasi Sampel Daun Kirinyuh

Daun kirinyuh dipisahkan dari bagian lainnya, kemudian dicuci bersih menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kontaminan. Daun yang telah dicuci selanjutnya dikering-anginkan selama 5 hari pada suhu ruang hingga kadar air berkurang secara optimal (Akinwunmi *et al.*, 2017). Daun kirinyuh kering kemudian dihaluskan menjadi serbuk menggunakan *blender*. Serbuk diayak menggunakan ayakan 100 *mesh* untuk memperoleh simplisia dengan ukuran partikel yang homogen (Widasmara *et al.*, 2025).

2.4.3 Ekstraksi Sampel Daun Kirinyuh

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi mengacu pada prosedur Widasmara *et al.* (2025) dengan modifikasi. Sebanyak 500 g serbuk daun kirinyuh dimasukkan ke dalam wadah gelap, kemudian ditambahkan pelarut etanol p.a hingga serbuk terendam sempurna. Wadah ditutup rapat dan didiamkan selama 1×24 jam pada suhu kamar dengan pengadukan setiap enam jam sekali untuk meningkatkan kontak antara pelarut dan sampel. Setelah 24 jam, campuran disaring menggunakan kertas saring untuk memperoleh filtrat. Remaserasi dilakukan sebanyak 3 kali menggunakan pelarut etanol p.a baru dengan kontrol KLT untuk memantau kelengkapan proses ekstraksi. Seluruh filtrat yang diperoleh dari setiap tahap maserasi digabungkan, kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh disimpan dalam wadah tertutup rapat pada suhu ruang (Widasmara *et al.*, 2025). Bagan kerja ekstraksi sampel daun kirinyuh terlampir pada Lampiran 2. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan Persamaan (1):

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (g)}}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4.4 Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kirinyuh

Uji flavonoid. Sebanyak 2 mL larutan ekstrak daun kirinyuh dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian dipanaskan selama 5 menit. Setelah itu, ke dalam larutan ditambahkan 0,1 g logam magnesium dan 5 tetes asam klorida pekat. Campuran dibiarkan bereaksi dan diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil uji dinyatakan positif mengandung flavonoid apabila terbentuk warna kuning, jingga, hingga merah yang menunjukkan terbentuknya senyawa flavilium klorida (Fauzi dan Santoso, 2021). Bagan kerja uji flavonoid terlampir pada Lampiran 2.

Uji tanin. Sebanyak 2 mL larutan ekstrak daun kirinyuh dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian dipanaskan selama 5 menit untuk memastikan homogenitas

larutan. Setelah itu, ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl_3 1% ke dalam larutan ekstrak. Campuran diaduk perlahan dan diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil uji dinyatakan positif mengandung tanin apabila terbentuk warna cokelat kehijauan (tanin terkondensasi) atau biru kehitaman (tanin terhidrolisis) (Fauzi dan Santoso, 2021). Bagan kerja uji tanin terlampir pada Lampiran 2

Uji alkaloid. Sebanyak 2 mL larutan ekstrak daun kirinyuh dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 tetes asam klorida pekat untuk menciptakan suasana asam. Selanjutnya, ditambahkan 5 tetes reagen Dragendorff. Campuran dikocok secara perlahan dan diamati perubahan yang terjadi. Hasil uji dinyatakan positif mengandung alkaloid apabila terbentuk endapan berwarna jingga yang menandakan terbentuknya kompleks kalium-alkaloid (Fauzi dan Santoso, 2021). Bagan kerja uji alkaloid terlampir pada Lampiran 2.

Uji fenolik. Sebanyak 2 mL larutan ekstrak daun kirinyuh dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl_3 1%. Campuran dihomogenkan secara perlahan dan diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil uji dinyatakan positif mengandung senyawa fenolik apabila terjadi perubahan warna menjadi hijau kebiruan atau hitam yang mengindikasikan terbentuknya kompleks besi(III)-fenolat (Banerjee *et al.*, 2025). Bagan kerja uji fenolik terlampir pada Lampiran 2.

Uji terpenoid. Sebanyak 5 mL larutan ekstrak daun kirinyuh yang telah dilarutkan dalam kloroform dipipet ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan asam sulfat pekat secara perlahan melalui dinding tabung reaksi untuk membentuk lapisan bawah. Campuran dibiarkan bereaksi dan diamati perubahan warna yang terjadi pada batas antara kedua lapisan. Hasil uji dinyatakan positif mengandung senyawa terpenoid apabila terbentuk warna merah kecokelatan pada batas lapisan yang menandakan reaksi Liebermann-Burchard (Krishnan dan Packirisamy, 2024). Bagan kerja uji terpenoid terlampir pada Lampiran 2.

2.4.5 Penentuan Kadar Flavonoid Total

Pembuatan larutan standar kuersetin. Kuersetin ditimbang sebanyak 0,01 g dan dilarutkan dalam 100 mL etanol p.a sehingga diperoleh larutan induk kuersetin dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$. Larutan induk tersebut dipipet masing-masing sebanyak 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; dan 6,4 mL ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian dicukupkan volumenya hingga 10 mL dengan etanol p.a sehingga diperoleh seri larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 4; 8; 16; 32; dan 64 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing larutan standar dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 mL etanol p.a, 0,2 mL AlCl_3 10%, 0,2 mL kalium asetat 1 M, serta 5,6 mL akuades. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ($\lambda_{\text{maks}} = 413 \text{ nm}$) (Budaya *et al.*, 2025)

Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Kirinyuh. Ekstrak daun kirinyuh ditimbang sebanyak 0,01 g dan dilarutkan dalam 100 mL etanol p.a, sehingga diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 100 µg/mL. Larutan sampel dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 mL etanol p.a, 0,2 mL AlCl_3 10%, 0,2 mL kalium asetat 1 M, serta 5,6 mL akuades. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda_{\text{maks}} = 413 \text{ nm}$ (Budaya *et al.*, 2025). Kadar flavonoid total dihitung menggunakan Persamaan (2):

$$F = \frac{V \times C \times fp}{m} \quad (2)$$

Keterangan:

- F : Flavonoid total (mg QE/g ekstrak)
 V : Volume ekstrak (L)
 C : Konsentrasi kuersetin sampel (µg/mL)
 fp : faktor pengenceran
 m : bobot ekstrak yang ditimbang (g)

2.4.6 Formulasi Nanoemulsi Ekstrak Daun Kirinyuh dengan Penambahan Enzim Papain (NEDKP)

Desain formulasi nanoemulsi. Desain formulasi dilakukan menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) dengan *Central Composite Design* (CCD) (Montgomery, 2017). Variasi massa ekstrak daun kirinyuh ditetapkan pada rentang 0,01–0,05 g dan variasi massa enzim papain ditetapkan pada rentang 0,001–0,005 g sehingga diperoleh 13 run order yang direalisasikan menjadi 13 formulasi awal sebagaimana disajikan pada Tabel 1. Pada tahap ini, formulasi belum ditambahkan surfaktan, kosurfaktan, dan fase minyak. Seluruh formulasi diuji untuk menentukan persen inhibisi enzim α -amilase sebagai respon utama

Tabel 1. Desain Formulasi NEDKP dengan RSM-CCD

RunOrder	Ekstrak (g)	Enzim (g)
1	0,030	0,005
2	0,030	0,003
3	0,030	0,003
4	0,044	0,004
5	0,030	0,003
6	0,030	0,001
7	0,050	0,003
8	0,030	0,003
9	0,016	0,002
10	0,030	0,003
11	0,010	0,003

RunOrder	Ekstrak (g)	Enzim (g)
12	0,044	0,002
13	0,016	0,004

Evaluasi respon terhadap uji inhibisi enzim α -amilase. Sebanyak 0,2 mL larutan enzim α -amilase dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL larutan yang berisi campuran ekstrak daun kirinyuh dan enzim papain sesuai dengan konsentrasi masing-masing *run order*. Campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, ditambahkan 0,1 mL larutan amilum 1% sebagai substrat dan diinkubasi kembali selama 10 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan penambahan 0,75 mL reagen DNS, kemudian campuran dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 10 menit. Setelah didinginkan, absorbansi larutan diukur pada $\lambda_{maks} = 515$ nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (El-Sofany *et al.*, 2025). Persen inhibisi dihitung menggunakan Persamaan (3):

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (3)$$

Data persen inhibisi yang diperoleh dari 13 formulasi kemudian dianalisis menggunakan RSM untuk menentukan kondisi optimum. Berdasarkan hasil analisis, dipilih lima formulasi terbaik sebagai dasar formulasi nanoemulsi lanjutan.

Pengujian stabilitas awal (*cycling test*). Pengujian stabilitas awal dilakukan terhadap larutan campuran ekstrak daun kirinyuh dan enzim papain menggunakan metode *cycling test*. Larutan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke oven bersuhu 40°C selama 24 jam. Perlakuan tersebut merupakan satu siklus. Pengujian dilakukan sebanyak 2 siklus. Stabilitas dinilai dengan membandingkan kondisi fisik sediaan pada setiap siklus, meliputi perubahan warna, kekeruhan, dan pemisahan fase (Budaya *et al.*, 2025).

Pembuatan NEDKP dari hasil optimasi RSM. Sediaan nanoemulsi dibuat dengan variasi konsentrasi ekstrak daun kirinyuh dan enzim papain sesuai dengan lima hasil optimasi dari RSM. Komposisi bahan secara lengkap disajikan pada Tabel 2. Prosedur pembuatan dilakukan sebagai berikut: Span 80 dicampurkan ke dalam Tween 80, kemudian ditambahkan ekstrak daun kirinyuh yang telah dilarutkan dalam VCO dan dihomogenkan. Selanjutnya, ditambahkan BHT dan dihomogenkan, dilanjutkan dengan penambahan propilen glikol. Larutan kitosan 0,05% kemudian ditambahkan ke dalam campuran. Buffer fosfat pH 6,9 ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 890 rpm selama 1 jam. Campuran kemudian disonikasi selama 1,5 jam untuk membentuk sistem nanoemulsi. Setelah sonikasi, larutan enzim papain ditambahkan dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 50 rpm selama 10 menit untuk menghindari degradasi enzim akibat gaya geser berlebihan (Budaya *et al.*, 2025).

Tabel 2. Formulasi NEDKP

Bahan	Fungsi	Komposisi (g)
Ekstrak Daun Kirinyuh	Bahan aktif	sesuai hasil RSM
Enzim Papain	Bahan aktif	sesuai hasil RSM
VCO	Fase minyak	3
Tween 80	Surfaktan	27
Span 80	Surfaktan	1
Propilen Glikol	Kosurfaktan	5
BHT	Antioksidan	0,1
Kitosan 0,05%	Penstabil	10
Buffer Posfat	Fase air	ad 100

2.4.7 Evaluasi Sediaan NEDKP

Uji organoleptis. Evaluasi organoleptis sediaan nanoemulsi dilakukan dengan mengamati homogenitas, tekstur, aroma, dan warna secara visual menggunakan indra penglihatan dan penciuman (Tahir *et al.*, 2023).

Uji pH. Pengukuran pH sediaan nanoemulsi dilakukan menggunakan pH meter digital. Sebelum pengukuran, elektroda pH meter dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan standar pH 4 dan pH 7. Setelah kalibrasi, elektroda dicelupkan ke dalam sediaan nanoemulsi dan nilai pH dicatat setelah angka pada alat stabil (Tahir *et al.*, 2023).

Uji persen transmittan. Persen transmittan sediaan nanoemulsi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm dengan akuades sebagai blanko. Nilai persen transmittan sebesar 90–100% mengindikasikan bahwa sediaan nanoemulsi memiliki penampakan yang jernih dan transparan, yang merupakan salah satu karakteristik nanoemulsi yang baik (Taiyeb *et al.*, 2024).

Uji viskositas. Pengujian viskositas dilakukan menggunakan viskometer Brookfield. Sebanyak 80 mL sampel NEDKP dimasukkan ke dalam gelas *sloki*. Pengukuran dilakukan menggunakan spindel nomor 61 dengan kecepatan 60 rpm. Nilai viskositas dicatat dalam satuan cP (Gharibzahedi *et al.*, 2017).

Uji stabilitas metode sentrifugasi. Sediaan nanoemulsi disentrifugasi menggunakan alat sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 45 menit. Setelah sentrifugasi, diamati ada tidaknya keterpisahan fase (*creaming*, *cracking*, atau sedimentasi) pada sediaan nanoemulsi (Wahgiman *et al.*, 2020).

Uji stabilitas metode cycling test. Sediaan nanoemulsi disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke oven bersuhu 40°C selama 24 jam.

Perlakuan tersebut merupakan satu siklus. Pengujian dilakukan sebanyak 3 siklus. Pada setiap akhir siklus, dilakukan pengamatan terhadap perubahan kondisi fisik sediaan, meliputi warna, kejernihan, homogenitas, dan ada tidaknya pemisahan fase (Budaya *et al.*, 2025).

Analisis ukuran partikel dan indeks polidispersitas. Analisis ukuran partikel dan indeks polidispersitas (PDI) dilakukan menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) dengan prinsip *dynamic light scattering* (DLS). Sampel nanoemulsi terlebih dahulu diencerkan dengan medium pendispersi yang sesuai hingga diperoleh konsentrasi yang optimal untuk pengukuran. Sampel yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam kuvet dan dianalisis. Hasil pengukuran berupa ukuran partikel rata-rata (*z-average*) dan nilai PDI dicatat. Ukuran partikel nanoemulsi yang baik berada pada rentang 20–300 nm dengan nilai PDI < 0,3 yang menunjukkan distribusi ukuran partikel yang seragam (Tahir *et al.*, 2023).

2.4.8 Penentuan Formulasi NEDKP Terbaik

Penentuan formulasi NEDK terbaik dilakukan dengan membandingkan seluruh hasil evaluasi sediaan yang telah diperoleh, meliputi uji organoleptis, pH, persen transmittan, viskositas, stabilitas sentrifugasi, stabilitas cycling test, serta analisis ukuran partikel dan indeks polidispersitas. Setiap formula dinilai berdasarkan kesesuaiannya dengan kriteria nanoemulsi yang baik, yaitu tampilan homogen dan transparan, pH sesuai dengan rentang fisiologis, persen transmittan tinggi (90-100%), viskositas dalam rentang optimal, tidak terjadi pemisahan fase setelah uji stabilitas, ukuran partikel pada rentang 20–300 nm, dan nilai PI < 0,3. Formula dengan hasil evaluasi yang paling stabil, konsisten, ukuran partikel paling kecil, serta distribusi partikel paling seragam ditetapkan sebagai formulasi terbaik.

2.4.9 Evaluasi Lanjutan Formulasi NEDKP Terbaik

Uji stabilitas termal. Uji stabilitas termal dilakukan pada formulasi NEDKP terbaik menggunakan instrumen Thermogravimetric Analysis (TGA). Uji ini bertujuan untuk mengetahui ketahanan dan konsistensi sifat fisikokimia sediaan terhadap perubahan suhu. Sampel NEDKP ditimbang sebanyak 1 mg, kemudian ditempatkan pada wadah aluminium dan dipanaskan dengan laju 20°C/menit dari suhu 30°C hingga 600°C. Termogram yang diperoleh dianalisis untuk mengidentifikasi tahapan dekomposisi termal dan stabilitas sediaan (Sharma *et al.*, 2024).

Uji zeta potensial. Pengukuran potensial zeta sediaan nanoemulsi dilakukan menggunakan Particle Size Analyzer (PSA) dengan prinsip electrophoretic light scattering (ELS). Uji ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas elektrostatik sistem nanoemulsi. Nilai potensial zeta yang lebih besar dari +30 mV atau lebih kecil dari -30 mV mengindikasikan stabilitas nanoemulsi yang baik, karena gaya tolak-menolak elektrostatik antarpartikel yang cukup kuat sehingga agregasi dapat dihambat untuk diketahui stabilitas elektrostatik sistem. Nilai potensial zeta yang

diukur lebih besar dari +30 mV atau lebih kecil dari -30 mV diinterpretasikan sebagai indikator stabilitas nanoemulsi yang baik karena gaya tolak-menolak antarpasrtikel yang cukup kuat sehingga agregasi dapat dihambat. (Wahgiman *et al.*, 2020).

Uji aktivitas antibakteri. Sebanyak 5 μ L larutan uji yang terdiri atas sampel F3 NEDK, Tween 80 sebagai kontrol negatif, dan larutan amoksisilin sebagai kontrol positif, diteteskan pada kertas cakram steril yang telah ditempatkan di permukaan media Mueller-Hinton Agar yang sebelumnya telah diinokulasi dengan bakteri *Staphylococcus aureus*. Cakram dидiamkan selama ± 15 menit hingga larutan terserap sempurna ke dalam kertas. Selanjutnya, cawan petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri diamati setelah inkubasi dengan mengukur terbentuknya zona jernih di sekitar cakram. Zona inhibisi nol menunjukkan tidak adanya daerah hambat, zona inhibisi parsial ditandai dengan masih terlihatnya pertumbuhan bakteri pada area hambat, sedangkan zona resistensi total ditunjukkan oleh terbentuknya zona yang tidak utuh atau terputus di sekitar cakram. Diameter zona hambat diukur menggunakan penggaris dan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm) (El Karkouri *et al.*, 2021).

2.4.10 Pembuatan Nanoemulsi Ekstrak Daun Kirinyuh Tanpa Penambahan Enzim Papain (NEDK)

Pembuatan NEDK digunakan sebagai pembandingan dengan NEDKP pada pengujian aktivitas antidiabetes. Sediaan NEDK dibuat dengan jumlah ekstrak daun kirinyuh yang sama dengan formulasi NEDKP terbaik. Prosedur pembuatan mengikuti tahapan yang sama dengan pembuatan NEDKP (Subbagian 2.4.6), namun tanpa penambahan enzim papain. Secara ringkas, Span 80 dicampurkan ke dalam Tween 80, kemudian ditambahkan ekstrak daun kirinyuh yang telah dilarutkan dalam VCO dan dihomogenkan. BHT dan propilen glikol ditambahkan secara berturut-turut. Larutan kitosan 0,05% ditambahkan, dilanjutkan dengan penambahan buffer fosfat pH 6,9 sedikit demi sedikit sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer dengan kecepatan 890 rpm selama 1 jam, kemudian disonikasi selama selama 1,5 jam (Budaya *et al.*, 2025).

2.4.11 Uji Aktivitas Antidiabetes dengan Metode Inhibisi Enzim α -amilase

Pembuatan larutan kontrol positif akarbosa. Tablet akarbosa 50 mg digerus dan ditimbang sebanyak 0,01 g, kemudian dilarutkan dengan sedikit HCl 2 N. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya dengan buffer fosfat pH 6,9 sehingga diperoleh larutan induk akarbosa dengan konsentrasi 1000 μ g/mL. Dari larutan induk tersebut, dipipet masing-masing 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; dan 3,0 mL ke dalam labu ukur 3 mL, kemudian dicukupkan dengan buffer fosfat pH 6,9 sehingga diperoleh seri larutan akarbosa dengan konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 μ g/mL (El-Sofany *et al.*, 2025). Bagan kerja terlampir pada Lampiran 2.

Pembuatan larutan sampel ekstrak daun kirinyuh (EDK). Ekstrak kental daun kirinyuh ditimbang sebanyak 0,01 g, kemudian dilarutkan dengan 1 mL DMSO 1%. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya dengan buffer fosfat pH 6,9 sehingga diperoleh larutan induk EDK dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Dari larutan induk tersebut, dipipet masing-masing 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; dan 3,0 mL ke dalam labu ukur 3 mL, kemudian dicukupkan dengan buffer fosfat pH 6,9 sehingga diperoleh seri larutan sampel EDK dengan konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 µg/mL (El-Sofany *et al.*, 2025). Bagan kerja terlampir pada Lampiran 2.

Pembuatan larutan sampel nanoemulsi ekstrak daun kirinyuh tanpa enzim papain (NEDK). Sediaan NEDK ditimbang sebanyak 0,01 g, kemudian dilarutkan dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Volume dicukupkan dengan buffer fosfat pH 6,9 sehingga diperoleh larutan induk NEDK dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Dari larutan induk tersebut, dipipet masing-masing 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; dan 3,0 mL ke dalam labu ukur 3 mL, kemudian dicukupkan dengan buffer fosfat pH 6,9 sehingga diperoleh seri larutan sampel NEDK dengan konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 µg/mL. Bagan kerja terlampir pada Lampiran 2.

Pembuatan larutan sampel nanoemulsi ekstrak daun kirinyuh dengan enzim papain (NEDKP). Sediaan NEDKP ditimbang sebanyak 0,01 g, kemudian dilarutkan dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Volume dicukupkan dengan buffer fosfat pH 6,9 sehingga diperoleh larutan induk NEDKP dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Dari larutan induk tersebut, dipipet masing-masing 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; dan 3,0 mL ke dalam labu ukur 3 mL, kemudian dicukupkan dengan buffer fosfat pH 6,9 sehingga diperoleh seri larutan sampel NEDKP dengan konsentrasi 200, 400, 600, 800, dan 1000 µg/mL. Bagan kerja terlampir pada Lampiran 2.

Pengujian aktivitas inhibisi enzim α -amilase kontrol negatif. Sebanyak 0,2 mL larutan enzim α -amilase dipipet ke dalam tabung reaksi (lima tabung sebagai replikasi), kemudian ditambahkan 1 mL buffer fosfat pH 6,9 sebagai pengganti larutan sampel. Campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, ditambahkan 0,1 mL larutan amilum 1% sebagai substrat dan diinkubasi kembali selama 10 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan penambahan 0,75 mL reagen DNS, kemudian campuran dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 10 menit. Setelah didinginkan, absorbansi larutan diukur pada $\lambda_{maks} = 515$ nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Absorbansi kontrol negatif digunakan sebagai nilai absorbansi kontrol ($A_{kontrol}$) dalam perhitungan persen inhibisi (El-Sofany *et al.*, 2025). Bagan kerja terlampir pada Lampiran 2.

Pengujian aktivitas inhibisi enzim α -amilase kontrol positif akarbosa, sampel EDK, NEDK dan NEDKP. Sebanyak 0,2 mL enzim α -amilase dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL larutan (akarbosa, EDK, dan NEDK, atau NEDKP) dari masing-masing konsentrasi (200, 400, 600, 800, dan 1000 µg/mL). Campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi,

ditambahkan 0,1 mL larutan amilum 1% sebagai substrat dan diinkubasi kembali selama 10 menit. Reaksi enzimatis dihentikan dengan penambahan 0,75 mL reagen DNS, kemudian campuran dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 10 menit. Setelah didinginkan, absorbansi larutan diukur pada $\lambda_{maks} = 515 \text{ nm}$ menggunakan spektrofotometer UV-Vis (El-Sofany *et al.*, 2025). Pengujian dilakukan secara triplo untuk setiap konsentrasi. Bagan kerja terlampir pada Lampiran 2. Persen inhibisi dihitung menggunakan Persamaan (3).

Nilai IC_{50} ditentukan melalui analisis regresi linear antara konsentrasi sampel (x) dan persen inhibisi (y) dengan persamaan $y = ax + b$. Nilai IC_{50} dihitung menggunakan Persamaan (4):

$$IC_{50} = \frac{50-b}{a} \quad (4)$$

Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim α -amilase. Semakin kecil nilai IC_{50} , semakin kuat aktivitas inhibisi sampel terhadap enzim α -amilase (Kashtoh dan Baek, 2023).