

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit degeneratif masih menjadi salah satu penyebab kematian paling umum yang dapat ditandai dengan penurunan fungsi jaringan atau organ secara progresif. Beberapa contoh penyakit degeneratif meliputi katarak, diabetes melitus, obesitas, osteoporosis, *rheumatoid arthritis* (RA), kanker, dan penyakit kardiovaskular. Data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) pada tahun 2018 menunjukkan peningkatan prevalensi penyakit degeneratif dibandingkan dengan data Riskesdas 2013. Faktor utama yang berkontribusi terhadap perkembangan penyakit degeneratif adalah gaya hidup yang tidak sehat serta akumulasi radikal bebas dalam tubuh manusia (Prasetya, 2023). Radikal bebas merupakan molekul atau ion yang memiliki elektron tidak berpasangan pada orbital atomnya, sehingga tidak stabil dan sangat reaktif.

Radikal bebas dapat dihasilkan secara endogen melalui proses metabolisme seluler, seperti rantai pernapasan mitokondria yang menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) selama pembentukan ATP. Selain itu radikal bebas juga dapat berasal dari sumber luar tubuh (eksogen), seperti radiasi, ozon, pestisida, bahan kimia industri, dan asap rokok (Tumilaar et al., 2023). Akumulasi radikal bebas dalam jumlah berlebih dapat menyebabkan stres oksidatif pada biomolekul seperti lipid, protein dan DNA, yang selanjutnya dapat memicu berbagai gangguan patologis seperti kanker, penyakit inflamasi, gangguan pernapasan, penyakit kardiovaskular, gangguan neurodegeneratif, serta gangguan saluran pencernaan (Muscolo et al., 2024).

Salah satu strategi utama untuk mengurangi efek buruk radikal bebas adalah melalui konsumsi antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa biokimia yang memiliki kemampuan untuk menetralkan radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif dalam tubuh. Senyawa ini berfungsi melindungi struktur seluler dari kerusakan oksidatif serta berperan penting dalam memodulasi jalur inflamasi, memfasilitasi perbaikan dan regenerasi seluler, serta mengatur ekspresi gen yang terkait dengan kecenderungan terhadap kondisi degeneratif. Selain itu, antioksidan juga menunjukkan sifat neuroprotektif yang dapat mempertahankan fungsi kognitif dan menghambat timbulnya gangguan neurodegeneratif (Muscolo et al., 2024).

Meskipun demikian, penggunaan antioksidan sintetis pada hewan percobaan telah dikaitkan dengan tumorigenesis dan berbagai efek samping, meliputi alergi kulit, gangguan gastrointestinal, kerusakan hematologis, serta gangguan ginjal. Sebaliknya, antioksidan yang berasal dari sumber botani umumnya dianggap lebih aman karena cenderung diserap lebih cepat dibandingkan obat-obatan sintetis sehingga mengurangi kemungkinan terjadinya efek samping. Oleh karena itu, eksplorasi sumber antioksidan alami yang aman dan efektif menjadi penting untuk dilakukan (Purwanto et al., 2022).

Flavonoid merupakan kelompok terbesar dari senyawa fenolik tumbuhan yang mencakup lebih dari separuh dari sekitar delapan ribu senyawa fenolik yang ditemukan secara alami. Senyawa ini termasuk kelompok antioksidan alami yang umumnya terdapat dalam tumbuhan, buah-buahan, dan sayuran serta memiliki kemampuan yang sangat baik dalam meredam radikal bebas oksigen. Selain flavonoid, senyawa fenolik dan polifenolik juga termasuk dalam kelas utama antioksidan alami yang terdapat dalam

tumbuhan, makanan, dan minuman. Salah satu tumbuhan yang diketahui kaya akan senyawa flavonoid adalah kersen (*Muntingia calabura* L.). Berbagai studi fitokimia terhadap tanaman ini telah mengidentifikasi kandungan flavonoid, seskuiterpena, kalkon, dan senyawa fenolik yang bersifat bioaktif. Pada ekstrak kasar *Muntingia calabura* L., metabolit sekunder yang dominan umumnya berupa senyawa golongan flavonoid yang diketahui berkontribusi terhadap bioaktivitas tanaman ini. Studi sebelumnya juga melaporkan bahwa flavon, flavanon, flavan, dan biflavan merupakan komponen utama dari *Muntingia calabura* L., di mana beberapa di antaranya menunjukkan aktivitas anti-agregasi platelet dan sitotoksik (Pertiwi et al., 2020). Anti-agregasi platelet merujuk pada kemampuan suatu senyawa dalam mencegah penggumpalan atau penempelan trombosit satu sama lain, yang apabila tidak terkendali dapat meningkatkan risiko pembentukan bekuan darah (trombus) dan berujung pada gangguan kardiovaskular seperti serangan jantung maupun stroke. Dengan demikian, aktivitas ini memiliki relevansi klinis yang penting dalam pencegahan penyakit trombotik (Nouruzi et al., 2022).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Gunny et al. (2024) nilai IC_{50} aktivitas antioksidan ekstrak daun *Muntingia calabura* L. sebesar 2,5 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan asam askorbat sebagai kontrol positif menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 1,657 $\mu\text{g/mL}$. Asam askorbat atau yang dikenal sebagai vitamin C merupakan senyawa antioksidan larut air yang telah terstandarisasi dan umum digunakan sebagai pembanding positif dalam uji aktivitas antioksidan karena kemampuannya yang kuat dan konsisten dalam menetralisasi radikal bebas. Nilai IC_{50} yang rendah dan relatif mendekati kontrol positif tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun kersen memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dalam meredam radikal bebas, sehingga berpotensi dikembangkan sebagai sumber antioksidan alami. Namun, sebagian besar penelitian tersebut dilakukan di negara lain, sementara perbedaan lokasi penanaman *Muntingia calabura* L. dapat mempengaruhi kandungan fenol dan flavonoid totalnya.

Meskipun daun kersen mengandung senyawa antioksidan yang potensial, efektivitas antioksidan tidak hanya bergantung pada jumlahnya, tetapi juga pada bioavailabilitas. Bioavailabilitas adalah parameter farmakokinetik yang menggambarkan sejauh mana suatu zat aktif dapat diserap dan mencapai sirkulasi sistemik dalam bentuk utuh setelah dikonsumsi, sehingga dapat memberikan efek biologis yang diharapkan. Dengan kata lain, semakin tinggi bioavailabilitas suatu senyawa, semakin besar peluangnya untuk diserap dan dimanfaatkan secara optimal oleh tubuh. Berbagai faktor eksternal, seperti teknik pemrosesan, kondisi penyimpanan, dan penggunaan sistem penghantaran, dapat mempengaruhi bioavailabilitas senyawa bioaktif (Muscolo et al., 2024). Oleh karena itu, berbagai inovasi sistem penghantaran telah dikembangkan untuk meningkatkan absorpsi dan efisiensi senyawa bioaktif, di antaranya melalui larutan propilen glikol, kompleks fosfolipid, nanopartikel, dan koloid.

Nanoemulsi merupakan sistem penghantaran berbasis koloid yang terdiri dari komponen utama, yaitu minyak, surfaktan, kosurfaktan, dan air (Kaptan, 2024). Nanoemulsi memiliki ukuran partikel berkisar antara 20 hingga 200 nm yang distabilisasi oleh lapisan interfasi molekul surfaktan dan kosurfaktan (Rocha-Filho dan Maruno, 2025). Ukuran partikel yang sangat kecil ini secara signifikan meningkatkan kelarutan, stabilitas, dan bioavailabilitas senyawa yang dikapsulasi (Luu et al., 2025). Selain itu, tetesan dalam nanoemulsi memiliki muatan permukaan dan bersifat stabil secara kinetik,

sehingga mampu mencegah terjadinya penggabungan tetesan (koalesensi) (Mushtaq et al., 2023). Formulasi senyawa bioaktif dalam bentuk nanoemulsi dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dibandingkan ekstrak dalam bentuk konvensional. Hal ini berkaitan dengan peningkatan luas permukaan kontak akibat ukuran droplet yang sangat kecil (skala nanometer), yang memfasilitasi kontak antara senyawa antioksidan dengan radikal bebas dan memungkinkan transfer elektron yang lebih efektif (da Silva et al., 2023). Penelitian Zhao et al. (2020) melaporkan bahwa nanoemulsi flavonoid buckwheat menunjukkan aktivitas penangkapan radikal DPPH yang lebih tinggi dibandingkan bentuk suspensinya, meskipun masih di bawah asam askorbat sebagai kontrol positif. Oleh karena itu, nanoemulsi banyak dikembangkan sebagai sistem penghantaran untuk senyawa bioaktif yang memiliki keterbatasan kelarutan dan stabilitas.

Minyak biji bunga matahari kaya akan asam lemak esensial dan beberapa senyawa antioksidan alami, seperti tokoferol, fitosterol, glikosida triterpen, flavonoid, asam fenolik, karotenoid, asam klorogenat, dan asam kafeik yang berperan dalam menangkal radikal bebas (Anggraeni et al., 2025). Kandungan bioaktif yang didukung oleh karakteristik yang stabil, aman, dan kompatibel dalam emulsi serta ketersediaannya yang melimpah di alam menjadikannya berpotensi dikembangkan dalam bidang farmasi, kosmetik, dan pangan fungsional (Arianto dan Cindy, 2019; Iqbal et al., 2024; Oliveira et al., 2023). Oleh karena itu, minyak biji bunga matahari dipilih sebagai fase minyak dalam formulasi nanoemulsi.

Proses pembentukan nanoemulsi memerlukan surfaktan yang berperan sebagai emulsifier untuk menurunkan tegangan antarmuka antara fase minyak dan air. Untuk meningkatkan stabilitas, digunakan sorbitol sebagai kosurfaktan dalam formulasi. Sorbitol termasuk golongan senyawa gula alkohol rantai pendek yang memiliki kelarutan tinggi dalam air sehingga sebagian besar terdistribusi ke dalam fase air, sementara sebagian lainnya berinteraksi dengan bagian polar dari surfaktan. Interaksi ini membantu menurunkan tegangan permukaan antara minyak dan air sehingga mendukung pembentukan emulsi yang stabil (Wahyuningsih dan Latief, 2021). Selain komposisi formulasi, waktu sonikasi juga berpengaruh terhadap ukuran partikel. Peningkatan waktu sonikasi berhubungan dengan penurunan ukuran droplet akibat pembentukan gelombang ultrasonik berfrekuensi tinggi sehingga dihasilkan nanoemulsi dengan tetesan yang lebih kecil (Kaptan, 2024). Berdasarkan uraian tersebut, pemanfaatan nanoemulsi sebagai sistem penghantaran ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) merupakan pendekatan formulasi berbasis nanoteknologi yang menjanjikan untuk meningkatkan kelarutan, stabilitas, dan bioavailabilitas senyawa antioksidan. Penelitian ini penting dilakukan guna mengoptimasi formulasi nanoemulsi ekstrak daun kersen berbasis minyak biji bunga matahari serta mengevaluasi karakteristik fisik dan aktivitas antioksidannya, sehingga diharapkan dapat berkontribusi dalam pengembangan sistem penghantaran antioksidan alami yang efektif untuk pencegahan penyakit degeneratif.

1.2 Dasar Teori

1.2.1 Tanaman Kersen (*Muntingia calabura* L.)

Tanaman telah lama dimanfaatkan sebagai sumber terapi alami. Salah satu tanaman yang memiliki potensi multi-terapeutik adalah *Muntingia calabura* L., dilaporkan memiliki aktivitas farmakologis pada berbagai bagian tanamannya. *Muntingia calabura* L., yang dikenal di Indonesia sebagai kersen atau kerukup siam termasuk dalam famili

Muntingiaceae (Gunny et al., 2024; Menon et al., 2025). Tanaman ini berasal dari Amerika Tengah, namun telah tersebar luas di negara beriklim tropis seperti Malaysia, Indonesia, Filipina, India, Cina, dan Brasil.



Gambar 1. Tanaman kersen (kiri) dan daun kersen (kanan)

Secara tradisional tanaman ini telah lama digunakan sebagai obat tradisional untuk melawan penyakit seperti flu, batuk, dan demam. Tanaman *Muntingia calabura* L. dikenal memiliki berbagai aktivitas farmakologis yang berasal dari kandungan metabolit sekundernya. Berbagai bagian tanaman, termasuk daun, kulit batang, bunga, dan buah, dilaporkan memiliki potensi terapeutik seperti aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antidiabetik, antihipertensi, gastroprotektif, serta aktivitas antimikroba (Gunny et al., 2024). Aktivitas antioksidan daun kersen telah dibuktikan melalui berbagai penelitian sebelumnya yang menunjukkan kemampuan ekstrak dalam menangkap radikal bebas. Aktivitas ini berkaitan dengan kemampuan senyawa fenolik dan flavonoid dalam mendonorkan atom hidrogen atau elektron untuk menstabilkan radikal bebas (Samodra et al., 2023). Adapun taksonomi tanaman kersen adalah sebagai berikut:

Regnum	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermeae
Classic	: Dicotyledoneae
Subclassic	: Dialypetalae
Ordo	: Malvales
Familia	: Tiliaceae
Genus	: <i>Muntingia</i>
Species	: <i>Muntingia calabura</i> L.

1.2.2 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang menjadi penghambat proses oksidasi substrat walaupun dalam konsentrasi yang kecil. Mekanisme kerja antioksidan dengan mendonorkan elektron atau atom hidrogen untuk berikatan dengan radikal bebas, sehingga radikal bebas menjadi stabil dan tidak reaktif. Antioksidan menghambat tahap inisiasi (awal reaksi), propagasi (reaksi berantai), dan terminasi (penghentian reaksi) pada proses oksidasi akibat radikal bebas, sehingga mencegah kerusakan sel dan bahan pangan. Efektivitas antioksidan dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain struktur

kimia, konsentrasi dan kondisi fisik seperti suhu dan pH (Gulcin dan Alwasel, 2023). Berdasarkan sifat kelarutannya, antioksidan dapat dikategorikan ke dalam dua kelompok utama, pertama antioksidan yang larut dalam air dan kedua antioksidan yang larut dalam lemak. Antioksidan larut dalam air, seperti vitamin C dan polifenol, mudah diserap oleh tubuh, tetapi relatif lebih cepat dikeluarkan melalui urin, sehingga perlu dikonsumsi secara teratur. Sebaliknya, antioksidan larut dalam lemak, seperti vitamin E dan karotenoid, memerlukan lipid untuk proses absorpsi dan cenderung terakumulasi lebih lama dalam jaringan tubuh.

Berdasarkan struktur kimianya, antioksidan dapat dibedakan menjadi beberapa kelompok, salah satunya adalah senyawa fenolik atau polifenol. Kelompok ini dikenal memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi karena keberadaan gugus hidroksil yang mampu mendonorkan atom hidrogen untuk menstabilkan radikal bebas. Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan tinggi karena efektif dalam menetralkan spesies oksigen reaktif (ROS) melalui mekanisme transfer atom hidrogen (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT). Selain itu, flavonoid juga memiliki kemampuan mengkhelat ion logam transisi, seperti besi dan tembaga, yang berperan dalam pembentukan radikal bebas melalui reaksi Fenton. Quercetin merupakan salah satu contoh flavonoid yang berfungsi sebagai khelator besi sekaligus penstabil radikal, sehingga berkontribusi dalam menghambat proses oksidatif (Tumilaar et al., 2023).

1.2.3 Nanoemulsi

Emulsi adalah sistem yang terdiri atas fase terdispersi dan fase pendispersi (kontinu) yang tidak saling bercampur. Berdasarkan distribusi fasenya, emulsi diklasifikasikan menjadi dua tipe utama, yaitu minyak dalam air (*oil in water*, O/W), di mana fase minyak terdispersi dalam medium berair, serta air dalam minyak (*water in oil*, W/O), di mana fase air terdispersi dalam medium minyak (Majchrzak et al., 2025). Nanoemulsi merupakan pengembangan dari sistem emulsi konvensional yang memiliki ukuran partikel dalam skala nanometer dan stabilitas kinetik. Ukuran partikel yang sangat kecil memberikan luas permukaan antarmuka yang lebih besar, sehingga meningkatkan efisiensi enkapsulasi dan penghantaran. Berdasarkan dari segi struktur dan komposisi yang terkontrol nanoemulsi memungkinkan distribusi senyawa aktif lebih merata yang berpotensi meningkatkan stabilitas dan bioaktivitas senyawa. Pembentukan nanoemulsi secara umum dibedakan menjadi dua, yaitu pendekatan energi tinggi dan energi rendah. Metode energi tinggi, seperti homogenisasi tekanan tinggi dan ultrasonikasi yang memanfaatkan gaya mekanik untuk memperkecil ukuran partikel. Sementara metode energi rendah mengandalkan perubahan kondisi sistem, seperti komposisi atau suhu, untuk menghasilkan droplet berukuran nanometer tanpa penggunaan energi mekanik yang besar. Pemilihan metode pembuatan bergantung pada karakteristik bahan, ukuran droplet yang diinginkan, stabilitas sistem, serta tujuan aplikasinya (Ozdamar et al., 2026).

Pada bidang farmasetika dan kosmetik, nanoemulsi dilaporkan mampu meningkatkan penetrasi kulit serta menghasilkan profil pelepasan bahan aktif yang lebih efektif dibandingkan sistem konvensional. Sifat ini menjadikan nanoemulsi sebagai sistem yang menjanjikan dalam formulasi antioksidan berbasis tanaman. Meskipun memiliki stabilitas yang baik, nanoemulsi tetap dapat mengalami ketidakstabilan fisik, terutama melalui

mekanisme pematangan Ostwald (*Ostwald ripening*). Mekanisme ini terjadi akibat perbedaan energi permukaan antara droplet kecil dan droplet besar, sehingga molekul dari droplet kecil berdifusi ke droplet yang lebih besar. Proses ini menyebabkan peningkatan ukuran rata-rata droplet seiring waktu dan dapat menurunkan stabilitas sistem (Rocha-Filho dan Maruno, 2025).

1.2.4 Minyak Biji Bunga Matahari

Minyak nabati merupakan komponen penting dalam diet manusia karena berfungsi sebagai sumber energi serta menyediakan mikronutrien esensial. Namun, kandungan asam lemak tak jenuh yang tinggi pada minyak nabati menyebabkan minyak tersebut rentan terhadap proses oksidasi. Degradasi oksidatif dapat menimbulkan ketengikan, perubahan rasa, penurunan nilai gizi, serta menurunkan kualitas dan keamanan produk bagi konsumen. Minyak biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) merupakan salah satu minyak nabati yang banyak digunakan baik dalam industri pangan maupun bidang farmasi dan kosmetik. Minyak ini kaya akan asam lemak tak jenuh, terutama asam oleat dan asam linoleat. Asam oleat diketahui mampu meningkatkan penetrasi senyawa aktif dengan mengganggu struktur lipid pada penghalang kulit, sedangkan asam linoleat berperan dalam menjaga integritas barrier permeabilitas air serta mendukung fungsi protektif kulit (Cavitioli et al., 2025; Hallouch et al., 2025).

Minyak biji bunga matahari juga dapat berfungsi sebagai medium penghantaran senyawa bioaktif, termasuk senyawa fenolik. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa minyak ini dapat diperkaya dengan ekstrak fenolik tanaman sehingga meningkatkan aktivitas antioksidan dan stabilitas oksidatifnya (Hallouch et al., 2025). Minyak biji bunga matahari diketahui mengandung senyawa bioaktif seperti tokoferol, fenolik, flavonoid, dan karotenoid yang berperan sebagai antioksidan alami. Keberadaan senyawa tersebut berkontribusi dalam menghambat peroksidasi lipid dan meningkatkan stabilitas oksidatif minyak. Beberapa penelitian terbaru melaporkan bahwa kandungan fenolik dan tokoferol dalam minyak biji bunga matahari berhubungan langsung dengan peningkatan kapasitas penangkapan radikal bebas serta ketahanan terhadap degradasi oksidatif (Cavitioli et al., 2025; Pointner et al., 2024). Beberapa penelitian terbaru menunjukkan bahwa nanoemulsi berbasis minyak nabati seperti *sunflower seed oil* dapat meningkatkan penetrasi bahan aktif serta bioavailabilitasnya bila dibandingkan dengan sistem emulsi konvensional, sehingga meningkatkan respons biologis seperti efek antioksidan atau penyembuhan jaringan (Deveci, 2025; Oliveira et al., 2023).

1.3 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) berdasarkan nilai IC_{50} ?
2. Bagaimana proses sintesis nanoemulsi ekstrak daun kersen?
3. Bagaimana pengaruh variasi konsentrasi tween 80, waktu sonikasi dan konsentrasi ekstrak daun kersen terhadap ukuran partikel dan aktivitas antioksidan nanoemulsi?
4. Bagaimana karakteristik fisik, aktivitas antioksidan, dan aktivitas antibakteri nanoemulsi ekstrak daun kersen pada formulasi optimal?

1.4 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. Menganalisis aktivitas antioksidan ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura L.*) berdasarkan nilai IC_{50} ,
2. Menyintesis nanoemulsi ekstrak daun kersen,
3. Mengoptimasi formulasi nanoemulsi ekstrak daun kersen berdasarkan variasi konsentrasi tween 80, waktu sonikasi, dan konsentrasi ekstrak terhadap ukuran partikel dan aktivitas antioksidan,
4. Mengevaluasi karakteristik fisik, aktivitas antioksidan dan aktivitas antibakteri nanoemulsi ekstrak daun kersen pada formulasi optimal.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai potensi ekstrak daun kersen sebagai sumber antioksidan alami berdasarkan nilai IC_{50} .
2. Menjadi dasar dalam pengembangan formulasi nanoemulsi yang stabil melalui pengaturan konsentrasi tween 80, waktu sonikasi, dan konsentrasi ekstrak daun kersen.
3. Menghasilkan formulasi nanoemulsi optimum yang memiliki karakteristik fisik yang baik, aktivitas antioksidan tinggi serta daya hambat pertumbuhan bakteri yang kuat, sehingga berpotensi dikembangkan lebih lanjut dalam bidang pangan fungsional, kosmetik, maupun produk berbasis bahan alam.

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 (Merck), larutan Pb asetat (Merck), HCl (Merck), pereaksi Mayer, kloroform (Merck), minyak biji bunga matahari (Mazola), 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, vial, mikro pipet dan buret.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2025 hingga Februari 2026 di beberapa laboratorium yang mendukung tahapan penelitian. Kegiatan penelitian dilakukan beberapa Laboratorium Departemen Kimia, FMIPA yaitu, Laboratorium Biokimia, Laboratorium Radiasi, Laboratorium Kimia Fisika, Laboratorium Analitik, dan Laboratorium Terpadu. Adapun di Departemen Biologi, FMIPA yaitu, Laboratorium Botani. Kemudian Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains (LPPS), Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi, serta Laboratorium Kimia dan Bioproses-Sub Laboratorium Karakterisasi Kimia Badan Riset dan Inovasi Nasional.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Simplisia Daun Kersen (Situmorang et al., 2022)

Sampel daun kersen (*Muntingia calabura L.*) diperoleh dari Kabupaten Maros, Provinsi Sulawesi Selatan, Indonesia, dengan kondisi segar dan hijau dari pohon. Sampel daun dicuci bersih dengan air mengalir dan ditiriskan, selanjutnya dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada ruang terbuka selama beberapa hari hingga kering. Sampel yang telah kering digiling menggunakan blender hingga diperoleh serbuk simplisia kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat.

2.4.2 Ekstraksi Daun Kersen (Situmorang et al., 2022)

Ekstraksi daun kersen (*Muntingia calabura L.*) dilakukan menggunakan metode maserasi. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 300 g dimasukkan ke dalam toples kaca, kemudian ditambahkan etanol sebanyak 3000 mL dan ditutup rapat. Sampel dibiarkan dalam tempat yang gelap selama 24 jam dengan pengadukan sesekali. Ekstrak disaring menggunakan kertas saring hingga diperoleh filtrat pertama. Residu selanjutnya dilakukan remaserasi selama 2×24 jam dengan mengikuti langkah yang sama untuk mengoptimalkan proses ekstraksi. Filtrat yang diperoleh dari seluruh tahap maserasi

digabungkan, kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 55°C hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan persamaan (1) sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak (g)}}{\text{Berat Sampel (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4.3 Skirining Fitokimia Ekstrak Daun Kersen (Nortjie et al., 2022)

Uji Fenolik. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 1.000 ppm dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 4 tetes FeCl₃ 5%. Jika hasil uji positif ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi hijau atau biru kehitaman.

Uji Tanin. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 1.000 ppm dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 tetes FeCl₃ 1%. Jika hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau, merah kecoklatan, biru atau hitam pekat.

Uji Terpenoid dan steroid. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 1.000 ppm (dalam kloroform) dipipet sebanyak 1 mL, dikocok perlahan, dan dibiarkan selama beberapa menit. Setelah itu, ditambahkan reagen Liebermann-Burchard sebanyak 10 tetes. Jika hasil positif steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru, sedangkan triterpenoid ditandai dengan warna merah atau ungu.

Uji Saponin. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) konsentrasi 1.000 ppm dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 mL air hangat sambil dikocok selama 1 menit, lalu ditambahkan 2 tetes HCl 2 M. Busa yang terbentuk diamati; apabila busa tetap stabil hingga ±7 menit, maka ekstrak positif mengandung saponin.

Uji Flavonoid. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) konsentrasi 1.000 ppm dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL larutan Pb asetat. Jika hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna kuning.

Uji Alkaloid. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) konsentrasi 1.000 ppm dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, ditambahkan beberapa tetes HCl, kemudian ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 1 mL dan dihomogenkan. Jika hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih atau larutan yang berubah menjadi keruh.

2.4.4 Analisis Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kersen (Pertiwi et al, 2020)

Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM. Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 7,8864 mg dan dilarutkan dengan sedikit etanol dalam gelas kimia. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL dan dihomogenkan dengan etanol hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan DPPH 0,4 mM.

Pembuatan Larutan Induk Asam Askorbat 50 mg/L. Asam askorbat ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan sedikit etanol dalam gelas kimia. Larutan

dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dihipitkan dengan etanol hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan induk asam askorbat dengan konsentrasi 50 mg/L.

Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Daun Kersen 50 mg/L. Ekstrak kental daun kersen (*Muntingia calabura* L.) ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dalam 100 mL etanol, sehingga diperoleh larutan induk ekstrak dengan konsentrasi 50 mg/L.

Pembuatan larutan kontrol. Larutan DPPH 0,4 mM dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 4 mL etanol. Larutan diinkubasi selama 30 menit di tempat yang gelap, lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum.

Penentuan Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat. Larutan induk asam askorbat konsentrasi 50 mg/L dibuat menjadi 5 seri konsentrasi, yaitu 0,5; 1; 2; 4; dan 8 mg/L. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; dan 0,8 mL secara berturut-turut ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Setiap konsentrasi larutan ditambahkan dengan 1 mL DPPH 0,4 mM dan dicukupkan volumenya dengan etanol hingga 5 mL. Larutan diinkubasi selama 30 menit di tempat yang gelap, kemudian absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum.

Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kersen. Larutan induk ekstrak daun kersen 50 mg/L dibuat menjadi 5 seri konsentrasi, yaitu 0,5; 1; 2; 4; dan 8 mg/L. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; dan 0,8 mL secara berturut-turut ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Setiap konsentrasi larutan ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM dan dicukupkan volumenya dengan etanol hingga 5 mL. Larutan diinkubasi selama 30 menit di tempat yang gelap, kemudian absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum. Persentase inhibisi radikal DPPH dihitung menggunakan persamaan (2) berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol DPPH} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\% \quad (2)$$

Nilai IC_{50} ditentukan melalui persamaan regresi linear $y = ax + b$, dengan konsentrasi larutan uji sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Nilai IC_{50} dihitung menggunakan persamaan (3) berikut:

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

2.4.5 Formulasi Sediaan Nanoemulsi Ekstrak Daun Kersen (Klopcevska et al., 2023; Oliveira et al., 2023)

Nanoemulsi dibuat menggunakan metode emulsifikasi spontan. Ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) digunakan sebagai komponen bioaktif, minyak biji bunga matahari sebagai fase minyak, dan akuades sebagai fase air. Tween 80 digunakan sebagai surfaktan dan sorbitol sebagai kosurfaktan. Pada tahap awal, minyak biji bunga matahari, ekstrak daun kersen, tween 80, dan sorbitol dicampurkan menggunakan

magnetic stirrer dengan kecepatan 400 rpm pada suhu 50°C selama 30 menit hingga terbentuk fase minyak yang homogen. Selanjutnya, akuades ditambahkan secara tetes demi tetes ke dalam fase minyak menggunakan buret sambil diaduk secara konstan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 400 rpm pada suhu 50°C selama 30 menit. Setelah seluruh komponen tercampur homogen, emulsi yang terbentuk disonikasi menggunakan *ultrasonic bath* sesuai dengan variasi waktu sonikasi yang telah ditentukan. Proporsi masing-masing komponen serta variasi waktu sonikasi ditentukan berdasarkan desain eksperimental tipe Box–Behnken pada *Response Surface Methodology* (RSM) dengan tiga faktor, yaitu konsentrasi ekstrak, volume tween 80, dan waktu sonikasi sebagaimana disajikan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Formulasi sediaan nanoemulsi ekstrak daun kersen hasil desain eksperimental dengan RSM

StdOrder	Run Order	PtType	Blocks	Waktu Sonikasi (min)	Ekstrak (g)	Tween-80 (mL)
1	1	2	1	10	0	8
2	2	2	1	110	0	8
3	3	2	1	10	0,064	8
4	4	2	1	110	0,064	8
5	5	2	1	10	0,032	3
6	6	2	1	110	0,032	3
7	7	2	1	10	0,032	13
8	8	2	1	110	0,032	13
9	9	2	1	60	0	3
10	10	2	1	60	0,064	3
11	11	2	1	60	0	13
12	12	2	1	60	0,064	13
13	13	0	1	60	0,032	8
14	14	0	1	60	0,032	8
15	15	0	1	60	0,032	8

2.4.6 Optimasi Formulasi Nanoemulsi Menggunakan *Respon Surface Methodology* (RSM) Berdasarkan %Inhibisi Aktivitas Antioksidan (Oliveira et al., 2023; Rocha-Filho dan Maruno, 2025)

Optimasi formulasi nanoemulsi dilakukan menggunakan metode *Respon Surface Methodology* (RSM) untuk memperoleh komposisi formulasi optimum dengan respon berupa % inhibisi aktivitas antioksidan. Faktor yang dioptimasi meliputi komponen penyusun nanoemulsi dan parameter proses pembuatan. Desain percobaan RSM menghasilkan 15 kombinasi formulasi yang selanjutnya digunakan sebagai dasar pembuatan nanoemulsi. Setiap formulasi dibuat sesuai dengan komposisi hasil desain percobaan, kemudian dilakukan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM. Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 7,8864 mg dan dilarutkan dengan sedikit etanol dalam gelas kimia. Larutan dipindahkan ke dalam labu

ukur 50 mL dan dihipitkan dengan etanol hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan DPPH 0,4 mM.

Pembuatan Larutan Kontrol. Larutan DPPH 0,4 mM dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 4 mL etanol. Larutan diinkubasi selama 30 menit di tempat yang gelap, lalu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum.

Penentuan Aktivitas Antioksidan Nanoemulsi. Sampel nanoemulsi dari masing-masing formulasi disiapkan pada konsentrasi 4% (w/v) dengan cara menimbang nanoemulsi sebanyak 0,4 g kemudian melarutkannya dalam 10 mL etanol. Selanjutnya, sampel nanoemulsi dipipet sebanyak 4 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM. Campuran diinkubasi selama 30 menit dalam kondisi gelap, kemudian absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum. Aktivitas antioksidan nanoemulsi dinyatakan sebagai % inhibisi radikal DPPH yang dihitung menggunakan persamaan (4) berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol DPPH} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\% \quad (4)$$

Data % inhibisi dari seluruh formulasi dianalisis menggunakan software RSM untuk memperoleh model matematis hubungan antara faktor formulasi dengan respons %inhibisi. Model yang dihasilkan digunakan untuk menentukan formulasi optimum berdasarkan nilai desirability tertinggi, yang selanjutnya digunakan untuk pengujian karakterisasi fisik dan stabilitas nanoemulsi.

2.4.7 Karakterisasi Fisik Nanoemulsi

Analisis pH. Pengukuran pH formulasi nanoemulsi dilakukan menggunakan pH meter digital. Alat dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan *buffer* standar pH 7 (netral) dan pH 4 (asam). Selanjutnya, elektroda pH meter dicelupkan ke dalam sampel nanoemulsi hingga diperoleh nilai pH yang stabil (Dwivedi et al., 2025).

Analisis Ukuran Partikel, PDI, dan Potensial Zeta. Ukuran partikel, indeks polidispersitas (PDI), dan zeta potensial nanoemulsi diukur menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) yang bekerja berdasarkan prinsip *Dynamic Light Scattering* (DLS). Sampel nanoemulsi sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian kuvet ditempatkan pada ruang sampel alat dan dilakukan pengukuran sesuai dengan parameter yang telah ditetapkan (Azzahra et al., 2025).

Uji Viskositas. Uji viskositas dilakukan menggunakan viskometer Brookfield pada suhu 25 °C dengan kecepatan *shear* 6 rpm menggunakan spindel nomor 61, 62, dan 63 dengan perulangan tiga kali (triplo) (Arianto dan Cindy, 2019).

2.4.8 Uji Stabilitas Fisik Nanoemulsi dengan Sentrifugasi (Dwivedi et al., 2025).

Uji stabilitas nanoemulsi dilakukan menggunakan metode sentrifugasi untuk mengevaluasi kestabilan terhadap gaya mekanik. Sampel nanoemulsi dimasukkan ke

dalam tabung sentrifus dan disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 4.000 rpm. Setelah proses sentrifugasi, nanoemulsi diamati terhadap adanya pemisahan fase, pembentukan krim, atau terbentuknya endapan.

2.4.9 Analisis Menggunakan *Thermogravimetric Analysis* (TGA) (Rousta et al., 2025)

Analisis TGA sampel nanoemulsi dilakukan dengan *Simultaneous Thermal Analyzers* (STA) 8000 di bawah atmosfer nitrogen. Sampel nanoemulsi ditimbang sebanyak 1 mg dan ditempatkan dalam wadah aluminium. Sampel dipanaskan dengan laju 10°C/menit dari suhu 30 °C hingga 600 °C selama 45 menit dalam lingkungan gas nitrogen dengan laju alir 100 mL/menit.

2.4.10 Analisis Aktivitas Antioksidan Formulasi Optimum (Rocha-Filho dan Maruno, 2025)

Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM. Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 7,8864 mg dan dilarutkan dengan sedikit etanol dalam gelas kimia. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL dan dihindarkan dengan etanol hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan DPPH 0,4 mM.

Pembuatan Larutan Kontrol. Larutan DPPH 0,4 mM dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 4 mL etanol. Larutan diinkubasi selama 30 menit di tempat yang gelap, lalu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum.

Penentuan Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat. Asam askorbat ditimbang sebanyak 0,4 g dan dilarutkan dalam 10 mL etanol, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 4% (w/v). Larutan dipipet sebanyak 4 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM. Larutan diinkubasi selama 30 menit di tempat yang gelap, kemudian absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum.

Penentuan Aktivitas Antioksidan Nanoemulsi. Sediaan nanoemulsi formulasi optimum ditimbang sebanyak 0,4 g dan dilarutkan dalam 10 mL etanol, sehingga diperoleh konsentrasi 4% (w/v). Sampel dipipet sebanyak 4 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM. Larutan diinkubasi selama 30 menit di tempat yang gelap, kemudian absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum. Persentase inhibisi radikal DPPH dihitung menggunakan persamaan (5) berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol DPPH} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100 \quad (5)$$

2.4.11 Uji Antibakteri Nanoemulsi Formulasi Optimum (El Karkouri et al., 2021)

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram pada media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) dalam cawan Petri berdiameter 90 mm. Suspensi

bakteri disiapkan dalam larutan garam fisiologis steril hingga mencapai kekeruhan yang sesuai, kemudian diinokulasikan secara merata pada permukaan media agar untuk memperoleh pertumbuhan bakteri yang homogen. Cakram kertas saring steril berdiameter 6 mm diletakkan secara hati-hati di atas permukaan media yang telah diinokulasi. Selanjutnya, sebanyak 5 μ L sampel nanoemulsi ditetaskan pada masing-masing cakram uji menggunakan mikropipet steril. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram diukur menggunakan alat ukur dalam satuan milimeter.