

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi sampel

Daun kayu lubang diperoleh dari Gunung Mangkol, Bangka Tengah. Sampel dipilih untuk memisahkan kotoran atau bahan asing yang masih menempel. Kemudian keringkan sampel di bawah sinar matahari langsung selama 2 hari. Pengeringan ini dilakukan untuk mengurangi kadar air yang terkandung di dalam sampel, sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan sampel oleh mikroorganisme. Setelah itu, haluskan sampel menggunakan blender dan disaring dengan saringan mesh 80 hingga diperoleh serbuk halus. Tujuan penghalusan sampel yaitu untuk memperluas kontak sampel dengan pelarut agar dapat terekstraksi secara maksimal dalam pelarut. Berdasarkan Tabel 4.1 diperoleh persentase nilai susut pengeringan daun kayu lubang yaitu sebesar 75%, yang menunjukkan bahwa semakin besar nilai susut pengeringan yang diperoleh semakin menurunnya kadar air yang terdapat didalam daun kayu lubang.

Tabel 4.1 Persentase nilai susut pengeringan daun kayu lubang

| Bobot basah (gr) | Bobot kering (gr) | Nilai susut pengeringan b/b (%) |
|------------------|-------------------|---------------------------------|
| 3000 | 750 | 75 |

4.2 Ekstraksi sampel

Ekstraksi merupakan metode pemisahan senyawa aktif yang terdapat dalam suatu sampel dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Khopkar, 1984). Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi karena dapat meminimalisir kerusakan senyawa aktif yang tidak tahan terhadap pemanasan pada suatu sampel. Proses maserasi dengan cara merendam 500 gram serbuk halus dalam 5L pelarut aseton. Aseton adalah pelarut semi polar yang mampu menarik senyawa polar ataupun nonpolar yang terkandung pada suatu sampel (Troy, 2005). Maserasi dilakukan dalam waktu 3 x 24 jam disertai pengadukan untuk memaksimalkan maserat yang diperoleh karena semakin lama waktu perendaman yang dilakukan semakin banyak senyawa bioaktif yang diperoleh. Pengadukan bertujuan untuk menghomogenkan antara pelarut dengan sampel serta meningkatkan tumbukan antar

molekul pelarut dengan sampel. Setelah itu, dilakukan penyaringan menggunakan pompa vakum dengan tujuan untuk mempermudah proses penyaringan. Prinsip dari alat ini untuk memperkecil tekanan di dalam erlenmeyer sehingga dapat memperbesar tekanan disekitar erlenmeyer, tekanan dari luar dapat mendorong filtrat masuk ke dalam erlenmeyer. Kemudian filtrat di *rotary evaporator vacuum* pada suhu 60 °C untuk menguapkan pelarut sehingga diperoleh ekstrak pekat.

Nurhayati *et al.*, (2009) menyatakan jika nilai rendemen besar menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang dihasilkan banyak. Budiyanto (2015) menyatakan jika semakin besar rendemen ekstrak maka kandungan zat yang tertarik pada suatu sampel semakin banyak. Penelitian Dewatisari, (2019) pada daun lidah mertua (*Sansevieria trifasciata*) yang diekstraksi menggunakan pelarut aseton menghasilkan rendemen sebesar 6,88%. Sedangkan pada daun kayu lubang menghasilkan rendemen sebesar 8,64%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pada daun kayu lubang menghasilkan senyawa bioaktif yang lebih banyak dibandingkan daun lidah mertua.

Tabel 4.2 Persentase rendemen ekstrak pekat daun kayu lubang

| Serbuk halus (gr) | Ekstrak pekat (gr) | Rendemen b/b (%) |
|-------------------|--------------------|------------------|
| 500 | 43,1936 | 8,64 |

4.3 Skrining fitokimia

Tahap awal untuk mengetahui senyawa aktif yang terdapat didalam tumbuhan yang diteliti. Berdasarkan Tabel 4.3 hasil skrining fitokimia melalui reaksi pengujian warna menggunakan suatu pereaksi.

Tabel 4.3 Hasil skrining fitokimia ekstrak daun kayu lubang

| No | Senyawa aktif | Hasil | Keterangan |
|----|--------------------------|-------------------|------------|
| 1 | Alkaloid | | |
| | (a) Pereaksi Dragendroft | Jingga | - |
| | (b) Pereaksi Mayer | Kuning kehijauan | - |
| | (c) Pereaksi Wagner | Jingga kecoklatan | - |
| 2 | Flavonoid | Jingga, ada busa | + |
| 3 | Fenolik | Biru kehitaman | + |
| 4 | Saponin | Tidak ada busa | - |
| 5 | Tanin | Hijau kehitaman | + |

Keterangan :

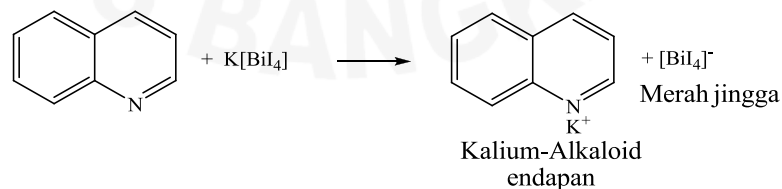
(+) Terdapat senyawa bioaktif

(-) Tidak terdapat senyawa bioaktif

Berdasarkan Tabel 4.3 dari hasil skrining fitokimia ekstrak daun kayu lubang mengandung senyawa flavonoid, fenolik, dan tanin. Sedangkan pada senyawa alkaloid dan saponin menunjukkan hasil negatif.

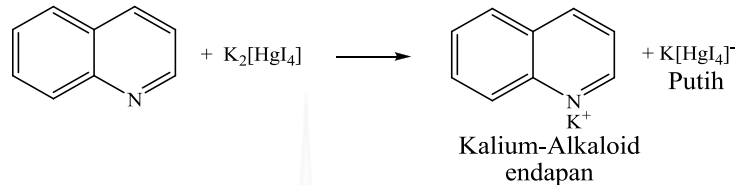
a. Pengujian alkaloid

Identifikasi senyawa alkaloid pada ekstrak daun kayu lubang dilakukan dengan penambahan H_2SO_4 . Fungsi H_2SO_4 yaitu untuk membentuk garam alkaloid, karena alkaloid yang bersifat basa dapat larut dalam pelarut yang bersifat asam. Kemudian diuji dengan pereaksi yaitu Dragendroff, Mayer, dan Wagner. Reaksi yang terjadi pada pengujian alkaloid dengan pereaksi Dragendroff, Meyer, dan Wagner dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



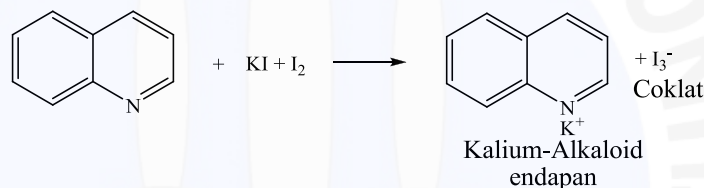
Gambar 4.1 Reaksi alkaloid dengan pereaksi Dragendroff (Setyowati *et al.*, 2014)

Hasil positif alkaloid pereaksi Dagendroff menunjukkan jika terbentuk endapan merah jingga yang menandakan nitrogen yang digunakan dapat membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam (Miroslav, 1971).



Gambar 4.2 Reaksi alkaloid dengan pereaksi Mayer (Illing *et al.*, 2017)

Hasil positif alkaloid menunjukkan adanya endapan putih pada pereaksi Mayer. Alkaloid memiliki pasangan elektron bebas pada atom nitrogen sehingga dapat membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam (McMurry, 2004). Atom nitrogen pada alkaloid bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kalium-alkaloid kompleks yang mengendap.

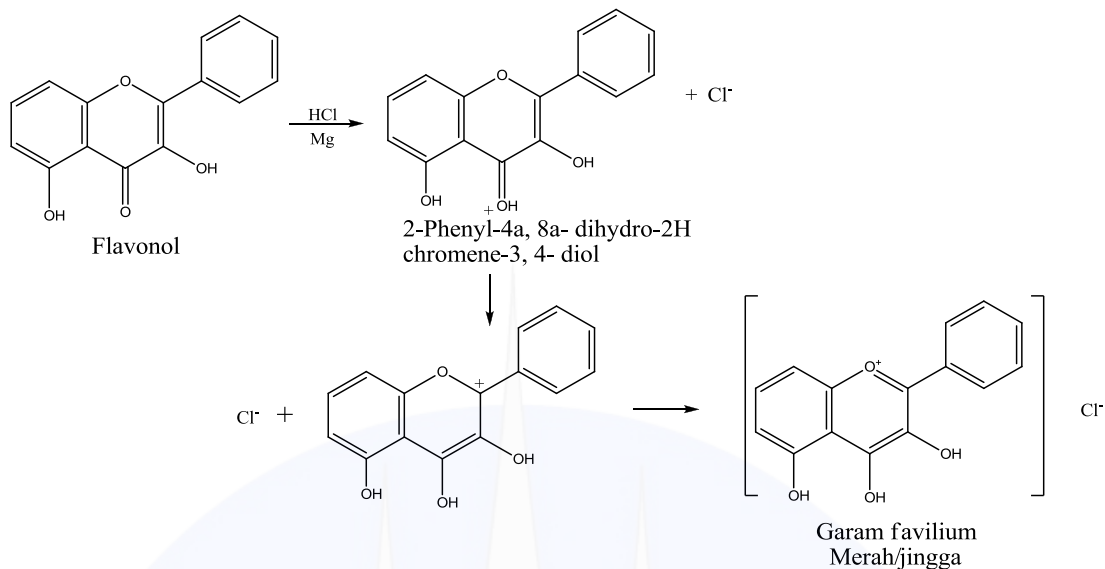


Gambar 4.3 Reaksi alkaloid dengan pereaksi Wagner (Setyowati *et al.*, 2014)

Hasil positif alkaloid membentuk endapan coklat pada pereaksi Wagner. Endapan coklat tersebut merupakan iodin yang bereaksi dengan ion I^- dari kalium iodida menghasilkan ion I_3^- yang berwarna coklat. Ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen membentuk kalium-alkaloid kompleks yang mengendap. Pengujian alkaloid pada ekstrak daun kayu lubang tidak menghasilkan endapan, sehingga menunjukkan tidak adanya senyawa alkaloid.

b. Pengujian flavonoid

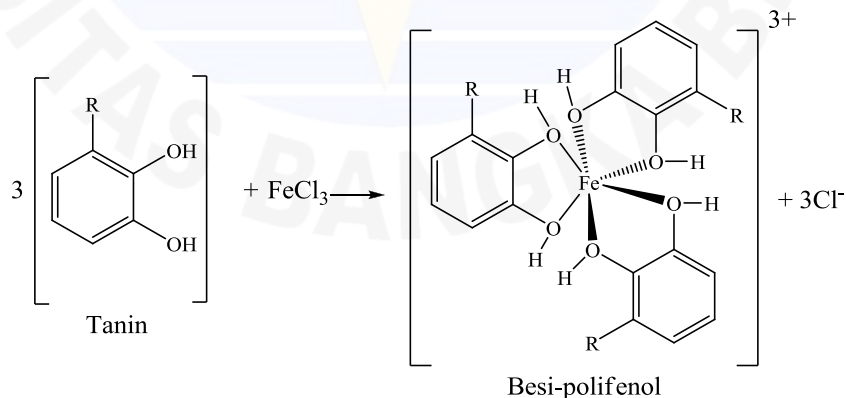
Pengujian flavonoid menunjukkan hasil positif dengan menambahkan serbuk Mg dan HCl pekat ke dalam ekstrak daun kayu lubang. Hal ini terjadi perubahan warna menjadi jingga dan terdapat busa sehingga terjadinya reduksi flavonoid oleh logam Mg yang membentuk garam flavilium. Reaksi flavonoid membentuk garam favilium dapat dilihat pada Gambar 4.4 dibawah ini :



Gambar 4.4 Reaksi flavonoid membentuk garam flavilium (Achmad, 1986)

c. Pengujian fenol/tanin

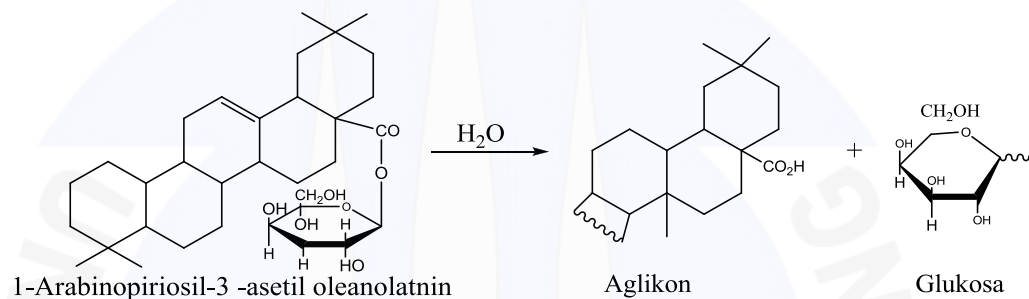
Hasil pengujian tanin menggunakan logam transisi Fe. Logam Fe sering digunakan dalam reaksi kompleksasi karena lebih mudah membentuk senyawa kompleks. Hasil positif setelah ditambahkan FeCl₃ terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru kehitaman. Larutan FeCl₃ ini digunakan untuk mengetahui kandungan gugus fenol dalam suatu sampel. Perubahan warna hijau kehitaman atau biru kehitaman disebabkan tanin (senyawa polifenol) membentuk senyawa kompleks dengan FeCl₃. Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 4.5 dibawah ini:



Gambar 4.5 Reaksi tanin dengan FeCl₃ (Perron dan Brugmaghim, 2009)

d. Pengujian saponin

Pengujian saponin dilakukan dengan uji busa. Busa yang terbentuk menunjukkan adanya glikosida yang mampu membentuk busa dalam air. Glikosida menjadi senyawa aglikon dan glukosa (Rusdi, 1990). Adanya kombinasi struktur senyawa penyusun dari gugus steroid sebagai gugus nonpolar dan rantai samping polar yang larut dalam air sehingga timbulnya busa (Naoumkina *et al.*, 2010). Hasil pengujian saponin terhadap ekstrak daun kayu lubang negatif karena tidak menghasilkan busa. Reaksi yang terjadi dilihat pada Gambar 4.6 dibawah ini :



Gambar 4.6 Reaksi hidrolisis saponin dalam air (Marliana *et al.*, 2005)

4.4 Pembuatan nanoemulsi

Pada penelitian ini sediaan nanoemulsi dilakukan dengan metode energi tinggi. Formulasi konsentrasi dari komponen pembuatan sediaan nanoemulsi ini dilakukan uji pendahuluan untuk menentukan jumlah komponen sediaan nanoemulsi yang baik dan stabil. Dalam pembuatan sediaan nanoemulsi ekstrak daun kayu lubang dilarutkan dalam etil asetat dengan konsentrasi 5% (Ha *et al.*, 2015). Kemudian larutan ekstrak divariasikan konsentrasi dengan cara dipipet sebanyak 1 mL dan 3 mL dan masing-masing larutan dimasukkan ke dalam gelas kimia. Pada masing-masing gelas kimia ditambahkan VCO sebanyak 3 mL dan 12 mL tween 80. Campuran diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 3.500 rpm selama 5 menit. Tujuan pengadukan untuk menghindari penggabungan fase minyak yang dapat menyebabkan antar permukaan menjadi tidak stabil dan menghasilkan ukuran partikel yang beranekaragam. Dalam pembuatan sediaan nanoemulsi kecepatan pengadukan sangat penting karena semakin cepat pengadukan semakin kecil ukuran droplet akan

dihasilkan. Setelah 5 menit campuran ditambahkan etanol 96% sebanyak 4 mL dan akuades sedikit demi sedikit sampai campuran homogen selama 30 menit. Tujuan *stirer* agar campuran tersebut dapat tercampur merata. Selanjutnya campuran dihomogenizer dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit sampai campuran menjadi jernih. Tujuan homogenizer yaitu agar campuran nanoemulsi dapat homogen secara merata sehingga menghasilkan sediaan nanoemulsi yang jernih dan transparan. Semakin tinggi kecepatan homogenizer dan semakin lama waktu putaran yang digunakan dapat meningkatkan intensitas sentuhan antar partikel sehingga ukuran droplet sediaan nanoemulsi yang dihasilkan semakin kecil. Kemudian disonikasi dengan sonikator tipe *bath* selama 20 menit pada suhu 37°C sambil sesekali diaduk. Tujuan sonikasi yaitu untuk memecahkan ukuran partikel menjadi lebih kecil dan seragam (Du *et al.*, 2016). Selanjutnya sediaan nanoemulsi yang dihasilkan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator vacuum* untuk menghilangkan larutan etil asetat yang terdapat didalam sediaan nanoemulsi.

4.5 Hasil uji evaluasi nanoemulsi

Formulasi sediaan nanoemulsi dilakukan beberapa uji evaluasi untuk mengetahui karakteristik dari sediaan nanoemulsi tersebut.

Tabel 4.4 Hasil karakteristik formulasi nanoemulsi

| Karakteristik | Pengamatan | | |
|------------------|--|---|--|
| | Blanko | N1 | N3 |
| Organoleptis | Tidak terpisah Kurang jernih Putih | Tidak terpisah Kurang jernih Kuning pucat | Tidak terpisah Kurang jernih Hijau |
| pH | 6,5 | 5,9 | 5,8 |
| Stabilitas fisik | Homogen | Homogen | Homogen |
| % transmittan | 70,95 | 64,11 | 34,63 |
| Viskositas | - | 0,1033 mPa·s | 0,0941 mPa·s |
| Bobot jenis | 1,012 g/mL | 1,013 g/mL | 1,012 g/mL |

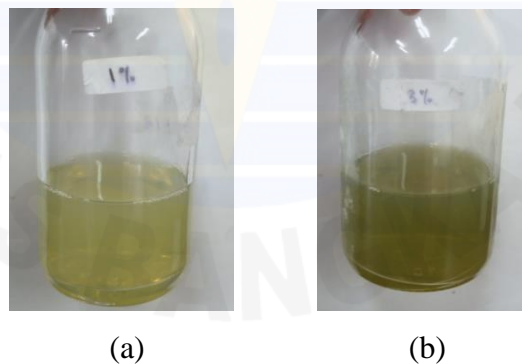
Keterangan : N1 : Nanoemulsi 20 mg

N3 : Nanoemulsi 60 mg

Berdasarkan Tabel 4.4 hasil karakteristik formulasi sediaan nanoemulsi ekstrak daun kayu lubang. Dari pengamatan uji organoleptis secara visual formulasi sediaan nanoemulsi blanko, N1 dan N3 belum memenuhi kriteria sebagai sediaan nanoemulsi, hal ini berkaitan dengan formulasi sediaan nanoemulsi yang terlihat kurang jernih dan tidak terjadi pemisahan fase. Hasil pengamatan organoleptis ini dipengaruhi oleh kandungan klorofil yang terdapat pada daun kayu lubang sehingga menyebabkan warna larutan semakin pekat dengan penambahan jumlah ekstrak yang semakin banyak.

Pengukuran pH sediaan nanoemulsi yang dihasilkan telah memenuhi nilai pH pada kulit wajah (5,4-5,9), namun hasil pengukuran pH pada formulasi N3 mengalami penurunan. Hal ini disebabkan, semakin banyak jumlah ekstrak yang digunakan akan menghasilkan nilai pH semakin kecil yang menandakan sediaan nanoemulsi menjadi lebih asam. pH yang baik untuk kulit wajah yaitu tidak boleh terlalu asam atau basa. Jika pH terlalu asam maka dapat mengiritasi kulit dan juga jika terlalu basa maka dapat menyebabkan kulit bersisik (Yani, 2016).

Uji stabilitas fisik dilakukan untuk mengetahui kestabilan pada sediaan nanoemulsi yang dihasilkan. Hasil uji stabilitas fisik formulasi sediaan nanoemulsi dilihat pada Gambar 4.7 dan Tabel 4.4.



Gambar 4.7 Hasil sentrifugasi (a) N1, (b) N3

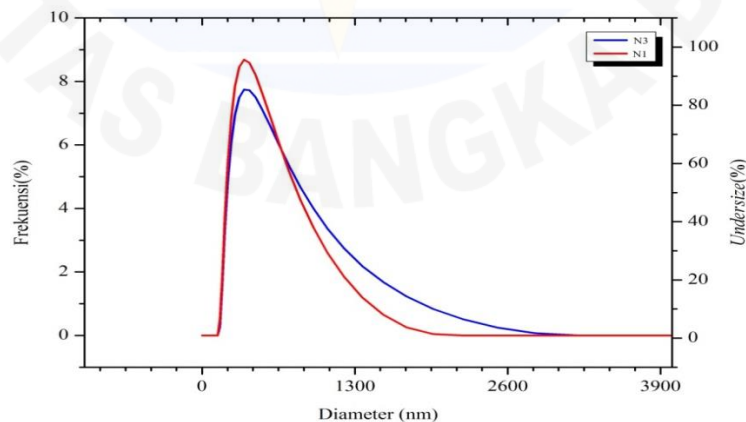
Uji stabilitas fisik menghasilkan sediaan nanoemulsi yang homogen dengan tidak terjadinya pemisahan fase pada ketiga formulasi nanoemulsi. Uji ini bertujuan untuk mengetahui efek guncangan yang dapat mempengaruhi tampilan fisik sediaan

nanoemulsi yang dihasilkan dengan cara mengamati pemisahan fase setelah disentrifugasi.

Pengukuran persen transmittan dilakukan untuk mengukur absorbansi pada sampel. Hal ini berkaitan dengan konsentrasi ekstrak yang digunakan, semakin besar konsentrasi ekstrak yang digunakan semakin kecil nilai persen transmittan yang dihasilkan. Pada penelitian ini, indikator kejernihan sediaan nanoemulsi dapat diamati dari hasil persen transmittan yang dihasilkan. Kejernihan sediaan nanoemulsi yang dihasilkan memiliki nilai persen transmittan mendekati 90-100% secara visual jernih dan transparan (Zulfa *et al.*, 2014). Dari hasil pengukuran persen transmittan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm menghasilkan nilai persen transmittan sediaan nanoemulsi N1 dan N3 yaitu 64,11% dan 34,6%.

Uji viskositas dilakukan untuk melihat sifat alir dari cairan. Semakin besar massa jenis suatu cairan maka semakin besar kekuatan yang digunakan untuk mengalir. Berdasarkan Tabel 4.4 hasil uji viskositas sediaan nanoemulsi N1 dan N3 yaitu 0,1033 mPa·s dan 0,0941 mPa·s, hasil ini tidak menunjukkan perubahan yang jauh berbeda. Hal ini dikarenakan hasil ukuran nanoemulsi dan massa jenis yang diperoleh berbanding lurus dengan nilai viskositas yang dihasilkan.

Pengukuran ukuran droplet formulasi sediaan nanoemulsi dilakukan di Laboratorium ILRC UI Depok, menggunakan alat PSA (*Particel Size Analyzer*) tipe Horiba scientific SZ-100.



Gambar 4.8 Grafik hasil analisis PSA

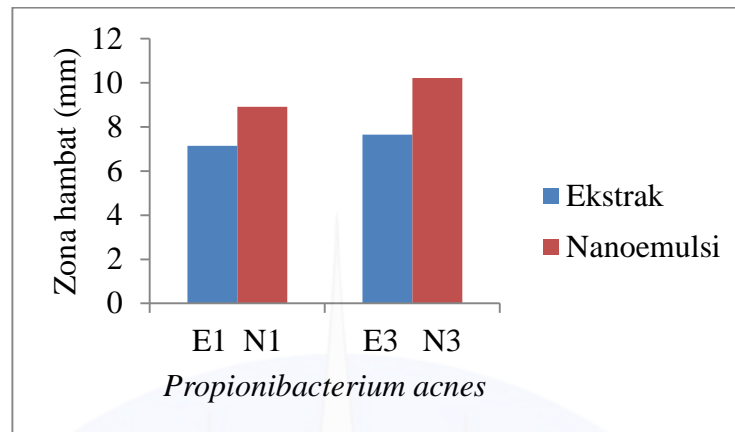
Tabel 4.5 Diameter dan PI nanoemulsi

| Nanoemulsi | Diameter (nm) | PI |
|------------|---------------|-------|
| N1 | 332,1 | 0,287 |
| N3 | 326,7 | 0,409 |

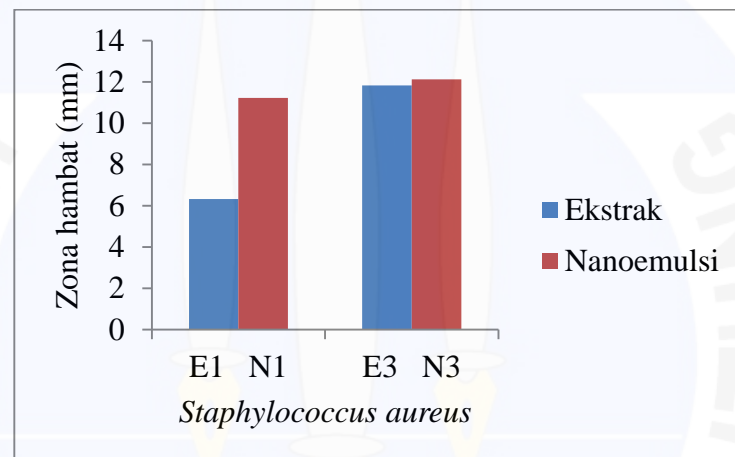
Berdasarkan Gambar 4.8 dan Tabel 4.5 dan hasil pengukuran ukuran droplet sediaan nanoemulsi N1 dan N3 yaitu 332,1 nm dan 326,7 nm memenuhi kisaran ukuran droplet sediaan nanoemulsi. Hasil ukuran nanoemulsi tidak mengalami perubahan yang signifikan antara sediaan nanoemulsi N1 dan N3. Hal ini dikarenakan, jumlah konsentrasi ekstrak yang digunakan sama sehingga ukuran nanoemulsi yang dihasilkan tidak mengalami perbedaan yang jauh antara sediaan nanoemulsi N1 dan N3. Ukuran droplet nanoemulsi yang kecil memiliki luas permukaan yang besar sehingga lebih mudah menyerap ke dalam jaringan kulit.

Indeks polidispersitas merupakan ukuran distribusi massa molekul dalam sampel tertentu. Indeks polidispersitas yang mendekati nol menunjukkan keseragaman ukuran droplet pada sediaan nanoemulsi (Stephanie, 2015). Hasil nilai indeks polidispersitas sediaan nanoemulsi N1 dan N3 yaitu 0,409 dan 0,287 yang menunjukkan pada sediaan nanoemulsi N3 memiliki indeks polidispersitas yang lebih kecil dengan keseragaman ukuran droplet nanoemulsi yang lebih baik dibandingkan sediaan nanoemulsi N1. Hal ini dipengaruhi oleh ukuran droplet nanoemulsi yang dihasilkan.

4.6 Hasil uji aktivitas antibakteri



(a)



(b)

Keterangan : E1 = Ekstrak 20 mg, E3 = Ekstrak 60 mg

N1 = Nanoemulsi 20 mg, N3 = Nanoemulsi 60 mg

Gambar 4.9 Diagram zona hambat (a) *Propionibacterium acnes*, (b) *Staphylococcus aureus*

Berdasarkan Gambar 4.9 menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada ekstrak dan nanoemulsi yang dapat menghambat aktivitas hidup bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus*. Pada pengujian antibakteri kontrol negatif yang digunakan yaitu DMSO dan blanko nanoemulsi. Hasil pengujian kontrol negatif tidak terbentuk zona hambat. Kontrol negatif digunakan untuk mengetahui pengaruh pelarut terhadap aktivitas hidup bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus*

aureus. Sedangkan kontrol positif yaitu klindamisin, digunakan sebagai pembandingan dari ekstrak daun kayu lubang. Hasil kontrol positif yaitu adanya zona hambat yang terbentuk yang tergolong sangat kuat yaitu 25,19 mm (*P. acnes*) dan 44,70 mm (*S. aureus*). Ekstrak daun kayu lubang menghasilkan zona hambat yang tergolong sedang yaitu 7,14 mm, 7,66 mm (*P. acnes*) dan sedang-kuat yaitu 6,33 mm, 11,83 mm (*S. aureus*) yang digunakan sebagai pembandingan dari sediaan nanoemulsi. Pada sediaan nanoemulsi menghasilkan zona hambat yang tergolong sedang-kuat yaitu 8,92 mm, 10,22 mm (*P. acnes*) dan kuat yaitu 11,22 mm, 12,15 mm (*S. aureus*). Pada bakteri *P. acnes* dan *S. aureus* menunjukkan perbedaan sensitivitas terhadap bahan uji (ekstrak dan nanoemulsi), dimana bakteri *S. aureus* lebih kuat dibandingkan *P. acnes*. Hal ini dikarenakan bakteri *S. aureus* memiliki faktor koagulase yang menyebabkan peptidoglikan pada dinding sel bakteri lebih mudah menggumpal sehingga bakteri *S. aureus* lebih mudah dihambat dibandingkan bakteri *P. acnes* (Jawetz *et al.*, 1996). Sehingga dapat disimpulkan bahwa sediaan nanoemulsi N3 memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri jerawat yang baik dibandingkan sediaan nanoemulsi N1.

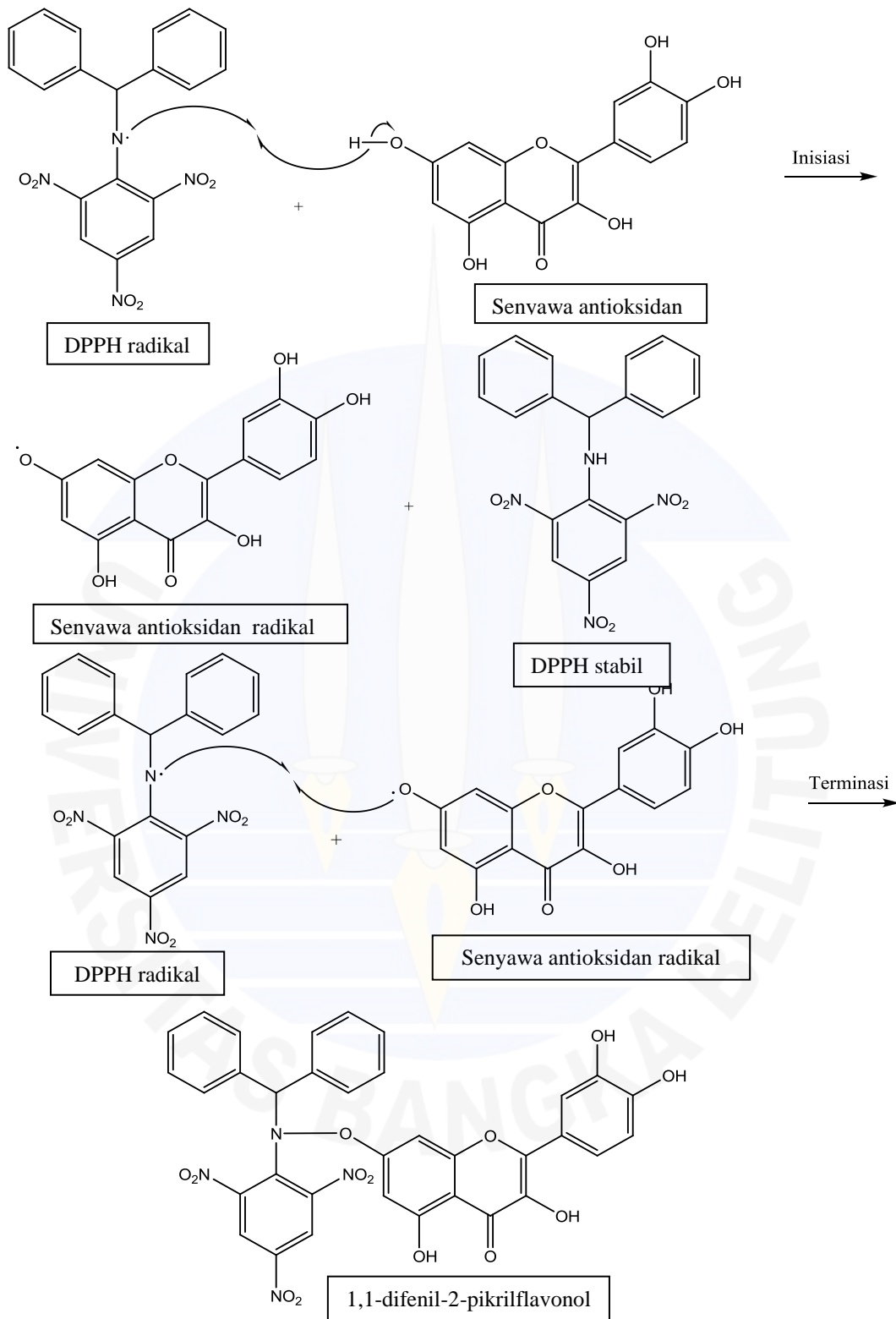
Hasil zona hambat pada sediaan nanoemulsi menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan ekstrak. Hal ini disebabkan, ukuran nano yang dihasilkan dapat menembus membran sel bakteri, karena memiliki permukaan yang luas, stabil, dan lebih reaktif sehingga mampu membuat membran sel bakteri menjadi tidak stabil dan menyebabkan sel bakteri menjadi rapuh dan mati (Pelczar dan Chan, 1988). Selain itu juga, senyawa bioaktif yang terdapat dalam daun kayu lubang seperti flavonoid, fenol, dan tanin juga mampu menghambat aktivitas hidup bakteri. Senyawa flavonoid yaitu menghambat aktivitas hidup bakteri gram positif seperti *P. acnes* dan *S. aureus* yang merupakan bakteri yang memiliki dinding sel yang bersifat polar. Lapisan peptidoglikan yang bersifat polar lebih mudah tembus oleh senyawa flavonoid (Suerni, 2013). Senyawa flavonoid akan menembus membran sel bakteri dan mengakibatkan sel dinding bakteri menjadi rusak dengan cara berikatan dengan protein fungsional sel dan DNA (Sabir, 2005).

Senyawa fenolik berinteraksi langsung dengan sel dinding bakteri, apabila konsentrasi yang digunakan kecil dapat mendenaturasi protein dan apabila

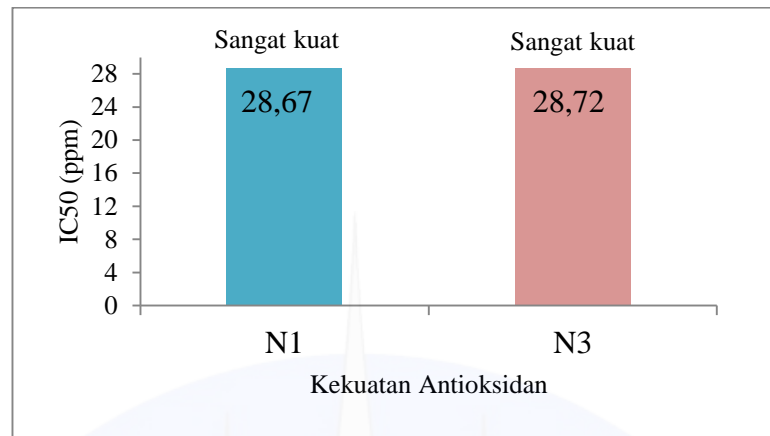
konsentrasi yang digunakan besar dapat mengakibatkan koagulasi protein sehingga sel bakteri mati karena protein terdenaturasi dan terjadi kerapuhan pada sel dinding bakteri (Pelczar dan Chan, 1986). Sedangkan senyawa tanin merupakan golongan polifenol yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri, tanin dapat mengerutkan sel dinding atau sel membran dengan merusak permeabilitas sel bakteri sehingga aktivitas hidup bakteri tidak dapat dilakukan dan menyebabkan pertumbuhan bakteri terhambat serta mati (Ajizah, 2004). Selain itu, tanin mempunyai sifat untuk menginaktifkan adhesin sehingga pada sel inang bakteri tidak dapat melekat dan menginaktifkan enzim protease. Tanin juga menambah toksisitas pada bakteri dengan mendestruksi materi genetik pada bakteri (Sujatmiko, 2014).

4.7 Hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH

Pengujian antioksidan ini dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Radikal bebas DPPH memiliki elektron yang tidak berpasangan yang memberikan warna ungu pada larutan. Perubahan warna ungu menjadi kuning apabila elektron telah berpasangan. Perubahan intensitas warna karena adanya perendaman radikal bebas dari reaksi pada molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul suatu senyawa. Mekanisme reaksi DPPH dengan antioksidan dapat dilihat pada Gambar 4.10 dibawah ini :



Gambar 4.10 Mekanisme Reaksi DPPH dengan Antioksidan (Molynuex, 2004).



Gambar 4.11 Diagram nilai IC₅₀ nanoemulsi daun kayu lubang

Berdasarkan Gambar 4.11 menunjukkan nilai IC₅₀ sediaan nanoemulsi N1 dan N3 berturut-turut yaitu 28,67 ppm dan 28,72 ppm masuk ke dalam spesifik antioksidan yang tergolong sangat kuat. Suatu senyawa secara spesifik memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat jika nilai (IC₅₀ ≤ 50 ppm), kuat (IC₅₀ 50-100 ppm), sedang (IC₅₀ 100-150 ppm), lemah (IC₅₀ 150-200 ppm), dan sangat lemah (IC₅₀ > 200 ppm) (Molyneux, 2004). Nilai IC₅₀ sediaan nanoemulsi yang dihasilkan tidak mengalami perbedaan yang signifikan dari kedua formulasi nanoemulsi. Hal ini menunjukkan bahwa variasi konsentrasi ekstrak daun kayu lubang tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas antioksidan pada sediaan nanoemulsi, ini dikarenakan ukuran nanoemulsi N1 dan N3 yang dihasilkan tidak jauh berbeda. Selain itu juga, kandungan senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak memiliki konsentrasi yang sama sehingga tidak memberikan pengaruh yang besar terhadap nilai IC₅₀ yang dihasilkan dari sediaan nanoemulsi N1 dan N3.

Adanya aktivitas antioksidan yang terdapat dalam sediaan nanoemulsi dipengaruhi oleh senyawa bioaktif yang terdapat pada daun kayu lubang seperti flavonoid. Flavonoid mengandung gugus fenolik banyak terdapat pada jaringan tumbuhan. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antioksidan secara langsung dan tidak langsung. Flavonoid secara langsung dapat mendonorkan atom hidrogen sehingga dapat menstabilkan radikal bebas yang bersifat reaktif dan bertindak sebagai penangkal radikal bebas secara langsung (Aurora *et al.*, 1998). Flavonoid juga dapat

berfungsi sebagai penangkal radikal bebas sehingga dapat meminimalisir efek kerusakan pada sel dan molekul-molekul tubuh seperti DNA, membran sel, protein, lipid peroksida, dan penuaan dini (Djajadisastra, 2009). Tanin merupakan senyawa pereduksi yang baik dalam menghambat reaksi oksidasi dengan cara mendonorkan atom hidrogen sebagai peredaman radikal DPPH, sehingga radikal bebas menjadi lebih stabil dengan adanya resonansi yang terjadi (Mabrurroh, 2015).

