

Formulasi Liposom Ekstrak Etanol Daun Mangrove *Sonneratia alba* dan Uji Aktivitas Antiradikal Bebas

Dhiya'ulfitri, Windah Anugrah Subaidah, Lina Permatasari

Abstrak : Kulit merupakan lapisan terluar tubuh yang menjadi pelindung utama dari paparan radiasi sinar ultraviolet. Hal tersebut menyebabkan kulit rentan mengalami kerusakan, salah satunya akibat stres oksidatif. Kondisi tersebut dapat diatasi dengan penggunaan antioksidan alami dari tanaman mangrove *Sonneratia alba*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui formula dan karakteristik liposom ekstrak etanol daun mangrove *S.alba* serta aktivitas penghambatan radikal bebas liposom. Liposom yang telah diformulasi, kemudian dilakukan karakterisasi ukuran partikel, indeks polidispersi, dan efisiensi penjerapan. Aktivitas penghambatan radikal bebas DPPH liposom diuji melalui metode DPPH dengan standar asam askorbat menggunakan instrument spektrofotometri UV-Vis. Hasil karakterisasi dianalisis dengan statistika deskriptif dan nilai IC_{50} dihitung dari persentasi inhibisi liposom. Nilai persen inhibisi ekstrak etanol daun mangrove sebelum dan setelah diformulasi menjadi liposom dianalisis secara statistik menggunakan metode *paired t-test* dengan taraf kepercayaan $p>0,05$. Hasil uji tabung dan KLT menunjukkan ekstrak *S.alba* teridentifikasi mengandung fenolik dan flavonoid. Liposom dengan variasi bobot 50;100;dan 200 mg menghasilkan efisiensi penjerapan berturut-turut $95,4884 \pm 0,520744\%$; $94,8419 \pm 0,409189\%$; dan $88,7686 \pm 0,337682$. Ukuran partikel liposom yang terbentuk $2018 \pm 228,30$ nm dan indeks polidispersi $0,654 \pm 0,056$. Ekstrak etanol daun mangrove menghasilkan penghambatan 50% konsentrasi DPPH pada rata-rata konsentrasi $7,9 \pm 0,06$ ppm, sementara liposom ekstrak etanol daun mangrove *S.alba* menghasilkan rata-rata penghambatan sebesar $39,59 \pm 3,38\%$ pada konsentrasi yang sama.

Kata Kunci : *Sonneratia alba*, Liposom, Antiradikal Bebas DPPH, Hidrasi Lapis Tipis

Abstract: Skin is the outermost layer of the body that is functioned as main protector from exposure to ultraviolet radiation. This causes the skin to be susceptible to damage, one of which is due to oxidative stress. This condition can be overcome by using natural antioxidants from the *Sonneratia alba* mangrove plant. This research aimed to determine the formula and characteristics of liposomes from ethanol extract of *S.alba* mangrove leaves as well as the free radical inhibitory activity of liposomes. Liposomes that had been formulated are then characterized for particle size, polydispersity index, and entrapment efficiency. The free radical inhibitory activity of DPPH liposomes was tested by the DPPH method with ascorbic acid standards using a UV-Vis spectrophotometry instrument. The characterization results were analyzed by descriptive statistics and the IC_{50} value was calculated from the percentage of liposome inhibition. The percentage of inhibition of mangrove leaf ethanol extract before and after being formulated into liposomes was analyzed statistically by the paired t test method with a confidence level of $p>0.05$. The results of the tube and TLC tests showed that the *S. alba* extract contains phenolics and flavonoids. Liposomes with varying weights of 50; 100; and 200 mg produced entrapment efficiencies of $95.4884 \pm 0.520744\%$; $94.8419 \pm 0.409189\%$; and 88.7686 ± 0.337682 . The particle size of the liposomes formed was 2018 ± 228.30 nm and the polydispersity index was 0.654 ± 0.056 . The ethanol extract of mangrove leaves produced 50% inhibition of DPPH concentration at an average concentration of 7.9 ± 0.06 ppm, while the liposome ethanol extract of *S.alba* mangrove leaves produced an average inhibition of $39.59 \pm 3.38\%$ at the same concentration.

Keyword : *Sonneratia alba*, Liposome, Free Radical, DPPH, Thin Film Hydration

PENDAHULUAN

Paparan lingkungan eksternal, salah satunya seperti radiasi sinar UV-B, dapat menembus hingga lapisan stratum korneum dan menimbulkan sensasi terbakar (*sunburn*). Hasil penelitian Kawashima *et al.*, (2018) menunjukkan bahwa bagian epidermis kulit yang diinduksi 120 mJ/cm^2 radiasi UV-B menyebabkan penurunan $29,8\%$ *cell viability*. Selain itu, terjadi induksi reaksi oksidatif stress pada epidermis kulit terinduksi paparan radiasi UV-B yang ditunjukkan melalui peningkatan fluorosensi dihydroethidium (DHE) pada stratum basale, spinosum, dan granulosum (Kawashima *et al.*, 2018). Selain itu, penelitian (Ohba *et al.*, 2016) menyatakan bahwa kulit yang diinduksi 10 J/cm^2 radiasi UV-A menyebabkan peningkatan kematian sel yang ditunjukkan melalui peningkatan angka positif propidium iodide. Paparan UV-A menginduksi peningkatan ROS sehingga berdampak pada peningkatan persentase peroksidasi lipid pada kulit. Poljšak & Dahmane, (2012) juga menyatakan bahwa 80% kerusakan kulit, mulai dari penuaan kulit hingga kanker disebabkan oleh radiasi *ultraviolet* (UV). Tubuh telah memiliki antioksidan sebagai mekanisme pertahanan alami untuk mengatasi permasalahan tersebut, akan tetapi ketika paparan UV melebihi kemampuan pertahanan antioksidan tubuh, paparan UV akan berkembang menjadi Reaksi Oksidatif Stress (ROS) (Poljšak & Dahmane, 2012) . Oleh karena itu, diperlukan sumber antioksidan

berbahan sintesis maupun bahan alam sebagai pendukung ataupun pengganti dari sistem antioksidan alami pada tubuh.

Daun mangrove *Sonneratia alba* adalah salah satu tumbuhan yang memiliki potensi aktivitas antioksidan. Hasil skrining fitokimia daun mangrove *S.alba* menunjukkan adanya kandungan flavonoid, terpenoid, steroid, fenol, dan tanin (Budi *et al.*, 2019). Beberapa penelitian juga telah membuktikan potensi daun mangrove *S.alba* sebagai antioksidan. Hasil uji beberapa ekstrak etanol daun mangrove *S.alba* menunjukkan nilai penghambatan 1,1 difenil-2- pikrilhidrazil (DPPH) yang sangat kuat dengan IC_{50} 18,62; 20,27; dan 29 ppm (Delta *et al.*, 2021; Haq *et al.*, 2014)

Penggunaan sediaan antioksidan secara topikal dapat menjadi solusi untuk perlindungan terhadap ROS akibat paparan sinar UV. Akan tetapi, belum terdapat sediaan daun mangrove *S.alba* yang diformulasikan sebagai antioksidan, untuk proteksi dari sinar UV. Selain itu, terdapat beberapa tantangan dalam memformulasi sediaan antioksidan, diantaranya terkait stabilitas dan penetrasi melalui stratum korneum, lapisan terluar kulit. Agar dapat berperan sebagai agen proteksi yang optimal, antioksidan harus dapat melewati barrier stratum korneum sehingga dapat menembus sampai lapisan kulit yang lebih dalam, dengan masih dalam bentuk aktifnya agar dapat bertahan lama (Alonso *et al.*, 2014). Sebagai upaya mengatasi tantangan terkait stabilitas sediaan, dapat dilakukan proses enkapsulasi atau penggunaan sistem penghantaran obat berupa liposom.

Sistem liposom dapat meningkatkan stabilitas sediaan dengan adanya proses enkapsulasi (Hua & Wu, 2013), sehingga dapat meningkatkan penetrasi zat aktif ke lokasi kerjanya dan meminimalisir akumulasi pada lokasi non target (Hua *et al.*, 2015). Berdasarkan uraian di atas, akan dilaksanakan penelitian terkait formulasi liposom ekstrak etanol daun mangrove (*Sonneratia alba*) dan uji aktivitas antiradikal bebas.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Aluminium (iii) klorida ($AlCl_3$), asam askorbat, asam galat, asam klorida (HCl), aquabidest, akuades, besi (III) klorida ($FeCl_3$), daun mangrove *Sonneratia alba*, DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*), etanol p.a, etanol 96%, etil asetat teknis, *Folin-ciocalteu*, klorform p.a, kolesterol (CH) Sigma-Aldric®, Magnesium (Mg), metanol p.a, natrium karbonat (Na_2CO_3), n-butanol, *phosphatidylcholine* (PC) Lipoid®, dan plat silika gel 60 GF₂₅₄.

Alat

Lampu UV 254 dan 366 Camag®, labu alas bulat, lemari asam Kewaunee®, lemari pendingin Sharp®, mikropipet Labnet, *vacuum rotary evaporator* Heidolph®, spektrofotometri uv-vis, sonikator, *rotary evaporator*, sonikator Elmasonic®, spektrofotometer UV-Vis Specord®200, timbangan analitik Ohaus®, *vortex* Labnet®, dan *water bath* Labnet®.

Prosedur Penelitian

1. Ekstraksi

Sebanyak 200 gram serbuk simplisia daun mangrove (*Sonneratia alba leaves*) diekstraksi dengan metode sonikasi menggunakan pelarut etanol 96%. Perbandingan serbuk simplisia dan ekstrak yang digunakan adalah 1:10. Campuran etanol 96% dan serbuk simplisia dimasukkan ke dalam wadah kaca. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan bantuan sonikator selama 20 menit, dengan kontrol suhu 40°C. Hasil yang diperoleh kemudian disaring dengan kain mori dan kertas saring. Selanjutnya residu hasil penyaringan diresonikasi sebanyak dua kali. Ekstrak cair (filtrat) yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada kecepatan 50 rpm dengan kontrol suhu 45°C. Hasil ekstrak yang telah diuapkan kemudian dilakukan pengentalan dengan *water bath* dengan kontrol suhu 40°C (Candra *et al.*, 2021; Yuliantari *et al.*, 2017; Sekarsari *et al.*, 2019).

2. Skrining Fitokimia

A. Uji Tabung

a. Fenolik

Uji fenolik dilakukan dengan memasukkan 2 mL ekstrak etanol ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan $FeCl_3$ 5%. Reaksi positif adanya fenolik ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau atau biru kehitaman (Harborne, 1984).

b. Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan mereaksikan 2 mL ekstrak etanol dengan 2 mg serbuk Mg dan 2-3 tetes HCl pekat di dalam tabung reaksi. Reaksi positif adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya perubahan warna menjadi kuning, jingga atau merah (Harborne, 1984).

B. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Analisis senyawa metabolit sekunder fenolik dan flavonoid pada ekstrak etanol daun mangrove *S.alba* dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 GF₂₅₄ yang bersifat polar dengan ukuran 10x2 cm, dengan fase gerak kloroform, etil asetat, dan n-butanol dengan perbandingan 5:2:0,25 untuk uji flavonoid. Sementara untuk uji fenolik digunakan eluen kloroform dan metanol dengan perbandingan 9 : 1. Plat silika gel terlebih dahulu diaktivasi pada suhu 110°C selama 30 menit. Bagian atas dan bawah plat yang telah teraktivasi kemudian diberi batas atas 0,5 cm dan batas bawah 1,5 cm. Sementara itu, dilakukan penjujukan fase gerak dalam chamber hingga seluruh kertas saring terbasahi. Sampel dan standar ditotolkan dengan pipa kapiler berukuran 2 µL, pada plat silika gel. Pengujian dilakukan dengan standar asam galat untuk identifikasi fenolik dan quercetin untuk identifikasi flavonoid. Plat kemudian dielusi hingga bagian batas atas terelusi, kemudian diangkat dan dikering-anginkan. Hasil positif adanya fenolik ditandai dengan terbentuknya noda berwarna biru kehitaman setelah penyemprotan reagen *Folin Ciocalteu* pada pengamatan sinar UV 254 nm dan 366 nm. Sementara hasil positif adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya noda berwarna hijau, kuning, atau biru setelah penyemprotan reagen AlCl₃ 5% (Dewi *et al.*, 2018; Harborne, 1984; Sopiah *et al.*, 2019).

3. Uji Antiradikal Bebas

A. Penentuan Operating time

4,65 mL larutan asam askorbat 1 ppm ditambahkan dengan 0,35 mL larutan DPPH 1 mM. Larutan dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum teoritis 517 nm tiap 1 menit selama 1 jam. Blanko larutan dibuat dari 4,65 mL asam askorbat 1 ppm dan metanol p.a yang ditambahkan hingga 5 mL. *Operating time* yang tepat ditunjukkan melalui angka absorbansi yang stabil pada peredaman radikal bebas DPPH (Utami, 2020).

B. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan DPPH

Panjang gelombang maksimum ditentukan melalui pengukuran sejumlah 0,35 mL larutan DPPH 1 mM yang ditambahkan dengan metanol p.a hingga 5 mL. Larutan tersebut kemudian diinkubasi selama 24 menit pada tempat gelap. Pengukuran nilai absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis, dengan metanol p.a sebagai blanko. Panjang gelombang maksimum ditunjukkan melalui nilai absorbansi maksimum

C. Pengukuran Absorbansi Kontrol

Pengukuran absorbansi larutan kontrol dilakukan dengan memipet sejumlah 4,65 mL metanol p.a dan ditambahkan dengan 0,35 mL larutan DPPH 1 mM. Campuran kemudian dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik pada suhu 25°C selama *operating time*. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum.

D. Pengukuran Absorbansi Larutan Pembanding

Larutan asam askorbat dengan masing-masing seri konsentrasi dipipet sejumlah 4,65 mL dan ditambahkan 0,35 mL larutan DPPH 1 mM, kemudian divortex selama 30 detik dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 24 menit. Absorbansi larutan pembanding kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum dengan 4,65 mL larutan pembanding pada masing-masing konsentrasi dan 0,35 mL metanol p.a sebagai blanko (Delta *et al.*, 2021).

E. Pengukuran Absorbansi Larutan Uji

Larutan uji dengan masing-masing seri konsentrasi dipipet sejumlah 4,65 mL dan ditambahkan 0,35 mL larutan DPPH 1 mM, kemudian divortex selama 30 detik dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 24 menit. Absorbansi larutan pembanding kemudian diukur pada panjang gelombang 516 nm, dengan 4,65 mL larutan uji pada masing-masing konsentrasi dan 0,35 mL metanol p.a sebagai blanko (Delta *et al.*, 2021).

F. Perhitungan Nilai Konsentrasi Penghambatan 50% (IC₅₀)

Aktivitas penghambatan radikal bebas ditunjukkan melalui nilai IC₅₀, nilai ini diperoleh dari persamaan regresi linier antara konsentrasi dan persentase peredaman radikal bebas DPPH. Persentase peredaman radikal bebas DPPH dihitung berdasarkan persamaan 3.1 (Budi *et al.*, 2019).

$$\text{Persentase peredaman DPPH(\%)} = \frac{Ac-As}{Ac} \times 100\% \dots\dots(3.1)$$

Keterangan :

Ac : absorbansi kontrol

As : absorbansi sampel

G. Penentuan Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ dihitung berdasarkan persamaan regresi linier 3.2 antara konsentrasi larutan uji dengan persentase penghambatan radikal bebas DPPH.

$$y = bx + a \dots\dots\dots(3.2)$$

Keterangan :

a : Konstanta

y : persentase penghambatan 50%

x : nilai IC₅₀

b : Koefisien regresi

4. Formulasi Liposom

Liposom diformulasi dengan metode hidrasi lapis tipis, prosedur formulasi mengacu pada penelitian Chotphruethipong *et al.*, (2020). Formulasi liposom ekstrak etanol daun mangrove dibuat dengan mencampurkan soy phosphatidylcholine (PC) dan kolesterol (CH) (4:1) sebagai fase lipid dengan konsentrasi 1%. Campuran dengan total bobot 0,2 gram tersebut kemudian dilarutkan dengan 20 mL etanol p.a. Selanjutnya, campuran diinkubasi di *water bath* pada suhu 55°C untuk meningkatkan kelarutan. Kemudian campuran dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu yang sama dengan kecepatan 50 rpm selama 30-40 menit hingga terbentuk lapisan tipis pada permukaan labu, untuk selanjutnya diinkubasi pada desikator selama 12 jam sebagai proses pengeringan.

Lapisan tipis yang terbentuk kemudian dihidrasi dengan akuabides yang mengandung zat aktif dengan variasi bobot ekstrak 50 mg, 100 mg, dan 200 mg sambil dilakukan pengadukan pada kecepatan 210 rpm dengan suhu °C dan sonikasi selama 30 menit. Formula liposom ekstrak etanol daun mangrove *Sonneratia alba* dibuat dalam tiga variasi satu kelompok kontrol yang terdiri dari PC dan CH. **Tabel 3.1** menunjukkan variasi formula liposom ekstrak etanol daun mangrove.

Tabel 1. 1 Formula Liposom Ekstrak Etanol *S.alba*

	F1	F2	F3
Ekstrak	50 mg	100 mg	200 mg
phosphatidylcholine	40 mg	40 mg	40 mg
Kolesterol	160 mg	160 mg	160 mg

5. Karakterisasi Liposom

A. Karakterisasi Liposom

a. Efisiensi Penejerapan

Efisiensi penjerapan dianalisis berdasarkan metode penentuan *Total Phenolic Content* (TPC) berdasarkan prosedur preparasi yang dilakukan oleh Trucillo *et al.*, (2018) dan Candra *et al.*, 2021. Kadar total fenolik ekstrak dan supernatan hasil pemisahan liposom diukur dengan metode spektrofotometri menggunakan standar asam galat.

Penentuan Kadar Total fenolik Ekstrak Etanol 96% *S.alba*

Penentuan *Operating time*

Larutan asam galat 30 ppm dipipet sejumlah 300 µL kemudian ditambahkan 1,5 mL reagen folin-ciocalteu (1:10). Larutan diinkubasi selama 3 menit kemudian ditambahkan 1,2 mL Na₂CO₃ 7,5%. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 765 nm setiap 1 menit selama 120 menit. Pengujian dilakukan dengan campuran 300 µL akuades, 1,5 mL reagen Folin-ciocalteu, dan 1,2 mL Na₂CO₃ 7,5% sebagai blanko. *Operating time* yang tepat ditunjukkan melalui angka absorbansi yang stabil (Candra *et al.*, 2021).

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Larutan asam galat 30 ppm dipipet sejumlah 300 µL kemudian ditambahkan 1,5 mL reagen folin-ciocalteu (1:10). Larutan diinkubasi selama 3 menit kemudian ditambahkan 1,2 mL Na₂CO₃ 7,5%. Larutan diinkubasi pada *operating time*, selanjutnya absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 500-800 nm dengan blanko 300 µL akuades, 1,5 mL reagen Folin-ciocalteu, dan 1,2 mL Na₂CO₃ 7,5%.

Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat

Larutan asam galat 1000 ppm diencerkan dengan akuades untuk mendapatkan seri konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm. Larutan dengan masing-masing variasi konsentrasi dipipet sejumlah 300 µL ke dalam vial kaca, kemudian ditambahkan 1,5 mL reagen folin-ciocalteu (1:10). Larutan diinkubasi selama 3 menit kemudian ditambahkan 1,2 mL Na₂CO₃ 7,5%. dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Campuran tersebut kembali diinkubasi selama 110 menit dan absorbansi sampel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 760 nm dengan blanko campuran 300 µL akuades, 1,5 mL reagen Folin-ciocalteu, dan 1,2 mL Na₂CO₃ 7,5%.

Penentuan Total Phenolic Content (TPC)

Penentuan kadar fenolik total ekstrak etanol daun mangrove *S.alba* dilakukan dengan menimbang sejumlah 10 mg ekstrak kental kemudian dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%. Larutan kemudian dipipet sejumlah 1 mL dan ditambahkan aquadest hingga 10 mL. Larutan ekstrak yang telah diencerkan dipipet sejumlah 300 µL kemudian dimasukkan ke dalam vial kaca 10 mL. Ditambahkan 1,5 mL reagen Folin-ciocalteu dan diinkubasi selama 3 menit. Larutan kemudian ditambahkan 1,2 mL Na₂CO₃ 7,5%. Larutan diinkubasi selama 110 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 760 nm. Pengukuran absorbansi diulangi sebanyak tiga kali. Hasil pengukuran kemudian disubstitusi pada persamaan regresi kurva baku asam galat. Kadar fenolik total ekstrak ditentukan berdasarkan persamaan 3.3 (Candra *et al.*, 2021).

$$\text{Kadar Fenolik total} \left(\text{mg} \frac{\text{GAE}}{\text{g}} \right) = \frac{c \cdot v \cdot fp}{g} \dots \dots (3.3)$$

Keterangan :

- c : Kadar fenolik (mg/mL)
- v : volume ekstrak (mL)
- Fp : Faktor pengenceran
- g : Berat sampel yang digunakan (g)

Kadar total fenolik dinyatakan dalam satuan mg ekuivalen asam galat/ gram sampel (mgEAG/g).

Penentuan Kadar Total Fenolik Supernatan

Preparasi sampel diawali dengan proses pemisahan suspensi liposom menggunakan sentrifugasi pada 13000 rpm selama 50 menit. Bagian supernatan atau bagian yang tidak terjerap digunakan untuk pengujian efisiensi penjerapan.

Kadar total fenolik dari supernatant yang telah dipisahkan dianalisis berdasarkan prosedur berikut.

Penentuan Total Phenolic Content (TPC)

Penentuan kadar fenolik total supernatan dilakukan dengan memipet sejumlah 1 mL supernatant kemudian ditambahkan aquadest hingga 10 mL. larutan ini selanjutnya dipipet sejumlah 300 µL kemudian dimasukkan ke dalam vial kaca 10 mL. Ditambahkan 1,5 mL reagen Folin-ciocalteu, diinkubasi selama 3 menit kemudian ditambahkan 1,2 mL larutan Na₂CO₃ 7,5%. Larutan diinkubasi selama 110 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 760 nm. Pengukuran absorbansi diulangi sebanyak tiga kali. Hasil pengukuran kemudian disubstitusi pada persamaan regresi kurva baku asam galat. Kadar fenolik total ekstrak ditentukan berdasarkan persamaan 3.4 (Candra *et al.*, 2021).

$$\text{Kadar Fenolik total} \left(\text{mg} \frac{\text{GAE}}{\text{mL}} \right) = \frac{c \cdot v \cdot fp}{g} \dots \dots (3.4)$$

Keterangan :

- C : Kadar fenolik (ppm)
- v : volume supernatan (mL)
- Fp : Faktor pengenceran
- g : bobot sampel pada liposom (g)

Kadar total fenolik supernatan dinyatakan dalam satuan mg ekuivalen asam galat/mL suspensi liposom (mg EAG/mL).

Efisiensi Penjerapan Liposom

Efisiensi penjerapan dikalkulasi dalam persen berdasarkan persamaan 3.5

$$\%EE = \left(\frac{Q_t - Q_s}{Q_t} \right) \times 100\% \dots \dots \dots (3.5)$$

Keterangan :

%EE : Efisiensi penjerapan (*entrapment efficiency EE*) (%)

Qt : kadar total fenolik ekstrak

Qs : kadar total fenolik supernatant

Liposom dengan efisiensi penjerapan paling optimum dikarakterisasi lebih lanjut untuk mengetahui ukuran partikel dan indeks polidispersi. Liposom dengan formula ini juga digunakan sebagai sampel uji antiradikal bebas DPPH.

b. Analisis Ukuran Partikel dan Indeks Polidispersi Liposom

Analisis ukuran partikel dan indeks polidispersi dilakukan dengan metode Dynamic Light Scattering dengan instrumen Zetasizer Nano ZS. Sejumlah 1 mL sampel terlebih dahulu diencerkan sebanyak 10 kali dengan akuades untuk mencegah fenomena multiple scattering. Sampel kemudian dianalisis dengan tiga kali pengulangan pada sudut scattering 90° dengan panjang gelombang 535 nm. Hasil pengukuran ditampilkan dalam nilai rata-rata ukuran partikel dan indeks polidispersi (Hosseini *et al.*, 2017; Otake *et al.*, 2006).

6. Uji Aktivitas Antiradikal Bebas Liposom Ekstrak Etanol Daun Mangrove *S. alba*

Uji aktivitas antiradikal bebas liposom dilakukan dengan metode DPPH. Preparasi sampel diawali dengan proses pemisahan suspensi liposom menggunakan sentrifugasi pada 13000 rpm selama 50 menit. Bagian presipitat dipisahkan dari supernatannya dan digunakan sebagai sampel uji. Presipitat dari masing-masing variasi formula liposom yang telah dipisahkan dari supernatannya dikeringkan pada waterbath dengan kontrol suhu 50°C. Sejumlah 50 mg presipitat kering dilarutkan dengan metanol p.a untuk memperoleh konsentrasi larutan 1000 ppm. Dilakukan pengenceran hingga diperoleh konsentrasi 8 ppm. Larutan tersebut kemudian dipipet sejumlah 4,65 mL dan ditambahkan 0,35 mL larutan DPPH 1 mM. Campuran dihomogenkan kemudian dimasukkan ke dalam vial yang telah dilapisi aluminium foil dan diinkubasi selama 24 menit. Absorbansi presipitat formula liposom diukur pada panjang gelombang 516 nm dengan spektrofotometri UV-Vis. Sejumlah 4,65 mL larutan presipitat dan 0,35 mL metanol p.a digunakan sebagai blanko (Trucillo *et al.*, 2018). Pengukuran absorbansi diulangi sebanyak tiga kali. Hasil pengukuran kemudian disubstitusi pada persamaan regresi kurva baku asam askorbat. Perhitungan nilai penghambatan dilakukan dengan metode yang sama dengan bagian 3.10.10 Penentuan Nilai IC₅₀.

7. Analisis Data

Aktivitas antiradikal bebas DPPH sebelum dan setelah diformulasi menjadi sediaan liposom dianalisis secara statistik menggunakan *paired t-test* dengan taraf kepercayaan 95% dalam perangkat lunak SPSS 25.0. Hal ini dilakukan untuk mengetahui adanya pengaruh signifikan aktivitas penghambatan radikal bebas sebelum dan setelah diformulasi dalam liposom. Data hasil karakterisasi liposom dianalisis dengan statistika deskriptif, yaitu rata-rata dan standar deviasi menggunakan Microsoft Excel 2016.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Ekstraksi

Ekstrak kental yang diperoleh sejumlah 60,869 gram dengan persentase rendemen sebesar 30,43%. Hasil ekstraksi dan beberapa parameter yang diamati pada penelitian ini ditunjukkan pada **Tabel 4.1**. Persentase rendemen yang diperoleh lebih tinggi dari hasil penelitian yang dilakukan Binuni *et al.*, (2020), dengan persen rendemen 5,76% berdasarkan hasil ekstraksi dengan prosedur maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Sementara hasil yang diperoleh Budi *et al.*, (2019) dengan metode ekstraksi sonikasi pada pelarut etanol, menunjukkan persentase rendemen sebesar 10,26%. Durasi sonikasi yang digunakan pada penelitian ini lebih panjang dibandingkan dengan prosedur yang dilakukan pada penelitian sebelumnya yang hanya melakukan prosedur sonikasi selama 10 menit. Hal ini memungkinkan pada penelitian ini menghasilkan rendemen yang lebih banyak.

Tabel 4. 1 Hasil Ekstraksi Daun Mangrove

Parameter	Hasil
Warna	Hijau pekat
Aroma	Mirip tanaman asam
Rasa	asam



Rendemen	30,43%
TPC mg EAG/g	159,37 ± 7,994
IC ₅₀ DPPH (ppm)	7,9 ± 0,06

Keterangan : mg EAG/g (mg Ekuivalen Asam Galat/ g), Data TPC dan IC₅₀ merupakan rata-rata ± standar deviasi

2. Identifikasi Metabolit Sekunder

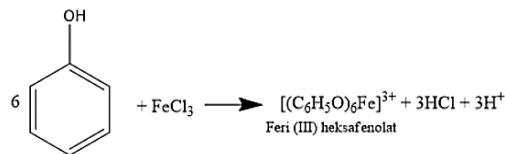
Identifikasi metabolit sekunder bertujuan untuk mendeteksi senyawa aktif yang terdapat pada sampel. Proses identifikasi dilakukan melalui uji warna dengan reagen tertentu untuk mengidentifikasi senyawa fenolik dan flavonoid. **Tabel 4.2** menunjukkan hasil identifikasi metabolit sekunder ekstrak etanol daun mangrove *S.alba*.

Tabel 4. 2 Hasil Identifikasi Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol *S.alba*

Metabolit Sekunder	Hasil	Interpretasi Hasil
Fenolik		(+) : hijau atau biru kehitaman
Flavonoid		(+) : jingga, kuning, hijau, dan merah tua

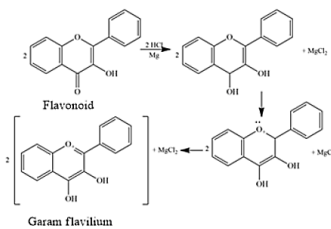
Keterangan : (+) Teridentifikasi

Hasil identifikasi metabolit sekunder golongan fenolik menunjukkan hasil positif. Hasil ini ditunjukkan melalui perubahan warna ekstrak menjadi biru kehitaman setelah direaksikan dengan reagen FeCl₃ 5%. Perubahan warna yang terjadi merupakan hasil reaksi gugus hidroksil penyusun fenol dengan FeCl₃ menghasilkan kompleks Feri (III) heksafenolat **Gambar 4.3** (Larasati *et al.*, 2023; (Ahluwalia & Dhingra, 2004). Senyawa fenol memiliki kemampuan membentuk kelat dengan logam dan mudah teroksidasi, hal inilah yang menyebabkan timbulnya warna yang lebih gelap (Ikalinus *et al.*, 2015).



Gambar 4. 1 Reaksi senyawa fenolik dengan FeCl₃ (Larasati *et al.*, 2023)

Hasil identifikasi metabolit sekunder golongan flavonoid juga menunjukkan hasil positif dengan adanya perubahan warna menjadi jingga setelah reaksi dengan serbuk Mg dan HCl. Serbuk magnesium dan HCl menghidrolisis struktur benzopiron O-glikosil pada flavonoid menjadi aglikonnya **Gambar 4.5**. Reaksi ini menghasilkan garam flavylum berwarna merah atau jingga pada senyawa yang mengandung flavonoid flavanol, flavanon, flavanolol, dan xanton (Ikalinus *et al.*, 2015); (Yuniati *et al.*, 2020).



Gambar 4. 2 Uji flavonoid dengan reaksi shinoda (Tandi *et al.*, 2020)

3. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi metabolit sekunder pada sampel juga dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah silika gel 60 GF₂₅₄, jenis fase diam ini

memiliki ukuran pori 60 Å dengan bahan yang dapat berpendar pada sinar UV 254 nm dan memiliki pengikat berbahan *gypsum* CaSO₄ (Cahyono & Suzery, 2018). Hasil uji kromatografi lapis tipis menunjukkan ekstrak etanol daun mangrove *S.alba* positif mengandung fenolik dan flavonoid. **Gambar 4.5** dan **Gambar 4.6** menunjukkan hasil uji kromatografi lapis tipis fenolik dan flavonoid ekstrak. Pengujian senyawa flavonoid dan fenolik secara berturut-turut menggunakan eluen klorofom : etil asetat : n-butanol (5 : 2 : 0,25 v/v) dan kloroform : meranol (9:1 v/v). Eluen yang digunakan merupakan hasil optimasi dengan pemisahan paling baik.

Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan adanya dua bercak berwarna kuning kehijauan dan satu bercak berwarna biru pada pengamatan sinar UV 366 nm setelah bereaksi dengan penampak AlCl₃ 10%. Bercak berwarna kuning yang berfluorosensi merupakan hasil pembentukan kompleks asam yang stabil antara gugus keto C-4 dengan salah satu gugus hidroksil C-3 atau C-5 dari flavon dan flavanol (Ahmed & Iqbal, 2018). Sementara adanya bercak berwarna biru menunjukkan flavonoid golongan chrysin atau antosianin (Tanikawa *et al.*,2019; Poblocka *et al.*, 2018).



Gambar 4. 3 Hasil KLT senyawa flavonoid dan fenolik ekstrak etanol daun mangrove *S.alb* dengan eluen klorofom : etil asetat : n-butanol (5:2:0,25 v/v) dan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ di bawah sinar UV 366 nm, dengan penampak AlCl₃ 10% A. Standar keursetin; B. Sampel ekstrak etanol

Hasil uji kromatografi lapis tipis fenolik menunjukkan hasil positif. Hasil ini ditunjukkan dengan adanya bercak berwarna biru setelah penyemprotan dengan Folin-ciocalteu. Bercak warna yang berfluorosensi ini menunjukkan adanya kandungan senyawa asam monofenolat atau asam dihidroksi fenolat (Badal & Delgoda, 2017; Smith & Seakins, 1976). Selain itu, terlihat adanya bercak berwarna hijau kebiruan, bercak ini menunjukkan adanya senyawa fenol dengan komponen gugus hidroksi yang berada selain pada posisi para (Smith & Seakins,1976).



Gambar 4. 4 Hasil KLT senyawa fenolik ekstrak etanol daun mangrove *S.alba* dengan eluen klorofom : metanol (9 :1 v/v) dan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ di bawah sinar UV 366 nm, dengan penampak Folin-ciocalteu 10% (A) Asam galat; (B) Sampel ekstrak etanol

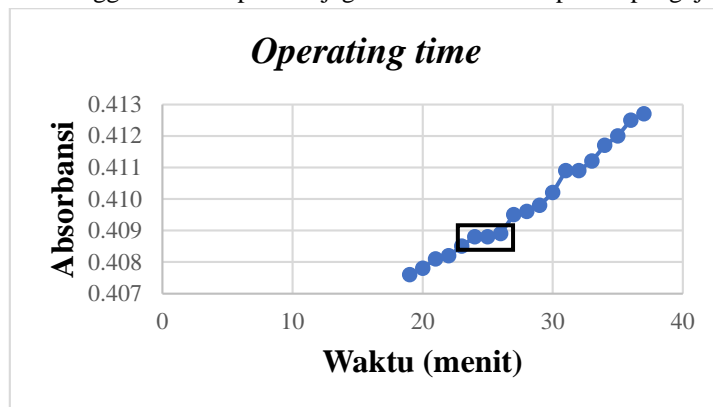
4. Uji Aktivitas Antiradikal Bebas Ekstrak

Uji aktivitas antiradikal bebas ekstrak etanol daun mangrove didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan dalam sampel mereduksi radikal DPPH. Pengukuran dilakukan berdasarkan metode spektrofotometri dan hasilnya dinyatakan dalam IC₅₀, yaitu konsentrasi efektif senyawa antioksidan dalam menghambat atau mereduksi 50% konsentrasi DPPH (Shahidi & Zhong, 2015). Penentuan nilai

IC₅₀ dilakukan dengan menentukan beberapa parameter, yaitu *operating time*, panjang gelombang maksimum, penentuan nilai IC₅₀ standar asam askorbat dan ekstrak.

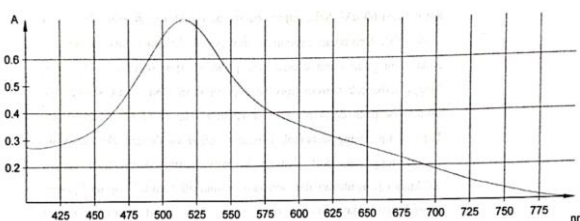
5. Penentuan *Operating time* dan Panjang Gelombang Maksimum

Hasil penentuan *operating time* yang diperoleh adalah 24 menit, waktu ini diperoleh melalui hasil pengukuran absorbansi yang konstan pada menit ke-24, 25, dan 26 **Gambar 4.7**. Hasil yang diperoleh sesuai dengan pernyataan Stratil *et al.*, (2006) yang menyatakan bahwa waktu inkubasi yang dibutuhkan pada pengujian antioksidan dengan metode DPPH paling singkat adalah 20 menit hingga 30 menit. Hasil yang diperoleh juga tidak berbeda signifikan dengan hasil penentuan *operating time* yang diperoleh (Bakti *et al.*, 2017), yaitu 26 menit. Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan senyawa antioksidan mengalami reaksi secara sempurna dengan radikal bebas yang digunakan. Sehingga hal ini dapat menjaga stabilitas selama proses pengujian (Bal *et al.*, 2020)



Gambar 4. 5 Grafik *Operating time* DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan melalui pengukuran absorbansi campuran larutan 4,65 mL metanol dan 0,35 mL DPPH yang diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh yaitu 24 menit. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum yang diperoleh 516 nm. Panjang gelombang maksimum ditunjukkan melalui nilai absorbansi tertinggi pada pengukuran dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm **Gambar 4.8**. Hasil panjang gelombang maksimum yang diperoleh sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Kusuma & Yolanda, (2020) dan Yulizar *et al.*, (2020). Secara teoritis dinyatakan bahwa serapan maksimum DPPH berada panjang gelombang 517 nm. Sementara Boligon, (2014) menyatakan bahwa serapan maksimum DPPH berada pada gelombang 518 nm. Pergeseran panjang gelombang secara teoritis dan hasil pengamatan dapat terjadi pada rentang 0-4 nm. Sehingga panjang gelombang yang diperoleh pada penelitian ini masih dapat diperbolehkan karena tidak melebihi toleransi pergeseran panjang gelombang (Prananta *et al.*, 2020)



Gambar 4. 6 Grafik panjang gelombang maksimum

6. Penentuan IC₅₀ Standar Asam Askorbat dan Ekstrak

Asam askorbat digunakan sebagai standar pada penelitian ini. Standar diperlukan untuk mengetahui keakuratan metode yang digunakan (Widyasanti *et al.*, 2016). Asam askorbat merupakan salah satu senyawa antioksidan yang telah terbukti memiliki aktivitas penghambatan yang sangat kuat terhadap berbagai senyawa radikal bebas. Senyawa ini diketahui memiliki peranan dalam berbagai siklus pertahanan sel dalam melawan radikal bebas, seperti penghambatan radikal bebas, biosintesis dan aktivasi enzim antioksidan, dan perbaikan kerusakan oksidatif (Gęgotek & Skrzydlewska, 2022). Hal inilah yang mendasari pemilihan asam askorbat sebagai standar dalam pegujian aktivitas antiradikal bebas sampel. Pada penentuan IC₅₀ dibutuhkan pengukuran absorbansi kontrol untuk mengetahui nilai absorbansi DPPH sebelum mengalami reaksi dengan sampel. Nilai absorbansi kontrol dan seri

konsentrasi larutan standar digunakan pada penentuan persentase inhibisi. Persentase yang diperoleh akan meningkat sering dengan peningkatan konsentrasi yang digunakan (Widyasanti *et al.*, 2016). Nilai persentase inhibisi yang diperoleh dengan seri konsentrasi yang digunakan diplotkan dalam grafik untuk memperoleh persamaan regresi. Persamaan regresi yang diperoleh digunakan untuk penentuan IC₅₀ yang merupakan konstanta x pada persamaan, melalui substitusi konstanta y dalam persamaan regresi dengan nilai 50. Nilai R² dari ketiga persamaan regresi kurva standar asam askorbat 0,9708 atau mendekati 1. Nilai ini menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang tinggi antara persen inhibisi dengan konsentrasi standar (Bucchianico, 2007). Berdasarkan hasil pengukuran, diperoleh nilai IC₅₀ standar asam askorbat sebesar 4,66 ± 0,04 ppm (**Tabel 4.3**). Nilai yang diperoleh termasuk ke dalam klasifikasi antioksidan yang sangat kuat (Nurjanah *et al.*, 2017). Hasil yang diperoleh pada penelitian ini lebih baik dari hasil penelitian (Irnameria *et al.*, 2023), dengan perolehan IC₅₀ 5,4 ppm dengan konsentrasi larutan DPPH yang sama.

Tabel 4. 3 IC₅₀ Larutan Standar Asam Askorbat

Replikasi	IC ₅₀ (ppm)	Rata-rata ± SD	CV (%)
1	4,62		
2	5,32	4,66 ± 0,04	0,86
3	4,64		

Keterangan : Rep : Replikasi; SD : Standar Deviasi; CV : *Coefficient of variation*

Penentuan IC₅₀ sampel ekstrak etanol daun mangrove *S.alba* dilakukan dengan prosedur yang sama dengan standar. Hasil penentuan persentase inhibisi menunjukkan peningkatan seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Nilai R² dari ketiga kurva hubungan konsentrasi sampel dengan persentase inhibisi 0,9706. Data tersebut menunjukkan terdapat korelasi yang tinggi antara konsentrasi dengan persen inhibisi (Widyasanti *et al.*, 2016.). Ekstrak etanol daun mangrove *S.alba* memiliki IC₅₀ 7,9 ± 0,06 ppm (**Tabel 4.1**), yang tergolong dalam klasifikasi sangat kuat (**Lampiran 9**). Hasil yang diperoleh lebih baik dari hasil penelitian yang dilakukan Delta *et al.*, (2021) dengan nilai IC₅₀ 18,62 ppm. Hasil penelitian Binuni *et al.*, (2019) menunjukkan ekstrak etanol daun mangrove *S.alba* menghasilkan penghambatan 50% konsentrasi DPPH pada 39,95 ppm.

Tingginya aktivitas antioksidan pada sampel berkorelasi dengan hasil pengukuran kadar total fenol yang cukup tinggi, yaitu 156,63 mg EAG/g. Fenolik merupakan salah satu senyawa yang dapat memberikan aktivitas antioksidan. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini sesuai dengan beberapa penelitian yang menyatakan bahwa terdapat hubungan antara kadar fenolik total dan aktivitas antioksidan sampel (Ariviani *et al.*, 2013; Muflihah *et al.*, 2021)

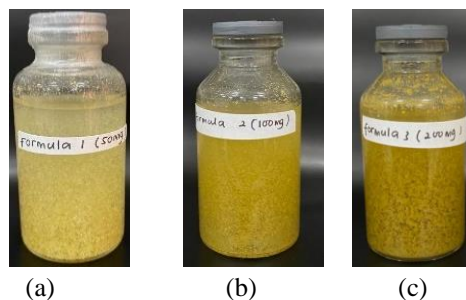
Data IC₅₀ standar dan sampel diolah dengan statistika deskriptif untuk mengetahui standar deviasi dan koefisien variasi data yang diperoleh. Data IC₅₀ standar maupun ekstrak menunjukkan persebaran yang baik, nilai standar deviasi yang diperoleh lebih kecil dari nilai rata-rata IC₅₀ standar. Hal ini menunjukkan persebaran data yang rendah. Nilai persen koefisien variasi (CV) juga menunjukkan bahwa data yang diperoleh presisi. Semakin mendekati nol nilai atau semakin kecil nilai CV maka data yang diperoleh dianggap semakin presisi. Nilai minimal koefisien variasi data dianggap presisi adalah 5% (Gandjar & Rohman, 2012; Sulandari *et al.*, 2014).

7. Formulasi dan Karakterisasi Liposom

Liposom ekstrak etanol daun mangrove *Sonneratia alba* diformulasi dengan metode hidrasi lapis tipis. Formula liposom terdiri dari fosfatidilkolin dan kolesterol sebagai fase lipid, aquabidest sebagai penghidrasi, dan ekstrak etanol daun mangrove *S.alba* sebagai zat aktif. Formulasi liposom berdasarkan metode ini didasarkan pada pembentukan lapis tipis pada permukaan labu (Patil & Jadhav, 2014). Larutan fase lipid yang terdiri dari fosfatidilkolin dan kolesterol yang dilarutkan dalam etanol p.a akan membentuk lapisan bilayer setelah proses penguapan pelarut. Proses preparasi liposom dilakukan pada kondisi sedekat mungkin dengan suhu transisi fosfatidilkolin, yaitu 55°C (Sutisna & Chaerunisaa, 2022). Sementara untuk proses hidrasi lapis tipis dilakukan pada kecepatan 210 rpm dengan suhu 60°C, kondisi ini dipilih karena memungkinkan pelepasan lapis tipis pada permukaan labu.

Pemilihan komponen lipid pada liposom diketahui dapat mempengaruhi beberapa karakteristik liposom seperti ukuran partikel, rigiditas, dan stabilitas liposom. Pada penelitian ini fosfatidilkolin dipilih sebagai komponen fase lipid. Hal ini karena penggunaan lemak alami seperti fosfatidilkolin dapat

menghasilkan liposom dengan permeabilitas yang tinggi akan tetapi stabilitasnya rendah (Nsairat *et al.*, 2022). Selain itu, terdapat komponen tambahan, yaitu kolesterol pada fase lipid. Komponen ini dapat meningkatkan permeabilitas membran dan stabilitas lapisan ganda yang terbentuk (Laouini *et al.*, 2012; Nsairat *et al.*, 2022). Hasil penelitian (Febriyenti *et al.*, 2018) menunjukkan stabilitas liposom dengan adanya tambahan kolesterol lebih baik dari liposom tanpa kolesterol. Hal ini dibuktikan melalui uji stabilitas penyimpanan selama 6 bulan, liposom dengan kandungan kolesterol tidak mengalami perubahan warna. Sedangkan secara visual liposom tanpa kolesterol terlihat mengalami perubahan warna menjadi kekuningan. **Gambar 4.9** menunjukkan hasil formulasi liposom dengan berbagai variasi bobot ekstrak.



Gambar 4. 7 Liposom ekstrak etanol daun mangrove dengan berbagai variasi bobot ekstrak (a) Formula 1 (50 mg); (b) Formula 2 (100 mg); (c) Formula 3 (200 mg)

Liposom yang telah diformulasi selanjutnya melalui proses karakterisasi. Karakterisasi yang dilakukan berupa pengamatan organoleptis, analisis ukuran partikel, indeks polidispersi (**Lampiran 10**), dan efisiensi penjerapan (**Lampiran 12**). **Tabel 4.4** menunjukkan hasil karakterisasi liposom ekstrak etanol *S.alba*.

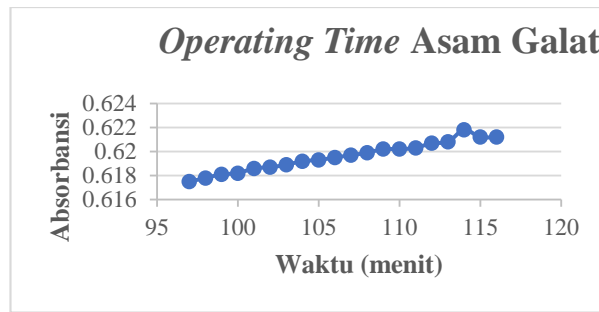
Tabel 4. 4 Karakteristik Liposom Ekstrak Etanol *S.alba*

Parameter	Formula I	Formula II	Formula III
Warna	Hijau pucat	Hijau	Hijau kecoklatan
Aroma	Mirip aroma ekstrak		
Konsistensi	Mirip suspense, cair		
EE(%)	95,488±0,5207	94,8419±0,4091	88,7686±0,3376
Ukuran Partikel (nm)	2018 ± 228,30	-	-
Indeks Polidispersi	0,654 ± 0,056	-	-

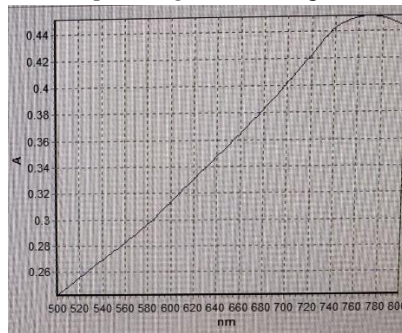
Keterangan : EE (*Entrapment Efficiency*/ efisiensi penjerapan); Formula I (50 mg ekstrak); Formula II (100 mg ekstrak); dan Formula III (200 mg)

8. Efisiensi Penjerapan

Pengukuran efisiensi penjerapan dilakukan dengan membandingkan kadar fenolik total ekstrak dan supernatant liposom. Pengukuran kadar fenolik total dilakukan dengan terlebih dahulu menentukan beberapa parameter, yaitu *operating time*, panjang gelombang maksimum, dan kurva standar asam galat. Hasil penentuan *operating time* menunjukkan absorbansi yang stabil mulai menit ke-109 hingga menit ke-111. **Gambar 4.10** menunjukkan kurva *operating time* asam galat. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum menunjukkan serapan dengan absorbansi tertinggi pada panjang gelombang 760 nm (**Gambar 4.11**). Hasil yang diperoleh sesuai dengan penelitian yang dilakukan (Molole *et al.*, 2022) yang juga memperoleh hasil pengukuran panjang gelombang maksimum 760 nm berdasarkan hasil validasi.



Gambar 4. 8 Kurva *operating time* asam galat

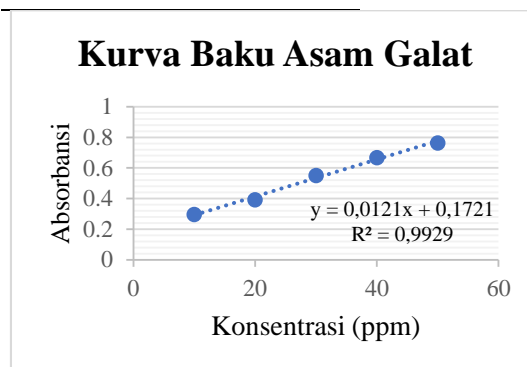


Gambar 4. 9 Kurva panjang gelombang maksimum asam galat

Hasil pengukuran absorbansi (Tabel 4.4) diplot bersama seri konsentrasi asam galat dalam kurva regresi, untuk memperoleh persamaan regresi linear (Gambar 4.12). Persamaan regresi linear kurva standar asam galat yang diperoleh adalah $y = 0,1208 + 0,1721x$, dengan nilai R^2 0,9929. Nilai R yang mendekati 1 menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang sangat tinggi antara konsentrasi dengan absorbansi standar asam galat (Rawski *et al.*, 2016)

Tabel 4. 5 Hasil pengukuran absorbansi asam galat

Konsentrasi	Absorbansi ($\mu\text{g/mL}$)
10	0,297
20	0,392
30	0,551
40	0,667
50	0,764

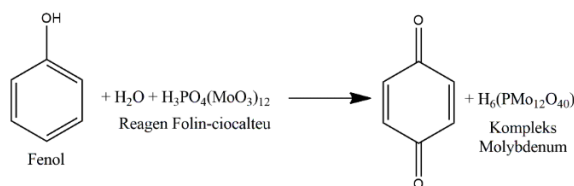


Gambar 4. 10 Kurva baku standar asam galat

Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak

Penetapan kadar fenolik total dilakukan berdasarkan metode folin ciocalteu. Folin Ciocalteu merupakan senyawa kompleks yang tersusun dari asam fosfomolibdat dan asam heteropoly fosfotungstat. Gugus hidroksil pada fenol akan teroksidasi dengan adanya penambahan reagen folin ciocalteu menghasilkan warna kuning. Reaksi antara senyawa fenol dan folin ciocalteu hanya dapat berlangsung pada suasana basa. Oleh karena itu, dilakukan penambahan larutan basa Na_2CO_3 untuk

menghasilkan suasana basa. Sehingga larutan akan mengalami perubahan warna menjadi warna biru hingga biru kehitaman, hasil disosiasi proton pada senyawa fenol menjadi bentuk ion (**Gambar 4.13**) (Eddy *et al.*, 2022; Nofita *et al.*, 2022) Larutan ini selanjutnya dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 760 nm.



Gambar 4. 11 Reaksi fenol dengan reagen Folin-ciocalteu

Nilai absorbansi yang diperoleh (y), selanjutnya disubstitusi pada persamaan regresi kurva baku standar asam galat. Nilai x pada persamaan regresi menunjukkan konsentrasi, nilai inilah yang digunakan untuk menentukan kadar fenolik total pada sampel *S.alba* (**Tabel 4.1**). Nilai yang diperoleh dinyatakan dalam mg EAG/g ekstrak. Kadar fenolik total ekstrak etanol daun mangrove *Sonneratia alba* yang diperoleh sebesar 159,37 mg EAG/g. Nilai yang diperoleh lebih tinggi dari hasil penelitian (Sasmito, 2020) yang memperoleh kadar total fenolik sebesar 5,847 mg EAG/g, nilai ini diperoleh dengan metode ekstraksi dan pelarut yang sama dengan penelitian ini.

Hasil penelitian lain menunjukkan kadar total fenol daun mangrove *S.alba* yang diekstraksi dengan metode maserasi sebesar 84,94 mg EAG/g (Sasmito *et al.*, 2019). Hasil penelitian Annegowda *et al.*, (2011) menyatakan kadar total fenolik yang dihasilkan berdasarkan ekstraksi dengan metode sonikasi selama 40 menit lebih tinggi dibandingkan dengan metode maserasi selama 24 jam. Perbedaan dapat terjadi karena adanya keterlibatan gelombang ultrasonic pada proses ekstraksi dengan metode sonikasi. Adanya gelombang ini memungkinkan peningkatan *permeabilitas dinding sel dan akan menyebabkan dinding sel terbuka, sehingga lebih banyak senyawa target yang dapat tertarik oleh pelarut* (Das *et al.*, 2019).

Penetapan Kadar Fenolik Total supernatant dan Efisiensi Penjerapan Liposom

Pengukuran efisiensi penjerapan dilakukan dengan membandingkan kadar fenolik total ekstrak dan kadar fenolik total supernatant liposom. supernatant diperoleh setelah melalui pemisahan dengan metode sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C. Bagian atas dari hasil pemisahan suspensi liposom (supernatant) merupakan bagian tidak terjerap atau bagian bebas. larutan ini kemudian diukur absorbansinya dengan metode yang sama seperti penentuan kadar fenolik total ekstrak. **Tabel 4.5** menunjukkan hasil pengukuran efisiensi penjerapan liposom dengan berbagai variasi bobot ekstrak. Hasil ini menunjukkan bahwa tingkat efisiensi penjerapan liposom berbanding terbalik dengan bobot ekstrak yang ditambahkan. Semakin tingginya bobot ekstrak menunjukkan penurunan kemampuan liposom dalam menjerap zat aktif.

Kemampuan penjerapan zat aktif didasarkan pada kemampuannya dalam untuk terdispersi, baik pada bagian polar maupun nonpolar dari vesikel yang terbentuk. Selain itu, hal ini juga ditentukan oleh kemampuan difusi zat aktif selama proses hidrasi (Rahman *et al.*, 2011). Hasil penelitian ini menunjukkan ketiga formula menghasilkan efisiensi penjerapan yang tinggi. Hal ini dapat dipengaruhi oleh adanya penambahan kolesterol dan besarnya ukuran partikel liposom yang terbentuk. (Ong *et al.*, 2016) menyatakan bahwa semakin tinggi ukuran partikel liposom maka efisiensi penjerapannya dapat meningkat.

Analisis Ukuran Partikel dan Indeks Polidispersi

Analisis ukuran partikel dilakukan untuk mengetahui jenis liposom yang terbentuk didasarkan pada ukuran partikelnya. Sementara untuk mengetahui persebaran atau homogenitas ukuran partikel dilakukan uji indeks polidispersi. Hasil analisis ukuran partikel dan indeks polidispersi liposom ditunjukkan pada **Tabel 4.6**.

Hasil analisis ukuran partikel menunjukkan bahwa liposom yang terbentuk termasuk kategori *Giant unilamellar vesicles (GUV)* dengan ukuran >1000 nm (Laouini *et al.*, 2012). Besarnya ukuran partikel liposom yang terbentuk dapat disebabkan karena adanya penggunaan kolesterol pada komponen penyusun liposom (Kaddah *et al.*, 2018). Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan (Refai *et al.*, 2017) yang menunjukkan peningkatan ukuran partikel seiring dengan penambahan kolesterol.

Hasil analisis indeks polidispersi liposom menunjukkan bahwa distribusi ukuran partikel yang terbentuk homogen, dengan nilai PDI kurang dari 0,7 (Danaei *et al.*, 2018).

9. Uji Aktivitas Antiradikal Bebas Liposom

Uji aktivitas antioksidan liposom dilakukan dengan metode yang sama seperti ekstrak. Presipitat hasil pemisahan suspensi liposom dengan efisiensi penjerapan tertinggi digunakan sebagai sampel uji. Presipitat kemudian dikeringkan menggunakan *waterbath* pada kontrol suhu 50°C. Bobot total yang diperoleh setelah pengeringan disetarakan dengan bobot ekstrak yang ditambahkan pada formula liposom. Larutan presipitat liposom dibuat dalam konsentrasi 8 ppm. konsentrasi ini disterakan dengan konsentrasi ekstrak dalam memberikan 50% penghambatan terhadap radikal DPPH. **Tabel 4.7** menunjukkan hasil pengukuran persentase inhibisi ekstrak dan liposom pada konsentrasi 8 ppm.

Tabel 4. 6 Aktivitas Antiradikal Bebas Ekstrak dan Liposom

Sampel	Replikasi	Inhibisi (%)	Rerata ± SD
Ekstrak <i>S.alba</i>	1	50,48	50,40 ± 0,25*
	2	50,61	
	3	50,12	
Liposom	1	38,33	39,59 ± 3,38*
	2	39,44	
	3	41	

*Hasil persentase inhibisi berbeda bermakna secara statistik berdasarkan *uji paired t-test*

Tabel 4.8 menunjukkan terjadi penurunan kemampuan zat aktif dalam menghambat radikal DPPH setelah diformulasi dalam sistem liposom. Hasil uji statistik paired t-test pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara aktivitas penghambatan radikal bebas ekstrak dan liposom. Terdapat perbedaan persentase inhibisi antara ekstrak dan larutan presipitat dalam konsentrasi yang sama. Terdapat beberapa hal yang dapat menyebabkan penurunan persentase inhibisi, diantaranya yaitu efisiensi penjerapan, degradasi atau penurunan aktifitas senyawa zat aktif selama proses formulasi, dan ketepatan penimbangan presipitat. Efisiensi penjerapan yang dihasilkan pada penelitian ini adalah 95%, artinya terdapat 95% zat aktif yang berhasil terjerap oleh sistem liposom dan berada pada bagian presipitat setelah proses pemisahan. Sementara 5% bagian berada pada bagian bebas atau tidak terjerap pada sistem liposom, bagian ini terdapat pada supernatant setelah proses pemisahan. Oleh karena itu, presipitat liposom yang digunakan sebagai sampel uji tidak dapat menghasilkan penghambatan yang setara dengan ekstrak.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa;

- Formula liposom terdiri dari 150 mg fosfatidilkolin dan 50 mg kolesterol dengan variasi bobot 50 mg, 100 mg, dan 200 mg. Efisiensi penjerapan yang dihasilkan berturut-turut adalah 95,4884± 0,520744%; 94,8419 ± 0,409189%; dan 88,768 6± 0,337682. Ukuran partikel liposom yang terbentuk 2018 ± 228,30 nm dan indeks polidispersi 0,654 ± 0,056.
- Ekstrak etanol daun mangrove dengan konsentrasi 8 ppm mampu menghambat 50,40% radikal DPPH . Sementara dengan konsentrasi yang sama, liposom menghasilkan penghambatan DPPH 39,59 ± 3,38% pada konsentrasi yang sama.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahluwalia, V. K., & Dhingra, S. (2004). *Comprehensive Practical Organic Chemistry Qualitative Analysis*. Universities Press (India) Private Limited.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- Allen, Loyd. v., duakavich, Nicholas. G., & Ansel, Howard. C. (2014). *Bentuk Sediaan Farmasetis & Sistem Penghantaran Obat* (L. Hendriati & K. Foe, Eds.; 9th ed.). Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Alonso, C., Rubio, L., Touriño, S., Martí, M., Barba, C., Fernández-Campos, F., Coderch, L., & Luís Parra, J. (2014). Antioxidative effects and percutaneous absorption of five polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine*, 75, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.014>
- Anggraito, Y. U., Susanti, R., Iswari, R. S., Yuniastuti, A., Lisdiana, Nugrahaningsih, Habibah Noor Aini, & Bintari, S. H. (2018). *Metabolit Sekunder*

- dari Tanaman. Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang.
- Ariviani, S., Her, N., & Parnanto, R. (2013). Antioxidant Capacity of Snake Fruit (*Salacca edulis Reinw*) Cultivar Pondoh, Nglumut, Bali and Its Correlation to Total Phenolics and Ascorbic Acid Content. In *AGRITECH*, 33(3).
- Badal, S., & Delgoda, R. (2017). *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*. Elsevier
- Bakti, A., Triyasmono, L., & Rizki, M. I. (2017). Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Uji Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kasturi (*Mangifera casturi Kosterm.*) dengan Metode DPPH. *Jurnal Pharmascience*, 04(01), 102–108. <http://jps.unlam.ac.id/>
- Bal, Abhipsa., Samar Gourav, P., Falguni, P., & Biswaranjan, P. (2020). Modification of the Time of Incubation in colorimetric method for accurate determination of the total antioxidants capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl stable free radical. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.7324/JABB.2021.9421>
- Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I., & el Hady, S. (2013). Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2013.07.002>
- Binuni, R., Maarisit, W., Hariyadi, & Saroinsong, Y. (2020). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Mangrove *Sonneratia alba*. *Jurnal Biofarmasetikal Tropis*, 3(1), 79–85.
- Bordi, F., Cametti, C., & Sennato, S. (2006). Electrical Properties of Aqueous Liposome Suspensions. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* (Vol. 4, pp. 282–315). Elsevier.
- Budi, S. B., Dwi, S. T., & Hardoko. (2019). Phytochemicals and Identification of Antioxidant Compounds from Ethanol Extract of *Sonneratia alba* Leaves and Bark. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 95(11), 190–196. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2019-11.26>
- Cahyaningrum, P. L. (2022). *Monograf Buah Amla (Phyllanthus emblica L.): Khasiat Antioksidan dalam Sediaan Dekokta dan Loloh Ayurveda*. Media Sains Indonesia.
- Cahyono, B., & Suzery, M. (2018). *Metode Pemisahan Bahan Alam*. Kompas Ilmu.
- Candra, L. M. M., Andayani, Y., & Wirasisya, D. G. (2021). Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kandungan Fenolik Total dan Flavonoid Total Pada Ekstrak Etanol Buncis (*Phaseolus vulgaris L.*). *Jurnal Pijar Mipa*, 16(3), 397–405. <https://doi.org/10.29303/jpm.v16i3.2308>
- Chotphruethipong, L., Battino, M., & Benjakul, S. (2020). Effect of stabilizing agents on characteristics, antioxidant activities and stability of liposome loaded with hydrolyzed collagen from defatted Asian sea bass skin. *Food Chemistry*, 328, 127127. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127127>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. In *Pharmaceutics* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Das, S., Ray, A., Nasim, N., Nayak, S., & Mohanty, S. (2019). Effect of different extraction techniques on total phenolic and flavonoid contents, and antioxidant activity of betelvine and quantification of its phenolic constituents by validated HPTLC method. *3 Biotech*, 9(1), 37. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1565-8>
- Delta, M., Muhammad Hendri, dan, Jurusan Ilmu Kelautan, M., Sriwijaya, U., & Ilmu Kelautan, J. (2021). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun dan Kulit Batang Mangrove *Sonneratia alba* di Tanjung Carat, Kabupaten Banyuasin, Provinsi Sumatera Selatan. In *Maspari Journal* (Vol. 13, Issue 2, pp. 129–144).
- Dewi, N. L. A., Adnyani, L. P. S., Pratama, R. B. R., Yanti, N. N. D., Manibuy, J. I., & Warditiani, N. K. (2018). Pemisahan, Isolasi, dan Identifikasi Senyawa Saponin Dari Herba Pegagan (*Centella asiatica L. Urban*). *Jurnal Farmasi Udayana*, 68. <https://doi.org/10.24843/JFU.2018.v07.i02.p05>
- Dotulong, V., Damongilala, L. J., Wonggo, D., & Montolalu, L. A. D. Y. (2022). Antibacterial Activity of Secondary Metabolites Isolated from Mangrove Leaves *Sonneratia alba*. *JURNAL ILMIAH SAINS*, 22(2), 125. <https://doi.org/10.35799/jis.v22i2.42332>
- Eddy, D. R., Nursyamsiah, D., Permana, M. D., Solihudin, Noviyanti, A. R., & Rahayu, I. (2022). Green Production of Zero-Valent Iron (ZVI) Using Tea-Leaf Extracts for Fenton Degradation of Mixed Rhodamine B and Methyl Orange Dyes. *Materials*, 15(1), 332. <https://doi.org/10.3390/ma15010332>
- Erdilawati, & Safrida. (2018). *Potensi Antioksidan sebagai Antidiabetes*. Syah Kuala University Press.
- Farabi, K., Subaidah, W. A., & Hanifa, N. I. (2023). Optimasi Pelarut Pada Ekstraksi Senyawa Fenolik Dari Daun Kelor (*Moringa oleifera L.*) Menggunakan Simplex Lattice Design. *Jurnal Kedokteran Unram*, 2023(1), 1258–1264.
- Favareto, R., Teixeira, M. B., Soares, F. A. L., Belisário, C. M., Cabral, J. F., da Silva, E. A., Moia, T. A., & Cardozo-Filho, L. (2019). Extraction of bioactive compounds of leaves of *duguetia furfuracea (annonaceae)* using green and organic solvents. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36(1), 549–556.

<https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190361s20170451>

- Febriyenti, Putra, D. P., Wicaksanti, E. I., & Hamami, C. D. (2018). *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 5(2).
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2012). *Kimia Farmasi Analisis* (2nd ed.). Pustaka Pelajar
- Gęgotek, A., & Skrzydlewska, E. (2022). Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Ascorbic Acid. *Antioxidants*, 11(10), 1993. <https://doi.org/10.3390/antiox11101993>
- Handajani, F. (2019). *Oksidan dan Antioksidan pada Beberapa Penyakit dan Proses Penuaan*. Zifatama Jawa.
- Handayani, H., & Heppy Sriherfyna, F. (2016). *Antioxidant Extraction of Soursop Leaf with Ultrasonic Bath (Study of Material: Solvent Ratio and Extraction Time)* (Vol. 4, Issue 1).
- Harborne, J. B. (1984). *Phytochemical Methods*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5570-7>
- Harlina. (2022). *Monograf Potensi Bahan Alam dan Peningkatan Sistem Imun*. Nas Media Indonesia.
- Hua, S., & Wu, S. Y. (2013). The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. *Frontiers in Pharmacology*, 4 NOV. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00143>
- Ibrahim, A. M., Yuniarta & Sriherfyna, H, F. (2015). Effect of Temperature and Extraction Time on Physicochemical Properties of Red Ginger (*Zingiber officinale var. Rubrum*) Extract with The Additional of Honey Combination as Sweetener for Functional Drink. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* (Vol. 3, Issue 2).
- Ikalinus, R., Widyastuti, S. K., Luh, N., & Setiasih, E. (2015). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa oleifera*) Phytochemical Screening Ethanol Extract Skin Stem Moringa (*Moringa oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*, 4(1), 71–79.
- Irianti, Tanti. T., Kuswandi, Nuranto, S., & Purwanto. (2021). *Antioksidan dan Kesehatan*. Gadjah Mada University Press.
- Irnameria, D., & Okfrianti, Y. (2023). Differences In the Antioxidant Activity of Sungkai Leaf Extract Using Methanol And Aquades Solvents. *AGRITEPA: Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pertanian*, 10(1), 219–228. <https://doi.org/10.37676/agritepa.v10i1.3158>
- Julianto, T. S. (2019). *Fitokimia Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia*. Universitas Islam Indonesia.
- Kaddah, S., Khreich, N., Kaddah, F., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2018). Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. *Food and Chemical Toxicology*, 113, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.017>
- Kawashima, S., Funakoshi, T., Sato, Y., Saito, N., Ohsawa, H., Kurita, K., Nagata, K., Yoshida, M., & Ishigami, A. (2018). Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage. *Scientific Reports*, 8(1), 16199. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34530-4>
- Kemit, N., Dewa Gde Mayun Permana dan Pande Ketut Diah Kencana Program Pascasarjana, I., Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, P., & Teknologi Pertanian, F. (2019). Stabilitas Senyawa Flavonoid Ekstrak Daun Alpukat (*Persea Americana Mill.*) Terhadap Perlakuan Ph Dan Suhu Flavonoid Stability of Avocado Leaf (*Persea americana Mill.*) Extract on pH and Temperature Treatment. *Media Ilmiah Teknologi Pangan (Scientific Journal of Food Technology)*, 6(1), 34–42.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*. Dalam *The Scientific World Journal* (Vol. 2013). *ScientificWorld Ltd.* <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kusuma, A. E., & Yolanda, A. (2020) Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Afrika (*Vernonia Arborea Buch-Ham*) Dengan Metode DPPH. Sitawa : *Jurnal Farmasi Sains Dan Obat Tradisional I(1)*
- Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., & Fessi, H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1(2), 147–168. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2012.1020>
- Larasati, T. D., Alham, N. R., Wulandari, R., Putri, R. I., Kholifah, N. A., & Utomo, P. K. (2023). *Proceedings of the International Conference of Tropical Studies and Its Applications (ICTROPS 2022)*. Atlantis Press International BV. <https://doi.org/10.2991/978-94-6463-180-7>
- Leba, M. A. U. (2017). *Ekstraksi dan Real Kromatografi*. Sleman : Deepublish.
- Martini, H. F., Nath, Judi. L., & Bartholomew, F. E. (2015). *Fundamentals of Anatomy and Physiology* (9th ed.). Pearson education.
- Molole, G. J., Gure, A., & Abdissa, N. (2022). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of *Commiphora mollis* (Oliv.) Engl. resin. *BMC Chemistry*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13065-022-00841-x>
- Morada, N. J., Metillo, E. B., Uy, M. M., & Oclarit, J. M. (2016). Toxicity and hypoglycemic effect of

- tannin-containing extract from the mangrove tree *Sonneratia alba* Sm. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, 5(6), 58–64.
- Muflihah, Y. M., Gollavelli, G., & Ling, Y. C. (2021). Correlation study of antioxidant activity with phenolic and flavonoid compounds in 12 Indonesian indigenous herbs. *Antioxidants*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/antiox10101530>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nafisi, S., & Maibach, H. I. (2018). Skin penetration of nanoparticles. In *Emerging Nanotechnologies in Immunology* (pp. 47–88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40016-9.00003-8>
- Nofita, S. D., Ngibad, K., & Rodli, A. F. (2022). Determination of percentage yield and total phenolic content of ethanol extract from purple passion (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) fruit peel. *Jurnal Pijar Mipa*, 17(3), 309–313. <https://doi.org/10.29303/jpm.v17i3.3461>
- Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., & Alshaer, W. (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. In *Heliyon* (Vol. 8, Issue 5). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>
- Nugroho, A. (2017). *Teknologi Bahan Alam*. Lambung Mangkurat University Press.
- Ohba, T., Ishisaka, M., Tsujii, S., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Kubo, K., Umigai, N., Iwawaki, T., & Hara, H. (2016). Crocetin protects ultraviolet A-induced oxidative stress and cell death in skin in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 789, 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.07.036>
- Ong, S. G. M., Ming, L. C., Lee, K. S., & Yuen, K. H. (2016). Influence of the encapsulation efficiency and size of liposome on the oral bioavailability of griseofulvin-loaded liposomes. *Pharmaceutics*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8030025>
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K., & Levine, M. (2003). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18–35. <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719272>
- Patil, Y. P., & Jadhav, S. (2014). Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>
- Pobłocka-Olech, L., Migas, P., & Krauze-Baranowska, M. (2018). TLC determination of some flavanones in the buds of different genus *Populus* species and hybrids. *Acta Pharmaceutica*, 68(2), 199–210. <https://doi.org/10.2478/acph-2018-0018>
- Poljšak, B., & Dahmane, R. (2012). Free radicals and extrinsic skin aging. In *Dermatology Research and Practice* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/135206>
- Popovska, O. (2014). An overview: Methods For Preparation And Characterization Of Liposomes As Drug Delivery Systems. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 3(3).
- Prananta, Y. E., Rakhman, K. A., & Saleh, J. (2020). Antioxidant activities of red jaban (*Anthocephalus macrophyllus*) ethanol extract. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 415(1), 012026. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/415/1/012026>
- Rahman, Latifah., Ismail, Isriany., & Wahyudin, Ely, (2011). Kapasitas Jerap Niosom terhadap Ketoprofen dan Prediksi Penggunaan Transdermal. *Majalah Farmasi Indonesia*, 22(2)
- Rahmawati, S. I., Rahman Zein, E., Listanti, E., & Siti Nurlaela, R. (2017). Yield And Antioxidant Of Simplicia From *Peperomia Pellucida* Using Drum Dryer, Tray Dryer, And Solar Dryer Drying Method. In *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology* (Vol. 5, Issue 3). <http://iraj.in>
- Rawski, R. I., Sanecki, P. T., Kijowska, K. M., Skitat, P. M., & Saletnik, D. E. (2016). Regression analysis in analytical chemistry. Determination and validation of linear and quadratic regression dependencies. *South African Journal of Chemistry*, 69. <https://doi.org/10.17159/0379-4350/2016/v69a20>
- Refai, H., Hassan, D., & Abdelmonem, R. (2017). Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate. *Drug Delivery*, 24(1), 278–288. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1247925>
- Rusli, Z., Sari, B. L., Utami, N. F., & Sabila, S. (2020). Optimization Of Microwave-Assisted Extraction Of Flavonoids From Binahong (*Anredera cordifolia*) Leaves Using Respon Surface Methodology. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 7(3), 10–19. <https://doi.org/10.33096/jffi.v7i3.596>

- Rusyiana, R., Lestarini, I. A., Hamdin, C. D., & Muliastari, H. (2021). Anticoagulant activity of mangrove (*avicennia alba*) leaves extract in vitro. *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 26(2), 110–116. <https://doi.org/10.14710/IK.IJMS.26.2.110-116>
- Saad, S., Taher, M., Susanti, D., Qaralleh, H., & Awang, A. F. I. B. (2012). In vitro antimicrobial activity of mangrove plant *Sonneratia alba*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(6), 427–429. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60069-0](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60069-0)
- Santos, E. L., Maia, B. H. L. N. S., Ferriani, A. P., & Teixeira, S. D. (2017). Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. In *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67861>
- Sasmito, B. B. (2020). Pengaruh Suhu Dan Waktu Penyeduhan Teh Hijau Daun *Sonneratia Alba* Terhadap Aktivitas Antioksidannya. *JFMR- Journal of Fisheries and Marine Research*, 4(1), 109–115. <https://doi.org/10.21776/ub.jfmr.2020.004.01.16>
- Sasmito, B. B., Sulistiyati, T. D., & Hardoko. (2019). Phytochemicals And Identification Of Antioxidant Compounds From Ethanol Extract Of *Sonneratia Alba* Leaves And Bark. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 95(11), 190–196. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2019-11.26>
- Sasmito, B. B., Sulistiyati, T. D., & Hardoko. (2019). Phytochemicals And Identification Of Antioxidant Compounds From Ethanol Extract Of *Sonneratia Alba* Leaves And Bark. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 95(11), 190–196. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2019-11.26>
- Schirmer, R. E. (1991). *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis* (2nd ed.). CRC Press.
- Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Palma, M., & Barroso, C. G. (2016). *Stability of 40 phenolic compounds during ultrasound-assisted extractions (UAE)*. 080009. <https://doi.org/10.1063/1.4958517>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Sharif Hossain, A., Moneruzzaman Khandaker, M., Feisal Merican, A., & Faruq, G. (2014). Antioxidant and Antibacterial Activities of Different Extracts and Fractions of a Mangrove Plant *Sonneratia alba* Taxonomy and ecology of Black fly, *Simulium* spp. View project Plant growth regulators on growth, development and quality of Wax apple View project. In *Article in International Journal of Agriculture and Biology*. <http://www.fspublishers.org>
- Sopiah, B., Muliastari, H., & Yuanita, E. (2019). Skrining Fitokimia dan Potensi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Hijau dan Daun Merah Kastuba. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 17(1), 27. <https://doi.org/10.35814/jifi.v17i1.698>
- Stratil, P., Klejduš, B., & Kubáň, V. (2006). Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 607–616. <https://doi.org/10.1021/jf052334j>
- Susanti, R. F., & Natalia, D. (2016). Pengaruh Penambahan Filler dan Suhu Pengeringan terhadap Kandungan Antioksidan pada Daun *Physalis angulata* yang Diperoleh dengan Ekstraksi Menggunakan Air Subkritik. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia*.
- Tiwari, S., & Talreja, S. (2022). Thin Layer Chromatography (TLC) VS. Paper Chromatography: A Review. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, 05–09. <https://doi.org/10.31080/asps.2022.06.0894>
- Widyasanti, A., Rohdiana, D., Ekatama, N., Pertanian, D. T., & Biosistem, D. (2016). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Teh Putih (*Camellia Sinensis*) Dengan Metode DPPH (2,2 Difenil-1-Pikrilhidrazil) Antioxidant Activities of White Tea Extract (*camellia sinensis*) Using DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) Method. In *FORTECH* (Vol. 1, Issue 1). <http://ejournal.upi.edu/index.php>
- Yuliantari, Wayan, N., A., Rai, W., Dan I, W., Gede, D., & Permana, M. (2017). Pengaruh Suhu dan Waktu Ekstraksi Terhadap Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) Menggunakan Ultrasonik. *Media Ilmiah Teknologi Pangan*, 4(1), 35-42
- Yulizar, Y., Kusriani, E., Apriandanu, D. O. B., & Nurdini, N. (2020). Datura metel L. Leaves extract mediated CeO₂ nanoparticles: Synthesis, characterizations, and degradation activity of DPPH radical. *Surfaces and Interfaces*, 19, 100437. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2020.100437>
- Yuniati, R., Zainuri, M., & Kusumaningrum, H. (2020). Qualitative Tests of Secondary Metabolite Compounds in Ethanol Extract of *Spirulina platensis* from Karimun Jawa Sea. *Indonesia Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 12(3), 343–349. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v12i3.23153>
- Yuniwati, M., Tanadi, K., Andaka, G., & Kusmartono, B. (2019). Pengaruh Waktu, Suhu dan Kecepatan Pengadukan Terhadap Proses Pengambilan Tannin Dari Pinang. In *Jurnal Teknologi* (Vol. 12).