

**TOKSISITAS FORMULASI SEDIAAN NANOEMULSI
KOMBINASI EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica* L.) DAN
JINTAN HITAM (*Nigella sativa* L.) PADA IKAN ZEBRA**

SKRIPSI

Untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)



**SOFA TASYA KAMILA
22613112**

**PROGRAM STUDI FARMASI PROGRAM SARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
2026**

PERSETUJUAN PENDADARAN

**TOKSISITAS FORMULASI SEDIAAN NANOEMULSI
KOMBINASI EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica* L.) DAN
JINTAN HITAM (*Nigella sativa* L.) PADA IKAN ZEBRA**



Yang diajukan oleh :
SOFA TASYA KAMILA
22613112

untuk dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Program Sarjana Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Pembimbing Utama

(Dr. apt. Farida Hayati, S.Si., M.Si)

Tanggal: 24 Mei 2026

Pembimbing Pendamping

(apt. Cynthia Astiti Putri, S.Farm., M.Si)

Tanggal: 24 Mei 2026

SKRIPSI
TOKSISITAS FORMULASI SEDIAAN NANOEMULSI
KOMBINASI EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica* L.) DAN
JINTAN HITAM (*Nigella sativa* L.) PADA IKAN ZEBRA

Yang diajukan oleh :

SOFA TASYA KAMILA

22613112

Telah lolos uji etik penelitian

dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi

Program Studi Farmasi Program Sarjana Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 7 Juli 2026

PEMBIMBING

Utama : Dr. apt. Farida Hayati, S.Si., M.Si ()

Pendamping : apt. Cynthia Astiti Putri S.Farm., M.Si ()

PENGUJI

Ketua : Dr. apt. Arba Pramundita Ramadani, M.Sc ()

Anggota : 1. Dr. apt. Lutfi Chabib, S.Farm., M.Sc. ()

2. Dr. apt. Farida Hayati, S.Si., M.Si. ()

3. apt. Cynthia Astiti Putri S.Farm., M.Si ()

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia




apt. Saepudin, S.Si., M.Si., Ph.D.



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 20 Mei 2026

Penulis,



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sofa'.

Sofa Tasya Kamila

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat, taufik, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Toksistas Formulasi Sediaan Nanoemulsi Kombinasi Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* L.) dan Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) pada Ikan Zebra”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Universitas Islam Indonesia. Penulis menyadari bahwa penyelesaian skripsi ini tidak terlepas dari dukungan, bimbingan, dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. apt. Farida Hayati, S.Si., M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama dan apt. Cynthia Astiti Putri, S.Farm., M.Si selaku Dosen Pembimbing Pendamping, yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam memberikan bimbingan, arahan, serta masukan yang sangat berarti selama proses penyusunan skripsi ini.
2. Dr. apt. Arba Pramundita Ramadani, S.Farm., M.Sc. dan Dr. apt. Lutfi Chabib, S.Farm., M.Sc. selaku Dosen Penguji, yang telah memberikan saran dan masukan yang membangun demi penyempurnaan skripsi ini.
3. Dr. apt. Asih Triastuti, S.F., M.Pharm selaku Dosen Pembimbing Akademik, yang telah memberikan bimbingan dan arahan selama penulis menempuh studi di Program Studi Farmasi Universitas Islam Indonesia.
4. Seluruh dosen Program Studi Farmasi Universitas Islam Indonesia yang telah memberikan ilmu, wawasan, dan pengalaman berharga selama penulis duduk di bangku perkuliahan.
5. Bapak dan Alm ibu tercinta, yang senantiasa memberikan doa yang tak pernah putus, kasih sayang yang tak terhingga, serta dukungan penuh dalam setiap langkah perjalanan penulis hingga sampai pada titik ini. Kakak dan adik tersayang, yang selalu menjadi penyemangat dan penghibur di setiap momen. Eyang laki dan Alm eyang putri, serta ninik tercinta, yang doa dan

restunya selalu menjadi kekuatan terbesar bagi penulis dalam menjalani setiap proses.

6. Tim penelitian multispecies, Puti, Karin, Wakar, Mba Dede, Mba Nisya dan Mba Salwa yang telah bersama-sama berjuang dan saling mendukung selama proses penelitian berlangsung, serta Khanza Adinda Salsabila, yang tidak hanya menjadi rekan dalam penelitian ini tetapi juga teman seperjuangan dalam berbagai kompetisi PKM dan lomba kepenulisan selama dua tahun terakhir. Terima kasih telah mau berkeliling Indonesia bersama, melewati segala lelah, tangis, dan perjuangan berat di tengah padatnya perkuliahan, hingga bersama-sama melangkah ke panggung PIMNAS.
7. Sahabat-sahabat seperjuangan, Najwa, Nanda, Alma, dan Cesa, yang selalu hadir memberikan semangat, tawa, dan dukungan di setiap suka maupun duka selama masa perkuliahan.
8. Teman-teman praktikum kelas F dan teman-teman kelas B Program Studi Farmasi Universitas Islam Indonesia angkatan 2022, atas kebersamaan dan kekompakan yang telah mewarnai perjalanan studi penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan di masa mendatang. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan bagi semua pihak yang telah terlibat.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Yogyakarta, 20 Mei 2026

Penulis,



Sofa Tasya Kamila

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERSETUJUAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
INTISARI.....	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Luaran Penelitian	2
1.5 Integrasi dengan Nilai Keislaman	3
1.6 Manfaat Penelitian	3
BAB II KAJIAN PUSTAKA	5
2.1 Telaah Pustaka	5
2.1.1 Pegagan (<i>Centella asiatica</i> L.)	5
2.1.2 Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i>)	6
2.1.3 Teknologi Nanoemulsi pada Herbal.....	8
2.1.4 Profil Keamanan Eksipien Nanoemulsi	9
2.1.5 Evaluasi Sediaan Nanoemulsi	13
2.1.6 Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>).....	14
2.1.7 <i>Fish Acute Toxicity Test</i> (FAT).....	16
2.1.8 Pemeriksaan Histopatologi pada Ikan Zebra.....	17
2.2 Landasan Teori.....	17

2.3	Hipotesis.....	18
2.4	Kerangka Konsep Penelitian.....	19
BAB III METODE PENELITIAN		20
3.1	Bahan Penelitian	20
3.2	Alat Penelitian.....	20
3.3	Subjek Uji	20
3.4	Cara Kerja Penelitian	20
3.4.1	Pengajuan <i>Ethical Clearance</i>	20
3.4.2	Pengujian Parameter Spesifik.....	21
3.4.3	Pengujian Parameter Non-Spesifik	21
3.4.4	Formulasi Nanoemulsi	23
3.4.5	Evaluasi Sediaan Nanoemulsi	24
3.4.6	Penyiapan Hewan Uji.....	24
3.4.7	Perlakuan Hewan Uji	27
3.4.8	Pengamatan Tanda Klinis.....	28
3.4.9	Penanganan Hewan Uji Paska Pengujian.....	31
3.5	Analisis Data	31
3.5.1	Analisis Kualitatif	31
3.5.2	Analisis Kuantitatif	31
3.6	Alur Penelitian	32
BAB IV		33
HASIL DAN PEMBAHASAN		33
4.1	Pengujian Parameter Spesifik	33
4.2	Pengujian Parameter Non Spesifik	34
4.2.1.	Kadar Air.....	34
4.2.2.	Kadar Abu	35
4.2.3.	Kadar Abu Tidak Larut Asam.....	35
4.2.4.	Pengujian Cemarkan Logam Berat	35
4.3	Hasil Evaluasi Sediaan Nanoemulsi	37
4.3.1.	Hasil Uji Organoleptik	37
4.3.2.	Hasil Uji Persen Transmittansi.....	37

4.3.3. Hasil Uji Sentrifugasi	38
4.3.4. Hasil Uji Ukuran Partikel, <i>Polydispersity Index</i> dan Zeta Potensial..	38
4.3.5. Hasil Uji Viskositas.....	39
4.3.6. Hasil Uji Homogenitas	40
4.3.7. Hasil Uji <i>Freeze Thaw Cycle</i>	40
4.4 Hasil Uji <i>Fish Acute Toxicity</i>	41
4.4.1 Hasil Pengamatan Tanda Klinis	41
4.4.2 Mortalitas Ikan Zebra dan Nilai LC_{50}	47
4.4.3 Hasil Pengamatan Histopatologi	48
BAB V.....	51
5.1 Kesimpulan.....	51
5.2 Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN.....	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Pegagan	5
Gambar 2.2 Tanaman Jintan	7
Gambar 2.3 Preparasi Nanoemulsi Dan Jalur Penghantarannya	9
Gambar 2.4 Ikan Zebra	14
Gambar 2.5 Anatomi <i>Zebrafish</i>	15
Gambar 2.6 Kerangka Konsep Penelitian.....	19
Gambar 4.1. Hasil identifikasi Senyawa Thymoquinone.....	33
Gambar 4. 2. Hasil Uji Sentrifugasi Nanoemulsi	38
Gambar 4. 3 Hasil Uji Homogenitas Nanoemulsi	40
Gambar 4. 4. Gambaran histopatologi jaringan hati <i>Danio rerio</i>	48

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kategori Akut bahan berbahaya bagi perairan	23
Tabel 3.1 Formulasi Nanoemulsi	23
Tabel 3.2 Kelompok dan Perlakuan Hewan Uji.....	26
Tabel 3.3 Jadwal Pengamatan	28
Tabel 3.4 Sistem Skoring Tanda Klinis pada Uji Toksisitas Akut Ikan Zebra	29
Tabel 3.5 Parameter Pengamatan Histopatologi	30
Tabel 3.6 Skoring Histopatologi.....	31
Tabel 4. 1 Hasil Identifikasi Cemaran Logam Berat.....	35
Tabel 4. 2 Hasil Pengamatan Organoleptik.....	37
Tabel 4. 3 Hasil Pengujian Persen Transmittansi	37
Tabel 4.4 Hasil pengujian ukuran partikel, polydispersity index dan zeta potensial	38
Tabel 4.5 Hasil Pengujian Viskositas.....	39
Tabel 4.6 Hasil Uji Stabilitas <i>Freeze-Thaw Cycle</i>	41
Tabel 4.7 Skor Tanda Klinis Ikan Zebra Selama 96 Jam Pengamatan pada Berbagai Kelompok Perlakuan.....	42
Tabel 4.8 Median Skor Histopatologi Jaringan Hati <i>Zebrafish</i> pada Berbagai Kelompok Perlakuan.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i>	60
Lampiran 2. Hasil Identifikasi Hewan Uji	61
Lampiran 3. Sertifikat Pengujian Cemaran Logam Berat	63
Lampiran 4. Hasil Identifikasi Kandungan Senyawa <i>Thymoquinone</i>	65
Lampiran 5. Hasil Uji Persen Transmittansi	69
Lampiran 6. Hasil Karakterisasi Nanoemulsi.....	70
Lampiran 7. Hasil Perhitungan Konsentrasi Nanoemulsi Pegagan dan Jintan Hitam	76
Lampiran 8. Hasil perhitungan konsentrasi ekstrak jintan dan pegagan yang terkandung dalam nanoemulsi.....	77
Lampiran 9. Perhitungan Parameter Non Spesifik.....	78
Lampiran 10. Evaluasi Sediaan	78
Lampiran 11. <i>Fish Acute Toxicity</i>	80
Lampiran 12. Tanda-tanda klinis yang diamati pada ikan	82
Lampiran 13. Lembar Pengamatan Tanda Klinis.....	84
Lampiran 14. Rubrik Penilaian Tanda Klinis.....	85
Lampiran 15. Hasil Pengamatan Histopatologi.....	90

TOKSISITAS FORMULASI SEDIAAN NANOEMULSI KOMBINASI EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica* L.) DAN JINTAN HITAM (*Nigella sativa* L.) PADA IKAN ZEBRA

Sofa Tasya Kamila

Program Studi Farmasi Program Sarjana INTISARI

Latar Belakang: Pegagan dan jintan hitam mengandung *asiaticoside* dan *thymoquinone* yang bersifat antiinflamasi dan antioksidan. Rendahnya kelarutan dan bioavailabilitas kedua senyawa dapat ditingkatkan melalui sistem penghantaran nanoemulsi. Namun, ukuran partikel nano berpotensi memengaruhi profil keamanan sehingga diperlukan uji toksisitas akut.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi karakteristik fisikokimia sediaan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan jintan hitam, serta menganalisis profil toksisitasnya terhadap ikan zebra berdasarkan perubahan tanda klinis, nilai LC_{50} , dan gambaran histopatologi hati.

Metode: Penelitian eksperimental dengan desain *post-test control group only* menggunakan 49 ikan zebra yang dibagi menjadi 7 kelompok. Evaluasi sediaan nanoemulsi meliputi organoleptik, persen transmittan, viskositas, ukuran partikel, *polydispersity index*, dan zeta potensial, serta stabilitas sediaan melalui uji sentrifugasi dan *freeze-thaw cycle*. Uji toksisitas akut dilakukan selama 96 jam menggunakan *Fish Acute Toxicity* (FAT) OECD Guideline No. 203. Parameter toksisitas yang diamati meliputi perubahan tanda klinis, mortalitas untuk penentuan nilai LC_{50} menggunakan analisis probit, serta perubahan histopatologi hati yang dianalisis menggunakan uji Jonckheere–Terpstra.

Hasil: Evaluasi sediaan nanoemulsi menunjukkan karakteristik fisikokimia yang baik, meliputi penampilan organoleptik yang homogen, nilai persen transmittan $91,7 \pm 0\%$, viskositas $72,57 \pm 0,25$ cP, ukuran partikel $144,5 \pm 0,32$ nm, PI $0,454 \pm 0,01$, zeta potensial $-31,6 \pm 0,1$ mV, serta stabilitas yang baik tanpa pemisahan fase pada uji sentrifugasi maupun *freeze-thaw cycle*. Pengamatan toksisitas akut menunjukkan peningkatan tanda klinis seiring bertambahnya konsentrasi dan lama paparan, namun tidak ditemukan kematian ikan selama 96 jam. Sehingga nilai LC_{50} diperkirakan lebih dari 800 ppm. Pengamatan histopatologi hati menunjukkan perubahan ringan hingga sedang, dengan hanya parameter vakuolisasi sitoplasma yang menunjukkan tren peningkatan signifikan seiring meningkatnya konsentrasi perlakuan ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan jintan hitam memiliki karakteristik fisikokimia yang baik dan menunjukkan toksisitas akut yang rendah pada ikan zebra berdasarkan tanda klinis, histopatologi hati, dan nilai $LC_{50} > 800$ ppm yang tidak diklasifikasikan sebagai berbahaya akut terhadap organisme akuatik menurut GHS.

Kata Kunci: *Centella asiatica*, *Nigella sativa*, *Fish Acute Toxicity*, *Danio rerio*

**TOXICITY OF THE FORMULATION OF NANOEMULSION
COMBINATION OF PEGAGAN EXTRACT (*Centella asiatica* L.) AND
BLACK CUMIN (*Nigella sativa* L.) IN ZEBRA FISH**

Sofa Tasya Kamila

**Pharmacy Study Program, Undergraduate Program
ABSTRACT**

Background: *Centella asiatica* and black cumin contain *asiaticoside* and *thymoquinone*, which possess anti-inflammatory and antioxidant properties. The low solubility and bioavailability of these two compounds can be improved through a nanoemulsion delivery system. However, the size of the nanoparticles has the potential to affect the safety profile, making acute toxicity testing necessary.

Objective: This study aims to evaluate the physicochemical characteristics of a combined nanoemulsion formulation of gotu kola and black cumin extracts, as well as to analyze its toxicity profile in zebrafish based on changes in clinical signs, LC₅₀ values, and liver histopathology.

Methods: This was an experimental study with a post-test control group-only design involving 49 zebrafish divided into 7 groups. Evaluation of the nanoemulsion formulation included organoleptic assessment, transmittance percentage, viscosity, particle size, polydispersity index, and zeta potential, as well as formulation stability assessed via centrifugation and freeze-thaw cycle tests. An acute toxicity test was conducted over 96 hours using the OECD Guideline No. 203 for Fish Acute Toxicity (FAT). The toxicity parameters observed included changes in clinical signs, mortality for determining the LC₅₀ value using probit analysis, and histopathological changes in the liver analyzed using the Jonckheere–Terpstra test.

Results: Evaluation of the nanoemulsion formulation revealed favorable physicochemical characteristics, including a homogeneous organoleptic appearance, a transmittance value of $91.7 \pm 0\%$, viscosity of 72.57 ± 0.25 cP, particle size of 144.5 ± 0.32 nm, PI of 0.454 ± 0.01 , zeta potential of -31.6 ± 0.1 mV, and good stability with no phase separation in either the centrifugation test or the freeze-thaw cycle. Acute toxicity observations showed an increase in clinical signs as concentration and exposure duration increased; however, no fish deaths were observed over 96 hours. Thus, the LC₅₀ value is estimated to be greater than 800 ppm. Histopathological observations of the liver revealed mild to moderate changes, with only the cytoplasmic vacuolization parameter showing a significant increasing trend as treatment concentration increased ($p < 0.05$).

Conclusion: The nanoemulsion combining gotu kola and black cumin extracts possesses favorable physicochemical characteristics and exhibits low acute toxicity in zebrafish based on clinical signs, liver histopathology, and an LC₅₀ value >800 ppm, which is not classified as acutely hazardous to aquatic organisms according to the GHS.

Keywords: *Centella asiatica*, *Nigella sativa*, Fish Acute Toxicity, *Danio rerio*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Pegagan (*Centella asiatica* L.) diketahui memiliki aktivitas penyembuhan luka melalui modulasi inflamasi, peningkatan sintesis kolagen, dan aktivitas antioksidan (Witkowska *et al.*, 2023). Senyawa aktif utamanya, *asiaticoside* yang berperan penting dalam mendukung proses regenerasi jaringan. Sementara itu, jintan hitam (*Nigella sativa* L.) juga memiliki potensi terapeutik yang luas, dengan aktivitas imunomodulator, antimikroba, dan pengatur metabolisme. Komponen bioaktif utamanya adalah *thymoquinone*, yang memiliki efek antiinflamasi, antioksidan, hepatoprotektif, serta memberikan proteksi terhadap gangguan saluran cerna (Jarmakiewicz-Czaja *et al.*, 2023).

Meskipun memiliki aktivitas biologis yang kuat, senyawa aktif dari kedua tanaman tersebut memiliki keterbatasan sifat fisikokimia. *Thymoquinone* merupakan senyawa bioaktif jintan hitam yang bersifat hidrofobik, memiliki kelarutan air yang rendah, dan rentan mengalami degradasi (K. Ibrahim *et al.*, 2024). Selain itu, *asiaticoside* merupakan bioaktif pegagan yang dilaporkan memiliki kelarutan dan bioavailabilitasnya yang rendah dan hampir tidak larut dalam air (Kumar *et al.*, 2024). Keterbatasan ini berpotensi menurunkan efektivitas terapeutik obat apabila tidak didukung oleh sistem penghantaran yang sesuai.

Untuk mengatasi keterbatasan tersebut, dikembangkan sistem nanoemulsi tipe *oil-in-water* (O/W) sebagai sistem penghantaran bahan aktif untuk pengembangan sediaan topikal. Sistem ini dipilih karena mampu meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas senyawa aktif yang sukar larut dalam air melalui pembentukan droplet berukuran <200 nm (Harwansh *et al.*, 2019) sehingga memperluas area kontak dan mendukung peningkatan penetrasi zat aktif (Helsawati *et al.*, 2023). Selain itu, nanoemulsi memiliki kestabilan sistem yang baik sehingga mampu mempertahankan homogenitas formulasi dalam jangka waktu tertentu. Sebelum digunakan lebih lanjut, sediaan ini perlu dievaluasi secara fisikokimia, meliputi karakterisasi dan uji stabilitas untuk memastikan kualitas serta konsistensi formulasi (Widyastuti & Saryanti, 2023).

Dalam mendukung aspek keamanan sediaan, penelitian sebelumnya melaporkan bahwa sediaan SNEDDS jintan hitam memiliki nilai LC_{50} sebesar 154,63 ppm (Utami & Miladiyah, 2020), sedangkan ekstrak etanol daun *Centella asiatica* memiliki nilai LC_{50} sebesar 1250 ppm (Zakaria *et al.*, 2019). Namun, hingga saat ini belum terdapat laporan mengenai uji toksisitas akut nanoemulsi kombinasi pegagan dan jintan hitam pada ikan zebra. Oleh karena itu, pengujian toksisitas praklinik dilakukan untuk memperoleh data toksikologi sebagai dasar penilaian keamanan suatu sediaan uji (BPOM RI, 2022). Evaluasi toksisitas dalam penelitian ini dilakukan menggunakan *Fish Acute Toxicity Test* (FAT) sesuai OECD *Guideline* No. 203 melalui penentuan nilai LC_{50} , pengamatan tanda klinis, dan pemeriksaan histopatologi organ target sebagai metode skrining awal yang komprehensif (Jamir *et al.*, 2024).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil evaluasi karakteristik fisikokimia sediaan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dan jintan hitam (*Nigella sativa* L.)?
2. Bagaimana profil toksisitas formulasi sediaan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan jintan hitam terhadap ikan zebra (*Danio rerio*) berdasarkan perubahan tanda klinis, nilai LC_{50} , dan gambaran histopatologi hati pada berbagai konsentrasi uji?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengevaluasi karakteristik fisikokimia sediaan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dan jintan hitam (*Nigella sativa* L.)
2. Menganalisis profil toksisitas formulasi sediaan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan jintan hitam terhadap ikan zebra (*Danio rerio*) berdasarkan perubahan tanda klinis, nilai LC_{50} , dan gambaran histopatologi hati pada berbagai konsentrasi uji.

1.4 Luaran Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan artikel ilmiah yang layak dipublikasikan pada jurnal ilmiah nasional maupun internasional serta data pendukung keamanan formulasi nanoemulsi kombinasi ekstrak Pegagan dan Jintan Hitam.

1.5 Integrasi dengan Nilai Keislaman

Penelitian ini merupakan salah satu bentuk pembuktian atas kekuasaan Allah SWT yang telah menciptakan tanaman obat untuk mengobati berbagai penyakit. Hal ini seperti yang tertuang pada Al-Quran Surat Asy-Syu'ara ayat 80. Allah Subhanahu wa Ta'ala berfirman:

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ

“Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku” (QS. Asy-Syu'ara ayat 80)

Ayat ini menegaskan bahwa kesembuhan sejati berasal dari Allah SWT, sedangkan penelitian dan pengobatan hanyalah bentuk ikhtiar manusia. Penelitian ini merupakan wujud ikhtiar ilmiah untuk memanfaatkan ciptaan Allah berupa tumbuhan yang berkhasiat, sekaligus memastikan keamanannya melalui pendekatan ilmiah. Dengan demikian, penelitian ini menjadi bukti bahwa ilmu pengetahuan dan keimanan dapat berjalan sejalan dalam mencari solusi kesehatan yang aman dan bermanfaat bagi umat manusia.

Disebutkan juga dalam Shahih Al-Bukhari tercantum sebuah hadits yang dikutip dari Abu Hurairah radhiyallahu 'anhu, bahwasanya Nabi shallallahu 'alaihi wa sallam bersabda:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

“Tidaklah Allah menurunkan suatu penyakit, melainkan Allah juga menurunkan obatnya” (HR. Bukhari, no. 5354)

Hadis ini memperkuat keyakinan bahwa setiap penyakit memiliki obat yang Allah ciptakan, dan manusia diperintahkan untuk berikhtiar menemukannya. Penelitian ini merupakan wujud ikhtiar tersebut dengan mengkaji potensi Pegagan dan Jintan Hitam sebagai obat herbal serta memastikan keamanannya melalui uji toksisitas, sebagai bentuk syukur dan pengabdian kepada Allah SWT.

1.6 Manfaat Penelitian

1. Memberikan data ilmiah mengenai tingkat toksisitas (LC₅₀), perubahan tanda klinis, dan histopatologi hati ikan zebra setelah paparan formulasi nanoemulsi kombinasi ekstrak Pegagan dan Jintan Hitam.

2. Berkontribusi dalam pengembangan sediaan nanoemulsi berbasis bahan alam yang aman digunakan untuk bidang farmasi dan kosmetik.
3. Menjadi referensi bagi penelitian sejenis atau lanjutan terkait keamanan sediaan nanoemulsi kombinasi ekstrak Pegagan dan Jintan Hitam.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Telaah Pustaka

2.1.1 Pegagan (*Centella asiatica* L.)

Pegagan (*Centella asiatica* L.) merupakan tanaman herba menjalar dari famili *Apiaceae* yang tumbuh menahun dan banyak ditemukan di daerah tropis serta subtropis. Secara morfologi, tanaman ini memiliki daun tunggal berbentuk ginjal atau kipas dengan tepi bergerigi, berwarna hijau mengilap dan bertangkai panjang. Bunganya kecil berwarna merah muda keunguan tersusun dalam bentuk payung, sementara buahnya kecil berbentuk lonjong. Pegagan berkembang biak secara vegetatif melalui stolon yang menjalar di permukaan tanah dan mampu tumbuh baik di lahan lembap seperti tepi sungai, sawah, dan rawa. Persebaran tanaman ini berasal dari wilayah Asia tropis, khususnya India, Sri Lanka, Tiongkok, Indonesia, dan Malaysia, namun kini juga ditemukan di Afrika Selatan dan Madagaskar. Di Indonesia, pegagan dikenal dengan berbagai nama lokal seperti pegagan, antanan, atau daun kaki kuda, dan sering ditanam di pekarangan maupun tumbuh liar di tempat teduh dan lembap (Hein *et al.*, 2025).



Gambar 2.1 Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L.) (Elfianis, 2022)

Dari segi kandungan kimia, pegagan kaya akan triterpenoid saponin yaitu *asiaticoside*, *madecassoside*, *asiatic acid*, dan *madecassic acid*, yang menjadi senyawa utama penentu aktivitas biologisnya (Puttarak *et al.*, 2017). Selain itu, terdapat flavonoid (*quercetin*, *kaempferol*, *rutin*), *fitosterol* (β -sitosterol, *stigmasterol*), dan alkaloid seperti *hydrocotyline*. Kombinasi senyawa ini memberi efek antiinflamasi, antioksidan, penyembuhan luka, neuroprotektif, dan anti-aging. Secara klinis, beberapa penelitian dan meta-analisis menunjukkan bahwa ekstrak

pegagan dapat mempercepat penyembuhan luka, meningkatkan elastisitas kulit, serta memperbaiki fungsi kognitif dan menurunkan kecemasan ringan (Hein *et al.*, 2025).

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa daun pegagan memiliki efektivitas biologis yang kuat. Ekstrak pegagan meningkatkan regenerasi sirip kaudal ikan zebra hingga 28,58% pada konsentrasi 7,5 ppm dan 32,91% pada konsentrasi 10 ppm (Nurkhasanah, 2023). Selain itu, pegagan juga memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, dengan daya hambat terbesar pada konsentrasi 75% (Siregar *et al.*, 2022). Temuan ini menegaskan potensi pegagan sebagai agen regeneratif dan antibakteri.

Ekstrak etanol daun pegagan menunjukkan toksisitas akut rendah pada ikan zebra. Paparan perendaman selama 96 jam menghasilkan LC₅₀ sebesar 1250 ppm, dengan tidak ditemukan mortalitas pada konsentrasi $\leq 312,5$ ppm, sedangkan 100% kematian terjadi pada 2500 ppm (Zakaria *et al.*, 2019). Senyawa penanda utama (*asiaticoside*, *asiatic acid*, *madecassic acid*, dan *madecassoside*) tidak menimbulkan kematian hingga dosis 500 mg/kg BB, sehingga toksisitas ekstrak diduga berasal dari komponen lain dalam matriks ekstrak (Zakaria *et al.*, 2019).

2.1.2 Jintan Hitam (*Nigella sativa*)

Jintan hitam (*Nigella sativa* L.) merupakan tanaman dari famili *Ranunculaceae* yang berasal dari wilayah Mediterania dan Asia Barat. Tanaman ini diketahui mengandung berbagai senyawa penting, seperti minyak atsiri, termasuk *p-cymene* dan *thymoquinone*, serta beragam jenis asam lemak, misalnya *palmitat*, *linoleat*, dan *oleat*. Selain itu, *tokoferol* dan *sterol* juga ditemukan sebagai komponen bioaktifnya (Mardisiwi *et al.*, 2018). Secara historis, biji jintan hitam telah lama dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional di berbagai negara Timur Tengah dan Asia, terutama untuk menangani berbagai masalah kesehatan, termasuk infeksi mikroba (Glabella *et al.*, 2022).

Jintan hitam merupakan tanaman berbunga tahunan dengan daun berseling berbentuk linear hingga lanset. Buahnya berupa kapsul berisi biji hitam. Tanaman ini memiliki waktu perkecambahan dan pematangan yang relatif seragam. Beberapa varian tanaman memiliki performa pertumbuhan yang lebih menonjol, misalnya varian *Shyama* yang membutuhkan waktu lebih lama untuk berkecambah dan

berbunga dibandingkan varian lainnya. Sementara itu, varian AN-1 menunjukkan karakter pertumbuhan terbaik, seperti tinggi tanaman, panjang akar, jumlah cabang, jumlah kapsul, dan ukuran kapsul, serta menghasilkan biji dengan produktivitas tertinggi per tanaman (Pandey *et al.*, 2024).



Gambar 2.2 Tanaman Jintan (*Nigella sativa L.*) (Pandey *et al.*, 2024)

Minyak yang dihasilkan dari biji jintan hitam diketahui memiliki berbagai aktivitas farmakologis, seperti antioksidan, antikanker, penurun kolesterol, antihistamin, analgesik, imunomodulator, serta aktivitas antimikroba dan antibakteri (Agistia *et al.*, 2021). Biji tanaman ini mengandung sejumlah komponen penting, termasuk asam amino, protein, karbohidrat, minyak atsiri (sekitar 0,4%–0,7%), minyak lemak, saponin, alkaloid, dan berbagai senyawa aktif lainnya. Efek farmakologis minyak atsiri tersebut terutama berasal dari senyawa seperti *thymoquinone*, *carvacrol*, *p-cymene*, α -*pinen*, *4-terpineol*, *longifolen*, *t-anethole*, *dithymoquinone*, *thymohydroquinone*, serta senyawa ester. Di antara berbagai komponen tersebut, *thymoquinone* dan α -*pinen* dianggap sebagai senyawa utama yang berperan dalam aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* (Agistia *et al.*, 2021)

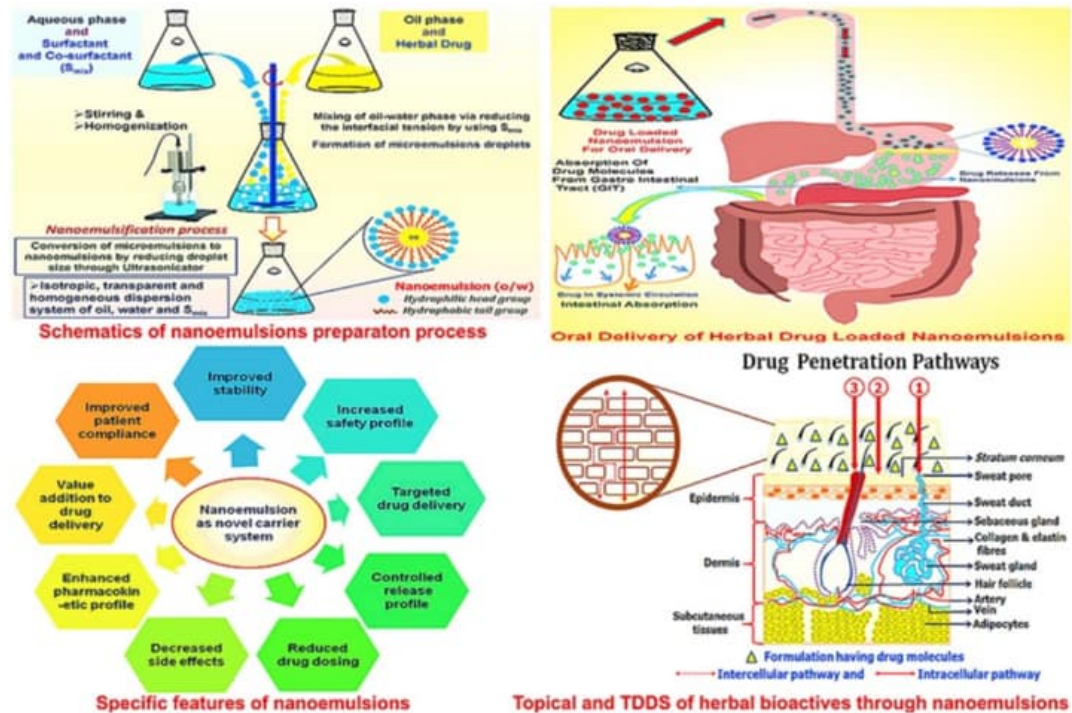
Penelitian terbaru semakin menguatkan efektivitas jintan hitam. Hendrawan *et al.*, (2023) melaporkan bahwa pemberian ekstrak dosis 600 mg/kgBB pada tikus mampu menurunkan derajat degenerasi dan nekrosis pada hepar dan ginjal, sehingga menunjukkan adanya perbaikan gambaran histopatologi kedua organ tersebut. Selain itu, penelitian oleh Putri & Muflihah (2024) menemukan bahwa ekstrak jintan hitam 40% menghasilkan zona hambat yang cukup luas terhadap bakteri penyebab jerawat, menandakan aktivitas antibakteri yang potensial. Temuan tersebut mendukung penggunaan jintan hitam sebagai kandidat terapi

topikal, meskipun uji lanjutan tetap diperlukan untuk memastikan efektivitas klinisnya

Selain aktivitas biologisnya, penelitian mengenai keamanan sistem nano juga memberikan gambaran yang relevan, studi terkait formulasi SNEDDS jintan hitam pada ikan zebra menunjukkan bahwa penggunaan sistem nano tidak meningkatkan toksisitas secara signifikan. Nilai LC_{50} SNEDDS ($154,637 \pm 75,609$ ppm) lebih tinggi daripada bentuk non-SNEDDS ($72,358 \pm 15,253$ ppm) yang mengindikasikan bahwa optimasi formulasi nanoemulsi berpotensi menghasilkan profil toksisitas yang lebih rendah. Temuan ini memperkuat dugaan bahwa nanoemulsi jintan hitam cenderung aman atau tidak bersifat toksik (Utami & Miladiyah, 2020).

2.1.3 Teknologi Nanoemulsi pada Herbal

Nanoemulsi merupakan sistem dispersi koloid berukuran sangat kecil, berukuran <500 nm, yang mampu meningkatkan kelarutan serta bioavailabilitas bahan aktif (Helsawati *et al.*, 2023). Secara umum, nanoemulsi adalah sistem homogen yang stabil secara termodinamika dan bersifat isotropik, terdiri atas fase air, fase minyak, serta campuran surfaktan dan ko-surfaktan. Ukuran droplet nanoemulsi, baik tipe o/w maupun w/o, dilaporkan berada pada rentang 20–200 nm bergantung pada komposisi formulasi dan teknik homogenisasi yang digunakan (Harwansh *et al.*, 2019)



Gambar 2.3 Preparasi Nanoemulsi dan Jalur Penghantarannya (Harwansh *et al.*, 2019)

Pada pemberian oral, nanoemulsi akan terdispersi menjadi *droplet* berukuran lebih kecil melalui mekanisme nanoemulsifikasi diri di lingkungan saluran cerna. Sistem penghantar ini mampu menjaga stabilitas senyawa herbal yang dienkapsulasi dari degradasi lambung serta mendukung pelepasan zat aktif secara lebih berkepanjangan. Ukuran *droplet* yang nano juga meningkatkan permeasi membran, yang berkontribusi pada efek terapeutik yang lebih optimal dan profil farmakokinetik yang lebih baik (Harwansh *et al.*, 2019).

2.1.4 Profil Keamanan Eksipien Nanoemulsi

Formulasi nanoemulsi dalam penelitian ini mengacu pada penelitian Musyaffa (2023), terdiri atas ekstrak pegagan dan minyak jintan hitam sebagai zat aktif, Tween 80 sebagai surfaktan, *propylene glycol* sebagai ko-surfaktan, serta aquadest sebagai pelarut, dengan rincian konsentrasi masing-masing komponen disajikan pada **Tabel 3.1**. Pemilihan eksipien dalam formulasi nanoemulsi tidak hanya didasarkan pada fungsi teknologinya, tetapi juga harus memperhatikan aspek keamanan penggunaan pada kulit maupun sistemik, mengingat eksipien bukan merupakan komponen inert sepenuhnya dan dapat memengaruhi keamanan serta

efikasi produk akhir. Berikut disajikan profil keamanan dan toksisitas masing-masing eksipien yang digunakan dalam formulasi nanoemulsi tersebut.

a. Tween 80

Tween 80 atau polisorbat 80 merupakan surfaktan nonionik yang banyak digunakan dalam sediaan farmasi, kosmetik, dan pangan sebagai zat pelarut, penstabil, maupun pengemulsi. Bahan ini digunakan dalam berbagai formulasi obat, termasuk amiodaron, vitamin K, etoposid, dosetaksel, berbagai vaksin, terapi protein biologis, agen perangsang eritropoietin, dan fosaprepitan, yang mencerminkan pemanfaatannya secara luas sebagai eksipien dalam formulasi sediaan farmasi (Schwartzberg & Navari, 2018).

Dari segi keamanan, Tween 80 dikategorikan sebagai bahan yang *Generally Recognized as Safe* (GRAS) oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat (Kriegel *et al.*, 2020). Hasil evaluasi ulang yang dilakukan oleh *European Food Safety Authority* (EFSA) memperkuat profil keamanan tersebut, dengan nilai NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) sebesar 2.500 mg/kgBB/hari berdasarkan studi toksisitas kronik pada tikus. Nilai tersebut memberikan margin keamanan hingga 100 kali lipat di atas nilai ADI (*Acceptable Daily Intake*). Selain itu, tidak ditemukan efek karsinogenik, genotoksik, maupun toksisitas reproduksi pada tingkat paparan yang relevan secara klinis (EFSA NDA, 2015).

Meskipun demikian, perlu dicatat bahwa penelitian terbaru mengindikasikan bahwa polisorbat 80 merupakan senyawa yang secara biologis dan farmakologis aktif, sehingga dapat memengaruhi sifat farmakologis obat yang diformulasikan bersamanya atau bahkan menjadi penyebab langsung dari kejadian efek samping tertentu (Schwartzberg & Navari, 2018). Hal ini menjadi catatan penting khususnya pada penggunaan rute parenteral dengan konsentrasi tinggi. Namun demikian, untuk penggunaan topikal pada konsentrasi yang lazim digunakan dalam sediaan nanoemulsi (1–15%), Tween 80 dinyatakan aman dan tidak menimbulkan iritasi bermakna pada kulit, sehingga penggunaannya sebagai surfaktan dalam formulasi nanoemulsi ekstrak pegagan dan minyak jintan hitam ini dapat dipertanggungjawabkan secara keamanan (Schwartzberg & Navari, 2018).

Selain data toksisitas pada mamalia, beberapa penelitian juga mengevaluasi efek Tween 80 menggunakan model ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai organisme uji toksisitas akuatik. Nilai LC₅₀ Tween-80 pada embrio ikan zebra dilaporkan sebesar 323 mg/L setelah pajanan 96 jam (Ali *et al.*, 2011). Selain itu, studi mengenai mekanisme reaksi hipersensitivitas menemukan bahwa bukan Tween-80 murni, melainkan residu hidrogen peroksida dan residu asam lemak teroksidasi yang terkandung sebagai pengotor dalam sampel Tween-80 yang diduga menjadi pemicu reaksi anafilaktoid pada model ikan zebra (Yuan *et al.*, 2016). Studi lain yang menelaah lebih lanjut komponen penyusun Tween 80 juga menemukan bahwa organ target utama toksisitas akut pada ikan zebra yang terpapar Tween 80 meliputi sistem kardiovaskular, ginjal, usus, kulit, dan hati, disertai kerusakan oksidatif akibat gangguan keseimbangan redoks pada larva (Wang *et al.*, 2024). Temuan-temuan ini menegaskan bahwa profil toksisitas Tween 80 sangat bergantung pada konsentrasi, jalur pajanan, dan kemurnian bahan baku yang digunakan, di mana jalur parenteral jauh lebih berisiko dibandingkan jalur topikal pada konsentrasi rendah sebagaimana digunakan dalam formulasi nanoemulsi ini.

b. Propilen Glikol

Propilenglikol merupakan salah satu eksipien farmasetis yang telah luas digunakan sebagai ko-surfaktan dalam berbagai sistem penghantaran obat berbasis emulsi, termasuk nanoemulsi dan mikroemulsi (Szumala *et al.*, 2023). Dalam formulasi nanoemulsi, propilenglikol berfungsi sebagai ko-surfaktan yang berperan meningkatkan kelarutan zat aktif dalam sistem minyak-air, di mana propilenglikol menunjukkan kemampuan melarutkan yang baik dibandingkan ko-surfaktan golongan glikol lainnya (Smail *et al.*, 2021). Dalam sediaan farmasi secara umum, propilenglikol lazim digunakan pada konsentrasi 15–30% dalam sediaan kulit, atau sebagai ko-solven dalam aerosol (10–25%), parenteral (10–60%), dan larutan oral (10–25%) (EMA 2013).

Status keamanannya telah diakui secara luas, di mana propilenglikol dikategorikan *Generally Recognized as Safe* (GRAS) oleh *Food and Drug Administration* (FDA) dan tidak menimbulkan efek kesehatan yang merugikan pada penggunaan normal sesuai peruntukannya (Rowe *et al.*, 2009). Namun demikian, toksisitas dapat terjadi pada kondisi tertentu, di mana efek samping yang dilaporkan

akibat toksisitas propilenglikol meliputi gangguan sistem saraf pusat, hiperosmolaritas, hemolisis, aritmia jantung, kejang, agitasi, dan asidosis laktat, terutama pada penggunaan dosis tinggi atau jangka panjang, khususnya melalui rute intravena (Lim *et al.*, 2014). Populasi yang lebih rentan terhadap toksisitas tersebut meliputi bayi, pasien dengan gangguan fungsi ginjal atau hati, pasien epilepsi, dan pasien luka bakar yang menerima aplikasi dermal ekstensif dari produk yang mengandung propilenglikol (Lim *et al.*, 2014).

Selain data toksisitas pada mamalia, profil keamanan propilenglikol sebagai eksipien farmasi juga telah dievaluasi pada model ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai organisme uji alternatif dalam penilaian toksisitas perkembangan. Penelitian yang dilakukan oleh Shen *et al.* (2022) mengevaluasi toksisitas perkembangan dan neurotoksisitas dari enantiomer R-, S-, dan RS-propilenglikol pada larva ikan zebra menunjukkan bahwa, pajanan terhadap ketiga jenis enantiomer propilenglikol tidak memengaruhi secara bermakna parameter perkembangan dasar embrio maupun larva, yang meliputi pergerakan embrionik, penetasan, mortalitas, malformasi, denyut jantung, dan panjang tubuh, sehingga mengindikasikan bahwa ketiga jenis propilenglikol tersebut tidak menunjukkan toksisitas perkembangan dasar pada larva ikan zebra. Lebih lanjut, tingkat toksisitas ketiga enantiomer tersebut bahkan dilaporkan lebih rendah dibandingkan etanol, tanpa perbedaan bermakna di antara ketiganya (Shen *et al.*, 2022)

Berdasarkan kedua data tersebut, baik dari uji pada hewan mamalia maupun model alternatif ikan zebra, dapat disimpulkan bahwa propilenglikol pada konsentrasi yang relevan dengan penggunaan farmasetik memiliki profil keamanan yang baik. Untuk konteks penggunaan topikal pada sediaan nanoemulsi dengan konsentrasi 15% sebagaimana digunakan dalam formulasi ini, risiko toksisitas sistemik tergolong sangat rendah karena absorpsi transdermal yang terbatas dan tidak melibatkan rute pemberian intravena yang menjadi sumber utama kasus toksisitas yang dilaporkan dalam literatur.

c. Aquadest

Aquadest merupakan pelarut universal yang bersifat inert dan secara umum tidak menimbulkan efek toksik dalam penggunaan farmasetis (Kementerian Kesehatan RI, 2020). Oleh karena itu, aquadest tidak dikategorikan sebagai bahan

yang memerlukan kajian toksikologi khusus sebagaimana eksipien lainnya. Meskipun demikian, kualitas aquadest tetap harus memenuhi persyaratan farmakope, meliputi bebas pirogen, bebas partikel asing, memiliki kadar logam berat yang memenuhi batas yang ditetapkan, serta bebas dari kontaminasi mikroorganisme. Pemenuhan persyaratan tersebut penting untuk menjamin keamanan, mutu, dan stabilitas sediaan farmasi yang dihasilkan.

2.1.5 Evaluasi Sediaan Nanoemulsi

Evaluasi sediaan nanoemulsi merupakan tahapan penting dalam pengembangan formulasi untuk memastikan kualitas, stabilitas, dan konsistensi sediaan sebelum digunakan lebih lanjut. Parameter evaluasi yang umum dilakukan meliputi uji organoleptik, persen transmitansi, ukuran partikel, indeks polidispersitas (PDI), zeta potensial, viskositas, homogenitas, dan uji stabilitas freeze-thaw (Helsawati *et al.*, 2023).

Uji organoleptik dilakukan untuk mengamati penampilan fisik sediaan secara visual meliputi warna, bau, dan homogenitas. Sediaan nanoemulsi yang baik umumnya bertekstur cair, berwarna khas bahan penyusunnya, homogen, serta tidak berbau tengik yang mengindikasikan tidak terjadinya oksidasi komponen lipid (Ma'arif *et al.*, 2023). Persen transmitansi digunakan sebagai indikator kejernihan sediaan, dimana nilai yang mendekati 100% menunjukkan bahwa ukuran droplet telah mencapai skala nano sehingga sediaan tampak jernih dan transparan. Nilai persen transmitansi yang memenuhi syarat berada pada rentang 90–100% (Helsawati *et al.*, 2023). Ukuran partikel dan PDI diukur menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA). Ukuran droplet nanoemulsi umumnya berada pada rentang 20–200 nm, yang menciptakan luas antarmuka besar sehingga meningkatkan kelarutan dan bioavailabilitas zat aktif (Harwansh *et al.*, 2019). Nilai PDI menggambarkan keseragaman distribusi ukuran partikel, di mana nilai PDI <0,7 masih dapat diterima dan nilai yang semakin rendah menunjukkan distribusi yang semakin homogen (Ananingsih *et al.*, 2024).

Zeta potensial merupakan parameter yang menggambarkan stabilitas fisik jangka panjang nanoemulsi secara elektrostatik. Nilai zeta potensial $\geq +30$ mV dan ≤ -30 mV mengindikasikan sistem yang stabil karena gaya tolak antar partikel cukup kuat untuk mencegah agregasi dan koalesensi (Mohammed *et al.*, 2020).

Viskositas diukur untuk mengetahui kekentalan sediaan, di mana nanoemulsi yang baik memiliki nilai viskositas dalam rentang 10–100 cP (Widyastuti & Saryanti, 2023). Homogenitas sediaan dinilai berdasarkan tidak adanya butiran kasar maupun agregat yang menunjukkan seluruh komponen telah terdispersi secara merata (R. Ibrahim, 2026). Uji stabilitas *freeze-thaw* dilakukan untuk mengevaluasi ketahanan sediaan terhadap perubahan suhu ekstrem secara berulang. Sediaan dinyatakan stabil apabila tidak menunjukkan pemisahan fase, *cracking*, maupun *creaming* setelah tiga siklus pengujian (Pratiwi *et al.*, 2018).

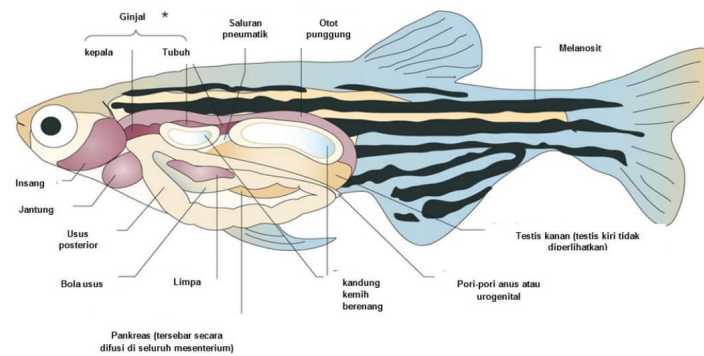
2.1.6 Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Ikan zebra (*Danio rerio*) merupakan salah satu spesies ikan air tawar yang banyak digunakan sebagai hewan model dalam penelitian biomedis dan toksikologi. Morfologi ikan zebra ditunjukkan pada **Gambar 2.4**.



Gambar 2.4 Ikan zebra (*Danio rerio*) (PNAS, 2024)

Secara morfologis, ikan zebra dewasa berukuran sekitar 4–5 cm, berbentuk silindris, dan memiliki pola garis horizontal terang-gelap yang khas. Spesies ini menampilkan dimorfisme seksual, di mana jantan cenderung berwarna keemasan pada bagian ventral dan tampak lebih bulat, sedangkan betina lebih ramping dengan warna keperakan, terutama menjelang pemijahan. Betina bersifat asinkron dan dapat bertelur setiap dua hingga tiga hari, dengan hasil 100–200 telur per pemijahan. Dari sisi genetik, *Danio rerio* memiliki sekitar 70% kesamaan gen dengan manusia dan berbagi lebih dari 12.000 gen homolog dengan vertebrata lain, sehingga mampu mengekspresikan fenotipe penyakit manusia. Karakteristik tersebut menjadikan ikan zebra sebagai model *in vivo* yang relevan, sensitif, dan banyak digunakan dalam penelitian toksikologi serta skrining awal keamanan bahan aktif dan sediaan farmasi (Kandasamy *et al.*, 2022).



Gambar 2.5 Anatomi *Zebrafish* (White *et al.*, 2013)

Ikan zebra memiliki nilai biologis yang tinggi sebagai model penelitian karena kesamaan genetiknya dengan manusia. Sekitar 70% gen ikan zebra homolog dengan gen manusia, dan lebih dari 12.000 gen berbagi fungsi yang sama di antara keduanya. Kesetaraan genetik ini memungkinkan para peneliti memperkenalkan gen penyebab penyakit manusia ke dalam embrio ikan zebra, yang kemudian dapat memunculkan fenotipe penyakit serupa. Dengan dasar tersebut, ikan zebra menjadi model yang kuat untuk mempelajari patogenesis, jalur molekuler, hingga respons biologis terhadap intervensi terapeutik (Kandasamy *et al.*, 2022).

Dengan kombinasi kesesuaian fisiologis dan karakter biologis yang menguntungkan, ikan zebra berkembang menjadi salah satu organisme model paling unggul dalam penelitian biomedis dan toksikologi modern. Untuk mengevaluasi respons biologis maupun mekanisme toksikologi, dibutuhkan model *in vivo* yang cepat, sensitif, dan ekonomis. Dibandingkan mencit maupun tikus, ikan zebra menawarkan sistem penyaringan toksisitas yang lebih efisien, berbiaya rendah, mudah ditangani, serta mendukung analisis ber-*throughput* tinggi (Zhao *et al.*, 2024). Proses embriogenesis yang berlangsung cepat—sekitar ± 72 jam—serta kemampuan betina menghasilkan 200–300 telur terfertilisasi per minggu membuatnya ideal untuk studi skala besar (Kandasamy *et al.*, 2022). Selain itu, ikan zebra memiliki organ-organ yang secara fisiologis mirip dengan manusia, seperti ginjal, pankreas, jaringan adiposa, dan otot rangka, sehingga memungkinkan penggunaannya dalam penelitian berbagai penyakit, termasuk gangguan saraf, kanker, infeksi, penyakit jantung, diabetes, gangguan metabolik, hingga hematopoiesis. Embrionya yang transparan juga memberikan keunggulan signifikan karena memungkinkan visualisasi langsung terhadap proses

perkembangan, kerusakan jaringan, dan progres patologi secara *real time*, menjadikan ikan zebra sebagai hewan uji yang informatif dalam riset biomedis (Silva *et al.*, 2025).

2.1.7 *Fish Acute Toxicity Test (FAT)*

Uji toksisitas akut merupakan metode standar untuk menilai efek berbahaya suatu bahan kimia terhadap organisme akuatik dalam waktu singkat. Berdasarkan OECD *Test Guideline* 203, pengujian ini dilakukan dengan memaparkan ikan zebra terhadap larutan bahan kimia selama 96 jam dalam kondisi statis, semi-statis, atau sistem aliran. Tujuan utama dari uji ini adalah menentukan nilai *Lethal Concentration* 50% (LC₅₀), yaitu konsentrasi bahan uji yang menyebabkan kematian 50% ikan dalam periode pengamatan, sehingga dapat menggambarkan tingkat toksisitas akut bahan kimia tersebut. Selain mortalitas, berbagai kelainan tanda klinis seperti perubahan keseimbangan, pola berenang, pigmentasi, hingga gangguan ventilasi juga dicatat untuk memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai respons ikan terhadap paparan zat toksik (OECD, 2025).

Tabel 2.1 Kategori Akut bahan berbahaya bagi perairan (*Globally Harmonized System*, 2013)

<i>Category Acute</i>	96 hr LC ₅₀ (for fish)	Keterangan
<i>Acute 1</i>	≤ 1 mg/L	Sangat toksik terhadap organisme akuatik
<i>Acute 2</i>	> 1 – ≤ 10 mg/L	Toksik terhadap organisme akuatik
<i>Acute 3</i>	> 10 – ≤ 100 mg/L	Berbahaya (<i>harmful</i>) terhadap organisme akuatik
<i>Not Classified</i>	> 100 mg/L	Tidak diklasifikasikan sebagai berbahaya akut terhadap organisme akuatik

Uji toksisitas akut pada organisme akuatik umumnya ditentukan menggunakan parameter *lethal concentration* 50% (LC₅₀), yaitu konsentrasi senyawa uji dalam media air yang menyebabkan kematian 50% populasi organisme uji dalam periode paparan tertentu, umumnya selama 96 jam pada ikan. Nilai LC₅₀ dinyatakan dalam satuan mg/L atau ppm dan digunakan secara luas untuk mengevaluasi tingkat toksisitas bahan kimia maupun senyawa bioaktif terhadap organisme perairan.

Semakin rendah nilai LC_{50} , semakin tinggi tingkat toksisitas senyawa tersebut (OECD, 2025).

OECD *Test Guideline* 203 juga memberikan alternatif berupa uji batas (*limit test*) apabila tujuan penelitian hanya untuk memastikan bahwa nilai LC_{50} berada di atas konsentrasi tertentu. Uji ini biasanya dilakukan pada konsentrasi 100 ppm, batas kelarutan maksimum, atau konsentrasi ambang yang relevan, dengan membandingkan kelompok perlakuan dan kontrol. Apabila tidak ditemukan mortalitas signifikan pada konsentrasi uji batas, maka dapat disimpulkan bahwa nilai LC_{50} berada di atas konsentrasi tersebut, sehingga zat uji dikategorikan memiliki toksisitas akut yang rendah terhadap ikan (OECD, 2025).

2.1.8 Pemeriksaan Histopatologi pada Ikan Zebra

Pemeriksaan histopatologi merupakan metode penting dalam studi toksikologi karena memberikan informasi rinci mengenai perubahan jaringan dan seluler akibat paparan zat toksik yang sering kali tidak terdeteksi melalui parameter mortalitas, perubahan tanda klinis, atau nilai LC_{50} (El-SiKaily & Shabaka, 2024). Histopatologi memungkinkan deteksi lesi jaringan seperti degenerasi, inflamasi, atau kerusakan struktural pada organ target, sehingga menjadi *endpoint* sensitif dan informatif dalam penilaian efek toksik subletal. Analisis histopatologi sering digunakan sebagai *biomarker* dalam evaluasi toksisitas karena dapat mengungkap karakteristik dan tingkat kerusakan jaringan yang lebih mendalam (El-SiKaily & Shabaka, 2024).

Hati dipilih sebagai organ target histopatologi karena merupakan pusat metabolisme dan detoksifikasi xenobiotik. Paparan zat toksik dapat menyebabkan degenerasi hepatosit, vakuolisasi, inflamasi, dan nekrosis, yang mencerminkan gangguan fungsi hati meskipun belum terjadi kematian organisme uji (Kadhim *et al.*, 2024). Penelitian oleh Jamir *et al.* (2024) menunjukkan bahwa paparan senyawa tertentu pada ikan zebra menyebabkan perubahan histopatologi pada hati yang tidak selalu tampak secara makroskopik, sehingga analisis jaringan menjadi komponen penting dalam interpretasi toksisitas akut.

2.2 Landasan Teori

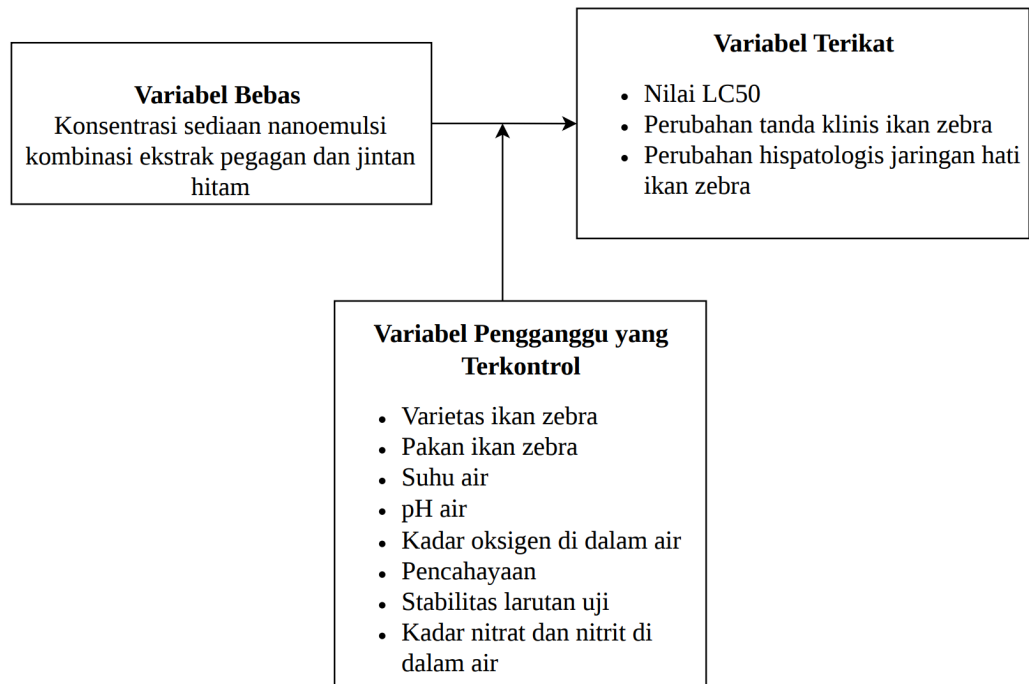
Pegagan (*Centella asiatica* L.) dan Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) merupakan tanaman herbal yang memiliki aktivitas biologis luas dengan profil keamanan yang

relatif baik. Pegagan mengandung triterpenoid saponin utama yaitu *asiaticoside* yang berperan sebagai antiinflamasi, antioksidan, dan agen regeneratif, pada konsentrasi rendah tanpa menyebabkan kematian atau kerusakan jaringan yang signifikan. Jintan hitam mengandung senyawa bioaktif *thymoquinone* yang memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan, dan imunomodulator, serta terbukti tidak menimbulkan perubahan histopatologi bermakna pada organ hepar dosis uji tertentu. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa kedua tanaman memiliki potensi terapeutik yang menjanjikan dan memiliki profil toksisitas yang dilaporkan sebelumnya. Ekstrak etanol daun pegagan diketahui memiliki nilai LC_{50} sebesar 1250 ppm pada ikan zebra, sedangkan sediaan SNEDDS jintan hitam memiliki nilai LC_{50} sebesar 154,63 ppm. Nilai tersebut menunjukkan bahwa kedua bahan memiliki toksisitas akut yang relatif rendah pada model uji yang digunakan. Selain itu, formulasi berbasis nano dilaporkan tidak meningkatkan toksisitas akut dibandingkan bentuk non-nano. Di sisi lain, teknologi nanoemulsi diketahui mampu meningkatkan stabilitas, kelarutan, dan bioavailabilitas senyawa aktif herbal yang memiliki keterbatasan sifat fisikokimia. Penggunaan ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai model uji toksisitas akut dan histopatologi juga relevan karena sensitivitasnya terhadap perubahan perilaku dan jaringan serta kemiripan fisiologis dan genetik dengan manusia.

2.3 Hipotesis

1. Sediaan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dan jintan hitam (*Nigella sativa* L.) memiliki karakteristik fisikokimia yang baik dan memenuhi persyaratan sebagai sediaan nanoemulsi.
2. Sediaan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dan jintan hitam (*Nigella sativa* L.) memiliki toksisitas akut yang rendah pada ikan zebra (*Danio rerio*) berdasarkan perubahan tanda klinis, nilai LC_{50} , dan gambaran histopatologi hati.

2.4 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.6 Kerangka Konsep Penelitian

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.), ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa* L.) yang didapatkan dari Naturindo, Yogyakarta, pakan ikan *micro pellet* (Hikari), tip steril *blue* (extra gene), *yellow*, dan *white* (Thermo), larutan NaCl fisiologis, buffer formalin 10%, alkohol 95%, hematoksin-eosin, *tween*-80, *aquadest*, propilenglikol, metanol, asetonitril, *water for injection*, asam klorida, kertas saring *whatman Grade-42* 12.5 cm, asam nitrat (HNO₃), dan asam perklorat (HClO₄).

3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya gelas *beaker*, gelas ukur, labu (Pyrex), pisau bedah (One Med), *high Performance Chromatography Liquid* (HPLC) (Waters e2695), viscometer *Brookfield DV IT*, water bath (memmert), neraca analitik (Mettler Toledo), kaca objek, kolom *SunFire C18* 5 µm (4,6 x 250 mm), cawan porselen, *Muffle Furnace* (1200C-1700C), desikator (Duran), *hot plate* (infitec), Corong Kaca (One Med), Spektrofotometer Serapan Atom (AAS) (*Biobase BK-AA4530F*), Spektrofotometer UV-1800 (*Biobase*), *centrifuge* (DIAB D2012 plus), *Particle Size Analyzer* (Horiba), Lemari Pendingin (*Polytron*), *ultrasonic cleaner* (Branson 2510) dan kamera,

3.3 Subjek Uji

Subjek uji dalam penelitian ini adalah ikan zebra (*Danio rerio*) dengan usia 3-6 bulan, baik jantan maupun betina. Ikan diperoleh dari peternak ikan zebra di Kediri, Jawa Timur. Seluruh rangkaian penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Praktek, Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.

3.4 Cara Kerja Penelitian

3.4.1 Pengajuan *Ethical Clearance*

Sebelum penelitian dilaksanakan, peneliti terlebih dahulu mengajukan permohonan izin kepada Komite Etik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta sebagai lembaga yang menilai kelayakan etik. Pengajuan dilakukan dengan melampirkan proposal penelitian dan mengisi formulir yang telah disediakan.

3.4.2 Pengujian Parameter Spesifik

Pengujian parameter spesifik pada penelitian ini dilakukan terhadap ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa* L.) sebagai bahan baku yang digunakan dalam formulasi. Ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) tidak dilakukan pengujian parameter spesifik karena digunakan dalam bentuk ekstrak yang telah diperoleh dari penelitian sebelumnya dan telah melalui proses standardisasi.

3.4.2.1 Identifikasi Senyawa *Thymoquinone*

Analisis *thymoquinone* dilakukan menggunakan metode *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC). Sampel dianalisis dengan detektor UV-Vis *array detector*. Pemisahan dilakukan menggunakan kolom C18 berukuran $250 \times 4,6$ mm dengan ukuran partikel 5 μm . Fase gerak yang digunakan berupa campuran Air/Metanol (45:5 v/v) sebagai fase A dan Asetonitril (50 v/v) sebagai fase B, dengan rasio total A:B = 40:60 v/v dengan metode isokratik yang sebelumnya disonikasi pada suhu 37 °C selama 10 menit dan disaring menggunakan kertas saring PTFE ukuran 0,45 μm . Sebanyak 20 μL sampel diinjeksikan ke dalam sistem HPLC dengan laju alir 1 mL/menit. Deteksi *thymoquinone* dilakukan pada panjang gelombang 253 nm pada suhu ruang. Identifikasi senyawa dilakukan dengan membandingkan waktu retensi antara standar *thymoquinone* dan sampel (*P. Gupta et al., 2024*).

3.4.3 Pengujian Parameter Non-Spesifik

Pengujian parameter non-spesifik pada penelitian ini dilakukan terhadap ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa* L.) sebagai bagian dari pengendalian mutu bahan baku. Ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) tidak diuji karena telah digunakan dalam bentuk ekstrak terstandarisasi dari penelitian sebelumnya.

3.4.3.1 Uji Kadar Air

Sebanyak lebih kurang 3 g ekstrak ditimbang saksama dan dimasukkan ke dalam cawan yang telah ditara. Sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam dalam keadaan cawan terbuka. Cawan ditutup lalu dipindahkan ke dalam desikator dan didinginkan selama 20-30 menit, kemudian ditimbang kembali. Kriteria keberterimaan kadar air tidak lebih dari 9,6% (*Kemenkes RI, 2022; Azzahra et al., 2022*).

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{\text{Bobot awal (g)} - \text{bobot setelah pemanasan (g)}}{\text{Bobot awal (g)}} \times 100\%$$

3.4.3.2 Uji Kadar Abu

Sebanyak 2 g ekstrak dimasukkan ke dalam cawan porselen yang telah ditimbang, kemudian dipanaskan selama 3 jam hingga seluruh sisa arang habis terbakar dan diperoleh bobot konstan pada suhu $600 \pm 25^\circ\text{C}$. Setelah didinginkan, cawan ditimbang kembali. Persyaratan kadar abu total tidak lebih dari 2,9% (Kemenkes RI, 2022; Syukri *et al.*, 2020)

$$\% \text{ Kadar abu total} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = bobot cawan kosong (g)

W1 = bobot ekstrak awal (g)

W2 = bobot cawan + ekstrak setelah diabukan (g)

3.4.3.3 Uji Kadar Abu Tidak Larut Asam

Penetapan kadar abu tidak larut asam dilakukan dengan cara abu hasil pengujian kadar abu total dididihkan bersama 25 mL asam klorida encer (10%) selama 5 menit. Residu yang tidak larut dalam asam kemudian disaring menggunakan kertas saring bebas abu Whatman No. 42 dan dibilas dengan aquadest hingga bersih. Residu yang telah disaring selanjutnya dipijarkan secara bertahap di dalam krus pada suhu $600 \pm 25^\circ\text{C}$ selama 2 jam, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Persyaratan kadar abu tidak larut asam tidak lebih dari 0,7% (Rahmaniati *et al.*, 2018; Kemenkes RI., 2022).

$$\% \text{ Kadar Tidak Larut Asam} = \frac{W_2 - (C \times 0,0076) - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = bobot cawan kosong (g)

W1 = bobot ekstrak awal (g)

W2 = bobot cawan + abu yang tidak larut asam (g)

C = bobot kertas saring (g)

3.4.3.4 Uji Cemaran Logam Berat (Cu, Pb, dan Cd)

Sebanyak 1 g ekstrak jintan hitam dimasukkan ke dalam labu destruksi, kemudian ditambahkan 10 mL HNO_3 dan 5 mL HClO_4 . Campuran tersebut didiamkan semalaman sebelum dilakukan proses destruksi menggunakan alat *block digest* pada suhu 150°C selama 150 menit hingga uap berwarna kuning menghilang. Selanjutnya, suhu dinaikkan menjadi 170°C selama 1 jam dan

dilanjutkan pemanasan hingga 200 °C sampai terbentuk uap putih. Larutan hasil destruksi kemudian didinginkan dan diencerkan dengan air suling dalam labu ukur 50 mL hingga tanda batas, dikocok homogen, dan didiamkan semalaman. Analisis logam selanjutnya dilakukan menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) (Djoko *et al.*, 2020). Batas maksimum cemaran yang diperbolehkan yaitu Pb tidak lebih dari 10 mg/kg ekstrak, Cd tidak melebihi 0,3 mg/kg ekstrak, dan Cu tidak melebihi 150 mg/kg ekstrak (WHO, 2007).

3.4.4 Formulasi Nanoemulsi

Formulasi nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan minyak jintan hitam disusun berdasarkan pengembangan dari penelitian sebelumnya dengan beberapa penyesuaian komposisi bahan untuk memperoleh sistem nanoemulsi yang stabil. Pembuatan sediaan nanoemulsi dilakukan dengan menimbang 0,5 g ekstrak pegagan dan 0,5 g ekstrak jintan hitam menggunakan neraca analitik pada cawan yang sama, kemudian diaduk hingga tercampur dan homogen. Campuran ekstrak selanjutnya dimasukkan ke dalam vial dan dilakukan vortex selama 10 menit untuk membantu proses pelarutan dan homogenisasi. Setelah itu, ditambahkan *Tween 80* sebanyak 3,5 g dan *Propylene glycol* sebanyak 1,5 g ke dalam vial, kemudian campuran kembali divortex selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan sonikasi menggunakan *ultrasonic homogenizer* selama 5 menit untuk meningkatkan homogenitas sistem. Setelah proses tersebut, ditambahkan *aquadest* sebanyak 4 mL ke dalam vial, kemudian campuran kembali divortex selama 10 menit. Tahap akhir dilakukan sonikasi selama 30 menit dengan jeda setiap 5 menit untuk memperoleh sistem yang homogen.

Tabel 3.1 Formulasi Nanoemulsi (Musyaffa, 2023)

Formula		Fungsi	Konsentrasi
Ekstrak Pegagan		Zat aktif	5%
Minyak	Jintan	Zat aktif/fase	5%
Hitam		minyak	
<i>Tween 80</i>		Surfaktan	35%
<i>Propylene glycol</i>		Ko-surfaktan	15%
<i>Aquadest</i>		Pelarut	Ad 100%

3.4.5 Evaluasi Sediaan Nanoemulsi

3.4.5.1 Uji Organoleptik

Penilaian organoleptik dilakukan dengan mengamati konsistensi, homogenitas, warna, aroma, serta bentuk dari sediaan nanoemulsi ekstrak melalui pengamatan menggunakan pancaindra (Sadik & Anwar, 2022).

3.4.5.2 Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas sediaan nanoemulsi dilakukan dengan cara mengoleskan sampel pada tiga area berbeda pada kaca bening, kemudian ditutup dengan kaca objek. Pengamatan dilakukan untuk melihat kejernihan sediaan serta mendeteksi ada atau tidaknya agregat (gumpalan) yang terbentuk dalam sediaan nanoemulsi (Nabillah *et al.*, 2022)

3.4.5.3 Uji Viskositas

Pengujian viskositas sediaan nanoemulsi dilakukan menggunakan alat viskometer Brookfield DV1. Sebanyak 10 mL sampel dimasukkan ke dalam vial dan dipasang pada solvent trap yang tersedia. Pengukuran dilakukan pada kecepatan 50 rpm dengan ukuran spindel 61, dan nilai viskositas yang terukur dapat diamati langsung pada layar alat (Zulfa *et al.*, 2019). Sediaan nanoemulsi dikatakan memiliki viskositas yang baik apabila berada pada rentang 1-100 cP (Widyastuti & Saryanti, 2023).

3.4.5.4 Uji Persen Transmittan

Pengukuran persentase transmittan dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm. Sampel nanoemulsi sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. Larutan yang diperoleh selanjutnya diukur nilai persen transmittannya (%T) menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan aquadest sebagai blanko (Yuliani *et al.*, 2016). Sediaan nanoemulsi dikatakan baik apabila nilai persen transmittan berada pada rentang 90-100% (Zulfa *et al.*, 2019).

3.4.5.5 Uji Sentrifugasi

Sampel nanoemulsi ditimbang 0,4 g, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan ditambahkan aquadest hingga volume akhir 10 mL sehingga diperoleh pengenceran 25 kali. Sampel kemudian dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam *microtube*, selanjutnya disentrifugasi selama 30 menit pada kecepatan 3000 rpm. Setelah proses sentrifugasi selesai, sediaan diamati secara visual untuk

mengetahui adanya pemisahan fase, pengendapan, pembentukan creaming, atau *cracking* pada sistem nanoemulsi (Nemade *et al.*, 2022).

3.4.5.6 Uji Ukuran Partikel, *Polydispersity Index*, dan Zeta Potensial

Pengujian ukuran partikel, *polydispersity index*, dan zeta potensial pada sediaan nanoemulsi dilakukan menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA). Data hasil pengukuran kemudian dianalisis dan diinterpretasikan sesuai parameter yang ditetapkan (Hanifah & Jufri, 2018). Agar diperoleh hasil pengukuran yang valid dan reproduksibel, sampel dipastikan dalam kondisi homogen, bebas gelembung udara, serta memiliki konsentrasi yang sesuai untuk menghindari terjadinya aglomerasi dan *multiple scattering* yang dapat memengaruhi hasil pengukuran. Kondisi pengukuran juga perlu dikontrol agar sistem dispersi tetap stabil selama analisis (Stetefeld *et al.*, 2016; International Organization for Standardization, 2017)

3.4.5.7 Uji *Freeze-Thaw Cycle*

Pengujian dilakukan dengan menyimpan sediaan nanoemulsi pada suhu rendah $4 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke suhu ruang 25°C selama 24 jam sebagai satu siklus. Proses tersebut diulang sebanyak tiga siklus. Setelah seluruh siklus selesai, sediaan diamati untuk menilai adanya perubahan warna, aroma, maupun pemisahan fase

3.4.6 Penyiapan Hewan Uji

3.4.6.1 Identifikasi Ikan Zebra

Ikan zebra diidentifikasi di Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada yang bertujuan untuk mengetahui spesies dan varietas ikan zebra yang digunakan pada penelitian ini.

3.4.6.2 Kriteria Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah ikan zebra (*Danio rerio*) yang termasuk dalam spesies yang direkomendasikan OECD sebagai organisme uji toksisitas akut air tawar. Kriteria inklusi meliputi ikan zebra dengan usia 3-6 bulan, Ikan harus berusia sama, baik jantan maupun betina (Agustin & Taihuttu, 2021; Hendawy *et al.*, 2024) berasal dari populasi yang sama, sehat, aktif berenang, serta memiliki morfologi tubuh normal tanpa kelainan. Kriteria eksklusi meliputi ikan yang menunjukkan tanda penyakit, stres, perubahan perilaku tidak normal, malformasi fisik, luka terbuka, infeksi, cacat, dan ikan yang mengalami kematian selama pengujian (OECD, 2025).

3.4.6.3 Aklimatisasi

Sebelum dilakukan pengujian, ikan harus mengalami proses aklimatisasi minimal selama sembilan hari, terdiri dari 48 jam masa penyesuaian dan tujuh hari aklimatisasi sesuai ketentuan OECD bagian *Holding of Fish*. Aklimatisasi dilakukan dalam air yang memiliki karakteristik yang sama atau sangat mirip dengan media uji. Selama periode ini, kondisi lingkungan dijaga stabil pada suhu 21–25°C, pH 6,0–8,5, dengan oksigen terlarut minimal 80%. Fotoperioda dipertahankan dalam rentang 12–16 jam cahaya. Ikan diberi pakan secara rutin hingga 24–48 jam sebelum uji dimulai, *batch* ikan dinyatakan layak digunakan apabila mortalitas selama tujuh hari terakhir kurang dari 5%; bila mortalitas berada pada kisaran 5–10%, maka aklimatisasi diperpanjang tujuh hari, sedangkan mortalitas di atas 10% menyebabkan *batch* tidak dapat digunakan dalam uji toksisitas akut ini.

3.4.6.4 Kelompok Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan 7 kelompok uji, yaitu kelompok kontrol air, kontrol basis, serta lima kelompok perlakuan dengan konsentrasi nanoemulsi yang berbeda. Penentuan jumlah hewan uji mengacu pada pedoman OECD *Test Guideline* 203, yang mensyaratkan bahwa setiap kelompok uji maupun kontrol harus terdiri dari sekurang-kurangnya 7 ekor ikan zebra.

Tabel 3.2 Kelompok dan Perlakuan Hewan Uji

Kelompok	Perlakuan
Kontrol air	Ikan zebra dipelihara dalam air <i>reverse osmosis</i> (RO) tanpa nanoemulsi.
Basis formulasi (Tween 80 & PEG)	Ikan zebra dipaparkan basis nano yang mengandung Tween 80 dan PEG dalam aquadest tanpa bahan aktif.
Perlakuan 1	Ikan zebra dipaparkan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan–jintan Hitam pada konsentrasi 50 ppm.
Perlakuan 2	Ikan zebra dipaparkan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan–jintan Hitam pada konsentrasi 100 ppm.
Perlakuan 3	Ikan zebra dipaparkan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan–jintan Hitam pada konsentrasi 200 ppm.

Perlakuan 4	Ikan zebra dipaparkan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan-jintan Hitam pada konsentrasi 400 ppm.
Perlakuan 5	Ikan zebra dipaparkan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan-jintan Hitam pada konsentrasi 800 ppm.

3.4.7 Perlakuan Hewan Uji

3.4.7.1 Pemeliharaan Ikan Zebra

Pengujian dilakukan selama 96 jam dengan metode statis sesuai pedoman OECD. Selama pengujian, kondisi lingkungan harus dijaga stabil, meliputi suhu 21–25°C dengan fluktuasi tidak lebih dari 2°C, oksigen terlarut minimal 60% kejenuhan, serta pH yang tetap berada pada rentang 6,0–8,5. Fotoperioda dipertahankan 12–16 jam cahaya. Setiap konsentrasi mengandung minimum 7 ekor ikan tanpa replikasi tangki, dengan beban biomassa tidak melebihi 0,8 g berat basah ikan/L. Tidak ada pemberian pakan selama pengujian. Aerasi diperbolehkan hanya jika terbukti tidak menurunkan konsentrasi bahan uji, yang harus diverifikasi melalui pengukuran konsentrasi.

3.4.7.2 Uji Validitas

Uji toksisitas akut ikan dinyatakan valid apabila memenuhi kriteria validitas berdasarkan OECD *Test Guideline* No. 203, yaitu mortalitas pada kelompok kontrol tidak melebihi 10% atau maksimal satu ekor ikan apabila jumlah ikan kontrol kurang dari sepuluh ekor pada akhir periode paparan. Selain itu, konsentrasi oksigen terlarut selama pengujian harus dipertahankan $\geq 60\%$ dari nilai kejenuhan udara pada seluruh wadah uji sepanjang periode paparan, serta pengukuran analitik konsentrasi bahan uji.

3.4.7.3 *Fish Acute Toxicity (FAT)*

Larutan stok nanoemulsi disiapkan terlebih dengan mengencerkan nanoemulsi menggunakan *aquadest* dan dihomogenkan. Larutan stok tersebut selanjutnya digunakan untuk menyiapkan larutan uji dengan konsentrasi akhir 50, 100, 200, 400, 800 ppm hingga diperoleh konsentrasi akhir yang diinginkan pada volume total 5 L untuk setiap kelompok.

Larutan uji yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam wadah yang berisi 5 L air, kemudian diaduk hingga homogen. Setelah itu dimasukkan ke dalam kandang besar sebagai wadah uji dengan ukuran total 70 × 10 × 15 cm (panjang × lebar ×

tinggi) yang terdiri ruang individual berukuran 10×15 cm (panjang $\times$ lebar). Ikan zebra kemudian dimasukkan secara acak ke dalam masing-masing ruang, dengan jumlah tujuh ekor ikan per kelompok.

Pengujian toksisitas akut dilakukan selama 96 jam menggunakan sistem statis. Selama periode paparan, ikan tidak diberikan pakan. Pengamatan dilakukan terhadap mortalitas dan perubahan perilaku ikan selama pengujian. Parameter kualitas air meliputi suhu, pH, dan oksigen terlarut dimonitoring setiap hari. Semua ikan dipelihara tanpa pemberian pakan sepanjang durasi uji. Dilakukan *limit test* pada 100 ppm untuk menunjukkan bahwa $LC_{50} > 100$ ppm jika tidak terjadi mortalitas atau tanda klinis signifikan.

3.4.8 Pengamatan Tanda Klinis

Pengamatan tanda klinis dilakukan sepanjang periode pengujian dan dicatat bersamaan dengan pengamatan mortalitas. Pengamatan ini bertujuan untuk mengidentifikasi respons toksik subletal sebagai indikator awal gangguan fisiologis sebelum terjadinya kematian. Parameter tanda klinis yang diamati meliputi gangguan pola renang, kehilangan keseimbangan dan orientasi tubuh, perubahan distribusi posisi ikan dalam kolom air (permukaan atau dasar), gangguan ventilasi seperti hipo/hiperventilasi, perilaku *gulping* di permukaan, perubahan pigmentasi, serta kelainan fisik yang tampak seperti edema, eksophthalmia, produksi lendir berlebih, perdarahan, dan tanda klinis lain yang tercantum dalam *Annex 4 OECD TG 203*.

Tabel 3.3 Jadwal Pengamatan (OECD, 2025)

Hari ke-	Jam Pengamatan	Keterangan
0	10.00	2 jam setelah paparan dimulai
0	13.00	5 jam setelah paparan dimulai
1	08.00	24 jam setelah paparan dimulai
1	15.00	30 jam setelah paparan dimulai
2	08.00	48 jam setelah paparan dimulai
2	15.00	54 jam setelah paparan dimulai
3	08.00	72 jam setelah paparan dimulai
3	15.00	78 jam setelah paparan dimulai

4	08.00	96 jam setelah paparan dimulai
---	-------	--------------------------------

Pengamatan dilakukan sesuai waktu pengamatan yang tercantum pada **Tabel 3.3**. Pada setiap waktu pengamatan, masing-masing ikan diamati secara langsung selama ± 2 menit untuk mengidentifikasi perubahan perilaku dan tanda klinis yang muncul. Selain itu, setiap ikan direkam secara individual selama ± 1 menit sebagai bahan dokumentasi dan verifikasi hasil pengamatan.

Penilaian tanda klinis dilakukan oleh tiga penilai untuk meminimalkan subjektivitas. Penilai pertama melakukan observasi langsung selama pengujian berlangsung untuk memantau kondisi ikan, kemudian hasil pengamatan dikonfirmasi menggunakan rekaman video. Penilai kedua dan ketiga melakukan penilaian secara independen berdasarkan rekaman video pada setiap titik waktu pengamatan. Meskipun observasi langsung digunakan untuk monitoring selama pengujian, penilaian akhir tetap mengacu pada rekaman video yang digunakan bersama oleh seluruh penilai. Skor akhir tanda klinis ditentukan berdasarkan nilai median dari ketiga penilai.

Tabel 3. 4 Sistem Skoring Tanda Klinis pada Uji Toksisitas Akut Ikan Zebra

Skor	Tingkat Keparahan	Keterangan
0	Normal	Tidak ada perubahan perilaku/fisik. Normal seperti kontrol.
1	Abnormal Ringan	Perubahan sangat minimal, muncul sesekali, namun masih batas minimal
2	Abnormal Sedang	Perubahan jelas terlihat, frekuensi meningkat, mulai mengganggu aktivitas normal.
3	Abnormal Berat	Perubahan dominan, aktivitas terganggu signifikan.
4	Abnormal Sangat Berat	Kondisi ekstrem, hampir tidak bergerak /kehilangan kontrol/ mendekati kematian.

Penilaian dilakukan menggunakan sistem skoring ordinal 0–4 yang tertera pada **Tabel 3.4** yang menggambarkan tingkat keparahan perubahan tanda klinis. Skor 0 mengacu pada kondisi kelompok kontrol dalam penelitian ini. Rubrik penilaian lengkap seluruh parameter disajikan pada **Lampiran 14**, sedangkan lembar pengamatan disajikan pada **Lampiran 13**.

3.4.8.1 Pengamatan Mortalitas (LC₅₀)

Ikan dinyatakan mati apabila tidak menunjukkan gerakan operkulum (insang) dan tidak merespons rangsangan fisik pada bagian kaudal. Seluruh ikan mati harus segera diambil untuk mencegah penurunan kualitas air. Mortalitas dicatat pada setiap konsentrasi untuk menentukan nilai LC₅₀.

3.4.8.2 Pengamatan Histopatologi

Analisis histopatologi dilakukan untuk mengevaluasi perubahan jaringan hati secara mikroskopis. Pengamatan dilakukan menggunakan preparat histopatologi dengan pewarnaan hematoksin-eosin (HE). Pendekatan ini mengacu pada penelitian Jamir *et al.* (2024), yang melaporkan bahwa paparan senyawa tertentu pada ikan zebra dapat menimbulkan perubahan histopatologi yang tidak selalu tampak secara morfologis. Parameter pengamatan histopatologi yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada **Tabel 3.5**.

Tabel 3.5 Parameter Pengamatan Histopatologi Hati (Jamir *et al.*, 2024)

Parameter	Keterangan
1. Degenerasi hepatosit	1. Pembengkakan sel dan/atau vakuolisasi sitoplasma,
2. Nekrosis hepatosit	2. Kerusakan sel ditandai dengan inti sel hilang atau terfragmentasi,
3. Kongesti sinusoid	3. Pelebaran sinusoid akibat penumpukan darah

Pada akhir periode paparan, sebanyak tiga ekor ikan dari setiap kelompok perlakuan dipilih sebagai perwakilan untuk pemeriksaan histopatologi hati. Penilaian preparat histopatologi dilakukan oleh dokter spesialis patologi anatomi tersertifikasi di Laboratorium Washkita, Yogyakarta, Indonesia. Setiap preparat diamati pada seluruh lapang pandang dan dinilai berdasarkan parameter pada **Tabel 3.5** menggunakan sistem skoring sesuai **Tabel 3.6**. Skor diberikan berdasarkan luas area jaringan yang mengalami perubahan, kemudian nilai median dari ketiga preparat pada masing-masing kelompok digunakan untuk mewakili tingkat keparahan perubahan histopatologi kelompok tersebut.

Tabel 3. 6 Skoring Histopatologi (*Klopfleisch, 2013*)

Skor	Keterangan
0	Tidak ditemukan perubahan (normal)
1	Perubahan ringan (fokal, <25% lapang pandang)
2	Perubahan sedang (multifokal, 25–50% lapang pandang)
3	Perubahan berat (difus, >50–75% lapang pandang)
4	Perubahan sangat berat (difus luas, >75% lapang pandang)

3.4.9 Penanganan Hewan Uji Pasca Pengujian

Hewan uji yang masih hidup setelah rangkaian pengujian selesai dilakukan eutanasia secara humanis dengan cara perendaman dalam larutan tricaine pada konsentrasi 0,25–0,5 mg/mL sesuai pedoman AVMA (2020). Selanjutnya, hewan uji dimasukkan ke dalam plastik klip yang kemudian dibungkus dengan kantong plastik, ditutup rapat, dan disimpan di dalam lemari pendingin hingga dilakukan proses insinerasi oleh pihak ketiga.

3.5 Analisis Data

3.5.1 Analisis Kualitatif

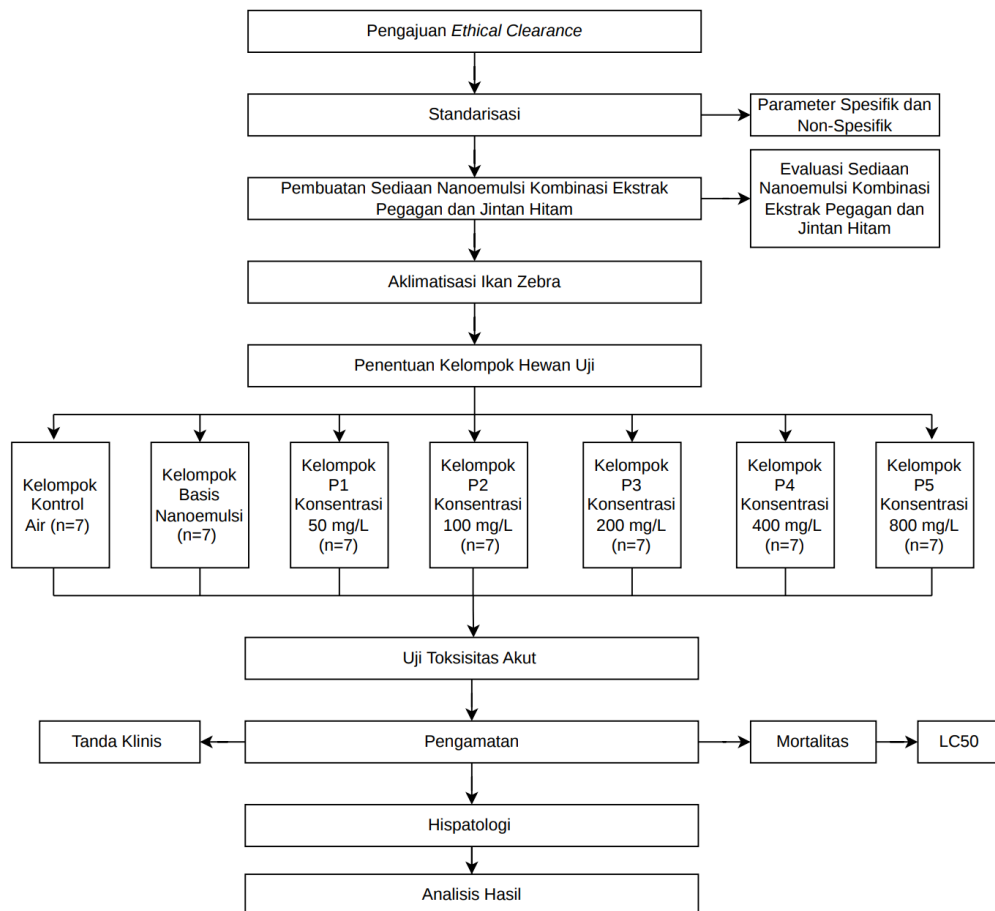
Analisis data kualitatif pada penelitian ini dapat dilihat dari hasil standarisasi jintan meliputi identifikasi senyawa *thymoquinone* pada ekstrak jintan hitam, hasil evaluasi sediaan berupa hasil uji organoleptik, uji homogenitas, uji sentrifugasi, uji *freeze-thaw cycle*, hasil pengamatan FAT berupa tanda klinis ikan zebra dan pengamatan histopatologi jaringan hati. Tanda klinis dinilai menggunakan sistem skoring sehingga menghasilkan data ordinal. Data diolah menggunakan *Microsoft Excel* untuk memperoleh nilai median dan selanjutnya divisualisasikan serta diinterpretasikan menggunakan *GraphPad Prism*.

3.5.2 Analisis Kuantitatif

Analisis data kuantitatif pada penelitian ini meliputi hasil standardisasi ekstrak jintan hitam berupa kadar air, kadar abu, kadar abu tidak larut asam, dan cemaran logam berat. Analisis juga dilakukan terhadap hasil evaluasi sediaan nanoemulsi yang meliputi persen transmitansi, viskositas, ukuran partikel, *polydispersity index* (PDI), dan zeta potensial. Data mortalitas ikan zebra digunakan untuk menentukan nilai LC_{50} melalui analisis probit menggunakan perangkat lunak SPSS versi 27.

Selain itu, skor perubahan histopatologi hati dianalisis menggunakan uji Jonckheere–Terpstra untuk mengetahui adanya tren perubahan skor histopatologi berdasarkan peningkatan konsentrasi perlakuan.

3.6 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

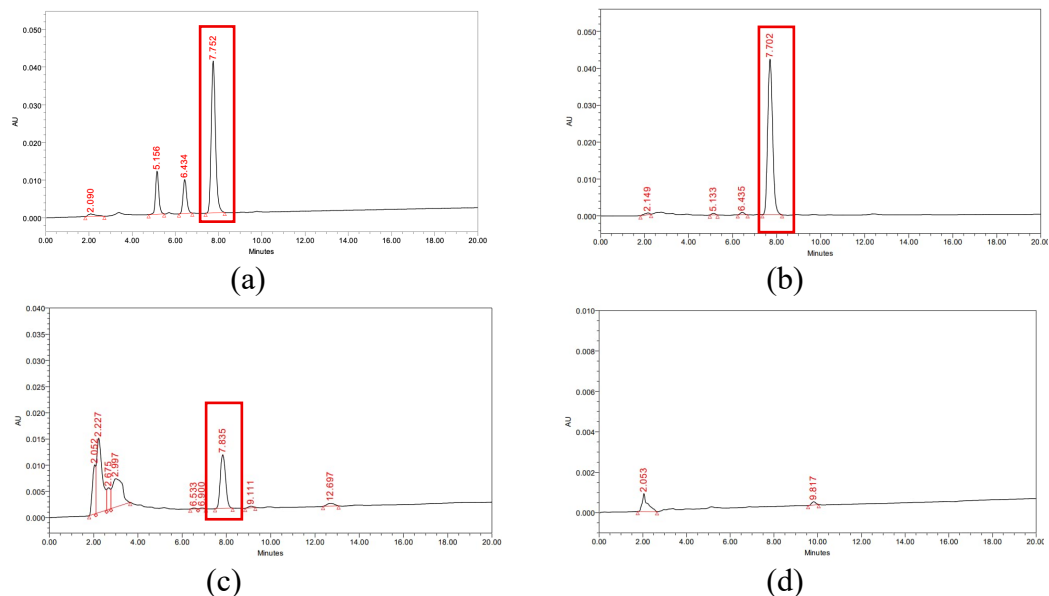
Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta, dengan nomor DP.04.03/e-KEPK.1/075/2026, yang ditujukan pada **Lampiran 1**. Selain itu, Ikan zebra yang digunakan sebagai subjek uji dalam penelitian ini juga telah dilakukan identifikasi dengan nomor surat 05/BI/SH/I/2025 yang ditujukan pada **Lampiran 2**.

4.1 Pengujian Parameter Spesifik

Berdasarkan hasil penelitian Ashfiya (2025), identifikasi senyawa penanda ekstrak etanol herba pegagan (*Centella asiatica* L.) menggunakan metode RP-HPLC menunjukkan adanya puncak *asiaticoside* pada waktu retensi sekitar 30 menit. Kesesuaian waktu retensi antara standar dan sampel menunjukkan bahwa senyawa yang terdeteksi memiliki karakteristik kromatografi yang serupa dengan standar *asiaticoside*.

4.1.1 Identifikasi Senyawa *Thymoquinone*

Identifikasi ini bertujuan untuk mengonfirmasi keberadaan *Thymoquinone* sebagai senyawa penanda dalam tanaman jintan hitam. Sampel yang dianalisis dapat dilihat pada **Gambar 4.1**.



Gambar 4.1. Hasil identifikasi Senyawa *Thymoquinone* dengan HPLC, (a) Identifikasi Senyawa *Thymoquinone* pada Standar *Thymoquinone*; (b) Identifikasi Senyawa *Thymoquinone* pada Ekstrak Jintan Hitam; (c) Identifikasi Senyawa *Thymoquinone* pada Nanoemulsi Kombinasi Ekstrak Pegagan dan Jintan Hitam; (d) Identifikasi Senyawa *Thymoquinone* pada Basis Formulasi

Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan metode RP-HPLC yang ditunjukkan pada **Gambar 4.1**, kesamaan waktu retensi antara standar *thymoquinone* (7,752 menit) dengan ekstrak jintan hitam (7,702 menit) dan sediaan nanoemulsi kombinasi ekstrak jintan hitam dan pegagan (7,835 menit) mengindikasikan bahwa senyawa yang terdeteksi dalam ekstrak maupun sediaan memiliki karakteristik kromatografi yang menyerupai standar *thymoquinone*. Tidak terdeteksinya puncak pada basis formulasi semakin mempertegas bahwa kemunculan puncak tersebut berasal dari senyawa aktif *thymoquinone*, bukan dari komponen pembawa. Hasil ini memberikan bukti bahwa ekstrak dan sediaan nanoemulsi yang diuji mengandung senyawa *thymoquinone* yang merupakan senyawa penanda dari tanaman jintan hitam (*Nigella sativa*).

4.2 Pengujian Parameter Non Spesifik

Hasil penelitian Ashfiya (2025) menunjukkan bahwa ekstrak etanol herba pegagan memiliki kadar air sebesar 0,84%, kadar abu total 9,54%, dan kadar abu tidak larut asam sebesar 1,40%, yang telah memenuhi persyaratan Farmakope Herbal Indonesia Edisi II. Pengujian cemaran logam berat menunjukkan kadar Cu sebesar 7,4 mg/L masih memenuhi persyaratan, sedangkan kadar Pb sebesar 21,4 mg/L dan Cd sebesar 3,9 mg/L melebihi batas maksimum yang ditetapkan. Hasil tersebut mengindikasikan adanya kemungkinan kontaminasi logam berat yang dipengaruhi oleh kondisi lingkungan maupun proses pengolahan bahan baku, sehingga pengendalian mutu ekstrak tetap diperlukan untuk menjamin keamanan penggunaannya.

4.2.1. Kadar Air

Penetapan kadar air bertujuan untuk mengetahui besarnya kandungan air di dalam ekstrak yang berkaitan dengan kemurnian serta potensi kontaminasi mikroba apabila kadar air melebihi batas yang dipersyaratkan (Depkes, 2000). Nilai kadar air yang tinggi berpotensi menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme dan menurunkan stabilitas ekstrak selama penyimpanan (Wijaya & Rissa, 2024). Hasil pengujian kadar air ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa* L.) menunjukkan nilai sebesar 0,66%, nilai tersebut memenuhi persyaratan batas maksimum kadar air ekstrak jintan hitam tidak lebih dari 9,6% (Kemenkes RI, 2022).

4.2.2. Kadar Abu

Pengujian kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran mengenai kandungan mineral, baik yang berasal dari bahan tanaman itu sendiri (internal) maupun dari kontaminan luar (eksternal) yang mungkin masuk selama proses pengolahan hingga tahap ekstraksi (Syukri *et al.*, 2020). Dalam penelitian ini, kadar abu total yang diperoleh dari ekstrak etanol 96% jintan adalah sebesar 0,71%. Nilai ini memenuhi persyaratan batas maksimum yang ditetapkan dalam Farmakope Herbal Indonesia, yaitu tidak lebih dari 2,9% (Kemenkes RI, 2022).

4.2.3. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Penetapan kadar abu tidak larut asam dimaksudkan untuk mengevaluasi ekstrak terhadap kontaminasi bahan-bahan yang mengandung silika seperti tanah dan pasir (Maryam *et al.*, 2020). Dalam penelitian ini, kadar abu tidak larut asam ekstrak etanol 70% biji jintan hitam (*Nigella sativa*) yang diperoleh adalah sebesar 0,14%. Nilai tersebut berada di bawah batas maksimum yaitu tidak lebih dari 0,7%, sehingga ekstrak dinyatakan memenuhi syarat mutu (Kemenkes RI, 2022). Nilai kadar abu tidak larut asam yang memenuhi standar mengindikasikan bahwa ekstrak terbebas dari kontaminan anorganik yang berlebih dan layak digunakan sebagai bahan baku sediaan farmasi (Azis *et al.*, 2026).

4.2.4. Pengujian Cemarkan Logam Berat

Pengujian cemarkan logam berat dilakukan terhadap ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) menggunakan metode Spektrofotometri Serapan Atom (SSA) dengan parameter uji meliputi tembaga (Cu), timbal (Pb), dan kadmium (Cd). Hasil pengujian disajikan pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4. 1 Hasil Identifikasi Cemarkan Logam Berat (Cu, Pb, dan Cd) dalam Ekstrak Jintan (*Nigella sativa*)

Parameter Uji	Hasil pengujian (mg/L)	Referensi* (mg/L)	Keterangan
Cemarkan logam Cu	0,3672	<150	Sesuai
Cemarkan logam Pb	2,9269	<10	Sesuai
Cemarkan logam Cd	0,3691	<0,3	Tidak Sesuai

*WHO Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines with Reference to Contaminants and Residues

Berdasarkan **Tabel 4.1** cemarkan logam Cu ini dinyatakan memenuhi persyaratan mutu. Cu merupakan mineral esensial yang dibutuhkan dalam berbagai proses fisiologis tubuh, termasuk metabolisme energi, pembentukan jaringan ikat,

dan sistem pertahanan antioksidan (Luo *et al.*, 2021). Meskipun demikian, Cu dapat bersifat toksik apabila terpapar dalam konsentrasi tinggi. Kadar Cu yang diperoleh pada penelitian ini masih jauh di bawah batas yang ditetapkan sehingga tidak menunjukkan risiko kontaminasi yang signifikan

Kadar timbal (Pb) dinyatakan memenuhi persyaratan mutu. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tingkat cemaran Pb pada sampel masih berada dalam batas yang dapat diterima dan tidak mengindikasikan adanya kontaminasi Pb yang signifikan. Pb merupakan logam berat non-esensial yang tidak memiliki fungsi biologis dalam tubuh dan dapat menimbulkan efek toksik apabila terpapar dalam jumlah yang berlebihan atau secara kronis (M. Gupta *et al.*, 2024). Cemaran Pb pada tanaman herbal umumnya berasal dari tanah, air irigasi, maupun deposisi polutan dari lingkungan sekitar (Luo *et al.*, 2021). Dengan demikian, kadar Pb pada sampel penelitian ini masih memenuhi persyaratan keamanan yang ditetapkan WHO untuk bahan baku herbal.

Kadar Cd yang diperoleh melampaui batas maksimum WHO, selisih yang ditemukan relatif kecil di atas batas yang dipersyaratkan. Kondisi ini dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor eksternal selama proses budidaya tanaman, mengingat tanaman herbal memiliki kemampuan menyerap Cd dari tanah, air irigasi, maupun deposisi atmosfer yang tercemar. Tingkat akumulasi Cd pada tanaman juga dipengaruhi oleh karakteristik lingkungan tumbuh, seperti pH tanah, kandungan bahan organik, kapasitas tukar kation, serta spesies tanaman yang digunakan (Luo *et al.*, 2021; Genchi *et al.*, 2020). Dari aspek keamanan, kadmium merupakan logam berat non-esensial yang bersifat toksik dan memiliki waktu paruh biologis yang panjang sehingga dapat terakumulasi di dalam tubuh setelah paparan berulang. Akumulasi Cd terutama terjadi pada ginjal dan hati, yang dalam jangka panjang berpotensi menyebabkan gangguan fungsi ginjal, stres oksidatif, kerusakan hati, demineralisasi tulang, serta peningkatan risiko gangguan reproduksi dan karsinogenesis (Genchi *et al.*, 2020; Faroon *et al.*, 2012).

Oleh karena itu, hasil yang diperoleh tidak serta-merta menunjukkan rendahnya kualitas formulasi yang dikembangkan, melainkan mengindikasikan perlunya pengendalian mutu yang lebih ketat pada tahap pemilihan bahan baku. Upaya yang dapat dilakukan antara lain melalui pemilihan sumber bahan baku dari

lahan dengan tingkat pencemaran rendah, pemantauan kualitas tanah dan air secara berkala, serta pengujian cemaran logam berat sebelum bahan baku digunakan dalam proses formulasi guna meminimalkan risiko kontaminasi pada produk akhir (Luo *et al.*, 2021; Genchi *et al.*, 2020).

4.3 Hasil Evaluasi Sediaan Nanoemulsi

4.3.1. Hasil Uji Organoleptik

Evaluasi organoleptik dilakukan untuk mengamati karakteristik fisik sediaan yang meliputi warna, aroma, dan konsistensi. Hasil pengamatan organoleptik Nanoemulsi kombinasi pegagan dan jintan disajikan pada **Tabel 4.2**.

Tabel 4. 2 Hasil Pengamatan Organoleptik Sediaan Nanoemulsi Kombinasi Pegagan dan Jintan (PJ)

Sediaan	Warna	Aroma	Konsistensi
Nanoemulsi PJ	Hijau tua	Khas ekstrak	Cair kental

Berdasarkan tabel hasil uji organoleptik terlihat bahwa nanoemulsi berwarna hijau tua. Kedua sediaan memiliki aroma khas masing-masing tanpa bau asing maupun tengik yang menandakan tidak terjadinya oksidasi komponen lipid selama proses pembuatan, serta homogen tanpa adanya pemisahan fase maupun endapan. Hal ini sesuai dengan karakteristik sediaan nanoemulsi yang baik, yaitu bertekstur cair kental, berwarna khas bahan penyusunnya, homogen, serta tidak berbau busuk atau tengik (Ma'arif *et al.*, 2023; Iskandar *et al.*, 2024)

4.3.2. Hasil Uji Persen Transmittansi

Evaluasi persen transmittan dilakukan untuk mengetahui tingkat kejernihan dan transparansi sediaan nanoemulsi (Helsawati *et al.*, 2023). Hasil pengujian persen transmittan nanoemulsi kombinasi pegagan dan jintan disajikan pada **Tabel 4.3**.

Tabel 4. 3 Hasil Pengujian Persen Transmittansi Nanoemulsi Kombinasi Pegagan dan Jintan (PJ)

Sediaan	%Transmittan	SD
Nanoemulsi PJ	91,7	0

Berdasarkan hasil pengujian, sediaan nanoemulsi memiliki kejernihan dan transparansi yang baik serta ukuran droplet telah mencapai skala nano. Semakin tinggi nilai persen transmittan maka semakin jernih penampilan sediaan, yang mencerminkan homogenitas dan kestabilan sistem dispersi nanoemulsi yang baik (Helsawati *et al.*, 2023; Sekti & Firmansah, 2025).

4.3.3. Hasil Uji Sentrifugasi

Uji sentrifugasi bertujuan untuk mengetahui kestabilan sediaan nanoemulsi, dimana ketahanan sediaan dalam waktu yang lama tanpa mengalami pemisahan fase (Nurhidayati *et al.*, 2020). Hasil dapat dilihat pada **Gambar 4.2**.



Gambar 4. 2. Hasil Uji Sentrifugasi Nanoemulsi Kombinasi Ekstrak Pegagan dan Jintan

Berdasarkan hasil pengujian, sediaan nanoemulsi tidak menunjukkan adanya pemisahan fase setelah dilakukan sentrifugasi. Tidak terjadinya pemisahan fase pada uji sentrifugasi mengindikasikan bahwa komposisi surfaktan, kosurfaktan, dan fase minyak dalam formulasi berada dalam keseimbangan yang baik sehingga sistem dispersi nanoemulsi yang terbentuk bersifat stabil (Ayuningtyas *et al.*, 2022). Hasil tersebut menunjukkan bahwa sediaan nanoemulsi stabil terhadap pengaruh kekuatan fisik.

4.3.4. Hasil Uji Ukuran Partikel, *Polydispersity Index* dan Zeta Potensial

Pengujian ukuran partikel, *polydispersity index* (PDI), dan zeta potensial dilakukan untuk mengevaluasi karakteristik fisik dan stabilitas koloid sediaan nanoemulsi. Hasil pengujian disajikan pada **Tabel 4.4**.

Tabel 4.4 Hasil pengujian ukuran partikel, *polydispersity index* dan zeta potensial Nanoemulsi Kombinasi Pegagan dan Jintan (PJ)

Sediaan	Ukuran Partikel (nm)	<i>Polydispersity Index</i> (PI)	Zeta Potensial (mV)
Nanoemulsi PJ	144,5 ± 0,32	0,454 ± 0,01	-31,6 ± 0,1

Berdasarkan hasil uji ukuran partikel, sediaan nanoemulsi yang diuji dalam tiga kali replikasi menunjukkan ukuran partikel yang memenuhi rentang ukuran nanoemulsi, yaitu 20–200 nm (Harwansh *et al.*, 2019). Ukuran droplet nanoemulsi yang kecil mampu menghasilkan luas permukaan dan luas antarmuka yang besar sehingga mendukung proses pelarutan zat aktif yang sukar larut dalam air

(Harwansh et al., 2019). Peningkatan luas permukaan tersebut juga berpotensi meningkatkan bioavailabilitas zat aktif melalui peningkatan laju disolusi dan absorpsi (Preeti *et al.*, 2023).

Nilai *Polydispersity Index* (PDI) yang diperoleh sediaan nanoemulsi telah memenuhi persyaratan. Nilai PDI yang baik adalah $< 0,7$ yang mengindikasikan distribusi ukuran partikel masih dapat diterima dan tidak menunjukkan adanya heterogenitas yang berlebihan dalam sistem dispersi (John *et al.*, 2024). Semakin rendah nilai PDI maka distribusi ukuran partikel akan semakin homogen, sedangkan nilai PDI yang tinggi menunjukkan distribusi ukuran partikel yang lebih luas dan kemungkinan terjadinya agregasi partikel (Preeti *et al.*, 2023)

Nilai Zeta potensial yang diperoleh menunjukkan bahwa sediaan nanoemulsi memenuhi batas keberterimaan zeta potensial untuk sistem nanoemulsi, yaitu $\geq +30$ mV dan ≤ -30 mV. Nilai zeta potensial yang tinggi menunjukkan adanya gaya tolak-menolak elektrostatis antarpartikel yang mampu mencegah terjadinya agregasi dan koalesensi, sehingga berkontribusi terhadap stabilitas sistem dispersi (Mohammed *et al.*, 2020). Semakin besar nilai absolut zeta potensial, semakin tinggi stabilitas fisik sistem karena partikel cenderung tetap terdispersi dan tidak mudah bergabung membentuk agregat. Dengan demikian, nilai zeta potensial yang diperoleh menunjukkan nanoemulsi memiliki stabilitas yang baik dan diperkirakan mampu mempertahankan homogenitas sistem selama penyimpanan (Loya *et al.*, 2023)

4.3.5. Hasil Uji Viskositas

Uji viskositas dilakukan untuk mengetahui tingkat kekentalan sediaan nanoemulsi yang dapat memengaruhi stabilitas fisik, kemampuan alir, dan kemudahan penggunaan sediaan (Rahmaniati *et al.*, 2018). Hasil pengujian disajikan pada **Tabel 4.5**.

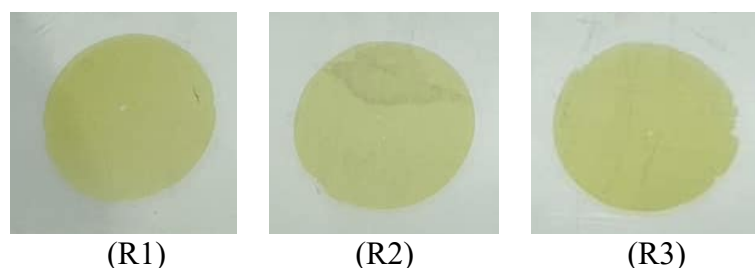
Tabel 4.5 Hasil Pengujian Viskositas Nanoemulsi Kombinasi Pegagan dan Jintan (PJ)

Sediaan	Rata-rata	SD
Nanoemulsi PJ	72,57	0,25

Berdasarkan hasil pengujian pada **Tabel 4.5**, Kedua sediaan memenuhi rentang viskositas sediaan nanoemulsi yang baik, yaitu 10–100 cP. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kedua sediaan memiliki kekentalan yang sesuai untuk mempertahankan stabilitas sistem dispersi (Rahmaniati *et al.*, 2018).

4.3.6. Hasil Uji Homogenitas

Uji homogenitas bertujuan untuk mengamati campuran bahan dalam formulasi sediaan. Sediaan dikatakan homogen apabila tidak tampak partikel atau massa kasar pada sediaan, yang diamati melalui distribusi warna dan pencampuran komponen menggunakan visual pada kaca bening (Rahma *et al.*, 2025). Hasil pengujian disajikan pada **Gambar 4.3**.



Gambar 4. 3 Hasil Uji Homogenitas Nanoemulsi Kombinasi Pegagan dan Jintan (R1) Replikasi 1;(R2) Replikasi 2;(R3) Replikasi 3

Hasil pengujian homogenitas sediaan nanoemulsi menunjukkan bahwa kedua sediaan bersifat homogen, ditandai dengan tidak ditemukannya butiran kasar maupun agregat (gumpalan) saat diamati pada kaca objek. Homogenitas sediaan nanoemulsi yang baik ditandai dengan tidak terjadinya koalesensi maupun pemisahan fase, yang menunjukkan bahwa seluruh komponen dalam formulasi telah terdispersi secara merata (R. Ibrahim *et al.*, 2026) Hasil ini menunjukkan bahwa proses formulasi nanoemulsi telah berjalan dengan baik dan sediaan memenuhi syarat homogenitas.

4.3.7. Hasil Uji Freeze Thaw Cycle

Uji *freeze thaw cycle* dilakukan untuk mengevaluasi kestabilan sediaan nanoemulsi terhadap perubahan suhu ekstrem secara berulang. Sediaan nanoemulsi yang stabil tidak mengalami pemisahan, pengendapan, *cracking*, maupun *creaming* setelah dilakukan uji freeze thaw (Pratiwi *et al.*, 2018). Hasil pengujian disajikan pada **Tabel 4.6**.

Tabel 4.6 Hasil Uji Stabilitas *Freeze-Thaw Cycle* Nanoemulsi Kombinasi Pegagan dan Jintan (PJ)

Sediaan	Siklus ke-1	Siklus ke-2	Siklus ke-3
Nanoemulsi PJ	+	+	+

Keterangan: (+) Tidak memisah, (-) Memisah

Berdasarkan hasil pengujian selama 3 siklus, basis nanoemulsi dan ekstrak nanoemulsi tidak menunjukkan adanya pemisahan fase maupun *cracking* pada setiap siklus yang dilakukan. Hasil ini mengindikasikan bahwa formulasi nanoemulsi yang dibuat memiliki ketahanan yang baik terhadap fluktuasi suhu dan dinyatakan memenuhi syarat stabilitas fisik sediaan nanoemulsi (Juliana *et al.*, 2024).

Secara keseluruhan, hasil evaluasi menunjukkan bahwa formulasi nanoemulsi kombinasi ekstrak etanol herba pegagan dan ekstrak etanol biji jintan hitam telah memenuhi karakteristik fisikokimia yang diharapkan. Sediaan memiliki penampilan organoleptik yang homogen, nilai persen transmitansi yang menunjukkan kejernihan sistem, ukuran partikel yang berada dalam rentang nanoemulsi, distribusi ukuran partikel yang seragam berdasarkan nilai *polydispersity index* (PDI), serta nilai zeta potensial yang menunjukkan stabilitas dispersi yang baik. Selain itu, nilai viskositas masih berada dalam rentang yang dipersyaratkan dan pengujian stabilitas melalui metode sentrifugasi maupun *freeze-thaw cycle* tidak menunjukkan adanya pemisahan fase atau perubahan karakteristik fisik sediaan. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa formulasi nanoemulsi kombinasi ekstrak etanol herba pegagan dan ekstrak etanol biji jintan hitam memiliki karakteristik yang baik, stabil secara fisik, serta berpotensi digunakan sebagai sistem penghantaran bahan aktif untuk penelitian lebih lanjut.

4.4 Hasil Uji *Fish Acute Toxicity*

4.4.1 Hasil Pengamatan Tanda Klinis

Pengamatan tanda klinis dilakukan selama 96 jam pada seluruh kelompok perlakuan untuk mengevaluasi respons toksik ikan zebra terhadap paparan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan jintan hitam. Hasil pengamatan pada masing-masing parameter disajikan pada **Tabel 4. 7**.

Tabel 4.8. Skor Tanda Klinis Ikan Zebra Selama 96 Jam Pengamatan pada Berbagai Kelompok Perlakuan

Parameter	Kelompok Uji						
	Normal	Basis	50 ppm	100 ppm	200 ppm	400 ppm	800 ppm
Hipoaktif	0	2	0	0	0	0	2
Hiperaktif	0	0	0	0	0	0	0
Berenang di Permukaan	0	0	0	0	0	0	0
Berenang di Dasar	0	3	1	1	2	2	3
Terlalu Reaktif Terhadap Stimulus	0	0	1	1	3	0	0
Dibawah Kontrol Terhadap Stimulus	0	0	0	0	0	2	3
Hiperventilasi	0	3	0	0	2	2	3
Hipoventilasi	0	0	1	0	0	0	0
Meneguk	0	0	0	0	0	0	0
Gumpalan Feses	0	0	0	0	0	0	0
Sekresi Lendir	0	0	0	0	0	2	1

Secara umum, hasil pengamatan menunjukkan bahwa kelompok kontrol normal tidak menampilkan perubahan tanda klinis apapun selama 96 jam pengamatan, yang mengonfirmasi bahwa kondisi media pengujian dan prosedur pemeliharaan tidak menyebabkan stres fisiologis pada ikan. Sebaliknya, kelompok basis dan kelompok perlakuan nanoemulsi menunjukkan kemunculan berbagai tanda klinis dengan intensitas yang bervariasi, di mana secara umum skor cenderung meningkat pada konsentrasi yang lebih tinggi (400 dan 800 ppm), khususnya pada parameter berenang di dasar, hiperventilasi, dan sekresi lendir. Kemunculan tanda klinis pada kelompok basis juga mengindikasikan adanya kontribusi eksipien formulasi terhadap respons toksik yang teramati. Pembahasan lebih rinci mengenai masing-masing parameter disajikan sebagai berikut.

a. Hipoaktif

Hipoaktif didefinisikan sebagai penurunan aktivitas spontan ikan yang ditandai dengan gerakan melambat, berkurangnya respons terhadap rangsangan, hingga kondisi diam sepenuhnya (OECD, 2025). Kemunculan hipoaktif pada kelompok basis mengindikasikan bahwa eksipien formulasi, khususnya Tween 80, memiliki kontribusi terhadap efek depresi motorik secara mandiri, sejalan dengan laporan JH & Jung (2021) mengenai hubungan antara paparan surfaktan dengan penurunan

aktivitas lokomotor *zebrafish*. Pada kelompok konsentrasi tertinggi, hipoaktif yang teramati diduga berkaitan dengan gangguan pada sistem saraf akibat akumulasi beban paparan, sebagaimana dilaporkan oleh Ren *et al.* (2016) bahwa penurunan aktivitas asetilkolinesterase (AChE) otot *zebrafish* berkorelasi dengan penurunan aktivitas spontan seiring meningkatnya konsentrasi.

b. Hiperaktif

Hiperaktif didefinisikan sebagai peningkatan aktivitas spontan berupa gerakan berenang tidak teratur atau respons berlebihan terhadap lingkungan (OECD, 2025). Tidak teramatinya tanda klinis ini pada seluruh kelompok mengindikasikan bahwa paparan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan jintan hitam tidak memicu kondisi hipereksitabilitas sistem saraf yang menetap pada *zebrafish*, berbeda dari pola yang umumnya dilaporkan pada paparan senyawa neurotoksik yang biasanya diawali fase hiperaktif sebelum berkembang menjadi depresi motorik (Satpathy & Parida, 2020).

c. Berenang di permukaan

Berenang di permukaan didefinisikan sebagai perilaku abnormal berupa kecenderungan ikan berada di dekat antarmuka air-udara (OECD, 2025). Tidak teramatinya tanda klinis ini pada seluruh kelompok mengindikasikan bahwa fungsi respirasi ikan masih dapat dipertahankan dalam kondisi yang memadai selama periode paparan dan tidak terjadi kondisi hipoksia akut yang signifikan. Berenang di permukaan umumnya merupakan indikator gangguan respirasi berat akibat penurunan kapasitas pertukaran oksigen melalui insang (Abdallah *et al.*, 2015), sehingga ketiadaan tanda ini memperkuat bahwa kerusakan fungsional insang yang berarti tidak terjadi pada rentang konsentrasi yang diuji.

d. Berenang di dasar

Berenang di dasar didefinisikan sebagai kecenderungan abnormal ikan untuk menetap di dekat dasar wadah uji, berbeda dari pola renang normal *zebrafish* yang umumnya tersebar di seluruh kolom air (OECD, 2025). Parameter ini merupakan tanda klinis yang paling konsisten teramati sepanjang periode pengujian, bahkan pada konsentrasi terendah. Perilaku *bottom dwelling* telah diidentifikasi sebagai indikator stres fisiologis dan gangguan neuromotor pada *zebrafish* (Stewart *et al.*, 2012), sehingga konsistensinya pada hampir seluruh kelompok perlakuan

menunjukkan sensitivitas parameter ini sebagai bioindikator awal paparan toksik subletal.

e. Terlalu reaktif terhadap stimulus

Terlalu reaktif terhadap stimulus merupakan perilaku abnormal berupa respons berlebihan terhadap rangsangan visual, sentuhan, atau getaran yang mencerminkan kondisi hipereksitabilitas (OECD, 2025). Tanda klinis ini lebih dominan teramati pada konsentrasi rendah hingga sedang dan tidak muncul pada konsentrasi tinggi, yang diduga mencerminkan pergeseran kondisi dari hipereksitabilitas menuju depresi sensorimotorik seiring meningkatnya beban paparan. Ogungbemi *et al.* (2019) melaporkan bahwa paparan toksikan dapat meningkatkan sensitivitas ikan terhadap stimulus eksternal pada konsentrasi rendah, sementara pada konsentrasi lebih tinggi penurunan aktivitas umum mendominasi respons yang teramati. Interpretasi ini didukung oleh kemunculan hipoaktif dan penurunan respons stimulus pada kelompok konsentrasi tinggi (Faria *et al.*, 2022).

f. Di bawah Kontrol terhadap Stimulus

Penurunan respons terhadap stimulus didefinisikan sebagai berkurangnya kemampuan *zebrafish* dalam memberikan respons normal terhadap rangsangan eksternal akibat gangguan fisiologis maupun neurologis (OECD, 2025). Parameter ini menunjukkan hubungan dosis-respons yang jelas, di mana gangguan fungsi sensorimotorik semakin nyata seiring meningkatnya konsentrasi paparan. Bailey *et al.* (2013) menyatakan bahwa respons terhadap stimulus merupakan parameter kunci dalam evaluasi fungsi sensorimotorik *zebrafish*, sedangkan Huang *et al.* (2014) melaporkan bahwa perubahan perilaku akibat paparan toksikan semakin nyata seiring meningkatnya konsentrasi. Tingginya skor pada kelompok basis turut mengindikasikan kontribusi eksipien yang signifikan terhadap gangguan sensorimotorik ini.

g. Hiperventilasi

Hiperventilasi didefinisikan sebagai peningkatan frekuensi gerakan operkulum melebihi kondisi normal sebagai respons kompensasi untuk meningkatkan pengambilan oksigen (OECD, 2025). Parameter ini merupakan tanda klinis respirasi yang paling menonjol dan menunjukkan hubungan dosis-respons yang relatif jelas, di mana peningkatan frekuensi gerakan operkulum mencerminkan

upaya kompensasi ikan dalam mempertahankan kecukupan oksigen di bawah tekanan fisiologis akibat paparan bahan uji. Satpathy & Parida (2020) dan Huang *et al.* (2014) melaporkan bahwa peningkatan gerakan operkulum merupakan salah satu indikator awal gangguan respirasi pada *zebrafish* yang muncul seiring meningkatnya konsentrasi paparan. Kemunculan hiperventilasi pada kelompok basis mengonfirmasi bahwa eksipien formulasi turut memberikan beban fisiologis pada sistem respirasi ikan secara mandiri.

h. Hipoventilasi

Hipoventilasi didefinisikan sebagai penurunan frekuensi gerakan operkulum di bawah kondisi normal yang mencerminkan melambatnya aktivitas ventilasi insang (OECD, 2025). Tidak adanya hubungan dosis-respons yang jelas serta intensitas yang hanya bersifat ringan mengindikasikan bahwa hipoventilasi bukan merupakan respons utama terhadap paparan nanoemulsi ini. Kemunculannya yang bersifat sporadis diduga berkaitan dengan gangguan sementara pada regulasi ventilasi atau fungsi neuromotor yang mengendalikan gerakan operkulum, sebagaimana dikemukakan oleh Kevin Pan *et al.* (2023).

i. Meneguk (*Gasping*)

Meneguk (*gasping*) didefinisikan sebagai gerakan mulut dan operkulum yang meningkat di dekat permukaan air sebagai respons terhadap gangguan respirasi berat atau penurunan ketersediaan oksigen (OECD, 2025). Tidak teramatinya tanda klinis ini pada seluruh kelompok memperkuat bahwa paparan nanoemulsi pada rentang konsentrasi yang diuji hanya menyebabkan gangguan respirasi subletal yang masih dapat dikompensasi oleh mekanisme fisiologis ikan. *Gasping* umumnya merupakan respons terhadap kondisi hipoksia berat atau kerusakan insang yang parah sehingga pertukaran gas tidak lagi mencukupi (Mandic *et al.*, 2022; Jamir *et al.*, 2024), sehingga ketiadaannya mengindikasikan bahwa kondisi tersebut tidak tercapai selama periode pengujian.

j. Gumpalan feses

Gumpalan feses didefinisikan sebagai kondisi abnormal yang ditandai oleh adanya untaian feses menggantung dari anus atau ditemukan di dasar wadah uji (OECD, 2025). Tidak teramatinya tanda klinis ini pada seluruh kelompok mengindikasikan bahwa paparan nanoemulsi tidak menyebabkan gangguan fungsi

gastrointestinal yang signifikan. Perlu diperhatikan bahwa prosedur pengujian OECD mengharuskan penghentian pemberian pakan selama 96 jam, sehingga produktivitas feses secara keseluruhan berkurang dan sensitivitas parameter ini menjadi terbatas dalam kondisi pengujian.

k. Sekresi lendir berlebih

Sekresi lendir berlebih didefinisikan sebagai peningkatan produksi atau penumpukan lendir pada permukaan tubuh ikan maupun di dalam media pemeliharaan dibandingkan kondisi normal (OECD, 2025). Kemunculan tanda klinis ini hanya pada konsentrasi tinggi menunjukkan bahwa mekanisme pertahanan mukus baru teraktivasi ketika paparan mencapai ambang tertentu. Lendir berperan sebagai lapisan pelindung yang mengurangi kontak langsung antara jaringan epitel dengan agen yang berpotensi mengganggu homeostasis fisiologis, dan sistem mukus *zebrafish* diketahui bersifat dinamis serta dapat meningkat sebagai respons terhadap stres lingkungan maupun paparan toksikan untuk mempertahankan integritas epitel (Jevtov *et al.*, 2014).

Selain parameter yang diamati secara sistematis, terdapat temuan individual berupa pendarahan pada regio *ventral operculum* dan *caudal peduncle* yang ditemukan pada satu ekor ikan di kelompok 400 ppm dan satu ekor di kelompok 800 ppm. Meskipun tidak representatif secara kelompok, kemunculannya pada konsentrasi tinggi mengindikasikan adanya respons toksik subletal yang perlu dicatat, sejalan dengan laporan Jamir *et al.* (2024) bahwa hemoragik pada tubuh *zebrafish* merupakan salah satu tanda klinis akut yang dapat muncul pada paparan toksikan konsentrasi tinggi.

Secara keseluruhan, tanda klinis yang teramati selama 96 jam pengamatan bersifat subletal dengan pola respons yang bergantung pada konsentrasi paparan. Gangguan lokomotor dan respirasi merupakan manifestasi yang paling dominan, sementara tidak teramatinya tanda klinis berat pada seluruh kelompok menunjukkan bahwa gangguan fisiologis yang terjadi masih berada dalam batas yang dapat dikompensasi oleh mekanisme homeostasis ikan. Kontribusi eksipien formulasi, khususnya Tween 80, juga perlu dipertimbangkan mengingat kelompok basis turut menunjukkan beberapa tanda klinis yang sebanding dengan kelompok perlakuan.

4.4.2 Mortalitas Ikan Zebra dan Nilai LC_{50}

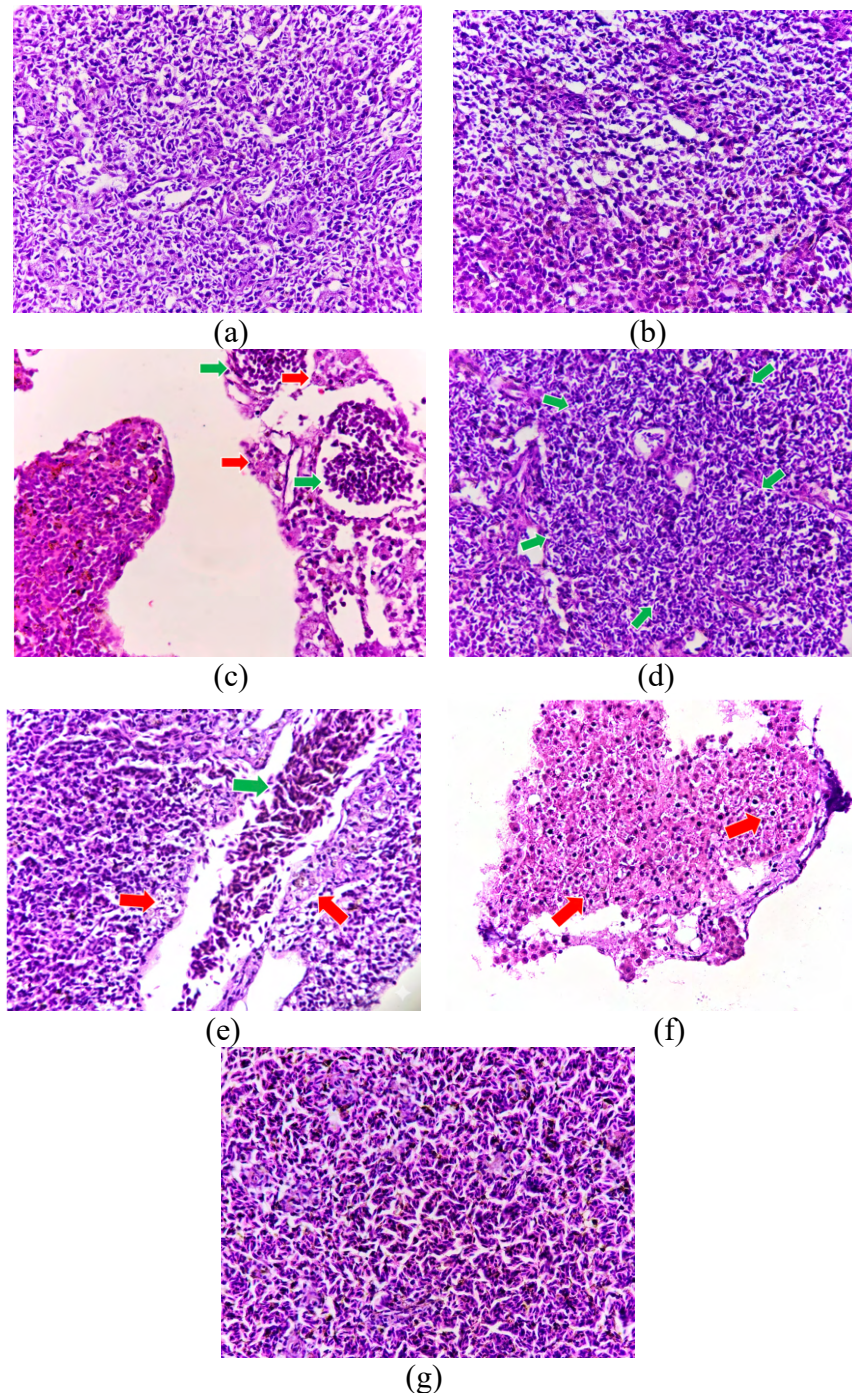
Pengamatan mortalitas selama 96 jam menunjukkan bahwa tidak terdapat kematian ikan zebra pada seluruh kelompok perlakuan hingga konsentrasi tertinggi 800 ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa paparan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan jintan hitam tidak menimbulkan efek letal akut pada kondisi pengujian yang digunakan. Oleh karena itu, nilai LC_{50} formulasi nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan jintan hitam dinyatakan lebih besar dari konsentrasi tertinggi yang diuji ($LC_{50} > 800$ ppm). Berdasarkan kriteria Globally Harmonized System (GHS, 2013), nilai $LC_{50} > 100$ mg/L tergolong *Not Classified*, yang berarti nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan jintan hitam tidak diklasifikasikan sebagai berbahaya akut terhadap organisme akuatik.

Hasil ini sejalan dengan profil toksisitas masing-masing bahan aktif yang telah dilaporkan sebelumnya. Ekstrak etanol daun pegagan dilaporkan memiliki nilai LC_{50} sebesar 1250 ppm pada *zebrafish* (Zakaria *et al.*, 2019), sedangkan formulasi SNEDDS jintan hitam memiliki nilai LC_{50} sebesar 154,63 ppm (Utami & Miladiyah, 2020). Meskipun nilai LC_{50} SNEDDS jintan hitam lebih rendah dibandingkan estimasi pada penelitian ini, perbedaan tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh perbedaan komposisi formulasi, konsentrasi bahan aktif yang digunakan, serta adanya kombinasi dengan ekstrak pegagan yang dapat memengaruhi profil toksisitas keseluruhan sediaan. Utami & Miladiyah (2020) juga melaporkan bahwa sistem nano tidak meningkatkan toksisitas secara signifikan dibandingkan bentuk non-nano, yang mendukung temuan bahwa teknologi nanoemulsi dalam penelitian ini tidak memperburuk profil keamanan bahan aktif.

Meskipun tidak ditemukan mortalitas, tanda klinis subletal tetap teramati pada seluruh kelompok perlakuan dengan intensitas yang meningkat seiring bertambahnya konsentrasi dan durasi paparan. Hal ini menunjukkan bahwa ketiadaan mortalitas tidak berarti absennya efek toksik, melainkan bahwa gangguan fisiologis yang terjadi masih berada pada level subletal yang belum mencapai ambang letal.

4.4.3 Hasil Pengamatan Histopatologi

Hasil Pengamatan histopatologi disajikan pada **Gambar 4.4**, kemudian data skor hasil uji histopatologi pada masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada **Tabel 4**.



Gambar 4. 4. Gambaran histopatologi jaringan hati *Danio rerio* setelah paparan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan jintan hitam selama 96 jam. pewarnaan Hematosiklin-Eosin (H&E), perbesaran 40×. (a) Kontrol; (b) 50 ppm; (c) 100 ppm; (d) 200 ppm; (e) 400 ppm; (f) 800 ppm; (g) Basis

Keterangan: ➡ vakuolisasi sitoplasma; ➡ dilatasi sinusoid

Tabel 4.9 Median Skor Histopatologi Jaringan Hati *Zebrafish* pada Berbagai Kelompok Perlakuan

Kelompok	Vakuolisasi Sitoplasma	Dilatasi Sinusoid	Nekrosis Hepatosit	Keterangan
Kontrol	0	0	0	Normal
50 ppm	0	0	0	Normal
100 ppm	1	1	0	Ringan–Sedang
200 ppm	0	2	0	Ringan–Sedang
400 ppm	1	1	0	Ringan
800 ppm	2	0	0	Berat
Basis	0	0	0	Normal

Keterangan: 0 = tidak ada; 1 = ringan/fokal (<25%); 2 = sedang/multifokal (25–50%); 3 = berat/difus (>50%) 4 = Perubahan sangat berat (difus luas, >75% lapang pandang)

Jaringan hati kelompok kontrol, 50 ppm, dan basis menunjukkan gambaran histologis normal tanpa adanya vakuolisasi sitoplasma maupun dilatasi sinusoid. Hepatosit tampak pada kelompok 50 ppm menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut belum menimbulkan perubahan struktural hati yang dapat diamati secara histopatologi. Sementara itu, normalnya gambaran histologi pada kelompok basis mengindikasikan bahwa komponen eksipien formulasi tidak memberikan efek hepatotoksik.

Vakuolisasi sitoplasma hepatosit yang teramati pada beberapa kelompok perlakuan ditandai oleh terbentuknya ruang-ruang kosong pada sitoplasma dengan inti sel yang masih tampak utuh. Perubahan ini merupakan lesi degeneratif yang pada umumnya masih bersifat reversibel apabila faktor penyebabnya dihilangkan (Vliegenthart *et al.*, 2014). Pada *zebrafish*, vakuolisasi hepatosit sering dikaitkan dengan gangguan metabolisme intraseluler, akumulasi lipid, maupun stres oksidatif akibat paparan senyawa toksik (Ye *et al.*, 2022). Peningkatan keparahan vakuolisasi pada kelompok konsentrasi tertinggi menunjukkan bahwa paparan nanoemulsi memberikan tekanan fisiologis yang lebih besar terhadap hepatosit seiring meningkatnya konsentrasi.

Dilatasi sinusoid yang teramati pada beberapa kelompok perlakuan ditandai secara mikroskopis oleh pelebaran ruang sinusoid yang berisi eritrosit. Perubahan ini mengindikasikan adanya gangguan vaskular pada jaringan hati sebagai respons terhadap paparan bahan uji. Temuan serupa dilaporkan oleh Arman (2021) pada *zebrafish* yang terpapar senyawa toksik, di mana dilatasi sinusoid dapat terjadi

akibat gangguan sirkulasi mikro maupun perubahan hemodinamik intrahepatik sebagai bentuk respons jaringan terhadap stres seluler (Brancatelli *et al.*, 2018).

Secara keseluruhan, paparan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan jintan hitam menyebabkan perubahan histopatologi hati berupa dilatasi sinusoid dan vakuolisasi sitoplasma hepatosit. Tidak ditemukan nekrosis pada seluruh kelompok perlakuan, sehingga kerusakan yang teramati masih terbatas pada perubahan vaskular dan degeneratif tanpa adanya kematian sel. Temuan ini menunjukkan bahwa hati *zebrafish* masih mampu mempertahankan integritas strukturalnya meskipun telah terjadi respons jaringan pada konsentrasi yang lebih tinggi.

Hasil uji statistik menggunakan Jonckheere–Terpstra menunjukkan bahwa hanya parameter vakuolisasi sitoplasma yang memiliki tren peningkatan skor yang signifikan seiring dengan meningkatnya konsentrasi perlakuan ($p < 0,05$), sedangkan parameter dilatasi sinusoid dan nekrosis tidak menunjukkan tren peningkatan yang signifikan ($p > 0,05$). Temuan ini mengindikasikan bahwa vakuolisasi sitoplasma merupakan parameter histopatologi yang paling sensitif dalam menggambarkan hubungan dosis–respons terhadap paparan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan dan jintan hitam.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Sediaan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dan jintan hitam (*Nigella sativa* L.) memiliki karakteristik fisikokimia yang baik sehingga menghasilkan sediaan yang optimal.
2. Paparan nanoemulsi kombinasi ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.) dan jintan hitam (*Nigella sativa* L.) pada ikan zebra (*Danio rerio*) menunjukkan adanya peningkatan tanda klinis seiring bertambahnya konsentrasi dan lama paparan. Meskipun demikian, selama 96 jam pengamatan tidak ditemukan kematian ikan, sehingga nilai LC₅₀ diperkirakan lebih dari 800 ppm. Hasil histopatologi hati menunjukkan perubahan ringan hingga sedang. Secara keseluruhan, hasil tersebut menunjukkan bahwa sediaan memiliki toksisitas akut yang rendah

5.2 Saran

Perlu dilakukan analisis kimia media uji secara lebih komprehensif, termasuk verifikasi konsentrasi bahan uji selama pengujian, sehingga kestabilan paparan dan validitas hasil uji toksisitas dapat dipastikan, serta pengamatan histopatologi pada organ lain untuk memperoleh gambaran toksisitas yang lebih komprehensif. Selain itu, pengujian dengan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) setelah uji *freeze-thaw* perlu dilakukan untuk memastikan kestabilan nanoemulsi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agistia, N., Oktaviani, M., Mukhtadi, W. K., & Ariska, D. (n.d.). Formulasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Emulgel Minyak Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 2.
- Agustin, R. D., & Taihuttu, Y. M. J. (2021). Formulation and physical stability test of hand sanitizer based on nutmeg oil (*Myristica fragrans* Houtt). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 800(1), 012032. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/800/1/012032>
- Ali, S., Mil, H. G. J. V., & Richardson, M. K. (2011). Large-Scale Assessment of the Zebrafish Embryo as a Possible Predictive Model in Toxicity Testing. *PLoS ONE*, 6(6), e21076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021076>
- Ananingsih, V. K., Pratiwi, A. R., Soedarini, B., & Putra, Y. A. S. (2024). Formulation of nanoemulsion parijoto fruit extract (*Medinilla Speciosa*) with variation of tweens stabilizers. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1398809. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1398809>
- Ashfiya, S. (2025). *Profil Iritasi Akut Dermal Sediaan Nanohidrogel Ekstrak Herba Pegagan (Centella asiatica (L.) Urban) pada Kelinci* [Undergraduate thesis]. Universitas Islam Indonesia.
- Ayuningtyas, N. D., Solichah, A. I., Fadhillah, R. N., & Subekti, T. (2022). Formulasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Nanoemulsi Mouthwash Ekstrak Etanol Daun Jeringau (*Acorus calamus* Linn.): Formulation and Antimicrobial Activity of Jeringau Leaves Extract (*Acorus calamus* Linn.) Nanoemulsion Mouthwash. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 4(SE-1), 93–100. <https://doi.org/10.25026/jsk.v4iSE-1.1694>
- Azis, A. A. H., Pratiwi, Y., Burhanuddin, I., & Putri, I. M. (2026). Standardisasi Simplisia dan Ekstrak Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale* L.) dari Kabupaten Gowa Sulawesi Selatan. *Jurnal Kefarmasian dan Gizi*.
- Azzahra, F., Yulianti, R., & Indra. (2022). Optimasi Gelatin-Gliserin pada Sediaan Gummy Candies Ekstrak Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.). *Journal of Pharmacopolium*, 5(2), 135–141.
- Depkes, R. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.
- Djoko, W., Taurhesia, S., Djamil, R., & Simanjuntak, P. (2020). Standardisasi Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centella asiatica*). *Sainstech Farma: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 13(2), 118–123.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2015). Niacin and contribution to normal energy-yielding metabolism: Evaluation of a health claim pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 13(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4180>
- Elfianis, R. (2022). *Klasifikasi dan Morfologi Tanaman Daun Pegagan*. <https://agrotek.id/klasifikasi-dan-morfologi-tanaman-daun-pegagan/>
- El-SiKaily, A., & Shabaka, S. (2024). Biomarkers in aquatic systems: Advancements, applications and future directions. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 50(2), 169–182. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2024.05.002>

- European Medicines Agency (EMA). (2013). *Questions and answers on propylene glycol used as an excipient in medicinal products for human use* (EMA/CHMP/704195/2013). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-and-answers-propylene-glycol-used-excipient-medicinal-products-human-use_en.pdf
- Faroon, O., Ashizawa, A., Wright, S., Tucker, P., Jenkins, K., Ingerman, L., & Rudisill, C. (2012). *Toxicological Profile for Cadmium*. (Original work published Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US))
- Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. (2020). The Effects of Cadmium Toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), 3782. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113782>
- Glabella, P., Putri, S. R., Haryani, E., & Wahyuni, A. E. T. H. (2022). Uji In Vitro Efektivitas Ekstrak Biji Jintan Hitam (*Nigella Sativa* L.) terhadap Pertumbuhan *Microsporum gypseum* Penyebab Dermatitis pada Anjing. *Jurnal Sain Veteriner*, 40(2), 163. <https://doi.org/10.22146/jsv.69251>
- Gupta, M., Dwivedi, V., Kumar, S., Patel, A., Niazi, P., & Yadav, V. K. (2024). Lead toxicity in plants: Mechanistic insights into toxicity, physiological responses of plants and mitigation strategies. *Plant Signaling & Behavior*, 19(1), 2365576. <https://doi.org/10.1080/15592324.2024.2365576>
- Gupta, P., Sharma, S., Gupta, A., Kawish, S. M., Iqbal, M., Rahman, S., Aqil, M., Kohli, K., & Sultana, Y. (2024). Development and Validation of a Robust RP-HPLC Method for the Simultaneous Analysis of Exemestane and Thymoquinone and Its Application to Lipid-Based Nanoformulations. *ACS Omega*, 9(28), 30120–30130. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08078>
- Hanifah, M., & Jufri, M. (2018). Formulation and Stability Testing of Nanoemulsion Lotion Containing *Centella asiatica* Extract. *Journal of Young Pharmacists*, 10(4), 404–408. <https://doi.org/10.5530/jyp.2018.10.89>
- Harwansh, R. K., Deshmukh, R., & Rahman, M. A. (2019). Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 224–233.
- Hein, Z. M., Gopalakrishna, P. K., Kanuri, A. K., Thomas, W., Hussan, F., Naik, V. R., Shantakumari, N., Che Ramli, M. D., Mohd Moklas, M. A., Che Mohd Nassir, C. M. N., & Vishnumukkala, T. (2025). *Centella asiatica*: Advances in Extraction Technologies, Phytochemistry, and Therapeutic Applications. *Life*, 15(7), 1081. <https://doi.org/10.3390/life15071081>
- Helsawati, H., Ratnapuri, P. H., & Fitriana, M. (2023). Formulation and Evaluation of Nanoemulsion Kelakai (*Stenochlaena palustris*) Herbs with Composition of Smix (Tween 80 and Glycerin) and Pine Oil. *Borneo Journal of Pharmacy*, 6(4), 406–416. <https://doi.org/10.33084/bjop.v6i4.3817>
- Hendawy, A. A., Elgharbawy, A. A. M., Mohd Noor, N., Al-Saari, N., Azmi, N. A. N., & Mohd Salleh, H. (2024). Exploring the Safety of the Sustainable Toxicity Testing in Zebrafish and Brine Shrimp Using Nanoemulsions Formulated from Fish Byproducts and Lemon Oil. *Colloids and Interfaces*, 8(6), 59. <https://doi.org/10.3390/colloids8060059>

- Hendrawan, V. F., Oktanella, Y., Firmawati, A., & Agustina, G. C. (2023). The Effect of Black Cumin (*Nigella sativa*) on Histopathology of Liver and Kidney in Albino Rats with Organophosphate Exposure. *Jurnal Medik Veteriner*, 6(1), 35–42. <https://doi.org/10.20473/jmv.vol6.iss1.2023.35-42>
- Ibrahim, K., Hudu, S., Jega, A., Taha, A., Pharmacy, A., Usman, D., Adeshina, K., Umar, Z., Nyakudya, T., & Erlwanger, K. (2024). Thymoquinone: A comprehensive review of its potential role as a monotherapy for metabolic syndrome. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 27(10). <https://doi.org/10.22038/ijbms.2024.77203.16693>
- Ibrahim, R., Fahluhi, C. F., Cahyana, H. A., Buana, B. S., Aziz, A. M., Saputro, M. R., & Pratama, R. (2026). Review Artikel: Tinjauan Pengujian dan Peningkatan Stabilitas Sediaan Nanoemulsi dari Berbagai Bahan Alam. *Majalah Farmasetika*, 11(1). <https://doi.org/10.24198/mfarmasetika.v11i1.67962>
- International Organization for Standardization (ISO). (2017). *Particle size analysis—Dynamic light scattering (DLS)* (ISO 22412:2017). ISO. <https://www.iso.org/standard/65410.html>
- Iskandar, B., Liu, T.-W., Mei, H.-C., Kuo, I.-C., Surboyo, M. D. C., Lin, H.-M., & Lee, C.-K. (2024). Herbal nanoemulsions in cosmetic science: A comprehensive review of design, preparation, formulation, and characterization. *Journal of Food and Drug Analysis*, 32(4), 428–458. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3526>
- Jamir, A., Longkumer, S., & Punj, P. P. (2024). Acute Toxicity of Epigallocatechin Gallate and C-Phycocyanin in Zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and Histopathological Studies. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(86), 546–555. <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.1307>
- Jarmakiewicz-Czaja, S., Zielińska, M., Helma, K., Sokal, A., & Filip, R. (2023). Effect of *Nigella sativa* on Selected Gastrointestinal Diseases. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(4), 3016–3034. <https://doi.org/10.3390/cimb45040198>
- JH, H., & Jung, S. (2021). *Evaluasi Toksisitas Deterjen dan Surfaktan Rumah Tangga Menggunakan Ikan Zebra*. 156–164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12257-020-0109-3>
- John, R., Monpara, J., Swaminathan, S., & Kalhapure, R. (2024). Chemistry and Art of Developing Lipid Nanoparticles for Biologics Delivery: Focus on Development and Scale-Up. *Pharmaceutics*, 16(1), 131. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010131>
- Juliana, I., Fatmawati, A., Munir, M. A., Emelda, & Rahmawati, F. (2024). The effect of concentration variation on the physical properties and stability tests of freeze-thaw cycling on gel formula for the combination of moringa leaf extract and lime leaf extract. *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 7(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.36490/journal-jps.com>
- Kadhim, A., Ben Slima, A., Alneamah, G., & Makni, M. (2024). Assessment of Histopathological Alterations and Oxidative Stress in the Liver and Kidney of Male Rats following Exposure to Aluminum Chloride. *Journal of Toxicology*, 2024(1), 3997463. <https://doi.org/10.1155/2024/3997463>
- Kandasamy, T., Chandrasekar, S., Pichaivel, M., Pachaiappan, S., Muthusamy, G., & Sumathi, L. (2022). A Review of Zebrafish as an Alternative Animal

- Model and Its Benefits over Other Animal Models in Various Disease Conditions. *Saudi Journal of Biomedical Research*, 7(12), 355–359. <https://doi.org/10.36348/sjbr.2022.v07i12.005>
- Kemenkes RI. (2022). *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II: Suplemen I*.
- Kim, J.-H., Son, S.-H., Lee, H. W., Kim, J. H., Kang, S.-M., & Choi, C.-H. (2026). Scalable Nanoemulsion Formation of Lipophilic Active Ingredients via Low-Energy Phase Inversion. *Polymers*, 18(7), 794. <https://doi.org/10.3390/polym18070794>
- Klopfleisch, R. (2013). Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology—A systematic review. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 123. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-123>
- Kriegel, C., Festag, M., Kishore, R. S. K., Roethlisberger, D., & Schmitt, G. (2019). Pediatric Safety of Polysorbates in Drug Formulations. *Children*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.3390/children7010001>
- Kumar, M., Kumar, D., Mahmood, S., Singh, V., Chopra, S., Hilles, A. R., & Bhatia, A. (2024). Nanotechnology-driven wound healing potential of asiaticoside: A comprehensive review. *RSC Pharmaceutics*, 1(1), 9–36. <https://doi.org/10.1039/D3PM00024A>
- Lim, T. Y., Poole, R. L., & Pageler, N. M. (2014). Propylene Glycol Toxicity in Children. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, 19(4), 277–282. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-19.4.277>
- Luo, L., Wang, B., Jiang, J., Fitzgerald, M., Huang, Q., Yu, Z., Li, H., Zhang, J., Wei, J., Yang, C., Zhang, H., Dong, L., & Chen, S. (2021). Heavy Metal Contaminations in Herbal Medicines: Determination, Comprehensive Risk Assessments, and Solutions. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 595335. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595335>
- Ma'arif, B., Rani Azzahara, Fahrul Rizki, Arief Suryadinata, Abdul Wafi, Novia Maulina, & Hajar Sugihantoro. (2023). FORMULASI DAN KARAKTERISASI NANOEMULSI EKSTRAK ETANOL 70% DAUN SEMANGGI (*Marsilea crenata* C. Presl.): FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF 70% ETHANOL EXTRACT NANOEMULSION OF SEMANGGI (*Marsilea crenata* C. Presl.) LEAVES. *Medical Sains : Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 8(2), 733–746. <https://doi.org/10.37874/ms.v8i2.731>
- Mardisiwi, R. S., Kurniawati, A., Sulistyono, E., & Fardidah, D. D. N. (2018). Pertumbuhan dan Produksi Jintan Hitam pada Beberapa Komposisi Media Tanam dan Interval Penyiraman. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 46(1), 89. <https://doi.org/10.24831/jai.v46i1.16723>
- Maryam, F., Taebe, B., & Toding, D. P. (2020). Pengukuran Parameter Spesifik Dan Non Spesifik Ekstrak Etanol Daun Matoa (*Pometia pinnata* J.R. & G.Forst). *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 6(01), 1–12. <https://doi.org/10.35311/jmpi.v6i01.39>
- Mohammed, N. K., Muhialdin, B. J., & Meor Hussin, A. S. (2020). Characterization of nanoemulsion of *Nigella sativa* oil and its application in ice cream. *Food Science & Nutrition*, 8(6), 2608–2618. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1500>
- Musyaffa, N. R. (2023). *FORMULASI DAN EVALUASI SEDIAAN TOPIKAL NANOEMULGEL EKSTRAK PEGAGAN (Centella asiatica (L)) TERSTANDAR*. Universitas Islam Indonesia.

- Nabillah, S., Noval, N., Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Sari Mulia, Hidayah, N., & Program Studi Sarjana Teknik Industri, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Sari Mulia. (2022). FORMULASI DAN EVALUASI NANO HIDROGEL EKSTRAK DAUN SERUNAI (*Chromolaena odorata* L.) DENGAN VARIASI KONSENTRASI POLIMER CARBOPOL 980. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina (JIIS): Ilmu Farmasi dan Kesehatan*, 7(2), 340–349. <https://doi.org/10.36387/jiis.v7i2.995>
- Nemade, S. M., Kakad, S. P., Kshirsagar, S. J., & Padole, T. R. (2022). Development of nanoemulsion of antiviral drug for brain targeting in the treatment of neuro-AIDS. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00319-8>
- Nesheim, O. N. (2017). *O. Norman Nesheim, Frederick M. Fishel, and Mark Mossler2*.
- Nurhidayati, L. G., Nugroho, B. H., & Indrati, O. (2020). FORMULASI DAN UJI SIFAT FISIK SEDIAAN NANOEMULSI NATRIUM DIKLOFENAK DENGAN KOMBINASI TWEEN 80 DAN TRANSKUTOL. *Sainteks*, 17(1), 33. <https://doi.org/10.30595/sainteks.v17i1.6896>
- Nurkhasanah, L. (2023). *Aktivitas ekstrak daun pegagan (Centella asiatica (L.) Urb.) sebagai terapi ulkus diabetikum pada ekspresi gen dan regenerasi sirip kaudal ikan zebra (Danio rerio)* [Tesis, Universitas Islam Indonesia]. <https://dspace.uui.ac.id/handle/123456789/48477>
- OECD. (2025). *Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test*. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>
- Pandey, R., Pandey, B., & Bhargava, A. (2024). Morphological and anatomical studies in *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Journal of Applied Horticulture*, 26(02), 159–164. <https://doi.org/10.37855/jah.2024.v26i02.30>
- PNAS, Proc. Natl. Acad. S. (2024). <https://doi.org/10.1073/iti2324121>
- Pratiwi, L., Fudholi, A., Martien, R., & Pramono, S. (2018). Physical and Chemical Stability Test of SNEDDS (Self-nanoemulsifying Drug Delivery System) and Nanoemulsion Ethyl Acetate Fraction of *Garcinia mangostana* L. *Majalah Obat Tradisional*, 23(2), 84. <https://doi.org/10.22146/mot.28533>
- Preeti, Sambhakar, S., Malik, R., Bhatia, S., Al Harrasi, A., Rani, C., Saharan, R., Kumar, S., Geeta, & Sehrawat, R. (2023). Nanoemulsion: An Emerging Novel Technology for Improving the Bioavailability of Drugs. *Scientifica*, 2023, 1–25. <https://doi.org/10.1155/2023/6640103>
- Putri, N. D. L., & Muflihah, C. H. (2024). UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI PENYEBAB JERAWAT *Propionibacterium acnes* DAN *Staphylococcus aureus* MENGGUNAKAN EKSTRAK DAN FRAKSI JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) SERTA BIOAUTOGRAFINYA. *Usadha Journal of Pharmacy*, 272–287. <https://doi.org/10.23917/ujp.v3i3.404>
- Puttarak, P., Dilokthornsakul, P., Saokaew, S., Dhippayom, T., Kongkaew, C., Sruamsiri, R., Anchalee Chuthaputti, A., & Chaikyapapruk, N. (2017). Effects of *Centella asiatica* (L.) Urb. On cognitive function and mood related outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *SCIENTIFIC RepoRts*.

- Rahma, H., Priani, S. E., Fakhri, T. M., Suarantika, F., Patricia, V. M., Laksono, B. T., & Subekti, P. I. (2025). Nanoemulsion-based delivery system of tamanu (*Calophyllum inophyllum* L.) oil: Formulation, characterization, and antibacterial activity. *Pharmacia*, 72, 1–11. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.72.e153246>
- Rahmaniati M, A., Ulfah, M., & Mulangsari, D. A. K. (2018). STANDARISASI PARAMETER NON SPESIFIK EKSTRAK ETANOL DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica* L.) DI DUA TEMPAT TUMBUH. *Jurnal Inovasi Teknik Kimia*, 3(1). <https://doi.org/10.31942/inteka.v3i1.2128>
- Rodriguez-Loya, J., Lerma, M., & Gardea-Torresdey, J. L. (2023). Dynamic Light Scattering and Its Application to Control Nanoparticle Aggregation in Colloidal Systems: A Review. *Micromachines*, 15(1), 24. <https://doi.org/10.3390/mi15010024>
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Sixth Edition).
- Sadik, F., & Anwar, R. A. (2022). Standarisasi Parameter Spesifik Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica* L.) Sebagai Antidiabetes. *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 4(1). <https://doi.org/10.37311/jsscr.v4i1.13310>
- Schwartzberg, L. S., & Navari, R. M. (2018). Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting. *Advances in Therapy*, 35(6), 754–767. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0707-z>
- Sekti, B. H., & Firmansah, M. (2025). Uji Stabilitas dan Mutu Fisik Nanoemulsi Ekstrak *Kyllinga nemoralis*. *Jurnal Farmasi Tinctura*, 7(7), 135–143.
- Shen, C., Zhao, X., He, C., & Zuo, Z. (2022). *Developmental toxicity and neurotoxicity assessment of R-, S-, and RS-propylene glycol enantiomers in zebrafish (Danio rerio) larvae*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17538-8>
- Silva, A. W. R. da, Silva, L. B. da, Rambo, D. F., & Biegelmeyer, R. (2025). Application of zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for central nervous system disorders screening of natural products, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jpp/rgaf067>
- Siregar, A., Mutia, M. S., & Napiyah, A. (2022). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) pada Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutical Journal of Islamic Pharmacy*, 6(1), 21. <https://doi.org/10.21111/pharmasipha.v6i1.7403>
- Smail, S. S., Ghareeb, M. M., Omer, H. K., Al-Kinani, A. A., & Alany, R. G. (2021). Studies on Surfactants, Cosurfactants, and Oils for Prospective Use in Formulation of Ketorolac Tromethamine Ophthalmic Nanoemulsions. *Pharmaceutics*, 13(4), 467. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040467>
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: A practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- Syukri, Y., Purwati, R. P., Hazami, N., Tahmid, H. A., & Fitria, A. (2020). Standardization of Specific and Non-Specific Parameters of Propolis Extract as Raw Material for Herbal Product. *Journal of Sciences Adn Data*

- Analysis*, 1(1), 36–43.
<https://doi.org/DOI:%2010.20885/EKSAKTA.vol1.iss1.art6>
- Szumala, P., Kaplińska, J., Makurat-Kasprolewicz, B., & Mania, S. (2023). Microemulsion Delivery Systems with Low Surfactant Concentrations: Optimization of Structure and Properties by Glycol Cosurfactants. *Molecular Pharmaceutics*, 20(1), 232–240.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00599>
- Underwood, & Anthony. (2020). *AVMA guidelines for the euthanasia of animals*: United Nations. (2013). *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) 5th revised edition*. 222.
- Utami, Y. T., & Miladiyah, I. (2020). Toxicity of Self-nanoemulsifying Drug Delivery System Formulation of Nigella Sativa L. Seed Oil against Adult Danio rerio: *Proceedings of the 1st Jenderal Soedirman International Medical Conference in Conjunction with the 5th Annual Scientific Meeting (Temilnas) Consortium of Biomedical Science Indonesia*, 35–42.
<https://doi.org/10.5220/0010487300350042>
- Wang, J., Sun, H., Yang, H., Yang, R., Zhu, X., Guo, S., Huang, Y., Xu, Y., Li, C., Tu, J., & Sun, C. (2024). Dessecting the toxicological profile of polysorbate 80 (PS80): Comparative analysis of constituent variability and biological impact using a zebrafish model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 198, 106796. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106796>
- White, R., Rose, K., & Zon, L. (2013). Zebrafish cancer: The state of the art and the path forward. *Nat Rev Cancer*, 13(9), 624–636.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrc3589>
- WHO (Ed.). (2007). *WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues*. World Health Organization.
- Widyastuti, A. I., & Saryanti, D. (2023). Formulasi dan Evaluasi Sediaan Nanoemulsi Ekstrak Umbi Bawang Putih (*Allium sativum* L.): Formulation and Evaluation of Nanoemulsion of Garlic (*Allium sativum* L.) Extract. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 5(2), 178–185.
<https://doi.org/10.25026/jsk.v5i2.1677>
- Wijaya, A., & Rissa, M. M. (2024). PENETAPAN KADAR AIR, KADAR SARI LARUT AIR DAN KADAR SARI LARUT ETANOL EKSTRAK DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia* Steen.). *Forte Journal*, 4(2), 481–487.
<https://doi.org/10.51771/fj.v4i2.792>
- Witkowska, K., Paczkowska-Walendowska, M., Plech, T., Szymanowska, D., Michniak-Kohn, B., & Cielecka-Piontek, J. (2023). Chitosan-Based Hydrogels for Controlled Delivery of Asiaticoside-Rich *Centella asiatica* Extracts with Wound Healing Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17229. <https://doi.org/10.3390/ijms242417229>
- Yuan, Z., Li, Y., Hu, Y., You, J., Higashisaka, K., Nagano, K., Tsutsumi, Y., & Gao, J. (2016). Chitosan nanoparticles and their Tween 80 modified counterparts disrupt the developmental profile of zebrafish embryos. *International Journal of Pharmaceutics*, 515(1–2), 644–656.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.071>
- Yuliani, S. H., Hartini, M., Pudyastuti, B., & Istyastono, E. P. (2016). *COMPARISON OF PHYSICAL STABILITY PROPERTIES OF POMEGRANATE SEED OIL NANOEMULSION DOSAGE FORMS WITH*

LONG-CHAIN TRIGLYCERIDE AND MEDIUM-CHAIN TRIGLYCERIDE AS THE OIL PHASE.

- Zakaria, F., Ibrahim, W. N. W., Safinar, I., Ahmad, H., Manshoor, N., Ismail, N., & Shaari, K. (n.d.). *LCMS/MS Metabolite Profiling and Analysis of Acute Toxicity Effect of the Ethanolic Extract of Centella asiatica on Zebrafish Model*.
- Zhao, W., Chen, Y., Hu, N., Long, D., & Cao, Y. (2024). The uses of zebrafish (*Danio rerio*) as an in vivo model for toxicological studies: A review based on bibliometrics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 272, 116023. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116023>
- Zulfa, E., Novianto, D., & Setiawan, D. (2019). FORMULASI NANOEMULSI NATRIUM DIKLOFENAK DENGAN VARIASI KOMBINASI TWEEN 80 DAN SPAN 80: KAJIAN KARAKTERISTIK FISIK SEDIAAN. *Media Farmasi Indonesia*, 14(1).

LAMPIRAN

Lampiran 1. *Ethical Clearance*



Terakreditasi KEPPKN No. 005/KEPPKN/AKT/IV/2024

Kementerian Kesehatan

Poltekkes Yogyakarta

Komite Etik Penelitian Kesehatan

Jalan Tata Bumi No. 3, Banyuraden, Gamping,
Sleman, D.I. Yogyakarta 55293

(0274) 617601

<https://poltekkesjogja.ac.id>

KETERANGAN LAYAK ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL EXEMPTION
"ETHICAL EXEMPTION"

No.DP.04.03/e-KEPK.1/075/2026

Protokol penelitian versi 1 yang diusulkan oleh :
The research protocol proposed by

Peneliti utama : Sofa Tasya Kamila
Principal In Investigator

Nama Institusi : Universitas Islam Indonesia
Name of the Institution

Dengan judul:
Title

**"TOKSISITAS FORMULASI SEDIAAN NANOEMULSI KOMBINASI EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica* L.)
DAN JINTAN HITAM (*Nigella sativa* L.) PADA IKAN ZEBRA"**

"TOXICITY OF THE FORMULATION OF NANOEMULSION COMBINATION OF PEGAGAN EXTRACT (*Centella asiatica* L.) AND BLACK CUMIN (*Nigella sativa* L.) IN ZEBRA FISH"

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah, 3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Risiko, 5) Bujukan/Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan 7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar.

Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1) Social Values, 2) Scientific Values, 3) Equitable Assessment and Benefits, 4) Risks, 5) Persuasion/Exploitation, 6) Confidentiality and Privacy, and 7) Informed Consent, referring to the 2016 CIOMS Guidelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicators of each standard.

Pernyataan Laik Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 19 Januari 2026 sampai dengan tanggal 19 Januari 2027.

This declaration of ethics applies during the period January 19, 2026 until January 19, 2027.



January 19, 2026
Chairperson,



Dr. drg. Wiworo Haryani, M.Kes.

Lampiran 1. Hasil Identifikasi Hewan Uji



LABORATORIUM SISTEMATIKA HEWAN
FAKULTAS BIOLOGI UNIVERSITAS GADJAH MADA
Jl. Teknik Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta 55281. Telp. (0274) 580839

SURAT KETERANGAN

No : 05/BI/SH/I/2025

Yang bertanda tangan di bawah ini, menerangkan bahwa Mahasiswa Program Sarjana, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia:

Nama : Femalia Ayu Puspa Widya
NIM : 21613281

telah selesai melaksanakan identifikasi ikan zebra di Laboratorium Sistematika Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, di bawah bimbingan Dr. Rury Eprilurahman, S.Si., M.Sc.

Hasil Identifikasi sebagai berikut :

1. *Danio rerio* (Hamilton, 1822) (deskripsi terlampir)

Demikian surat keterangan ini dibuat, untuk dipergunakan seperlunya.

Mengetahui,
an. Dekan
Wakil Dekan Bidang Penelitian, Pengabdian
Kepada Masyarakat, Kerjasama dan Alumni


Dr. Eko Agus Suyono, M.App.Sc.
NIP. 197412181997021001

Yogyakarta, 17 Januari 2025
Kepala
Laboratorium Sistematika Hewan


Dr. Dwi Sendi Priyono, S.Si., M.Si.
NIP. 199209302024061003



LABORATORIUM SISTEMATIKA HEWAN
FAKULTAS BIOLOGI UNIVERSITAS GADJAH MADA
Jl. Teknik Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta 55281. Telp. (0274) 580839

Hasil Identifikasi Spesimen:

1. Klasifikasi

Regnum (Kerajaan)	: Animalia
Phylum (Filum)	: Chordata
Subphylum (Anak filum)	: Vertebrata
Superclassis (Superkelas)	: Gnathostomata
Classis (Kelas)	: Actinopterygii
Ordo (Bangsa)	: Cypriniformes
Familia (Suku)	: Cyprinidae
Subfamilia (Anak suku)	: Danioninae
Genus (Marga)	: <i>Danio</i>
Spesies (Jenis)	: <i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822)

Deskripsi:

Spesimen yang diperiksa merupakan hasil ternakan dari Kediri, Jawa Timur. Ikan memiliki ukuran 3,8 cm, tubuh memanjang, memipih laterolateral dan subsilindris. Perut membulat, kepala berukuran sedang dan tumpul. Moncong tumpul, mulut anterior, celah mulut dangkal, tidak protaktil dan mengarah miring ke atas. Ujung rahang bawah sejajar dengan profil tubuh dorsal. Mata lebar dengan diameter 3,00 s.d 3,50 mm, terletak di tengah kepala dan tidak terlihat dari bawah permukaan ventral. Bibir tipis dan sederhana, rahang bawah menonjol dengan tonjolan pada symphysis. Dua pasang barbel yang berkembang baik. Sirip dorsal di sisi atas, letaknya diantara sirip anal dan pelvis di bawahnya, dan mendekati pangkal ekor. Sirip dorsal dengan 7-19 jari-jari lunak; sirip anal dengan 13-20 jari-jari lunak. Sirip ekor lunate. Tubuh dengan garis-garis longitudinal besar; lima garis horizontal seragam, berpigmen, di sisi tubuh, semuanya memanjang hingga ujung sirip ekor. Linea lateralis pendek dan tidak memanjang hingga melebihi sirip pectoral. Sisik linea lateralis berjumlah 28-80 buah.



Gambar 1. Morfologi *Danio rerio*

Yogyakarta, 17 Januari 2025

Dr. Rury Eprilurahman, S.Si., M.Sc.
NIP. 198104212005011008



LABORATORIUM SISTEMATIKA HEWAN
FAKULTAS BIOLOGI UNIVERSITAS GADJAH MADA
Jl. Teknik Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta 55281. Telp. (0274) 580839

Referensi

- Barman, R.P., 1991. *A Taxonomic Revision of the Indo-Burmese Species of Danio Hamilton Buchanan (Pisces: Cyprinidae)*. Records of the Zoological Survey of India. Occasional Paper No. 137. Pp. 16, 57.
- Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2024. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, (10/2024)<https://www.fishbase.se/summary/Danio-rerio.html>.
- Jayaram, K.C., 1981. *The Freshwater Fishes of India, Pakistan, Bangladesh and Srilanka*. A Handbook. Calcutta Laser Graphics (P) Ltd. Pp. 78-79, 81.

Lampiran 2. Sertifikat Pengujian Cemaran Logam Berat

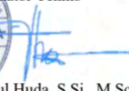
LABORATORIUM TERPADU PENGUJIAN DAN KALIBRASI UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA		Gedung Lab Terpadu Jl. Kaliurang Km 14,5 Yogyakarta (0274)898444 ext. 4027 http://labterpadu.uii.ac.id lab.terpadu@uii.ac.id
No. Dok : Form-37.P/Sert. Uji Rev. 2 Tgl. Terbit : 03 Mei 2024		Nomor : 04790426B/LT-UII/V/2026 Number
SERTIFIKAT PENGUJIAN <i>Certificate of Testing</i>		
<u>Dibuat untuk</u> Certified to	: Karin Nafisah Zahwa	
<u>Jenis>Nama Sampel</u> Type/Name of sample	: Cair/Ekstrak	
<u>Asal Sampel</u> Origin of sample	: Universitas Islam Indonesia	
<u>Jumlah Sampel</u> Amount of sample	: 1	
<u>Kode Sampel</u> Sample code	: 04790426/C/L.T.-UII/2026	
<u>Parameter</u> Parameters	: Cu, Pb, Cd	
<u>Tanggal Pengambilan Sampel</u> : - Sample taken on		
<u>Tanggal Penerimaan Sampel</u> : 4 Mei 2026 Sample received on		
<u>Tanggal Pengujian Sampel</u> : 11 Mei 2026 Sample tested on		
LAYANAN PRIMA : AKURAT, TEPAT WAKTU, INTEGRITAS		Halaman 1 dari 2



Nomor : 04790426B/LT-UII/V/2026
Number

HASIL PENGUJIAN
TEST RESULT

No	Label Pelanggan	Label Lab. Terpadu	Parameter	Hasil Uji	Satuan	Metode
1	Ekstrak jintan hitam	04790426-3	Cu	0,3672 ± 0,061	mg/kg	Atomic Absorption Spectrophotometer
2	Ekstrak jintan hitam	04790426-3	Pb	2,9269 ± 0,119	mg/kg	Atomic Absorption Spectrophotometer
3	Ekstrak jintan hitam	04790426-3	Cd	0,3691 ± 0,022	mg/kg	Atomic Absorption Spectrophotometer

Yogyakarta, 29 Mei 2026
Koordinator Teknis

Thorikul Huda, S.Si., M.Sc.
NIK. 052316003

Catatan : 1. Hasil pengujian ini hanya berlaku untuk sampel yang diuji
Notes
The results are available exclusively to the tested samples
2. Sertifikat ini hanya dapat digandakan secara utuh
The certificate can be reproduced (copied) only for all this reported sheets
3. Pengambilan sampel diluar tanggung jawab Laboratorium Terpadu UII
The Integrated Laboratory of UII disclaims all responsibility for the sampling

Lampiran 3. Hasil Identifikasi Kandungan Senyawa *Thymoquinone*

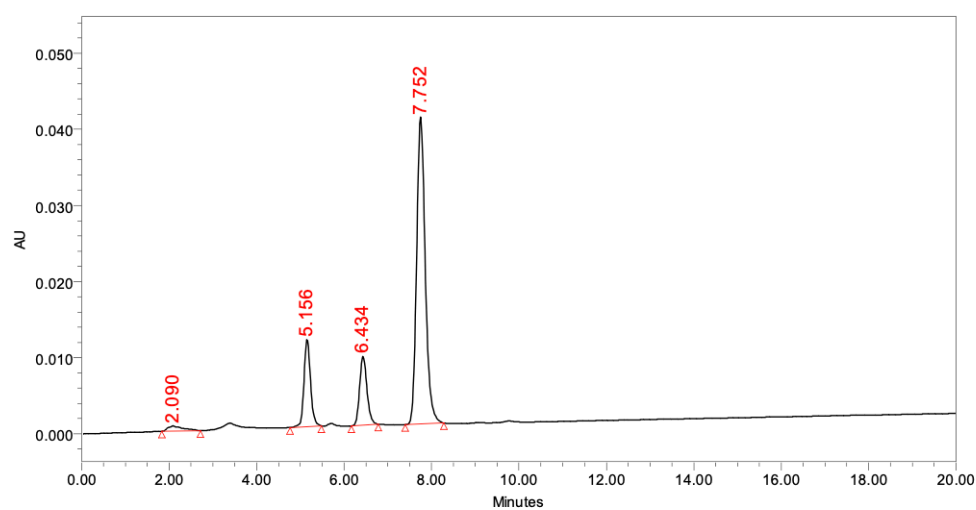
a. Standar *Thymoquinone*



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Std 10 ppm	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	std 10 ppm
Vial:	32	Acq. Method Set:	Tmq
Injection #:	1	Processing Method:	30 60
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	20.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 253nm
Date Acquired:	4/27/2026 1:09:24 PM WIT		
Date Processed:	5/6/2026 1:33:53 PM WIT		



	RT	Area	% Area	Height
1	2.090	16539	2.08	681
2	5.156	118750	14.96	11467
3	6.434	105797	13.33	9042
4	7.752	552748	69.63	40343

Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1247
 Page: 1 of 1

Project Name: Thymoquinone
 Date Printed:
 5/6/2026
 1:34:23 PM Asia/Jakarta

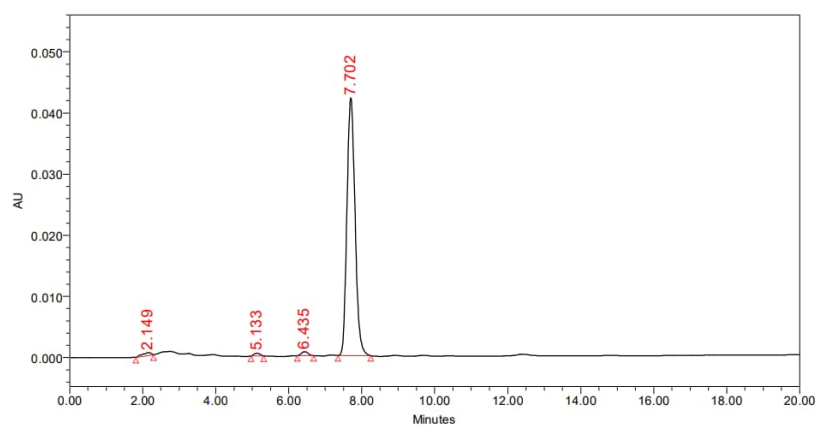
b. Ekstrak Jintan Hitam



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Ekstrak	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	tmq
Vial:	28	Acq. Method Set:	Tmq
Injection #:	1	Processing Method:	30 50
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	60.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 253nm
Date Acquired:	4/24/2026 5:24:35 PM WIT		
Date Processed:	4/28/2026 2:22:23 PM WIT		



	RT	Area	% Area	Height
1	2.149	8417	1.25	505
2	5.133	4677	0.69	434
3	6.435	8551	1.27	671
4	7.702	652626	96.79	42138

Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1247
 Page: 1 of 1

Project Name: Thymoquinone
 Date Printed: 5/6/2026
 1:30:27 PM Asia/Jakarta

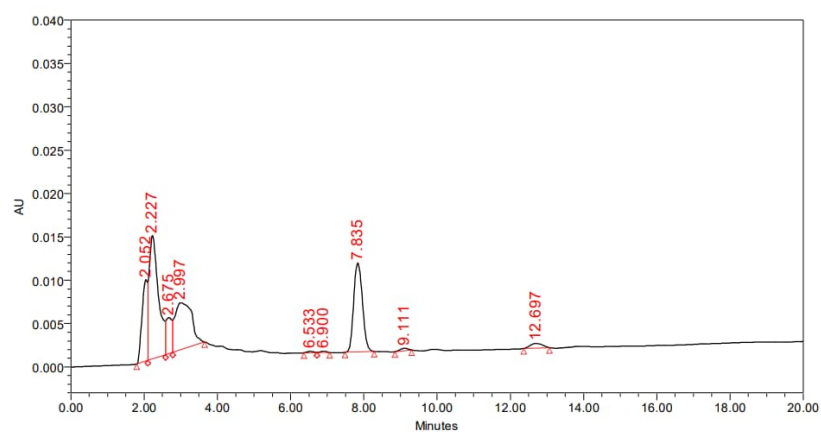
c. Nanoemulsi



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	NE (100mg)	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Nanoemulsi
Vial:	40	Acq. Method Set:	Tmq
Injection #:	1	Processing Method:	20 20
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	20.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 253nm
Date Acquired:	5/1/2026 11:52:45 AM WIT		
Date Processed:	5/5/2026 10:02:30 AM WIT		



	RT	Area	% Area	Height
1	2.052	95403	12.58	9383
2	2.227	254403	33.53	14267
3	2.675	47647	6.28	4160
4	2.997	170174	22.43	5427
5	6.533	2050	0.27	168
6	6.900	1992	0.26	164
7	7.835	170589	22.49	10254
8	9.111	3951	0.52	256

	RT	Area	% Area	Height
9	12.697	12453	1.64	537

Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1265
 Page: 1 of 1

Project Name: Thymoquinone
 Date Printed:
 5/6/2026
 2:03:03 PM Asia/Jakarta

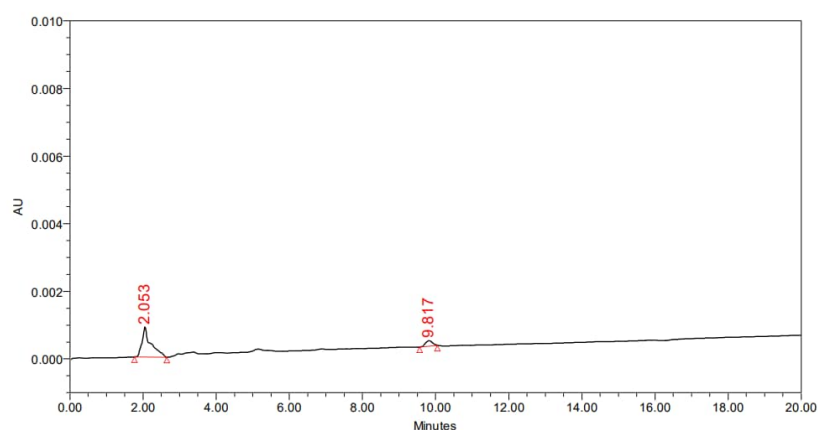
d. Basis Nanoemulsi



Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Basis NE	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	NE
Vial:	35	Acq. Method Set:	Tmq
Injection #:	1	Processing Method:	30 10
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	20.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 253nm
Date Acquired: 4/27/2026 2:50:28 PM WIT			
Date Processed: 4/28/2026 2:30:13 PM WIT			



	RT	Area	% Area	Height
1	2.053	14992	87.50	886
2	9.817	2141	12.50	160

Reported by User: System
 Report Method: Default Individual Report
 Report Method ID: 1252
 Page: 1 of 1

Project Name: Thymoquinone
 Date Printed: 5/6/2026
 1:43:29 PM Asia/Jakarta

Lampiran 4. Hasil Uji Persen Transmittansi

a. Nanoemulsi

Report : 2026/02/26 15:31

Sample Name : nanoemulsi PJ
 File Name : nanoemulsi PJ 583nm
 Run Date : 2026/02/26 15:30
 Operator :

Spectrophotometer
 Model : UH5300 Spectrophotometer
 SERIAL No. : 2483-018
 (CPU1)Program No. : 3115300-04
 (CPU2)Program No. : 3115310-13
 Option : 6 Cell

Instrument Parameter
 Measurement Mode : Abs/Transmittance Bandpass(nm) : 1.0
 Data Mode : XT Replicate Measurement : ON
 Number of WL : 1 Number of Replicate : 3
 WL1 (nm) : 583.5 Statistics : ON
 Initial Delay(s) : 3 6 Cell Mode : Auto
 Autozero : Cell A
 Sample Autozero : ON
 Autozero Interval : 5
 Number of Sample : 1

Sample	
Sample ID	%T
*nanoemuls	91.7
i 1.1 baru	
-1	
*nanoemuls	91.7
i 1.1 baru	
-2	
*nanoemuls	91.7
i 1.1 baru	
-3	

MEAN	91.7
SD	0.0
RSD	0.00

b. Nanoemulsi

Report : 2026/06/09 12:09

Sample Name : NE peg jin
 File Name : NE peg jin
 Run Date : 2026/06/09 12:07
 Operator :

Spectrophotometer
 Model : UH5300 Spectrophotometer
 SERIAL No. : 2483-018
 (CPU1)Program No. : 3115300-04
 (CPU2)Program No. : 3115310-13
 Option : 6 Cell

Instrument Parameter
 Measurement Mode : Abs/Transmittance Bandpass(nm) : 1.0
 Data Mode : XT Replicate Measurement : ON
 Number of WL : 1 Number of Replicate : 3
 WL1 (nm) : 583.5 Statistics : ON
 Initial Delay(s) : 3 6 Cell Mode : Manual

Sample

Sample ID	%T
*1-1	100.7
*1-2	100.8
*1-3	100.8

MEAN	100.8
SD	0.0
RSD	0.04

Lampiran 5. Hasil Karakterisasi Nanoemulsi

HORIBA
Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.00

SZ-100

024.C.PSA.V.2026.nsz

Measurement Results

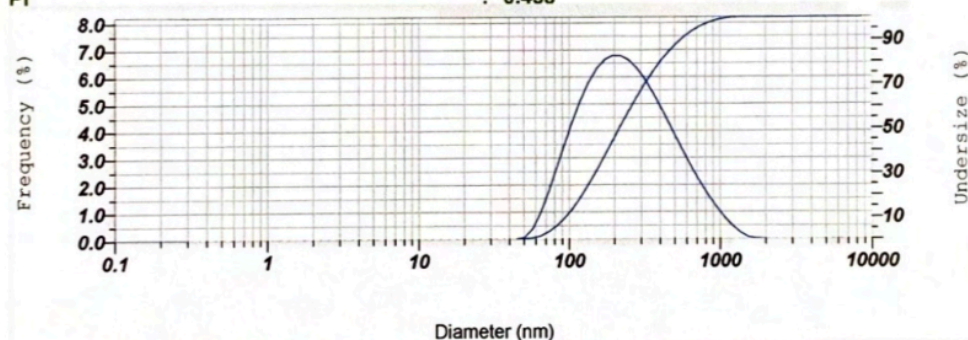
Date : Monday, May 25, 2026 11:05:55 AM
Measurement Type : Particle Size
Sample Name : NE PJ
Scattering Angle : 90
Temperature of the Holder : 24.8 °C
Dispersion Medium Viscosity : 0.898 mPa·s
Transmission Intensity before Meas. : 21090
Distribution Form : Standard
Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
Representation of Result : Scattering Light Intensity
Count Rate : 1682 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	279.5 nm	205.2 nm	182.3 nm
2	—	— nm	— nm	— nm
3	—	— nm	— nm	— nm
Total	1.00	279.5 nm	205.2 nm	182.3 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 144.7 nm
PI : 0.458



No	Diameter	Frequency	Cumulation	No	Diameter	Frequency	Cumulation	No	Diameter	Frequency	Cumulation	No	Diameter	Frequency	Cumulation
1	0.34	0.000	0.000	22	4.40	0.000	0.000	43	57.09	0.358	0.412	64	740.89	2.055	95.735
2	0.38	0.000	0.000	23	4.97	0.000	0.000	44	64.50	0.955	1.366	65	837.07	1.580	97.315
3	0.43	0.000	0.000	24	5.61	0.000	0.000	45	72.87	1.730	3.096	66	945.74	1.155	98.470
4	0.49	0.000	0.000	25	6.34	0.000	0.000	46	82.33	2.595	5.691	67	1068.52	0.783	99.253
5	0.55	0.000	0.000	26	7.17	0.000	0.000	47	93.02	3.484	9.175	68	1207.24	0.469	99.722
6	0.62	0.000	0.000	27	8.10	0.000	0.000	48	105.10	4.340	13.515	69	1363.97	0.221	99.943
7	0.70	0.000	0.000	28	9.15	0.000	0.000	49	118.74	5.115	18.629	70	1541.04	0.056	99.999
8	0.80	0.000	0.000	29	10.34	0.000	0.000	50	134.16	5.769	24.395	71	1741.10	0.001	100.000
9	0.90	0.000	0.000	30	11.68	0.000	0.000	51	151.57	6.275	30.674	72	1967.14	0.000	100.000
10	1.02	0.000	0.000	31	13.20	0.000	0.000	52	171.25	6.613	37.286	73	2222.51	0.000	100.000
11	1.15	0.000	0.000	32	14.91	0.000	0.000	53	193.48	6.777	44.064	74	2511.05	0.000	100.000
12	1.30	0.000	0.000	33	16.84	0.000	0.000	54	218.80	6.773	50.837	75	2837.04	0.000	100.000
13	1.47	0.000	0.000	34	19.03	0.000	0.000	55	246.96	6.613	57.449	76	3205.35	0.000	100.000
14	1.66	0.000	0.000	35	21.50	0.000	0.000	56	279.04	6.317	63.767	77	3621.48	0.000	100.000
15	1.87	0.000	0.000	36	24.29	0.000	0.000	57	315.27	5.911	69.678	78	4091.63	0.000	100.000
16	2.11	0.000	0.000	37	27.45	0.000	0.000	58	356.20	5.422	75.099	79	4622.81	0.000	100.000
17	2.39	0.000	0.000	38	31.01	0.000	0.000	59	402.44	4.875	79.974	80	5222.96	0.000	100.000
18	2.70	0.000	0.000	39	35.03	0.000	0.000	60	454.89	4.296	84.270	81	5901.02	0.000	100.000
19	3.05	0.000	0.000	40	39.56	0.000	0.000	61	513.71	3.706	87.976	82	6687.10	0.000	100.000
20	3.45	0.000	0.000	41	44.72	0.000	0.000	62	580.41	3.128	91.106	83	7532.85	0.000	100.000
21	3.99	0.000	0.000	42	50.53	0.054	0.054	63	655.76	2.574	93.680	84	8510.56	0.000	100.000

Explore the future

Automotive Test Systems | Process & Environmental | Medical | Semiconductor | Scientific

HORIBA

SZ-100

024.C.PSA.V.2026 R2.nsz

Measurement Results

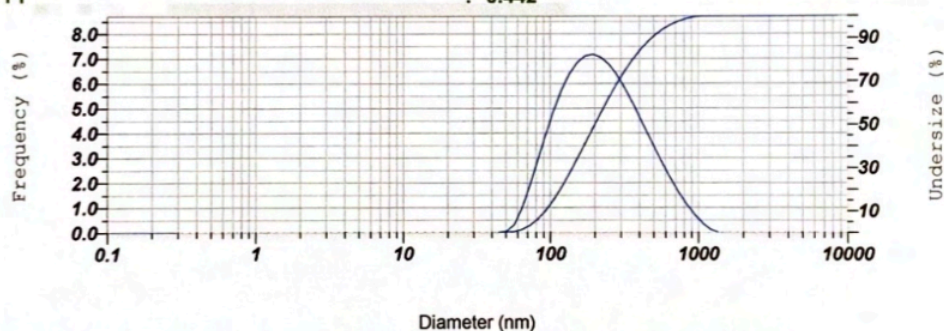
Date : Monday, May 25, 2026 10:17:45 AM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : NE PJ
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 24.8 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.898 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 21152
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1554 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	252.0 nm	172.1 nm	182.0 nm
2	—	— nm	— nm	— nm
3	—	— nm	— nm	— nm
Total	1.00	252.0 nm	172.1 nm	182.0 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 144.6 nm
 PI : 0.442



No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation
1	0.34	0.000	0.000	22	4.40	0.000	0.000	43	57.09	0.306	0.342	64	740.89	1.577	97.750
2	0.38	0.000	0.000	23	4.97	0.000	0.000	44	64.50	0.981	1.333	65	837.07	1.100	98.850
3	0.43	0.000	0.000	24	5.61	0.000	0.000	45	72.87	1.910	3.243	66	945.74	0.687	99.537
4	0.48	0.000	0.000	25	6.34	0.000	0.000	46	82.33	2.924	6.167	67	1068.52	0.351	99.888
5	0.55	0.000	0.000	26	7.17	0.000	0.000	47	93.02	3.939	10.106	68	1207.24	0.112	100.000
6	0.62	0.000	0.000	27	8.10	0.000	0.000	48	105.10	4.884	14.990	69	1363.97	0.000	100.000
7	0.70	0.000	0.000	28	9.15	0.000	0.000	49	118.74	5.706	20.696	70	1541.04	0.000	100.000
8	0.80	0.000	0.000	29	10.34	0.000	0.000	50	134.16	6.364	27.060	71	1741.10	0.000	100.000
9	0.90	0.000	0.000	30	11.68	0.000	0.000	51	151.57	6.833	33.893	72	1967.14	0.000	100.000
10	1.02	0.000	0.000	31	13.20	0.000	0.000	52	171.25	7.101	40.994	73	2222.51	0.000	100.000
11	1.15	0.000	0.000	32	14.91	0.000	0.000	53	193.48	7.171	48.165	74	2511.05	0.000	100.000
12	1.30	0.000	0.000	33	16.84	0.000	0.000	54	218.60	7.056	55.220	75	2837.04	0.000	100.000
13	1.47	0.000	0.000	34	19.03	0.000	0.000	55	246.98	6.777	61.996	76	3205.35	0.000	100.000
14	1.66	0.000	0.000	35	21.50	0.000	0.000	56	279.04	6.364	68.361	77	3621.48	0.000	100.000
15	1.87	0.000	0.000	36	24.29	0.000	0.000	57	315.27	5.845	74.207	78	4091.63	0.000	100.000
16	2.11	0.000	0.000	37	27.45	0.000	0.000	58	356.20	5.254	79.460	79	4622.81	0.000	100.000
17	2.39	0.000	0.000	38	31.01	0.000	0.000	59	402.44	4.618	84.079	80	5222.96	0.000	100.000
18	2.70	0.000	0.000	39	35.03	0.000	0.000	60	454.89	3.966	88.044	81	5901.02	0.000	100.000
19	3.05	0.000	0.000	40	39.58	0.000	0.000	61	513.71	3.319	91.363	82	6667.10	0.000	100.000
20	3.45	0.000	0.000	41	44.72	0.000	0.000	62	580.41	2.696	94.060	83	7532.85	0.000	100.000
21	3.89	0.000	0.000	42	50.53	0.037	0.037	63	655.78	2.112	96.172	84	8510.58	0.000	100.000

SZ-100

024.C.PSA.V.2026 R3.nsz

Measurement Results

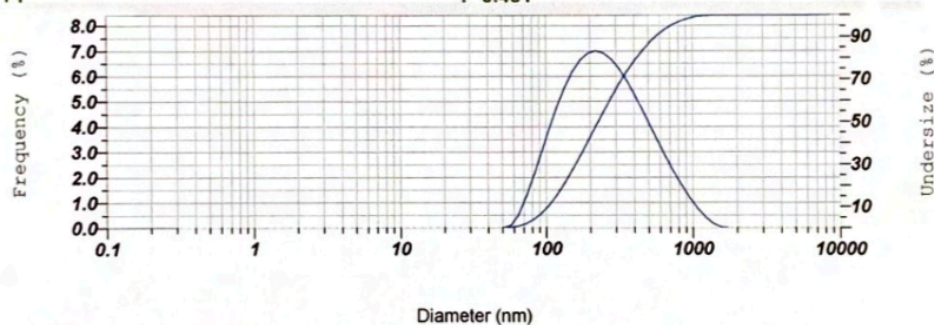
Date : Monday, May 25, 2026 10:16:36 AM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : NE PJ
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.896 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 21152
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1657 KCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	288.8 nm	201.7 nm	205.7 nm
2	—	— nm	— nm	— nm
3	—	— nm	— nm	— nm
Total	1.00	288.8 nm	201.7 nm	205.7 nm

Cumulant Operations

Z-Average : 144.1 nm
 PI : 0.461



No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation
1	0.34	0.000	0.000	22	4.40	0.000	0.000	43	57.09	0.073	0.073	64	740.89	2.204	95.743
2	0.38	0.000	0.000	23	4.97	0.000	0.000	44	64.50	0.510	0.583	65	837.07	1.672	97.415
3	0.43	0.000	0.000	24	5.61	0.000	0.000	45	72.87	1.215	1.798	66	948.74	1.194	98.609
4	0.49	0.000	0.000	25	6.34	0.000	0.000	46	82.33	2.070	3.869	67	1068.52	0.778	99.385
5	0.55	0.000	0.000	26	7.17	0.000	0.000	47	93.02	2.992	6.861	68	1207.24	0.428	99.813
6	0.62	0.000	0.000	27	8.10	0.000	0.000	48	105.10	3.915	10.776	69	1363.97	0.186	99.979
7	0.70	0.000	0.000	28	9.15	0.000	0.000	49	118.74	4.782	15.558	70	1541.04	0.021	100.000
8	0.80	0.000	0.000	29	10.34	0.000	0.000	50	134.18	5.546	21.104	71	1741.10	0.000	100.000
9	0.90	0.000	0.000	30	11.68	0.000	0.000	51	151.57	6.169	27.273	72	1967.14	0.000	100.000
10	1.02	0.000	0.000	31	13.20	0.000	0.000	52	171.25	6.625	33.898	73	2222.51	0.000	100.000
11	1.15	0.000	0.000	32	14.91	0.000	0.000	53	193.48	6.899	40.797	74	2511.05	0.000	100.000
12	1.30	0.000	0.000	33	16.84	0.000	0.000	54	218.60	6.990	47.787	75	2837.04	0.000	100.000
13	1.47	0.000	0.000	34	19.03	0.000	0.000	55	246.98	6.908	54.692	76	3205.35	0.000	100.000
14	1.66	0.000	0.000	35	21.50	0.000	0.000	56	279.04	6.664	61.356	77	3621.48	0.000	100.000
15	1.87	0.000	0.000	36	24.29	0.000	0.000	57	315.27	6.289	67.646	78	4091.63	0.000	100.000
16	2.11	0.000	0.000	37	27.45	0.000	0.000	58	356.20	5.809	73.455	79	4622.81	0.000	100.000
17	2.39	0.000	0.000	38	31.01	0.000	0.000	59	402.44	5.252	78.706	80	5222.96	0.000	100.000
18	2.70	0.000	0.000	39	35.03	0.000	0.000	60	454.69	4.648	83.352	81	5901.02	0.000	100.000
19	3.05	0.000	0.000	40	39.58	0.000	0.000	61	513.71	4.018	87.370	82	6667.10	0.000	100.000
20	3.45	0.000	0.000	41	44.72	0.000	0.000	62	580.41	3.389	90.759	83	7532.85	0.000	100.000
21	3.89	0.000	0.000	42	50.53	0.000	0.000	63	655.76	2.780	93.539	84	8510.56	0.000	100.000

2026.05.25 11:55:39

HORIBA
Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.00

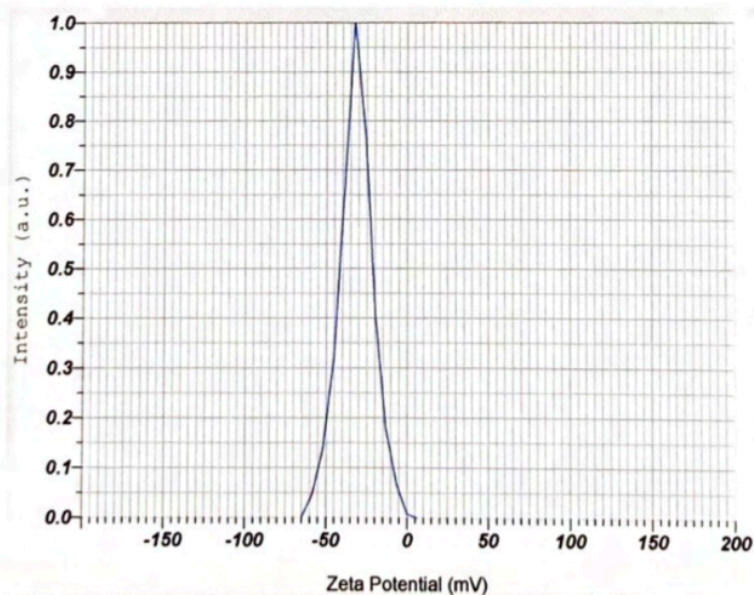
SZ-100**Measurement Results****ZETA 024.C.PSA.V.2026.nzt****Measurement Results**

Date : Monday, May 25, 2026 11:52:57 AM
Measurement Type : Zeta Potential
Sample Name : NE PJ
Temperature of the Holder : 24.8 °C
Dispersion Medium Viscosity : 0.900 mPa·s
Conductivity : 0.088 mS/cm
Electrode Voltage : 3.9 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-31.5 mV	-0.000243 cm ² /Vs
2	— mV	— cm ² /Vs
3	— mV	— cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -31.5 mV

Electrophoretic Mobility Mean : -0.000243 cm²/Vs

Explore the Future

Automation Test Systems | Process & Environmental | Medical | Semiconductor | Scientific

HORIBA

1 / 1

2026.05.25 12:12:45

HORIBA
Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.00

SZ-100

Measurement Results

ZETA 024.C.PSA.V.2026 R2.nzt

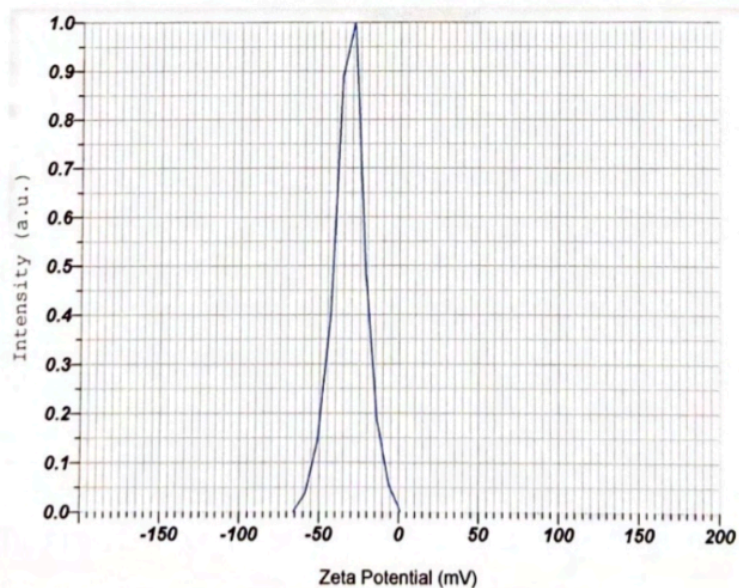
Measurement Results

Date : Monday, May 25, 2026 11:18:43 AM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : NE PJ
 Temperature of the Holder : 24.9 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.897 mPa·s
 Conductivity : 0.140 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.4 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-31.6 mV	-0.000244 cm ² /Vs
2	— mV	— cm ² /Vs
3	— mV	— cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -31.6 mV

 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000244 cm²/Vs


Explore the future

Analytical and Software Solutions & Instruments for Life Science, Medicine, and Environmental Science

HORIBA
Scientific

1 / 1

2026.05.25 12:13:29

HORIBA
Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.00

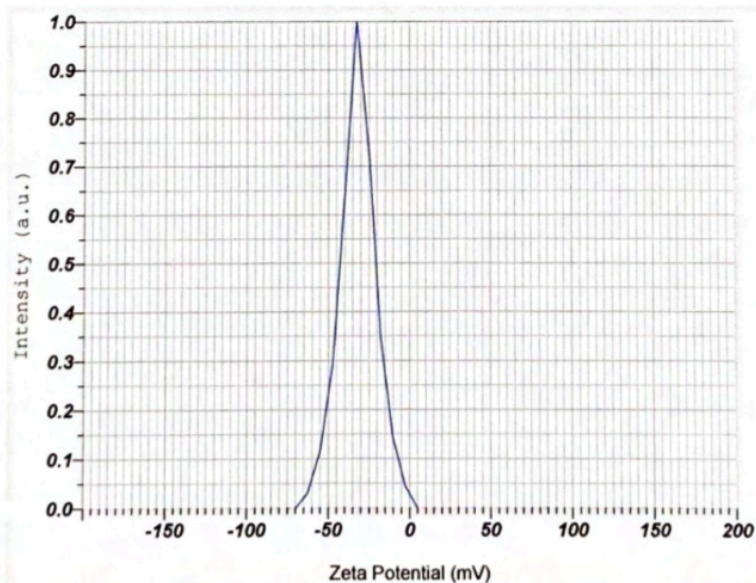
SZ-100**Measurement Results****ZETA 024.C.PSA.V.2026 R3.nzt****Measurement Results**

Date : Monday, May 25, 2026 11:15:57 AM
Measurement Type : Zeta Potential
Sample Name : NE PJ
Temperature of the Holder : 24.8 °C
Dispersion Medium Viscosity : 0.900 mPa·s
Conductivity : 0.140 mS/cm
Electrode Voltage : 3.4 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-31.7 mV	-0.000245 cm ² /Vs
2	— mV	— cm ² /Vs
3	— mV	— cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -31.7 mV

Electrophoretic Mobility Mean : -0.000245 cm²/Vs

Explore the Future

Automation Test Software | Process & Environmental | Medical | Semiconductor | Scientific

HORIBA

1 / 1

Lampiran 6. Hasil Perhitungan Konsentrasi Nanoemulsi Pegagan dan Jintan Hitam

Pembuatan larutan stok 5000 ppm dalam labu ukur 500 ml

$$= 2500 \text{ mg} / 500 \text{ mL}$$

Pembuatan konsentrasi larutan uji nanoemulsi dalam 5L air

1. 50 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$5000 \text{ ppm} \times V_1 = 50 \text{ ppm} \times 5000 \text{ mL}$$

$$C_2 = 50 \text{ mL}$$

2. 100 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$5000 \text{ ppm} \times V_1 = 100 \text{ ppm} \times 5000 \text{ mL}$$

$$C_2 = 100 \text{ mL}$$

3. 200 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$5000 \text{ ppm} \times V_1 = 200 \text{ ppm} \times 5000 \text{ mL}$$

$$C_2 = 200 \text{ mL}$$

4. 400 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$5000 \text{ ppm} \times V_1 = 400 \text{ ppm} \times 5000 \text{ mL}$$

$$C_2 = 400 \text{ mL}$$

5. 800 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$5000 \text{ ppm} \times V_1 = 800 \text{ ppm} \times 5000 \text{ mL}$$

$$C_2 = 800 \text{ mL}$$

Lampiran 7. Hasil perhitungan konsentrasi ekstrak jintan dan pegagan yang terkandung dalam nanoemulsi

Kandungan ekstrak pegagan dan jintan dalam nanoemulsi = 0,5 gram (500 mg) x 2 = 1 gr (1000 mg)

Jumlah formulasi nanoemulsi = 10 gram (10.000 mg)

Larutan stok = 2500 mg/ 500 mL

Jumlah ekstrak yang terkandung dalam 2500 mg nanoemulsi = $\frac{1000 \text{ mg} \times 2500 \text{ mg}}{10.000 \text{ mg}} =$

250 mg

Jumlah ekstrak yang terkandung dalam labu ukur 500 mL = $\frac{250 \text{ mg}}{500 \text{ mL}} = 0,5 \text{ mg/mL} =$

500 ppm

Hasil Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Pegagan dan Jintan Hitam yang Terkandung dalam Nanoemulsi

Kandungan ekstrak dalam setiap konsentrasi

1. Nanoemulsi 50 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$500 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL} = C_2 \times 5000 \text{ mL}$$

$$C_2 = 5 \text{ ppm}$$

2. Nanoemulsi 100 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$500 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL} = C_2 \times 5000 \text{ mL}$$

$$C_2 = 10 \text{ ppm}$$

3. Nanoemulsi 200 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$500 \text{ ppm} \times 200 \text{ mL} = C_2 \times 5000 \text{ mL}$$

$$C_2 = 20 \text{ ppm}$$

4. Nanoemulsi 400 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$500 \text{ ppm} \times 400 \text{ mL} = C_2 \times 5000 \text{ mL}$$

$$C_2 = 40 \text{ ppm}$$

5. Nanoemulsi 800 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$500 \text{ ppm} \times 800 \text{ mL} = C_2 \times 5000 \text{ mL}$$

C2 = 80 ppm

Lampiran 8. Perhitungan Parameter Non Spesifik

1. Kadar Air

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{\text{Bobot awal (g)} - \text{bobot setelah pemanasan (g)}}{\text{Bobot awal (g)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Kadar Air} = \frac{3,0137 \text{ g} - 1,0105 \text{ g}}{3,0137 \text{ g}} = 0,66 \%$$

2. Kadar Abu

$$\% \text{ Kadar abu total} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times 100\%$$

$$\% \text{ Kadar abu total} = \frac{113,3222 - 113,308}{2,0008} \times 100\% = 0,71\%$$

3. Kadar Abu Tidak Larut Asam

$$\% \text{ Kadar Tidak Larut Asam} = \frac{W_2 - (C \times 0,0076) - W_0}{W_1} \times 100\%$$

$$\% \text{ Kadar Tidak Larut Asam} = \frac{113,3222 - (0 \times 0,0076) - 113,308}{2,0008} \times 100\%$$

Lampiran 9. Evaluasi Sediaan

Pengujian Viskositas Basis



Pengujian Viskositas Nanoemulsi



Hasil Freeze Thaw Cycle



Pengamatan *Freeze Thaw* Basis Nanoemulsi Tanpa Ekstrak

Siklus ke-	Wujud	Warna	Aroma	Pemisahan	Pengendapan	<i>Creaming</i>	<i>Cracking</i>
0	Cair	Bening	Khas basis	-	-	-	-
1	Cair	Bening	Khas basis	-	-	-	-
2	Cair	Bening	Khas basis	-	-	-	-
3	Cair	Bening	Khas basis	-	-	-	-

Pengamatan *Freeze Thaw* Nanoemulsi Ekstrak Pegagan dan Jintan

Siklus ke-	Wujud	Warna	Aroma	Pemisahan	Pengendapan	<i>Creaming</i>	<i>Cracking</i>
0	Cair	Hijau Tua	Khas ekstrak	-	-	-	-

1	Cair	Hijau Tua	Khas ekstrak	-	-	-	-
2	Cair	Hijau Tua	Khas ekstrak	-	-	-	-
3	Cair	Hijau Tua	Khas ekstrak	-	-	-	-

Hasil Pengujian Persen Transmittansi

Sediaan	Replikasi	%Transmitan	Rata-rata	SD
Nanoemulsi PJ	R1	91,7	91,7	0
	R2	91,7		
	R3	91,7		

Hasil pengujian ukuran partikel, polydispersity index dan zeta potensial

Sediaan	Replikasi	Ukuran Partikel (nm)	<i>Polydispersity Index (PI)</i>	Zeta Potensial (mV)
Nanoemulsi PJ	R1	144,7	0,458	-31,5
	R2	144,6	0,442	-31,6
	R3	144,1	0,461	-31,7
Mean $\pm$ SD		144,5 $\pm$ 0,32	0,454 $\pm$ 0,01	-31,6 $\pm$ 0,1

Hasil Pengujian Viskositas

Sediaan	Replikasi	Cp	Rata-rata	SD
Nanoemulsi PJ	R1	72,3	72,57	0,25
	R2	72,6		
	R3	72,8		

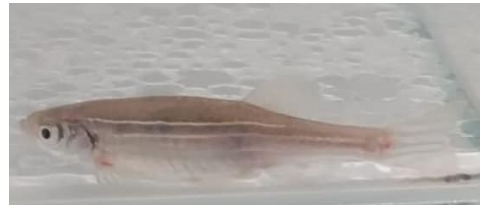
Lampiran 10. *Fish Acute Toxicity*

Pengecekan Ph, Suhu, DO Air, Kadar nitrat dan nitrit





Pengamatan Tanda Klinis



(a)



(b)



(c)



(d)

Keterangan: (a) Pendarahan pada ikan no 5 800 ppm pada jam ke 24; (b) Pendarahan pada ikan no 5 800 ppm pada jam ke 30; Gulping pada ikan no 1 400 pm jam ke 30; Gulping pada ikan no 4 800 ppm jam ke 3

Lampiran 11. Tanda-tanda klinis yang diamati pada ikan (OECD, 2025)

Tanda klinis	Definisi	Sinonim
KEHILANGAN KESEIMBANGAN (sub-kategori dibawah)		
Orientasi horizontal yang tidak normal	Kehilangan keseimbangan yang ditunjukkan sebagai orientasi/postur horizontal abnormal di dalam kolom air.	Lumpuh, kehilangan refleks, penyeimbangan
Orientasi vertikal yang tidak normal	Posisi kepala tegak atau kepala menunduk	
Kehilangan kendali daya apung	Mengapung di permukaan atau tenggelam ke dasar	
PERILAKU BERENANG ABNORMAL (sub-kategori di bawah)		
Hipoaktif	Penurunan aktivitas spontan	Lesu, apatis, lamban, lemah, tidak bergerak, tidak aktif, berhenti berenang, tenang
Hiperaktif	Peningkatan aktivitas spontan	Berenang tidak beraturan, melompat-lompat
Berenang pembuka botol	Rotasi di sekitar sumbu panjang, gerakan tidak menentu, seringkali secara tiba-tiba	Gerakan berguling, berputar, berenang spiral, berguling, dan melingkar
Kejang	Kontraksi otot yang tidak normal, tidak disengaja, dan tidak terkontrol	Kejang, kedutan, kejang otot, gemetar, menggigil, getaran
Tetani	Otot badan kaku (intermiten atau permanen)	Kelumpuhan
Perilaku kulit yang teriritasi		Menyalakan, mengikis, menggosok
Distribusi/perilaku permukaan yang abnormal	Pemilihan kedalaman yang tidak normal, dekat dengan antarmuka air/udara	Melompat, muncul ke permukaan; di/pada/tepat di bawah permukaan/atas
Distribusi/perilaku dasar yang abnormal	Pemilihan kedalaman yang tidak normal, dekat dengan dasar tangki	Menyelam, mengukur kedalaman, berbaring di/orientasi/pengumpulan/di/dekat/tepat di atas dasar
Terlalu reaktif terhadap stimulus	Reaksi lari (terkejut) atau menghindari terhadap rangsangan visual (tangan yang melewati bagian atas tangki, sorotan cahaya), taktil (sentuhan) atau getaran (tangki diketuk perlahan)	Hipereksitabilita, hiperaktivitas setelah rangsangan/ancaman
Kurang reaktif terhadap stimulus		Tidak responsif terhadap rangsangan eksternal, tidak aktif setelah rangsangan/ancaman.
Hilangnya perilaku berkelompok/berkumpul	Ikan-ikan secara individu menunjukkan hilangnya kemampuan berkelompok dan interaksi sosial	Isolasi, isolasi sosial
Perilaku bergerombol/berkumpul	Peningkatan asosiasi berkelompok pada ikan	kesesakan
Kepala gemetar	Gerakan kepala lateral yang cepat	
FUNGSI VENTILASI (PERNAPASAN) ABNORMAL (sub-kategori di bawah)		
Hiperventilasi	Peningkatan frekuensi Gerakan ventilasi operkulum, dengan kemungkinan mulut terbuka dan operkulum memanjang	Laju/fungsi pernapasan cepat/kuat. Gerakan insang yang berat, ventilasi yang kuat, insang yang sangat memanjang,

		aktivitas operkulum yang abnormal, operkulum terpisah, mulut terbuka.
Hipoventilasi	Penurunan frekuensi (dan kemungkinan gerakan ventilasi operkular yang dangkal)	Pernapasan/Gerakan insang sporadis/spasmodik
Batuk	Refleks cepat berupa perluasan mulut dan operkulum yang tidak tersedia di permukaan air diperkirakan untuk membersihkan saluran ventilasi	Terengah-engah, aktivitas operkulum abnormal, menguap
Meneguk	Gerakan mulut (dan operkulum) di permukaan air, yang mengakibatkan masuknya air dan udara	Perpipaan
PIGMENTASI KULIT ABNORMAL (sub-kategori di bawah)		
Gelap		Warna/pigmentasi berubah/meningkat/menjadi lebih gelap tanda melanistik
Menjadi terang		Pucat, pigmentasi pucat/berubah/lemah
Belang-belang		Bercak yang berubah warna
KELAINAN LAIN YANG TERLIHAT (PENAMPILAN DAN PERILAKU) (sub-kategori di bawah)		
Eksoftalmia	Pembengkakan di dalam rongga orbita yang mengakibatkan penonjolan salah satu rongga orbita atau kedua matanya	Eksoftalmos, ekssoftalmus, mata popeye, bola mata menojol
Busung	Pembengkakan perut akibat penumpukan cairan. Dapat menyebabkan sisik menonjol dan/atau retakan pada dinding perut.	Perut/area usus yang membengkak/mengembang/kembung; edema
Pendarahan	Petechia (bitnik-bintik seukuran kepala jarum) dan/atau hematoma (area darah) akibat pendarahan intradermal atau sub-mukosa	
Sekresi lendir	Produksi lendir berlebih	Penumpukan lendir (perhatikan mata dengan saksama); peningkatan sekresi (lendir pada kulit atau dalam air); keluarnya lendir
Gumpalan feses (anus)	Untaian feses menggantung dari anus atau di dasar tangki	
Agresi dan/atau kanibalisme		Agresi, serangan langsung, dpminasi Lokasi tank pilihan, mengorek atau memakan bangkai ikan yang mati

Figure 1

Meneguk									
Kepala gemetar									
PIGMENTASI KULIT ABNORMAL									
Gelap									
Menjadi terang									
Belang-belang									
KELAINAN LAIN YANG TERLIHAT									
Eksoftalmia									
Busung									
Pendarahan									
Sekresi lendir									
Gumpalan feses (anus)									
Agresi dan/atau kanibalisme									
Tidak tercantum di atas. Tolong jelaskan									

Lampiran 13. Rubrik Penilaian Tanda Klinis

RUBRIK PENILAIAN TANDA KLINIS SUBLETAL Ikan Zebra (Danio rerio) – Uji Toksisitas Akut Berdasarkan: OECD Test Guideline No. 203 – Fish Acute Toxicity Test (2019)	
PRINSIP PENILAIAN Skor 0 pada setiap parameter mengacu pada kondisi kelompok KONTROL dalam penelitian ini. Baseline kelompok kontrol penelitian ini: • Perilaku berenang : Campuran aktif dan diam, tersebar di kolom air • Posisi dominan : Tersebar di kolom air (tidak menetap di dasar/permukaan) • Meneguk udara : Tidak teramati → Jika perilaku ikan perlakuan SAMA dengan kontrol → Skor 0 (Normal) → Jika perilaku ikan perlakuan BERBEDA dari kontrol → Skor 1–4 (sesuai tingkat penyimpangan)	
SKALA SKOR ■ Skor 0 = NORMAL (sama seperti kelompok kontrol) ■ Skor 1 = Abnormal Ringan (sedikit berbeda dari control) ■ Skor 2 = Abnormal Sedang (jelas berbeda dari kontrol) ■ Skor 3 = Abnormal Berat (sangat berbeda dari kontrol) ■ Skor 4 = Abnormal Sangat Berat (ekstrem, mendekati kematian)	
PETUNJUK PENGGUNAAN 1. Pengamatan dilakukan sesuai waktu pengamatan yang tertera di kolom pengamatan. 2. Setiap ikan dinilai dari klip video 60 detik. 3. Gunakan kelompok kontrol sebagai referensi visual skor 0 pada setiap sesi pengamatan. Kelompok kontrol telah dikonfirmasi mencerminkan kondisi normal zebrafish sehat. 4. Nilai hanya parameter yang menunjukkan penyimpangan dari kelompok kontrol. Tidak ada penyimpangan → langsung skor 0. 5. Jika ikan tidak teramati dengan jelas → tulis NAO (tidak ada observasi).	

1. HIPOAKTIF · Perilaku Berenang			
✓ Baseline Kontrol (= Skor 0): Ikan aktif, berenang tersebar di kolom air — Jika berhenti lalu bergerak kembali.			
Cara menilai: Bandingkan aktivitas ikan yang dinilai dengan yang Anda lihat pada kelompok kontrol.			
Skor	Tingkat Keparahan	Yang terlihat dalam video (45–60 detik)	Pertanyaan untuk memastikan skor
0	NORMAL	Ikan aktif seperti kelompok kontrol. Jika berhenti lalu bergerak kembali.	Apakah pola gerak ikan ini sama seperti ikan kontrol?
1	Abnormal – Ringan	Lebih sering diam dibanding kontrol. Bergerak hanya sesekali dan terlihat lebih lambat.	Apakah ikan ini lebih banyak diam dibanding ikan kontrol?
2	Abnormal – Sedang	Dominan diam. Hanya bergerak beberapa kali singkat selama video ($\leq 3\times$ gerak aktif).	Apakah ikan hampir tidak bergerak spontan, jauh lebih diam dari kontrol?
3	Abnormal – Berat	Hampir tidak bergerak sama sekali. Hanya bergerak jika ada rangsangan dari luar.	Apakah ikan hanya bergerak saat diganggu, tidak pernah bergerak sendiri?
4	Abnormal – Sangat Berat	Imobil total. Tidak bergerak sama sekali. Hanya gerakan operkulum (insang) yang tersisa.	Apakah ikan benar-benar diam total? Apakah Hanya insang yang bergerak?
2. HIPERAKTIF · Perilaku Berenang			
✓ Baseline Kontrol (= Skor 0): Ikan aktif, berenang tersebar di kolom air — tidak menunjukkan aktivitas berlebihan.			
Cara menilai: Bandingkan intensitas dan kecepatan gerakan ikan yang dinilai dengan kelompok kontrol.			
Skor	Tingkat Keparahan	Yang terlihat dalam video (45–60 detik)	Pertanyaan untuk memastikan skor
0	NORMAL	Aktivitas aktif. Tidak ada gerakan berlebihan.	Apakah intensitas gerak ikan ini sama seperti ikan kontrol?
1	Abnormal – Ringan	Lebih aktif dari kontrol. Berenang lebih sering/cepat, sesekali burst ($1-2\times$), masih terkontrol.	Apakah ikan ini bergerak lebih banyak/cepat dari kontrol tapi masih wajar?
2	Abnormal – Sedang	Jelas lebih aktif dari kontrol. Sering burst/zig-zag tidak beraturan ($\geq 3\times$).	Ada ≥ 3 gerakan cepat mendadak atau zig-zag yang tidak ada di kontrol?
3	Abnormal – Berat	Sangat aktif tidak terkendali. Sering membentur dinding/dasar wadah	Apakah ikan membentur dinding atau objek berkali-kali?
4	Abnormal – Sangat Berat	Melompat, berputar ekstrem, atau membentur terus-menerus tanpa henti.	Apakah ikan kehilangan kendali total atas gerakannya?
3. BERENANG DI DASAR · Perilaku Berenang			
✓ Baseline Kontrol (= Skor 0): Ikan tersebar di kolom air, namun kadang menetap sebentar di dasar lalu naik kembali.			
Cara menilai: Amati apakah ikan lebih sering atau lebih lama di dasar dibandingkan ikan kontrol.			
Skor	Tingkat Keparahan	Yang terlihat dalam video (45–60 detik)	Pertanyaan untuk memastikan skor
0	NORMAL	Tersebar di kolom air seperti kontrol. Kadang menetap sebentar di dasar lalu naik sendiri — masih dalam batas normal kontrol.	Apakah pola posisi ikan ini sama seperti ikan kontrol?

1	Abnormal – Ringan	Lebih sering atau lebih lama di dasar dibanding kontrol, tapi masih bisa naik sendiri.	Apakah ikan lebih sering/lama di dasar dibandingkan kontrol?
2	Abnormal – Sedang	Sering berada di dekat dasar ($\geq 3\times$ turun atau menetap >10 detik di dasar).	Apakah ikan menghabiskan banyak waktu di dasar, jauh lebih dari kontrol?
3	Abnormal – Berat	Hampir selalu di dasar. Sangat jarang naik ke kolom air.	Apakah ikan hampir tidak beranjak dari dasar?
4	Abnormal – Sangat Berat	Berbaring/terlentang di dasar. Tidak mampu naik sama sekali.	Apakah ikan berbaring pasif di dasar tanpa bisa naik?

4. BERENANG DI PERMUKAAN · Perilaku Berenang

✓ **Baseline Kontrol (= Skor 0):** Ikan tersebar di kolom air — tidak menetap di permukaan.

Cara menilai: Amati apakah ikan lebih banyak berada di permukaan dibandingkan ikan kontrol.

Skor	Tingkat Keparahan	Yang terlihat dalam video (45–60 detik)	Pertanyaan untuk memastikan skor
0	NORMAL =Kelompok Kontrol	Tersebar di kolom air seperti kontrol. Tidak menetap di permukaan.	Apakah posisi ikan ini sama seperti kontrol — tidak menempel di permukaan?
1	Abnormal – Ringan	Sesekali muncul ke permukaan (1–2 $\times$) lalu turun sendiri. Lebih sering dari kontrol.	Apakah ikan lebih sering ke permukaan dibanding kontrol, tapi masih turun sendiri?
2	Abnormal – Sedang	Sering di lapisan atas/permukaan ($\geq 3\times$ atau menetap >10 detik di permukaan).	Apakah ikan lebih banyak di permukaan, jauh lebih dari kontrol?
3	Abnormal – Berat	Hampir selalu di permukaan. Tubuh sering miring/horizontal di permukaan.	Apakah ikan tampak 'menempel' di permukaan hampir sepanjang video?
4	Abnormal – Sangat Berat	Mengapung pasif di permukaan. Tidak mampu menyelam sama sekali.	Apakah ikan mengapung tanpa bisa menyelam?

5. MENEGUK UDARA (Gulping) · Fungsi Ventilasi

✓ **Baseline Kontrol (= Skor 0):** Ikan kontrol tidak terlihat meneguk udara dari permukaan.

Cara menilai: Hitung berapa kali mulut ikan muncul ke permukaan untuk menghirup udara.

Skor	Tingkat Keparahan	Yang terlihat dalam video (45–60 detik)	Pertanyaan untuk memastikan skor
0	NORMAL =Kelompok Kontrol	Tidak ada perilaku meneguk udara — sama seperti kelompok kontrol.	Apakah ikan tidak pernah meneguk udara dari permukaan?

1	Abnormal Ringan	–	1–2× terlihat muncul ke permukaan dan membuka mulut menghirup udara.	Ada 1–2 kali gerakan meneguk udara yang tidak ada di kontrol?
2	Abnormal Sedang	–	3–5× terlihat meneguk udara di permukaan selama video.	Ada 3–5 kali gerakan meneguk udara dalam video?
3	Abnormal – Berat		≥6× meneguk udara. Sebagian besar waktu dihabiskan di permukaan.	Apakah ikan terus-menerus bolak-balik ke permukaan untuk udara?
4	Abnormal Sangat Berat	–	Tidak beranjak dari permukaan. Mulut terus membuka-menutup di permukaan.	Apakah ikan tidak bisa bernapas tanpa terus meneguk udara dari permukaan?

6. TERLALU REAKTIF TERHADAP STIMULUS · Respons Stimulus

✓ **Baseline Kontrol (= Skor 0):** Ikan kontrol merespons stimulus dengan wajar — menghindari proporsional lalu tenang.

Cara menilai: Berikan rangsangan ringan (ketukan kecil / gerakan tangan) lalu amati respons ikan.

Skor	Tingkat Keparahan		Yang terlihat dalam video (45–60 detik)	Pertanyaan untuk memastikan skor
0	NORMAL =Kelompok Kontrol		Merespons stimulus seperti ikan kontrol: menghindari proporsional, cepat tenang.	Apakah respons ikan ini sama seperti ikan kontrol?
1	Abnormal Ringan	–	Merespons lebih cepat/berlebihan dari kontrol, burst singkat, tenang kembali <5 detik.	Ikan kaget lebih dari kontrol tapi cepat kembali normal?
2	Abnormal Sedang	–	Panik jelas: lari cepat ke sudut, butuh >5 detik untuk tenang. Jauh lebih dari kontrol.	Ikan berlari jauh dan butuh waktu lama untuk tenang — lebih dari kontrol?
3	Abnormal – Berat		Sangat panik, membentur dinding 1–2× setelah stimulus. Tidak terjadi pada kontrol.	Apakah ikan membentur dinding akibat stimulus?
4	Abnormal Sangat Berat	–	Stimulus kecil memicu ikan melompat atau membentur berkali-kali tanpa terkendali.	Apakah stimulus ringan memicu reaksi ekstrem yang tidak bisa berhenti?

7. DIBAWAH KONTROL TERHADAP STIMULUS · Respons Stimulus

✓ **Baseline Kontrol (= Skor 0):** Ikan kontrol merespons stimulus dengan segera dan jelas.

Cara menilai: Berikan rangsangan (ketukan / gerakan tangan) lalu amati respons ikan.

Skor	Tingkat Keparahan		Yang terlihat dalam video (45–60 detik)	Pertanyaan untuk memastikan skor
0	NORMAL =Kelompok Kontrol		Merespons stimulus segera seperti ikan kontrol.	Apakah respons ikan ini sama cepatnya dengan ikan kontrol?

1	Abnormal Ringan –	Merespons lebih lambat dari kontrol (jeda 2–3 detik sebelum bereaksi).	Ada jeda singkat sebelum ikan bereaksi, berbeda dari kontrol?
2	Abnormal Sedang –	Baru bereaksi setelah stimulus diulang $\geq 2\times$. Respons terlihat lemah.	Ikan butuh stimulus berulang untuk merespons — tidak seperti kontrol?
3	Abnormal – Berat	Hanya gerakan kecil (sirip atau ekor saja) setelah stimulus kuat berulang.	Hanya ada gerakan minimal yang jauh lebih lemah dari kontrol?
4	Abnormal Sangat Berat –	Tidak merespons sama sekali meskipun stimulus diberikan berkali-kali.	Apakah ikan benar-benar tidak bereaksi terhadap stimulus apapun?

8. HIPERVENTILASI · Fungsi Ventilasi

✓ **Baseline Kontrol (= Skor 0):** Gerakan operkulum kontrol, ritmis dan teratur.

Cara menilai: Hitung gerakan operkulum selama 15 detik dalam video $\rightarrow \times 4$ = per menit. Bandingkan dengan kontrol.

Skor	Tingkat Keparahan	Yang terlihat dalam video (45–60 detik)	Pertanyaan untuk memastikan skor
0	NORMAL =Kelompok Kontrol	Gerakan operkulum sama seperti kontrol	Gerakan insang tampak sama seperti ikan kontrol?
1	Abnormal Ringan –	Sedikit lebih cepat dari kontrol, tapi masih ritmis dan teratur.	Gerakan insang sedikit lebih cepat dari kontrol tapi masih berpola?
2	Abnormal Sedang –	Jelas lebih cepat dari kontrol. Gerakan lebih besar dan lebih kuat.	Gerakan insang jelas lebih cepat dan lebih besar dibanding kontrol?
3	Abnormal – Berat	Megap-megap. Operkulum sangat cepat dan kuat. Insang melebar jelas.	Apakah ikan terlihat megap-megap dengan insang yang melebar?
4	Abnormal Sangat Berat –	Ventilasi ekstrem: sangat cepat dan tidak teratur. Ikan hampir tidak bisa berenang.	Apakah ikan tampak kehabisan napas dan tidak bisa bergerak normal?

9. HIPOVENTILASI · Fungsi Ventilasi

✓ **Baseline Kontrol (= Skor 0):** Gerakan operkulum kontrol, ritmis dan teratur.

Cara menilai: Hitung gerakan operkulum selama 15 detik dalam video $\rightarrow \times 4$ = per menit. Bandingkan dengan kontrol.

Skor	Tingkat Keparahan	Yang terlihat dalam video (45–60 detik)	Pertanyaan untuk memastikan skor
0	NORMAL =Kelompok Kontrol	Gerakan operkulum sama seperti kontrol	Gerakan insang tampak sama seperti ikan kontrol?
1	Abnormal Ringan –	Sedikit lebih lambat dari kontrol, tapi irama masih teratur.	Gerakan insang sedikit lebih lambat dari

			kontrol tapi masih berpola?
2	Abnormal Sedang –	Jelas lebih lambat dari kontrol. Jeda antar gerakan memanjang.	Jeda antar gerakan insang jelas lebih panjang dari kontrol?
3	Abnormal – Berat	Sangat lambat. Gerakan kecil dan lemah. Sangat berbeda dari kontrol.	Gerakan insang sangat lambat dan lemah — jauh berbeda dari kontrol?
4	Abnormal Sangat Berat –	Operkulum hampir tidak bergerak. Hanya gerakan minimal atau berhenti total.	Apakah insang hampir tidak bergerak sama sekali?

10. SEKRESI LENDIR BERLEBIH · Penampilan

✓ **Baseline Kontrol (= Skor 0):** Air kontrol jernih dengan sedikit lendir tipis di sekitar tubuh ikan — ini kondisi normal zebrafish.

Cara menilai: Amati apakah lendir lebih banyak atau lebih jelas dibandingkan yang terlihat pada kontrol.

Skor	Tingkat Keparahan	Yang terlihat dalam video (45–60 detik)	Pertanyaan untuk memastikan skor
0	NORMAL	Air jernih dengan sedikit lendir tipis di sekitar tubuh — sama seperti kelompok kontrol.	Lendir yang terlihat masih sama seperti atau tidak lebih dari kontrol?
1	Abnormal Ringan –	Lendir sedikit lebih banyak dari kontrol. Lapisan putih tipis lebih jelas terlihat dibanding kontrol.	Apakah lendir terlihat lebih banyak dari yang ada di kontrol?
2	Abnormal Sedang –	Lendir jelas terlihat menempel di tubuh atau melayang di sekitarnya.	Lendir jelas terlihat di tubuh atau mengambang di air?
3	Abnormal – Berat	Lendir cukup banyak, menyebar ke area wadah. Air mulai agak keruh.	Air mulai keruh karena lendir yang menyebar?
4	Abnormal Sangat Berat –	Lendir sangat banyak. Air keruh nyata. Tubuh ikan tampak tertutup lendir.	Air sangat keruh dan tubuh ikan tampak berlendir tebal?

11. SEKRESI FESES ABNORMAL · Penampilan

✓ **Baseline Kontrol (= Skor 0):** Kontrol kadang menunjukkan untaian feces pendek sesekali — ini normal untuk zebrafish.

Cara menilai: Amati apakah untaian feces lebih panjang atau lebih sering dibandingkan yang terlihat pada kontrol.

Skor	Tingkat Keparahan	Yang terlihat dalam video (45–60 detik)	Pertanyaan untuk memastikan skor
0	NORMAL	Untaian feces pendek sesekali — sama seperti yang terlihat pada kelompok kontrol.	Apakah feces yang terlihat masih sama seperti atau tidak lebih dari kontrol?
1	Abnormal – Ringan	Untaian feces sedikit lebih panjang atau lebih sering dari kontrol, 1-2 untaian feces	Apakah feces lebih panjang atau lebih sering muncul dibanding kontrol?

2	Abnormal – Sedang	Untaian feses sepanjang tubuh, tergantung 3-4 dalam video.	Feses menggantung panjang dan terlihat beberapa kali?
3	Abnormal – Berat	Untaian feses lebih panjang dari tubuh, menetap 5-6 hampir sepanjang video.	Feses terus menggantung panjang hampir sepanjang video?
4	Abnormal – Sangat Berat	Untaian feses sangat panjang terus-menerus, tidak lepas, warna/tekstur sangat abnormal.	Ada untai feses ekstrem yang tidak pernah lepas selama video?

12. PERDARAHAN · Penampilan

✓ **Baseline Kontrol (= Skor 0):** Tidak ada bintik atau area merah pada ikan kontrol.

Cara menilai: Amati ada/tidaknya bintik atau area kemerahan pada tubuh, sirip, atau mata ikan.

Skor	Tingkat Keparahan	Yang terlihat dalam video (45–60 detik)	Pertanyaan untuk memastikan skor
0	NORMAL	Tidak ada bintik merah — sama seperti kelompok kontrol.	Tubuh ikan terlihat bersih seperti ikan kontrol?
1	Abnormal – Ringan	1 bintik kecil merah (petechiae) di satu lokasi. Tidak ada di kontrol.	Ada 1 bintik merah kecil yang tidak ada di kontrol?
2	Abnormal – Sedang	2–3 bintik atau area merah di beberapa lokasi berbeda.	Ada 2–3 titik perdarahan di lokasi yang berbeda-beda?
3	Abnormal – Berat	Area perdarahan luas: >3 lokasi atau bercak merah besar yang jelas terlihat.	Perdarahan di banyak tempat atau berbentuk bercak besar?
4	Abnormal – Sangat Berat	Perdarahan masif: hampir seluruh tubuh, sirip, dan/atau mata terlibat.	Tubuh ikan tampak merah menyeluruh atau perdarahan sangat parah?

Lampiran 14. Hasil Pengamatan Histopatologi

Perhitungan Median Skor Histopatologi

Kelompok	Vakuolisasi Sitoplasma	Dilatasi Sinusoid	Nekrosis Hepatosit
Kontrol 1	0	0	0
Kontrol 2	0	0	0
Kontrol 3	0	0	0
MEDIAN	0	0	0
Basis 1	0	0	0
Basis 2	2	0	0
Basis 3	0	0	0
MEDIAN	0	0	0
50 PPM 1	4	0	0
50 PPM 2	0	0	0
50 PPM 3	0	0	0
MEDIAN	0	0	0
100 PPM 1	0	1	0
100 PPM 2	1	0	0
100 PPM 3	1	2	0
MEDIAN	1	1	0
200 PPM 1	0	2	0
200 PPM 2	1	2	0
200 PPM 3	0	0	0
MEDIAN	0	2	0
400 PPM 1	2	0	0
400 PPM 2	1	1	0
400 PPM 3	1	1	0
MEDIAN	1	1	0
800 PPM 1	3	0	0
800 PPM 2	2	1	0
800 PPM 3	0	0	2
MEDIAN	2	0	0

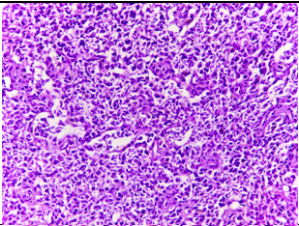
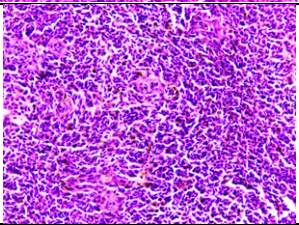
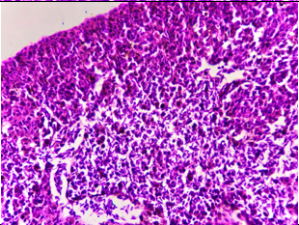
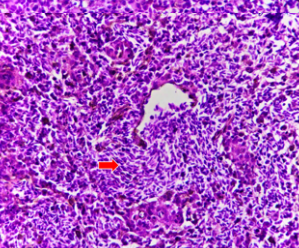
Hasil Uji Statistik Skor Histopatologi

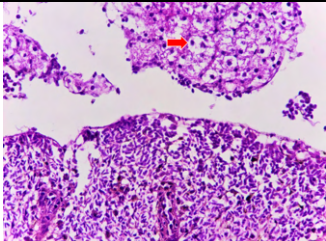
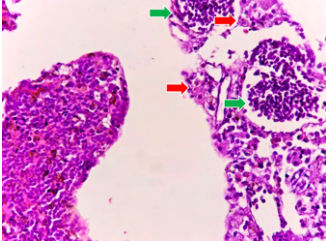
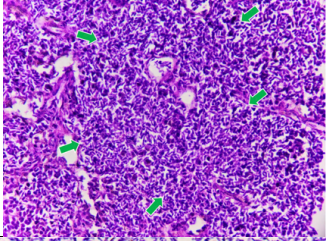
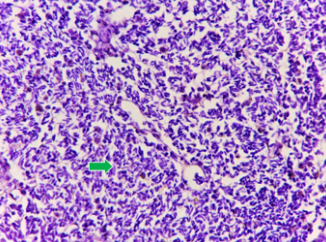
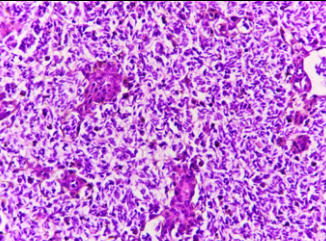
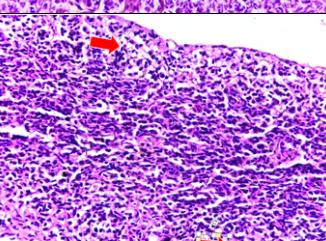
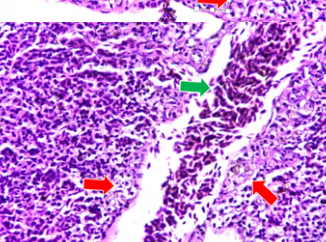
	Vakuolisasi	Dilatasi	Nekrosis
Number of Levels in Kelompok	7	7	7
N	21	21	21
Observed J-T Statistic	126.000	118.000	103.500
Mean J-T Statistic	94.500	94.500	94.500
Std. Deviation of J-T Statistic	14.942	13.567	6.000
Std. J-T Statistic	2.108	1.732	1.500
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.035	0.083	0.134

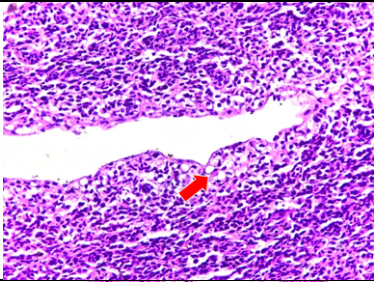
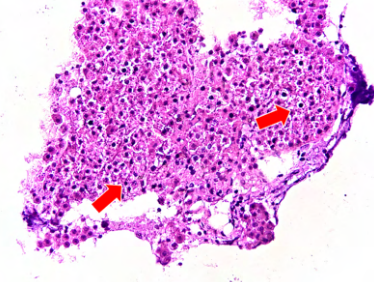
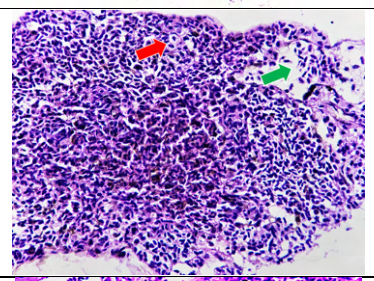
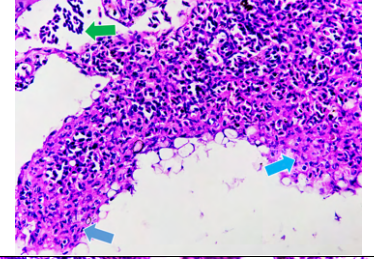
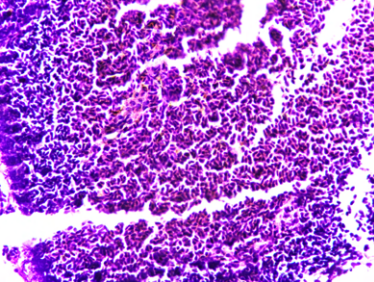
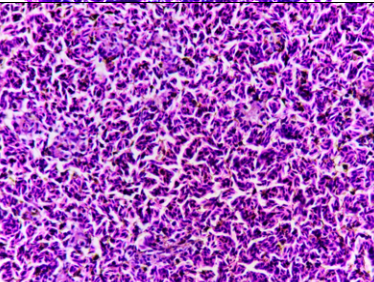
a. Grouping Variable: Kelompok

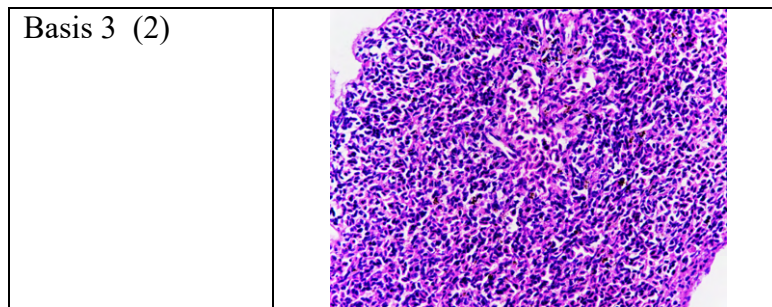
Jonckheere–Terpstra test digunakan untuk menguji adanya tren terurut (ordered trend) pada beberapa kelompok independen, terutama untuk melihat apakah terdapat peningkatan atau penurunan nilai seiring dengan meningkatnya dosis perlakuan. Hasil dari uji Jonckheere–Terpstra Test, bahwa nilai ($p < 0,05$) untuk parameter vakuolisasi sitoplasma yang menunjukkan adanya tren peningkatan skor yang signifikan sejalan dengan peningkatan dosis dan ($p > 0,05$) untuk parameter dilatasi dan nekrosis sehingga hasil tidak signifikan.

Gambar Histopatologi Hati Ikan Zebra

Kode ikan	Gambar	
Kontrol 1 (5)		
Kontrol 2 (2)		
Kontrol 1 (1)		
50 ppm 1 (1)		
50 ppm 2 (6)		
50 ppm 3 (2)		
100 ppm 1 (6)		

100 ppm 2 (2)			
100 ppm 3 (1)			
200 ppm 1 (2)			
200 ppm 2 (4)			
200 ppm 3 (1)			
400 ppm 1 (6)			
400 ppm 2 (7)			

400 ppm 3 (2)	
800 ppm 1 (4)	
800 ppm 2 (2)	
800 ppm 3 (5)	
Basis 1 (7)	
Basis 2 (1)	



Keterangan: → vakuolisasi sitoplasma; → dilatasi sinusoid; → nekrosis.