

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah objek maupun subjek secara keseluruhan dalam sebuah penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye (*Tropaeolum majus* L.).

2. Sampel

Sampel merupakan bagian yang memiliki karakteristik serupa dengan populasi. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah formulasi nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye (*Tropaeolum majus* L.) dengan menggunakan variasi penstabil.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini yaitu formulasi nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye (*Tropaeolum majus* L.) yang dibuat dengan variasi penstabil dan dilakukan pengujian sediaan nanosuspensi untuk meningkatkan aktivitas antioksidan dengan metode *in vitro*, ukuran partikel, zeta potensial, polidispersi, morfologi (TEM dan SEM), viskositas, pH, dan stabilitas penyimpanan.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama diklasifikasikan menjadi beberapa bagian variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang dapat diuji maupun diubah-ubah dalam suatu percobaan. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi jenis penstabil.

Variabel tergantung adalah variabel yang pusat permasalahannya dapat diukur atau diamati merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung

penelitian ini adalah pengujian aktivitas antioksidan secara *in vitro* dan uji sediaan nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye (*Tropaeolum majus* L.).

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel *dependen*, sehingga ditetapkan kualifikasi agar hasil yang dihasilkan tidak mudah ditiru oleh peneliti lain. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah pembuatan ekstrak dan sediaan nanosuspensi dengan metode sonopresipitasi, alat serta bahan yang digunakan, lingkungan, suhu, lama pengerjaan dan laboratorium yang digunakan.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, bunga nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) adalah bunga yang berwarna oranye diambil dalam kondisi segar, bersih, dan tidak rusak yang didapat dari Dieng Kulon, Wonosobo, Jawa Tengah. Bunga yang dipanen memiliki warna yang cerah dan mulai mekar maksimal.

Kedua, serbuk bunga nasturtium oranye adalah serbuk yang diperoleh dari bunga nasturtium yang telah melalui proses pemilahan, pencucian, perajangan dan pengeringan, setelah kering bunga tersebut di serbuk dengan cara penggilingan, kemudian diayak menggunakan mesh 40.

Ketiga, ekstrak bunga nasturtium oranye adalah diperoleh dengan cara metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 70% kemudian akan dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*.

Keempat, formulasi nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye adalah nanosuspensi yang dibuat dengan metode sonopresipitasi menggunakan ekstrak bunga nasturtium oranye 150 mg dengan 6 variasi zat penstabil yaitu formula pertama adalah Sodium lauril sulfat, formula kedua *Pluronic F-68*, formula ketiga Tween 80, formula keempat Polivinil pirolidon, formula kelima campuran Sodium lauril sulfat dengan Polivinil pirolidon, dan formula keenam Polivinil alkohol.

Kelima, uji karakteristik sediaan nanosuspensi adalah uji ukuran partikel, zeta potensial, polidispersi, morfologi (TEM dan SEM), pH, viskositas, dan stabilitas penyimpanan.

Keenam, aktivitas antioksidan adalah aktivitas antioksidan kuersetin, ekstrak, dan nanosuspensi bunga nasturtium menggunakan pengujian dengan metode DPPH yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} .

Ketujuh, pengujian stabilitas sediaan nanosuspensi adalah pengujian stabilitas selama penyimpanan 4 minggu, yang diuji setiap seminggu sekali dengan membandingkan awal sediaan nanosuspensi dengan hasil akhir setelah masa penyimpanan pada ukuran partikel, zeta potensial, polidispersi, morfologi (TEM dan SEM), pH, dan viskositas.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *magnetic stirrer* (Thermo Scientific), sonikator Qsonica (Q 500), spektrofotometer Uv-Vis Shimadzu (Seri 1800, Jepang), kuvet semimikro *disposable*, alat TEM (JEOL TEM 1400) dan SEM (*Inspect S50*), analisis ukuran partikel, indeks polidispersi, dan zeta potensial (Delsa Nano Particle Analyzer, Beckam Coulter Counter), viskometer *ostwald* (*Capillary Viscometer*), pH meter digital (Milwaukee MW101 PRO pH Meter), alat-alat gelas (*Pyrex*) dan non gelas yang terdapat di laboratorium.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga nasturtium berwarna oranye yang didapatkan dari Dieng Kulon Wonosobo Jawa Tengah, etanol 70%, *etanol* p.a, methanol p.a, Sodium lauril sulfat, *Pluronic F-68*, Tween 80, Polivinil pirolidon, Polivinil alkohol (Sigma, Aldrich), $FeCl_3$ 1%, $AlCl_3$, Folin-Ciocalteu, Mg, HCl pekat, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorff, HCl 2N, kloroform, asetat anhidra, H_2SO_4 , kuersetin baku, amil alkohol, DPPH, kuersetin (Sigma Aldrich), *aquadest*.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman nasturtium dilakukan di Herbarium Bandungense SITH ITB, Bandung, Jawa Barat. Tujuan dari determinasi tanaman adalah untuk memastikan kebenaran dari suatu sampel tanaman yang digunakan pada penelitian dengan cara mencocokkan morfologi tanaman.

2. Pengambilan Sampel Simplisia

Sampel bunga nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) diperoleh dari Dieng Kulon, Wonosobo, Jawa Tengah yang digunakan adalah bunga berwarna oranye, kondisi segar, bersih, dan tidak rusak. Bunga yang dipanen memiliki warna yang cerah dan mulai mekar maksimal.

3. Pembuatan Simplisia

Bunga nasturtium yang digunakan dalam kondisi masih segar, tidak rusak, berwarna oranye, bersih serta terbebas dari pengotor lain. Bunga nasturtium kemudian dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir, dikeringkan dengan bantuan sinar matahari dalam wadah tampah dan ditutupi menggunakan kain tipis berwarna hitam agar mempercepat proses pengeringan dan melindungi dari kotoran juga serangga. Bunga nasturtium yang sudah kering kemudian diserbuk menggunakan blender, dan diayak menggunakan ayakan agar mendapat serbuk yang halus (Santos-sánchez & Salas-coronado, 2019).

4. Penetapan Kadar Kelembaban Serbuk Bunga Nasturtium Oranye

Penetapan keseimbangan kadar kelembaban menggunakan alat *moisture balance* yang diset dengan suhu 105°C, kemudian menimbang serbuk bunga nasturtium oranye sebanyak 2 gram pada alat *moisture balance* dan ditutup alat tersebut sampai mendapatkan kadar keseimbangan kelembaban serbuk bunga nasturtium oranye yang paling stabil. Ulangi pengujian tersebut sebanyak 3 kali replikasi.

5. Ekstraksi Bunga Nasturtium Oranye (Modifikasi Neswati dan Ismanto, 2018)

Serbuk bunga nasturtium oranye ditimbang sebanyak 10 gram dengan penambahan pelarut etanol 70% sebanyak 220 mL dengan rasio 1 : 220 mL.

Kemudian diekstraksi dengan bantuan metode ultrasonikasi menggunakan suhu 20°C, 30°C, dan 40°C dengan kecepatan 40 kHz dilakukan selama 20 menit, 30 menit dan 40 menit. Hasil yang diperoleh kemudian disaring menggunakan kertas saring. Kemudian ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai didapatkan kepekatan 30 mL (Neswati & Ismanto, 2017). Rendemen yang diperoleh dari ekstrak bunga nasturtium oranye kemudian dihitung dengan rumus:

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\%$$

6. Penetapan Kadar Air Ekstrak Bunga Nasturtium Oranye

Penetapan kadar air ekstrak bunga nasturtium oranye dilakukan dengan menggunakan metode gravimetri. Ekstrak ditimbang sebanyak 10 gram kemudian dimasukan kedalam krus yang telah ditara. Kemudian sampel dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan timbang. Ekstrak dikeringkan dan ditimbang setiap 1 jam sampai mendapatkan perbedaan bobot konstan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% atau tidak melebihi 0,5 mg yang ditimbang dengan timbangan analitik. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Wijaya & Haryanti, 2022).

7. Identifikasi Senyawa Kimia Bunga Nasturtium

Skrining fitokimia adalah suatu uji yang digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel. Skrining fitokimia terdiri dari uji :

7.1 Flavonoid. Dimasukkan sampel ke dalam tabung sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan serbuk Mg sebanyak 0,1 mg dan 2 tetes HCl pekat. Diamati dan jika menghasilkan warna merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Suryanita *et al.*, 2019).

7.2 Fenolik. Dimasukkan sampel ke dalam tabung sebanyak 1 mL kemudian tambahkan dengan 3 tetes larutan FeCl₃. Diamati dan bila terbentuk warna hitam kebiruan atau hijau menunjukkan adanya senyawa fenolik (Suryanita *et al.*, 2019).

7.3 Alkaloid. Dimasukkan sampel ke dalam tabung sebanyak 1 mL kemudian direaksikan dengan pereaksi Mayer, pereaksi Wagner dan pereaksi Dragendorff. Diamati masing-masing pereaksi jika menghasilkan endapan jingga,

berwarna coklat dan berwarna putih menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Suryanita *et al.*, 2019).

7.4 Tanin. Dimasukkan sampel ke dalam tabung sebanyak 1 mL kemudian tambahkan dengan beberapa tetes FeCl_3 1%. Diamati dan bila terbentuk warna coklat kehitaman menunjukkan adanya senyawa tannin (Suryanita *et al.*, 2019).

7.5 Saponin. Dimasukkan sampel ke dalam tabung sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan HCl 2N sebanyak 2-3 tetes dan dikocok kuat. Diamati dan bila terbentuk busa yang stabil menunjukkan adanya senyawa saponin (Suryanita *et al.*, 2019).

7.6 Steroid/Triterpenoid. Dimasukkan sampel ke dalam tabung sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan kloroform sebanyak 2 mL dan asetat anhidrida sebanyak 2 mL lalu didinginkan dan ditambahkan H_2SO_4 . Diamati dan jika terjadi perubahan warna hijau atau biru menunjukkan adanya triterpenoid, dan warna merah atau ungu menunjukkan adanya steroid (Suryanita *et al.*, 2019).

8. Penetapan Kadar Fenolik Total

8.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum. Larutan baku dibuat dengan menggunakan asam galat sebanyak 10 mg ditambahkan metanol dalam labu takar 25 mL sampai tanda batas. Larutan Folin-Ciocalteu dibuat dengan mengencerkan Folin-Ciocalteu 1 : *aquadest* 10. Larutan Na_2CO_3 10% ditimbang sebanyak 10 gram dan ditambahkan 80 mL *aquadest* kemudian dipanaskan sampai larut, didiamkan selama 24 jam selanjutnya saring larutan tersebut dan tambah *aquadest* sampai 100 mL. Larutan blanko dibuat dengan 1 mL metanol p.a ditambahkan 1 mL enceran Folin-Ciocalteu kemudian dikocok dan diamkan selama 8 menit, ditambahkan Na_2CO_3 sebanyak 3 mL. Sebanyak 1 mL larutan baku pembanding ditambah dengan 5 mL *aquadest* dan 1 mL enceran Folin-Ciocalteu dikocok dan didiamkan selama 8 menit ditambah dengan Na_2CO_3 sebanyak 3 mL kemudian baca serapan pada panjang gelombang 400-800 nm (Nurulita *et al.*, 2019).

8.2. Penentuan Operating Time (OT). Sebanyak 1 mL larutan baku pembanding ditambah dengan 5 mL *aquadest* dan 1 mL enceran Folin-Ciocalteu

dikocok dan didiamkan selama 8 menit ditambah dengan Na_2CO_3 sebanyak 3 mL. Kemudian baca serapan panjang gelombang maksimum selama 1 menit setiap 1 jam (Nurulita *et al.*, 2019).

8.3. Penentuan Kurva Baku Asam Galat. Larutan asam galat dengan seri konsentrasi 70 ppm, 60 ppm, 50 ppm, 40 ppm, 30 ppm, dan 20 ppm dipipet sebanyak 1 mL ditambahkan 1 mL enceran Folin-Ciocalteu dan 5 mL *aquadest* selanjutnya dikocok dan didiamkan selama 8 menit kemudian tambah dengan Na_2CO_3 sebanyak 3 mL dikocok sampai homogen. Diamkan selama *operating time*, kemudian baca absorbansi pada panjang gelombang maksimum (Nurulita *et al.*, 2019).

8.4. Penentuan Kadar Fenolik Total. Sebanyak 200 mg ekstrak kental bunga nasturtium dilarutkan dengan 25 mL metanol p.a, *stirrer* selama 30 menit kemudian saring dalam labu takar 25 mL tambah metanol p.a sampai tanda batas. Dipipet sebanyak 1 mL sampel ekstrak ditambah dengan 5 mL *aquadest* dan enceran Folin-Ciocalteu sebanyak 1 mL, dikocok sampai homogen kemudian diamkan selama 8 menit. Ditambahkan natrium karbonat sebanyak 3 mL. Didiamkan selama *operating time* kemudian baca serapan panjang gelombang maksimum dan ulangi sebanyak 3 kali replikasi (Nurulita *et al.*, 2019).

9. Penetapan Kadar Flavonoid Total

9.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum. Larutan baku pembanding dibuat dengan menimbang 10 mg kuersetin ditambahkan 25 mL etanol p.a sampai tanda batas. Larutan AlCl_3 10% dibuat dari 3 gram AlCl_3 ditambah dengan 50 mL *aquadest*. Larutan natrium asetat 1 M dibuat dengan menimbang $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ sebanyak 8,203 gram ditambahkan 100 mL *aquadest*. Dibuat larutan blanko dengan 1 mL etanol p.a ditambahkan 1 mL natrium asetat dan 2 mL *aquadest* homogenkan. Larutan pembanding sebanyak 1 mL ditambahkan 1 mL natrium asetat dan 2 mL *aquadest* homogenkan. Baca serapan pada panjang gelombang maksimal 400-500 nm (Nurulita *et al.*, 2019).

9.2. Penentuan Operating Time (OT). Sebanyak 1 mL larutan stok ditambahkan 1 mL natrium asetat dan 2 mL *aquadest* homogenkan. Kemudian

baca serapan panjang gelombang maksimum selama 60 menit sampai didapatkan absorbansi yang stabil (Nurulita *et al.*, 2019).

9.3. Penentuan Kurva Baku Kuersetin. Larutan asam galat dengan seri konsentrasi 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, dan 80 ppm dipipet sebanyak 1 mL dan ditambahkan ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% dan natrium asetat sebanyak 1 mL. Diamkan selama *operating time*, kemudian baca absorbansi pada panjang gelombang maksimum (Nurulita *et al.*, 2019).

9.4. Penentuan Kadar Flavonoid Total. Ekstrak bunga nasturtium oranye 200 mg tambah dengan 25 mL etanol p.a kemudian *stirrer* selama 30 menit, saring dalam labu takar 25 mL dicukupkan dengan etanol p.a sampai tanda batas. Sebanyak 1 mL sampel ekstrak dan ditambahkan dengan AlCl_3 10% sebanyak 1 mL dan natrium asetat sebanyak 1 mL. Didiamkan selama OT dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum, ulangi sebanyak 3 kali replikasi (Nurulita *et al.*, 2019).

10. Pengujian Kelarutan Kualitatif Ekstrak Bunga Nasturtium Oranye

Pengujian ini menggunakan etanol atau aseton, DMSO, dan *aquadest*. Berdasarkan klasifikasi toksisitas pelarut ICH, pelarut tersebut masuk ke dalam kelas III, yang menimbulkan bahaya sangat rendah bagi kesehatan manusia (Dzakwan, 2020). Tujuan dari pengujian ini untuk melihat kelarutan ekstrak pada berbagai macam pelarut yang berbeda dimana kemampuan senyawa aktif dalam ekstrak dapat terlarut atau tidak dalam tingkatan kepolaran yang berbeda (Octavia *et al.*, 2023). Sebanyak 150 mg ekstrak bunga nasturtium oranye ditimbang dalam beaker glass ditambahkan 5 mL pelarut (*aquadest*, etanol 70%, etanol 96%, dan DMSO) kemudian diaduk hingga tercampur secara merata dan amati hasil yang diperoleh.

11. Pembuatan Nanosuspensi Menggunakan Metode Sonopresipitasi

Pembuatan nanosuspensi bunga nasturtium menggunakan metode sonopresipitasi, 150 mg ekstrak bunga nasturtium oranye dilarutkan dalam pelarut yang cocok dengan cara dibuktikan terlebih dahulu derajat kelarutannya (fase organik), untuk melarutkan ekstrak digunakan pelarut non polar dan pelarut untuk melarutkan bahan penstabil digunakan pelarut polar. Masing-masing dari enam

jenis penstabil dilarutkan dalam 10 ml air suling (fase air). Fase organik kemudian ditambahkan secara bertahap ke dalam fase air hingga diperoleh dispersi koloidal. Proses ini diakhiri dengan sonikasi menggunakan sonikator tipe probe pada frekuensi 50 kHz selama delapan menit (Dzakwan, 2020).

Tabel 2. Formulasi sediaan nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye

Bahan	Konsentrasi % (b/b)					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Ekstrak bunga nasturtium	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Sodium lauril sulfat	0,5	-	-	-	0,5	-
<i>Pluronic F-68</i>	-	1	-	-	-	-
Tween 80	-	-	1	-	-	-
PVP	-	-	-	1	1	-
PVA	-	-	-	-	-	1
<i>Aquadest</i>	89,2	88,07	88,07	88,07	88,2	88,07
Etanol 70%	10	10	10	10	10	10
Volume	50	50	50	50	50	50

Keterangan:

F1 nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye 0,3% dengan *stabilizer* SLS

F2 nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye 0,3% dengan *stabilizer Pluronic f-68*

F3 nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye 0,3% dengan *stabilizer* Tween 80

F4 nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye 0,3% dengan *stabilizer* PVP

F5 nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye 0,3% dengan *stabilizer* SLS : PVP

F6 nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye 0,3% dengan *stabilizer* PVA

Stabilizer yang digunakan untuk aplikasi dalam formulasi atau teknologi farmasi pada formula ke-1 yaitu Sodium lauril sulfat dengan konsentrasi 0,5% digunakan sebagai emulsifier anionik, membentuk basis *self-emulsifying* dengan alkohol lemak, formula ke-2 yaitu *Pluronic F-68* dengan konsentrasi 1% digunakan sebagai *spreading agent* (agen penyebar), formula ke-3 yaitu Tween 80 konsentrasi 1% digunakan sebagai *wetting agent* (pembasah) untuk konstituen aktif yang tidak larut dalam basis lipofilik, formula ke-4 yaitu Polivinil pirolidon konsentrasi 1% sebagai agen penstabil, formula ke-5 yaitu kombinasi SLS : PVP (0,5% : 1%) digunakan sebagai emulsifier anionik dan agen penstabil, formula ke-6 yaitu Polivil alkohol konsentrasi 1% digunakan sebagai agen penstabil (Haley, 2009).

12. Karakteristik nanosuspensi

12.1 Ukuran Partikel dan Indeks Polidispersitas. Penentuan ukuran partikel dilakukan dengan menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA).

Sebanyak 3 mL nanosuspensi diambil. Kemudian diukur diameter dari partikel yang terdispersi dalam sediaan dan dilakukan sebanyak 3 replikasi (Bhatia, 2016).

12.2 Zeta Potensial. Diambil sebanyak 3 mL nanosuspensi kemudian zeta potensial diukur dengan menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) dan dilakukan sebanyak 3 replikasi (Bhatia, 2016).

12.3 Morfologi. *Transmission Electron Microscopy* (TEM) bekerja dengan mentransmisikan berkas elektron melalui spesimen tipis untuk menghasilkan gambar dengan resolusi tinggi. *Scanning Electron Microscopy* (SEM) menggunakan berkas elektron yang terfokus untuk memindai permukaan sampel dan menghasilkan gambar morfologi dengan perbesaran tinggi. Setelah itu, elektron-elektron ini mengenai layar fluoresen, yang menghasilkan cahaya ketika bersentuhan dengannya, sedangkan SEM yaitu melibatkan pemancaran elektron dari gun elektron, yang kemudian bergerak melalui lensa kondensasi. Setelah penguatan oleh kumparan, berkas elektron dipusatkan pada sampel oleh lensa objektif yang terletak di bagian bawah. Elektron yang memantul dari permukaan sampel dideteksi oleh detektor elektron yang dihamburkan dan detektor elektron sekunder, kemudian informasi ini diubah menjadi gambar yang ditampilkan pada layar (Julianto *et al.*, 2017).

12.4 pH. Pengujian pH sediaan nanosuspensi diukur menggunakan alat pH meter digital yang telah dikalibrasi dengan buffer pH 7,01 (Devirizanty *et al.*, 2021). Setelah dikalibrasi elektroda dicelupkan ke dalam sediaan nanosuspensi yang telah diencerkan dengan *aquadest*, perbandingan 1:10. Amati sampai muncul harga pH yang konstan. Rentang pH yang sesuai kulit yaitu pH 4,5-6,5 (Devirizanty *et al.*, 2021).

12.5 Viskositas. Pengukuran viskositas sediaan nanosuspensi dilakukan dengan menggunakan alat viskometer *Ostwald* dengan cara diambil 10 mL nanosuspensi dan dimasukkan kedalam alat viskometer *Ostwald*. Pompa dipasang pada ujung yang lain digunakan untuk memompa larutan sampai batas atas pipa. Lepaskan pompa dengan menghitung waktu alir sediaan nanosuspensi. Dibandingkan dengan larutan air dengan menggunakan rumus (Shavira *et al.*, 2021). Rumus untuk menghitung viskometer *Ostwald* sebagai berikut:

$$\eta = \eta_0 \frac{t \cdot \rho}{t_0 \cdot \rho_0}$$

Keterangan : η = viskositas cairan sampel

η_0 = viskositas cairan pembanding

t = waktu aliran cairan sampel

t_0 = waktu aliran cairan pembanding

ρ = massa jenis cairan sampel

ρ_0 = massa jenis cairan pembanding

12.6 Stabilitas Penyimpanan. Pengujian stabilitas suhu rendah dan tinggi dengan menyimpan sampel nanosuspensi ekstrak bunga nasturtium oranye pada suhu rendah 4°C dan suhu tinggi 30°C selama 4 minggu, kemudian dilakukan pengamatan ukuran partikel, polidispersitas, zeta potensial, pengukuran pH, morfologi, dan pengukuran viskositas dengan pengamatan setiap 1 minggu sekali (Iswandana *et al.*, 2017).

13. Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

Sebanyak 150 mg ekstrak bunga nasturtium oranye dilarutkan dengan etanol 70%, dimasukkan dalam labu takar 25 mL sampai tanda batas dan didapatkan larutan induk konsentrasi 6000 ppm. Dibuat dalam beberapa seri konsentrasi (2000 ppm, 1500 ppm, 1000 ppm dan 500 ppm) kemudian dipipet 100 μ L dan ditambahkan larutan DPPH sebanyak 1 mL, dimasukkan dalam labu takar 5 mL ditambahkan etanol 70% sampai tanda batas dan dihomogenkan. Inkubasi larutan tersebut sesuai *operating time* dan baca serapan panjang gelombang maksimal yang sudah ditentukan. Selanjutnya hitung nilai absorbansi yang diperoleh untuk menentukan % inhibisi. Persentase inhibisi radikal bebas DPPH dihitung dengan rumus berikut :

$$\text{In. DPPH (\%)} = \frac{(A \text{ blanko} - A \text{ sampel})}{A \text{ blanko}} \times 100\%$$

Ketrangan : A blanko = Absorbansi DPPH tanpa sampel

A sampel = Absorbansi sampel + DPPH

13.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimal. Pengujian aktivitas antioksidan pada sampel dilakukan penentuan panjang gelombang maksimal

dengan larutan DPPH. Larutan DPPH dibuat dengan menimbang serbuk DPPH sebanyak 15,8 mg kemudian dimasukkan dalam labu takar 100 mL yang sudah ditutupi *aluminium foil*, ditambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan DPPH 0,4 mM. Baca serapan larutan DPPH menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal yaitu 480-600 nm.

13.2 Pengukuran Serapan Sampel Kuersetin. Sebanyak 10 mg serbuk kuersetin dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas, dikocok hingga homogen dan diperoleh larutan induk baku pembanding 400 ppm, selanjutnya dibuat seri konsentrasi yaitu 140 ppm, 100 ppm, 70 ppm, dan 30 ppm. Masing-masing seri konsentrasi dipipet sebanyak 3,5 mL, 2,5 mL, 1,75 mL, 0,75 mL dimasukkan dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas. Selanjutnya diambil larutan seri konsentrasi masing-masing sebanyak 1 mL dalam labu takar 10 mL ditambahkan larutan DPPH sebanyak 1 mL kemudian ditambah dengan etanol p.a sampai tanda batas, dikocok hingga homogen. Inkubasi dalam tempat gelap selama *operating time* dan diukur absorpsi pada panjang gelombang yang sudah ditentukan sebelumnya.

13.3 Pengukuran Serapan Sampel Nanosuspensi Bunga Nasturtium (*Tropaeolum majus* L.). Sebanyak 6 formula dengan konsentrasi 6000 ppm dimasukkan dalam labu takar 50 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen, selanjutnya dibuat seri konsentrasi dan dipipet (1000 ppm sebanyak 1,6 mL, 500 ppm sebanyak 0,83 mL, 250 ppm sebanyak 0,41 mL dan 150 ppm sebanyak 0,25 mL) dimasukkan dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas. Selanjutnya diambil larutan seri konsentrasi masing-masing sebanyak 1 mL dalam labu takar 10 mL ditambahkan larutan DPPH sebanyak 1 mL kemudian ditambah dengan etanol p.a sampai tanda batas, dikocok hingga homogen. Inkubasi dalam tempat gelap selama *operating time* dan diukur absorpsi pada panjang gelombang yang sudah ditentukan sebelumnya.

E. Analisis Hasil

Analisis hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan SPSS. Analisis hasil dari pengujian parameter fisik sediaan nanosuspensi dilihat dari kesesuaian syarat baku yang menjadi ketentuan dari sediaan nanosuspensi, seperti mengacu pada hasil penelitian sebelumnya. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan data antar kelompok dibandingkan dengan metode *One Way ANOVA* ($p < 0,05$). Analisis hasil pengujian formulasi sediaan nanosuspensi dilakukan menggunakan *paired sampel t test* untuk pengujian masa penyimpanan ($p > 0,05$).