

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang berfokus pada pemanfaatan minyak biji anggur untuk diformulasikan menjadi sediaan nanoemulsi. Proses optimasi dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan tween 80 sebagai surfaktan, PEG 400 sebagai kosurfaktan yang dianalisis menggunakan metode *Simplex Lattice Design* melalui perangkat lunak *Design Expert*. Respon yang diamati dalam penelitian ini meliputi karakterisasi nanoemulsi, seperti ukuran droplet, *Indeks Polidispersitas* (PDI), % transmittan serta evaluasi aktivitas antioksidan yang dianalisis menggunakan metode DPPH (*1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil*) dengan parameter IC<sub>50</sub>.

#### B. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo sebagai lokasi utama. Proses penyiapan sampel minyak biji anggur serta skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam untuk mengidentifikasi kandungan senyawa aktif dalam sampel. Formulasi dan karakterisasi fisik nanoemulsi dilaksanakan di Laboratorium Teknologi, yang mencakup berbagai uji untuk memastikan stabilitas dan kualitas sediaan. Sementara itu, pengujian aktivitas antioksidan dari nanoemulsi dilakukan di Laboratorium Instrumen menggunakan metode yang sesuai guna menilai efektivitas antioksidan dalam sediaan yang dikembangkan.

### C. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan minyak biji anggur sebagai subjek utama.

Minyak biji anggur yang diperoleh dari PT. Saraswanti Indo Genetech yang diformulasikan menjadi sediaan nanoemulsi, yang dikembangkan melalui proses optimasi guna meningkatkan stabilitas, ketersediaan hayati, dan efektivitasnya dalam aplikasi farmasi.

### D. Definisi Operasional

Berikut ini adalah tabel yang menyajikan definisi operasional dari variable yang digunakan dalam penelitian ini. Definisi operasional terdapat pada tabel 3.1

**Tabel 3.1 Definisi Operasional**

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
1.	Tween 80	Tween sebagai surfaktan adalah senyawa nonionik yang berfungsi menurunkan tegangan antarmuka antara fase minyak dan fase air.	80	-	-	-
2.	PEG 400	PEG adalah kosurfaktan yang berfungsi membantu kerja surfaktan utama dalam menurunkan	400			

		tegangan antarmuka antara fase minyak dan air.				
3.	Ukuran partikel	Ukuran partikel adalah ukuran partikel dari nanoemulsi minyak biji anggur	Ukuran partikel diukur menggunakan metode <i>Partikel Size Analyzer</i> (PSA)	<i>Partic le Size Analyzer</i> (PSA)	Nanometer (nm)	Ukuran rata-rata partikel nanoemulsi
4.	% transmittan	% Transmittan adalah persentase cahaya yang diteruskan melalui nanoemulsi minyak biji anggur	Diukur dengan membandingkan daya radiasi cahaya yang diteruskan dengan yang diterima dalam kuvet	Spektr ofoto meter UV-Vis	Persentase (%)	Persentase transmittan cahaya yang melalui nanoemulsi
5.	PDI (Indeks Polidispersitas)	PDI adalah nilai yang menunjukkan distribusi ukuran partikel dalam nanoemulsi minyak biji anggur	Diukur menggunakan alat PSA yang menghasilkan nilai PDI	<i>Partic le Size Analyzer</i> (PSA)	0-1	Nilai PDI
6.	Organoleptis	Organoleptis adalah ciri fisik nanoemulgel kombinasi minyak biji	Observasi visual dan penciuman	Indra (mata dan hidung)	-	Hasil pengamatan organoleptis

		bunga matahari dan minyak atsiri jeruk nipis				
7.	pH	pH adalah tingkat keasaman nanoemulgel kombinasi minyak biji bunga matahari dan minyak atsiri jeruk nipis	pH meter	pH meter		Nilai pH
8.	Viskositas	Viskositas adalah tingkat kekentalan suatu cairan atau ukuran hambatan cairan untuk mengalir.	Viskometer <i>Brookfield</i>	Viskometer <i>Brookfield</i>		Nilai viskositas
9.	<i>Cycling Test</i>	<i>Cycling test</i> adalah uji stabilitas yang dilakukan dengan cara mengulang-ulang penyimpanan sampel pada dua kondisi suhu secara bergantian dalam	Climatic chamber	Climatic chamber	°C	Menentukan stabilitas

10. IC <sub>50</sub>	Nilai penghambatan 50% nanoemulsi dan nanoemulgel	DPPH	Spektr ofoto meter UV Vis	Rasio	% inhibisi
----------------------	---	------	---------------------------	-------	------------

## E. Variabel Penelitian

### 1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi variasi kombinasi surfaktan tween 80 dan kosurfaktan PEG 400.

### 2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah formula optimum nanoemulsi dengan parameter ukuran partikel, PDI, persen transmitan. Karakteristik nanoemulsi yang meliputi organoleptis, pH, viskositas, *cycling test*, dan aktivitas antioksidan yang diinterpretasikan dengan nilai IC<sub>50</sub>.

### 3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah formulasi dan prosedur pembuatan sediaan nanoemulsi, termasuk waktu dan kecepatan pengadukan.

## F. Pengumpulan Data

### 1. Alat

Alat yang digunakan yaitu neraca analitik (OHAUS), *magnetic stirrer* (Cimarex), seperangkat alat gelas (Pyrex, Iwaki), *Particle Size Analyzer* (PSA) (Malvern), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1900), pipet volume, *paleus*

ball, pipet tetes, ultra-turrax (IKA-T25), viskometer *Brookfield*, climatic chamber, pH meter (OHAUS), aluminium foil, spatula.

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak biji anggur (PT. Saraswanti Indo Genetech), Tween 80 (Farmasetis MKR), PEG 400 (Farmasetis MKR), gliserin (Farmasetis MKR), aquadest (Farmasetis MKR), DPPH (*2,2-diphenyl-picrylhydrazyl*) (Sigma aldric), etanol p.a (p.a, merck), kuersetin (Sigma aldric), serbuk Mg (p.a, merck), HCl pekat (p.a, merck), asam sulfat (p.a, merck), pereaksi Dragendorf (p.a, merck), FeCl 1% (p.a, merck), methanol (p.a, merck).

## G. Prosedur Penelitian

### 1. Formulasi

Formula sediaan nanoemulsi yang dimodifikasi dari penelitian (Priani, Wulansari *and* Darusman, 2021). Formula tersebut terdiri atas minyak biji anggur dengan konsentrasi 5% sebagai zat aktif, tween 80 dengan konsentrasi 7% sebagai surfaktan, PEG 400 dengan konsentrasi 25% sebagai kosurfaktan, dan gliserin dengan konsentrasi 32% sebagai humektan. Formula ini dibuat untuk menghasilkan nanoemulsi dengan kestabilan yang optimal. Formula sediaan nanoemulsi dapat dilihat pada tabel 3.2

**Tabel 3.2 Formula Sediaan Nanoemulsi**

<b>Bahan</b>	<b>Konsentrasi (%)</b>	<b>Kegunaan</b>
Minyak Biji Anggur	5	Zat aktif
Tween 80	7	Surfaktan
PEG 400	25	Kosurfaktan
Glicerin	32	Humektan

Selanjutnya, untuk memperoleh variasi komposisi surfaktan dan kosurfaktan yang tepat, dilakukan perancangan formula menggunakan *Design Expert*. Tabel 3.3 menyajikan formula nanoemulsi hasil rancangan *Design Expert* versi 13 dengan 8 kombinasi percobaan (*run*). Setiap run memvariasikan jumlah Tween 80 (komponen 1) dan PEG 400 (komponen 2) dalam konsentrasi berbeda, *run* 1 dan *run* 6 menggunakan 32,5% Tween 80 dan 7,5% PEG 400, *run* 2 dan *run* 2 menggunakan 30% Tween 80 dan 10% PEG 400, *run* 7 dan *run* 8 menggunakan 35% Tween 80 dan 5% PEG 400, *run* 3 menggunakan 31,25% Tween 80 dan 8,75% PEG 400, *run* 5 menggunakan 33,75% Tween 80 dan 7,5% PEG 400. Variasi konsentrasi digunakan untuk mengamati pengaruh perbandingan surfaktan dan kosurfaktan terhadap karakteristik nanoemulsi. Formulasi nanoemulsi dengan *design expert* dapat dilihat pada tabel 3.3.

**Tabel 3.3 Formulasi Nanoemulsi dengan *Design Expert* Versi 13 Trial**

<b>std</b>	<b>Run</b>	<b>Component 1 Tween 80</b>	<b>Component 2 PEG 400</b>
3	1	32,5	7,5
2	2	30	10
5	3	31,25	8,75
7	4	30	10
4	5	33,75	6,25
8	6	32,5	7,5
6	7	35	5
1	8	35	5

Selanjutnya, untuk menetapkan batasan konsentrasi yang digunakan dalam formulasi, peneliti menentukan nilai aras rendah dan aras tinggi dari masing-masing komponen. Tabel 3.4 menunjukkan nilai aras rendah dan aras

tinggi untuk surfaktan Tween 80 dan kosurfaktan PEG 400. Tween 80 digunakan pada kisaran konsentrasi 30–35%, dengan nilai aras rendah 30% dan aras tinggi 35%. PEG 400 digunakan pada kisaran konsentrasi 5–10%, dengan nilai aras rendah 5% dan aras tinggi 10%. Penetapan nilai batas konsentrasi berfungsi untuk memastikan bahwa formulasi yang diuji tetap berada pada rentang aman dan efektif selama proses optimasi. Aras rendah dan aras tinggi dapat dilihat pada tabel 3.4

**Tabel 3.4 Aras Rendah Aras Tinggi Surfaktan Tween 80, Kosurfaktan PEG 400**

<b>Bahan</b>	<b>Konsentrasi (%)</b>	<b>Aras rendah</b>	<b>Aras tinggi</b>
Tween 80	30 - 35	30	35
PEG 400	5 - 10	5	10

Berdasarkan batas konsentrasi tersebut, peneliti kemudian merancang beberapa kombinasi formula untuk melihat pengaruh perbedaan proporsi bahan terhadap karakteristik nanoemulsi. Tabel 3.5 menyajikan 8 run formula nanoemulsi minyak biji anggur yang dibuat dengan variasi konsentrasi Tween 80 dan PEG 400 sesuai metode Simplex Lattice Design. Setiap formula menggunakan minyak biji anggur (5%), Tween 80, PEG 400, gliserin (5%), dan aquadest ad 100% sebagai komponen penyusun. Formula F1 menggunakan Tween 80 sebanyak 31,25% dan PEG 400 sebesar 6,25%, F2 menggunakan Tween 80 sebanyak 33,75% dan PEG 400 sebesar 8,75%, F3 dan F8 menggunakan Tween 80 paling rendah yaitu 30% dengan PEG 400 sebesar 10%, F4 dan F7 menggunakan Tween 80 paling rendah yaitu 32,5%

dengan PEG 400 sebesar 7,5%, F5 dan F6 memiliki konsentrasi Tween 80 tertinggi yaitu 35% dengan PEG 400 sebesar 5%. Variasi konsentrasi ini dirancang untuk menentukan kombinasi yang menghasilkan karakteristik fisikokimia terbaik. Formulasi nanoemulsi minyak biji anggur dengan variasi tween 80, PEG 400 dan humektan *simplex lattice design* dapat dilihat pada tabel 3.5.

**Tabel 3.5 Formulasi Nanoemulsi Minyak Biji Anggur dengan Variasi Tween 80, PEG 400 dan Humektan *Simplex Lattice Design***

Konsentrasi (%)	Bahan				
	MBA	Tween 80	PEG 400	Gliserin	Aquadest ad
<b>F1</b>	5	33.75	6.25	5	100
<b>F2</b>	5	31.25	8.75	5	100
<b>F3</b>	5	30	10	5	100
<b>F4</b>	5	32.5	7.5	5	100
<b>F5</b>	5	35	5	5	100
<b>F6</b>	5	35	5	5	100
<b>F7</b>	5	32.5	7.5	5	100
<b>F8</b>	5	30	10	5	100

2. Optimasi formula dengan *Design Expert* metode *Simplex Lattice Design*

Optimasi formula dilakukan menggunakan software *Design Expert* 13 metode *Simplex Lattice Design* (SLD). Komponen yang akan dioptimasi yaitu minyak, surfaktan, dan kosurfaktan dengan total komponen bahan yaitu 40. Hasil olahan diperoleh 8 run dengan replikasi sebanyak 3 kali (Amara, Sari and Saputri, 2024).

Formula yang telah disiapkan selanjutnya diformulasikan menjadi nanoemulsi, kemudian dilakukan serangkaian pengujian untuk menentukan ukuran partikel, indeks polidispersitas (PDI), dan persen transmisi guna

menilai stabilitas dan homogenitas sediaan. Data hasil uji kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak *Design Expert* dengan metode *Simplex Lattice Design*, yang berfungsi untuk melakukan optimasi formulasi. Proses optimasi ini dilakukan dengan mengevaluasi 8 run percobaan guna memperoleh formula terbaik, yang ditentukan berdasarkan derajat *desirability* yang dihasilkan oleh sistem dalam perangkat lunak *Design Expert*.

### 3. Skrining fitokimia minyak biji anggur

#### a. Flavonoid

Sebanyak 2 mL minyak biji labu kuning ditambahkan 0,2 g bubuk logam Mg dan 3 tetes HCl pekat pada tabung reaksi, selanjutnya dikocok. Sampel mengandung flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Manongko, Sangi *and* Momuat, 2020).

#### b. Alkaloid

Sebanyak 2 mL minyak biji labu kuning ditambahkan 5 tetes asam sulfat 2N dalam tabung reaksi, kemudian dikocok hingga terbentuk dua lapisan. Fraksi asam diambil, kemudian ditambahkan pereaksi Dragendorff memberikan endapan berwarna kuning-merah (Diharmi, Ilza *and* Saputra, 2024).

#### c. Tanin

Sebanyak 2 mL minyak biji labu kuning ditambahkan 1 ml methanol dan 2 tetes  $\text{FeCl}_3$  1 % pada tabung reaksi. Sampel mengandung tanin bila terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman (Mulqie, 2022).

#### 4. Prosedur pembuatan nanoemulsi

Nanoemulsi dibuat dengan menggunakan metode rendah dan tinggi untuk menghasilkan campuran yang stabil dan homogen. Proses dimulai dengan memasukkan minyak biji anggur sebagai fase minyak ke dalam *beaker glass*. Minyak tersebut kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 300 rpm selama 5 menit pada suhu 50°C agar lebih merata. Setelah itu, Tween 80 ditambahkan ke dalam campuran dan kembali diaduk selama 5 menit, PEG 400 ditambahkan ke dalam campuran dan diaduk selama 5 menit, gliserin dimasukkan secara perlahan dan diaduk selama 5 menit hingga tercampur sempurna, aquadest sebanyak 50 mL kemudian ditambahkan secara sedikit demi sedikit, sambil terus diaduk untuk memastikan homogenitas larutan. Sebagai tahap akhir, campuran dihomogenkan kembali menggunakan *magnetic stirrer* dengan durasi 5 menit agar diperoleh nanoemulsi yang optimal dan stabil.

Proses pengadukan lanjutan menggunakan alat ultra-turrax untuk mengecilkan ukuran partikel dalam sediaan nanoemulsi. Pengadukan dilakukan dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit secara terus-menerus. Proses ini bertujuan untuk memperoleh ukuran partikel yang lebih kecil dan distribusi yang lebih merata, sehingga meningkatkan kestabilan serta efektivitas dari nanoemulsi yang dihasilkan. Penggunaan ultra-turrax juga membantu memperkuat interaksi antara fase minyak dan fase air (aquadest), sehingga menghasilkan sistem emulsi yang lebih homogen dan halus. (Ratnapuri *et al.*, 2022).

## 5. Karakteristik nanoemulsi

### a. Uji ukuran droplet

Uji ukuran partikel menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) untuk memastikan karakteristik dari sediaan nanoemulsi. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ukuran partikel dalam sediaan memenuhi standar yang telah ditetapkan, yaitu berada dalam rentang kurang dari 100  $\mu\text{m}$ . Melalui analisis ini, kestabilan dan homogenitas partikel nanoemulsi dapat dievaluasi guna mendukung efektivitas serta kualitas formulasi (Budiarto, Rochmah *and* Setiyabudi, 2021).

### b. Uji PDI

Uji ukuran partikel dan *indeks polidispersitas* pada nanoemulsi minyak biji anggur (*Vitis vinifera* L.) menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) untuk mengevaluasi karakteristik fisiknya. Sampel sebanyak 3 ml dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dianalisis oleh sinar laser PSA. PSA bekerja dengan cara memancarkan sinar laser ke partikel dalam sampel, kemudian mendeteksi hamburan cahaya menggunakan detektor foton pada sudut tertentu untuk menentukan ukuran partikel yang terkandung dalam preparat. Selain itu, analisis indeks polidispersitas dilakukan untuk menilai keseragaman distribusi ukuran partikel dalam sediaan (Sari, 2023). Nilai PDI yang mendekati 0 menunjukkan sebaran ukuran partikel yang homogen, artinya partikel dalam sediaan memiliki ukuran yang hampir seragam dan terdistribusi secara merata. Sebaliknya, nilai PDI yang melebihi 0,5 menunjukkan ukuran partikel yang heterogen, yaitu terdapat

variasi ukuran partikel yang cukup besar, sehingga menunjukkan bahwa sistem tidak stabil dan partikel mudah mengalami penggabungan atau agregasi (Suhesti *and* Muslimah, 2025).

c. Uji persen transmittan

Pengujian persen transmittan dilakukan untuk mengevaluasi kejernihan nanoemulsi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Sebanyak 1 ml sampel nanoemulsi diambil dan diencerkan dengan 100 mL akuades untuk memastikan konsentrasi yang sesuai. Campuran tersebut kemudian diaduk menggunakan vortex selama 1 menit hingga mencapai homogenitas sempurna. Setelah tercampur dengan baik, larutan dimasukkan ke dalam kuvet sebagai wadah pengukuran. Selanjutnya, transmittansi sampel diamati menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm untuk memperoleh data transparansi. Hasil pengujian ini akan digunakan untuk menilai kestabilan optik dari nanoemulsi yang diuji. Uji persen transmittan dilakukan mengetahui tingkat kejernihan sediaan nanoemulsi yang telah diformulasi. Hasil uji % transmittan yang baik mendekati 100% (Ma'arif *et al.*, 2023).

d. Uji organoleptis

Pengujian organoleptik dilakukan untuk mengevaluasi karakteristik fisik nanoemulsi setelah 24 jam penyimpanan. Proses ini melibatkan pengamatan terhadap perubahan warna, aroma, dan tingkat homogenitas sediaan. Peneliti secara visual menilai apakah terjadi perubahan warna pada

formulasi, mencium aroma untuk mendeteksi adanya perubahan bau, serta memeriksa homogenitas campuran guna memastikan kestabilan sistem emulsi. Hasil pengujian ini digunakan sebagai indikator awal untuk menilai kestabilan fisik dan kualitas nanoemulsi sebelum dilakukan analisis lebih lanjut (Widyastuti *and* Saryanti, 2023).

e. Uji pH

Pengukuran pH sampel menggunakan pH meter untuk menentukan tingkat keasaman atau kebasaan nanoemulsi. Sebelum pengukuran, elektroda dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan dapar standar dengan pH 4, 7, dan 10. Proses kalibrasi dianggap selesai ketika nilai pH yang tertera pada layar pH meter sesuai dengan nilai pH larutan dapar dan stabil. Setelah kalibrasi, elektroda dicelupkan ke dalam sampel nanoemulsi, lalu nilai pH yang terbaca dicatat dengan teliti. Seluruh proses pengukuran dilakukan pada suhu ruang untuk memastikan keakuratan hasil dan kestabilan sampel. pH yang memenuhi kulit manusia yaitu 4,5-8 (Sari *et al.*, 2020).

f. Uji viskositas

Pengukuran viskositas sediaan dengan menggunakan alat viskometer Brookfield RV (D 220) pada suhu ruang untuk mengetahui kekentalan formulasi. Sebanyak 50 mL sampel dituangkan ke dalam beaker glass sebagai media pengujian viskositas. Selanjutnya, viskometer diatur pada kecepatan putar sebesar 50 rpm dengan menggunakan spindel nomor 64 untuk memastikan pengukuran yang akurat. Hasil viskositas sampel

akan secara otomatis ditampilkan pada layar monitor viskometer dalam satuan cps (centipoise). Uji viskositas nanoemulsi yang baik memiliki nilai viskositas 10 - 2000 cps (Priani, Wulansari *and* Darusman, 2021).

g. *Cycling test*

Sampel nanoemulsi disimpan pada suhu dingin 4°C selama 24 jam sebagai tahap awal pengujian stabilitas. Setelah itu, sampel diganti dengan suhu panas 40°C dan disimpan kembali selama 24 jam. Kedua perlakuan suhu ini membentuk satu siklus pengujian stabilitas. Pengujian *cycling test* menggunakan alat climatic chamber. Siklus tersebut sebanyak enam kali untuk mengamati perubahan yang mungkin terjadi (Zubaydah *et al.*, 2023).

6. Uji antioksidan metode DPPH

a. Pembuatan larutan DPPH 40 ppm

Larutan DPPH dengan konsentrasi 40 ppm disiapkan melalui proses pelarutan 4 mg DPPH murni ke dalam 100 mL pelarut etanol p.a menggunakan labu takar agar volume terukur dengan presisi. Setelah larutan tercampur homogen, larutan disimpan dalam wadah tertutup rapat guna mencegah penguapan dan degradasi senyawa. Penyimpanan dilakukan di tempat yang gelap atau terlindung dari cahaya matahari langsung untuk menjaga kestabilan larutan dan mencegah oksidasi radikal DPPH yang sensitif terhadap cahaya (Suyatmi, Saleh *and* Pratiwi, 2021).

b. Penentuan Panjang gelombang serapan maksimum DPPH

Larutan diuji menggunakan spektrofotometer visibel pada rentang panjang gelombang 400 hingga 800 nm untuk mengukur nilai absorbansi,

guna mengetahui aktivitas antioksidan yang terjadi melalui penurunan intensitas warna ungu khas DPPH (Suhaela *et al.*, 2023).

c. Penentuan *Operating Time* (OT) 2 kalimat mL

Larutan DPPH 40 ppm dibaca absorbansinya pada Panjang gelombang maksimum menit ke 1 sampai menit ke 30. Pengukuran ini dilakukan dari menit ke-1 hingga menit ke-30 untuk mengetahui waktu optimal reaksi antara DPPH dan sampel (Suhaela *et al.*, 2023).

d. Pengukuran absorbansi larutan blanko

Larutan baku DPPH 40 ppm dipipet sebanyak 2 mL dan menambahkan etanol p.a sebanyak 1 mL untuk membuat larutan blanko DPPH. Setelah larutan tercampur homogen, diukur absorbansi larutan blanko pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Amara, Sari *and* Saputri, 2024).

e. Pembuatan larutan pembanding kuersetin

Sebanyak 10 mg kuersetin murni, yang digunakan sebagai senyawa pembanding, ditimbang secara teliti menggunakan timbangan analitik, lalu dilarutkan dalam pelarut etanol p.a hingga mencapai volume akhir 10 mL menggunakan labu ukur untuk memastikan keakuratan pengenceran. Dari proses ini diperoleh larutan induk kuersetin dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan baku kuersetin dipipet 1 mL dan menambahkan etanol p.a hingga volume mencapai 10 mL untuk mengencerkan larutan menjadi konsentrasi 100 ppm. Larutan 100 ppm dibuat konsentrasi sei konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan

5 ppm dengan memipet masing-masing volume 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 mL pada labu ukur 10 mL. Setelah itu, sebanyak 1 mL larutan kuersetin dari masing-masing konsentrasi dicampurkan dengan 2 mL larutan DPPH 40 ppm. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan dengan hati-hati dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil untuk menghindari paparan cahaya. Kemudian, larutan diinkubasi pada suhu ruang 25°C sesuai *operating time*. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh sebelumnya (Suyatmi, Saleh *and* Pratiwi, 2021).

f. Pengukuran aktivitas antioksidan minyak biji anggur

Sebanyak 25 mg minyak labu kuning ditimbang dan dicukupkan dengan etanol p.a pada labu ukur 25 mL sehingga didapat konsentrasi 1000 ppm. Larutan 1000 ppm dibuat seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm dengan memipet masing-masing 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mL ad dengan etanol p.a pada labu ukur 10 mL. Masing-masing seri diukur sebanyak 1 mL minyak biji anggur dan 2 mL larutan DPPH. Campuran dihomogenkan dan tutup dengan aluminium foil, diinkubasi sesuai *operating time* dengan suhu ruangan 25°C. Ukur absorbansi pada panjang gelombang yang telah diperoleh (Suyatmi, Saleh *and* Pratiwi, 2021).

g. Pengukuran aktivitas antioksidan nanoemulsi minyak biji anggur

Sebanyak 25 mg nanoemulsi minyak biji anggur ditimbang dan dicukupkan dengan etanol p.a pada labu ukur 25 mL sehingga didapat

konsentrasi 1000 ppm. Larutan 1000 ppm dibuat seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm. Campuran dihomogenkan dan tutup dengan alumunium foil, diinkubasi sesuai *operating time* dengan suhu ruangan 25°C. Setelah inkubasi selesai, nilai absorbansi masing-masing larutan diukur menggunakan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang optimum 517 nm, yang merupakan panjang gelombang maksimum serapan DPPH (Saputra *et al.*, 2024).

Hasil serapan larutan DPPH terhadap sampel dianalisis dan dinyatakan dalam persen inhibisi (IC<sub>50</sub>) berdasarkan persamaan yang telah ditentukan.

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

Semakin tinggi nilai IC<sub>50</sub>, semakin tinggi nilai aktivitas antioksidan (Pujiastuti and Ma'rifah, 2022).

## H. Analisis Data

Pengolahan data uji menggunakan software *Design Expert* versi 13 dengan menerapkan metode *Simplex Lattice Design* (SLD) untuk menentukan formula nanoemulsi yang optimal berdasarkan komposisi yang telah diuji. Analisis dilakukan dengan membandingkan hasil yang diperoleh terhadap spesifikasi standar yang telah ditetapkan. Parameter evaluasi meliputi karakteristik organoleptik, persen transmitan, nilai pH, viskositas, tipe nanoemulsi, ukuran partikel, *indeks polidispersitas* (PDI), serta aktivitas antioksidan. Hasil optimasi ini digunakan untuk memastikan bahwa formulasi nanoemulsi yang dikembangkan memenuhi kriteria yang diharapkan dalam aspek fisik, kimia, dan fungsional.

Aktivitas antioksidan sampel dinyatakan dalam persen inhibisi dan dihitung menggunakan persamaan:

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

Setelah memperoleh data persen inhibisi dari setiap konsentrasi sampel yang diuji, analisis dilanjutkan dengan perhitungan regresi linier untuk menentukan nilai  $IC_{50}$ . Dalam perhitungan ini, sumbu x merepresentasikan konsentrasi sampel dalam satuan ppm, sedangkan sumbu y menunjukkan persen inhibisi yang dihasilkan. Proses regresi linier dilakukan untuk menemukan hubungan matematis antara konsentrasi dan efektivitas inhibisi, sehingga dapat dihitung nilai  $IC_{50}$ , yaitu konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% aktivitas DPPH. Nilai ini menjadi indikator utama dalam menilai kekuatan aktivitas antioksidan suatu senyawa.  $IC_{50}$  sampel dan pembanding didapatkan dari persamaan:

$$Y = bx + a$$

Keterangan:

y = absorbansi atau garis regresi

a = slope

b = intersep

x = variabel bebas

Analisis data statistika menggunakan *IBM SPSS Statistics 20* secara deskriptif untuk hasil uji organoleptik dan tipe nanoemulsi guna mengevaluasi karakteristik visual dan stabilitas formulasi. Data yang diperoleh dari pengukuran ukuran partikel, *indeks polidispersitas* (PDI), serta persen transmitan selanjutnya

dianalisis menggunakan uji *One Sample T-Test* untuk membandingkan hasil eksperimen dengan prediksi yang dihasilkan oleh metode *Numerical Design Expert*. Hasil uji viskositas, pH, dan  $IC_{50}$  diuji statistika parametrik *One Way ANOVA* apabila data yang dihasilkan terdistribusi normal.