

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan digunakan adalah eksperimen laboratorium untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang paling baik pada biji *Carica pubescens* dengan variasi tiga pelarut air, air:etanol (1:1), dan air:etanol (2:1) menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri UV – Vis.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada 11 – 28 Maret 2025 di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia dan Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang, terletak di Jl. Besar Ijen No. 77C, Oro – Oro Dowo, Kecamatan Klojen, Kota Malang, Jawa Timur 65119

3.3 Alat dan bahan

3.3.1 Alat

Alat – alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah timbangan makro, loyang, oven, grinder, toples, ayakan 50 mesh, gelas beaker 50ml, gelas beaker 100ml, gelas arloji, spatula, batang pengaduk, neraca analitik, erlenmeyer, corong, labu bulat, hotplate, set reflux, cawan porselin, waterbath, aluminium foil, rotary evaporator, vial 10ml, blue tipe, mikropipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, labu takar 10ml, labu takar 100ml, pipet ukur 10ml, bulb, spektrofotometri UV, kuvet, gelas beaker 1000ml, dan kertas saring.

3.3.2 Bahan

Bahan – bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah biji carica pubescens, larutan DPPH, air, etanol 70%, metanol p.a, asam askorbat, dan aquades.

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji pepaya gunung (*Carica pubescens*) dari wilayah dataran tinggi Dieng Wonosobo, Jawa Tengah.

3.4.2 Sampel

Simplisia biji pepaya gunung *Carica pubescens* diperoleh dari wilayah dataran tinggi Dieng Wonosobo, Jawa Tengah dengan teknik pengambilan sampel yaitu *Simple Random Sampling* yang artinya semua biji buah pepaya gunung (*Carica pubescens*) mendapatkan kesempatan yang sama untuk menjadi sampel.

3.5 Variabel

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas (*Independent Variable*) merupakan variabel yang menjadi sebab akibat yang mempengaruhi suatu perubahan atau timbulnya variabel terikat (*dependent*). Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu variasi pelarut ekstraksi biji pepaya gunung (*Carica pubescens*) yaitu air, air:etanol (1:1), dan air:etanol (2:1).

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat (*Dependent Variable*) merupakan variabel yang menjadi sebab akibat atau dipengaruhi karena adanya variabel bebas (*independent*). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan yang diperoleh dalam ekstrak biji pepaya gunung (*Carica pubescens*).

3.6 Definisi operasional

Tabel 3. 1 Tabel definisi operasional

No	Variabel Penelitian	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur
1.	Aktivitas Antioksidan	Kemampuan senyawa dalam ekstrak air biji <i>Carica Pubescens</i> untuk menghambat proses oksidasi.	Metode DPPH dengan instrumen Spektrofotometer UV-Vis	Mengukur hasil nilai IC50 sampel	Nilai antioksidan
2.	Variasi pelarut ekstraksi biji buah pepaya gunung (<i>Carica pubescens</i>)	Variasi pelarut ekstraksi dari biji buah pepaya gunung (<i>Carica pubescens</i>) yang diperoleh dari wilayah dataran tinggi Dieng Wonosobo, Jawa Tengah.	Refluks	Mengukur hasil nilai rendemen ekstrak	Nilai rendemen ekstrak

3.7 Metode Penelitian

3.7.1 Pembuatan Simplisia dan Serbuk Biji *Carica pubescens*

Sebanyak 100 gram simplisia biji *Carica pubescens* dilakukan pengeringan kembali menggunakan metode pemanasan dengan oven pada suhu 60°C selama 1 jam. Biji *Carica pubescens* yang sudah kering dilakukan sortasi kering untuk menghilangkan pengotor. Kemudian dilakukan penyerbukan menggunakan grinder dan untuk menentukan ukuran serbuk disaring menggunakan mesh ukuran 50. Hasil serbuk disimpan ke dalam toples yang dilengkapi dengan silica gel.

3.7.2 Pembuatan Ekstrak Biji *Carica pubescens*

Pembuatan ekstrak biji *Carica pubescens* dilakukan dengan metode refluks yang diawali dengan menyiapkan set alat refluks seperti kondensor, hotplate, labu bulat, batu didih, dan lain sebagainya. Ekstraksi menggunakan perbandingan serbuk biji carica pubescens dan pelarut yakni 1 : 10 (Tapalina *et al.*, 2022). Serbuk biji *Carica pubescens* ditimbang sebanyak 15 gram ke dalam labu bulat. Ditambahkan pelarut sebanyak 150 ml. Dilakukan 3 kali replikasi ekstraksi. Ekstraksi refluks menggunakan batu didih dan dilakukan selama 3 jam (Yanti, 2022). Hasil ekstraksi didiamkan selama 10 menit kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat dituang ke dalam cawan porselin yang sudah diberi label. Pengentalan ekstrak menggunakan rotari evaporator dan waterbath hingga ekstrak mengental. Hasil masing – masing ekstrak ditimbang dan dihitung rendemen yang diperoleh dengan presentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan (Kemenkes RI, 2017). Kemudian dimasukkan ke dalam vial yang telah diberi label dan disimpan di tempat yang sejuk.

3.7.3 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH 50 ppm

DPPH ditimbang sebanyak 5 mg yang kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker. DPPH dilarutkan menggunakan metanol p.a sebanyak 30 ml. Kemudian dipindahkan ke dalam labu takar 100 ml dan ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas. Larutan DPPH dikocok perlahan hingga homogen sehingga diperoleh larutan DPPH 50 ppm (Tristantini *et al.*, 2016).

b. Pembuatan Kontrol Negatif

Larutan DPPH 50 ppm dipipet sebanyak 2 ml ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan metanol p.a sebanyak 2 ml dan dihomogenkan.

c. Pembuatan Kontrol Positif

Menyiapkan larutan induk asam askorbat sebesar 100 ppm dengan melarutkan 10 mg asam askorbat pada 100 ml metanol p.a. Kemudian dilakukan pengenceran menggunakan pelarut metanol p.a dengan membuat variasi konsentrasi 2ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm dan 6ppm (Badan Standarisasi Nasional, 2018).

d. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Air Biji *Carica Pubescens*

Menyiapkan larutan induk sampel sebesar 1000 ppm dengan melarutkan 100 mg ekstrak air biji *Carica pubescens* pada 100 ml metanol p.a. Kemudian dilakukan pengenceran menggunakan pelarut metanol p.a dengan membuat variasi konsentrasi 150 ppm, 250 ppm, 350 ppm, 450 ppm, dan 550 ppm (Badan Standarisasi Nasional, 2018).

e. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Air:Etanol (1:1) Biji *Carica Pubescens*

Menyiapkan larutan induk sampel sebesar 1000 ppm dengan melarutkan 100 mg ekstrak air:etanol (1:1) biji *Carica pubescens* pada 100 ml metanol p.a. Kemudian dilakukan pengenceran menggunakan pelarut metanol p.a dengan membuat variasi konsentrasi 150 ppm, 250 ppm, 350 ppm, 450 ppm, dan 550 ppm (Badan Standarisasi Nasional, 2018)

f. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Air:Etanol (2:1) Biji *Carica Pubescens*

Menyiapkan larutan induk sampel sebesar 1000 ppm dengan melarutkan 100 mg ekstrak air:etanol (2:1) biji *Carica pubescens* pada 100 ml metanol p.a. Kemudian dilakukan pengenceran menggunakan pelarut metanol p.a dengan membuat variasi konsentrasi 150 ppm, 250 ppm, 350 ppm, 450 ppm, dan 550 ppm (Badan Standarisasi Nasional, 2018)

g. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Sampel uji, kontrol negatif dan kontrol positif disiapkan masing – masing 2 ml larutan sampel dan 2 ml larutan DPPH 50 ppm. Kemudian dilakukan inkubasi selama 30 menit hingga terjadi perubahan warna dari aktivitas DPPH. Jika semua elektron DPPH berpasangan dengan elektron pada sampel ekstrak maka akan terjadi perubahan warna sampel mulai dari ungu tua hingga kuning terang. Pengujian dilakukan menggunakan spektrofotometri UV – Vis dengan panjang gelombang 517 nm. Seluruh reaksi dilakukan pada tempat gelap. Kemudian hasil yang diperoleh dicatat nilai absorbansinya (Tristantini *et al.*, 2016).

3.8 Cara Pengolahan dan Analisis Data

3.8.1 Analisis Data

a. Penentuan Persen Inhibisi

Nilai absorbansi yang telah didapatkan (sampel, kontrol negatif, dan kontrol positif) dihitung sebagai persen inhibisi (%inhibisi) dengan rumus sebagai berikut (Tapalina *et al.*, 2022).

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

b. Penentuan Nilai IC50

Penggambaran besar konsentrasi antioksidan dari ekstrak sampel uji yang dapat menangkap radikal sebesar 50% biasa disebut dengan nilai IC50. Nilai ini dapat dihitung menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh dengan memasukkan besarnya konsentrasi sampel uji sebagai sumbu x (absis) dan nilai %inhibisi sebagai sumbu y (ordinat). Dari data tersebut akan diperoleh persamaan regresi linier yang menghasilkan nilai koefisien relasi (R) yakni sebagai berikut (Tapalina *et al.*, 2022).

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y = Nilai IC50

x = Konsentrasi Larutan Sampel

a = Intersep

b = Slope

3.8.2 Pengolahan Data

Pengolahan data dari penelitian ini berupa pengolahan data nilai rendemen ekstrak, nilai % inhibisi dan nilai IC50 ekstrak sampel serta kontrol positif (asam askorbat).

3.8.3 Penyajian Data

Data hasil penelitian yang diperoleh akan disajikan dalam bentuk tabel dan pembahasan serta diambil kesimpulan apakah dalam ekstrak air biji pepaya gunung (*Carica pubescens*) terdapat kandungan antioksidan.

Tabel 3. 2 Tabel Nilai Absorbansi dan % Inhibisi Asam Askorbat (Kontrol Positif)

Sampel ID	Konsentrasi	Absorbansi			%Inhibisi (%)		
		1	2	3	1	2	3
Blanko							
Asam Askorbat (Kontrol positif)							
Ekstrak Sampel							

Tabel 3. 3 Tabel keterkaitan nilai IC50 terhadap Sifat Antioksidan

Sampel ID	Nilai IC50	Sifat Antioksidan
Kontrol positif (Asam Askorbat)		
Ekstrak Sampel		