

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang akan digunakan adalah deskriptif kuantitatif untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada biji *Carica pubescens* dengan pelarut etil asetat menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri UV – Vis.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 30 September – 18 Oktober 2024 di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia dan Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang yang terletak di Jl. 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, kertas saring, set refluks (labu bulat, hotplate, kondensor, selang, dan lain sebagainya), batu didih, rotary evaporator, cawan porselin, waterbath, alumunium foil, vial 10ml, blue tipe, mikropipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, labu takar 10ml, labu takar 100ml, pipet ukur 10ml, bulb, kuvet, spektrofotometri UV – Vis, gelas beaker 1000ml, dan tisu.

##### **3.3.2 Bahan**

Bahan – bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah biji *Carica pubescens*, larutan DPPH, etil asetat p.a, metanol p.a, asam askorbat, aquades.

#### **3.4 Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji buah *Carica pubescens* dari wilayah dataran tinggi Dieng Wonosobo, Jawa Tengah. Teknik sampling yang digunakan untuk pengambilan sampel pada penelitian ini yaitu

*Simple Random Sampling* yang artinya semua biji buah *Carica pubescens* mendapatkan kesempatan yang sama untuk menjadi sampel.

### 3.5 Definisi Operasional

**Tabel 3. 1** Tabel Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Metode Ukur	Alat Ukur	Skala Ukur
1.	Waktu Ekstraksi	Lama ekstraksi pada proses ekstraksi biji <i>Carica pubescens</i>	Ekstraksi Refluks	Jam	Rasio
2.	Rendemen Ekstrak Etil Asetat Biji <i>Carica pubescens</i>	Hasil perbandingan berat ekstrak etil asetat biji <i>Carica pubescens</i> dengan jumlah serbuk simplisia	Metode Refluks	Neraca analitik dan kalkulator	Rasio
3.	Aktivitas Antioksidan	Kemampuan suatu antioksidan dalam menghambat radikal bebas(A. . Pratiwi et al., 2023)	Metode DPPH	Spektrofotometer UV – Vis, kalkulator, laptop, dan microsoft excel	Rasio

## **3.6 Metode Penelitian**

### **3.6.1 Ekstraksi**

#### **1. Pembuatan Serbuk Simplisia Biji *Carica pubescens***

Sebanyak 200 gram simplisia biji *Carica pubescens* dilakukan sortasi kering untuk menghilangkan pengotor. Kemudian dilakukan pengeringan menggunakan metode pemanasan dengan oven pada suhu 60°C hingga simplisia kering. Pembuatan serbuk simplisia dilakukan dengan cara digrinder dan diayak dengan ayakan No. 50 mesh. Serbuk simplisia yang sudah diayak disimpan ke dalam toples yang dilengkapi silika gel (Islamiyati et al., 2024).

#### **2. Pembuatan Ekstrak Biji *Carica pubescens***

Sebanyak 15 gram serbuk simplisia *Carica pubescens* dimasukkan ke dalam labu alas bulat refluks tambahkan 150 ml pelarut etil asetat (1 : 10) antara sampel dan pelarut (Tapalina et al., 2022). Kemudian refluks dengan suhu 60°C selama 120 menit, 150 menit, dan 180 menit menggunakan batu didih. Proses tersebut dilakukan 3 kali replikasi. Hasil ekstraksi masing – masing replikasi didiamkan selama 10 menit dan disaring menggunakan kertas saring. Ekstrak cair dipisahkan dari pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 60°C. Hasil dari proses tersebut dipindahkan ke dalam cawan porselin yang sudah diberi label. Pemekatan ekstrak menggunakan waterbath hingga diperoleh ekstrak kental. 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.

### **3.6.2 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH**

#### **1. Pembuatan Larutan DPPH 50ppm**

Sebanyak 5 mg DPPH dimasukkan ke dalam gelas beaker dan dilarutkan dengan 30 ml metanol p.a. Kemudian dipindahkan ke dalam labu takar 100ml dan ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas. Larutan DPPH dikocok perlahan hingga homogen (Tristantini et al., 2016).

## 2. Pembuatan Blanko

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

## 3. Pembuatan Larutan Pembanding

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

## 4. Pembuatan Larutan Uji

### - Pembuatan Larutan Uji Stok 30.000 ppm

Sebanyak 3.000 mg ekstrak etil asetat biji *Carica pubescens* dilarutkan dengan 50 ml metanol p.a. Larutan tersebut disaring dan dipindahkan ke dalam labu takar 100 ml dan ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas. Larutan uji stok dikocok perlahan hingga homogen(Badan Standarisasi Nasional., 2018).

### - Pembuatan Larutan Uji Seri

Larutan uji stok 30.000 ppm dilakukan pengenceran menggunakan metanol p.a dengan membuat variasi konsentrasi 9.000 ppm, 12.000 ppm, 15.000 ppm, 18.000 ppm dan 21.000 ppm. Larutan uji stok dipipet sebanyak 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, dan 7 ml ke dalam masing – masing labu takar 10ml yang telah diberi label. Kemudian ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas dan dikocok perlahan hingga homogen(Badan Standarisasi Nasional., 2018).

## 5. Pengujian Antioksidan menggunakan Metode DPPH

Larutan pembanding dan larutan uji masing – masing konsentrasi dipipet sebanyak 2 ml ke dalam tabung reaksi yang telah diberi label. Kemudian ditambahkan masing – masing 2 ml larutan DPPH 50 ppm. Larutan tersebut dilakukan inkubasi selama 30 menit hingga terjadi perubahan warna dari aktivitas DPPH. Jika semua elektron DPPH berpasangan dengan elektron pada sampel maka akan terjadi perubahan warna sampel mulai dari ungu tua hingga

kuning terang. Blanko, larutan pembanding dan larutan uji dimasukkan ke dalam kuvet. 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).

#### 6. Penentuan Persen Inhibisi

Nilai absorbansi yang telah didapatkan dari pengujian (blanko , larutan pembanding, dan larutan uji) dihitung sebagai %inhibisi dengan rumus sebagai berikut.

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

Keterangan :

$A_{\text{blanko}}$  = Absorbansi blanko

$A_{\text{sampel}}$  = Absorbansi sampel

#### 7. Penentuan Nilai IC<sub>50</sub>

Penggambaran besar konsentrasi antioksidan dari ekstrak sampel uji yang dapat menangkap radikal sebesar 50% biasa disebut dengan nilai IC<sub>50</sub>. 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 IC<sub>50</sub>

x = Kosentrasi Larutan Sampel

a = Intersep

b = Slope

### 3.7 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

Pengolahan data yang dilakukan adalah mengolah data rendemen dan aktivitas antioksidan dari ekstrak etil asetat biji *Carica pubescens*. Penimbangan hasil ekstrak etil asetat dibagi dengan penimbangan sampel simplisia untuk memperoleh %rendemen. Aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat biji buah pepaya gunung (*Carica pubescens*) pada suhu 120 menit, 150 menit dan 180 menit dari tiga replikasi diuji menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri UV – Vis. Data yang diperoleh berupa nilai absorbansi yang dilakukan perhitungan %inhibisi sebagai nilai konsentrasi perhitungan nilai IC<sub>50</sub>. Penyajian data yang diperoleh menggunakan tabel untuk mempermudah penentuan aktivitas antioksidan ekstrak biji *Carica pubescens*. Kemudian dilakukan perbandingan pengaruh waktu ekstraksi refluks didasarkan pada perolehan data hasil aktivitas antioksidan dari masing – masing variasi waktu ekstraksi yang digunakan.

**Tabel 3. 2** Rendemen Ekstrak Etil Asetat Biji *Carica pubescens*

Sampel : Ekstrak Etil Asetat Biji <i>Carica pubescens</i>						
t <sub>e</sub> (menit)	Rep	M <sub>0</sub> (gram)	M <sub>1</sub> (gram)	M <sub>2</sub> (gram)	%Re (%)	$\bar{x}$ %Re (%)
120	1					
	2					
	3					
150	1					
	2					
	3					
180	1					
	2					
	3					

Keterangan :

t<sub>e</sub> = Waktu Ekstraksi

Rep = Replikasi

M<sub>0</sub> = Berat Cawan Kosong

M<sub>1</sub> = Berat Simplisia

M<sub>2</sub> = Berat Cawan Kosong + Ekstrak

%Re = %Rendemen

$\bar{x}$ %Re = Rata – Rata %Rendemen

**Tabel 3. 3** Nilai Absorbansi dan %Inhibisi Larutan Pembanding

Sampel ID	Konsentrasi	Absorbansi	%Inhibisi (%)
Blanko			
Larutan Pembanding			

**Tabel 3. 4** Nilai Absorbansi dan %Inhibisi Ekstrak Etil Asetat Biji *Carica pubescens*

Sampel ID	Konsentrasi	Absorbansi			%Inhibisi (%)		
		1	2	3	1	2	3
B	-						
LU.120	9000 ppm						
	12000 ppm						
	15000 ppm						
	18000 ppm						
	21000 ppm						
B	-						
LU.150	9000 ppm						
	12000 ppm						
	15000 ppm						
	18000 ppm						
	21000 ppm						
B	-						
LU.180	9000 ppm						
	12000 ppm						
	15000 ppm						
	18000 ppm						
	21000 ppm						

Keterangan :

B = Blanko

LU.120 = Larutan uji dengan waktu ekstraksi sampel 120 menit

LU.150 = Larutan uji dengan waktu ekstraksi sampel 150 menit

LU.180 = Larutan uji dengan waktu ekstraksi sampel 180 menit

**Tabel 3. 5** Hasil Nilai IC<sub>50</sub>

Sampel ID	Rep	Persamaan	R2	Nilai Y	Nilai X atau IC <sub>50</sub>	Rata – Rata IC <sub>50</sub>
LP	-					
LU.120	1					
	2					
	3					
LU.150	1					
	2					
	3					
LU.180	1					
	2					
	3					

Keterangan :

LP = Larutan Pembanding

LU.120 = Larutan uji dengan waktu ekstraksi sampel 120 menit

LU.150 = Larutan uji dengan waktu ekstraksi sampel 150 menit

LU.180 = Larutan uji dengan waktu ekstraksi sampel 180 menit

**Tabel 3. 6** Sifat Antioksidan berdasarkan Nilai IC<sub>50</sub>

Sampel ID	Nilai IC <sub>50</sub>	Sifat Antioksidan
Larutan Pembanding		
Sampel		

**Tabel 3. 7** Keterkaitan Nilai IC<sub>50</sub> terhadap Sifat Antioksidan

Sampel ID	Nilai IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Sifat Antioksidan
LP		
LU.120		
LU.150		
LU.180		

Keterangan :

LP = Larutan Pembanding

LU.120 = Larutan uji dengan waktu ekstraksi sampel 120 menit

LU.150 = Larutan uji dengan waktu ekstraksi sampel 150 menit

LU.180 = Larutan uji dengan waktu ekstraksi sampel 180 menit