BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan digunakan adalah penelitian eksperimental untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada biji *Carica pusbescens* dengan pelarut n - heksan menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri Uv – Vis.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada 30 September – 18 Oktober 2024 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.

3.3 Populasi dan Sampling

3.3.1 Populasi

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

3.3.2 Sampling

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.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 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, spatula, neraca analitik, erlenmeyer, corong, labu bulat, hotplate, set refluks, cawan porselin, waterbath, alumunium foil, rotary evaporator, vial 10ml, blue tipe, mikropipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, labu takar 10ml, labu takar 100ml, piepet ukur 10ml, bulb, spektrofotometri UV, kuvet, gelas beaker 1000ml, kertas saring dan sonikator.

3.4.2 Bahan

Bahan – bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah biji carica pusbescens, larutan DPPH, n – heksan p.a, metanol p.a, asam askorbat, aquades.

3.5 Variabel Penelitian

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 waktu yang digunakan dalam proses ekstraksi metode refluks.

3.5.2 Variabel Dependet (Terikat)

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas (independen). Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu aktivitas antioksidan yang diperoleh dalam ekstrak h-heksan sampel biji buah pepaya gunung (*Carica pubescens*).

3.6 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 *Carica pubescens*	Ekstraksi Refluks	Jam	Rasio
2.	Rendemen Ekstrak N-Heksan Biji *Carica pubescens*	Hasil perbandingan berat ekstrak n-heksan biji *Carica pubescens* dengan jumlah serbuk simplisia	Metode Refluks	Neraca analitik dan kalkulator	Rasio

3.	Aktivitas antioksidan	Kemampuan senyawa kimia yang terdapat dalam biji buah pepaya gunung (*Carica pubescens*) yang dapat menghambat radikal bebas	Metode DPPH	Spektrofotometer UV – Vis, kalkulator, laptop, dan microsoft excel	Rasio

3.7 Metode Penelitian

3.7.1 Pembuatan Simplisia dan Serbuk Biji *Carica Pubescens*

Sebanyak 100 gram simplisia biji *Carica pubescens* dilakukan pengeringan menggunakan metode pemanasan dengan oven pada suhu 60°C hingga diperoleh biji *Carica pubescens* kering . Biji *Carica pubescens* yang sudah kering dilakukan sortasi kering untuk menghilangkan pengotor. Kemudian dilakukan penyerbukan menggunakan grinder dan untuk menentukan ukuran serbuk diayak menggunakan mesh ukuran 50. Hasil serbuk disimpan ke dalam toples yang dilengkapi dengan silica gel (Islamiyati et al.,2024).

3.7.2 Pembuatan Ekstrak Biji *Carica Pubescens* Metode Refluks

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 n – heksan sebanyak 150ml dan dilakukan 3 kali replikasi. Ekstraksi refluks menggunakan batu didih dan dilakukan selama 120 menit, 150 menit, dan 180 menit. Hasil ekstraksi didiamkan selama 10 menit kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat dituang kedalam labu bulat rotary evaporator dan diuapkan dengan suhu sesuai dengan titik didih pelarut. Hasil dari proses tersebut dipindahkan ke dalam cawan porselin yang sudah diberi label. Pengentalan ekstrak

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

b. Pembuatan Kontrol Negatif

Larutan DPPH 50ppm dipipet sebanyak 2ml ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan metanol p.a sebanyak 2ml 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 pada labu 10 ml (Badan Standarisasi Nasioanal., 2018).

d. Pembuatan Larutan Uji Stok 150000 ppm

- Larutan Uji Ekstrak N-Heksan Biji *Carica Pubescens*

Sebanyak 3.750 mg ekstrak n-heksan yang dilarutkan dengan metanol p.a secukupnya. Kemudian disaring dalam labu ukur 25 ml dan ditandabataskan dengan metanol p.a.

e. Pembuatan Larutan Seri

Larutan uji induk 150000 ppm dilakukan pengenceran menggunakan pelarut metanol p.a dengan variasi konsentrasi 30000 ppm, 60000 ppm, 90000 ppm, 120000 ppm, dan 150000 ppm. Pemipetan dilakukan secara bertingkat sebanyak 5; 6,67; 7,5; dan 8ml.

f. Pengujian Antioksidan menggunakan Metode DPPH

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).

g. 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).

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

h. 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 koofesien relasi (R) yakni sebagai berikut (Tapalina et al., 2022).

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y = Nilai IC50

x = Kosentrasi Larutan Sampel

a = Intersep

b = Slop

3.8 Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data

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

Data hasil penelitian yang diperoleh akan disajikan dalam bentuk tabel dan pembahasan serta diambil diambil kesimpulan apakah ekstrak n-heksan eefektif untuk penentuan aktivitas antioksidan.

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

Sampel ID	**Konsentrasi**	**Absorbansi**	**%Inhibisi (%)**
Blanko			
Asam Askorbat (Kontrol positif)			

Tabel 3. 3 Absorbansi dan %Inhibisi Ekstrak Biji Carica Pubescens Pelarut N-Heksan

Sampel ID	**Konsentrasi**	**Absorbansi**			**%Inhibisi (%)**		
		1	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
Blanko							
Larutan Uji 120 menit							
Blanko							
Larutan Uji 150 menit							

Blanko							
Larutan Uji 180 menit							

Tabel 3. 4 Keterkaitan nilai IC50 terhadap Sifat Antioksidan

Sampel ID	**Nilai IC50**	**Sifat Antioksidan**
Blanko		
Kontrol positif		
Ekstrak sampel		