

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental untuk mengevaluasi pengaruh variasi konsentrasi ekstrak metanol biji pepaya terhadap sifat fisik gel *peel-off* dan aktivitas pengangakan radikal bebas ABTS.

B. Lokasi Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan di bulan Agustus 2023 hingga bulan November 2023, yang bertempat di Laboratorium Kimia Farmasi dan Teknologi Farmasi, Prodi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Populasi Sampel

1. Populasi

Penelitian ini menggunakan biji pepaya (*Carica pepaya* L.) yang diambil dari padukuhan Bungas, Kelurahan Suberagung, Kapanewon Jetis, Kab. Bantul, DIY. Lokasi tersebut merupakan perkebunan pepaya dengan spesies (*Carica pepaya* L.)

2. Sampel

Sampel uji yaitu biji pepaya (*Carica pepaya* L.) yang diambil secara random atau acak dari dalam buah pepaya yang sudah matang.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variasi konsentrasi ekstrak metanol biji pepaya (*Carica pepaya* L.).

2. Variabel terikat

Sifat fisik gel *peel-off* (organoleptis, homogenitas, pH, daya sebar, daya lekat, waktu mengering, iritasi) dan nilai IC₅₀

3. Variabel terkendali

Suhu pengeringan ekstrak pada oven, waktu ekstraksi, suhu pengembangan gel, dan kecepatan pengadukan.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak metanol biji pepaya (*Carica pepaya* L.) merupakan suatu cairan kental yang diperoleh dengan melarutkan serbuk dalam pelarut metanol melalui proses maserasi, kemudian dilakukan proses penguapan.
2. Gel *peel-off* merupakan sediaan semi padat yang berbentuk gel dan diaplikasikan ke kulit wajah.
3. IC₅₀ adalah parameter yang menunjukkan konsentrasi terendah senyawa antioksidan yang bisa meredam radikal bebas ABTS.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Bejana, *rotary evaporator*, batang pengaduk, oven, spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-Vis), grinder simplisia, timbangan analitik (Ohaus), *hotplate* (IKA C-MAG HS 7), mikropipet (*Ependroff*), tabung reaksi, rak tabung reaksi, ayakan 60 mesh dan alat gelas lainnya.

2. Bahan

Biji pepaya, metanol (p.a), serbuk ABTS (p.a), AlCl₃, HPMC, PVA, metil paraben, propil paraben, gliserin, kuersetin (Sigma Aldrich), kertas saring, aluminium foil, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendrof, pereaksi Mayer, HCl 2N, dan FeCl₃.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Biji pepaya dideterminasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi ini dilakukan untuk

memastikan keaslian dari simplisia biji pepaya yang akan digunakan dalam penelitian.

2. Persiapan Sampel

1 kg biji pepaya yang sudah diambil dari buahnya disortasi basah dengan cara memisahkan kotoran yang ikut dari dalam buah pepaya seperti selaput yang masih terbawa dari dalam buah pepaya. Biji pepaya dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan sisa kotoran yang menempel. Biji pepaya yang telah disortir, dikeringkan dengan oven pada suhu 45°C. Selanjutnya biji pepaya yang telah kering dihaluskan menggunakan grinder sampai diperoleh serbuk biji pepaya. Serbuk tersebut diayak dengan ayakan nomor 40 mesh (Christalina et al., 2013).

3. Pembuatan Ekstrak Biji Pepaya

Sebanyak 200 g serbuk biji pepaya dimaserasi dengan metanol sebanyak 2 L selama 3x24 jam. Setiap hari bejana yang berisi maserat diaduk dan selanjutnya hasil maserasi disaring, dan didapatkan filtrat 1. Ampas diremaserasi dengan 1 L metanol dan didiamkan selama 1x24 jam dengan sesekali diaduk. Hasil remaserasi disaring dan diperoleh filtrat 2. Selanjutnya kedua filtrat dicampur dan dipisahkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 45°C untuk memperoleh ekstrak kental. Rendemen dapat dihitung berdasarkan ekstrak kental yang diperoleh. Perhitungan rendemen dilakukan menggunakan persamaan 1 (Safitri et al., 2022).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat serbuk simplisia}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

4. Karakterisasi Ekstrak Metanol Biji Pepaya

a. Uji organoleptis

Pengamatan dilakukan terhadap bentuk, warna dan aroma ekstrak (Istiana et al., 2021).

b. Uji *Moisture content*

1 g ekstrak ditimbang dan dimasukkan dalam cawan aluminium pada *moisture analyzer*. Suhu diatur menjadi 105°C. Nilai kadar air akan keluar pada alat saat pengujian telah selesai (Cheiya et al., 2023).

c. Uji pH

1 g ekstrak biji pepaya dilarutkan dalam 10 mL akuades. Lalu pH diukur menggunakan kertas indikator pH universal (Slamet et al., 2020).

d. Skrining fitokimia

1) Uji flavonoid

50 mg ekstrak biji pepaya dilarutkan dengan 100 mL air panas, dalam tabung reaksi dan dipanaskan selama ± 5 menit. Larutan ditambahkan 50 mg magnesium dan 1 mL HCl 2N. Perubahan larutan menjadi berwarna merah menunjukkan adanya flavonoid (Umami et al., 2021).

2) Uji fenolik

50 mg ekstrak biji pepaya dilarutkan dengan 10 mL akuades. Larutan disaring kemudian di panaskan selama 5 menit. 5 mL filtrat diambil dan ditambahkan 10 tetes FeCl_3 1%. Hasil berupa warna hitam pekat menunjukkan adanya fenolik (Fauzi'ah & Wakidah, 2019).

3) Uji tanin

50 mg ekstrak biji pepaya dilarutkan ke dalam 5 mL air. 2 mL larutan diambil, lalu ditambahkan 2 tetes FeCl_3 10%. Hasil positif mengandung tanin jika terjadi perubahan warna biru tua atau hitam kehijauan pada larutan (Fitriyanti et al., 2020).

4) Uji alkaloid

0,5 g ekstrak biji pepaya ditambahkan dengan 9 mL akuades dan 1 mL HCl 2N. Larutan dipanaskan selama 2 menit dan disaring, disiapkan 3 tabung reaksi yang berisi masing-masing 3 tetes larutan. Masing-masing tabung ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, Dragendorf dan Wagner. Hasil berupa endapan putih atau kuning pada penambahan pereaksi Mayer menunjukkan adanya alkaloid. Hasil berupa endapan kuning jingga pada penambahan pereaksi Dragendorf menunjukkan adanya alkaloid. Hasil berupa perubahan warna cokelat

kemerahan pada penambahan pereaksi Wagner menunjukkan adanya alkaloid (Liling et al., 2020).

5) Uji saponin

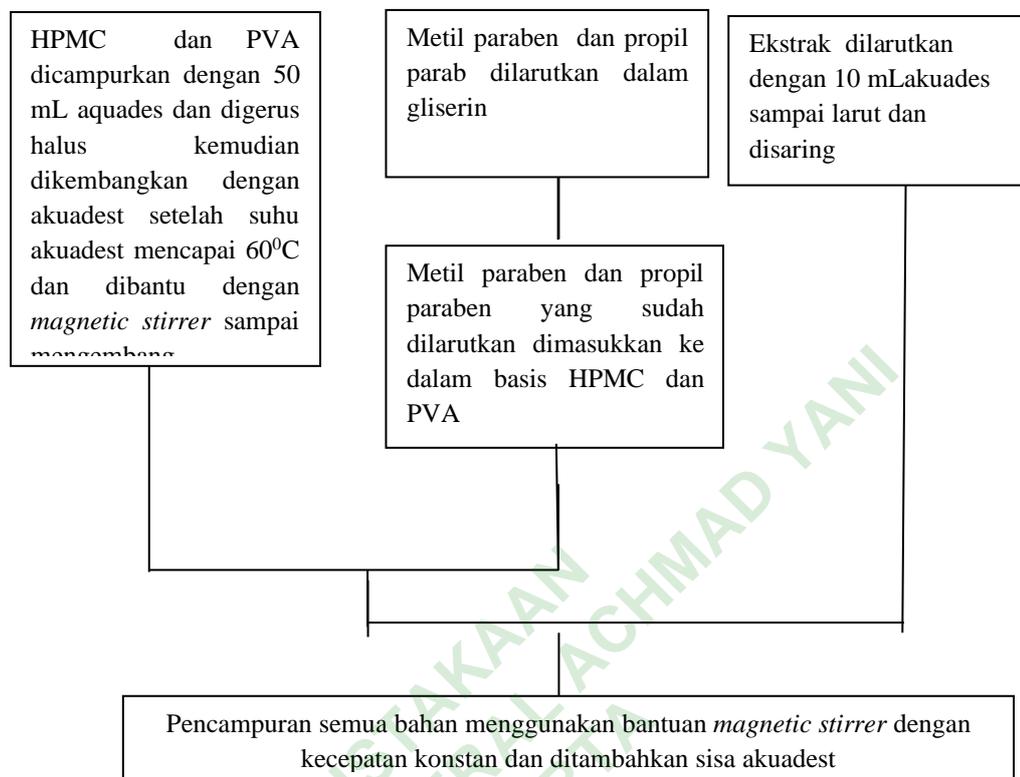
50 mg ekstrak ditambahkan 10 mL akuades ke dalam tabung reaksi. Tabung digojok selama 10 detik, dan akan menghasilkan busa 1-10 cm. HCl 2N ditambahkan 1 tetes ke dalam tabung. Hasil positif mengandung saponin apabila busa tersebut tidak hilang (Liling et al., 2020).

5. Formulasi Ekstrak Metanol Biji Pepaya

Variasi konsentrasi ekstrak biji pepaya yang digunakan adalah 0,25 g, 0,5 g, dan 0,75 g. Pemilihan konsentrasi ekstrak tersebut berdasarkan hasil dari penelitian Safitri dkk., (2022). Modifikasi formula ini pada bagian konsentrasi ekstrak formula 3 peneliti Safitri dkk., (2022) menggunakan konsentrasi 1%, pada penelitian ini menggunakan konsentrasi 0,75%. Gel yang dibuat terdiri dari 3 formula gel dengan variasi konsentrasi ekstrak biji pepaya dan 1 formula gel sebagai kontrol. Formula gel biji pepaya yang digunakan mengacu pada penelitian dari Safitri dkk (2022) yang ditunjukkan pada Tabel 2. Pembuatan gel ekstrak biji pepaya dapat dilihat pada Gambar 6.

Tabel 2. Formula Masker Gel *Peel-off* ekstrak Biji Pepaya
(Safitri et al., 2022)

Bahan	Konsentrasi (% b/b)			
	F0	F1	F2	F3
Ekstrak Biji Pepaya	-	0,25	0,5	0,75
HPMC	4	4	4	4
PVA	8	8	8	8
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02
Gliserin	11	11	11	11
Akuades	100	100	100	100



Gambar 6. Prosedur Pembuatan Masker Gel *Peel-off* Biji pepaya

6. Uji sifat fisik

Pengujian fisik yang dilakukan pada masker gel *peel-off* sebagai berikut :

a) Uji organoleptik

Pengamatan bentuk, warna, dan aroma dilakukan terhadap sediaan. Parameter standar gel yang baik adalah bentuknya yang kental, warna bening/transparan dan bau (Istiana et al., 2021).

b) Uji homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan dengan mengamati keseragaman susunan gel dengan cara mengoleskan sediaan pada kaca objek. Homogenitas ditunjukkan dengan ada tidaknya butiran kasar dalam sediaan gel tersebut (Istiana et al., 2021).

c) Uji pH

Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan pH meter, dengan cara 1 g sediaan gel dilarutkan dengan akuades 10 mL, kemudian kertas

indikator pH dicelupkan dan hasil pH yang didapatkan dicatat (Istiana et al., 2021).

d) Uji daya sebar

1 g gel diletakkan di atas permukaan cawan petri pada bagian bawah yang sebelumnya sudah ditimbang. Cawan petri tersebut ditimpa dengan cawan petri lainnya dan ditunggu 1 menit, kemudian diameter gel diukur. Selanjutnya 50 g beban ditambahkan selama 1 menit, kemudian diameter gel tersebut diukur dari sisi horizontal vertical dan diagonal. Pengukuran diameter dilakukan sampai beban tambahan mencapai 200 g. Ketentuan daya sebar yang baik adalah 5-7 cm (Istiana et al., 2021).

e) Uji daya lekat

250 mg gel diletakkan di atas *object glass* dan ditutup menggunakan *object glass* lainnya. Beban seberat 1 kg ditambahkan di atasnya selama 5 menit. Kemudian tuas ditarik dan beban 80 g dilepaskan. Saat tuas dilepaskan, waktu dicatat hingga kedua *object glass* terpisah. Ketentuan daya lekat yang bagus adalah tidak lebih dari 4 detik (Istiana et al., 2021).

f) Uji waktu mengering

0,2 g gel dioleskan ke *object glass* hingga membentuk lapisan tipis dengan tebal 1 mm. Ditunggu sampai kering dan dapat dikelupas kemudian dicatat waktu yang diperlukan dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Istiana et al., 2021).

g) Uji iritasi

0,5 g gel sediaan masker *peel-off* dioleskan ke bagian punggung lengan karena bagian lengan atas termasuk bagian yang sensitif seperti halnya kulit wajah, dan ditunggu sampai 15 menit, Kemudian dilihat ada atau tidak reaksi yang ditimbulkan dari sediaan masker seperti timbul bintik-bintik kemerahan (Zhelsiana et al., 2016).

7. Uji aktivitas antioksidan biji pepaya dan gel *peel-off*

a) Pembuatan Larutan Stok ABTS

Sebanyak 1,2 mg ABTS dilarutkan dengan 5 mL metanol p.a dengan konsentrasi akhir 7 mM. sebanyak 3,24 mg Kalium persulfat dilarutkan dengan akuades dalam labu takar 5 mL untuk memperoleh konsentrasi 2,4 mM. Kedua larutan dicampurkan lalu disimpan di ruang gelap selama 16 jam hingga terjadi perubahan warna menjadi biru kehijauan dan diperoleh absorbansi ($0,70 \pm 0,02$), pada λ 734 nm (Saputri et al., 2020).

b) Penetapan panjang gelombang (λ) maksimal ABTS

Sebanyak 2 mL larutan ABTS dimasukkan ke dalam kuvet dan ditambah 1 mL larutan kuersetin, lalu dilihat absorbansinya pada panjang gelombang 700-750 nm (Saputri et al., 2020).

c) Penentuan *operating time*

Sebanyak 2 mL larutan ABTS ditambahkan 1 mL larutan kuersetin ke dalam kuvet dan digojog. Diamati absorbansi tiap 1 menit selama 45 menit pada panjang gelombang (Safitri et al., 2022). Hasil *operating time* yang didapatkan adalah pada menit ke-30.

d) Pengukuran serapan blanko ABTS

Sebanyak 2 mL ABTS dimasukkan kedalam kuvet dan diukur absorbansinya pada Panjang gelombang yang telah ditentukan. Dalam penelitian ini diukur pada Panjang gelombang 734 nm.

e) Pembuatan larutan induk dan seri konsentrasi ABTS (100 ppm)

Sebanyak 10 mg kuersetin dilarutkan dengan metanol p.a pada labu takar 100 mL sehingga didapat konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 5; 10; 15; 20; dan 25 ppm dengan pengambilan 250 μ L, 500 μ L, 750 μ L, 1000 μ L dan 1250 μ L dari Larutan ABTS 100 ppm dalam labu takar 5 mL dan di ad kan dengan metanol (Ratnasari & Kasaiah, 2018).

f) Pembuatan larutan induk dan seri konsentrasi ekstrak (1000 ppm)

Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a. Larutan dilarutkan menggunakan sonikator dan ditutup dengan alumunium foil sehingga didapatkan konsentrasi larutan 1000 ppm. Dibuat konsentrasi

25, 50, 75, 100, 125 ppm dengan pengambilan 125 μL , 250 μL , 375 μL , 500 μL dan 625 μL menggunakan mikropipet dari larutan induk ABTS 1000 ppm, masing-masing dimasukkan labu takar 5 mL dan ditambahkan metanol sampai tanda batas (Ratnasari & Kasaiah, 2018).

g) Pembuatan larutan induk dan seri konsentrasi gel (1000 ppm)

Sebanyak 10 mg sampel masing-masing formula gel ditambahkan metanol p.a ke dalam labu ukur 10 mL. Larutan dilarutkan menggunakan sonikator dan ditutup aluminium foil sehingga didapatkan larutan konsentrasi 1000 ppm. Dibuat seri konsentrasi 25; 50; 75; 100; dan 125 ppm, dibuat dengan pengambilan 125 μL ; 250 μL ; 375 μL ; 500 μL ; dan 625 μL dari larutan sampel masing-masing formula daun kelor 100 ppm dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan dengan metanol p.a sampai tanda batas (Ratnasari & Kasaiah, 2018).

h) Penentuan aktivitas antioksidan gel *peel-off*

1 mL dari masing-masing sampel (kuersetin, ekstrak, dan gel) ditambahkan 2 mL ABTS. Kemudian campuran diinkubasi selama *operating time* yaitu 30 menit dan diukur pada panjang gelombang maksimal yang sudah ditentukan yaitu 734 nm (Ratnasari & Kasaiah, 2018).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Metode pengelolaan data antioksidan terhadap ABTS

Nilai IC_{50} merupakan parameter yang digunakan untuk melihat kemampuan antioksidan menggunakan metode ABTS. Nilai IC_{50} (50% *inhibition concentration* ialah konsentrasi yang mampu meredam sebesar 50% aktivitas ABTS. Nilai IC_{50} ditentukan dengan cara menghitung % inhibisi (Kamoda et al., 2021). Perhitungan perhambatan aktivitas radikal bebas dapat dilihat pada persamaan 2.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi ABTS} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi ABTS}} \times 100 \% \text{ persamaan (2)}$$

2. Analisis data

Pada penelitian ini, uji normalitas data menggunakan metode *Shapiro-Wilk*, dan uji homogenitas menggunakan metode *Levene`s-Test*. Apabila data normal dan homogeny maka analisis dilanjutkan menggunakan uji *One Way Anova* yang diolah menggunakan aplikasi SPSS. Metode *One way Anova* dipilih karena penelitian ini akan membandingkan % penangkapan radikal ABTS dan sifat fisik sediaan gel dari tiga variasi konsentrasi ekstrak. Jika data yang diperoleh tidak terdistribusi normal atau tidak homogen maka analisis dilakukan menggunakan metode statistic non parametrik seperti *Kruskal wallis*.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANU
YOGYAKARTA