

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental secara kualitatif dan kuantitatif pada ekstrak daun dan buah carica (*Carica pubescens* Solms.). Ekstrak daun dan buah carica dilakukan uji kualitatif berupa organoleptik, dan skrining fitokimia. Pemeriksaan kuantitatif dalam bentuk pengujian peredaman radikal bebas DPPH menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dinyatakan dengan nilai IC₅₀.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu penelitian

Penelitian berlangsung di bulan April 2025 hingga Juni 2025.

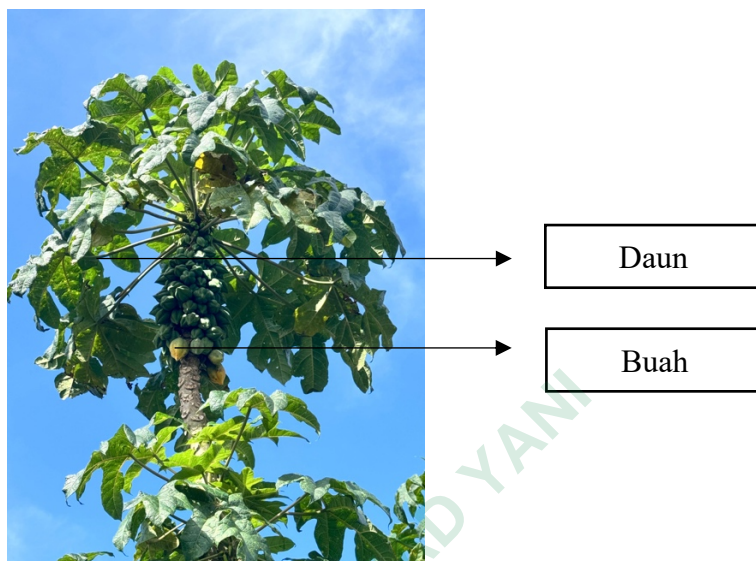
C. Populasi/Sampel/Objek Penelitian

1. Populasi

Daun dan buah carica dipanen dari Perkebunan Warga di Desa Sembungan, Kecamatan Kejajar, Kabupaten Wonosobo, Jawa Tengah pada ketinggian 2400 MDPL dan titik koordinat (-7.2402618, 109.9169365).

2. Sampel

- a. Daun carica dipanen pada pagi hari (06.00-08.00 WIB) dengan kriteria daun yang segar berwarna hijau tua pada pangkal tanaman.
- b. Buah carica dipanen pada pagi hari (06.00-08.00 WIB) dengan kriteria buah yang segar matang berwarna kuning hingga jingga.



Gambar 7. Daun dan Buah Carica (Dokumentasi pribadi)

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas penelitian ini yaitu ekstrak daun dan buah carica.
2. Variabel terikat penelitian ini yaitu nilai IC_{50} pada pengujian aktivitas peredaman radikal bebas DPPH.
3. Variabel control penelitian ini yaitu tempat tumbuh tanaman carica, waktu panen, waktu pengeringan, suhu pengeringan, waktu ekstraksi, suhu ekstraksi.

E. Definisi Oprasional

1. Ekstrak daun dan buah carica merupakan ekstrak yang didapatkan melalui proses maserasi dengan pelarut etanol 96%
2. Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dinyatakan dalam IC_{50} (*Inhibitory concentration*) yang merupakan konsentrasi ekstrak daun dan buah carica yang mampu menghambat 50% radikal bebas DPPH.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan meliputi ayakan 40 mesh, kompor Listrik, neraca analitik (*Ohaus*), oven, pipet volume (*Iwaki Pyrex*), pipet ukur (*Iwaki Pyrex*), propipet,

satu set Spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-Vis*), mikropipet (*Eppendorf* dan *Ohaus*), tabung reaksi (*Iwaki Pyrex*), labu takar (*Iwaki Pyrex*), thermometer, wadah kaca maserasi, grinder (*Fomac*), *vacuum buchner* (*Ohaus*), corong buchner, vortex (*Ohaus*) dan peralatan gelas (*Pyrex*).

2. Bahan

Daun dan buah carica yang diperoleh dari lingkungan Desa Sembungan, Kecamatan Kejajar, Kabupaten Wonosobo, Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan meliputi aquades, etanol 96% (teknis), etanol p.a., kertas saring, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, kuersetin p.a. (sigma), DPPH/2,2 *diphenyl-1-pikrihidrazil* (sigma Aldrich), serbuk magnesium p.a., asam klorida pekat, pereaksi wagner (teknis), pereaksi mayer (teknis), pereaksi dragendorff (teknis), serta FeCl_3 p.a.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Daun dan buah carica diperoleh dari Desa Sembungan, Kecamatan Kejajar, Kabupaten Wonosobo, Jawa Tengah. Daun dan buah carica dipetik pada bulan Maret 2025, berupa daun yang segar berwarna hijau tua pada pangkal tanaman dan buah yang segar matang berwarna kuning dipanen dipagi hari (jam 6 sampai jam 8 pagi). Tanaman carica dideterminasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi tanaman dilakukan untuk mencocokkan morfologi tanaman agar tidak terjadi kekeliruan dalam pengambilan sampel (Syamsiah *et al.*, 2025).

2. Penyiapan Simplisia

a. Daun Carica

Daun carica yang diperoleh sebanyak 3 kg disortasi basah untuk menghilangkan kotoran yang masih tertinggal, untuk selanjutnya ditimbang. Bagian daun dibilas bersih dengan aliran air lalu selanjutnya, proses pengeringan dengan oven pada temperatur 45°C . Daun carica dikeringkan hingga kering selama 2 hari yang ditandai saat diremas simplisia akan hancur. Simplisia kering

lalu diperkecil ukurannya menggunakan grinder hingga menjadi serbuk, selanjutnya disaring dengan ayakan berukuran 40 mesh (Indranila & Ulfah, 2022). Serbuk daun carica yang telah diperoleh disimpan dalam wadah bersih untuk tahap selanjutnya.

b. Buah Carica

Buah carica yang diperoleh sebanyak 10 kg disortasi basah untuk menghilangkan kotoran yang masih tertinggal, untuk selanjutnya ditimbang. Bagian buah dibilas bersih dengan aliran air lalu dikupas kulit buahnya, dihilangkan biji dari daging buah dan dilakukan perajangan daging buah carica, selanjutnya proses pengeringan dengan oven pada temperatur 45°C. Buah carica dikeringkan hingga kering selama 4 hari yang ditandai dengan mudah rapuh ketika diremas atau dipatahkan. Simplisia kering lalu diperkecil ukurannya menggunakan grinder hingga menjadi serbuk, selanjutnya disaring dengan ayakan berukuran 40 mesh. Serbuk buah carica yang telah diperoleh disimpan dalam wadah bersih untuk tahap selanjutnya.

3. Ekstraksi Daun dan Buah Carica

Metode ekstraksi sampel yang digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Indranila & Ulfah, (2022) dengan modifikasi yaitu serbuk simplisia daun dan buah carica masing-masing ditimbang 300 g lalu dimasukkan ke dalam wadah kaca maserasi yang berbeda. Proses maserasi dengan etanol 96% sebanyak 2.100 mL menggunakan perbandingan 1:7 hingga 5 hari, disertai pengadukan selama 15 menit setiap 24 jam, kemudian tahap penyaringan menggunakan kain mori dan dilanjutkan dengan menggunakan kertas saring untuk mendapatkan filtrat. Ampas hasil penyaringan dimaserasi kembali menggunakan 1.050 mL pelarut etanol 96% selama dua hari dengan cara yang sama. Hasil penyaringan filtrat itu dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan penangas air pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental lalu berlanjut dengan menggunakan *waterbath* 40°C sampai dihasilkan ekstrak yang kental.

Hasil ekstraksi dapat dilakukan pengukuran kadar air dengan alat *moisture balance* dan dihitung rendemennya menggunakan persamaan (1) (Wijaya & Satriawan, 2023):

$$\% \text{ Rendemen (b/b)} = \frac{\text{Berat Ekstrak (g)}}{\text{Berat Simplisia (g)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

4. Penetapan Kadar Air

Ekstrak daun dan buah carica dari hasil ekstraksi dimasukkan kedalam cawan hingga mencapai berat 1 g. Setelah itu, cawan dengan ekstrak ditempatkan di *moisture balance* yang diatur pada suhu 105°C. Proses akan terus berlangsung hingga alat menyelesaikan pengukuran dan menampilkan hasil kadar air dalam persentase (% moisture content), yang ditandai dengan bunyi peringatan, perubahan lampu indikator menjadi hijau, serta munculnya keterangan "*Drying Over, Press Tare*" pada layar. Selanjutnya, hasil pengukuran kadar air tersebut dicatat. Syarat kadar air pada ekstrak daun <10% dan syarat kadar air pada ekstrak buah <15% (Kemenkes RI, 2017).

5. Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis dikerjakan dengan memanfaatkan indra manusia untuk mengamati warna, aroma atau bau, dan tekstur sediaan ekstrak, kemudian hasilnya dideskripsikan secara kualitatif (Wijaya & Satriawan, 2023).

6. Skrining Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi keberadaan metabolit sekunder pada ekstrak daun dan buah carica. Sebagai berikut, sejumlah senyawa metabolit sekunder yang diuji dalam penapisan fitokimia adalah:

a. Flavonoid

Ekstrak daun dan buah carica masing-masing 100 mg dilarutkan dalam etanol p.a 10 mL. Diambil 1 mL dimasukkan dalam tabung reaksi sampel ditambahkan 1 mg serbuk magnesium lalu dicampurkan 5 tetes asam klorida pekat (HCl). Jika warna berubah menjadi merah, kuning atau jingga menunjukkan adanya flavonoid (Sari *et al.*, 2024).

b. Alkaloid

Setelah melarutkan 100 mg masing-masing ekstrak daun dan buah carica dalam 10 mL etanol, 15 mL amonia ditambahkan, dan cairan disaring. Filtrat kemudian dicampur dengan 2 mL larutan HCl 2M. Lima tetes bahan dimasukkan ke dalam masing-masing empat tabung reaksi. Larutan blanko dimasukkan ke dalam tabung 1, kemudian reagen Mayer, Wagner, dan

Dreagendorff ditambahkan tetes demi tetes ke dalam tabung 2, 3, dan 4 untuk membentuk endapan. Hasil endapan putih atau kuning menunjukkan adanya alkaloid ketika ditambahkan reagen Mayer. Endapan cokelat menunjukkan adanya alkaloid ketika ditambahkan reagen Wagner. Endapan oranye menunjukkan adanya alkaloid ketika ditambahkan reagen Dragendorf. Jika kedua reagen memberikan hasil positif, sampel yang mengandung alkaloid dianggap positif dalam uji ini (Sari *et al.*, 2024).

c. Fenolik dan Tanin

Ekstrak daun dan buah carica masing-masing seberat 100 mg dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Diambil 1 mL sampel dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan dengan tiga tetes larutan FeCl_3 1%. Apabila terbentuk warna ungu kehitaman, biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan hasil positif adanya fenolik dan tanin (Sari *et al.*, 2024).

d. Saponin

10 mL etanol p.a digunakan untuk melarutkan masing-masing 100 mg ekstrak daun dan buah carica. Akuades 5 mL ditambahkan ke dalam tabung reaksi berisi 1 mL sampel, dan campuran diaduk selama satu menit. Larutan HCl 1 M 5 tetes ditambahkan. Lanjutkan pemanasan selama dua hingga tiga menit jika tidak ada busa yang terbentuk, biarkan dingin dan dikocok. Adanya senyawa saponin dalam sampel ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil dalam waktu 8–10 menit (Sari *et al.*, 2024).

7. Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

Ditimbang DPPH (BM 394,32) sejumlah 3,94 mg kemudian diencerkan dengan etanol *p.a.*, kedalam labu takar 100 mL sampai garis batas. Selanjutnya dihomogenkan dan disimpan pada tempat yang gelap (Agustiarini & Wijaya, 2022).

b. Preparasi larutan ekstrak daun dan buah carica

Disiapkan larutan baku 1000 ppm dengan menimbang 100 mg masing-masing ekstrak daun dan buah carica, sampel diberikan etanol p.a., sampai tanda pembatas 100 mL kedalam labu ukur. Selanjutnya disiapkan

dalam berbagai seri konsentrasi (dalam labu ukur 10 mL) larutan 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm sebanyak 3 kali replikasi (Indranila & Ulfah, 2022).

c. Pembuatan larutan standar kuersetin

Standar larutan kuersetin disiapkan dengan menimbang kuersetin 10 mg, lalu dilarutkan menggunakan etanol *p.a.*, sampai batas volumenya 100 mL guna memperoleh larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya disiapkan dalam rentang konsentrasi (dalam labu ukur 10 mL) larutan 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm dan 9 ppm sebanyak 3 kali replikasi (Djamaluddin *et al.*, 2024).

d. Penetapan panjang gelombang maksimal

Penetapan panjang gelombang maksimal yakni, larutan induk DPPH 0,1 mM diukur sebanyak 3 mL dan disiapkan blanko etanol *p.a.*, kemudian dibaca dengan mengoperasikan spektrofotometer UV-Vis direntang panjang gelombang 400-800 nm (Djamaluddin *et al.*, 2024). Panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 517 nm.

e. Penetapan *operating time*

Larutan kuersetin 5 ppm diambil 1 mL digabungkan dengan 2 mL larutan DPPH, dan menggunakan blanko (etanol *p.a.*). Dilihat serapannya pada panjang gelombang maksimum 517 nm selama 0-60 menit dengan sela waktu 1 menit untuk menetapkan waktu stabil reaksi DPPH sebagai radikal bebas dan kuersetin sebagai aktivitas peredaman radikal bebas, diamati hingga diperoleh waktu inkubasi serapan yang stabil (Djamaluddin *et al.*, 2024). Hasil pengukuran *operating time* diperoleh nilai absorbansi yang stabil pada menit ke 34 sampai 37.

f. Pengukuran absorbansi DPPH

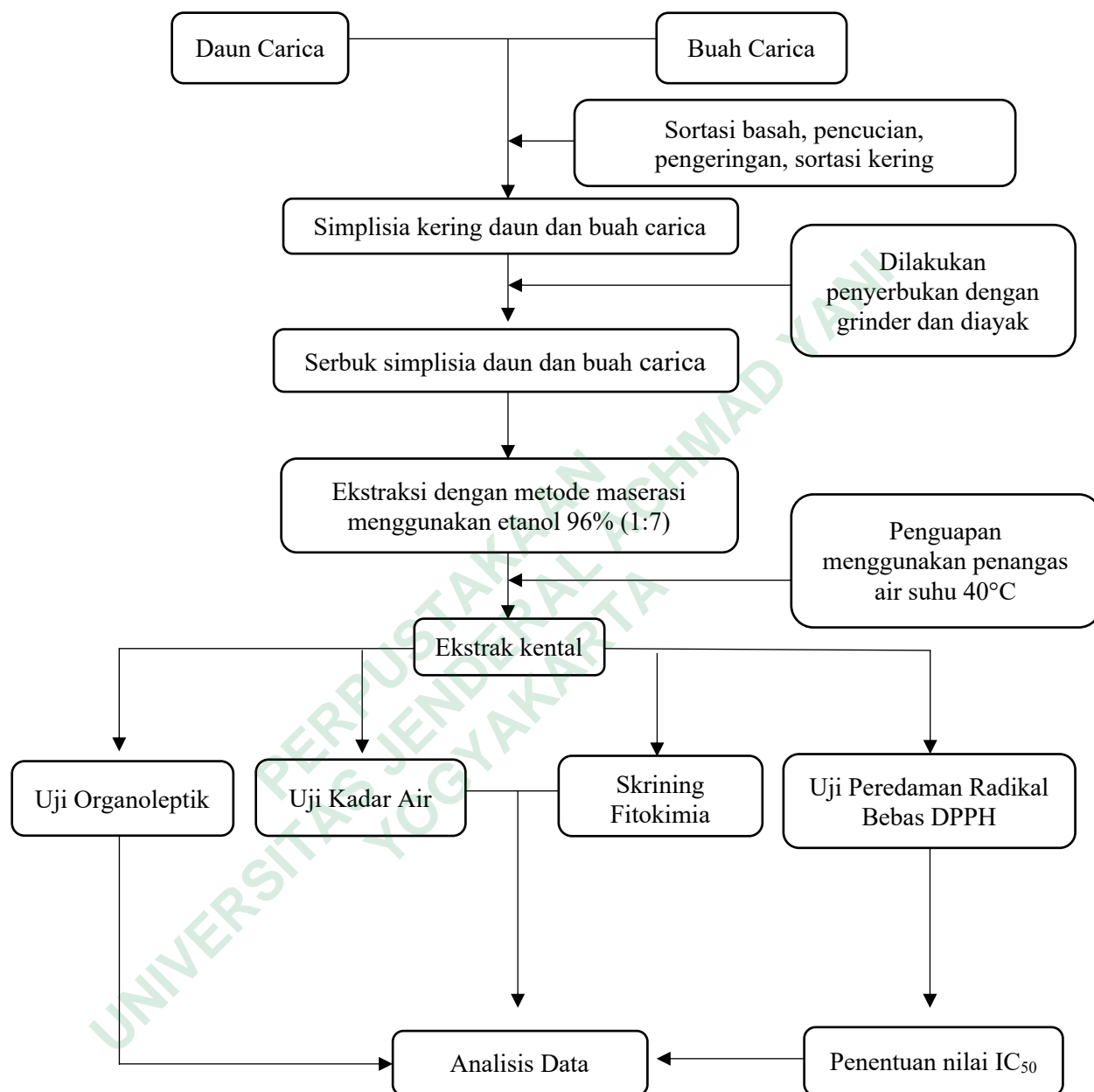
Larutan DPPH 0,1 mM diambil 3 mL. Kemudian diukur absorbansi DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 517 nm (Djamaluddin *et al.*, 2024).

g. Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH

Diambil 1 mL setiap sampel dan larutan standar kuersetin setelah itu dicampurkan 2 mL larutan DPPH. Selanjutnya, diinkubasi selama *operating time* yaitu 34 menit. Kemudian dibaca serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum 517 nm dan dilakukan replikasi (Djamaluddin *et al.*, 2024).

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA

H. Alur Penelitian



Gambar 8. Alur Penelitian

I. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data Untuk Menentukan Nilai IC₅₀

Indikator sebagai pengukur aktivitas peredaman radikal menggunakan prosedur DPPH adalah nilai IC₅₀ (*Inhibitor Concentration 50%*), merupakan konsentrasi dimana mampu mengurangi aktivitas DPPH sejumlah 50% (Molyneux, 2004). Pengukuran nilai IC₅₀ dibutuhkan informasi persentase inhibisi dari hasil perhitungan. Persentase inhibisi didapat dengan rumus (Aprillia *et al.*, 2023):

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi DPPH} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi DPPH}} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

Kadar sampel serta persentase inhibisi didapat dari setiap garis x dan y dalam persamaan regresi linear. Dari persamaan ini dipergunakan untuk menetapkan nilai IC₅₀ setiap sampel, dimasukan nilai y 50 serta nilai x yang ditentukan sebagai nilai IC₅₀ (Aprillia *et al.*, 2023).

Menurut (Rahman *et al.*, 2023) terdapat pengelompokan antioksidan berdasarkan nilai IC₅₀ :

Tabel 2. Pengelompokan Antioksidan Menurut Nilai IC₅₀

Nilai IC ₅₀ (ppm)	Antioksidan
<50	Sangat Kuat
50-100	Kuat
100-150	Sedang
150-200	Lemah
>200	Sangat lemah

2. Analisis Data Statistik

Data hasil uji nilai IC₅₀ ekstrak daun dan buah carica serta kuersetin, dianalisis statistik dengan mengoperasikan *software (Statistical Package For The Social Sciences) SPSS* untuk menentukan data itu berdistribusi normal ataupun tidak melalui pengujian normalitas dan homogenitas. Pengujian normalitas nilai signifikanya ($p > 0,05$) menggunakan *Shapiro-Wilk*. Serta pengujian homogenitas dengan prosedur *Levene test* dilihat nilai signifikanya ($p > 0,05$). Jika data telah tersebar normal dan homogen dilanjutkan uji parametrik *One Way ANOVA* karena menggunakan tiga kelompok yang berbeda yaitu kuersetin, ekstrak daun dan buah carica. Dilanjutkan uji *Post Hoc Tukey*

untuk mengetahui apakah ada perbedaan secara signifikan tiap kelompok dengan perbedaan hasil nilai signifikanya ($p < 0,05$).

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA