

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

##### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan jenis penelitian eksperimen.

##### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

###### **1. Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Bahan Alam, Laboratorium Farmasetika, serta Laboratorium Instrumen Program Studi DIII Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang.

###### **2. Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai Juni tahun 2026.

##### **C. Objek Penelitian**

Objek dari penelitian ini adalah *clay mask* ekstrak etanol daun pepaya.

##### **D. Variabel Penelitian**

###### **1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi *clay mask* ekstrak etanol daun pepaya yaitu 5%, dan 10%.

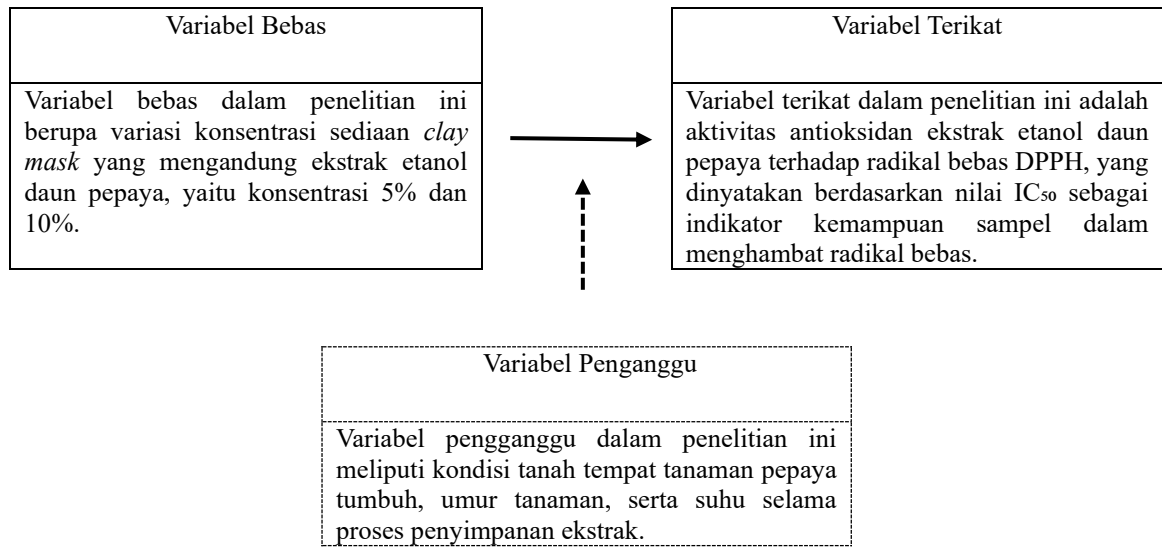
###### **2 Variabel Terikat**

Variabel terikat dari penelitian ini adalah aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun pepaya terhadap DPPH yang dinyatakan dengan  $IC_{50}$ , dan aktivitas antioksidan.

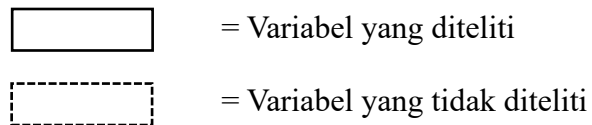
### 3. Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu adalah kondisi tanah tempat tumbuhnya tanaman pepaya, usia tanaman, serta suhu penyimpanan ekstraksi.

#### E. Kerangka Konsep



**Gambar 2. Hubungan antara variabel**



## F. Defenisi Operasional

**Tabel 1. Definisi Operasional**

| No | Variabel                                    | Defenisi Operasional                                                                                                                                                                                                                                           | Skala   |
|----|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1  | Daun pepaya                                 | Daun pepaya yang diambil dari Labat, Kupang NTT                                                                                                                                                                                                                | Nominal |
| 2  | Ekstrak etanol daun pepaya                  | Ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi daun pepaya menggunakan pelarut etanol 70% selama 5 hari                                                                                                                                                     | Nominal |
| 3  | <i>Clay mask</i> ekstrak etanol daun pepaya | <i>Clay mask</i> merupakan sediaan kosmetik topikal dan jenis masker yang terbuat dari bahan lumpur ( <i>clay</i> ) sebagai basisnya, mempunyai zat aktif yaitu ekstrak daun pepaya yang memiliki aktivitas antioksidan sehingga dapat menangkal radikal bebas | Rasio   |
| 4  | Aktivitas antioksidan                       | Kemampuan sediaan <i>clay mask</i> ekstrak etanol daun pepaya dalam meredam dan menangkal radikal DPPH berdasarkan nilai $IC_{50}$ dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis                                                                                  | Rasio   |
| 5  | Metode DPPH                                 | Prosedur pengujian aktivitas antioksidan dengan mereaksikan sampel dan pelarut DPPH, di mana perubahan warna yang diukur absorbansinya untuk menentukan persentase penghambatan, dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis                                    | Rasio   |
| 6  | Nilai $IC_{50}$                             | Parameter konsentrasi yang ekuivalen memberikan 50% aktivitas antioksidan. Nilai ini diperoleh dari perhitungan peramaan regresi linear antara konsentrasi sampel dan peredaman                                                                                | Rasio   |
| 7  | AAI                                         | Nilai yang menunjukan tingkat kekuatan antioksidan dari ekstrak daun pepaya, dihitung berdasarkan perbandingan konsentrasi akhir radikal bebas DPPH dengan nilai $IC_{50}$ sampel.                                                                             | Rasio   |

## G. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah belender atau (*Cosmos*), kain hitam, nampan, baskom, timbangan digital/ neraca analitik (*Type Ew-220-3NM*), hot plate, sendok tanduk, mortar, stamper, alat maserasi, *rotary evaporator* (*Eyela Type N-1000*), waterbath (*Memmert*), alat ukur daya sebar, gelas ukur (*Iwaki*), labu ukur 50 mL (*Iwaki*), labu ukur 100

mL (*Iwaki*), dan gelas kimia (*Iwaki*), tabung reaksi (*Iwaki*), rak tabung reaksi, inkubator, spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu tipe UV-1700*), kuvet (*Iwaki*), labu ukur (*Iwaki*), pipet mikro (*Iwaki*), stopwatch, aluminium foil (*Klin Palk*), dan (*Vortex Mixer*).

## **2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%, etanol 96% (*One Made*), larutan pereaksi mayer, kloroform, HCl 2 N, pereaksi Wagner, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, FeCl<sub>3</sub>, Mg, dan pereaksi Liberman Baucard, larutan asam asetat, larutan asam sulfat, ekstrak daun pepaya, bentonite, kaolin, xanthan gum, gliserin, nipagin, aquades, radikal DPPH (*Sigma-Aldrich*), dan BHT (*Sigma-Aldrich*).

## **H. Prosedur Penelitian**

### **1. Pengambilan Bahan**

Daun pepaya diambil dari Labat, Kelurahan Bakunase 2, Kecamatan Kota Raja, Kota Kupang Nusa Tenggara Timur.

### **2. Pembuatan Simplisia Daun Pepaya**

Proses pembuatan simplisia diawali dengan mengumpulkan daun tanaman pepaya atau proses pemanenan yang diambil dari daerah Labat, Kelurahan Bakunase 2, Kecamatan Kota Raja, Kota Kupang Nusa Tenggara Timur. Daun yang digunakan adalah daun yang memiliki warna hijau segar dan sudah agak tua. Pemanenan dilakukan pada pagi hari agar mencegah terjadinya penguapan zat aktif akibat sinar matahari yang panas. Setelah daun pepaya diambil, dilanjutkan dengan dilakukannya

sortasi basah dibawah air mengalir dan dirajang menjadi ukuran yang lebih kecil. Hasil rajangan kemudian dijemur dibawah sinar matahari (tidak langsung) agar kandungan air berkurang dan mencegah adanya pertumbuhan mikroba pada bahan tanaman, kemudian dilakukan sortasi kering dengan cara memisahkan partikel asing daun yang tidak layak pakai dan berbagai macam kerusakan yang lainnya. Terakhir dilakukan penghalusan menggunakan blender menjadi bubuk halus dan diayak menggunakan ayakan 40-50 (Mun'im, 2015).

### **3. Maserasi dan Pembuatan Ekstrak**

Simplisia daun pepaya diekstrak menggunakan cara dingin yaitu maserasi, dengan cara perendaman menggunakan perbandingan 1:10 (b/v) yaitu, satu sampel dan 10 pelarut (Fauziah *et al.*, 2022).

Proses pembuatan ekstrak dimulai dengan menimbang 500 g serbuk simplisia daun pepaya, direndam dengan etanol 70% sebanyak 3.750 mL, lalu didiamkan pada suhu kamar selama 3 hari. Pengadukan dilakukan pada 30 menit perendaman di hari pertama, begitu terus setiap 6 jam. Setelah 3 hari, dilanjutkan dengan remaserasi menggunakan 1.250 mL etanol 70% selama 2 hari. Selama remaserasi berlangsung, dilakukan juga pemisahan fitrat dengan ampas sebanyak dua kali penyaringan, menggunakan kain khusus penyaring dan terakhir menggunakan kertas saring.

Fitrat yang sudah didapat digabungkan dengan hasil maserasi, selanjutnya dilakukan penguapan menggunakan Vacuum Rotary

Evaporator pada suhu 60°C untuk menguapkan pelarut yang ada pada ekstrak. Kemudian dikentalkan dengan water bath pada suhu 40°-50°C sampai didapatkan ekstrak yang kental, lalu ditimbang dan dilakukan perhitungan rendemen (Mun'im, 2015).

$$\text{Rendemen (b/b)} = \frac{\text{Berat Ekstrak Kental (g)}}{\text{Berat Sampel Awal (g)}} \times 100\%$$

#### **4. Perhitungan Rendemen**

Rendemen merupakan nilai yang dinyatakan dalam presentasi dimana menggambarkan perbandingan antara jumlah ekstrak yang diperoleh dengan jumlah bahan awal yang digunakan. Semakin tinggi nilai rendemennya, semakin banyak ekstrak yang dihasilkan. Besarnya rendemen ekstrak dipengaruhi oleh berbagai faktor, salah satunya adalah metode ekstraksi yang digunakan (Mun'im, 2015).

#### **5. Uji Bebas Etanol**

Uji kualitatif etanol dilakukan dengan menambahkan 5 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan 2 mL larutan kalium dikromat ke dalam sampel. Adanya etanol dalam ekstrak ditunjukkan oleh perubahan warna larutan, yaitu dari warna jingga menjadi hijau kebiruan (Ramadhani *et al.*, 2020).

### **I. Skrining Fitokimia**

#### **1. Uji Alkaloid**

Uji alkaloid dilakukan dengan menimbang 10 mg ekstrak daun pepaya, kemudian ditambahkan 10 mL kloroform dan diaduk hingga homogen. Campuran selanjutnya disaring ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 mL HCl 2 N dan dikocok hingga tercampur dengan baik. Setelah

didiamkan beberapa saat hingga terbentuk lapisan, lapisan tersebut kemudian diuji menggunakan pereaksi Dragendorff dan Mayer. Hasil positif adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna kuning jingga atau merah pada penambahan pereaksi Dragendorff dan endapan berwarna putih pada penambahan pereaksi Mayer (Ramadhani *et al.*, 2020).

## **2. Uji Flavonoid**

Uji flavonoid dilakukan dengan menimbang 10 mg ekstrak, kemudian ditambahkan 20 mL etanol dan diaduk hingga homogen. Selanjutnya, sebanyak 10 mL larutan dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 tetes asam klorida pekat dan 3–4 butir magnesium. Campuran dikocok selama beberapa saat, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil positif adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya atau berubahnya warna larutan menjadi merah, kuning, atau jingga. (Ramadhani *et al.*, 2020).

## **3. Uji Saponin**

Uji saponin dilakukan dengan menimbang 10 mg ekstrak daun pepaya, kemudian ditambahkan 20 mL air panas. Campuran selanjutnya dikocok secara kuat selama kurang lebih 10 detik dan diamati pembentukan buih. Hasil positif adanya saponin ditandai dengan terbentuknya buih yang stabil dengan tinggi sekitar 1–10 cm selama 30 menit. Buih yang tetap bertahan setelah ditambahkan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya kandungan saponin dalam ekstrak. (Ramadhani *et al.*, 2020).

#### 4. Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan menimbang 10 mg ekstrak, kemudian menambahkan 20 mL air panas dan 5 tetes larutan NaCl 10%. Campuran selanjutnya dibagi ke dalam dua tabung reaksi, dengan tabung pertama digunakan sebagai kontrol dan tabung kedua ditambahkan 3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif adanya tanin ditunjukkan dengan terbentuknya perubahan warna menjadi biru atau biru kehitaman pada tabung yang diberi pereaksi  $\text{FeCl}_3$ . (Ramadhani *et al.*, 2020).

#### J. Formulasi *Clay Mask* Ekstrak Etanol Daun Pepaya

##### 1. Formula *Clay Mask* dan Proses Pembuatan Sediaan

**Tabel 2. Formula *clay mask* ekstrak etanol daun pepaya**

| Bahan               | Formula |        |
|---------------------|---------|--------|
|                     | F1 (%)  | F2(%)  |
| Ekstrak daun pepaya | 5       | 10     |
| Bentonite           | 0,5     | 0,5    |
| Kaolin              | 30      | 30     |
| Xanthan gum         | 0,5     | 0,5    |
| Gliserin            | 8       | 8      |
| Nipagin             | 0,1     | 0,1    |
| Aquades hingga      | 100 mL  | 100 mL |

Sumber: (Latifah, *et al.*, 2007).

##### 2. Proses pembuatan sediaan *clay mask* ekstrak etanol daun pepaya:

1. Persiapan alat dan bahan, kemudian timbang semua bahan sesuai dengan formula 1 dan formula 2.
2. Dilakukan pendispersian bentonit, dengan menimbang bentonit kemudian dilarutkan dalam 6 mL aquades di dalam mortir dan dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit hingga mengembang sempurna (Insan *et al.*, 2023).

3. Larutkan nipagin ke dalam 48 ml aquades yang sebelumnya telah dipanaskan, kemudian tambahkan bentonit secara bertahap sedikit demi sedikit ke permukaan aquades dan didiamkan hingga basah merata, serta tidak diaduk dalam waktu 24 jam.
4. Setelah itu, tambahkan xanthan gum sedikit demi sedikit ke dalam campuran dalam keadaan digerus dengan cepat hingga terbentuk massa yang homogen.
5. Tambahkan kaolin dan gliserin secara bertahap kemudian campuran digerus kembali hingga homogen. disertai dengan penambahan ekstrak daun pepaya, kemudian digerus hingga homogen. Setelah tercampur merata, terakhir masukkan sisa aquades dan digerus sampai homogen (Fauziah, 2018).

## **K. Prosedur Aktivitas Antioksidan**

### **1. Penyiapan Larutan DPPH**

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 10 mg, dilarutkan dengan etanol sampai tanda batas pada labu ukur 50 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 200 ppm. Setelah itu bungkus dengan menggunakan aluminium foil (Syamsu & Rachman, 2023).

### **2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH**

Tujuan penentuan panjang gelombang maksimum DPPH adalah agar dapat mengetahui seberapa panjang gelombang yang dapat diabsorpsi oleh senyawa DPPH. Dengan menggunakan larutan DPPH yang telah dibuat sebelumnya yaitu dengan cara, 4 mL larutan blanko yaitu etanol 95% dimasukkan ke dalam vial, tambahkan 1 mL larutan DPPH.

Kemudian dibungkus dengan aluminium foil, diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

### **3. Penyiapan Larutan Kontrol Positif**

Penyiapan larutan pembanding menggunakan serbuk BHT yang digunakan sebagai pembanding dan sebagai bukti adanya aktivitas antioksidan dalam sediaan *clay* mask ekstrak etanol daun pepaya. Konsentrasi yang akan dibuat adalah 100 ppm, dengan cara menimbang serbuk BHT sebanyak 5 mg, dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL, ditambahkan alkohol 95% hingga tanda batas. Dibuat seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. (Syamsu & Rachman, 2023).

### **4. Penyiapan Larutan Uji**

Larutan uji dibuat dengan cara menimbang masing-masing 20 mg *clay mask* ekstrak etanol daun pepaya, baik konsentrasi 5% dan 10%. Kemudian dilarutkan dengan etanol 95% menggunakan labu ukur 100 mL, menghasilkan 200 ppm. Selanjutnya dibuat deretan konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Selanjutnya masing-masing dari seri konsentrasi yang ada, dipipet 4 mL kedalam vial, ditambahkan 1 mL larutan DPPH lalu dibungkus menggunakan aluminium foil, diinkubasi selama 30 menit, diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Syamsu & Rachman, 2023).

## 5. Penyiapan Larutan Kontrol Negatif

Penyiapan larutan dimulai dengan cara melarutkan 2 g sediaan *clay mask* yang dibuat tanpa menambahkan zat aktif yaitu ekstrak etanol daun pepaya. Dilarutkan dengan etanol 95% dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas hingga menghasilkan larutan 20.000 ppm. Setelah itu buat seri konsentrasi yang lebih rendah yaitu 2000 ppm, 4000 ppm, 6000 ppm, 8000 ppm, 10.000 ppm. Selanjutnya masing - masing dari seri konsentrasi yang ada, dipipet 4 mL kedalam vial, ditambahkan 1 mL larutan DPPH lalu dibungkus menggunakan aluminium foil, diinkubasi selama 30 menit, diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Himaniarwati *et al.*, 2020).

## L. Analisis Data

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk menentukan persentase peredaman radikal bebas DPPH. Persentase (%) peredaman radikal bebas DPPH kemudian dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisis} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

Keterangan:

Absorbansi blanko: Serapan radikal bebas DPPH

Absorbansi sampel: Serapan sampel terhadap radikal bebas DPPH

Kemudian masing-masing dihitung nilai IC<sub>50</sub> menggunakan analisis regresi linear, yaitu:  $y = a + bx$

Keterangan: y: presentase aktivitas antioksidan (persen inhibisi 50)

x: konsentrasi larutan uji

a: tetapan intersep

b: tetapan slope

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

| Nilai IC <sub>50</sub> (ppm) | Tingkat Kekuatan          |
|------------------------------|---------------------------|
| <50                          | Sangat Kuat               |
| 50 - <100                    | Kuat                      |
| 100 - <150                   | Sedang                    |
| 150 - <200                   | Lemah                     |
| > 200                        | Sangat Lemah/ Tidak Aktif |

Hasil perhitungan selanjutnya dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear, dengan konsentrasi ekstrak sebagai variabel pada sumbu x (absis) dan persentase peredaman radikal bebas sebagai variabel pada sumbu y (ordinat). Berdasarkan analisis regresi linear tersebut diperoleh nilai x yang kemudian digunakan untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub> dengan rumus  $IC_{50} = \text{anti-log}(x)$ . Nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan tingkat kekuatan aktivitas antioksidan dari ekstrak yang diuji.

Penentuan Nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*) ditentukan dengan membandingkan konsentrasi DPPH yang digunakan dalam pengujian (ppm) dengan nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh (ppm). Perhitungan AAI bertujuan untuk mengetahui indeks aktivitas antioksidan dari sampel yang diuji. Nilai AAI dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Nilai AAI} = \frac{\text{Konsentrasi DPPH (ppm)}}{IC_{50} \text{ Sampel (ppm)}}$$

**Tabel 4.AAI**

| Nilai IC <sub>50</sub> (ppm) | Tingkat Kekuatan |
|------------------------------|------------------|
| < 0,5                        | Sangat Lemah     |
| 0,5 - 1                      | Sedang           |
| 1- 2                         | Kuat             |
| > 2                          | Sangat Kuat      |