

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah metode kuantitatif dan kualitatif dengan menganalisis kadar fenol dan flavonoid total pada biji pepaya gunung dengan metode kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri UV-Vis.

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

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-Juni 2023 yang bertempat di Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Malang.

#### **3.3. Alat dan Bahan**

##### **3.3.1. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beaker glass, erlenmeyer, labu ukur, batang pengaduk kaca, pipet volume, gelas ukur, oven, neraca analitik, corong kaca, bola hisap, botol chamber, spektrofotometri UV-Vis.

##### **3.3.2. Bahan**

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji pepaya gunung (*Carica pubescens*), aquades, etanol 70%, kertas saring, aluminium (III) klorida 2%, asam galat, kuersetin, natrium karbonat, methanol, asam asetat, Folin-Ciocalteau,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7%, n-butanol, plat KLT.

#### **3.4. Variabel Penelitian**

##### **3.4.1. Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak biji pepaya gunung (*Carica pubescens*). Biji pepaya gunung yang diperoleh dari limbah pembuatan manisan pepaya *Carica* yang diproduksi masyarakat dataran tinggi Dieng.

### 3.4.2. Variabel Terikat

Variable terikat pada penelitian ini adalah kadar flavonoid dan fenol total yang terdapat dalam biji pepaya gunung (*Carica pubescens*).

### 3.5. Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3.1 Definisi operasional variabel**

No	Nama Variabel	Definisi	Metode dan Alat pengukuran	Skala Pengukuran
1.	Simplisia biji pepaya gunung ( <i>Carica pubescens</i> )	Serbuk yang didapatkan dari proses penghalusan biji pepaya gunung ( <i>Carica pubescens</i> ) yang telah dikeringkan.	Biji pepaya gunung ( <i>Carica pubescens</i> ) dikeringkan menggunakan oven, kemudian dihaluskan menggunakan grinder.	Nominal
2.	Kadar total flavonoid dan fenol	Menentukan kadar total flavonoid dan fenol pada biji pepaya gunung ( <i>Carica pubescens</i> ) yang diperoleh dari limbah pembuatan manisan pepaya <i>Carica</i> yang diproduksi oleh masyarakat dataran tinggi Dieng.	Uji kualitatif menggunakan instrument KLT dan uji kuantitatif menggunakan instrument spektrofotometri UV-Vis.	Rasio

### **3.6. Metode Analisa**

#### **3.6.1. Sampel Uji**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah biji pepaya gunung (*Carica pubescens*) yang diperoleh dari limbah pembuatan manisan pepaya *Carica* yang diproduksi masyarakat dataran tinggi Dieng.

#### **3.6.2. Pembuatan Simplisia (FHI Edisi II Tahun 2017)**

Biji pepaya gunung yang telah terkumpul dibersihkan dari kulit bijinya, kemudian dicuci hingga bersih, ditiriskan, dan dioven dengan suhu 90°C selama 30 menit hingga kering. Sampel yang telah dioven kemudian diserbukkan menggunakan grinder hingga halus. Setelah itu, serbuk yang dihasilkan diayak menggunakan mesh dengan ukuran no.50 hingga diperoleh serbuk yang halus dan seragam. Kemudian hasilnya disimpan ke dalam wadah gelas tertutup (Darwis, 2018).

#### **3.6.3. Pembuatan Ekstrak**

Metode yang digunakan yaitu refluks dilakukan dengan cara sebanyak 20 gram simplisia biji pepaya gunung yang telah halus dimasukkan ke dalam labu alas datar, untuk selajutnya dilakukan ekstraksi dengan waktu yaitu 120 menit, 150 menit, 180 menit, 210 menit, dan 240 menit dengan penambahan Etanol 96%. Variasi waktu yang digunakan bertujuan untuk mengetahui dan mendapatkan waktu ekstraksi yang paling optimum. Setelah itu, saring hasil ekstraksi menggunakan kertas saring dan corong. Filtrate hasil penyaringan kemudian diuapkan menggunakan waterbath hingga kental. Suhu yang digunakan pada saat waterbath adalah 60°C. Hasil ekstraksi tersebut menghasilkan rendemen ekstrak kental.

#### **3.6.4. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (FHI Edisi II Tahun 2017)**

##### **1. Penjenuhan bejana**

Tempatkan kertas saring dalam bejana kromatografi. Sejumlah fase gerak dimasukkan ke dalam bejana kromatografi, hingga tingginya 0,5 sampai 1 cm dari dasar bejana. Tutup kedap dan biarkan hingga kertas saring basah seluruhnya. Kertas saring harus selalu tercelup ke dalam fase gerak pada dasar bejana. Kecuali dinyatakan lain pada

masing-masing monografi, prosedur KLT dilakukan dalam bejana jenuh.

## 2. Larutan uji KLT

Serbuk simplisia ditimbang saksama lebih kurang 1 g, direndam sambil dikocok di atas tangas air dengan 10 mL pelarut yang sesuai selama 10 menit. Filtrat dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL tambahkan pelarut sampai tanda.

## 3. Prosedur KLT

Larutan uji, dan larutan pembanding ditotolkan sebanyak 1 kali penotolan, menurut cara yang tertera pada masing-masing monografi dengan jarak antara 1 cm dari tepi bawah lempeng, dan biarkan mengering.

Lempeng ditempatkan pada rak penyangga, hingga tempat penotolan terletak di sebelah, dan masukkan rak ke dalam bejana kromatografi. Fase gerak dalam bejana harus mencapai tepi bawah lapisan penjerap, totolan jangan sampai terendam. Tutup bejana diletakkan pada tempatnya dan biarkan fase gerak merambat sampai batas jarak rambat. Lempeng dikeluarkan dan dikeringkan di udara, dan diamati bercak dengan sinar tampak, ultraviolet gelombang pendek (254 nm). Kemudian diukur dan dicatat jarak tiap bercak dari titik penotolan serta catat panjang gelombang untuk tiap bercak yang diamati. Setelah itu ditentukan nilai Rf.

### **3.6.5. Penentuan Kadar Flavonoid Total**

#### 1. Pembuatan larutan standar kuersetin

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan cara membuat kuersetin 60 ppm, kemudian sebanyak 1 mL larutan kuersetin 60 ppm tersebut direaksikan dengan 1 mL aluminium (III) klorida 2% di dalam tabung reaksi. Tambahkan 8 mL asam asetat 5% ke dalam larutan dan dilakukan pembacaan pada rentang panjang gelombang 400-500 nm.

#### 2. Penentuan kurva baku kuersetin

Larutan baku dibuat dengan menimbang kuersetin 10,0 mg pada neraca analitik, lalu dilarutkan dengan etanol add 10 mL sehingga

diperoleh konsentrasi 1000 ppm dan dibuat variasi konsentrasi 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm. Kemudian sebanyak 1 mL larutan dari berbagai konsentrasi direaksikan dengan 1 mL aluminium (III) klorida 2% dan ditambah 8 mL asam asetat 5% (Ipandi et al., 2016).

3. Larutan uji untuk ekstrak (FHI Edisi II Tahun 2017)

Ekstrak ditimbang saksama lebih kurang 0,2 g, lalu dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, ditambahkan 25 mL etanol P, dan diaduk selama 30 menit dengan pengaduk magnetik. Kemudian disaring ke dalam labu tentukur 25 mL, dan ditambahkan etanol P melalui penyaring sampai tanda.

Pembuatan larutan pembanding. ditimbang saksama lebih kurang 10 mg pembanding, lalu dimasukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, dilarutkan dan ditambahkan etanol P sampai tanda. Diukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum. Dilakukan pengukuran blanko dengan cara yang sama, tanpa penambahan aluminium klorida. Kemudian dibuat kurva kalibrasi dan dihitung kadar larutan uji.

### 3.6.6. Penentuan Kadar Fenol Total

1. Pembuatan larutan standar asam galat

Larutan standar asam galat 1000 ppm dibuat dengan menimbang 10 mg dan dilarutkan etanol 96% hingga volume 10 mL. Dari larutan stock dipipet 0,25 mL diencerkan dengan etanol 96% hingga volume 25 mL hingga dihasilkan konsentrasi 10 ppm (10.000 ppb). Lalu dipipet 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, dan 0,5 mL dan dicukupkan dengan etanol 96% hingga 10 mL sehingga dihasilkan larutan 100, 200, 300, 400, dan 500 ppb.

2. Pengukuran larutan standar asam galat

Untuk masing-masing konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 ppb ditambahkan dengan 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteau dikocok dan dibiarkan 8 menit, tambahkan 4,0 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% kocok hingga homogen. Tambahkan aquades steril hingga 10 mL dan diamkan selama 2 jam pada suhu ruangan. Ukur serapan pada panjang gelombang serapan 750 nm, lalu buat kurva kalibrasi.

3. Larutan uji untuk ekstrak

Timbang saksama lebih kurang 0,2 g ekstrak, kemudian dilarutkan dengan 10 mL etanol 96%.

4. Penetapan fenolik total ekstrak

Dipipet sebanyak 0,5 mL larutan dari ekstrak etanol biji pepaya gunung (*Carica pubescens*) ditambahkan dengan 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteu (campuran asam fosfomolibdat dan fosfotungstat ) dikocok dan dibiarkan 4-8 menit, tambahkan 4,0 mL larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% kocok hingga homogen. Tambahkan aquadest steril hingga 10 mL dan diamkan selama 2 jam pada suhu ruangan. Ukur serapan pada panjang gelombang serapan 750 nm yang akan memberikan kompleks biru.

**3.6.7. Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data**

- Uji Kualitatif Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel yang diperoleh positif apabila nilai Rf sampel sama dengan nilai Rf baku, tandanya sampel tersebut mengandung flavonoid dan fenol. Dengan perhitungan nilai Rf :

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat pelarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Data yang diperoleh pada penelitian ini berupa besarnya nilai Rf. Data hasil penelitian yang diperoleh akan disajikan dalam bentuk tabel dan pembahasan serta diambil kesimpulan.

**Tabel 3. 2 Hasil pengujian KLT**

Sampel	Jarak tempuh baku (cm)	Jarak tempuh noda (cm)			Nilai Rf baku	Nilai rf			Hasil
		R1	R2	R3		R1	R2	R3	

- Uji Kuantitatif Metode Spektrofotometri UV-Vis

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah absorbansi standar kuersetin dan asam galat serta absorbansi sampel oleh spektrofotometri UV-Vis. Penentuan konsentrasi larutan menggunakan persamaan regresi linier, yaitu:

$$Y = bx + a$$

Keterangan :

- Y : Garis regresi
- b : Konsentrasi regresi
- x : Variabel bebas
- a : Konstanta

Dari hasil di atas, selanjutnya dibuat tabel hasil pemeriksaan sebagai berikut:

**Tabel 3.3 Penyajian data absorbansi deret larutan standar**

No	Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
1.	Standar 1		
2.	Standar 2		
3.	Standar 3		
4.	Standar 4		
5.	Standar 5		
6.	Standar 6		

**Tabel 3. 4 penyajian data hasil absorbansi dan kadar dengan sampel**

Replikasi	Absorbansi	Kadar dalam Larutan Uji (% b/b)	Kadar dalam Larutan Ekstrak (% b/b)	Rata-rata Kadar (% b/b)
1				
2				
3				