

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Skripsi

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan metode bersifat eksperimental di laboratorium Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu persiapan sampel, ekstraksi, uji organoleptik, uji kualitatif fitokimia menggunakan pereaksi, uji KLT, dan tahap uji peredaman radikal bebas DPPH menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*.

B. Lokasi Dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian dilakukan sejak Oktober-Desember.

C. Populasi Dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) diambil dari Kecamatan Madukara, Kabupaten Banjarnegara, Jawa Tengah. Letak geografis Banjarnegara berbentuk pegunungan yang memiliki temperatur 20-26⁰ C dengan ketinggian tempat wilayah 40-2.300 meter dpl.

2. Sampel

Sampel penelitian dikumpulkan dengan cara pemilihan daun pandan wangi yang masih segar, berwarna hijau muda dan memiliki ukuran ±55-75 cm (usia panen ± 3-4 bulan).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*).

2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas peredaman radikal bebas pada ekstrak pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*).
3. Variabel pengacu terkendali dalam penelitian ini adalah waktu pemanenan, waktu inkubasi, suhu pada saat inkubasi.
4. Variabel pengacu tak terkendali dalam penelitian ini adalah usia tanaman yang dipanen, cuaca dan kelembaban.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) merupakan cairan khas ekstraksi dari pelarut metanol dan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*).
2. Pengujian terhadap skrining fitokimia untuk mendapatkan kandungan alkaloid, steroid, flavonoid, tanin, dan saponin pada ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) dan pengujian aktivitas peredaman radikal bebas dari ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*).
3. Peredaman radikal bebas adalah molekul yang dapat memperlambat atau mencegah oksidasi dari molekul lain. Oksidasi adalah reaksi kimia yang menghasilkan radikal bebas, memicu reaksi yang dapat merusak sel.
4. Metode DPPH adalah metode yang konvensional, digunakan untuk penepatan aktivitas peredaman radikal bebas.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV Vis*), Timbangan analitik (*Ohaus*), rotary evaporator (*IKA RV 10 Basic*), blender (*Fomac*), Pipet tetes, mikropipet, pipet ukur (*Iwaki*), propipet, batang pengaduk, toples kaca, tabung reaksi (*Iwaki*), rak tabung reaksi, lemari asam, gelas beker, erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur (*Iwaki*), sendok tandu, botol ekstrak (*Vial*), kaca arloji, Vortex (*Mixer DLAB MX-S*), Oven, Kulkas.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*), DPPH (*1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil*), pereaksi dragendorff, pereaksi mayer, pereaksi wagner, magnesium, akuades, FeCl₃, kloroform, natrium asetat trihidrat, FeCl₃.6H₂O, HCl, metanol, asam asetat, metanol *p.a*, vitamin C, kertas saring, alummunium foil, AlCl₃, Plat KLT, n-butanol, aquades, *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*, asam asetat, kuersetin.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengumpulan bahan dan determinasi tanaman

Daun pandan wangi di ambil bagian daun pada pagi hari, dipilih pandan wangi yang masih segar, berwarna hijau muda dan usia panen ± 3-4 bulan. Daun pandan wangi diambil pada pagi hari jam 06.00-08.00 karena kandungan zat aktifnya belum mengalami metabolisme (Werdhasari, 2014). Kemudian, dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Determinasi tanaman pada daun pandan wangi berfungsi untuk mengetahui kebenaran bahan daun pandan wangi yang digunakan pada penelitian.



Gambar 10. Tanaman Pandan Untuk Determinasi

2. Persiapan sampel

Daun pandan wangi yang telah diambil, kemudian disortasi basah untuk menghilangkan kotoran-kotoran dan bahan asing lainnya. Setelah itu, sampel dicuci dengan menggunakan air mengalir hingga bersih, kemudian sampel

ditiriskan. Daun pandan wangi kemudian disortasi kering untuk memisahkan dengan pengotor yang masih tertinggal. Selanjutnya, sampel dipotong kecil-kecil (± 5 cm) dan dikeringkan di oven pada suhu 50°C karena senyawa flavonoid yang digunakan sebagai antioksidan tidak tahan terhadap panas, selama 3 hari hingga daun pandan wangi hancur saat diremas, setelah kering daun pandan wangi di blender sampai halus kemudian diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh, hal ini dilakukan untuk memperkecil ukuran partikel dan memperbesar kontak dengan pelarut. Selanjutnya, serbuk ditimbang sebanyak 200 gram.

3. Ekstraksi daun pandan wangi

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi dengan perbandingan 1:10 (Kemenkes RI., 2017) yaitu daun pandan wangi yang telah di haluskan ditimbang sebanyak 200 gram, kemudian dimasukkan ke bejana maserasi dan ditambahkan pelarut metanol sebanyak 2 liter hingga seluruh sampel terendam oleh pelarut lalu ditutup rapat dan di simpan di tempat yang gelap. Sampel harus disimpan ditempat yang gelap untuk mencegah terjadinya kerusakan akibat reaksi dikatalisis oleh cahaya atau terjadinya perubahan warna (Supomo *et al.*, 2019). Bejana di simpan hingga 24 jam agar pelarut tidak jenuh, pada 6 jam pertama dilakukan pengadukan 3 kali dan selanjutnya dibiarkan selama 18 jam (Kemenkes RI., 2017). Kemudian disaring dengan kertas saring atau kain sehingga di peroleh filtrat metanol serta residu, dan dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali. Filtrat pertama, kedua dan ketiga dicampurkan dan di uapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga larutan menjadi kental (Titah, 2013).

4. Uji organoleptik

Uji organoleptik adalah suatu pengujian yang dilakukan dengan menggunakan pancaindra terhadap ekstrak dengan mengamati bentuk, konsistensi, bau, warna, dan rasa dari ekstrak. Pengujian ini bertujuan untuk mengidentifikasi ciri khas dari ekstrak. (Gangga *et al.*, 2017; Hal. 240).

5. Uji aktivitas fitokimia (Dwi Puspitasari & Proyogo, 2017)

Tujuan dilakukannya pengujian ini adalah untuk mengetahui kandungan

metabolit sekunder dari daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*). Serbuk daun pandan wangi dilakukan pengujian kandungan senyawa kimia yang meliputi pengujian alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, terpenoid/steroid.

a. Identifikasi Alkaloid

Sebanyak 2 mg ekstrak diencerkan dengan 4 mL HCl 2N, dibagi menjadi 3 tabung.

Tabung I : Ditambahkan 2-3 tetes pereaksi dragendorf. Positif apabila terbentuk endapan berwarna hijau kecoklatan.

Tabung II : Ditambahkan 2-3 tetes pereaksi mayer. Positif apabila terbentuk endapan berwarna hijau kecoklatan.

Tabung III : Ditambahkan 2-3 pereaksi Wagner. Positif apabila terbentuk endapan hijau kecoklatan.

Pada uji fitokimia alkaloid dibagi menjadi 3 penggunaan pereaksi untuk mengidentifikasi adanya senyawa alkaloid didalam pandan wangi. Apabila ketiga reaksi tersebut positif maka ekstrak pandan wangi positif mengandung senyawa alkaloid, apabila dari ketiga pereaksi tersebut menghasilkan dua yang positif masih diartikan bahwa daun pandan wangi positif mengandung senyawa alkaloid karena masih mendukung pereaksi lain seperti ikatan kovalen K^+ dan atom nitrogen yang menghasilkan endapan dan warna coklat ditimbulkan I^- kalium iodida bereaksi dengan iodin (I_2) menjadi I_3^- . Apabila hanya satu yang positif maka negatif mengandung alkaloid, hal ini disebabkan karena tanaman yang digunakan dalam pengambilan berbeda letaknya dan metode beda yang bisa memengaruhi hasil fitokimia (Dwi Puspitasari & Proyogo, 2017).

b. Identifikasi flavonoid

Sebanyak 200 mg ekstrak ditambahkan dengan 5mL eter dan dipanaskan menggunakan tabung reaksi selama lima menit. Selanjutnya ditambahkan HCl pekat, dan 2 mg bubuk magnesium (Mg). Dalam uji flavonoid penambahan HCl pekat dapat digunakan untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya. Flavonoid merupakan senyawa yang mengandung dua cincin aromatik dengan gugus hidroksil lebih dari satu.

Adanya reduksi antara magnesium (Mg) dan HCl dapat menimbulkan warna merah, kuning dan jingga pada flavonoid.

c. Identifikasi saponin

Sebanyak 4 mg sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan air suling untuk merendam sampel, sehingga seluruh cuplikan terendam, kemudian dipanaskan selama 2-3 menit, dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuknya busa setinggi 1-10 cm yang stabil dalam waktu tidak hilang setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N menunjukkan adanya saponin. Hasil pengujian ekstrak pandan wangi positif mengandung saponin dengan adanya busa setinggi 5 cm.

d. Identifikasi tanin

Sebanyak 20 mg sampel dan ditambahkan etanol sampai sampel terendam seluruhnya. Kemudian dipindahkan 1 mL larutan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%. Terbentuk warna merah kecoklatan pada pengujian ini menunjukkan adanya senyawa tanin.

e. Identifikasi Terpenoid/ Steroid

Sebanyak 5 mg sampel dalam 2-3 mL kloroform, kemudian ditambahkan 10 tetes asetat anhidrida dan 2-3 tetes H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung. Terbentuk warna hijau pada pengujian ini menunjukkan adanya senyawa terpenoid/steroid.

6. Identifikasi Senyawa Flavanoid dengan KLT

Identifikasi senyawa penanda yang terkandung dalam ekstrak metanol tanaman pandan wangi dilakukan secara kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa penanda dalam ekstrak larut metanol pandan wangi menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Bagian-bagian yang digunakan untuk KLT antara lain fase gerak, fase diam, dan *developing chamber*. Fase diam dapat berupa plastic, kaca ataupun *aluminium foil* yang dilapisi dengan absorben silika aluminium oksida dan selulosa. Sedangkan fase gerak yaitu suatu pelarut atau campuran dari beberapa pelarut atau solvent serta *developing chamber* yang berfungsi sebagai tempat elusi berlangsung. Senyawa penanda dalam ekstrak yang diidentifikasi pada penelitian ini yaitu

kuarsetin. Identifikasi senyawa flavonoid dengan KLT dilakukan dengan beberapa tahap :

a. Optimasi penggunaan berbagai macam fase gerak

Pada uji KLT ini, dilakukan optimasi terlebih dahulu untuk menentukan fase gerak yang dapat digunakan dalam memisahkan senyawa dalam sampel. Dari hasil optimasi tersebut, diperoleh fase gerak yang paling optimal yaitu butanol : asam asetat : air (6:2:2) yang menunjukkan terbentuknya bercak berwarna kuning yang memiliki nilai R_f hampir sama antara ekstrak pandan wangi dan kuarsetin.

Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini

- 1) Butanol : asam asetat: air (6:2:2)
- 2) Kloroform : metanol (8:2)
- 3) Kloroform : metanol (9,5:0,5)

b. Penjenuhan bejana

Fase gerak yang digunakan Butanol : asam asetat : air (6:2:2) (Dwi Puspitasari & Proyogo, 2017). Dimasukkan ke dalam chamber kemudian didiamkan hingga 24 jam. Setelah didiamkan selama 24 jam, diukur kertas saring 10 cm di masukkan ke dalam chamber. Tutup rapat dan biarkan kertas saring terbatas oleh fase gerak untuk menandakan chamber telah jenuh (Istiqomah, 2013).

c. Pembuatan larutan uji dan Prosedur KLT

Preparasi ekstrak pandan wangi dilakukan dengan cara melarutkan 500 mg ekstrak pandan wangi dalam 5 mL metanol (5%) kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 5 menit. Ekstrak cair tersebut selanjutnya ditotolkan pada fase diam silika gel GF₂₅₄ menggunakan *white tip*. Sebelumnya fase diam silika gel diaktifkan pada oven dengan suhu 100° C selama 30 menit yang bertujuan untuk menghilangkan pengotor dan air yang masih terdapat dalam plat KLT. Kemudian plat KLT dilusikan pada fase gerak (butanol : asam asetat : air) yang telah dijenuhkan sebelumnya di dalam *chamber* selama 24 jam (Kemenkes RI, 2017; Hal. 407-408). Setelah chamber yang berisi fase

garak jenuh, di masukkan plat KLT tutup di tunggu hingga eluen naik. Di ambil lalu di keringkan plat KLT kemudian di amati noda dibawah sinar *UV* pada panjang gelombang 366 nm, 254 nm dan penyemprotan AlCl_3 . Dihitung nilai R_f (*Reterdation Factor*) (Istiqomah, 2013).

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh analit}}{\text{Jarak tempuh pelarut}}$$

7. Uji aktivitas peredaman radikal bebas terhadap DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH (40 ppm)

Sebanyak 4 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL metanol *p.a* (sebagai pelarut) lalu dimasukkan ke dalam labu ukur. Pengerjaan dilakukan pada wadah gelap dan kondisi yang terhindar dari cahaya (Fauzi *et al.*, 2021).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk menentukan panjang gelombang antara DPPH dan senyawa antioksidan yang memberikan absorbansi yang optimum. Larutan yang digunakan adalah 3 mL DPPH di masukkan ke dalam kuvet, dengan menggunakan blanko metanol *p.a*, kuvet dimasukkan ke dalam spektrofotometri *UV-Vis*. Kemudian dilakukan skrinning panjang gelombang pada rentang 400-600 nm agar absorbansi berada pada rentang $\pm 0,2-0,8$ (Fauzi *et al.*, 2021). Diperoleh nilai absorbansi maksimal yaitu pada panjang gelombang 515 nm.

c. Penentuan *Operating time*

Operating time bertujuan untuk mengetahui waktu yang tepat dilakukannya pengukuran absorbansi, dimana pada waktu tersebut telah terjadi reaksi yang optimal. Diambil sebanyak 50 μL vitamin C ditambahkan 4000 μL larutan DPPH 40 ppm kemudian diukur absorbansinya pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 dan 60 pada panjang gelombang maksimum 515 nm (Fauzi *et al.*, 2021). DPPH stabil pada waktu inkubasi 30 menit.

d. Pembuatan larutan uji pembanding vitamin C

Ditimbang dengan seksama vitamin C 10 mg dan dilarutkan dalam 100 mL metanol *p.a* (100 ppm). Kemudian dikocok hingga homogen. Dari larutan induk vitamin C, kemudian masing-masing larutan uji dipipet dengan konsentrasi yaitu 2, 4, 6, dan 8 ppm. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan sebanyak 1 mL DPPH dan volume dicukupkan dengan metanol *p.a* hingga 5 mL lalu dihomogenkan. Masing-masing larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dikocok hingga homogen. Ditungkat dengan aluminium foil lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dan diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang 515 nm. Sebelumnya dilakukan orientasi dengan menggunakan seri konsentrasi 4 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 15 ppm. Orientasi ini dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi yang sesuai sehingga data penelitian yang diperoleh akan lebih relevan. Vitamin C digunakan untuk pembandingan karena vitamin C memiliki aktivitas yang sangat kuat, serta salah satu antioksidan alami yang relatif aman dan tidak menimbulkan toksisitas. (Fauzi *et al.*, 2021; Hal. 4) (Lung & Destiani, 2018; Hal. 54).

e. Larutan Uji Ekstrak Pandan Wangi (Aji sulandi & Rafika Sari, 2013)

Ditimbang dengan seksama ekstrak pandan wangi 10 mg dan dilarutkan dalam 100 mL metanol *p.a* (100 ppm) kemudian dikocok hingga homogen. Dari larutan uji ekstrak pandan wangi, kemudian masing-masing larutan uji di pipet dengan konsentrasi yaitu 10, 15, 20, dan 25 ppm. Sebelumnya dilakukan orientasi konsentrasi 5, 10, 25, 50 ppm. Kemudian, dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan sebanyak 1 mL DPPH. Kemudian, volume dicukupkan dengan metanol *p.a* hingga 5 mL lalu dihomogenkan. Masing-masing larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dikocok hingga homogen. Ditungkat dengan aluminium foil lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dan diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang 515 nm. Perhitungan Nilai IC_{50}

Dihitung nilai IC_{50} berdasarkan presentase penghambatan terhadap

radikal DPPH dari berbagai konsentrasi larutan. Maka didapat sebuah persamaan garis regresi linier $y = a + bx$. Nilai y diganti menjadi 50, sehingga nilai x merupakan nilai IC_{50} .

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Uji aktivitas peredaman radikal bebas menggunakan metode DPPH dinyatakan dengan nilai IC_{50} (*Inhibitor Concentration 50%*). Nilai IC_{50} adalah konsentrasi sampel yang dapat menangkap 50% radikal bebas. Persen inhibisi dihitung menggunakan rumus, sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100\%$$

Kemudian diperoleh presentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, selanjutnya dilakukan perhitungan regresi linier (x, y), dimana x sebagai konsentrasi dan y sebagai presentasi aktivitas yang dinyatakan dengan % maka dari perhitungan ini diperoleh rumus $y = bx + a$. apabila nilai IC_{50} kecil, maka aktivitas peredaman radikal bebas semakin rendah (Yuermaileni, 2018).

Tabel 3. Tingkat Kekuatan Antioksidan (Yuermaileni, 2018)

Nilai IC_{50}	Kekuatan Antioksidan
<50 ppm	Sangat kuat
50 – 100 ppm	Kuat
100 – 150 ppm	Sedang
151 – 200 ppm	Lemah

Kemudian data yang sudah diperoleh dari nilai IC_{50} dianalisis secara uji statistika menggunakan *software* SPSS untuk membandingkan ekstrak metanol daun pandan wangi dan vitamin C. Hasil normalitas dapat dilihat kesignifikan ($p > 0,05$) dari nilai IC_{50} ekstrak metanol daun pandan wangi dan nilai IC_{50} vitamin C menggunakan metode *Shapiro Wilk*. Apabila sudah terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan menggunakan uji *statistic T-Test*. Uji *statistic T-Test* dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan antara sampel daun pandan wangi dengan larutan standar vitamin C yang berbeda dengan hasil nilai signifikan ($p < 0,05$)