

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi tanaman

Determinasi daun pandan wangi dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada pada tanggal 4 Oktober 2021 dengan nomor surat 0141094/S.Tb./X/2021. Hasil determinasi menunjukkan bahwa daun pandan wangi yang digunakan untuk penelitian ini adalah spesies dari *Pandanus amaryllifolius* (Lampiran 1).

2. Persiapan sampel daun pandan wangi

Penyiapan simplisia daun pandan wangi dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu :

- a. Tahap pemanenan atau pengumpulan simplisia, yang dilakukan pada pagi hari pukul 06.00-08.00 WIB dengan dipetik daun pandan wangi berwarna hijau muda usia sekitar kurang lebih 3-4 bulan hingga diperoleh sebanyak ± 5 kg, pemanenan dilakukan pada pagi hari karena senyawa flavonoid yang terkandung pada daun masih banyak, apabila pemanenan dilakukan pada siang hari maka senyawa flavonoid pada daun dapat berkurang (Dwi Puspitasari & Proyogo, 2017).
- b. Tahap sortasi basah, untuk memisahkan benda asing atau kotoran yang menempel pada daun pandan wangi dengan cara membuang bagian yang tidak layak untuk digunakan.
- c. Proses pencucian, simplisia dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel pada daun pandan wangi.
- d. Tahap pemotongan, untuk mempercepat proses pengeringan, karena semakin kecil ukuran simplisia maka luas permukaannya akan semakin besar dan mempermudah simplisia menjadi kering.
- e. Tahap pengeringan, untuk menghindari adanya kerusakan sampel karena pertumbuhan mikroorganisme dan tidak mudah rusak jika disimpan dalam waktu yang lama. Pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu

50⁰ C karena senyawa antioksidan tidak tahan terhadap panas yang tinggi (Mitter, 2017).

- f. Tahap penyerbukan, simplisia kering daun pandan wangi diserbuk menggunakan grinder. Tujuan penyerbukan adalah untuk memperbesar luas permukaan simplisia sehingga penyarian simplisia juga lebih optimal, karena semakin kecil ukuran partikel maka luas permukaan simplisia yang kontak langsung dengan pelarut akan lebih besar dan memudahkan untuk menarik bahan kimia. Kemudian, diayak menggunakan ayakan mesh 40 dengan ukuran partikel 425 μm , untuk memudahkan proses penyarian saat melakukan ekstraksi dan mempermudah proses penarikan senyawa aktif pada simplisia oleh pelarut yang digunakan (Maria, 2017).

3. Ekstraksi Daun Pandan Wangi

Pada penelitian ini ekstraksi daun pandan wangi dilakukan dengan metode maserasi, pelarut yang digunakan adalah metanol dengan perbandingan 1:10 b/v yaitu 200 gram serbuk pandan wangi dalam 2 liter pelarut. Pelarut lalu diaduk kemudian ditutup rapat dibiarkan ditempat gelap. Pengadukan dilakukan pada 6 jam pertama kemudian dibiarkan selama 18 jam. Dibiarkan ditempat gelap agar senyawa antioksidan tidak rusak oleh cahaya. Dilakukan remaserasi dengan menyaring menggunakan kain mori kemudian diberi pelarut 2 liter. Dimasukkan ekstrak tanaman pandan wangi ke dalam *rotary evaporator* menggunakan suhu 50^o C agar senyawa flavanoid tidak rusak oleh pemanasan. Ditimbang ekstrak yang telah dipekatkan, proses ekstraksi menghasilkan ekstrak kental daun pandan wangi sebanyak 102,574 gram.

Eksrak daun pandan wangi yang diperoleh selanjutnya di hitung berat rendemen ekstrak. Diketahui bahwa hasil rendemen ekstrak daun pandan wangi memiliki berat sebesar 51,287% b/b. Artinya, dalam 100 gram bahan baku dapat menghasilkan ekstrak 51,287 gram. Hasil rendemen yang diperoleh telah sesuai dengan teori, menurut Farmakope nilai rendemen ekstrak adalah tidak kurang dari 24,6% b/v (Kemenkes RI, 2017). Perhitungan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rendemen

Sampel	Berat sampel (g)	Volume pelarut (L)	Berat ekstrak kental (g)	Rendemen (% b/b)	Teori (% b/v) (Kemenkes RI, 2017)
Daun pandan wangi (<i>Pandanus amaryllifolius</i>)	200	2	102,574	51,287	24,6

4. Hasil uji organoleptik

Ekstrak daun pandan wangi yang telah dikentalkan kemudian dilakukan pengujian organoleptik. Pengujian ini bertujuan untuk mengidentifikasi ciri khas dari ekstrak. Fungsi dari uji organoleptik untuk mengetahui suatu ekstrak rusak atau tidak setelah mengalami berbagai proses dan penyimpanan yang dapat mempengaruhi mutu. Berdasarkan hasil uji organoleptik, ekstrak metanol daun pandan wangi yang dibuat telah sesuai dengan teori (Kemenkes RI, 2017). Ekstrak metanol daun pandan wangi memiliki spesifikasi seperti pada tabel 5.








Tabel 5. Uji Organoleptik

Identifikasi	Hasil	Teori (Kemenkes RI, 2017)
Bentuk	Ekstrak kental	Ekstrak kental
Bau	Khas pandan wangi	Bau khas pandan wangi
Rasa	Pahit	Khas pandan wangi
Warna	Hijau pekat	Hijau tua

5. Hasil skrining fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam herba seledri. Berdasarkan hasil pengujian fitokimia, ekstrak metanol daun pandan wangi mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan steroid. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Dwi Puspitasari & Proyogo, 2017). Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol daun pandan wangi dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil Skrining Fitokimia

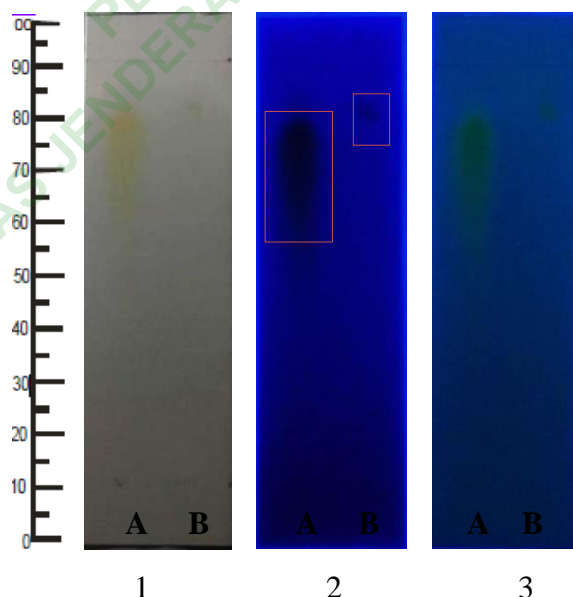
Senyawa	Hasil	Teori (Dwi Puspita & Proyogo, 2017)	Keterangan	Gambar
Alkaloid Pereaksi Mayer	Terbentuk endapan hijau kecoklatan	Terbentuk endapan hijau kecoklatan	Positif	
Alkaloid Pereaksi Wagner	Terbentuk endapan hijau kecoklatan	Terbentuk endapan hijau kecoklatan	Positif	
Alkaloid Pereaksi Dragendorf	Terbentuk endapan hijau kecoklatan	Terbentuk endapan hijau kecoklatan	Positif	
Flavonoid	Merah kecoklatan	Merah kecoklatan, dan kuning kental	Positif	
Saponin	Busa 4,5 cm	Busa setinggi 1- 10 cm	Positif	
Tanin	Hijau kehitam- hitaman	Biru tua atau hijau kehitam- hitaman	Positif	
Steroid & terpenoid	Hijau	Merah atau hijau	Positif	

6. Identifikasi Senyawa Flavanoid dengan KLT

Identifikasi senyawa penanda yang terkandung dalam ekstrak metanol tanaman pandan wangi dilakukan secara kualitatif. Metode yang digunakan dalam penelitian ini untuk analisis senyawa penanda dalam ekstrak ini yaitu 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 plastik, kaca ataupun *aluminium foil* yang dilapisi dengan absorben silika alumina 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. Pemisahan metode ini berdasarkan prinsip *like dissolve like*, yaitu didasarkan pada tingkat kepolaran analit yang dapat mempengaruhi interaksinya dengan fase diam dan fase gerak. Jika kepolaran analit sama dengan kepolaran fase gerak, maka analit akan larut dan terbawa oleh fase gerak pada permukaan fase diam. Jika interaksi analit dengan fase gerak semakin kuat, semakin jauh pula analit akan terelusi. Sebaliknya, jika kepolaran analit sama dengan fase diam, maka analit akan tertahan oleh fase diam. Metode KLT yang digunakan dalam penelitian ini yaitu secara kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa penanda dalam ekstrak larut metanol tanaman pandan wangi. Senyawa penanda dalam ekstrak yang diidentifikasi pada penelitian ini yaitu kuersetin. Pada uji KLT ini, dilakukan optimasi terlebih dahulu untuk menentukan fase gerak yang dapat digunakan dalam memisahkan senyawa dalam sampel. Hasil optimasi fase gerak dapat dilihat pada tabel 7. 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 kuersetin. Hasil KLT dapat dilihat pada gambar 11.

Tabel 7. Optimasi Penggunaan Fase Gerak

No	Fase Gerak	Hasil
1	Butanol : Asam Asetat : Air (6:2:2)	Konsentrasi kuarsetin 1%, sehingga bercak yang terlihat pada kuarsetin terlalu pekat.
2	Butanol : Asam Asetat : Air (6:2:2)	Terlihat noda pada ekstrak metanol pandan wangi, mencapai batas atas, kuarsetin terjadi terlalu pekat.
3	Kloroform : Metanol (8:2)	Kuarsetin naik tetapi sampel tidak terlihat noda.
4	Kloroform : Metanol (9,5:0,5)	Kuarsetin naik sedikit dan pekat, ekstrak metanol pandan wangi terlihat noda tetapi tidak jelas.
5	Metanol : kloroform : n-heksan (7:2:1)	Terjadi pelebaran spot, terlihat noda pada ekstrak metanol pandan wangi dan kuarsetin naik terlalu tinggi.
6	Butanol : asam asetat : air (6:2:2)	Konsentrasi yang digunakan kuarsetin 10%, bercak yang dihasilkan pada ekstrak dan kuarsetin sudah terlihat.



Gambar 11. Profil KLT ekstrak pandan wangi, keterangan : 1. Deteksi dengan sinar tampak; 2. Deteksi dengan UV 366 nm; 3. Deteksi dengan UV 254 nm. A) kuarsetin; B) ekstrak pandan wangi. Fase diam: silika Gel GF₂₅₄ ; Fase gerak n-butanol : asam asetat : air (6:2:2 v/v/v)

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 dielusikan pada fase gerak (butanol : asam asetat : air) yang telah dijenuhkan sebelumnya di dalam *chamber* selama 24 jam. Tujuan penjenuhan fase gerak di sini yaitu untuk menyamakan tekanan uap yang terjadi pada fase gerak yang digunakan sehingga pemisahan komponen senyawa dapat berjalan dengan baik.

Berdasarkan hasil KLT di atas, dapat diketahui bahwa ekstrak metanol pandan wangi yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kemiripan atau mendekati nilai R_f kuersetin. Deteksi adanya senyawa kuersetin ditandai dengan pengamatan dari sinar tampak, sinar UV 366 nm, sinar UV 254 nm yang telah disemprot dengan pereaksi AlCl₃ (Gambar 11) terlihat bahwa bercak ekstrak dan standar kuarsetin berwarna kuning. Dari hasil percobaan, diperoleh nilai R_f kuersetin sebesar 0,765 dan R_f ekstrak pandan wangi sebesar 0,787. Nilai R_f yang didapatkan sudah cukup baik karena berdasarkan literatur syarat nilai R_f yang baik adalah 0,2-0,8 (Mawarda *et al.*, 2020).

7. Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas
 - a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum dilakukan untuk menentukan panjang gelombang antara DPPH dan senyawa antioksidan yang memberikan absorbansi yang optimum. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pada saat suatu senyawa yang diukur memberikan absorbansi optimum. Pengukuran memiliki sensitifitas yang tinggi pada absorbansi yang paling optimum. Perbedaan konsentrasi akan memberikan perubahan pula pada absorbansi. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mengukur larutan DPPH pada spektrofotometer UV-VIS diatur pada panjang gelombang 400-600 nm. Didapat panjang gelombang maksimum

515 nm seperti hasil penelitian sebelumnya didapatkan panjang gelombang 515 nm, banyaknya elektron yang didonorkan oleh senyawa antioksidan sebanding dengan jumlah konsentrasi sampel dalam meredam radikal DPPH sehingga nilai absorbansi sebanding dengan elektron yang didonorkan (Wulandari *et al.*, 2015). Berdasarkan teori panjang gelombang maksimum DPPH berada di kisaran 400-600 nm agar absorbansi berada pada rentang $\pm 0,2-0,8$ (Aji Sulandi & Rafika Sari, 2013).

b. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dilakukan untuk mengetahui waktu yang diperlukan pembanding vitamin C dan DPPH untuk bereaksi secara optimal. Fungsi penentuan *operating time* adalah untuk meminimalkan kesalahan pengukuran aktivitas antioksidan. Diukur absorbansi DPPH yang sudah ditambah dengan vitamin C menggunakan spektrofotometer *UV-VIS* pada panjang gelombang 515 nm. Penentuan *operating time* dapat dilihat dari nilai absorbansi mulai stabil atau jarak nilai absorbansi tiap waktu mulai turun. Penentuan *operating time* dilakukan selama 5-60 menit. Pengukuran absorbansi *operating time* dilakukan setiap 5 menit sekali, yaitu pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 dan 60. Hasil penentuan *operating time* didapatkan nilai absorbansi stabil pada menit ke-30 yang artinya pada menit ke-30 senyawa antioksidan sudah bereaksi dengan DPPH.

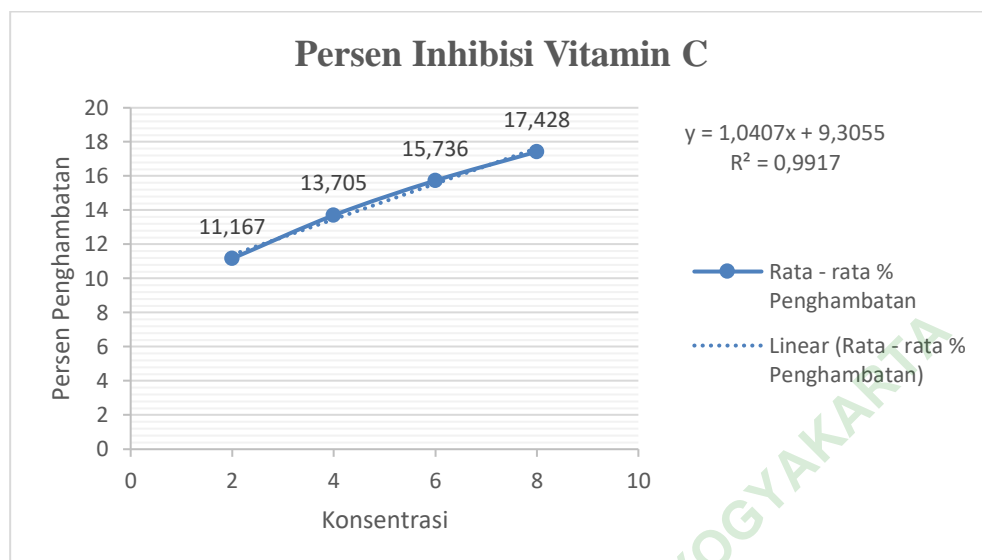
c. Uji aktivitas peredaman radikal bebas vitamin C

Uji aktivitas peredaman radikal bebas ekstrak daun pandan wangi dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*). Pembanding yang digunakan pada metode ini adalah vitamin C. Pada uji aktivitas peredaman radikal bebas dengan reagen DPPH digunakan konsentrasi DPPH sebesar 40 ppm. Pada penelitian ini, dilakukan terlebih dahulu orientasi penentuan seri konsentrasi dari vitamin C. Orientasi ini dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi yang sesuai sehingga data penelitian yang diperoleh akan lebih relevan. Berdasarkan hasil orientasi untuk seri konsentrasi yang digunakan adalah 2 ppm, 4 ppm,

6 ppm, dan 8 ppm. Sebelumnya dilakukan orientasi dengan menggunakan seri konsentrasi 4 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 15 ppm. Konsentrasi induk yang digunakan adalah 100 ppm. Hasil uji aktivitas peredaman radikal bebas vitamin C yang dinyatakan dalam persen penghambatan (Tabel 8) kemudian diplotkan terhadap konsentrasi sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = 1,0407 x + 9,3055$ (Tabel 8). Hasil tersebut digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} dan diperoleh nilai IC_{50} sebesar $0,39 \mu\text{g/mL}$, masuk ke kategori yang sangat kuat.

Tabel 8. Data Aktivitas Peredaman Radikal Bebas Vitamin C dengan DPPH

Konsentrasi Vitamin C (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-rata	% inhibisi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
2	1	0,538	0,525	11,167	39,103
	2	0,522			
	3	0,516			
4	1	0,527	0,510	13,705	
	2	0,505			
	3	0,498			
6	1	0,504	0,498	15,736	
	2	0,497			
	3	0,495			
8	1	0,501	0,488	17,428	
	2	0,496			
	3	0,468			
Absorbansi DPPH					0,591



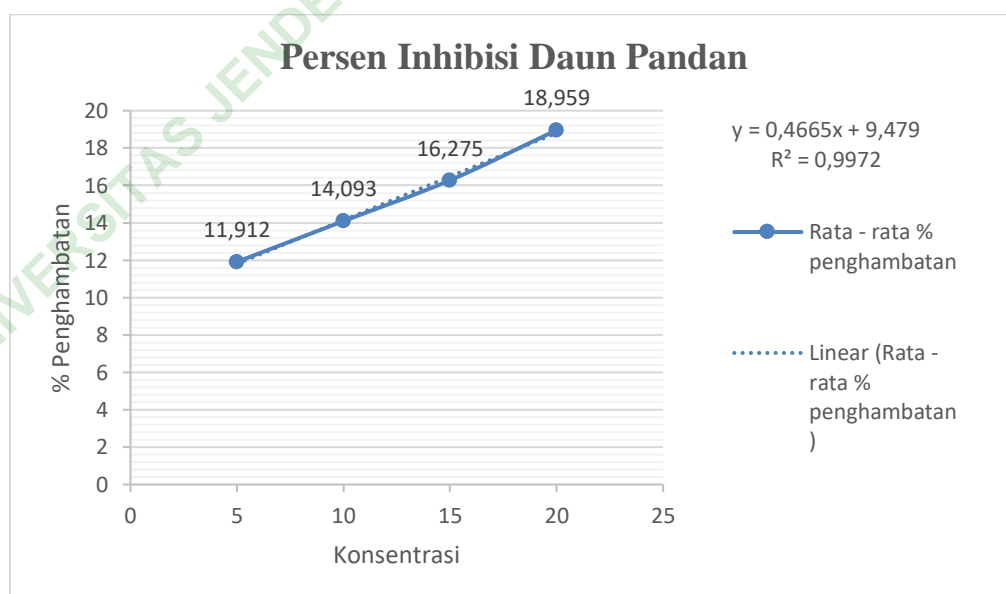
Gambar 12. Kurva Standar Vitamin C DPPH

d. Uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH ekstrak pandan wangi

Konsentrasi induk yang digunakan adalah konsentrasi 100 ppm, karena dengan konsentrasi tersebut nilai absorbansi yang diperoleh akan lebih terlihat perubahannya. Seri konsentrasi yang digunakan adalah 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, karena dengan seri konsentrasi ini nilai absorbansi yang diperoleh lebih linier dan data absorbansi tidak ekstrapolasi. Sebelumnya dilakukan orientasi dengan menggunakan seri konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm. Hasil data aktivitas peredaman radikal bebas pandan wangi yang dinyatakan dalam % peredaman radikal bebas (tabel 9) kemudian diplotkan terhadap konsentrasi sehingga diperoleh persamaan regresi linear $y = 0,467x + 9,479$. Hasil tersebut digunakan untuk menghitung IC_{50} dan diperoleh hasil sebesar 86,861 $\mu\text{g/mL}$. Nilai ini didapatkan dari persamaan regresi linear konsentrasi sebagai sumbu x dan persen inhibisi sebagai sumbu y. Semakin kecil nilai IC_{50} artinya semakin kuat senyawa antioksidan dalam menangkal radikal DPPH. Hal ini berarti untuk menghilangkan 50% aktivitas radikal DPPH diperlukan konsentrasi ekstrak metanol diperoleh adalah 86,861 $\mu\text{g/mL}$, artinya sampel ekstrak metanol pandan wangi masuk dalam kategori kuat.

Tabel 9. Data Aktivitas Peredaman Radikal Bebas Ekstrak Pandan Wangi

Konsentrasi Vitamin C (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-rata	% Inhibisi	IC ₅₀ (µg/mL)
5	1	0,528	0,525	11,912	86,861
	2	0,524			
	3	0,523			
10	1	0,515	0,512	14,093	
	2	0,513			
	3	0,509			
15	1	0,500	0,499	16,275	
	2	0,499			
	3	0,498			
20	1	0,501	0,483	18,959	
	2	0,476			
	3	0,473			
Absorbansi DPPH					0,596

**Gambar 13. Kurva Ekstrak dan DPPH**

Tabel 10. Tingkat Kekuatan Antioksidan Vitamin C, Ekstrak Metanol Pandan Wangi dengan Metode DPPH

Sampel	Kekuatan Antioksidan				
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Sangat kuat ($<50\mu\text{g/mL}$)	Kuat (50-100 $\mu\text{g/mL}$)	Sedang (100-150 $\mu\text{g/mL}$)	Lemah (151-200 $\mu\text{g/mL}$)
Vitamin C	39,103	√			
Ekstrak metanol daun pandan wangi	86,861		√		

Kemudian dilakukan analisis statistik menggunakan SPSS *Software* seri tipe 2019 versi 26 dari nilai IC₅₀ pada ekstrak metanol daun pandan wangi dan vitamin C tersebut. Dilakukan uji normalitas untuk mengetahui data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Berdasarkan (lampiran 6) hasil uji normalitas menggunakan metode *Shapiro-Wilk* karena data yang digunakan kurang dari 50 yaitu terdiri dari 2 variabel, hasilnya menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ tersebut terdistribusi normal dengan hasil nilai tersignifikan ($p > 0,05$) yaitu pada ekstrak metanol daun pandan wangi (0,544) dan vitamin C (0,830). Selanjutnya, untuk hasil uji homogenitas menggunakan *Levene test* karena uji homogenitas bertujuan untuk mengetahui variasi beberapa data dari populasi memiliki varian sama atau tidak. Uji homogenitas digunakan sebagai salah satu syarat, walaupun bukan syarat mutlak, artinya jika data tidak homogen uji *independent T-test* tetap dapat digunakan, namun pengambilan keputusan mengacu pada hasil *equal variance not assumed*. Hasil dari uji homogenitas menunjukkan bahwa data tersebut homogen dengan hasil nilai signifikan ($p > 0,05$). Kemudian, dilanjutkan dengan uji *T-test* untuk mengetahui adanya perbedaan antara sampel dengan standar, berdasarkan hasil uji tersebut menandakan bahwa aktivitas peredaman radikal bebas antara ekstrak metanol daun pandan wangi dengan vitamin C berbeda secara signifikan.

Tabel 11. Analisis Statistik SPSS Software Ekstrak Pandan dan Vitamin C

Uji Analisis Statistik SPSS	Nilai Signifikan	Keterangan
Normalitas (<i>Shapiro Wilk</i>)	$P > 0,05$	Normal
Homogenitas (<i>Loveno Test</i>)	$P > 0,05$	Homogen
Statistik <i>T-test</i>	$P < 0,05$	Terdapat perbedaan antara ekstrak pandan wangi dan vitamin C

B. Pembahasan

Tahap awal dilakukannya penelitian adalah dengan melakukan determinasi tanaman. Determinasi tanaman merupakan tahapan untuk membandingkan suatu tanaman dengan tanaman yang telah dikenal sebelumnya, yang bertujuan untuk memastikan kebenaran identitas tanaman yang akan digunakan untuk penelitian, sehingga dapat dihindari adanya kesalahan pengumpulan bahan yang akan diteliti. Berdasarkan hasil determinasi, dapat di buktikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*). Bahan yang digunakan untuk determinasi adalah daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) yang meliputi bagian daun, batang dan akar. Hasil dari identifikasi tanaman pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) dapat dilihat di Lampiran 1.

Daun pandan wangi yang digunakan sebagai bahan penelitian dikumpulkan dari daerah Banjarnegara, Madukara, Jawa Tengah. Daun pandan wangi diambil dalam satu kali waktu saja untuk menghindari adanya perbedaan kualitas kandungan kimia dalam daun pandan wangi yaitu pada bulan Oktober. Pemanenan daun pandan wangi dilakukan pada pagi hari yang bertujuan untuk mendapatkan kandungan zat aktif yang masih optimal, karena pada pagi hari tanaman belum mengalami metabolisme (Werdhasari, 2014).

Tanaman pandan wangi yang digunakan dalam penelitian ini dikeringkan dengan oven selama 3 hari pada suhu 50°C karena senyawa antioksidan tidak tahan terhadap panas yang tinggi, sehingga pengeringan sampel tidak dilakukan menggunakan terik matahari karena dapat merusak flavonoid sebagai antioksidan dan terhindar dari debu atau kotoran lain di udara terbuka (Utomo *et al.*, 2020).

Sampel dapat dikatakan kering apabila ketika di remas dengan tangan simplisia dapat hancur. Pengeringan sampel bertujuan untuk menghindari adanya kerusakan sampel karena adanya pertumbuhan mikroorganisme dan agar sampel tidak mudah rusak jika disimpan dalam waktu yang lama. Setelah simplisia kering kemudian dilakukan penyerbukan dengan menggunakan grinder simplisia. Tujuan dari penyerbukan adalah untuk memperbesar luas permukaan simplisia sehingga penyarian simplisia juga lebih optimal, karena semakin kecil ukuran partikel maka luas permukaan simplisia yang kontak langsung dengan pelarut akan lebih besar dan memudahkan untuk menarik senyawa kimia. Simplisia yang telah menjadi serbuk selanjutnya di ayak menggunakan ayakan 40 mesh (Prameswari & Widjanarko, 2014). Serbuk yang diperoleh kemudian di timbang sebanyak 200 gram, selanjutnya dilakukan proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Perendaman dilakukan selama 1 x 24 jam, di aduk pada 6 jam pertama dan didiamkan selama 18 jam. Pengadukan dilakukan agar larutan tidak jenuh serta agar pelarut bisa menembus dinding sel pada daun pandan wangi sehingga zat aktif yang keluar lebih banyak (Kemenkes RI, 2017). Metode maserasi digunakan karena tidak menggunakan suhu yang tinggi sehingga dapat memperkecil kemungkinan adanya kerusakan ekstrak karena proses pemanasan (Susanty & Bachmid, 2016). Metanol dipilih sebagai pelarut karena metanol memiliki tingkat kepolaran yang cukup tinggi, dan senyawa yang akan di tarik juga memiliki tingkat kepolaran yang tinggi yaitu senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid memiliki kepolaran yang tinggi karena senyawa ini memiliki gugus hidroksi pada strukturnya. Tingkat kepolaran ini yang menjadi alasan menggunakan pelarut metanol. Selanjutnya, dilakukan proses remaserasi sebanyak 2 kali untuk memastikan bahwa tidak ada zat aktif yang tertinggal dalam ampas daun pandan. Filtrat yang diperoleh kemudian di *rotary evaporator* pada suhu 50⁰C hingga menjadi ekstrak kental. Hasil dari ekstrak yang diperoleh adalah sekitar 102,574 gram dan hasil randemennya adalah 51,2871%. Hasil rendemen yang diperoleh telah sesuai dengan teori, menurut Farmakope nilai rendemen ekstrak adalah tidak kurang dari 24,6% (Kemenkes RI, 2017). Hasil dari nilai rendemen dapat digunakan sebagai indikator banyaknya komponen zat aktif yang terkandung di dalam ekstrak,

karena semakin tinggi nilai rendemen maka semakin banyak kandungan zat aktif yang tertarik dari sampel (Susanty & Bachmid, 2016).

Uji organoleptik dilakukan untuk mengidentifikasi ciri khas dari ekstrak pandan wangi. Fungsi dari uji organoleptik untuk mengetahui suatu ekstrak rusak atau tidak setelah mengalami berbagai proses dan penyimpanan yang dapat mempengaruhi mutu. Berdasarkan hasil uji organoleptik, ekstrak pandan wangi memiliki spesifikasi bentuk berupa ekstrak kental, bau khas pandan wangi dan rasa pahit yang khas serta memiliki warna hijau tua. Ekstrak pandan wangi yang dibuat telah sesuai dengan teori (Kemenkes RI, 2017).

Selanjutnya, dilakukan pengujian fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak tanaman pandan wangi berupa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan terpenoid. Pada pengujian alkaloid ketiga ekstrak pandan wangi menunjukkan hasil positif dengan menggunakan pereaksi wagner, dragendorf dan mayer. Pengujian alkaloid diasamkan menggunakan HCL 2N karena senyawa alkaloid bersifat basa sehingga membentuk garam. Hasil positif jika terdapat endapan yang terbentuk akibat pengompleksan atom nitrogen sampel bereaksi dengan ion logam K^+ pada pereaksi. Uji alkaloid dengan pereaksi mayer dilakukan dengan penambahan merkuri (II) klorida ke dalam kalium iodida menyebabkan terbentuknya kalium tetraiodomerkurat (II) yang bereaksi dengan senyawa alkaloid sehingga terjadi endapan coklat merkuri (II) iodida. Pada uji alkaloid dengan pereaksi dragendorf hasil positif jika terjadi endapan hijau kecoklatan akibat ikatan kovalen antara K^+ pada kalium tetraiodobismut pereaksi dan atom nitrogen pada alkaloid. Pada uji alkaloid dengan pereaksi wagner hasil positif jika terbentuk endapan coklat akibat adanya ikatan kovalen K^+ dan atom nitrogen. Sedangkan warna coklat ditimbulkan I^- kalium iodida bereaksi dengan iodin (I_2) menjadi I_3^- . Hasil pengujian ekstrak pandan wangi mengandung alkaloid, hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Dwi Puspitasari & Proyogo (2017). Uji flavonoid dilakukan dengan mereaksikan ekstrak dengan serbuk magnesium dan HCL 2N, magnesium dan HCL digunakan untuk memutus ikatan antara glikosida dan flavonoid sehingga akan membentuk garam flavium yang berwarna merah, jingga hingga kuning. Hasil dari percobaan ekstrak

tanaman pandan wangi mendapatkan perubahan warna menjadi merah, hal ini menjadi salah satu tanda bahwa ekstrak pandan wangi mengandung flavonoid, sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wulandari yang memperoleh hasil positif (Dwi Puspitasari & Proyogo, 2017). Pada uji saponin, ekstrak dilarutkan dengan air panas dan dikocok kuat selama 10 detik, hasil yang diperoleh adalah busa setinggi 4,5 cm, sesuai dengan penelitian yang dilakukan Wulandari bahwa ekstrak pandan wangi positif mengandung saponin (Dwi Puspitasari & Proyogo, 2017). Pada uji tanin, ekstrak direaksikan dengan FeCl_3 dan mengalami reaksi perubahan warna menjadi hijau kehitaman, terjadinya reaksi ini karena adanya gugus fenol dalam ekstrak pandan yang bereaksi dengan FeCl_3 sehingga akan terjadi perubahan warna menjadi biru tua atau hijau kehitaman (Dwi Puspitasari & Proyogo, 2017). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Dwi Puspitasari & Proyogo bahwa ekstrak pandan wangi positif mengandung tanin. Pengujian steroid dan terpenoid dilakukan dengan menambahkan asam asetat anhidrida untuk memutus gugus lain dengan gugus steroid dan terpenoid. H_2SO_4 pekat ditambahkan untuk memutus ikatan gula sehingga hasil positif akan berwarna merah atau hijau. Hasil pengujian ekstrak metanol pandan wangi mengandung senyawa steroid berwarna hijau karena steroid bereaksi dengan asam terjadi reaksi asetilasi gugus $-\text{OH}$. Steroid senyawa non polar, penambahan asam asetat anhidrida agar terbentuk turunan asetil sedangkan H_2SO_4 pekat untuk menghidrolisis air sehingga membentuk warna karena senyawa steroid teroksidasi melalui ikatan rangkap terkonjugasi. Hasil yang diperoleh berwarna hijau menandakan bahwa ekstrak tanaman pandan wangi positif mengandung steroid (Dwi Puspitasari & Proyogo, 2017).

Selanjutnya, dilakukan identifikasi kandungan senyawa flavonoid pada daun pandan wangi menggunakan metode KLT. Kuarsetin digunakan sebagai pembanding karena kuarsetin terhadap antioksidan mampu mencegah oksidasi dengan menangkal radikal bebas sehingga dapat membantu dalam pencegahan seperti penyakit degeneratif dan kuarsetin termasuk dalam senyawa flavonoid golongan flavonol, golongan flavanol sama seperti flavonoid yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa antioksidan, sehingga senyawa yang akan

diidentifikasi sama sebagai pembanding (Putri, 2014). Prinsip kerja dari KLT adalah suatu proses pemisahan senyawa kimia menggunakan fase gerak dan fase diam. Fase diam yang digunakan dalam penelitian ini adalah silika gel GF₂₅₄ yang bersifat polar, dipilih silika gel GF₂₅₄ karena silika gel ini akan berfluorensi pada sinar UV 254. Fase diam sebelum digunakan harus di oven pada suhu 100⁰C selama 30 menit untuk meningkatkan daya serap plat dengan menghilangkan kandungan air yang terdapat dalam plat (Mawarda *et al.*, 2020). Fase gerak yang digunakan adalah n-butanol (polar): asam asetat (polar): air (polar) dengan perbandingan 6:2:2. Pemilihan fase gerak ini karena senyawa yang akan diidentifikasi adalah senyawa yang polar yaitu flavonoid, sehingga agar senyawa tersebut dapat terelusi membutuhkan fase gerak yang memiliki kepolaran yang tinggi. Pada penelitian ini sebelumnya telah dilakukan pemilihan penentuan fase gerak yang sesuai terlebih dahulu agar bercak yang diperoleh dapat di amati dengan baik. Tujuan dari pemilihan fase gerak ini adalah melakukan percobaan dengan beberapa fase gerak hingga diperoleh fase gerak yang sesuai agar diperoleh hasil yang baik.

Senyawa flavonoid akan tampak berwarna kuning pada sinar UV. Sebelum disemprotkan dengan pereaksi AlCl₃ diamati pada sinar tampak, UV 366 nm dan UV 254 nm yang terlihat bahwa bercak noda pada ekstrak metanol daun pandan wangi berwarna kuning, sedangkan bercak noda pada kuersetin berwarna kuning kecoklatan. Analisis dilanjutkan dengan menggunakan pereaksi AlCl₃, karena pereaksi tersebut akan menghasilkan bercak noda yang berwarna kuning untuk mengidentifikasi suatu senyawa flavonoid pada sampel. Hasil setelah penyemprotan menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun pandan wangi memiliki bercak noda berwarna kuning yang menyatakan bahwa positif mengandung senyawa flavonoid yakni golongan flavonol berupa kuersetin dengan nilai Rf sampel sebesar 0,787 sedangkan nilai Rf kuersetin 0,768. Pada hasil bercak yang terbentuk melebar, untuk menghitung hasil nilai Rf tersebut dengan cara membentuk gambar persegi dibagian spot, kemudian ditarik garis miring dari sudut garis persegi kemudian akan ada titik tengah dari garis tersebut, titik tengah digunakan untuk menghitung nilai Rf. Berdasarkan penelitian Quen (2019) nilai Rf yang baik yaitu pada kisaran 0,2 – 0,8. Berdasarkan nilai Rf yang diperoleh bahwa ekstrak metanol

daun pandan wangi hampir memiliki kemiripan atau mendekati nilai kuersetin standar artinya ekstrak metanol daun pandan wangi hampir sama dengan kuersetin standar. Nilai Rf dapat dijadikan bukti identifikasi suatu senyawa dikatakan mirip atau memiliki karakteristik yang sama dengan pembanding apabila memiliki nilai Rf yang sama. Menurut Aji Sulandi & Rafika Sari (2013) selain dari nilai Rf yang diperoleh, identifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak pandan wangi menggunakan KLT dapat dilihat dari warna bercak noda ekstrak pandan wangi yang dihasilkan. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak pandan wangi mengandung senyawa flavonoid (Kusnadi & Devi, 2017). Kandungan kuersetin pada pandan wangi dapat menjadi indikator bahwa pandan wangi memiliki sifat peredaman radikal bebas yang kuat (Suryani *et al.*, 2018).

Pada penelitian ini, uji aktivitas peredaman radikal bebas yang akan dilakukan adalah dengan metode DPPH (*1,1-difenil-2-Pikrilhidrazil*). Metode ini memiliki mekanisme kerja dengan menangkap radikal bebas, pengukuran aktivitas peredaman radikal bebas metode DPPH dapat menggunakan alat spektrofotometri *UV-Vis*. Evaluasi hasilnya dengan menggunakan nilai IC_{50} , dimana semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas peredaman radikal bebas juga semakin besar. Pembanding yang digunakan dalam penelitian ini adalah vitamin C, karena vitamin C dikenal sebagai senyawa peredaman radikal bebas yang mampu untuk menangkal adanya radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai (Sayuti & Yenrina, 2015). Pada penelitian ini sebelumnya telah dilakukan pemilihan penentuan konsentrasi larutan DPPH, penentuan seri konsentrasi pada vitamin C dan ekstrak menggunakan metode DPPH. Tujuan dilakukan pemilihan seri konsentrasi pada penelitian adalah agar diperoleh data yang linier dan tidak mengalami ekstrapolasi data, sehingga data yang digunakan lebih relevan.

Metode DPPH dikenal sebagai metode yang sederhana, mudah, akurat, dan hanya menggunakan sampel yang sedikit serta waktu yang relatif singkat. Selain itu metode DPPH ini hanya membutuhkan sampel yang sedikit. Prinsip dari metode DPPH adalah adanya interaksi antara senyawa peredaman radikal bebas dengan DPPH sebagai radikal bebas, yang bekerja melalui transfer elektron atau pun hidrogen yang dapat menetralkan radikal bebas DPPH. (Marjoni & Zulfisa, 2017).

Pada metode DPPH penangkapan radikal bebas oleh suatu senyawa dapat diketahui dengan adanya penurunan absorbansi larutan DPPH pada panjang gelombang maksimum. Penurunan absorbansi DPPH dapat turun karena adanya kemampuan suatu senyawa untuk menangkap radikal bebas sehingga senyawa radikal menjadi lebih sedikit. Selain itu, dapat juga di amati dari perubahan warna yang terjadi, DPPH memiliki warna ungu yang cukup pekat, apabila DPPH ditambahkan dengan senyawa peredaman radikal bebas maka warna ungu dari DPPH akan mengalami perubahan menjadi sedikit pudar karena adanya aktivitas penangkapan radikal bebas.

Larutan DPPH dibuat dengan pelarut metanol *p.a.* Pemilihan metanol *p.a.* sebagai pelarut karena serbuk DPPH mudah larut dengan pelarut polar seperti metanol. Pembuatan larutan induk DPPH harus dilakukan di tempat yang gelap yaitu dengan melapisi labu ukur dengan aluminium foil, agar larutan tidak terkena cahaya secara langsung, karena jika terkena cahaya larutan DPPH akan mudah rusak dan menjadi tidak stabil. Selanjutnya, dilakukan skrining panjang gelombang larutan DPPH dari 400-600 nm, berdasarkan hasil skrining diperoleh bahwa panjang gelombang maksimum DPPH adalah 515 nm, hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Wulandari bahwa panjang gelombang maksimum DPPH adalah 515 nm (Aji Sulandi & Rafika Sari, 2013). Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengetahui serapan maksimum DPPH, karena jika di analisis dengan panjang gelombang maksimum, maka akan meningkatkan kepekaan terhadap hasil absorbansi yang diperoleh. Setelah di peroleh panjang gelombang maksimum selanjutnya dilakukan *operating time* dengan 50 μ L vitamin C ditambahkan 4000 μ L 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, DPPH stabil pada menit ke 30, hal ini sesuai penelitian Wulandari *et al.*, (2015) bahwa *operating time* DPPH adalah selama 30 menit. *Operating time* bertujuan untuk mengetahui waktu yang tepat dilakukannya pengukuran absorbansi, dimana pada waktu tersebut telah terjadi reaksi yang optimal (Aji Sulandi & Rafika Sari, 2013). Penggunaan DPPH dengan konsentrasi 40 ppm telah dilakukan diperoleh nilai absorbansi yang tinggi. Adanya nilai

absorbansi yang tinggi sehingga konsentrasi DPPH harus diturunkan, karena jika tidak diturunkan maka bahan yang digunakan banyak yang akan terbuang, sehingga penggunaan bahan juga tidak banyak yang terbuang.

Standar vitamin C dibuat seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, dan 8 ppm. Konsentrasi induk vitamin C yang digunakan adalah 100 ppm, yaitu dengan mencampurkan 10 ml vitamin C dan ditambah 100 ml DPPH dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml dan di ad hingga tanda batas dengan metanol *p.a.* Sedangkan ekstrak pandan wangi dibuat seri konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, dan 20 ppm. Sebelumnya dilakukan optimasi dengan menggunakan seri konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, dan 50 ppm, dari hasil absorbansi yang diperoleh telah memenuhi syarat (linier) yaitu nilai absorbansi pada rentang 0,2-0,8 sehingga dilanjutkan dengan seri konsentrasi lainnya. Pada saat preparasi, semua tabung dan gelas ukur ditutup dengan aluminium foil agar terhindar dari cahaya matahari secara langsung untuk menghindari terjadinya kerusakan. Setelah di peroleh nilai absorbansi kemudian di hitung nilai % inhibisi dan dibuat persamaan regresi liniernya dengan memasukkan konsentrasi sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Persamaan regresi linier yang diperoleh dari data vitamin C adalah $y = 1,0407x + 9,3055$ dan $r = 0,995$. Sedangkan untuk ekstrak daun pandan wangi adalah $y = 0,467x + 9,479$ dan $r = 0,998$. Nilai IC_{50} diperoleh dengan menggantikan nilai y dengan angka 50, sehingga diperoleh nilai IC_{50} vitamin C sebesar 39,109 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sedangkan untuk nilai IC_{50} ekstrak sebesar 86,861 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hasil nilai IC_{50} yang diperoleh menjelaskan bahwa vitamin C masuk dalam kategori sangat kuat ($IC_{50} < 50 \mu\text{g}/\text{mL}$) dan ekstrak masuk dalam kategori kuat ($IC_{50} > 50-100 \mu\text{g}/\text{ml}$).

Pandan wangi memiliki kandungan flavonoid yang diduga memperantarai aktivitas peredaman radikal bebas. Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai antioksidan yaitu dengan menghambat pembentukan radikal DPPH. Senyawa flavonoid bekerja dengan menangkap radikal bebas, di mana akibat dari penangkapan itu akan terjadi perpindahan elektron hidrogen dari senyawa flavonoid ke radikal DPPH sehingga radikal DPPH akan menjadi senyawa yang lebih stabil sedangkan untuk senyawa flavonoid akan menjadi radikal juga, namun tetap menjadi radikal yang stabil. Mekanisme vitamin C sebagai antioksidan dengan

menangkap O_2 (anion superoksida) dan singlet oksigen. Vitamin C dapat memutus reaksi radikal bebas, aktivitas antioksidannya tinggi, dan mudah didapatkan. Vitamin C memiliki gugus hidroksi bebas yang dapat meredam radikal bebas. Jika nilai IC_{50} sampel mendekati IC_{50} vitamin C artinya sampel ekstrak tanaman pandan wangi memiliki potensi alternatif antioksidan (Lung & Destiani, 2018).

Pada penelitian yang dilakukan oleh (Suryani *et al.*, 2018), nilai aktivitas peredaman radikal bebas pada daun pandan wangi kuat, hal ini dinyatakan dari nilai IC_{50} yang di dapatkan untuk ekstrak metanol pandan wangi sebesar 51,68. Berdasarkan hasil uji normalitas dengan menggunakan metode *shapiro-Wilk*, menunjukkan nilai IC_{50} ekstrak daun pandan wangi dan vitamin C signifikan ($p > 0,05$) artinya data terdistribusi normal. Uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan metode *levene's*, berdasarkan data yang diperoleh nilai sig ($p < 0,05$) artinya data yang di gunakan homogen, sehingga pengambilan keputusan *T-test* menggunakan hasil *equal variance not assumed*. Uji Statistik *T-test* merupakan salah satu uji untuk mengetahui perbedaan antara dua sampel yang berbeda. Interpretasi data dapat dilihat dari nilai signifikan ($p < 0,05$). Uji ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan signifikan dari nilai IC_{50} ekstrak daun pandan wangi dan vitamin C. Berdasarkan hasil uji *T-test equal variance not assumed* menunjukkan bahwa aktivitas peredaman radikal bebas vitamin C dan ekstrak daun pandan wangi dengan metode DPPH berbeda secara signifikan ($p < 0,05$), artinya adanya perbedaan aktivitas peredaman radikal bebas pada ekstrak daun pandan wangi dan vitaminn C ($p < 0,05$).

Dari hasil yang didapat pada penelitian ini, dapat dibuktikan bahwa nilai IC_{50} vitamin C lebih kecil dibandingkan dengan nilai IC_{50} pada ekstrak metanol daun pandan wangi, yang artinya aktivitas peredaman radikal bebas ekstrak metanol daun pandan wangi lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas peredaman radikal bebas pada vitamin C. Aktivitas peredaman radikal bebas yang rendah kemungkinan dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti, mudah rusaknya sifat yang telah terpapar oleh oksigen, proses panen simplisia, suhu saat ekstraksi dan pemekatan ekstrak, metode ekstraksi yang kurang cukup untuk menarik suatu senyawa yang memiliki sifat antioksidan pada simplisia, dan lamanya penyimpanan ekstrak

(Yuermaileni, 2018). Perbedaan nilai IC_{50} pada vitamin C dan ekstrak metanol daun pandan wangi disebabkan karena vitamin C merupakan suatu standar yang memiliki senyawa murni dan terdapat empat gugus hidroksil dengan secara langsung akan mendonorkan satu elektronnya untuk membentuk senyawa yang tidak bersifat reaktif. Sedangkan ekstrak metanol daun pandan wangi terdapat beberapa kandungan senyawa lainnya selain senyawa yang berperan sebagai antioksidan.

Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak pandan wangi dapat dikategorikan memiliki aktivitas peredaman radikal bebas yang kuat yaitu 86,861 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini telah sesuai dengan penelitian yang dilakukan Suryani *et al.*, (2015) nilai aktivitas peredaman radikal bebas pada ekstrak pandan wangi kuat, hal ini dinyatakan dari nilai IC_{50} yang di dapatkan untuk ekstrak etanol pandan wangi sebesar 51,68 $\mu\text{g/mL}$. Selain itu, pada penelitian menurut Maria *et al.*, (2019) pengujian ekstrak pandan wangi dengan metode refluks memperoleh nilai persen penghambatan sebesar 76,84 $\mu\text{g/mL}$. Pada penelitian lain aktivitas peredaman radikal bebas ekstrak etanol pandan wangi memiliki kandungan aktivitas peredaman radikal bebas yang sangat kuat, dibuktikan dengan nilai % penghambatan yaitu 28 $\mu\text{g/mL}$ (Sheilla *et al.*, 2020). Menurut penelitian Ghasemzadeh & Jaffar (2013) daun pandan wangi menunjukkan penghambatan peredaman radikal bebas yang kuat yaitu menggunakan metode DPPH diperoleh nilai 64,27 $\mu\text{g/mL}$ dan menggunakan metode FRAP diperoleh nilai IC_{50} 51,72 $\mu\text{g/mL}$. Pada penelitian lain menggunakan metode FRAP dengan pelarut etanol dan menggunakan metode maserasi diperoleh nilai IC_{50} sebesar 30,40 $\mu\text{g/mL}$ dan metode TPTZ dengan metode refluks dengan nilai IC_{50} 118,65 $\mu\text{g/mL}$, selain FRAP penelitian ini juga menggunakan metode ABTS yang memperoleh nilai IC_{50} yang sangat kuat yaitu dengan metode maserasi 38,12 $\mu\text{g/mL}$ dan metode refluks 43,32 $\mu\text{g/mL}$ (Lister & Wilson, 2001). Selain itu, menurut Quen (2019) pengujian ekstrak etanol daun pandan wangi dengan metode ABTS menunjukkan penghambatan peredaman radikal bebas sebesar 129,327 $\mu\text{g/mL}$.