

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menerapkan uji kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif dalam penelitian ini adalah uji organoleptik, skrining fitokimia, sedangkan uji kuantitatif berupa uji kadar flavonoid total. Tujuan penelitian ini adalah untuk memisahkan senyawa pada daun pandan wangi berdasarkan kepolarannya serta untuk mengetahui kadar flavonoid total ekstrak 96% dan fraksi dari daun pandan wangi (*Pandanus amarylifolius* (Roxb.)).

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan Juni – Agustus 2024 di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian yaitu daun pandan wangi yang berasal dari dusun Prapak Kulon, Sendangmulyo, Minggir, Sleman, Yogyakarta.

2. Sampel

Daun pandan wangi yang digunakan dalam penelitian ini mulai baris ke 4-5 bagian dalam daunnya yang berwarna hijau tua dan sampel diambil pada pagi hari 09.00-11.00 WIB.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Jenis pelarut ekstrak dan fraksi daun pandan wangi ditetapkan sebagai variabel bebas dalam penelitian ini.

2. Variabel terikat

Kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi daun pandan wangi adalah variabel terikat dalam penelitian ini.

3. Variabel kontrol

Waktu panen, tempat tumbuh, bagian tanaman, kriteria pemilihan tanaman, waktu dan suhu pengeringan, waktu dan suhu ekstraksi.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun pandan wangi, diperoleh dengan teknik maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Simplisia daun pandan wangi dari dusun Prapak Kulon, Sendangmulyo, Minggir, Sleman, Yogyakarta.
2. Fraksi daun pandan wangi diperoleh dengan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air dengan metode corong pisah.
3. Senyawa kimia dalam ekstrak daun pandan wangi dapat diidentifikasi dengan skrining fitokimia yang terdiri dari flavonoid, fenolik, alkaloid, tanin, dan saponin.
4. Uji kadar flavonoid total dengan metode spektrofotometri UV-Vis, hasil yang diperoleh berupa nilai absorbansi dan diolah ulang diperoleh kadar flavonoid total dalam satuan mgQE/g.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Ayakan no 40 mesh, batang pengaduk, cawan porselin, corong kaca, corong pisah, *magnetic stirrer*, oven (*Memmert UN160*), penangas air, pipet tetes, pipet ukur, propipet, sendok tanduk, spatula, spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer*), tabung reaksi (*iwaki*), timbangan analitik (*ohaus*), wajan, dan *waterbath* (*Memmert WNB10FC*).

2. Bahan

Aquadest (teknis), AlCl_3 (p.a), amoniak (p.a), asam asetat (p.a), *bluetip*, corong kaca, Daun pandan wangi, etanol 96% (teknis), etanol (p.a), etil asetat (teknis), FeCl_3 (p.a), HCl (p.a), MgSO_4 (p.a), n-heksan (teknis), kain penyaring, kertas saring, kloroform (p.a), kuersetin (*Sigma Aldrich, St. Louis, USA*), pereaksi Dragendrof, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan sampel dan determinasi

Pada penelitian ini yang menjadi bahan utama adalah 2 kg daun pandan wangi berwarna hijau tua yang berasal dari dusun Prapak Kulon, Sendangmulyo, Minggir, Sleman, Yogyakarta. Proses determinasi dijalankan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta sebagai langkah verifikasi untuk memastikan identitas tanaman yang diuji adalah benar, serta untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan sampel atau adanya kontaminasi pada tanaman yang sedang diteliti.

2. Penyiapan sampel

2 kg daun pandan wangi dipanen pagi hari pukul 09.00 -11.00 WIB, kemudian dicuci sampai bersih menggunakan air mengalir supaya kotoran yang menempel hilang. Selanjutnya iris tipis dan dikeringkan selama 48 jam pada suhu 60°C dalam oven. Setelah pengeringan, daun kering dihaluskan menjadi serbuk menggunakan grinder hingga didapatkan serbuk simplisia yang halus. Hal ini dilakukan untuk mengecilkan ukuran partikel sehingga dapat meningkatkan kontak dengan pelarut. Kemudian dilakukan pengayakan dengan ayakan 40 mesh untuk mendapatkan simplisia yang halus dan seragam (Khotimah *et al.*, 2019).

3. Ekstraksi daun pandan wangi

Masukkan 200 g serbuk halus daun panda wangi dan pelarut etanol 96% ke dalam toples perbandingan 1:10 sehingga volume pelarut 2 L (Amini *et al.*, 2019). Campuran tersebut didiamkan selama 3 hari dan diaduk setiap 10 menit selama 24 jam untuk memastikan bahwa setiap bagian serbuk berinteraksi dengan pelarut etanol 96%. Larutan yang telah dimaserasi selanjutnya disaring menggunakan corong kaca yang dilapisi kain penyaring untuk memisahkan filtratnya. Penyaringan dilakukan kembali dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak bening dan dipekatkan dengan penangas air suhu 60°C hingga terbentuk ekstrak kental daun pandan

wangi. Rendemen ekstrak dihitung dalam persen menggunakan persamaan 1 (Syamsul *et al.*, 2020):

$$\% \text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Berat simplisia (g)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

4. Fraksinasi daun pandan wangi

Larutkan 25 gram ekstrak kental daun pandan wangi dalam 100 mL air hangat sambil diaduk hingga larut sepenuhnya (Suryani *et al.*, 2018). Larutan tersebut ditunggu hingga dingin dan dipindahkan ke wadah corong pisah dan ditambahkan 100 mL n-heksan. Pastikan tercampur rata lalu digojog dengan sesekali membuka kran corong pemisah untuk mengeluarkan uap. Diamkan sampai terjadi pemisahan (fase n-heksan diatas, fase air dibawah) dan ditampung dalam wadah terpisah. Fraksinasi diulangi dengan cara memasukkan fase air dalam corong dan tambahkan 100 mL n-heksan hingga 3 kali pengulangan. Fase tidak larut n-heksan dimasukkan kembali ke dalam corong dan tambahkan 100 mL etil asetat yang dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Diamkan hingga terjadi pemisahan fase antara fase air dan fase etil asetat. Fase air dengan densitas yang lebih tinggi akan berada pada lapisan bawah, setelah pemisahan sempurna, lakukan pemisahan fase dengan cara menampung masing-masing fase kedalam wadah yang berbeda. Fase yang tidak larut etil asetat merupakan fraksi air. Ketiga fraksi yang ditampung pada wadah terpisah dipekatkan dengan *waterbath* suhu 50 °C hingga diperoleh fraksi kental (Widayanti *et al.*, 2023). Masing-masing fraksi dihitung rendemennya dengan persamaan 2:

$$\% \text{Rendemen fraksi} = \frac{\text{Berat fraksi (g)}}{\text{berat ekstrak (g)}} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

5. Uji organoleptik

Uji organoleptik pada ekstrak dan fraksi dilakukan melalui pengamatan visual dan sensorik dari warna, bau, dan tekstur dari sampel (Depkes RI, 2000). Observasi bertujuan untuk mengidentifikasi karakteristik fisik dari ekstrak dan fraksinya.

6. Uji fitokimia

- a. Identifikasi alkaloid

50 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL kloroform p.a dan 10 mL amonia kemudian teteskan H_2SO_4 sebanyak 10 tetes (Sofiyanti & Wirdayanti, 2019). Diambil lapisan atas dan dimasukkan kedalam tiga tabung reaksi. Ketiga tabung percobaan masing-masing diberi tiga tetes reagen Wagner, Dragendorf, Mayer. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna pada masing-masing tabung. Tabung dengan reagen Dragendorf menghasilkan endapan berwarna jingga, tabung dengan reagen Mayer menghasilkan endapan berwarna putih, dan tabung dengan reagen Wagner menghasilkan endapan coklat (Pongsapan *et al.*, 2024).

b. Identifikasi flavonoid

50 mg sampel dan dicampurkan dengan 10 mL etanol p.a. Diambil filtratnya dan ditambahkan serbuk MgSO_4 bersamaan dengan 10 tetes larutan HCl pekat. Perubahan warna ke merah, orange atau kuning menunjukkan hasil positif flavonoid dalam sampel (Hadiq *et al.*, 2023).

c. Identifikasi saponin

50 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL aquadest dan dididihkan selama 2-3 menit kemudian campuran tersebut didinginkan, Apabila terbentuk gelembung stabil dengan ketinggian 1 cm atau lebih ketika dikocok berarti positif saponin (Pongsapan *et al.*, 2024).

d. Identifikasi tanin

100 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Selanjutnya, ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 10%. Masukkan ke dalam tabung reaksi, munculnya warna hijau kehitaman atau hitam kecoklatan menunjukkan positif tanin (Pongsapan *et al.*, 2024).

e. Identifikasi fenolik

50 mg sampel, lalu dilakukan pelarutan menggunakan 10 mL air panas. Ditambahkan 3-4 tetes FeCl_3 5%, warna hijau tua menandakan positif fenolik (Ningsih *et al.*, 2020).

7. Penentuan kadar flavonoid total

a. Pembuatan reagen AlCl_3 10%

1g serbuk AlCl_3 dilarutkan dalam aquadest sampai tanda batas 10 mL (Bachtiar *et al.*, 2023).

b. Pembuatan larutan CH_3COOH 5%

5 mL CH_3COOH dilarutkan dengan aquadest ditambahkan sampai 100 mL.

c. Pembuatan larutan induk standar kuersetin 1000 ppm

Sebanyak 10 mg kuersetin standar ditimbang secara presisi menggunakan neraca analitik dan dipindahkan kedalam labu ukur 10 mL. Kemudian, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas untuk mendapatkan larutan induk 1000 ppm (Bachtiar *et al.*, 2023).

d. Pembuatan larutan seri konsentrasi kuersetin

Larutan induk standar kuersetin 1000 ppm dibuat dalam konsentrasi 40, 50, 60, 70, dan 80 ppm dengan masing-masing konsentrasi dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a.

e. Penentuan panjang gelombang maksimum

Diambil 0,5 mL larutan kuersetin dengan kepekatan 60 ppm dan dicampur dengan 0,5 mL AlCl_3 10% dan 4 mL CH_3COOH 5%. Pengukuran panjang gelombang maksimal dilakukan pada interval 300 hingga 800 nm. Panjang gelombang yang diperoleh dalam penelitian ini adalah 415 nm.

f. Penetapan *operating time*

0,5 mL larutan kuersetin dengan kepekatan 60 ppm, ditambahkan 0,5 mL larutan AlCl_3 10% dan dilanjutkan dengan penambahan 4 mL CH_3COOH 5% (Rahma *et al.*, 2017). Pengukuran absorbansi dilakukan setiap 1 menit pada panjang gelombang optimal, berlangsung selama 75 menit, hingga absorbansi menunjukkan nilai yang stabil. *Operating time* yang diperoleh adalah 23 menit.

g. Pembuatan kurva baku kuersetin

Masing-masing seri kadar diambil 0,5 mL dan direaksikan bersama 0,5 mL AlCl_3 10% serta ditambahkan 4 mL CH_3COOH 5%. Diukur pada panjang gelombang maksimum 415 nm setelah diinkubasi selama

23 menit. Sebuah kurva kalibrasi dibuat berdasarkan hubungan antara konsentrasi dan nilai absorbansi (Asmorowati, 2019).

h. Pembuatan larutan uji

100 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10.000 ppm.

1) Pembuatan larutan uji ekstrak etanol 96%

Larutan stok ekstrak etanol 10.000 ppm diambil 1 mL dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm.

2) Pembuatan larutan uji fraksi air

Larutan stok fraksi air 10.000 ppm diambil 5 mL dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi 5000 ppm

3) Pembuatan larutan uji fraksi etil asetat

Larutan stok fraksi etil asetat 10.000 ppm diambil 0,5 mL dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi 500 ppm.

4) Pembuatan larutan uji fraksi n-heksan

Larutan stok fraksi n-heksan 10.000 ppm diambil 0,6 mL dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a sehingga diperoleh konsentrasii 600 ppm.

i. Penentuan kadar flavonoid total ekstrak 96% dan fraksi daun pandan wangi

Setiap sampel diambil 0,5 mL dan direaksikan dengan 0,5 mL AlCl_3 10% serta 4 mL CH_3COOH 5%. Kemudian di inkubasi pada waktu *operating time* 23 menit. Selanjutnya diukur pada panjang gelombang maksimal 415 nm. Hasil absorbansi sampel dihitung dengan persamaan regresi linier.

D. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Perhitungan Kadar Flavonoid Total

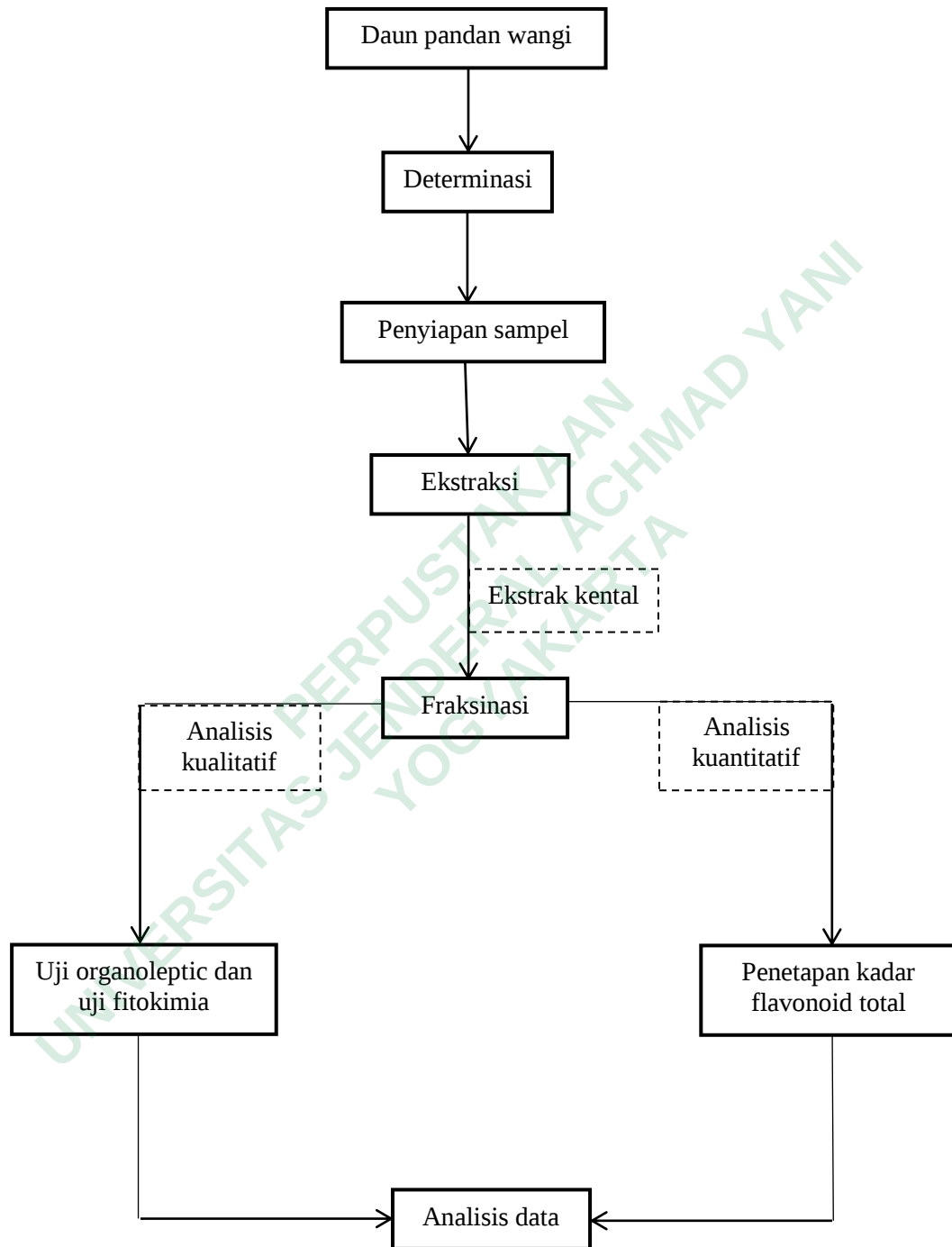
Perhitungan kadar flavonoid total dengan cara memasukan nilai absorbansi ke dalam rumus kurva standar kuersetin. Analisis data dilakukan dengan mengaplikasikan nilai-nilai ke dalam rumus regresi linier, yang dirumuskan sebagai $y = bx + a$. Dalam persamaan ini, nilai absorbansi adalah

y dan nilai konsentrasi adalah x. Kadar flavonoid total dihitung dalam satuan mgQE/g dibuat dengan persamaan 3 yaitu:

$$\text{Flavonoid total} = \frac{\text{Kadar terhitung (mg/L)} \times \text{Volume larutan sampel (L)} \times \text{Faktor pengenceran}}{\text{Berat sampel (g)}} \quad (3)$$

2. Pengolahan Data Hasil Penelitian

Analisis data dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak SPSS. Uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan uji homogenitas (*Levene Statistic*) dilakukan untuk memeriksa apakah memenuhi syarat dengan nilai *sig* nya >0,05. Data yang homogen dan terdistribusi normal dan memenuhi syarat maka dilanjutkan dengan uji *one-way* ANOVA untuk membandingkan rata-rata antar kelompok dengan nilai *sig* nya <0,05 (Syamsul *et al.*, 2020).

E. Skema penelitian**Gambar 12. Skema Penelitian**