

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan bersifat deskripsi dengan menggunakan ekstrak etanol 70% daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) yang akan dilakukan skrining fitokimia dan melihat potensi antioksidan. Adapun variabel bebas (independen) dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol 70% daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.). Sedangkan variabel terikat (Dependen) nya yaitu hasil dari skrining fitokimia yang mencakup alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin, saponin, steroid/triterpenoid, dan nilai IC₅₀.

B. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini yaitu ekstrak etanol 70% daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) yang sudah diekstraksi dengan metode maserasi.

C. Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian awal dilakukan di laboratorium botani Unila untuk melaksanakan proses identifikasi tumbuhan yang didasarkan pada ciri-ciri morfologi tumbuhan (determinasi tanaman). Kemudian di laboratorium teknologi sediaan solida, laboratorium kimia, laboratorium farmakognosi, dan ruang instrumen Politeknik Kesehatan Tanjungkarang yang akan dilakukan pembuatan simplisia, proses ekstraksi, skrining fitokimia, dan uji aktivitas antioksidan. Penelitian ini dilaksanakan pada Januari – Mei 2025.

D. Pengumpulan Data

1. Cara Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan mengumpulkan sampel daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) yang sudah tua, dari Desa Gunung Sari, Kelurahan Pasar Kota Krui, Kecamatan Pesisir Tengah, Kabupaten Pesisir Barat. Sampel akan menjalani serangkaian proses hingga menjadi simplisia kering,

kemudian sampel dihaluskan. Selanjutnya dilakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Hasil dari ekstrak etanol daun pandan wangi ini akan diidentifikasi organoleptisnya, kandungan metabolit sekunder nya, yang meliputi senyawa alkaloid, flavonoid, Polifenol, tanin, saponin, steroid/triterpenoid. Sisa ekstrak etanol dari daun pandan wangi ini akan dilarutkan dengan etanol pro analisis untuk dijadikan larutan sampel, yang kemudian akan diuji antioksidannya.

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Dalam penelitian ini, peralatan yang dibutuhkan antara lain adalah neraca analitik *BEL engineering*, oven *gemmysss*, mesin penggiling, ayakan mesh nomor 40, *rotary evaporator*, *Waterbath*, kompor listrik maspion, vortex, incubator *equitron*, *spektrofotometer UV-1900ui with Multi-cell Sampel Compartment*, kuvet, batang pengaduk, spatula logam, alumunium foil, beaker glass *Pyrex Iwaki* (250 ml), gelas ukur *Pyrex Iwaki* (10 ml, 50 ml), rak tabung reaksi kayu, tabung reaksi *Pyrex Iwaki*, bulb, corong gelas 75 mm, kertas saring, cawan porselen (75 ml), pipet ukur *Pyrex Iwaki* (5 ml, 20 ml), pipet volume *Pyrex Iwaki* (1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml) pipet tetes kecil, labu ukur (10 ml, 50 ml, 100 ml), serta botol kaca gelap.

b. Bahan

Dalam penelitian ini, bahan yang diperlukan mencakup daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*), etanol 70%, serbuk magnesium stearat (Mg), amil alkohol (C₅H₁₂O), asam klorida (HCl) pekat, asam klorida (HCl) 2N, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, pereaksi Bouchardat, aquadest, n-heksan, asam sulfat (H₂SO₄) pekat, pereaksi besi (III) klorida (FeCl₃), asam asetat (CH₃COOH), kuersetin, kristal DPPH, dan etanol pro analisis.

E. Prosedur kerja penelitian

- Pembuatan Simplisia Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*)
Langkah-langkah untuk membuat simplisia dari daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) adalah sebagai berikut:
 - Ambil daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) yang sudah tua dan masih dalam kondisi segar.

2. Bersihkan daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) dari segala kotoran yang menempel.
 3. Cuci daun hingga bersih menggunakan air yang mengalir.
 4. Setelah dicuci, lakukan perajangan pada daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.).
 5. Setelah dirajang, keringkan daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) menggunakan oven pada suhu 40°C
 6. Setelah kering, lakukan penyortiran untuk memastikan kotoran yang tidak ada kotoran yang tertinggal.
 7. Giling daun kering hingga halus menggunakan blender atau mesin penggiling.
 8. Ayak serbuk hasil gilingan dengan ayakan mesh nomor 40 agar diperoleh ukuran partikel yang seragam
- b. Ekstraksi simplisia daun pandan wangi

Marjoni (2016:41-42) menjelaskan bahwa prosedur berikut dapat digunakan dalam ekstraksi serbuk simplisia dengan metode maserasi:

- 1) Timbang serbuk simplisia daun pandan wangi sebanyak 500 g menggunakan neraca analitik.
- 2) Masukkan serbuk simplisia yang telah ditimbang ke dalam wadah gelap atau wadah tertutup.
- 3) Rendam serbuk simplisia dengan pelarut etanol 70% 1:7
- 4) Tutup wadah dengan aluminium foil dan biarkan di tempat yang bebas cahaya selama tiga hari, sambil diaduk setiap 5 jam selama sekitar 5 menit setiap kali pengadukan.
- 5) Setelah waktu perendaman selesai, saring maserasi dan pisahkan dari ampasnya.
- 6) Ampas sisa maserasi digunakan untuk remaserasi, direndam dengan pelarut etanol 70% 1:3 selama 2 hari, sambil diaduk setiap 5 jam dengan durasi sekitar 5 menit setiap kali.
- 7) Saring kembali maserasi hasil remaserasi dan pisahkan dari ampasnya, lalu gabungkan dengan filtrat dari maserasi pertama.
- 8) Kemudian, pekatkan filtrat dengan cara menguapkan pada suhu 40°C menggunakan *rotary evaporator*.

- 9) Selanjutnya, lakukan pengentalan menggunakan *waterbath* pada suhu 40°C.
- 10) Ekstrak yang diperoleh dimasukkan ke dalam wadah ekstrak dan ditimbang.
- 11) hitung rendemen ekstrak

c. Pemeriksaan Alkaloid

Menurut Marjoni (2016:8), pengujian alkaloid dapat dilakukan dengan langkah-langkah berikut:

1. Timbang masing-masing 0,5 gram ekstrak etanol daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.).
2. Tambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL aquades, kemudian panaskan dalam penangas air pada suhu 100 °C selama 2 menit.
3. Setelah dingin, lalu saring. Filtrat yang dihasilkan akan digunakan untuk percobaan berikut:
 - a) Ambil 3 tetes filtrat dan tambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, yang akan menghasilkan endapan berwarna putih atau kuning.
 - b) Ambil 3 tetes filtrat dan tambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat, yang menghasilkan endapan coklat.
 - c) Ambil 3 tetes filtrat dan tambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff, yang menghasilkan endapan merah bata.
4. Jika terdapat endapan minimal pada 2 atau 3 pereaksi, maka sampel dinyatakan positif mengandung alkaloid.

d. Pemeriksaan flavonoid

Menurut Marjoni (2016:9), pengujian flavonoid dapat dilakukan dengan langkah-langkah berikut:

1. Timbang 10 gram ekstrak etanol daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), kemudian tambahkan 100 mL air.
2. Didihkan campuran tersebut pada suhu 100 °C selama sekitar 5 menit, lalu saring filtrat dalam keadaan panas.
3. Pipet 5 mL filtrat, tambahkan 0,1 gram serbuk magnesium stearat, 1 mL HCl pekat, dan 2 mL amil alkohol, lalu kocok dan biarkan lapisannya memisah.

4. Sampel dinyatakan positif mengandung flavonoid jika terbentuk lapisan amil alkohol yang berwarna merah, kuning, atau jingga.

e. Pemeriksaan Tanin

Menurut Hanani (2015), pengujian tanin dapat dilakukan dengan langkah-langkah berikut:

1. Ambil sebanyak 0,5 gram ekstrak, lalu encerkan dengan aquades hingga larutannya tidak berwarna
2. Ambil 5 ml larutan hasil pengenceran tersebut, kemudian tambahkan larutan gelatin 1% yang telah dilarutkan dalam natrium klorida 10%
3. Sampel dinyatakan positif mengandung tanin jika terbentuk endapan.

f. Pemeriksaan Saponin

Menurut Marjoni (2016:12), pengujian saponin dapat dilakukan dengan langkah-langkah berikut:

1. Masukkan 0,5 gram ekstrak etanol daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 10 mL aquades panas.
2. Tunggu hingga dingin, kemudian kocok dengan kuat selama 10 detik.
3. Periksa apakah terbentuk buih atau busa yang bertahan setidaknya selama 10 menit dengan tinggi antara 1-10 cm.
4. Tambahkan 1 tetes larutan HCl 2N; jika buih tidak hilang, ini menunjukkan adanya saponin.

g. Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Menurut Marjoni (2016:12), pengujian steroid/triterpenoid dapat dilakukan dengan langkah-langkah berikut:

1. Masukkan 1 gram ekstrak etanol daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan n-heksan sebanyak 20 mL dan lakukan maserasi selama 2 jam, kemudian saring.
2. Uapkan filtrat dalam cawan penguap.
3. Tambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H_2SO_4 ke dalam sisa filtrat.

4. Hasil positif untuk steroid ditunjukkan dengan munculnya warna biru atau hijau, sementara hasil positif untuk triterpenoid ditandai dengan warna merah atau ungu.

h. Pemeriksaan Fenolik

Marjoni (2016:10) menyatakan bahwa untuk mendeteksi kandungan tanin, dapat dilakukan prosedur berikut:

1. Timbang 0,5 gram ekstrak etanol daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*), lalu tambahkan 10 mL aquades.
2. Saring hasil ekstraksi menggunakan kertas saring, kemudian encerkan filtrat dengan aquades hingga tidak berwarna.
3. Ambil 2 mL filtrat yang telah diencerkan, lalu tambahkan 1-2 tetes FeCl_3 .
4. Jika terbentuk warna hijau kehitaman, ini menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid.

i. Uji Aktivitas Antioksidan

Menurut Pindan et al. (2021) dan Hasan dkk. (2022), Langkah-langkah uji antioksidan dengan metode DPPH adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 Mm
 - a) Timbang 1,971 mg kristal DPPH.
 - b) Larutkan dalam 50 mL etanol pro analisis.
 - c) Homogenkan larutan tersebut dan simpan dalam botol gelap.
2. Pembuatan Larutan Sampel
 - a) Ambil 40 mg ekstrak etanol daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*).
 - b) Larutkan ke dalam 20 mL etanol pro analisis.
 - c) Homogenkan larutan dan simpan dalam botol gelap.
 - d) siapkan larutan ekstrak dengan variasi konsentrasi yaitu 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm dan 100 ppm.

3. Pembuatan Larutan Kuersetin

- a) Timbang 2,5 mg kuersetin.
- b) Larutkan dalam 50 mL etanol pro analisis.
- c) Campur hingga homogen dan simpan dalam botol gelap.
- d) Buat larutan dengan variasi konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, dan 8 ppm dan 10 ppm.

4. Pembuatan Larutan Blanko

- a) Siapkan tabung reaksi.
- b) Tambahkan 1-2 mL etanol pro analisis ke dalamnya.

5. Pembuatan Larutan Kontrol

- a) Siapkan tabung reaksi.
- b) Pipet 1 mL larutan DPPH masukkan ke dalam tabung reaksi
- c) Campurkan dengan 4 ml etanol pro analisis, homogenkan, dan inkubasi selama 30 menit.
- d) Ukur nilai absorbansi menggunakan *spektrofotometer visible* dalam rentang Panjang gelombang 500-600 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum.

6. Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

- a. Dari setiap konsentrasi sampel ekstrak etanol daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), dan kuersetin, ambil 4 mL menggunakan pipet ukur.
- b. Tambahkan 1 mL larutan DPPH, kemudian gunakan vortex untuk mencampur larutan hingga homogen.
- c. Inkubasi larutan selama 30 menit dalam inkubator pada suhu 37°C.
- d. Setelah proses inkubasi, amati perubahan warna yang terjadi.
- e. Selanjutnya, ukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh.
- f. Pembacaan dilakukan sebanyak 3 kali.
- g. Akhirnya, hitung nilai IC₅₀.
- h. Melihat potensi antioksidannya

Intensitas	Nilai IC₅₀ (µg/ml)
Sangat kuat	<50
Kuat	50-100
Sedang	101-250
Lemah	250-500
Sangat lemah	>500

j. Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil penelitian akan disajikan dalam bentuk tabel yang menggambarkan hasil penelitian dengan menggunakan analisis deskriptif kualitatif untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol dan etil asetat daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.).

Aktivitas antioksidan ditentukan dengan mengukur seberapa banyak sampel dapat menyerap radikal DPPH, yang dihitung melalui persentase inhibisi.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi ekstrak}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Nilai persentase inhibisi yang diperoleh kemudian digunakan untuk menghitung IC₅₀, yaitu konsentrasi yang dapat menurunkan 50% radikal bebas. Semakin kecil nilai IC₅₀, semakin besar aktivitas antioksidannya. IC₅₀ dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear yang menghubungkan Y dengan K melalui rumus berikut:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

- y = 50
- x = konsentrasi larutan uji (K)

Untuk mempermudah perhitungan persamaan regresi linear, peneliti akan menggunakan Microsoft Excel untuk analisis data, sehingga dapat diperoleh kurva perbandingan nilai IC₅₀ dari berbagai larutan sampel.