

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimen.

B. Tempat Dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Bahan Alam, laboratorium kimia dan Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Prodi DIII Farmasi, Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan April sampai bulan Juni 2025.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb) yang berada di Kupang, Nusa Tenggara Timur.

2. Sampel dan Teknik Sampling

a. Sampel

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb.) yang diperoleh dari Liliba, Kecamatan Oebobo, Nusa Tenggara Timur.

b. Teknik sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah *purposive sampling*, dengan kriteria daun pandan sebanyak 2 kg yang berwarna hijau, segar dan bersih.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb) dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm.

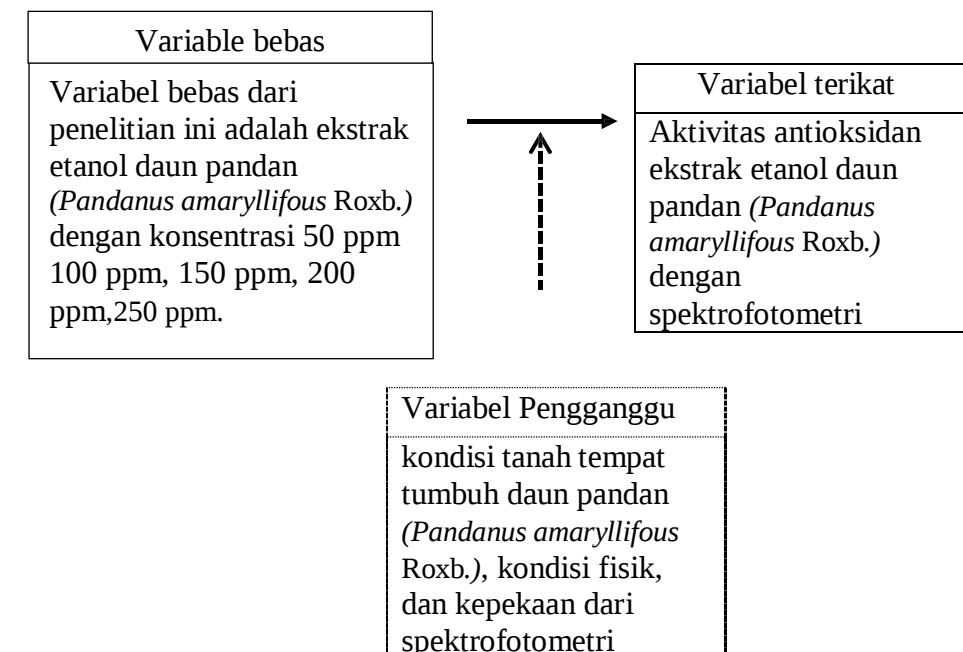
2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb.) terhadap DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) yang dinyatakan dengan IC_{50} .

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu adalah kondisi tanah tempat tumbuh daun pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb.), kondisi fisik, dan kepekaan dari spektrofotometri.

E. Kerangka Konsep



Keterangan :

———— : Yang diteliti
----- : Tidak diteliti

Gambar 2. Hubungan antar variabel

F. Defenisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi opersaional	Alat ukur	Skala
1	Aktivitas antioksidan	Kemampuan Aktivitas antioksidan Ekstrak etanol Daun pandan berdasarkan nilai IC ₅₀ dengan menggunakan Spektrofotometri UV-VIS.	spektrofotometri	Rasio
2	Daun pandan (<i>Pandanus amaryllifous</i> Roxb)	Daun pandan (<i>Pandanus amaryllifous</i> Roxb) yang diperoleh dari Liliba, Kecamatan Oebobo, Nusa Tenggara Timur dengan kriteria dalam keadaan yang masih segar.		Nominal
3	Ekstrak Etanol	Ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi serbuk simplisia Daun pandan (<i>Pandanus amaryllifous</i> Roxb) dengan menggunakan pelarut etanol 70%.		Rasio
4	Metode DPPH	Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi daya antioksidan ekstrak Daun pandan (<i>Pandanus amaryllifous</i> Roxb) Dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 500 - 600 nm	spektrofotometri	Rasio
5	Nilai IC ₅₀	Parameter konsentrasi yang ekuivalen memberikan 50% aktivitas antioksidan.		Rasio

G. Alat dam Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-2600), neraca digital, neraca analitik, bejana maserasi, Herbs grinder MKS-ML200, batang pengaduk (pyrex), cawan porselin, pipet tetes, corong, *waterbath*, *Rotary Evaporator*, *aluminum foil*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, penjepit tabung, plat tetes, kaca arloji, sendok tanduk, kerta perkamen, labu ukur 50 mL (IWAKI), labu ukur 100 mL(IWAKI), vial, mikro pipet, *beaker glass* 250ml (pyrex).

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb.), radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), asam askorbat (vit.C), etanol 70% dan etanol 95%, %, Hcl pekat, serbuk magnesium, Pereaksi Mayer, Pereaksi Dragendorff, FeCl₃ 1%, Na₂CO₃ 15% dan aquadest.

H. Prosedur Penelitian

1. Sampel

a. Pembuatan serbuk simplisia daun pandan

Sampel daun pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb.) sebanyak 2 kg di ambil di Liliba, Kota Kupang. Sampel dibersihkan dari pengotor dan dikeringkan, dengan cara di jemur dibawah matahari langsung, setelah kering sampel dihaluskan dengan menggunakan grinder (Dasopang, 2016)

b. Dalam metode ini, serbuk daun pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb.)

sebanyak 200g diekstraksi dengan cara remaserasi menggunakan etanol 70% 2L. Maserasi dilakukan dengan masukkan 200g dilarutkan dalam pelarut etanol 70% sebanyak $\frac{3}{4}$ dari 2L (1,5L) dimasukkan botol kaca yang ditutupi *aluminium foil* disimpan pada suhu ruangan selama 2 hari sambil diaduk 8 jam sekali. Setelah 3 hari, hasilnya disaring dan diperoleh maserat. Lalu, ampasnya diremaserasi menggunakan sisa pelarut etanol 70% sebanyak 0,5 L. Setelah 3 hari, hasilnya disaring dan diperoleh maserat. Hasil maserat 1 dan 2 yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* pada kondisi tertentu (70 rpm, 55°C). Lalu, dipekatkan menggunakan waterbath. Ekstrak yang diperoleh kemudian

ditutup dengan *aluminium foil* dan disimpan dalam lemari pendingin (Ulfah, 2023)

2. Identifikasi kandungan senyawa kimia

a. Identifikasi alkaloid

Ekstrak daun pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb.) 2 g dilarutkan dalam kloroform, ditambahkan amonia dan kloroform masing-masing 10 ml serta 10 tetes H₂SO₄. Setelah dikocok dan dibiarkan, diambil lapisan atas sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi. Pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff (masing-masing 1 ml) ditambahkan ke setiap tabung. Endapan yang terbentuk menandakan adanya alkaloid: putih (*Mayer*), kuning (*Wagner*), dan jingga (*Dragendorff*) (Adolph, 2016)

b. Uji flavonoid

Sebanyak 1 gram ekstrak daun pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb.) ditambahkan 5 ml etanol. Kemudian, larutan tersebut ditambahkan dengan beberapa tetes HCl pekat dan 1,5 gram magnesium. Reaksi positif ditandai dengan timbulnya warna merah, yang menunjukkan adanya flavonoid (Adolph, 2016)

c. Uji tanin

Ekstrak daun pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb.) sebanyak 2 g dilarutkan dalam 5 ml etanol, lalu ditambahkan 2 ml larutan Fe (III) klorida 1%. Jika larutan berubah menjadi biru tua, biru kehitaman, atau hitam kehijauan, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak tersebut mengandung tanin (Rahmasiahi *et al.*, 2023)

d. Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun pandan

1. Penyiapan larutan uji ekstrak daun pandan

Ekstrak daun pandan ditimbang sebanyak 50 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 95% didalam labu ukur 50 ml sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm.

Larutan ekstrak etanol daun pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb.) dari larutan induk tersebut dibuat dengan seri konsentrasi pengenceran yaitu 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm, 250 ppm (Bali *et al.*, 2019)

2. Penyiapan larutan DPPH

Ditimbang serbuk DPPH sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 95% sampai tanda batas pada labu ukur 50 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 mM, yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol. Labu takar yang digunakan dilapisi aluminium foil dan disimpan terhindar dari cahaya matahari (Wilapangga & Sari, 2018)

3. Penyiapan larutan pembanding

Larutan asam askorbat dibuat dengan cara menimbang 10 mg serbuk asam askorbat, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambah etanol 95% hingga tanda batas. Larutan ini disebut larutan induk dengan konsentrasi 200 ppm yang kemudian diencerkan menjadi konsentrasi yang lebih kecil yaitu 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm (Widiastuti, 2016)

4. Penentuan panjang gelombang

Sebanyak 4 mL blanko yaitu etanol 95% dimasukkan kedalam vial, ditambahkan 1 mL larutan DPPH, lalu ditutup dan diukur pada Panjang gelombang maksimal 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Wilapangga & Sari, 2018)

5. Absorbansi peredaman radikal DPPH

Blanko, larutan uji dan larutan pembanding yang dibuat dalam beberapa konsentrasi diambil sebanyak 4 mL ditambahkan 1 mL larutan DPPH dimasukkan dalam vial lalu dikocok. Larutan didiamkan selama 30 menit, kemudian dibaca serapannya pada Panjang gelombang maksimum (Masaenah *et al.*, 2019)

I. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan *spektrofotometri UV-Vis* yang digunakan untuk menghitung presentase perendaman radikal bebas DPPH. Persentase (%) perendaman radikal bebas DPPH dihitung menggunakan rumus;

$$(\%)Inhibisi = \frac{(\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel})}{\text{abs blanko}} \times 100 \%$$

Keterangan :

Abs blanko : serapan radikal DPPH 1 Mm

Abs sampel : serapan sampel terhadap radikal bebas DPPH 0,4

Daya antioksidan peredaman radikal bebas DPPH (% peredaman) ekstrak etanol daun pandan (*Pandanus amaryllifous* Roxb.) serta pembanding asam askorbat, dianalisis dan masing masing dihitung nilai IC₅₀ menggunakan analisis regresi linear (Wilapangga & Sari, 2018)

$$y = a + bx$$

keterangan:

y : presentase aktivitas antioksidan

x : konsentrasi larutan uji

a :tetapan slope

b : tetapan intersep

Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak sebagai absis (sumbu x) dan nilai presentase peredaman (aktivitas antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu y). hasil analisis regresi linear berupa nilai x, dan dimasukkan ke dalam rumus IC₅₀ = anti Ln(x) dan ditentukan tingkat kekuatan antioksidannya (Erna Cahyaingsih, Putu Era Sandhi, 2019)