



Aktivitas Peredaman Ekstrak Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius*) dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Devika Nurhasanah^{a,1,*}, Nofran Putra Pratama^{a,2}, Sri Purwa Pujihastuti^{a,3}

^a Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, Jl. Siliwangi, Ringroad Barat, Sleman, 55293, Indonesia

¹devika.pharmacist@gmail.com*; ²nofranputrapratama@gmail.com; ³hesti.hesti512@gmail.com

ABSTRACT

ARTICLE INFO

Background: Antioxidants are compounds that prevent an oxidation reaction from free radical compounds and important role in capturing free radicals in the human body. Excessive free radicals in the body can cause tissue damage and degenerative diseases. *Pandanus amaryllifolius* are known to act as natural antioxidant that have the potential to capture free radical compounds, because of their presence of flavonoid compounds.

Objective: This study aims to determine the free radical scavenging activity of DPPH against the leaf extract of *Pandanus amaryllifolius*.

Method: *Pandanus amaryllifolius* extraction was carried out using the maceration method with methanol as solvent (1:10). Concentration was carried out using a rotary evaporator to obtain a thick extract. Phytochemical screening and TLC test were carried out qualitatively using the mobile phase n-butanol: acetic acid: water (6:2:2) and phytochemical testing including flavonoids, alkaloids, saponins, tannins, steroids or terpenoids to determine the presence of flavonoid compounds as antioxidants. Free radical scavenging activity was tested using DPPH free radical scavenger with concentrations of vitamin C 2, 4, 5, 6, 8 ppm and pandanus fragrance extract concentrations of 10, 15, 20, 25 ppm and measured using a UV-Vis spectrophotometer to calculate the IC₅₀ value.

Result: The results of the phytochemical screening test of fragrant pandan indicate the presence of flavonoid compounds. The R_f value of the TLC test obtained 0.765 quercetin and 0.787 extract and the resulting yellow spots, the R_f value of pandan extract which was almost the same as the R_f value of quercetin indicated that the pandan extract may contain the same compounds as quercetin, namely flavonoid compounds. The results of the free radical scavenging activity of methanol extract of pandan leaves were 86,861 g/ml and for comparison, vitamin C was 39,103 g/ml. Based on the statistical analysis of the *T-Test*, it is known that there is a difference between the sample and the standard with a significant value ($p < 0.05$), namely 0.001 and 0.023.

Conclusion: The *Pandanus amaryllifolius* extract test using the DPPH method is in the strong category (IC₅₀ < 50 - 100 g/ml) and the comparison of Vitamin C is in the very strong category (IC₅₀ < 50 g/ml).

Article history

Received: 29 September 2023

Revised: 14 Oktober 2023

Accepted: 6 November 2023

Keywords

Antioxidants

DPPH

Pandanus amaryllifolius

Free radicals



1. Pendahuluan

Radikal bebas termasuk salah satu senyawa yang sangat berbahaya bagi kesehatan tubuh manusia. Senyawa radikal bebas dapat terbentuk dari proses oksidasi yang terjadi ketika tubuh melakukan olahraga secara berlebihan, dan disaat tubuh terpapar oleh udara atau polusi lingkungan seperti rokok dan asap kendaraan [1]. Paparan polusi secara terus menerus dapat mengakibatkan bertambahnya radikal bebas sehingga sel-sel dalam tubuh mudah rusak. Rusaknya sel tersebut dapat mengakibatkan timbulnya penyakit degeneratif, seperti mengalami penuaan diri, katarak, rematik, penyakit jantung maupun liver [2].

Tubuh manusia dapat menahan radikal bebas dengan sistem pertahanan antioksidan. Antioksidan adalah zat yang dapat menangkal atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi dari radikal bebas. Berdasarkan sumbernya antioksidan eksogen dibagi menjadi dua yaitu alami dan sintetik. Antioksidan sintetik diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia, sedangkan antioksidan alami diperoleh dari tanaman yang berpotensi sebagai penangkap radikal bebas seperti tanaman yang mengandung senyawa flavonoid, fenol, polifenol, kurkuminoid, dan tannin [3]. Salah satu tanaman yang memiliki antioksidan dan berpotensi menangkap radikal bebas yaitu terdapat pada daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) berdasarkan penelitian [4].

Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) diyakini masyarakat untuk pengobatan umum seperti mengontrol gula darah, meredakan nyeri bahkan mendukung terapi kanker. Berdasarkan penelitian, tanaman ini memiliki beberapa aktivitas farmakologi seperti antibakteri, antioksidan, antikanker, dan antidiabetes. Selain itu, pengujian skrining fitokimia terhadap daun pandan wangi memiliki kandungan senyawa saponin, flavonoid, polifenolat, steroid, dan terpenoid [5].

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya aktivitas peredaman radikal bebas pada daun pandan wangi menggunakan metode DPPH (2,2 diphenyl-1-pikrilhidrazil). Metode DPPH merupakan metode yang dapat digunakan untuk menguji kandungan antioksidan alami pada tanaman. Metode ini mudah untuk digunakan, murah, sederhana, hanya membutuhkan sedikit reagen, dan cepat. Kemampuan antioksidan dalam metode DPPH dapat dinyatakan oleh nilai IC_{50} [6].

2. Metode

2.1 Alat dan Bahan Penelitian

Alat: 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.

Bahan: Pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*), DPPH (*1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil*), pereaksi dragendorff, pereaksi mayer, pereaksi wagner, magnesium, akuades, $FeCl_3$, kloroform, natrium asetat trihidrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, HCl, metanol, asam asetat, metanol *p.a*, vitamin C, kertas saring, alummunium foil, $AlCl_3$, Plat KLT, n-butanol, aquades, *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*, asam asetat, kuersetin.

2.2 Pembuatan Sampel

Sampel daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) diperoleh dari Desa Kaliurip, Kecamatan Madukara, Kabupaten Banjarnegara, Jawa Tengah pada awal bulan Oktober 2021 dengan ketinggian wilayah mencapai 40-3.200 mdpl (meter di atas permukaan laut). Pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) dideterminasi di Laboratorium Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Bagian daun pandan wangi yang sudah dikumpulkan ditimbang sebanyak 5 kg disortasi basah, dibersihkan dengan air mengalir, dirajang, dan dikeringkan. Kemudian, disortasi kering. Selanjutnya, sampel simplisia dihaluskan dan diayak dengan menggunakan ayakan ukuran 40 *mesh* hingga diperoleh simplisia serbuk halus sebelum dilakukannya proses ekstraksi.

Serbuk simplisia daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) dimasukkan ke dalam toples kaca sebesar 200 g, lalu dimaserasi dengan ditambahkan pelarut metanol (1:10) sebanyak 2 L, diaduk dan ditutup rapat didiamkan ditempat yang gelap. Diaduk kembali setelah 6 jam pertama, lalu dibiarkan selama 18 jam. Didiamkan selama 3 hari dalam suhu kamar dan bebas paparan sinar

matahari dan dilakukan pengadukan setiap hari. Kemudian, ekstrak yang terbentuk disaring menggunakan kain halus sampai didapatkan residu dan filtratnya. Selanjutnya, residu sampel diremaserasi kembali dengan pelarut metanol sebanyak 2 L dan dibiarkan kembali selama 2 hari sambil dilakukan pengadukan. Setelah itu, filtrat hasil maserasi dan remaserasi dikumpulkan dan diuapkan dengan rotary *evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental.

2.3 Kontrol Kualitas Ekstrak

Perhitungan rendemen: Dihitung berdasarkan perbandingan antara berat ekstrak akhir yang diperoleh dengan berat sampel awal yang diekstrak lalu dikalikan 100%. Uji organoleptik dilakukan pengamatan sifat karakteristik fisik dari suatu bahan yang diuji seperti bau, rasa, bentuk, dan warna.

2.4 Skrining Fitokimia

Identifikasi alkaloid: Sebanyak 2 mg ekstrak diencerkan dengan 4 mL HCl 2N, dibagi menjadi 3 tabung. Dipanaskan, kemudian didinginkan lalu dibagi menjadi 3 tabung. Tiap tabung ditambahkan dengan masing-masing reagen pereaksi 3-4 tetes. Positif alkaloid jika ditetesi reagen Dragendorff terbentuk endapan warna hijau kecoklatan, Mayer terbentuk endapan hijau kecoklatan, dan Wagner terbentuk endapan hijau kecoklatan.

Identifikasi flavonoid: Sebanyak 200 mg ekstrak ditambahkan dengan 5 mL 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.

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.

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.

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.

2.5 Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis

Disiapkan sampel konsentrasi 10% dan pembanding standar kuersetin konsentrasi 5% yang sudah ditambahkan dengan pelarut metanol *p.a.* Kemudian, ditotolkan sebanyak 3 kali tetes secara vertikal pada plat silika gel GF254 yang berukuran 10 cm. Kemudian, dijenuhkan dalam suatu bejana yang berisikan fase gerak dengan perbandingan yaitu butanol : asam asetat : air (6 : 2 : 2 v/v). Hasil plat yang telah terelusi, diamati menggunakan sinar tampak, sinar UV 254 nm, dan UV 365 nm. Noda tidak terlihat, maka disemprotkan dengan penampak bercak AlCl_3 .

2.6 Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas

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.

Penentuan panjang gelombang maksimum. Sebanyak 3 mL DPPH dimasukkan 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 $\pm 0,2-0,8$. Penentuan *operating time* (OT). 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 [7]. DPPH stabil pada waktu inkubasi 30 menit.

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. Ditutup dengan aluminium foil lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dan diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang 515 nm.

Larutan Uji Ekstrak Pandan Wangi. 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. 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 di masukkan kedalam tabung reaksi dan dikocok hingga homogen. Ditutup dengan aluminium foil lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dan diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang 515 nm.

2.7 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 pada persamaan (1)

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100\% \quad (1)$$

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. 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 [8]. 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* [9]. Uji *statistic T-Test* dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan antara sampel daun pandan wangi dengan larutan standar vitamin C yang berbeda dengan hasil nilai signifikansi ($p<0,05$) [10].

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Ekstraksi

Pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) merupakan tanaman yang banyak hidup di daerah tropis maupun subtropis. Memiliki khasiat sebagai antidiabetes, antioksidan, antikanker, dan antibiotik [11]. Pada penelitian ini, pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) dilakukan secara kuantitatif menggunakan metode eksperimental agar mengetahui aktivitas peredaman radikal bebas. Determinasi dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran bahan pandan wangi yang digunakan pada penelitian [12].

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi karena mudah, sederhana, dan tanpa melalui proses pemanasan agar mencegah kemungkinan rusaknya komponen senyawa biokimia dalam sampel [13]. Proses maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia kedalam cairan penyari. Setelah itu, cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga

sel yang mengandung zat aktif. Larutan zat aktif yang ada di dalam sel akan didesak keluar oleh penyari karena adanya perbedaan konsentrasi. Peristiwa tersebut terjadi secara berulang hingga terjadi keseimbangan konsentrasi larutan antara di luar sel dan didalam sel [14]. Semakin lama waktu yang digunakan dalam proses maserasi, maka akan meningkatkan hasil rendemen karena banyaknya pelarut yang terserap ke dalam simplisia. Namun, apabila pelarut masuk ke dalam waktu fase jenuh, maka pelarut tidak akan mampu menarik senyawa bioaktif meskipun proses maserasi diperpanjang [15]. Pelarut penyari yang digunakan adalah metanol yang memiliki kemampuan dalam menyari suatu senyawa pada rentang polaritas yang lebar mulai dari senyawa polar sampai non polar, tidak toksik dibandingkan dengan pelarut organik lain seperti etanol, tidak mudah ditumbuhi mikroba dan relatif murah [16].

Hasil filtrat maserasi dan remaserasi yang telah diperoleh, kemudian digabungkan menjadi satu dalam satu toples kaca dan disaring kembali untuk mendapatkan filtrat murni untuk masing-masing bagian sampel. Setelah itu, dilanjutkan proses pengentalan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Diaduk menggunakan sendok kayu sesekali, agar pelarut metanol mudah menguap secara sempurna dan meminimalisir adanya kerusakan senyawa bioaktif yang tidak tahan terhadap panas. Setelah proses pengentalan selesai, dilakukan uji kontrol kualitas ekstrak sampel.

3.2 Rendemen

Rendemen merupakan suatu perbandingan antara ekstrak yang didapatkan dengan simplisia awal dikalikan 100%. Berdasarkan hasil nilai persen rendemen pada (Tabel 1), menunjukkan bahwa ekstrak kental pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) yaitu 51,287 % b/b sudah memenuhi syarat, dari hasil proses penimbangan serbuk simplisia awal sebanyak 200 g. Hal ini menunjukkan nilai persen rendemen yang baik karena sesuai teori tidak kurang dari 24,6% b/v [17]. Beberapa faktor seperti waktu, suhu, ukuran partikel, jenis pelarut, dan cara pengadukan sampel pada saat proses ekstraksi juga dapat mempengaruhi besar kecilnya suatu rendemen [18].

3.3 Organoleptik

Uji organoleptik merupakan suatu pengujian untuk mendeskripsikan warna, bentuk, bau, dan rasa yang terdapat dalam ekstrak kental metanol pandan wangi dengan menggunakan alat indera. Uji organoleptik bertujuan untuk mengidentifikasi ciri khas dari ekstrak [19]. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada (Tabel 2), menunjukkan bahwa uji organoleptik ekstrak pandan wangi memiliki ciri-ciri bau khas, bentuk kental, rasa asam kelat.

3.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengidentifikasi adanya suatu kandungan senyawa metabolit sekunder secara kualitatif pada ekstrak pandan wangi. Analisis kandungan senyawa yang akan diuji dalam sampel tersebut adalah alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan steroid yang dapat dilihat pada (Tabel 3).

Pada uji alkaloid, ekstrak sampel pandan wangi diasamkan menggunakan HCL 2N karena senyawa alkaloid bersifat basa sehingga membentuk garam [20]. 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) iodide [21]. Pada uji alkaloid dengan pereaksi dragendorff hasil positif jika terjadi endapan hijau kecoklatan akibat ikatan kovalen antara K^+ pada kalium tetraiodobismut pereaksi dan atom nitrogen pada alkaloid [22]. 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 [23].

Pada uji flavonoid, ekstrak sampel pandan wangi 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 [24]. Hasil dari percobaan ekstrak tanaman pandan wangi mendapatkan perubahan warna menjadi merah, hal ini menjadi salah satu tanda bahwa ekstrak pandan wangi mengandung flavonoid.

Pada uji saponin, ekstrak pandan wangi ekstrak dilarutkan dengan air panas dan dikocok kuat selama 10 detik, hasil yang diperoleh adalah busa setinggi 4,5 cm, menunjukkan bahwa ekstrak pandan wangi positif mengandung saponin [25].

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. Ekstrak pandan wangi positif mengandung tanin [26].

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 [27]. 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 [28]. Hasil yang di peroleh berwarna hijau menandakan bahwa ekstrak tanaman pandan wangi positif mengandung steroid.

3.5 Kromatografi Lapis Tipis

Untuk memperkuat adanya kandungan senyawa flavonoid, maka perlu dilakukan uji analisis kualitatif KLT pada ekstrak pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) menggunakan kuersetin sebagai pembanding. Prinsip kerjanya yaitu adsorben dilapiskan pada lempeng kaca yang bertindak sebagai fase diam. Fase gerak akan bermigrasi disepanjang fase diam dan terbentuklah elusi. Metode ini sederhana, kecepatan pemisahan tinggi dan mudah diperoleh kembali senyawa-senyawa yang terpisahkan [29].

Berdasarkan hasil optimasi fase gerak pada perbandingan butanol : asam asetat : air (6 : 2 : 2), menunjukkan hasil yang efektif dalam memisahkan senyawa bioaktif flavonoid secara optimal. Namun, sedikit samar-samar dikarenakan kurangnya homogenitas antara senyawa bioaktif dan pelarut. Hasil tersebut dapat dilihat secara kualitatif pada (Gambar 1), yaitu terdapat suatu kandungan flavonoid pada ekstrak sampel pandan wangi yang ditandai dengan nilai R_f yang hampir sama dengan pembanding. Nilai R_f kuersetin sebesar 0,768 dan nilai R_f sampel pandan wangi sebesar 0,787, setelah di semprot larutan AlCl_3 sebagai penampak bercak. Nilai R_f telah memenuhi ketentuan nilai posisi bercak, karena setiap zat terlarut pada plat KLT yang baik berkisar 0,2-0,8 [30]. Hasil bercak dapat dilihat pada **Gambar.1**

3.6 Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH

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 kuning [31]. 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 [32]. 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 [33].

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 [34]. Setelah di peroleh panjang gelombang maksimum DPPH 515 nm, selanjutnya dilakukan *operating time* di periksa nilai absorbansi setiap 5 menit sekali selama 45 menit, DPPH stabil pada menit ke 30.

Uji aktivitas peredaman radikal bebas ekstrak daun pandan wangi dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil). Konsentrasi DPPH yang digunakan

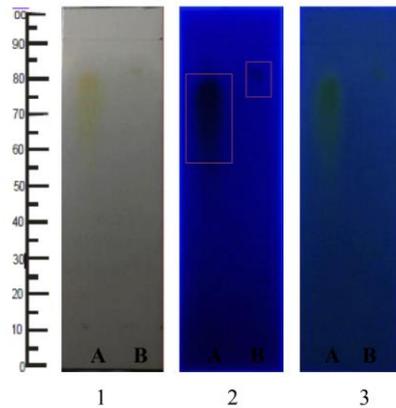
sebesar 40 ppm. Perbandingan yang digunakan pada penelitian ini adalah vitamin C. Berdasarkan hasil orientasi untuk seri konsentrasi perbandingan yang digunakan adalah 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, dan 8 ppm. Konsentrasi induk yang digunakan adalah 100 ppm. Hasil uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH terhadap vitamin C yang dinyatakan dalam persen penghambatan kemudian diplotkan terhadap konsentrasi sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = 1,0407x + 9,3055$ (Gambar 2). Hasil tersebut digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} dan diperoleh nilai IC_{50} sebesar 39,10 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 4), masuk ke kategori yang sangat kuat. 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 [27]. Studi oleh Harborne (1998) menyatakan bahwa flavonoid merupakan salah satu senyawa yang paling efektif sebagai antioksidan karena kemampuannya untuk mendonorkan elektron dan menstabilkan radikal bebas. Penelitian oleh Rice-Evans et al. (1996) juga mendukung bahwa flavonoid memiliki aktivitas antioksidan yang signifikan karena struktur fenolik mereka yang memungkinkan transfer hidrogen atau elektron untuk menetralkan radikal bebas.

Uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH terhadap ekstrak methanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) dengan konsentrasi induk 100 ppm. Seri konsentrasi yang digunakan adalah 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm. Hasil uji sampel dinyatakan dalam persen penghambatan kemudian diplotkan terhadap konsentrasi sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y=0,467x + 9,479$ (Gambar 3). Hasil tersebut digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} dan diperoleh nilai IC_{50} sebesar 86,86 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 4) masuk ke kategori kuat. 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 [27].

Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH ekstrak metanol daun pandan wangi lebih rendah dibandingkan dengan vitamin C sehingga hal ini dapat dilihat dari perbedaan nilai IC_{50} . 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. Faktor lain yang juga mempengaruhi hal tersebut antara lain metode ekstraksi yang kurang maksimal untuk menarik suatu senyawa yang memiliki sifat antioksidan pada simplisia, dan penyimpanan ekstrak yang kurang stabil [27].

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 vitamin C ($p < 0,05$).

3.7 Gambar dan Tabel



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

Table 1. Hasil Rendemen

Sampel	Berat Simplisia Awal (g)	Berat ekstrak kental (g)	Rendemen (% b/b)
Daun pandan wangi (<i>Pandanus amaryllifolisu</i>)	200	102,574	51,287

Table 2. Hasil Organoleptik

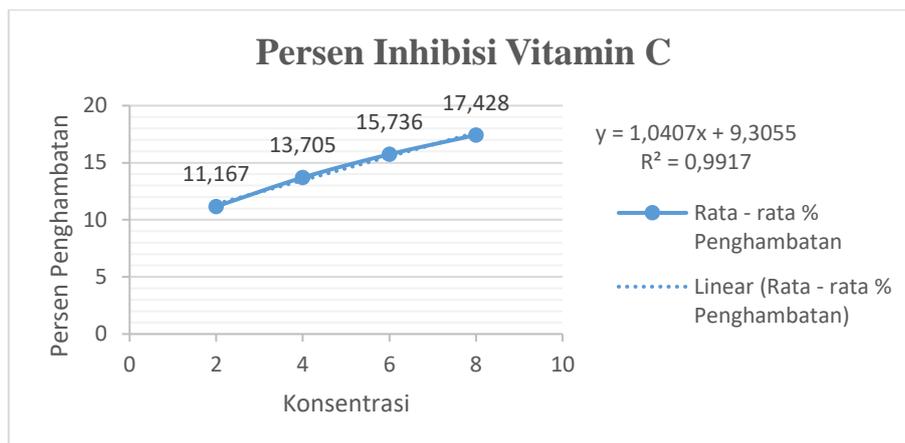
Identifikasi	Hasil	Teori (17)
Bentuk	Ekstrak kental	Ekstrak kental
Bau	Khas pandan wangi	Bau khas pandan wangi
Rasa	Pahit	Khas pandan wangi
Warna	Hijau pekat	Hijau tua

Table 3. Hasil Skrining Fitokimia

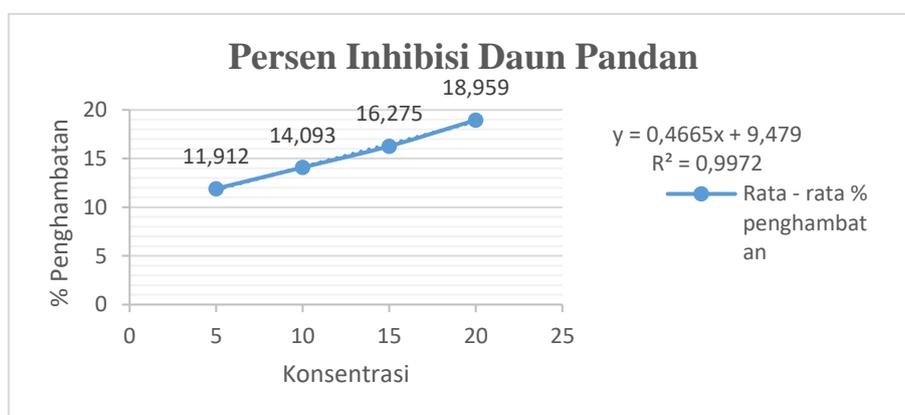
Senyawa	Hasil	Teori (8)	Keterangan	Gambar
Alkaloid Pereaksi Mayer	Terbentuk endapan hijau kecoklatan	Terbentuk endapan hijau kecoklatan	Positif	
Alkaloid Pereaksi Wagner	Terbentuk endapan hijau kecoklatan	Terbentuk endapan hijau kecoklatan	Positif	
Alkaloid Pereaksi Dragendorff	Terbentuk endapan hijau 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	

Table 4. Aktivitas Antioksidan

Sampel	IC ₅₀ (µg/mL)	Kekuatan Antioksidan			
		Sangat Kuat (<50µg/mL)	Kuat (50-100 µg/mL)	Sedang (100-150 µg/mL)	Lemah (151-200 µg/mL)
Vitamin C	39,103				
Ekstrak Metanol Daun Pandan Wangi	86,861				



Gambar. 1 Regresi Linear Vitamin C dan DPPH



Gambar. 2 Regresi Linear Ekstrak Metanol Daun Pandan dan DPPH

4. Kesimpulan

Ekstrak metanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) memiliki aktivitas peredaman radikal bebas dengan nilai IC_{50} sebesar 86,861 $\mu\text{g/mL}$ yang termasuk dalam kategori aktivitas antioksidan yang kuat.

5. Ucapan Terimakasih

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Prodi Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta yang telah memberikan sarana dan prasarana sehingga memungkinkan tim peneliti untuk menambah wawasan dan pengetahuan melalui penelitian ini. Semoga penelitian ini dapat membawa manfaat bagi kemajuan bangsa Indonesia

Referensi

- [1] Adawiyah, Dede Sukandar, A. M. (2015). Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Sari Buah Namnam. *Jurnal Kimia Valensi : Jurnal Penelitian Dan Pengembangan Ilmu Kimia*.
- [2] Aji sulandi, Rafika Sari, S. W. (2013). *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kloroform Buah Lakum dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil)*, Program Studi Farmasi Fakultas kedokteran, Universitas Tanjungpura.

- [3] Anam, C., Agustini, T., & Romadhon, R. (2014). Pengaruh Pelarut Yang Berbeda Pada Ekstraksi Spirulina Platensis Serbuk Sebagai Antioksidan Dengan Metode Soxhletasi. *Jurnal Pengolahan Dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, 3(4), 106–112.
- [4] Arifin, B., & Ibrahim, S. (2018). Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *JurnalZarah*, 6(1), 21–29. <https://doi.org/10.31629/zarah.v6i1.313>
- [5] Astrian. (2014). *Laporan lengkap praktikum: ekstraksi herba putri malu (mimosapudica l.)*. Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin & Helmiana, T. V. (2021). Penapisan Kandungan Fitokimia dan Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanolik Daun Tekelan. *Jurnal Farmasetis*, 10(2), 113–122.
- [6] Buah, E., Merah, N., Hylocereus, K., & Uv-vis, R. S. S. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Vitamin C Ekstrak Buah Naga Merah Keunguan (*Hylocereus lemairei* (Hook.) Britton & Rose) Secara Spektrofotometri UV-Vis. 9(1).
- [7] Capacity, A., Gula, O. F., Variant, P., & Salak, O. F. (2016). Kapasitas Antioksidan Ekstrak Buah Salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) Varian Gula Pasir Menggunakan Metode Penangkapan Radikal DPPH. *Pharmacy*, 13(01), 116–126
- [8] Dwi Puspitasari, A., & Proyogo, L. S. (2017). Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi terhadap Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, 1–8.
- [9] Faras, A.F., Wadkar, S.S., and Ghosh, J. S. (2014). Effect of Leaf Extract of *Pandanus amaryllifolius* Roxb on Growth of *Escherichia coli* and *Micrococcus* (*Staphylococcus*) *aureus*. *International Food Research Journal*, 1, 421–423.
- [10] Fauzi, M. N., Santoso, J., & Riyanta, A. B. (2021). Uji Kualitatif dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Buah Maja (*Aegle Marmelos* (L .) Correa) dengan Metode DPPH. *Journal Riset Farmasi*, 01, 1–8.
- [11] Gangga, E., Purwati, R., Farida, Y., & Kartiningsih. (2017). Penetapan Parameter Mutu Ekstrak yang Memiliki Aktivitas Sebagai Antioksidan Dari Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata* L. Miers.). *Jurnal Imu Kefarmasian Indonesia*, 15(2), 236–243.
- [12] Ghasemzadeh & Jaffar. (2013). *Profiling of phenolic compounds and their antioxidant and anticancer activities in pandan (Pandanus amaryllifolius Roxb) extracts from different locations of Malaysia*.
- [13] Hasrianti, Nururrahmah, & Nurasia. (2016). Pemanfaatan Ekstrak Bawang Merah dan Asam Asetat Sebagai Pengawet Alami Bakso. *Dinamika*, 07(1), 9–30.
- [14] Herbie, T. (2015). Kitab Tanaman Berkhasiat Obat-226. *Tumbuhan Obat Untuk Penyembuhan Penyakit Dan Kebugaran Tubuh, Yogyakarta : Octopus Publishing House, p:359*.
- [15] Hidayat, A. A. (2015). No Title. *Aktivitas Ekstrak Daun Pandan Wangi*.
- [16] Istiqomah. (2013). Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (*Piperis Retrofracti Fructus*). In *Skripsi*. UIN.Jakarta.
- [17] Kemenkes RI. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia Edisi 2* (II, hal. 406–413 & 531). Kementrian Kesehatan RI.
- [18] Khaira. (2010). Meangkal Radikal Bebas dengan Antioksidan. In *Jurnal Sainstek* (Vol. 2, pp. 183–187).
- [19] Kusnadi, K., & Devi, E. T. (2017). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) dengan Metode Refluks. *PSEJ (Pancasakti Science Education Journal)*, 2(1), 56–67. <https://doi.org/10.24905/psej.v2i1.675>.

- [20] Lister & Wilson. (2001). Measurement of total phenolic and ABTS assay for antioxidant activity (*personal communication*). Lincoln, New Zealand: Crops Research Institute.
- [21] Lung, J. K. S., & Destiani, D. P. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin A, C, E dengan Metode DPPH. *Farmaka*, 15(1), 56.
- [22] Etejere, Maria. (2017). Aktivitas Antioksidan Daun Pandan Wangi (*Pandanus amarillyfolius*) dan Fraksi-Fraksinya. Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Buana Yogyakarta.
- [23] Marjoni, & Zulfisa. (2017). Antioxidant Activity of Methanol Extract/Fractions of Senggani Leaves (*Melastoma candidum* D. Don). *Pharmaceutica Analytica Acta*, 08(08), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000557>.
- [24] Prochazkova, D., Bousova, I. & Wilhelmova, N. (2011). No Title. *Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids*, *Fitoterapia*, 82(4).
- [25] Putri, dayu nirwans. (2014). *uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun kenikir (Cosmas caudatus Kunth) terhadap bakteri Salmonella typhi*. Universitas.
- [26] Rohimat, Ita Widowati, A. T. (201 C.E.). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Rumput Laut Coklat (*Turbinaria Conoides* Dan *Sargassum Cristaefolium*) yang Dikoleksi dari Pantai Rancabuaya Garut Jawa Barat. *Journal of Marine Research*. Program Studi Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro.
- [27] Sayuti, K., & Yenrina, R. (2015). *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Andalas University Press.
- [28] Silvia, D., Katharina, K., Hartono, S. A., Anastasia, V., & Susanto, Y. (2016). Pengumpulan Data Base Sumber Antioksidan Alami. *Surya Octagon Interdisciplinary Journal of Technology*, 1(2), 181–198.
- [29] Susanty, S., & Bachmid, F. (2016). Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Refluks terhadap Kadar Fenolik dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays L.*). *Jurnal Konversi*. <https://doi.org/10.24853/konversi.5.2.87-92>.
- [30] Werdhasari, A. (2014). Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biomedik Medisiana Indonesia*, 3(2), 59–68.
- [31] Wulansari, D. dan C. (2011). Penapisan Aktivitas Antioksidan dan beberapa tumbuhan Obat Indonesia Menggunakan radikal 2,2-Diphenyl-1 Picrylhydrazyl (DPPH). *Majalah Obat Tradisional*, 1, 22–25.
- [32] Wullur, A. C., Jonathan, S., Andriani, N. K. W. (2012). Identifikasi Alkaloid pada Daun Sirsak. *Jurnal Ilmiah Farmasi Poltekkes Manado*, 3(2), 9648.
- [32] Yanlinastuti, & Fatimah, S. (2016). Pengaruh Konsentrasi Pelarut untuk Menentukan Kadar Zirkonium dalam Paduan U-Zr dengan Mengguakan Metode Spektrofotometri UV-VIS. *PIN Pengelolaan Instalasi Nuklir*, 1(17), 22–33.
- [33] Yuermaileni. (2018). *Uji Aktivitas antioksidan Ekstrak Etanol Bunga pagoda (clerodendrum paniculatum L) secara spektrofotometer UV-Widyasari*,
- [34] E. M., Sriyani, M. E., Daruwati, I., Halimah, I., & Nuraeni, W. (2019). Karakteristik Fisikokimia Senyawa Bertanda 99 mtc-Kuersetin. *Jurnal Sains Dan Teknologi Nuklir Indonesia*, 20(1), 9. <https://doi.org/10.17146/jstni.2019.1.1.4108>