

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Determinasi Tanaman**

Sampel uji buah naga merah yang digunakan terlebih dahulu telah dilakukan uji determinasi di laboratorium Sistematika tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Tujuan determinasi ini adalah untuk mengetahui kebenaran identifikasi sampel uji yang akan dianalisis dan menghindari kesalahan pengambilan sampel analisis (Harborne, 1987). Hasil identifikasi menunjukkan bahwa sampel uji yang digunakan sebagai bahan uji adalah buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) (Lampiran 1).

#### **B. Penyiapan Sampel**

Sampel yang digunakan yaitu kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*). Kulit buah naga merah ini dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil untuk mempercepat proses pengeringan (Sudewo, 2009). Kulit buah naga dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C. Sebanyak 20 kg buah didapatkan kulit buah naga merah basah sejumlah 7 kg dan setelah dikeringkan mengalami penyusutan menjadi serbuk kering seberat 470 gram.

Kulit buah naga merah yang sudah kering diekstraksi menggunakan etanol 95% dengan perbandingan serbuk dengan pelarut yang digunakan adalah 1:10. Ekstrak kental etanolik kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) (KBNM-Etanol) yang didapatkan adalah sebanyak 19,273 gram. Ekstrak kental KBNM-Etanol yang digunakan untuk fraksinasi cair-cair hanya sebanyak 5,022

gram. Metode fraksinasi cair-cair dilakukan untuk memisahkan antara senyawa polar dengan senyawa semi polar dalam ekstrak kental KBNM-Etanol. Senyawa polar (seperti betasianin danantosianin) akan tertarik ke dalam pelarut campuran H<sub>2</sub>O-Metanol, sedangkan senyawa yang bersifat semipolar (senyawa flavonoid seperti flavon dan flavonol) akan tertarik ke dalam pelarut kloroform (Budilaksono dkk., 2014).

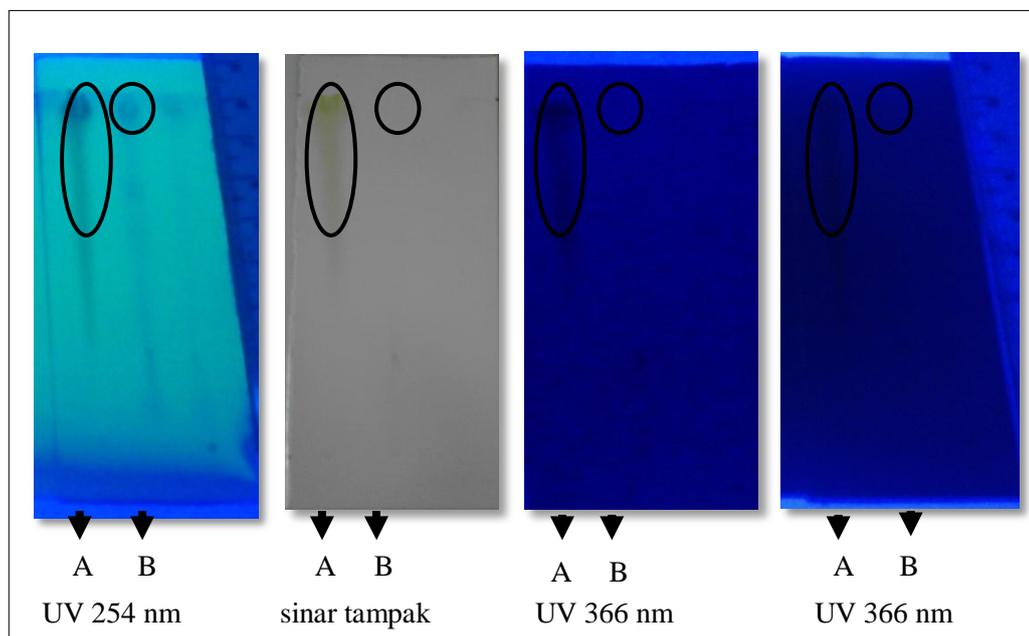
Ketika proses fraksinasi, fraksi campuran H<sub>2</sub>O-Metanol ekstrak etanolik kulit buah naga merah (KBNM-Metanol) berada di lapisan atas, dan fraksi kloroform KBNM berada pada lapisan bawah. Karena pelarut kloroform memiliki massa jenis yang lebih besar (1,49 g/cm<sup>3</sup>) dibanding metanol (0,7915 g/cm<sup>3</sup>). Hasil fraksi kloroform KBNM selanjutnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dilanjutkan dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 50°-70°C. Fraksi kental kloroform KBNM yang diperoleh adalah sebanyak 1,987 gram dan didapatkan nilai rendemen fraksi kental kloroform KBNM terhadap kulit buah naga kering sebesar 1,622 % (Lampiran 2).

### C. Kromatografi Lapis Tipis

Untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid yang terkandung pada kloroform KBNM dapat dilakukan uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis). KLT merupakan suatu teknik pemisahan yang menggunakan fase diam dan fase gerak (Gandjar dan Abdul Rohman, 2012). Fase gerak yang digunakan adalah n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) dan fase diam yang digunakan adalah selulosa. Pembanding yang digunakan pada uji KLT ini adalah kuersetin (golongan flavonoid). Campuran n-butanol : asam asetat : air yang diambil

untuk fase gerak adalah pada lapisan atas karena pada lapisan ini mengandung air dan asam asetat yang terdispersi dalam n-butanol.

Pemilihan selulosa sebagai fase diam dikarenakan fase diam yang lain seperti silika dapat menyebabkan terbentuknya kompleks antara senyawa flavonoid yang banyak mengandung gugus  $-OH$  dengan logam  $CaSO_4$  pada silika. Fase gerak yang bersifat polar dan fase diam yang bersifat non polar mengakibatkan senyawa flavonoid (kuersetin) akan lebih tertarik pada fase gerak (Christinawati, 2007). Uji KLT yang diamati dibawah sinar tampak, UV 254 nm, UV 366 nm sebelum dan setelah disemprot pereaksi sitroborat dapat dilihat pada gambar 7.



**Gambar 7. Hasil uji KLT kuersetin (A) dan Kloroform KBNM (B)**

Kandungan flavonoid pada fraksi kloroform KBNM dapat diketahui apabila nilai  $R_f$  fraksi kloroform KBNM sama dengan nilai  $R_f$  kuersetin.

Berdasarkan hasil perhitungan, nilai Rf fraksi kloroform KBNM adalah 0,93 sedangkan Rf kuersetin adalah 0,87 (Lampiran 3). Hal ini menunjukkan bahwa kedua nilai Rf berbeda.

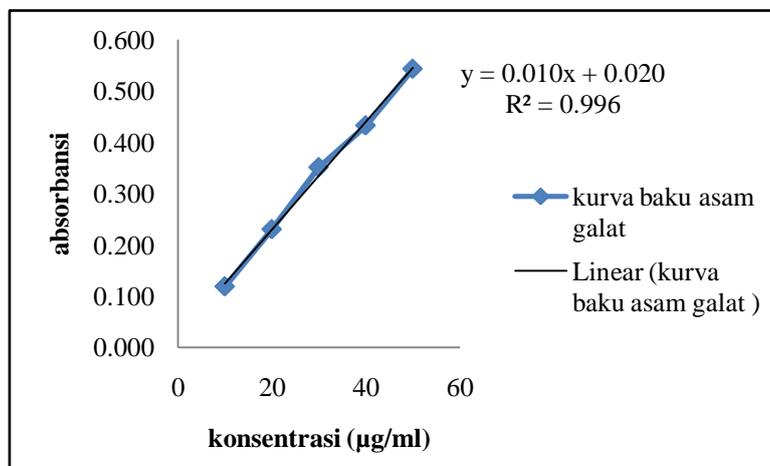
**Tabel 4. Nilai Rf dan warna bercak sampel uji pada Plat KLT**

<b>Sampel</b>	<b>Rf</b>	<b>Sinar tampak</b>	<b>UV 254 nm</b>	<b>UV 366 nm sebelum disemprot sitroborat</b>	<b>UV 366 nm setelah disemprot sitroborat</b>
<b>A</b>	0,87	Kuning kehijauan	Kuning	Coklat	Flouresensi kuning menyala
<b>B</b>	0,93	Kuning kecoklatan	Kuning pucat	Coklat	Flouresensi kuning tipis

Setelah diamati terlihat adanya bercak sampel berfluoresensi kuning setelah disemprotkan pereaksi sitroborat. Semua flavonoid akan memberikan fluoresensi kuning pada UV 366 nm (Harborne, 1987). Oleh karena itu, bercak fraksi kloroform KBNM dan standar kuersetin merupakan senyawa flavonoid.

#### **D. Analisis Kandungan Fenolik Total**

Uji kandungan fenolik total fraksi kloroform KBNM dilakukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu yang telah dikembangkan oleh Singleton dan Rossi (Rahmawati, 2009). *Gallic Acid Equivalent* (GAE) merupakan acuan umum untuk mengukur sejumlah senyawa fenolik yang terdapat dalam suatu bahan. Sehingga perlu dibuat kurva hubungan konsentrasi asam galat dengan kadar 10, 20, 30, 40 dan 50 µg/mL (gambar 8). Pemilihan asam galat adalah berdasarkan ketersediaan substansi yang lebih stabil dan murni serta harga yang lebih murah dibandingkan senyawa standar yang lainnya (Rahmawati, 2009).



**Gambar 8. Kurva hubungan konsentrasi asam galat dan absorbansi**

Hubungan antara nilai absorbansi dan konsentrasi asam galat menghasilkan suatu persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier asam galat yang didapat adalah  $y = 0,0105x + 0,0201$  dengan nilai  $R^2 = 0,9968$  (gambar 8). Kadar fenol total larutan fraksi kloroform KBNM (sumbu x) dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi sampel fraksi kloroform KBNM kedalam sumbu y.

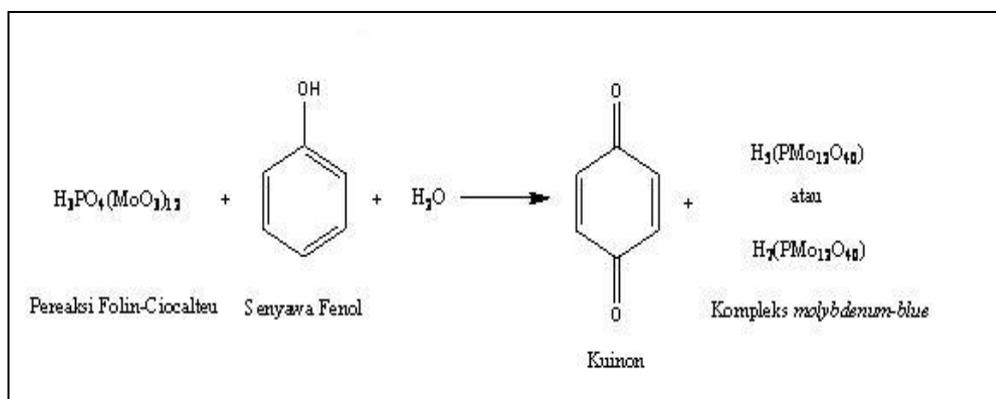
**Tabel 5. Perhitungan Konsentrasi fenol sampel fraksi kloroform KBNM**

Sampel	Replikasi ke-	Absorbansi (760 nm)	Konsentrasi fenol total larutan (µg GAE/ml sampel)	Kadar Fenol Total (mg GAE/100g)

				<b>sampel)</b>
<b>Fraksi kloroform KBNM</b>	1	0,121	10,1	2430
	2	0,124	10,4	2490
	3	0,124	10,4	2450
<b>Rata- rata</b>			10.3	2470
<b>SD</b>			0,173	34,641

Dari hasil perhitungan, rata-rata konsentrasi fenol total larutan fraksi kloroform KBNM adalah  $10.3 \pm 0.173 \mu\text{g GAE/mL}$  sampel (Lampiran 4). Pengenceran tidak dilakukan dalam uji ini dan larutan stok yang digunakan adalah 10 mg fraksi kloroform KBNM yang dilarutkan dalam 10 mL etanol. Rata-rata kadar fenol total (TPC) fraksi KBNM yang didapat adalah  $2.470 \pm 34,641 \text{ mg GAE/100g}$  (Lampiran 5). Artinya, setiap 100 gram fraksi kloroform KBNM setara dengan 2,470 gram asam galat.

Menurut Kiessoun dkk., (2010) Senyawa golongan fenol diketahui sangat berperan terhadap aktivitas antioksidan, semakin besar kandungan senyawa golongan fenolnya maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Kandungan fenolik total diuji menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dimana terjadi reaksi oksidasi-reduksi antara reagen Folin (asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstad) dan senyawa polifenol, sehingga terbentuk malibdenum-tungsen dengan kompleks warna biru. Semakin tinggi kadar fenol pada sampel, semakin banyak molekul kromagen (biru) yang terbentuk akibat absorbansinya meningkat. (Wisesa dan Widjanarko, 2014).

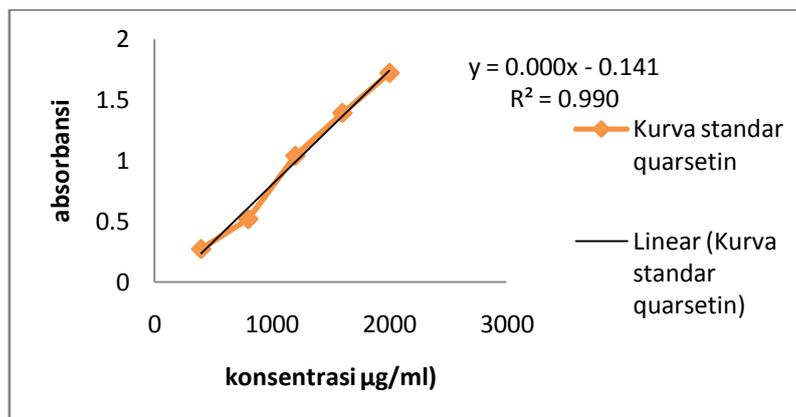


**Gambar 9. Reaksi Follin-Ciocalteu dengan senyawa fenol (Turisman, 2012)**

Hasil dari uji total fenol kloroform KBNM sangat rendah bila dibandingkan dengan senyawa pembandingnya (asam galat). Sehingga dapat disimpulkan daya antioksidan kloroform KBNM lemah.

**E. Analisis Kandungan Flavonoid Total**

Analisis flavonoid total fraksi kloroform KBNM dilakukan menggunakan metode kolorimetri  $AlCl_3$  berdasarkan Zhinsen dkk., (1999) yang telah dimodifikasi oleh Saini dkk., (2011). Kandungan flavonoid total dinyatakan dalam gram ekuivalen kuersetin tiap 100 gram subfraksi (% b/b EQ) (Abdul Rohman dkk., 2007). Sehingga perlu dibuat kurva hubungan konsentrasi kuersetin dan absorbansinya (gambar 10). Alasan pemilihan kuersetin sebagai standar adalah karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang dapat membentuk kompleks dengan  $AlCl_3$  (Desmiaty, 2009).



**Gambar 10. kurva standar kuersetin pada uji total flavonoid**

Nilai absorbansi dan konsentrasi kuersetin dihubungkan untuk membuat suatu persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier kuersetin yang didapat yaitu  $y=0.0009x - 0.1414$  dengan  $R^2 = 0.9904$  (Lampiran 5). Apabila nilai absorbansi fraksi kloroform KBNM dimasukkan ke dalam sumbu y dalam persamaan regresi linier kuersetin maka kadar flavonoid dalam sampel (sumbu x) dapat diketahui.

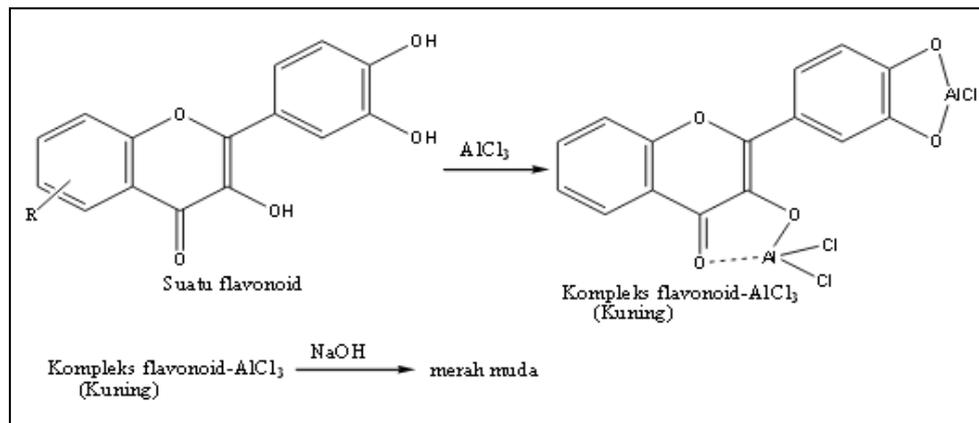
**Tabel 6. Kandungan total flavonoid Fraksi Kloroform KBNM**

Sampel	Replika ke-	Kadar flavonoid dalam sampel (ppm)	Konsentrasi sampel (ppm)	Total flavonoid (% b/b EQ)
Fraksi kloroform KBNM	1	243,770	1050	23,216
	2	241,111	1050	22,962
	3	243,333	1050	23,174
Rata-rata		242,738	1050	23,117
SD		1,425	0	0,135

Dari hasil perhitungan, rata-rata kadar flavonoid dalam sampel fraksi kloroform KBNM adalah  $242,738 \pm 1,425$  ppm (Lampiran 5). Larutan stok

dibuat dengan melarutkan 10,5 mg fraksi kloroform KBNM kedalam 10 mL etanol. Oleh karena itu, rata-rata kadar total flavonoid fraksi kloroform KBNM yang didapatkan dari hasil perhitungan adalah  $23,117 \pm 0,135$  % b/b EQ (Lampiran 5). Artinya, tiap 100 gram fraksi kloroform KBNM ekuivalen atau setara dengan 23,117 gram senyawa flavonoid kuersetin. Apabila dibandingkan dengan penelitian Chet (2009), fraksi kloroform KBNM menunjukkan kadar flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak air kulit buah naga dengan rata-rata kadar flavonoid sebesar  $1,8767 \pm 0,3287$  mg ekuivalen katekin/ 25 gram.

Prinsip penentuan kandungan flavonoid ini adalah dengan mengukur absorbansi larutan dimana flavonoid dalam kloroform KBNM akan membentuk kompleks yang berwarna kuning dengan  $AlCl_3$ , yang selanjutnya akan bereaksi dengan basa kuat NaOH membentuk warna merah muda pada panjang gelombang 510 nm (Abdul Rohman, 2006; Nurhaeni, dkk., 2014) dan jika menghasilkan warna kuning, orange, dan merah menandakan adanya flavonoid (gambar 11) (Harborne, 1987).



**Gambar 11. Reaksi penetapan kandungan flavonoid total dengan cara khelasi AlCl<sub>3</sub> (Harborne, 1987).**

Dari hasil uji total flavonoid ekstrak kloroform KBNM memberikan hasil positif berupa warna kuning terang yang serupa warna pembanding kuersetin dengan pereaksi AlCl<sub>3</sub>. Hasil menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada kloroform KBNM dengan nilai sebesar  $23,117 \pm 0,135$  % b/b EQ.

#### F. Uji Antioksidan Metode DPPH

Daya antioksidan senyawa fenol dan flavonoid fraksi kloroform KBNM dapat diketahui dengan melakukan uji penangkapan radikal bebas DPPH. Metode DPPH dipilih karena merupakan metode yang cepat, sederhana dan murah untuk mengukur aktivitas antioksidan (Prakash dkk., 2001). Kuersetin dipilih sebagai pembanding karena kuersetin mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Bila vitamin C mempunyai aktivitas antioksidan 1, maka kuersetin memiliki aktivitas antioksidan 4,7 (Sugrani dkk., 2009). Berikut adalah hasil uji penangkapan radikal bebas DPPH oleh kuersetin dan fraksi kloroform KBNM:

**Tabel 7. Uji penangkapan radikal bebas DPPH**

<b>Sampel</b>	<b>Konsentrasi (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Rerata % inhibisi</b>
Kuersetin	1	31.132
	2	46.275
	3	61.829
	4	75.568
	5	86.357
Fraksi kloroform KBNM	100	14.70588
	200	22.96919
	300	30.35714
	400	41.03641
	500	51.29552

Nilai % inhibisi didapatkan dari perhitungan yang dilakukan dengan memasukkan nilai absorbansi kedalam rumus % inhibisi (Lampiran 6). Konsentrasi kuersetin dan fraksi kloroform KBNM yang dihubungkan dengan nilai % inhibisi akan menghasilkan suatu persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier kuersetin yang didapat adalah  $y = 13,974x + 18,309$  dengan  $R^2 = 0,9954$ , sedangkan persamaan regresi linier fraksi kloroform KBNM adalah  $y = 0,091x + 4,698$  dengan  $R^2 = 0,994$  (Lampiran 6). Persamaan regresi linier ini digunakan untuk mengetahui nilai  $IC_{50}$  (sumbu x) dengan cara memasukkan nilai 50 ke dalam sumbu y kedalam persamaan regresi linier yang didapat.

Dari hasil perhitungan, maka didapatkan nilai  $IC_{50}$  kuersetin sebesar 2,2679  $\mu\text{g/mL}$  dan  $IC_{50}$  fraksi kloroform KBNM adalah 497,824176  $\mu\text{g/mL}$  (Lampiran 6). Artinya, pada fraksi kloroform KBNM membutuhkan konsentrasi sebesar 497,824176  $\mu\text{g/mL}$  untuk menangkap radikal DPPH sebanyak 50%, sedangkan kuersetin hanya membutuhkan konsentrasi sebesar 2,2679  $\mu\text{g/mL}$  untuk menangkap radikal DPPH sebanyak 50%.

Senyawa flavonoid berperan sebagai antioksidan karena memiliki gugus hidroksil yang dapat melepaskan proton dalam bentuk ion hidrogen. Ion hidrogen hanya memiliki satu buah proton dan tidak memiliki elektron, sehingga elektron radikal yang terdapat pada atom nitrogen di senyawa DPPH berikatan dengan ion hidrogen dan menghasilkan DPPH yang tereduksi (Gurav, dkk. 2007). Nilai  $IC_{50}$  yang terlalu besar diduga karena senyawa flavonoid mengikat gugus samping sehingga dapat mengakibatkan penghambatan aktivitas antioksidan. Hal tersebut mengakibatkan flavonoid tidak dapat mendonasikan hidrogen dan elektron untuk menangkal radikal bebas dikarenakan terjadinya halangan sterik (Harborne, 1987). Adanya gugus lain di dalam ekstrak kloroform KBNM juga dapat menyebabkan flavonoid termetilasi. Perubahan atom (-H) menjadi gugus metil (-CH<sub>3</sub>) melalui reaksi metilasi dapat menurunkan aktivitas antioksidan, yang disebabkan pengurangan atom -H yang merupakan sumber proton untuk penangkapan radikal bebas (Mikamo dkk., 2000; Pranata, 2013). Menurut Pine (1988) Potensi antioksidan fraksi kloroform yang tergolong lemah diduga turut disebabkan oleh adanya pengganggu seperti protein, lemak dan senyawa lainnya yang dapat terlarut dalam pelarut non-polar, dalam hal ini adalah pelarut kloroform, sehingga menghalangi proses penangkapan radikal bebas. Adanya senyawa protein atau lemak pada fraksi dapat mengganggu proses penangkapan radikal bebas oleh senyawa flavonoid. Protein atau lemak pada tumbuhan dapat memberikan atom hidrogen yang dimilikinya sehingga akan berikatan dengan radikal hidroksil pada DPPH.

Walaupun nilai  $IC_{50}$  dari fraksi kloroform KBNM masuk ke dalam katagori lemah jika dilihat dari tingkat aktivitas antioksidan menurut Jun (2003) ( $>150 \mu\text{g/mL}$ ), namun nilai  $IC_{50}$  200-1000  $\mu\text{g/mL}$  dinyatakan masih berpotensi sebagai antioksidan (Molyneux, 2004; Pranata, 2013).

#### G. Panjang Gelombang Maksimal dan SPF secara *in vitro*

Penentuan nilai SPF dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri (Sayre dkk., 1979). Uji SPF secara *in vitro* dilakukan dengan menetapkan panjang gelombang absorpsi maksimum ( $\lambda$  maks). Untuk mengetahui panjang gelombang maksimum fraksi kloroform KBNM, dilakukan *scanning* spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang antara 200-400 nm. Berikut adalah hasil *scanning* spektrofotometer UV-Vis fraksi kloroform KBNM:

**Tabel 8. *Scanning* panjang gelombang maksimal fraksi kloroform KBNM**

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\lambda$ max (260-400 nm interval 2 nm)	Daerah Ultraviolet
5	298	B
25	294	B
50	290	B
100	254	C

Spektrum elektromagnetik pada area UV terbagi menjadi 3 pita yaitu; ultraviolet A (UVA : 315-400 nm) ; ultraviolet B (UVB : 280-315 nm) dan ultraviolet C (UVC : 100-280 nm) (Dutra dkk., 2004). Panjang gelombang maksimum fraksi kloroform KBNM konsentrasi 5, 25, dan 50  $\mu\text{g/mL}$  diketahui berada pada rentang daerah UVB, sedangkan panjang gelombang maksimum fraksi kloroform KBNM konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$  berada pada rentang daerah

UVC (100-280 nm) (Tabel 8). Konsentrasi fraksi kloroform KBNM yang berada pada rentang UVB dapat dilakukan perhitungan nilai SPF menggunakan rumus yang telah dikembangkan oleh Mansur dkk., (1986), sedangkan konsentrasi fraksi kloroform KBNM yang berada pada rentang UVC tidak perlu dilakukan perhitungan nilai SPF karena sinar radiasi UVC merupakan radiasi yang tidak sampai ke permukaan bumi karena terserap oleh lapisan ozon (McKinlay, 1987).

UVB memiliki energi yang dapat menembus lapisan paling luar kulit (epidermis) yang efeknya dapat terlihat secara langsung berupa eritema. Kemampuan suatu tabir surya dapat melindungi kulit dengan menunda eritema dinyatakan dengan *Sun Protection Factor* (SPF) (Hassan dkk., 2013). Nilai SPF menunjukkan berapa kali perlindungan kulit dilipatgandakan sehingga aman di bawah sinar matahari tanpa mengalami eritema. Senyawa kimia dalam tabir surya umumnya adalah senyawa aromatis yang terkonjugasi dengan gugus karbonil. Struktur ini dapat menyerap energi yang tinggi dari matahari kemudian melepas energi tersebut menjadi lebih rendah.

Rata-rata nilai SPF pada rentang daerah UVB fraksi kloroform KBNM adalah  $0.0093 \pm 0.0036$  (Lampiran 8). Menurut Wasitaadmatdja, 1997; Damogalad, 2013) nilai SPF minimal suatu tabir surya atau agen fotoprotektif diklasifikasikan berdasarkan kekuatan daya fotoprotektifnya (tabel 9).

**Tabel 9. Tingkat kemampuan tabir surya (Wasitaadmatdja, 1997; Damogalad, 2013)**

<b>Nilai SPF</b>	<b>Keterangan</b>
2-4	Minimal
4-6	Sedang
6-8	Ekstra
8-15	Maksimal
>15	Ultra

Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa fraksi kloroform KBNM konsentrasi 5, 25, 50 dan 100 mg/L tidak memiliki daya fotoprotektif. Rendahnya nilai SPF padafraksi kloroform KBNM (<2) diduga disebabkan oleh konsentrasi fraksi kloroform KBNM yang digunakan terlalu rendah