

## **BAB III**

### **Metode Penelitian**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah observasional laboratorik untuk mengetahui kandungan fenolik total, kandungan flavonoid total, nilai  $IC_{50}$  serta nilai SPF pada fraksi etilasetat ekstrak etanolik kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) sebagai agen antioksidan dan fotoprotektif.

#### **B. Tempat Dan Waktu Penelitian**

##### **1. Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmasi dan Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

##### **2. Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan dari bulan November 2014 sampai dengan Juni 2015.

#### **C. Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*). Buah naga merah yang digunakan berasal daerah Banyuwangi (diambil pada bulan November 2014). Kulit buah naga merah diambil dari 20 kg buah naga merah. Kulit buah naga merah kemudian dikeringkan dan diekstraksi dengan etanol 95% menjadi ekstrak etanolik kulit buah naga merah. Selanjutnya ekstrak kental difraksinasi untuk mendapatkan fraksi etilasetat.

## D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 1. Variabel Penelitian

#### a. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi fraksi etilasetat ekstrak etanolik kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*).

#### b. Variable tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar fenolik total, kadar flavonoid total, nilai IC<sub>50</sub>, serta panjang gelombang absorpsi maksimum dan nilai SPF.

### 2. Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini adalah:

- a. Kadar fenolik total merupakan kadar senyawa fenolik dalam sampel yang dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat atau *Gallic Acid Equivalent* (GAE). Kadar fenolik total didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus TPC (*Total Phenolic Content*), dimana nilai C (kadar fenol total larutan) atau sumbu x didapatkan dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam sumbu y pada persamaan regresi linier standar asam galat. Persamaan regresi ini didapatkan dari hubungan antara konsentrasi asam galat (10, 20, 30, 40, dan 50 µg/mL) dan absorbansi asam galat. Absorbansi didapatkan dari hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Folin-Ciocalteu. Metode ini merupakan reaksi oksidasi-reduksi antara reagen Folin (asam fosfomolibdat dan asam

fosfotungstad) dan senyawa polifenol yang terdapat pada sampel sehingga terbentuk malibdenum-tungsen dengan kompleks warna biru (Wisesa dan Widjanarko, 2014).

- b. Kadar flavonoid total merupakan kadar flavonoid dalam sampel yang dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin (EQ). Kadar flavonoid total didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus Total Flavonoid, dimana kadar flavonoid dalam sampel (sumbu x) diketahui dengan memasukkan absorbansi sampel ke dalam sumbu y pada persamaan regresi linier kuersetin. Persamaan regresi linier kuersetin dibuat dari hubungan antara konsentrasi kuersetin (400, 800, 1200, 1600 dan 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dengan absorbansi kuersetin. Absorbansi didapatkan dari hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode kolorimetri menggunakan khelasi  $\text{AlCl}_3$ . Metode ini merupakan reaksi  $\text{AlCl}_3$  yang akan membentuk kompleks dengan gugus keto pada atom C-4 dan juga dengan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-4 yang bertetangga dari flavon dan flavonol (Desmiaty, 2009).
- c.  $\text{IC}_{50}$  (*Inhibitory Concentration*) merupakan konsentrasi yang ekuivalen memberikan 50% efek aktivitas antioksidan atau efek menangkap radikal bebas (Ciptaningsih, 2012; Marxen *et al.*, 2007).  $\text{IC}_{50}$  digunakan sebagai parameter yang menunjukkan aktivitas antioksidan yang didapatkan dengan menggunakan uji DPPH. Absorbansi DPPH biasanya diukur pada panjang gelombang 515-520 nm (Marxen *et al.*, 2007). Prinsip uji DPPH adalah perubahan warna radikal DPPH akibat

reaksi antara radikal bebas DPPH dengan satu atom hidrogen yang dilepaskan oleh senyawa yang terkandung dalam bahan uji untuk membentuk senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin yang berwarna kuning (Josephy, 1997).

- d. Panjang gelombang absorpsi maksimum dan nilai SPF ditentukan dengan metode spektrofotometri menggunakan daerah serapan UVB yaitu antara 290 hingga 320 nm. Nilai SPF didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus SPF yang telah dikembangkan oleh Mansur *et al.* (1986) (Dutra, 2004).

## E. Instrumen Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan adalah sebagai berikut:

### 1. Alat

Oven, bejana maserasi, bejana KLT, Blender (Philips<sup>®</sup>), cawan porselen, *Rotary evaporator* (IKA<sup>®</sup> RV10), waterbath (Mettler<sup>®</sup>), plat selulosa (E merck<sup>®</sup>), pipa kapiler, kipas angin (Sekai<sup>®</sup>), lampu UV 254 dan UV 366 nm, termometer, timbangan analitik (Mettler Toledo<sup>®</sup>), corong pisah (Pyrex<sup>®</sup>), rak tabung reaksi, mikropipet (Socorex<sup>®</sup>), pipet tetes, sendok tanduk, tabung reaksi (Pyrex<sup>®</sup>), erlenmeyer (Pyrex<sup>®</sup>), gelas ukur (Pyrex<sup>®</sup>), labu takar (Pyrex<sup>®</sup>), vortex, propipet, pipet volume (Pyrex<sup>®</sup>), kuvet, Spektrofotometer UV-Vis mini-1240 (Shimadzu<sup>®</sup>).

### 2. Bahan

Buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*), alkohol 96% (pro analisis, E Merck), etanol 95% (teknis, Bratac), etanol 70% (teknis, Bratac), etilasetat

(teknis, Bratac), metanol (teknis, Bratac), pereaksi sitroborat (asam borat dan asam sitrat) (E Merck), n-butanol (pro analisis, E Merck), asam asetat (pro analisis, E Merck), aquades (teknis, Bratac), Folin-ciocalteu (E Merck), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (E Merck), kuersetin standard (Sigma), AlCl<sub>3</sub> (E Merck), NaNO<sub>2</sub> (E Merck), NaOH (J.T. Baker), DPPH (E Merck).

## **F. Cara Kerja**

### **1. Bahan tumbuhan**

Kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dipisahkan dengan daging buahnya karena hanya kulit buahnya yang digunakan sebagai sampel. Setelah itu, kulit buah naga merah dipotong kecil-kecil ( $\pm 5\text{mm}$ ) kemudian dikeringkan dengan bantuan sinar matahari dalam keadaan tertutup kain hitam. Namun, dikarenakan kulit buah naga yang tidak segera mengering maka dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven pada suhu 50<sup>0</sup>C. Kulit buah naga merah yang sudah kering dihaluskan dengan cara diblender sehingga didapatkan serbuk kering kulit buah naga merah.

### **2. Ekstraksi**

Serbuk kering kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dimaserasi dengan etanol 95% dengan perbandingan bahan:pelarut (1:10) selama 7 hari (5 hari maserasi dan 2 hari remaserasi) pada suhu kamar dalam bejana kedap cahaya. Larutan ekstrak kemudian disaring dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50<sup>0</sup>C dilanjutkan dengan menggunakan waterbath pada suhu 50<sup>0</sup>-70<sup>0</sup>C sehingga didapatkan

ekstrak etanolik kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) (KBNM-EtOH).

### 3. Fraksinasi

KBNM-EtOH dilarutkan dalam campuran H<sub>2</sub>O-MeOH (3:7). Selanjutnya, dilakukan fraksinasi cair-cair dengan etilasetat (*AcOEt*) sehingga diperoleh fraksi metanol ekstrak etanolik kulit buah naga merah (KBNM-MeOH) dan fraksi etilasetat ekstrak etanolik kulit buah naga merah (KBNM-*AcOEt*). Fraksi KBNM-*AcOEt* dipekatkan menggunakan kompor listrik suhu 50°C. Fraksi kental digunakan untuk melakukan berbagai pengujian selanjutnya (Junior *et al.*, 2013).

### 4. Analisis Kualitatif Flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Mula-mula bejana kromatografi dijenuhi dengan uap fase gerak n-butanol:asam asetat:air (4:1:5 v/v, lapisan atas). Penjenuhan fase gerak dilakukan dengan cara memasukkan kertas saring ke dalam bejana kromatografi yang terisi fase gerak dalam keadaan tertutup rapat hingga fase gerak mencapai ujung atas kertas saring. Plat KLT selulosa dioven pada suhu 70°C selama 10 menit untuk menghilangkan kadar air. Selanjutnya, standar kuersetin dan fraksi KBNM-*AcOEt* ditotolkan pada plat KLT selulosa dengan menggunakan pipet kapiler pada jarak 1 cm dari bagian bawah. Bercak penotolan dibiarkan hingga kering kemudian dielusi dalam bejana kromatografi. Jarak elusi yang digunakan adalah 8 cm. Pengamatan plat KLT selulosa dilakukan dibawah sinar tampak, UV 254

nm dan 366 nm sebelum dan setelah disemprot dengan pereaksi sitroborat (Suhendi *et al.*, 2011).

#### **5. Penetapan Kuantitatif Kandungan Flavonoid Total**

Kadar flavonoid total ditetapkan dengan cara khelasi  $\text{AlCl}_3$ . Sebanyak 0,4 mL fraksi KBNM-*AcOEt* ditambahkan dengan 0,6 mL aquadest dan 0,06 mL  $\text{NaNO}_2$  (5%). Larutan diinkubasi selama 6 menit pada suhu kamar lalu ditambahkan 0,06 mL  $\text{AlCl}_3$  (10%), setelah 5 menit kemudian tambahkan  $\text{NaOH}$  0,4 mL (1mM). Selanjutnya absorbansi diukur pada panjang gelombang 510 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali (Saini *et al.*, 2011).

Kuersetin konsentrasi 400, 800, 1200, 1600 dan 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diuji seperti prosedur diatas. Persamaan regresi linier kuersetin dibuat dari hubungan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi kuersetin. Persamaan regresi ini digunakan untuk menghitung kadar flavonoid dalam sampel.

#### **6. Analisis Kuantitatif Kandungan Fenolik Total**

Kandungan fenolik total diuji menggunakan reagen Folin-Ciocalteu, dimana sejumlah 400  $\mu\text{L}$  fraksi KBNM-*AcOEt* ditambahkan 3,16 mL aquadest dan 200  $\mu\text{L}$  reagen Folin-Ciocalteu, dicampur hingga homogen. Larutan digojog selama 6 menit. Selanjutnya, ditambahkan 600  $\mu\text{L}$  larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% untuk membentuk suasana basa dan dihomogenkan dengan cara divortex (Talapessi *et al.*, 2013). Larutan didiamkan pada suhu kamar selama 2 jam. Absorbansi diamati pada panjang gelombang 760 nm

dengan spektrofotometer UV-Vis. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali (Junior *et al.*, 2013).

Asam galat konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50  $\mu\text{g/mL}$  diuji seperti prosedur diatas. Persamaan regresi linier asam galat dibuat dari hubungan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi asam galat. Persamaan regresi ini digunakan untuk menghitung kadar fenol total larutan.

#### **7. Uji Penangkapan Radikal Bebas DPPH**

Fraksi KBNM-*AcOEt* (kadar 100, 200, 300, 400 dan 500  $\mu\text{g/mL}$ ) masing-masing dicampur dengan 1 mL DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrasil) 0,4 mM dilarutkan dalam larutan etanol hingga 5 ml. Larutan didiamkan bereaksi pada temperatur ruangan dan gelap selama 30 menit. Absorbansi masing-masing larutan dibaca pada panjang gelombang 518 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Sumarny *et al.*, 2014). Replikasi dilakukan 2 kali dengan masing-masing absorbansinya diukur sebanyak 2 kali.

Nilai absorbansi yang didapat adalah absorbansi sampel, sedangkan absorbansi kontrol adalah absorbansi yang didapatkan dari larutan yang berisi 1 mL DPPH dalam 5 mL etanol. % inhibisi dihitung menggunakan rumus:

Persamaan regresi linier dibuat dari hubungan antara konsentrasi dan % inhibisi. Persamaan regresi ini digunakan untuk menghitung nilai  $\text{IC}_{50}$ .



Kuersetin konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5  $\mu\text{g/mL}$  diuji seperti prosedur diatas untuk dijadikan pembanding.

#### 8. Penetapan Panjang Gelombang Absorpsi Maksimum dan SPF

Untuk menetapkan panjang gelombang absorpsi maksimum ( $\lambda_{\text{maks}}$ ), fraksi kental KBNM-*AcOEt* dilarutkan dalam etanol absolut sehingga didapatkan seri kadar 5, 25, 50 dan 100 mg/L. Selanjutnya, dilakukan *scanning* spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang antara 260-400 nm dengan interval 2 nm. Blanko yang digunakan adalah etanol (Junior *et al.*, 2013).

**Tabel 5.** Panjang gelombang dan nilai EE ( $\lambda$ ) x I ( $\lambda$ ) (Junior *et al.*, 2013)

Panjang gelombang (nm)	EE x I
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180
<b>Total</b>	<b>1.0000</b>

Panjang gelombang maksimum yang didapatkan selanjutnya disesuaikan dengan nilai EE x I yang sudah ditentukan oleh Sayre *et al.* (1979) (Tabel 5). Nilai SPF dihitung menggunakan rumus yang telah dikembangkan oleh Mansur *et al.* (1986) yaitu (Dutra, 2004):

$$\text{SPF}_{\text{Spektrofotometrik}} = \text{CF} \times \sum_{290-320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

Keterangan:

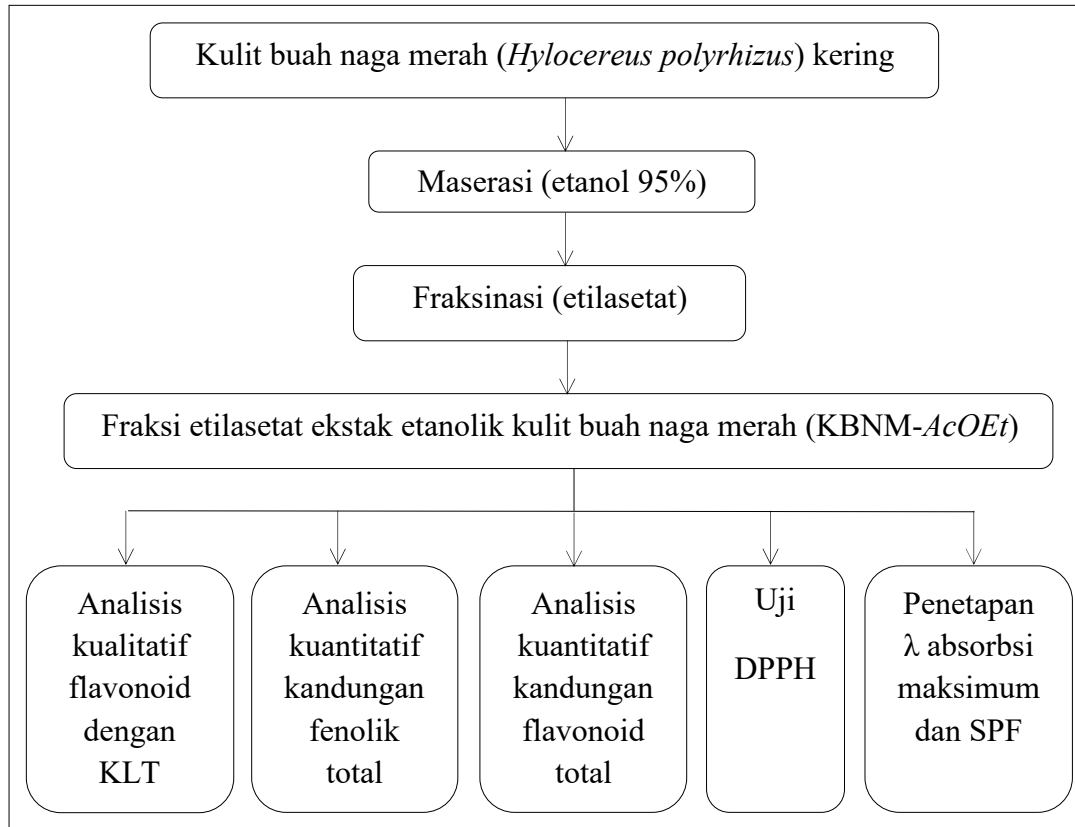
EE ( $\lambda$ ) : Spektrum efek erythemal

I ( $\lambda$ ) : Spektrum intensitas matahari

Abs ( $\lambda$ ) : Absorbansi

CF : Faktor koreksi (= 10)

### G. Skema langkah kerja



Gambar 6. Skema langkah kerja

### H. Analisis data

Daya antioksidan dilihat dari nilai  $IC_{50}$  yang dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier yang didapatkan dari hubungan antara konsentrasi sampel ( $\mu\text{g/mL}$ ) dengan % inhibisi, sedangkan daya fotoprotektif dilihat dari nilai SPF ekstrak etanolik kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) fraksi etilasetat yang didapatkan dari perhitungan rumus SPF.