

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Penyiapan sampel**

Kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dalam keadaan basah yang didapatkan dari 20 kg buah naga merah utuh adalah sebanyak 7 kg. Kulit buah naga merah ini dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil ( $\pm 5$ mm) untuk mempercepat proses pengeringan (Sudewo, 2009). Proses pengeringan bertujuan untuk menghentikan proses enzimatik yang mungkin masih bisa terjadi, sehingga degradasi zat aktif dapat dikurangi. Pengeringan dilakukan dengan bantuan sinar matahari dalam keadaan tertutup kain hitam dikarenakan kain hitam dapat menyerap sinar ultraviolet sehingga UV protektor dari kulit buah naga merah tidak mengalami kerusakan akibat paparan sinar matahari (Nuria *et al.*, 2009).

Pengeringan dilanjutkan dengan bantuan oven pada suhu 50°C. Suhu yang digunakan merupakan suhu yang tidak merusak senyawa flavonoid. Hal ini dikarenakan menurut Chet (2009), pemanasan yang dilakukan pada suhu 80°C dapat merusak senyawa flavonoid. Setelah proses pengeringan, didapatkan kulit buah naga merah sebanyak 470 gram.

Kulit buah naga merah yang sudah kering diekstraksi dengan etanol 95%. Menurut Chaiwut *et al.* (2012), ekstraksi kulit buah naga menggunakan pelarut etanol 95% akan menghasilkan kapasitas antioksidan tertinggi dengan metode DPPH (656,52 mgTEAC/g) dan kadar fenolik yang lebih besar (1,28

mgGAE/g sampel) dibanding menggunakan pelarut etanol 50% dan air. Perbandingan serbuk dengan pelarut yang digunakan adalah 1:10. Menurut Handayani *et al.* (2016), perbandingan ini merupakan rasio terbaik untuk mendapatkan kadar fenol, kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan ( $IC_{50}$ ) paling besar.

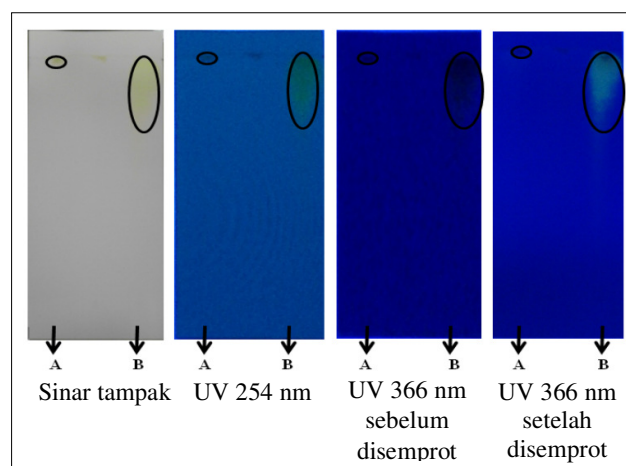
Ekstrak kental etanolik kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) (KBNM-EtOH) yang didapatkan adalah sebanyak 19,273 gram. Ekstrak kental KBNM-EtOH yang digunakan untuk fraksinasi cair-cair hanya sebanyak 5,046 gram. Fraksinasi cair-cair dilakukan untuk memisahkan senyawa yang bersifat polar dengan senyawa yang bersifat semi polar dalam ekstrak kental KBNM-EtOH. Senyawa yang bersifat polar (seperti betasianin dan antosianin) akan tertarik ke dalam pelarut campuran  $H_2O$ -MeOH, sedangkan senyawa yang bersifat semipolar (senyawa flavonoid seperti flavon dan flavonol) akan tertarik ke dalam pelarut etilasetat (*AcOEt*) (Indriasari, 2012; Pranata, 2013; Budilaksono *et al.*, 2014).

Ketika proses fraksinasi, fraksi campuran  $H_2O$ -MeOH ekstrak etanolik kulit buah naga merah (KBNM-MeOH) berada pada lapisan atas, sedangkan fraksi etilasetat ekstrak etanolik kulit buah naga merah (KBNM-*AcOEt*) berada pada lapisan bawah karena pelarut etilasetat memiliki massa jenis yang lebih besar. Fraksi kental KBNM-*AcOEt* yang diperoleh adalah sebanyak 2,886 gram. Oleh karena itu, dari hasil perhitungan didapatkan nilai rendemen fraksi kental KBNM-*AcOEt* terhadap kulit buah naga kering sebesar 2,34% (Lampiran 2).

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

Kromatografi 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. Perbandingan yang digunakan pada uji KLT ini adalah kuersetin (salah satu 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.

Selulosa dipilih 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). Berikut adalah hasil uji KLT yang diamati dibawah sinar tampak, UV 254 nm, UV 366 nm sebelum dan setelah disemprot pereaksi sitroborat:



**Gambar 7.** Hasil uji KLT(A) Fraksi KBNM-AcOEt (B) Kuersetin

Kandungan flavonoid (kuersetin) pada fraksi KBNM-*AcOEt* dapat diketahui apabila nilai Rf fraksi KBNM-*AcOEt* sama dengan nilai Rf kuersetin. Berdasarkan hasil perhitungan, nilai Rf fraksi KBNM-*AcOEt* adalah 0,9812, sedangkan Rf kuersetin adalah 0,855 (Lampiran 3). Hal ini menunjukkan bahwa kedua nilai Rf berbeda.

**Tabel 6.** Warna tiap bercak sampel uji pada Plat KLT  
(A) Fraksi KBNM-*AcOEt* (B) Standard Kuersetin

Sampel	Sinar tampak	UV 254 nm	UV 366 nm sebelum disemprot sitroborat	UV 366 nm setelah disemprot sitroborat
A	Kuning	Hitam	Coklat kehitaman	Coklat kehitaman
B	kuning	kuning	Kuning kehitaman	Flouresensi kuning menyala

Warna bercak fraksi KBNM-*AcOEt* dan standar kuersetin ketika diamati dibawah sinar tampak menunjukkan warna yang sama yaitu warna kuning (warna flavonoid apabila diamati dibawah sinar tampak). Oleh karena itu, bercak fraksi KBNM-*AcOEt* dan standar kuersetin merupakan senyawa flavonoid (Tabel 6). Bercak fraksi KBNM-*AcOEt* memiliki karakteristik nilai Rf 98,12 (dikali 100) dengan warna coklat kehitaman yang diamati pada sinar UV, dimana karakteristik ini merupakan sifat senyawa biflavonil (kayaflavon) (Harborne, 1987). Oleh karena itu, bercak fraksi KBNM-*AcOEt* diduga merupakan senyawa biflavonil (kayaflavon).

### C. Penetapan Kuantitatif Kandungan Flavonoid Total

Analisis flavonoid total fraksi KBNM-*AcOEt* dilakukan menggunakan metode kolorimetri  $AlCl_3$  berdasarkan Zhinsen *et al.* (1999) yang telah dimodifikasi oleh Saini *et al.* (2011). Kandungan flavonoid total dinyatakan dalam gram ekuivalen kuersetin tiap 100 gram subfraksi (% b/b EQ) (Abdul

Rohman *et al.*, 2007). Alasan pemilihan kuersetin sebagai standar adalah karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang dapat membentuk kompleks dengan  $AlCl_3$  (Desmiaty *et al.*, 2009). Berikut adalah hasil uji kandungan flavonoid total kuersetin:

**Tabel 7.** Uji Flavonoid total standar kuersetin

<b>konsentrasi (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Rerata Absorbansi</b>
400	0.2734
800	0.5196
1200	1.0402
1600	1.3925
2000	1.7219

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 4). Apabila nilai absorbansi fraksi KBNM-*AcOEt* dimasukkan ke dalam sumbu y dalam persamaan regresi linier kuersetin maka kadar flavonoid dalam sampel (sumbu x) dapat diketahui.

**Tabel 8.** Kandungan total flavonoid Fraksi KBNM-*AcOEt*

<b>Replikasi ke-</b>	<b>Absorbansi</b>	<b>Kadar flavonoid dalam sampel (ppm)</b>	<b>Total flavonoid (% b/b EQ)</b>
1	0.0154	174.2222	16.7521
2	0.0151	173.8889	16.7201
3	0.0094	167.5556	16.1111
<b>Rata-rata</b>		171,8889	16,5278
<b>SD</b>		3,7565	0,3612

Dari hasil perhitungan, rata-rata kadar flavonoid dalam sampel fraksi KBNM-*AcOEt* adalah  $171,8889 \pm 3,7565$  ppm (Lampiran 4). Larutan stok dibuat dengan melarutkan 10,4 mg fraksi KBNM-*AcOEt* kedalam 10 mL etanol. Oleh karena itu, rata-rata kadar total flavonoid fraksi KBNM-*AcOEt*

yang didapatkan dari hasil perhitungan adalah  $16,5278 \pm 0,3612$  % b/b EQ (Lampiran 4). Artinya, tiap 100 gram fraksi KBNM-*AcOEt* ekuivalen atau setara dengan 16,5278 gram senyawa flavonoid kuersetin. Apabila dibandingkan dengan penelitian Chet (2009), fraksi KBNM-*AcOEt* 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.

#### D. Analisis Kuantitatif Kandungan Fenolik Total

Kandungan fenolik total atau *Total Phenolic Content* (TPC) fraksi KBNM-*AcOEt* 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. Pemilihan asam galat adalah berdasarkan ketersediaan substansi yang lebih stabil dan murni serta harga yang lebih murah dibandingkan senyawa standar yang lainnya (Rahmawati, 2009). Berikut adalah hasil uji kandungan fenolik total asam galat:

**Tabel 9.** Uji Fenolik Standar Asam Galat

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rerata Absorbansi
10	0,119
20	0,231
30	0,352
40	0,433
50	0,544

Hubungan antara nilai absorbansi dan konsentrasi asam galat akan menghasilkan suatu persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier asam

galat yang didapat adalah  $y = 0,0105x + 0,0201$  dengan nilai  $R^2 = 0,9968$  (Lampiran 5). Kadar fenol total larutan fraksi KBNM-*AcOEt* (sumbu x) dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi sampel fraksi KBNM-*AcOEt* kedalam sumbu y.

**Tabel 10.** Perhitungan Konsentrasi fenol sampel fraksi KBNM- *AcOEt*

Replikasi ke-	Absorbansi	Konsentrasi fenol total larutan ( $\mu\text{g}$ GAE/mL sampel)	Kadar Fenol Total (mg GAE/100g sampel)
1	0.174	15.4	1509.8039
2	0.171	15.1	1480.3922
3	0.172	15.2	1490.1961
<b>Rata- rata</b>		15,2333	1493,4641
<b>SD</b>		0,1528	14,9757

Dari hasil perhitungan, rata- rata kadar fenol total larutan fraksi KBNM-*AcOEt* (nilai C) adalah  $15,2333 \pm 0,1528 \mu\text{g}$  GAE/mL sampel (Lampiran 5). Pengenceran tidak dilakukan dalam uji ini dan larutan stok yang digunakan adalah 25,5 mg fraksi KBNM-*AcOEt* yang dilarutkan dalam 25 mL etanol. Oleh karena itu, rata- rata kadar fenol total (TPC) fraksi KBNM-*AcOEt* yang didapat dari hasil perhitungan adalah  $1493,4641 \pm 14,9757$  mg GAE/100g (Lampiran 5).

Artinya, setiap 100 gram fraksi KBNM-*AcOEt* setara dengan 1493,4641 mg asam galat. Apabila dibandingkan dengan penelitian Chet (2009), fraksi KBNM-*AcOEt* menunjukkan kadar fenol total yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak air kulit buah naga dengan rata-rata kadar fenol total sebesar  $2,7533 \pm 0,8879$  mg GAE/25g.

### E. Uji Antioksidan Metode DPPH

Daya antioksidan senyawa fenol dan flavonoid fraksi KBNM-*AcOEt* dapat diketahui dengan melakukan uji penangkapan radikal bebas DPPH. 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 *et al.*, 2009). Berikut adalah hasil uji penangkapan radikal bebas DPPH oleh kuersetin dan fraksi KBNM-*AcOEt*:

**Tabel 11.** Uji penangkapan radikal bebas DPPH

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rerata % inhibisi
Kuersetin	1	31.132
	2	46.275
	3	61.829
	4	75.568
	5	86.357
Fraksi KBNM- <i>AcOEt</i>	100	13.70137
	200	23.45538
	300	29.74828
	400	42.96339
	500	50.60069

Nilai % inhibisi didapatkan dari perhitungan yang dilakukan dengan memasukkan nilai absorbansi kedalam rumus % inhibisi (Lampiran 6). Konsentrasi kuersetin dan fraksi KBNM-*AcOEt* 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 KBNM-*AcOEt* adalah  $y = 0,0933x + 4,1018$  dengan  $R^2=0.9904$  (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 KBNM-*AcOEt* adalah 491,9421  $\mu\text{g/mL}$  (Lampiran 6). Artinya, pada fraksi KBNM-*AcOEt* membutuhkan konsentrasi sebesar 491,9421  $\mu\text{g/mL}$  untuk menangkap radikal DPPH sebanyak 50%, sedangkan kuersetin hanya membutuhkan konsentrasi sebesar 2,2679  $\mu\text{g/mL}$  untuk menangkap radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai  $IC_{50}$  yang terlalu besar atau daya antioksidan yang kecil diduga disebabkan karena senyawa flavonoid yang mengikat gugus samping yang dapat menghambat aktivitas antioksidan, sehingga flavonoid tidak dapat menyumbangkan hidrogen dan elektron kepada DPPH (Harborne, 1987; Budilaksono *et al.*, 2014).

Selain itu, gugus samping juga dapat menyebabkan flavonoid termetilasi (gugus  $-H$  menjadi gugus  $-CH_3$ ), sehingga sumber proton untuk menangkap DPPH berkurang (Mikamo *et al.*, 2000; Pranata, 2013). Adanya pengganggu seperti protein dan lemak dalam fraksi KBNM-*AcOEt* diduga juga dapat mengganggu reaksi penangkapan radikal bebas DPPH (Budilaksono *et al.*, 2014). Walaupun, nilai  $IC_{50}$  dari ketiga fraksi masuk ke dalam katagori lemah jika dilihat dari tingkat aktivitas antioksidan menurut Ariyanto (2006) ( $>150 \mu\text{g/mL}$ ), namun nilai  $IC_{50}$  200-1000  $\mu\text{g/mL}$  dinyatakan masih berpotensi sebagai antioksidan (Molyneux, 2004; Pranata, 2013).

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

Uji SPF secara *in vitro* dilakukan dengan menetapkan panjang gelombang absorpsi maksimum ( $\lambda$  maks) dengan metode spektrofotometri. *Scanning* spektrofotometer UV-Vis dilakukan pada panjang gelombang antara 260-400 nm untuk mengetahui panjang gelombang maksimum fraksi KBNM-AcOEt pada masing- masing konsentrasi masuk kedalam rentang UVA, UVB, atau UVC. Berikut adalah hasil uji SPF fraksi KBNM-AcOEt:

**Tabel 12.** Scanning panjang gelombang maksimal fraksi KBNM-AcOEt

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\lambda$ max (nm)	Absorbansi	Daerah Ultraviolet
5	314	0.001	B
25	294	0.018	B
50	292	0.034	B
100	262	0.211	C

Panjang gelombang maksimum fraksi KBNM-AcOEt konsentrasi 5, 25, dan 50  $\mu\text{g/mL}$  diketahui berada pada rentang daerah UVB (290-320 nm), sedangkan panjang gelombang maksimum fraksi KBNM-AcOEt konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$  berada pada rentang daerah UVC (200-290 nm) (Tabel 12). Konsentrasi fraksi KBNM-AcOEt yang berada pada rentang UVB dapat dilakukan perhitungan nilai SPF menggunakan rumus yang telah dikembangkan oleh Mansur *et al.* (1986), sedangkan konsentrasi fraksi KBNM-AcOEt 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).

Rata-rata nilai SPF pada rentang daerah UVB fraksi KBNM-*AcOEt* adalah  $0.0069 \pm 0.0071$  (Lampiran 7). Menurut Wasitaadmatdja (1997), nilai SPF minimal suatu tabir surya atau agen fotoprotektif adalah 2. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa fraksi KBNM-*AcOEt* konsentrasi 5, 25, 50 dan 100 mg/L tidak memiliki daya fotoprotektif. Rendahnya nilai SPF pada fraksi KBNM-*AcOEt* ( $<2$ ) diduga disebabkan oleh konsentrasi fraksi KBNM-*AcOEt* yang digunakan terlalu rendah.

Menurut Widyastuti *et al.* (2015), konsentrasi ekstrak etanol kulit buah naga super merah (*Hylocereus costaricensis* (F.A.C. Weber) Britton & Rose) menunjukkan efektivitas yang baik sebagai tabir surya pada konsentrasi 900 ppm dengan nilai SPF 22,438, sedangkan pada konsentrasi 100 ppm ekstrak etanol kulit buah naga super merah tidak menunjukkan efektivitas sebagai tabir surya karena nilai SPF kurang dari 2 atau sebesar 1,419.