

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Jenis penelitian ini adalah observasional laboratorik untuk mengetahui kandungan fenolik total, kandungan flavonoid total, nilai IC<sub>50</sub> serta nilai SPF pada fraksi kloroform 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 Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

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

Penelitian dilakukan dari bulan November 2014 sampai dengan Juni 2015

#### **C. Variabel Penelitian**

##### **1. Variabel bebas**

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

##### **2. Variable tergantung**

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah % inhibisi DPPH.

##### **3. Variabel terkendali**

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah sistem spektrofotometri UV/Vis.

#### D. Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan dan fotoprotektif fraksi kloroform ekstrak etanolik kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) adalah:

1. Nilai SPF (*Sun Protection Factor*) adalah nilai yang digunakan untuk menentukan daya fotoprotektif dengan menetapkan panjang gelombang absorpsi maksimum ( $\lambda_{\text{maks}}$ ) yang di *scanning* dengan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang antara 260-400 nm.
2. *Inhibition Concentration 50%* (IC<sub>50</sub>) yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC<sub>50</sub> digunakan untuk menentukan daya antioksidan yang dihitung menggunakan rumus persamaan regresi (Josephy, 1997)..
3. 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. (Wisesa dan Widjanarko, 2014).
4. 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 (Desmiaty, 2009).

## **E. Instrumen Penelitian**

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

### **1. Alat**

Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu<sup>®</sup> UV-1700 Series), *Rotary evaporator* (IKA<sup>®</sup> RV10), Waterbath (Mettler<sup>®</sup>), Plat KLT Selulosa, pipa kapiler, sinar UV 254 dan UV 366 nm, kuvet, rak tabung reaksi, mikropipet (Gilson), Blender (Philips<sup>®</sup>), pipet tetes, sendok tanduk, cawan porselen, timbangan analitik (Sartorius<sup>®</sup>), bejana maserasi, bejana KLT, tabung reaksi (Pyrex<sup>®</sup>), erlenmeyer (Pyrex<sup>®</sup>), gelas ukur (Pyrex<sup>®</sup>), oven, vortex, corong pisah (Pyrex<sup>®</sup>), termometer, propipet, labu takar, pipet volume (Pyrex<sup>®</sup>).

### **2. Bahan**

Buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*), etanol 95%, etanol 70% etanol p.a (E Merck<sup>®</sup>), metanol (E Merck<sup>®</sup>), Pereaksi sitroborat (asam borat dan asam sitrat) (E merck<sup>®</sup>), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (E Merck<sup>®</sup>), DPPH p.a (E Merck<sup>®</sup>), Aquades (BrataChem), asam asetat p.a (E Merck<sup>®</sup>), n-butanol p.a (E Merck<sup>®</sup>), Kuersetin standard (Sigma<sup>®</sup>), AlCl<sub>3</sub> p.a (E Merck<sup>®</sup>), NaNO<sub>2</sub> p.a (E Merck<sup>®</sup>), NaOH p.a (E Merck<sup>®</sup>), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> p.a (E Merck<sup>®</sup>), Folin-Ciocalteu p.a (E Merck<sup>®</sup>).

## **F. Cara Kerja**

### **1. Preparasi sampel**

Tahap awal penelitian yang dilakukan adalah determinasi tanaman, agar karakteristik tanaman dapat diketahui jenis dan spesiesnya. Selanjutnya, pemisahan kulit buah naga merah dari daging buah. Sebelum dipisahkan, buah dicuci sampai bersih dengan air mengalir. Setelah buah dibersihkan, kulit buah naga dipisahkan dari daging dengan pisau, kemudian dilakukan pengecilan ukuran kulit buah dengan cara diiris tipis-tipis. Selanjutnya, kulit buah naga ditutup dengan kain hitam dan dikeringkan dengan bantuan sinar matahari. dilanjutkan dengan oven pada suhu 40°C hingga kadar air menyusut. Setelah itu dilakukan sortasi kering dan dihaluskan menjadi serbuk.

### **2. Ekstraksi**

Simplisia kering dalam bentuk serbuk diayak menggunakan pengayak ukuran 60 mesh untuk menyeragamkan partikel simplisia. Serbuk kering kulit buah naga merah dimaserasi dengan etanol 95% pada suhu kamar dalam bejana kedap cahaya selama 72 jam dan diaduk setiap hari. Setelah 72 jam dilakukan remaserasi selama 48 jam. Kemudian, hasil maserasi dan remaserasi dilakukan penyaringan untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Selanjutnya filtrat dipekatkan menggunakan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 50°C sehingga didapatkan ekstrak etanolik kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) (KBNM-Etanol).

### 3. **Fraksinasi**

KBNM-Etanol dilarutkan dalam campuran H<sub>2</sub>O-Metanol (3:7). Selanjutnya, dilakukan fraksinasi cair-cair dengan kloroform sehingga diperoleh fraksi metanol ekstrak etanolik kulit buah naga merah (KBNM-Metanol) dan fraksi kloroform ekstrak etanolik kulit buah naga merah (kloroform KBNM). Fraksi kloroform KBNM dipekatkan menggunakan kompor listrik suhu 50°C. Fraksi kental digunakan untuk melakukan berbagai pengujian selanjutnya (Junior dkk., 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 kloroform KBNM 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 dkk., 2011).

## 5. Analisis Kandungan Fenolik Total

Kandungan fenolik total diuji menggunakan reagen Folin-Ciocalteu, dimana sejumlah 400  $\mu\text{L}$  fraksi kloroform KBNM 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. 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 dkk., 2013).

Asam galat konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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.

## 6. Penetapan Kandungan Flavonoid Total

Kadar flavonoid total ditetapkan dengan cara khelasi  $\text{AlCl}_3$ . Sebanyak 0,4 mL fraksi kloroform KBNM 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 dkk., 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.

#### 7. Uji Penangkapan Radikal Bebas DPPH

Fraksi kloroform KBNM (kadar 100, 200, 300, 400 dan 500 µg/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 dkk., 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 persamaan % inhibisi.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100$$



#### Persamaan % inhibisi

Persamaan regresi linier dibuat dari hubungan antara konsentrasi dan % inhibisi. Persamaan regresi ini digunakan untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub>. Kuersetin konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 µg/mL diuji seperti prosedur diatas untuk dijadikan pembanding.

## 8. Penetapan Panjang Gelombang Absorpsi Maksimum dan SPF secara *invitro*

Untuk menetapkan panjang gelombang absorpsi maksimum ( $\lambda_{maks}$ ), ekstrak kering Kloroform KBNM dilarutkan dalam etanol absolut dan dibuat 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 (Junior dkk., 2013). Etanol digunakan sebagai blanko. Kemudian, dibuat kurva baku kuersetin untuk membandingkan nilai absorbansinya. Selanjutnya nilai SPF dapat dihitung menggunakan persamaan penentuan nilai SPF.

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



### Persamaan penentuan nilai SPF

Keterangan:

- EE ( $\lambda$ ) : Spektrum efek erythemal  
 I ( $\lambda$ ) : Spektrum intensitas matahari  
 Abs ( $\lambda$ ) : Absorbansi  
 CF : Faktor koreksi (= 10)

Nilai I ( $\lambda$ ) yang digunakan berdasarkan panjang gelombangnya, mengacu pada (tabel 3).

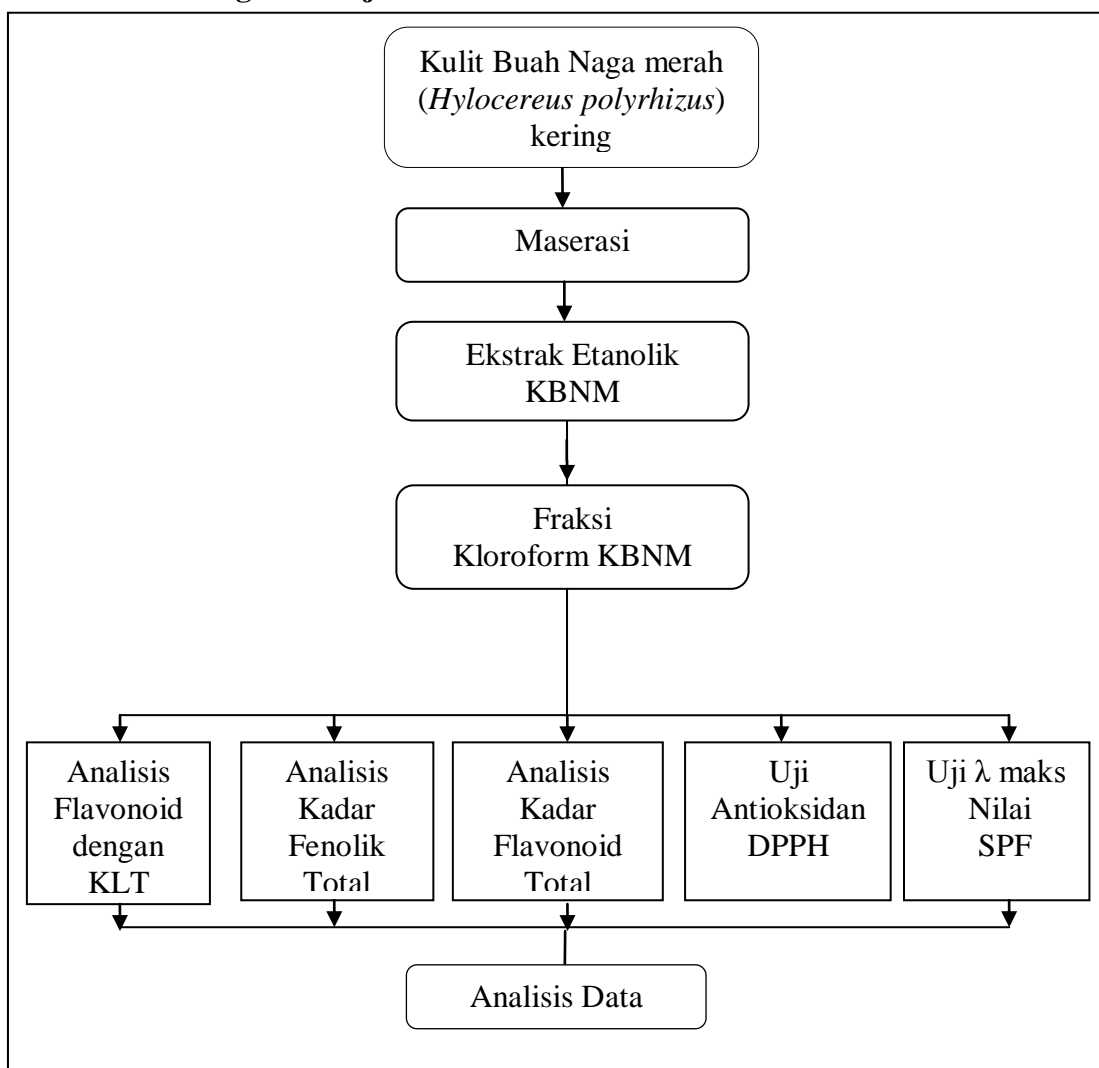
**Tabel 3. Persamaan fungsi yang digunakan untuk kalkulasi SPF (Mansur dkk., (1986))**

Panjang gelombang (nm)	EE x I (normalized)
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>

### G. Skema Langkah Kerja



Gambar 6. Skema Langkah Kerja

## H. Analisis Data

Daya antioksidan dilihat dari nilai  $IC_{50}$  yang dihitung dengan persamaan regresi linier yang didapatkan dari hubungan antara konsentrasi sampel ( $\mu\text{g/ml}$ ) dengan % inhibisi.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100$$



**Persamaan % inhibisi**

Sedangkan daya fotoprotektif dilihat dari nilai SPF ekstrak etanolik kulit buah naga merah fraksi kloroform yang didapatkan dari perhitungan rumus SPF.

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



**Persamaan penentuan nilai SPF**