

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI N-HEKSANA KULIT BUAH NAGA MERAH (*Hylocereus lemairei* Britton dan Rose) MENGGUNAKAN METODE DPPH (1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL)

ANTIOXIDANT ACTIVITY ASSAY OF N-HEXANE FRACTION OF RED DRAGON FRUIT (*Hylocereus lemairei* Britton and Rose) PEEL BY USING DPPH (1,1-DIPHENYL-2-PICRYLHYDRAZIL)

Widyo Budilaksono¹, Sri Wahdaningsih², Andhi Fahrurroji³
^{1,2,3} Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura,

ABSTRAK

Data WHO (*World Health Organization*) tahun 2011 menunjukkan bahwa berbagai penyakit degeneratif termasuk dalam sepuluh penyebab utama kematian manusia di seluruh dunia. Salah satu pemicu utama penyakit degeneratif adalah radikal bebas. Substansi penting yang dapat melindungi dan mengurangi dampak negatif dari serangan radikal bebas adalah antioksidan. Buah naga merah (*Hylocereus lemairei* Britton dan Rose) memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengukur aktivitas antioksidan alami dari fraksi n-heksana kulit buah naga merah. Simplisia kulit buah naga merah dimaserasi dengan kloroform. Maserat yang didapat selanjutnya difraksinasi dengan n-heksana. Fraksi n-heksana kemudian diskriminasi fitokimia dan terbukti mengandung flavonoid, alkaloid dan steroid. Dilakukan uji pendahuluan terhadap sampel menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dengan fase gerak berupa campuran n-heksana dan etil asetat (10:1). Hasil menunjukkan adanya bercak kuning keputihan dengan latar belakang ungu pada plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ ketika disemprot larutan DPPH 0,2% dengan nilai Rf sebesar 0,22; 0,29; 0,36; 0,52; 0,67 dan 0,88. Uji aktivitas antioksidan dari fraksi n-heksana kulit buah naga merah dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 515,50 nm. Nilai IC₅₀ sampel yaitu 206,591 $\mu\text{g/mL}$ dan tergolong kurang aktif, sedangkan nilai IC₅₀ vitamin C sebagai kontrol positif jauh lebih kecil, yaitu 2,973 $\mu\text{g/mL}$ dan tergolong sangat kuat.

Kata kunci : Antioksidan, Fraksi N-Heksana, Kulit Buah Naga Merah, KLT, DPPH

ABSTRACT

WHO's (*World Health Organization*) data in 2011 showed that some degenerative diseases included as the top ten causes of death in the world. One of the main trigger of degenerative diseases is free radical. The importance substrate that can reduce negative impact of free radicals attack is antioxidant. Red dragon fruit (*Hylocereus lemairei* Britton and Rose) has a potential to develop as the source of natural antioxidant. This study aims to determine the antioxidant activity of n-hexane fraction of red dragon fruit peel. Red dragon fruit peel powder macerated within chloroform, and macerate then fractionated with n-hexane. The result of phytochemical screening showed that the n-hexane fraction contains flavonoid, alkaloid and steroid. Preliminary test conducted on sample by using Thin Layer Chromatography (TLC) with a mixture mobile phase of n-hexane and ethyl acetate (10:1). The result indicated the presence of whitish yellow spots on a purple background at silica gel 60 F₂₅₄ when sprayed 0,2 % DPPH solution, with Rf values at 0,22; 0,29; 0,36; 0,52; 0,67 and 0,88. Antioxidant activity assay of n-hexane fraction of red dragon fruit peel performed by using the DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) method with UV-Vis spectrophotometric measurements at λ_{max} 515,50 nm, and it showed that sample had IC₅₀ at 206,591 $\mu\text{g/mL}$ and considered as less active antioxidant, whereas vitamin C had much lower IC₅₀ value (2,973 $\mu\text{g/mL}$) and considered as very powerful antioxidant.

Keywords : Antioxidant, N-Hexane Fraction, Red Dragon Fruit Peel, TLC, DPPH

PENDAHULUAN

Pesatnya perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi mengakibatkan perubahan pola hidup masyarakat yang semakin dinamis. Hal tersebut tentunya tidak terlepas dari berbagai dampak negatif yang tidak diinginkan, diantaranya adalah meningkatnya faktor-faktor resiko penyebab timbulnya penyakit, terutama penyakit degeneratif. Data WHO (*World Health Organization*) tahun 2011 menunjukkan bahwa beberapa penyakit degeneratif seperti aterosklerosis, stroke, diabetes mellitus dan lainnya termasuk ke dalam sepuluh penyebab utama kematian manusia di seluruh dunia. Salah satu pemicu utama penyakit degeneratif adalah radikal bebas¹.

Radikal bebas merupakan molekul tidak stabil yang memiliki elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya sehingga bersifat sangat reaktif. Radikal bebas dalam jumlah kecil digunakan pada respon seluler dan sistem imun. Namun pada konsentrasi yang tinggi radikal bebas dapat menghasilkan stres oksidatif yang menyebabkan kerusakan struktur sel, termasuk kerusakan lipid, protein dan DNA². Substansi penting yang dapat membantu melindungi tubuh dan mengurangi dampak negatif dari serangan radikal bebas adalah antioksidan.

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga reaksi radikal bebas tersebut dapat terhambat dan mencegah terbentuknya radikal bebas baru². Berdasarkan sumbernya, Antioksidan dapat dibedakan menjadi antioksidan sintetik dan alami. Seiring dengan semakin meningkatnya kekhawatiran masyarakat terhadap efek samping antioksidan sintetik seperti Butil Hidroksi Anisol (BHA) dan Butil Hidroksi Toluena (BHT) yang bersifat karsinogen, mengakibatkan terjadinya

kecenderungan peningkatan penggunaan antioksidan alami³.

Buah naga merupakan salah satu tanaman yang sangat potensial untuk dikembangkan, salah satunya yaitu sebagai sumber antioksidan alami. Tingkat pemanfaatan dan konsumsi buah naga semakin meningkat, namun umumnya masih sebatas pada pengolahan daging buahnya saja, padahal sebenarnya masih banyak potensi besar yang dimiliki bagian lainnya, salah satunya adalah kulit buah.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nurliyana dkk. (2010) diketahui bahwa kandungan fenolik total ekstrak etanol kulit buah naga lebih tinggi daripada kandungan fenolik total yang terdapat pada daging buahnya⁴. Selain itu aktivitas antioksidan kulit buah naga ($IC_{50} = 0,3 \text{ mg/mL}$) juga lebih tinggi daripada aktivitas antioksidan daging buahnya ($IC_{50} > 1 \text{ mg/mL}$). Kulit buah naga merah juga diketahui mengandung pigmen warna betalain, dimana senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan^{5,6}. Aktivitas antioksidan kulit buah naga juga diperkuat dengan penelitian oleh Mitasari (2012) yang menyatakan bahwa ekstrak kloroform kulit buah naga merah memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar $43,836 \mu\text{g/mL}$ ⁷.

Uji aktivitas antioksidan kulit buah naga merah diketahui masih terbatas pada uji terhadap ekstrak saja. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antioksidan pada tingkat fraksi, dalam hal ini yakni fraksi n-heksana.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex), *balb*, bejana maserasi, cawan krusibel (Pyrex), bejana KLT, corong pisah (Pyrex), lampu UV 366 nm (Merck tipe 1.13203.0001), lemari asam

(ESCO model EFH-4A1), oven (Modena tipe BO 3633), *rotary evaporator* (Heidolph tipe Hei-VAP), ayakan effendorf no.20 (pharmalab), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu tipe 2450), dan timbangan analitik (Precisa tipe XB 4200C dan BEL tipe M254Ai).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit buah naga merah, vitamin C (Kalbe Farma kode bahan No.13AV01100), larutan metanol *p.a* (Merck kode bahan No.1.06009.2500), larutan kloroform *p.a* (Merck kode bahan No.1.02445.2500), larutan etil asetat *p.a* (Merck kode bahan No.1.09623.1000), larutan *n*-heksana *p.a* (Merck kode bahan No.1.04367.2500), larutan *n*-heksana teknis, akuades, larutan FeCl₃ 1%, larutan NaCl 10%, pereaksi *Lieberman-Burchard*, pereaksi *Dragendroff*, pereaksi *Mayer*; serbuk Mg, larutan H₂SO₄ 2 N, larutan NaOH 2 N, larutan HCl 2 N, lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck kode bahan No.1.05554.0001), dan kristal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) *p.a* (Sigma-Aldrich kode bahan No.D9132-1G).

Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan yaitu bagian kulit buah naga merah (*Hylocereus lemairei* Britton dan Rose). Sampel kulit buah naga merah yang diperoleh dari buah naga merah segar disortir basah, kemudian dibersihkan, dirajang, lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C sampai kering. Setelah itu dilakukan sortasi kering dan dihaluskan dengan cara diblender kemudian diayak dengan ayakan no.20 hingga diperoleh serbuk halus yang homogen.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Sejumlah 503,68 g simplisia kering dimasukkan kedalam bejana maserasi dan ditambahkan pelarut kloroform *p.a* sampai semua sampel

terendam oleh pelarut. Maserasi dilakukan selama 5 hari, setiap 24 jam pelarut diganti dan dilakukan pengadukan tiga kali sehari. Total jumlah pelarut yang digunakan selama proses maserasi adalah 3,5 liter. Hasil maserasi disaring untuk memisahkan filtrat dan residunya. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan disaring. Kemudian filtrat tersebut dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum* dan *waterbath* pada suhu 45°C hingga pelarut menguap dan menjadi ekstrak kental.

Sejumlah 8,10 g ekstrak kloroform yang dihasilkan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, difraksinasi dengan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana teknis. Ekstraksi dilakukan replikasi sebanyak dua kali untuk tiap fraksi menggunakan pelarut dengan volume masing-masing 81 mL (10 x bobot ekstrak (b/v)) untuk sekali penyarian. Hasil fraksinasi dikumpulkan dan dipekatkan dengan *waterbath* pada suhu 45°C hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi *n*-heksana selanjutnya diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

Uji Pendahuluan Aktivitas Antioksidan secara KLT

Uji pendahuluan pada fraksi kloroform kulit buah naga merah sebagai penangkap radikal dilakukan sesuai metode Demirezer dkk. (2001) dengan sedikit modifikasi⁸. Uji pendahuluan diawali dengan mengaktifkan plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada oven dengan suhu 105°C selama 10 menit. Plat KLT yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄ dengan luas 2 x 10 cm. Plat KLT yang telah diaktifkan selanjutnya ditotolkan dengan fraksi kloroform kulit buah naga merah dengan konsentrasi 1% sebanyak 5 µL menggunakan mikropipet 1 µL, pada jarak 0,5 cm dari bagian bawah. Penotolan sampel pada plat dilakukan secara perlahan dengan volume yang

ditotolkan sebanyak 1 µL sebanyak lima kali penotolan. Tiap-tiap penotolan, bercak dibiarkan hingga kering kemudian dielusi dalam *chamber* pengelusi KLT menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 10 : 1 sebanyak 2 mL. Jarak elusi yang digunakan adalah 9 cm, setelah dikembangkan sampai batas pengembangan, elusi dihentikan dan lempeng diangin-anginkan hingga kering. Lempeng KLT kemudian diamati pada sinar tampak, sinar UV 366 nm, dan disemprotkan dengan larutan DPPH 0,2%. Bercak diperiksa 30 menit setelah penyemprotan. Senyawa aktif penangkap radikal bebas akan menunjukkan bercak berwarna kuning keputihan dengan latar belakang ungu.

Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis

Aktivitas antioksidan fraksi n-heksana ditentukan dengan metode DPPH sesuai yang digunakan oleh Nurliyana dkk. (2010) dengan sedikit modifikasi⁴. Sebanyak 1 mL fraksi n-heksana dengan konsentrasi 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 125 µg/mL, dan 150 µg/mL ditambahkan ke dalam 2 mL DPPH 0,1 mM. Campuran selanjutnya dikocok dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit di ruang gelap. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya pada λ_{maks} 515,50 nm. Perlakuan yang sama juga dilakukan untuk larutan blanko (larutan DPPH yang tidak mengandung bahan uji) dan kontrol positif vitamin C dengan konsentrasi 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL, dan 6 µg/mL. λ_{maks} yang digunakan untuk vitamin C adalah 515,5 nm. Larutan blanko terdiri dari 2 mL DPPH 0,1 mM dan 1 mL metanol *p.a.* Zeroing awal menggunakan metanol *p.a.* 3 mL. Data hasil pengukuran absorbansi dianalisa persentase aktivitas antioksidannya menggunakan persamaan 1.

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{A_{blanko} - A_{sampel}}{A_{blanko}} \times 100\% \dots(1)$$

Keterangan :

A = Nilai absorbansi

Nilai IC₅₀ merupakan nilai yang menggambarkan besarnya konsentrasi dari ekstrak uji yang dapat menangkap radikal bebas sebesar 50% melalui persamaan garis regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi senyawa uji (x) dengan persen aktivitas penangkap radikal (y). Dari data tersebut akan diperoleh persamaan $y = bx + a$ dengan a sebagai intersep, b sebagai slope dan nilai koefisien regresi linier dinyatakan sebagai r. Nilai r yang baik adalah mendekati -1 atau +1 tergantung pada nilai slope yang diperoleh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian kulit buah (perikarp) dari tanaman buah naga merah (*Hylocereus lemairei* (Hook) Britton dan Rose). Buah naga merah diperoleh dari Pusat Pelatihan Pertanian dan Pedesaan Swadaya (P4S) Alam Cemerlang Sejahtera, Jalan Raya Sui-Kunyit Km. 84,5 Desa Sungai Kunyit Laut, Kecamatan Sungai Kunyit, Kabupaten Pontianak, Provinsi Kalimantan Barat. Pengambilan sampel dari tempat pembudidayaan ini ditujukan agar identitas jenis, lokasi tumbuh, keseragaman umur, serta masa panen tanaman dapat diketahui dengan jelas.

Buah naga yang digunakan dalam penelitian sebanyak 28,29 kg. Dari jumlah tersebut diperoleh bobot kulit buah naga merah sebanyak 6,70 kg atau sebesar 23,683 % dari bobot buah keseluruhan. Kulit buah naga merah yang telah dikumpulkan kemudian diolah menjadi bentuk simplisia melalui beberapa tahap pengolahan, yaitu sortasi basah, pencucian, pengubahan bentuk, pengeringan, sortasi kering, dan penyimpanan. Bobot simplisia yang

dihasilkan setelah melalui tahapan-tahapan diatas adalah 518,68 gram.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi kulit buah naga merah dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut kloroform. Maserasi dipilih karena dapat mengekstrak senyawa dengan baik dan dapat mencegah dekomposisi senyawa yang labil terhadap pemanasan. Prinsip ekstraksi menggunakan maserasi yaitu adanya difusi cairan penyari ke dalam sel tumbuhan yang mengandung senyawa aktif. Difusi tersebut mengakibatkan tekanan osmosis dalam sel menjadi berbeda dengan keadaan diluar. Senyawa aktif kemudian terdesak keluar akibat adanya tekanan osmosis didalam dan diluar sel⁹.

Ekstrak kloroform yang didapat setelah proses maserasi adalah sebanyak 8,33 g atau dengan nilai rendemen sebesar 1,657 % dari jumlah simplisia, dan berwarna coklat tua. Nilai rendemen menunjukkan seberapa besar jumlah kandungan yang dapat terekstraksi oleh pelarut dalam persen (%). Ekstrak yang diperoleh kemudian dipartisi dengan menggunakan pelarut n-heksana. Senyawa non polar yang berada pada ekstrak kloroform akan terdistribusi dalam pelarut n-heksana. N-Heksana merupakan salah satu pelarut yang baik untuk mengekstraksi senyawa-senyawa yang bersifat non-polar karena memiliki beberapa keunggulan, diantaranya

adalah bersifat stabil, mudah menguap, selektif, serta menghasilkan jumlah kecil lilin, albumin dan zat warna¹⁰.

Prinsip pemisahan pada proses fraksinasi adalah didasarkan pada perbedaan tingkat kepolaran dan perbedaan bobot jenis antara dua fraksi, yakni fraksi yang memiliki bobot jenis lebih besar akan berada pada fase bawah, sedangkan fraksi yang memiliki bobot jenis yang lebih kecil akan berada pada fase atas.

Fraksi n-heksana yang diperoleh dalam penelitian ini memiliki bobot 4,32 g atau memiliki nilai rendemen sebesar 53,333 % dari ekstrak kloroform. Nilai rendemen yang tinggi tersebut menunjukkan bahwa pelarut n-heksana mampu mengekstrak lebih banyak komponen bioaktif dengan sifat kepolaran yang rendah. Hal tersebut disebabkan oleh kuatnya gugus non polar dalam struktur gugus karbon (non polar) n-heksana, serta memiliki indeks polaritas yang sangat rendah (0).

Tabel 1. Hasil Proses Maserasi dan Fraksinasi

	Jumlah Sampel	Pelarut	Jumlah pelarut	Hasil	Rendemen
Maserasi	503,68 g	Kloroform	3,5 L	8,33 g	1,654 %
Fraksinasi	8,10 g	N-Heksana	162 mL	4,32 g	53,333 %

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia Fraksi N-Heksana Kulit Buah Naga

No.	Perlakuan	Metode Pengujian	Hasil Positif Berdasarkan Teori	Hasil Pengamatan
1.	Alkaloid	Pereaksi Mayer	Endapan putih kekuningan	-
		Pereaksi Dragendorff	Endapan merah sampai jingga	+
2.	Flavonoid	Uji Wiltster Sianidin	Warna merah sampai jingga; warna merah tua; dan warna hijau sampai biru	+
3.	Triterpenoid Steroid	Uji Lieberman-Burchard	Warna merah/cincin merah	-
			Warna biru atau ungu	+
4.	Saponin	Uji Forth	Busa stabil selama 10 menit	-
5.	Fenolik	+ FeCl ₃ 1%	Warna ungu, biru dan hijau kuat.	-
6.	Tanin	+ NaCl 10% dan FeCl ₃ 1%	Warna biru tua	-

Keterangan : (+) : mengandung senyawa yang diuji; (-) : tidak mengandung senyawa yang diuji.

Hasil Uji Pendahuluan Aktivitas Antioksidan Secara KLT

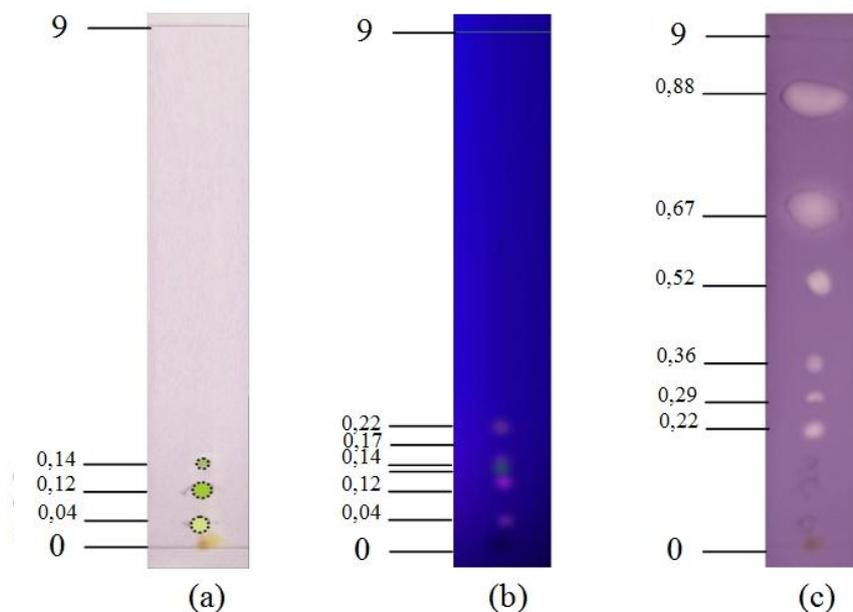
Uji pendahuluan aktivitas antioksidan dilakukan sesuai metode Demirezer dkk, (2001) dengan sedikit modifikasi⁸. Uji pendahuluan aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄ yang telah diaktifkan pada oven dengan suhu 105⁰C selama 10 menit, sedangkan fase gerak berupa campuran n-heksana : etil asetat (10:1), serta pereaksi DPPH 0,2%. Pemilihan fase gerak tersebut dipilih berdasarkan pada hasil optimasi yang telah dilakukan menggunakan beberapa jenis pelarut organik tunggal maupun campuran.

Berdasarkan hasil pengujian, diperoleh enam bercak yang memberikan hasil uji positif antioksidan dengan menghasilkan bercak kuning keputihan secara spontan dengan latar belakang ungu, yakni dengan nilai Rf 0,22; 0,29; 0,36; 0,52; 0,67 dan 0,88. Bercak yang menunjukkan hasil positif antioksidan ditandai dengan terbentuknya warna kuning keputihan dengan latar ungu. Hasil kromatogram fraksi n-heksana kulit buah naga merah dapat dilihat pada

gambar 1.

Pada bercak dengan nilai Rf 0,67 dan 0,88, dihasilkan bercak noda dengan ukuran yang relatif besar, sedangkan pada bercak noda pada 0,22, 0,29; 0,36 dan 0,52 dihasilkan noda dengan ukuran yang lebih kecil. Berdasarkan ukuran noda, dapat diasumsikan bahwa semakin besar ukuran noda yang dihasilkan, maka semakin banyak pula jumlah senyawa yang memberikan aktivitas antioksidan. Terbentuknya bercak kuning keputihan spontan setelah penyemprotan DPPH 0,2% disebabkan oleh adanya reaksi antara senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen di dalam ekstrak n-heksana kulit buah naga merah dengan molekul DPPH, sehingga mengakibatkan molekul DPPH tereduksi membentuk DPPH-H (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin) yang diikuti dengan memudarnya warna ungu pada fase diam KLT.

Pengamatan secara visual terlihat adanya tiga bercak yang memberikan warna yang berbeda, yakni bercak dengan nilai Rf 0,044 dan memberikan noda berwarna hijau muda yang cukup pudar. Pada bercak kedua dengan nilai Rf 0,116 dihasilkan noda



Gambar 1. Hasil Pemisahan Fraksi N-Heksana Kulit Buah Naga Merah pada Uji Pendahuluan Aktivitas Antioksidan Dengan Fase Diam Silika Gel 60 F₂₅₄, Fase Gerak N-Heksana dan Etil Asetat 10:1. (a). Pengamatan Visual, (b). Dengan Sinar UV 366 nm, (c). dengan Larutan DPPH 0,2%.

berwarna hijau dengan intensitas warna yang sedang, dan pada bercak tiga dengan nilai Rf 0,14 dihasilkan bercak dengan warna yang sama dengan bercak kedua, namun dengan ukuran yang lebih kecil. Setelah penyemprotan larutan DPPH 0,2%, ketiga bercak tersebut ternyata tidak memberikan adanya perubahan warna kuning keputihan, hal tersebut dapat diasumsikan bahwa senyawa dalam ketiga bercak tersebut tidak memiliki aktivitas antioksidan.

Pengamatan dengan menggunakan sinar UV didapatkan lima bercak noda yang berpendar, yakni pada nilai Rf 0,04; 0,12; 0,14; 0,17 dan 0,22. Panjang gelombang yang digunakan pada pengamatan ini adalah 366 nm. Pengamatan UV dengan menggunakan panjang gelombang 366 nm akan menghasilkan bercak noda yang berpendar, dengan latar belakang yang gelap, sehingga noda yang dapat berpendar (berfluoresensi) dapat terlihat secara visual. Hal tersebut disebabkan oleh adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auktokrom pada bercak noda. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan hasil emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron tereksitasi dari tingkat dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi dan kemudian kembali semula sambil melepaskan energi. Bercak-bercak noda yang menghasilkan perubahan warna kuning keputihan yang spontan selain pada Rf 0,22, tidak dapat terdeteksi pada pengamatan UV dengan panjang gelombang 366. Hal ini dapat disebabkan adanya kemungkinan senyawa tersebut merupakan senyawa yang dapat terdeteksi dengan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm.

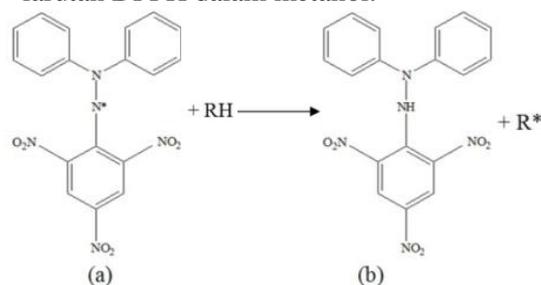
Hasil Uji Aktivitas Antioksidan dengan Spektrofotometer UV-Visibel

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan prinsip spektrofotometri. Suatu senyawa yang memiliki aktivitas

antioksidan akan mendonorkan atom hidrogennya untuk berikatan dengan DPPH membentuk DPPH tereduksi yang ditandai dengan kehilangan warna ungu menjadi kuning pucat disertai penurunan nilai absorbansi⁴.

Pengukuran absorbansi dalam penelitian ini dilakukan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) larutan DPPH 515,50 nm dengan absorbansi sebesar 1,244. Kedua panjang gelombang tersebut sesuai dengan jangkauan panjang gelombang maksimum yang dapat digunakan untuk pengukuran dengan metode DPPH yang dinyatakan oleh Molyneux (2004), yakni dari 515 nm sampai dengan 520 nm¹¹.

Data hasil pengukuran pada tabel 4 menunjukkan adanya aktivitas peredaman radikal DPPH, yang dilihat dari adanya penurunan nilai absorbansi radikal DPPH yang disebabkan oleh sampel uji pada berbagai konsentrasi dan semakin meningkatnya nilai persen (%) aktivitas antioksidan. Hal tersebut juga terlihat secara kasat mata dengan adanya perubahan warna ungu yang semakin memudar dan menjadi agak kekuningan setelah masa inkubasi 30 menit. Perubahan warna ini terjadi dikarenakan adanya senyawa dalam sampel yang mendonorkan atom hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi bentuk yang lebih stabil yaitu DPPH-H (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Gambar 2)¹². Dari hasil pengukuran fraksi n-heksana kulit buah baga merah menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel, maka semakin rendah nilai absorbansi dari larutan DPPH dalam metanol.

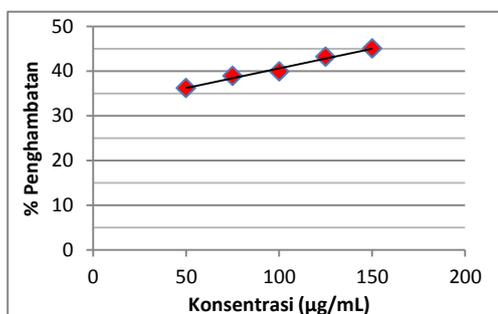


Gambar 2. Reaksi Reduksi DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (a) Menjadi DPPH-H (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (b)

Tabel 3. Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksana Kulit Buah Naga Merah pada Spektrofotometri UV-Vis

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi	% Aktivitas antioksidan	Persamaan Regresi	IC ₅₀ (µg/mL)
Blanko	1,244	0		
50	0,794	36,174	y = 0,088x + 31,82 r = 0,991	206,591
75	0,764	38,858		
100	0,748	39,871		
125	0,707	43,167		
150	0,684	45,016		

Persamaan regresi antara konsentrasi dari fraksi n-heksana kulit buah naga merah (sumbu x) dengan persen (%) aktivitas antioksidan (sumbu y) adalah $y = 0,088x + 31,82$, dengan nilai koefisien korelasi 0,991. Nilai koefisien korelasi yang bernilai positif tersebut menggambarkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi fraksi n-heksana kulit buah naga merah, maka semakin besar pula aktivitas antioksidannya. Hubungan tersebut dapat terlihat pada gambar 3.



Gambar 3. Kurva Regresi Linier Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksana

Parameter yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan dengan penangkapan radikal DPPH ini adalah nilai konsentrasi hambatan atau *Inhibitory Concentration* (IC₅₀) atau *efficient concentration* (EC₅₀). Semakin kecil nilai IC₅₀, maka semakin aktif sampel tersebut sebagai antioksidan. Berdasarkan persamaan regresi linear yang diperoleh, nilai IC₅₀ atau konsentrasi yang dibutuhkan untuk

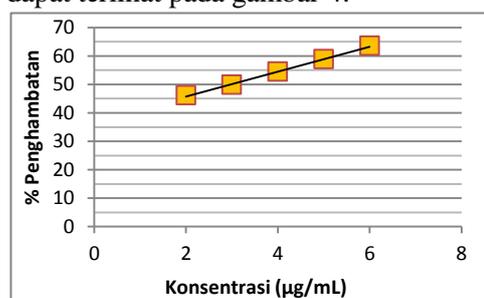
menangkap radikal DPPH sebanyak 50 % dari fraksi n-heksana kulit buah naga merah adalah 206,591 µg/mL. Nilai ini menyatakan bahwa fraksi n-heksana kulit buah naga merah memiliki aktivitas antioksidan yang kurang aktif, namun tetap memiliki potensi antioksidan, karena memiliki nilai IC₅₀ yang berkisar antara 200-1000 µg/mL¹¹.

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah vitamin C. Penggunaan kontrol positif ditujukan untuk membandingkan seberapa kuat potensi antioksidan yang terkandung dalam fraksi n-heksana kulit buah naga merah dengan antioksidan sintetik yang umum digunakan, seperti vitamin C.

Tabel 4. Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Vitamin C pada Spektrofotometri UV-Vis

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi	% Aktivitas antioksidan	Persamaan Regresi	IC ₅₀ (µg/mL)
Blanko	1,244	0		
2	0,67089	46,070	y = 4,3847x + 36,929 r = 0,9993	2,973
3	0,62459	49,792		
4	0,56728	54,399		
5	0,51212	58,833		
6	0,45439	63,473		

Persamaan regresi linear yang didapat dari hasil pengukuran aktivitas antioksidan vitamin C pada tabel 5 adalah $y = 4,397x + 36,929$, dengan nilai koefisien korelasi 0,999. Nilai IC₅₀ yang didapat dari hasil pengukuran vitamin C adalah sebesar 2,973 µg/mL. Nilai ini menunjukkan bahwa vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat, karena memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 50 µg/mL. Hubungan antara konsentrasi dan persen penghambatan vitamin C dapat terlihat pada gambar 4.



Gambar 4. Kurva Regresi Linier Pengujian Aktivitas Antioksidan Vitamin C

Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh antara fraksi n-heksana kulit buah naga merah dan vitamin C sebagai kontrol positif, dapat dilihat bahwa nilai IC_{50} fraksi n-heksana kulit buah naga merah jauh lebih besar dibandingkan dengan nilai IC_{50} vitamin C. Fraksi n-heksana kulit buah naga merah memiliki IC_{50} sebesar 206,591 $\mu\text{g/mL}$ dan tergolong kurang aktif, sedangkan vitamin C memiliki nilai IC_{50} sebesar 2,973 $\mu\text{g/mL}$ dan tergolong sangat kuat. Hal tersebut menunjukkan fraksi n-heksana kulit buah naga merah memiliki aktivitas antioksidan yang lebih lemah dibandingkan dengan vitamin C. Hal ini diduga disebabkan karena vitamin C merupakan senyawa murni, sedangkan pada fraksi n-heksana kulit buah naga merah masih dalam bentuk fraksi yang masih mengandung berbagai senyawa di dalamnya.

Berdasarkan hasil skrining fitokimia, diduga golongan senyawa yang memberikan aktivitas antioksidan dalam fraksi n-heksana kulit buah naga merah adalah alkaloid, flavonoid dan steroid. Menurut Gusrav (2007), 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 dalam elektron radikal yang terdapat pada atom nitrogen di senyawa DPPH berikatan dengan ion hidrogen dan menghasilkan DPPH yang tereduksi¹³. Namun flavonoid yang terkandung dalam fraksi n-heksana kulit buah naga merah merupakan senyawa-senyawa yang bersifat non-polar, yang masih terikat pada gugus glikosidanya sehingga menghambat pengikatan radikal DPPH dan mengakibatkan lemahnya aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Harborne (1987) menyatakan gugus samping yang berikatan dengan flavonoid dapat mengakibatkan penghambatan aktivitas antioksidan¹⁴. Hal tersebut

mengakibatkan flavonoid tidak dapat mendonasikan hidrogen dan elektron untuk menangkal radikal bebas dikarenakan terjadinya halangan sterik. Adanya gugus lain di dalam ekstrak n-heksana juga dapat menyebabkan flavonoid termetilasi. Perubahan atom -H menjadi gugus metil (-CH₃) melalui reaksi metilasi dapat menurunkan aktivitas antioksidan, yang disebabkan pengurangan atom -H yang merupakan sumber proton untuk penangkapan radikal bebas¹⁵.

Potensi antioksidan fraksi n-heksana yang tergolong kurang aktif diduga turut disebabkan oleh adanya pengganggu seperti protein, lemak dan senyawa lainnya yang dapat terlarut dalam pelarut non-polar, dalam hal ini adalah pelarut n-heksana, 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 DPPH¹⁶.

Selain flavonoid, alkaloid diduga turut bertanggung jawab dalam memberikan aktivitas antioksidan dengan mekanisme sekunder, yakni sebagai penangkap radikal bebas. Hal ini didukung dari penelitian yang telah dilakukan oleh Maiza-Benabdesselam (2007) tentang aktivitas antioksidan dari ekstrak alkaloid dua spesies *fumaria* (*Fumaria capreolata* dan *Fumaria bastardii*), yang menyatakan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak alkaloid dari dua spesies *Fumaria* memiliki aktivitas antioksidan yang bekerja dengan mekanisme sebagai *free radical scavenger*¹⁷.

Senyawa steroid dalam fraksi n-heksana kulit buah naga merah diduga turut berperan dalam memberikan aktivitas antioksidan. Mekanisme yang berperan oleh steroid adalah sebagai

penangkap radikal. Hal ini didukung berdasarkan penelitian oleh Cui (2003) yang menyatakan bahwa ekstrak etanol 80% dari *inonotus obliquus* yang positif mengandung steroid seperti lanosterol dan ergosterol peroksida menghasilkan aktivitas antioksidan sekunder *radical scavenger* yang cukup aktif¹⁸.

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Mitasari (2010) tentang uji aktivitas antioksidan ekstrak kloroform kulit buah naga merah, didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 43,8 µg/mL dan tergolong sangat kuat, sedangkan hasil pengukuran aktivitas antioksidan pada fraksi n-heksana kulit buah naga merah memiliki nilai IC₅₀ yang lebih besar dan tergolong kurang aktif, yakni 206,591 µg/mL. Hal tersebut serupa dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Chaman dkk. (2011) yang telah menguji aktivitas antioksidan pada buah beri Sea Buckthorn, dimana ekstrak metanol buah beri Sea Buckthorn memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan aktivitas antioksidan pada fraksi-fraksinya. Hal tersebut disebabkan oleh aktivitas antioksidan dari campuran senyawa yang masih terkandung di dalam ekstrak, sehingga dapat saling berinteraksi dan menghasilkan aktivitas antioksidan yang jauh lebih kuat¹⁹. Berdasarkan hal tersebut, diduga aktivitas antioksidan yang dihasilkan oleh ekstrak kloroform kulit buah naga merah merupakan hasil dari efek sinergisme antara senyawa-senyawa yang terkandung di dalamnya, sehingga setelah dilanjutkan pada tahap fraksinasi, aktivitas antioksidan yang dihasilkan justru semakin kecil.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa fraksi n-heksana kulit buah naga memiliki aktivitas antioksidan yang ditandai dengan timbulnya bercak

kuning keputihan spontan saat disemprot larutan DPPH 0,2% pada uji pendahuluan aktivitas antioksidan secara kromatografi lapis tipis (KLT). Nilai IC₅₀ fraksi n-heksana kulit buah naga merah adalah sebesar 206,591 µg/mL, sedangkan vitamin C sebagai kontrol positif memiliki nilai IC₅₀ sebesar 2,971 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. 2013. The 10 Leading Causes of Death in The World, 2000 and 2011. (Online) (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>, 7 Oktober 2013).
2. Winarsi, H., 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius. Hal: 13; 79-80.
3. Hernani dan Rahardja. 2005. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta: Penebar Swadaya. Hal: 3-5.
4. Nurliyana, R., Syed Z.I., Mustapha S.K., Aisyah, M.R., dan Kamarul R.K. 2010. Antioxidant study of pulp and peel dragon fruits: a comparative study. *Int. Food Res. J.* **17**: 365-375.
5. Azeredo, H.M.C. 2009. Betalain: Properties, Sources, Applications, and Stability – a Review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**: 2365-2376.
6. Choo, W.S., dan Yong, W.K., 2011. Antioxidant Properties of Two Species of *Hylocereus* Fruits. *Adv. Appl. Sci. Res.* **2(3)**: 418- 425.
7. Mitasari, A. 2012. Uji Aktivitas Ekstrak Kloroform Kulit buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus* Britton & Rose) Menggunakan Metode DPPH (1,1-Defenil-2-Pikril Hidrazil). *Skripsi*. Pontianak: Program Studi Farmasi, Universitas Tanjungpura. Hal: 37-38.

8. Demirezer, L. O., Kruuzum-Uz, A., Bergere, I., Schiewe, H. J., dan Zeeck, A. 2001. The Structures of Antioxidant and Cytotoxic Agents from Natural Source: Antraquinones and Tannin from Roots of *Rumex patientia*. *Phytochemistry*. **58**: 1213-1217.
9. Dean, J. 2009. *Extraction Techniques In Analytical Science*. London: John Wiley And Sons LTD. Hal: 43-46.
10. Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri*. Diterjemahkan oleh R.S Ketaren dan R. Mulyono. Jakarta: UI Press. Hal: 56.
11. Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* **26(2)**: 211-219.
12. Rahayu, D.S., Kusri D., Fachriyah, E. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L.) dengan Metode 1,1 difenil 2 pikrilhidrazil (DPPH). *Skripsi*. Semarang : Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro. Hal: 77-79.
13. Gurav, S., Deshkar, N., Gulkari, V., Duragkar, N., dan Patil, A., 2007, Free Radical Scavenging Activity of *Polygala chinensis* Linn, *Pharmacologyonline*. **2**: 245-253.
14. Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Penerbit ITB. Hal: 7-8; 49.
15. Mikamo, E., Okada, Y., Semma, M., Itto, Y., dan Morimoto T. 2000. Studies on Structural Correlationship with Antioxidant Activity of Flavonoids. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* **7**: 97-101.
16. Pine, H.S. 1988. *Radikal Bebas*. Bandung: ITB. Terjemahan dari: Organic Chemistry 2. Hal: 23-26.
17. Maiza-Benabdesselam, F., Khentache, S., Bougoffa, K., Chibane, M., Adach, S., Chapeleur, Y., Max, H. 2007. Antioxidant activities of alkaloid extract of two algerian species of *Fumaria*: *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardii*. *Record. Nat. Prod.* **1**: 28-35.
18. Cui, Y., Kim, D.S., dan Park, K.C. 2004. Antioxidant Effect *Inonotus Obliquus*. *J Etnopharmacol.* **96**: 79-85.
19. Chaman, S., Syed, N.I.H., Danish, Z., dan Khan, F.A. 2011. Phytochemical Analysis, Antioxidant and Antibacterial Effects of Sea Buckthorn Berries. *Pak. J. Pharm. Sci.* **24**: 345-351.