

NASKAH PUBLIKASI SKRIPSI

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



OLEH:

RINTIS PRANATA

NIM. I21109022

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK**

2013

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

NASKAH PUBLIKASI SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)
Pada Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura**



OLEH:

RINTIS PRANATA

NIM. I21109022

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK**

2013

NASKAH PUBLIKASI

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

**OLEH:
RINTIS PRANATA
NIM. I21109022**

**Telah Dipertahankan Di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura
Tanggal : 18 November 2013**

Disetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

**Hj. Sri Wahdaningsih, M.Sc., Apt.
NIP.198111012008012011**

**Andhi Fahrurroji, Msc., Apt.
NIP. 198102242008122003**

Penguji I,

Penguji II,

**Wintari Taurina, M.Sc., Apt.
NIP.198304212008012007**

**Siti Nani Nurbaeti, M.Si., Apt.
NIP. 198411302008122004**

**Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura**

**dr. Bambang Sri Nugroho, Sp.PD
NIP.195112181978111001**

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

ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST FROM CHLOROFORM FRACTION OF RED DRAGON FRUIT (*Hylocereus lemairei* Britton and Rose) PEEL BY USING DPPH (1,1-DIPHENYL-2-PICRYLHYDRAZIL) METHOD

Rintis Pranata¹, Sri Wahdaningsih², Andhi Fahrurroji³
¹²³Program Studi Farmasi Fakultas kedokteran, Universitas Tanjungpura,
Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi 78124

ABSTRAK

Buah naga merah (*Hylocereus lemairei* Britton dan Rose) merupakan tumbuhan yang berpotensi sebagai sumber antioksidan alami. Kulit buah naga merah dengan berat sekitar 22% dari berat buah diketahui memiliki aktivitas antioksidan pada tingkat ekstrak namun belum diuji pada tingkat fraksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari kulit buah naga merah pada tingkat fraksi menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan kloroform, kemudian difraksinasi cair-cair dengan n-heksana, kloroform, dan metanol. Fraksi kloroform yang diperoleh diskriminasi fitokimia. Uji pendahuluan aktivitas antioksidan dilakukan secara kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak kloroform:metanol (1,9:0,1) dengan pereaksi DPPH 0,2%. Aktivitas antioksidan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan dinyatakan sebagai nilai IC₅₀. Dari hasil skrining fitokimia diperoleh fraksi kloroform mengandung flavonoid dan triterpenoid. Hasil uji pendahuluan aktivitas antioksidan secara KLT menunjukkan adanya bercak kuning keputih-putihan dengan latar belakang ungu pada nilai R_f 0,60; 0,84; 0,90; dan 0,96. Hasil pengukuran secara spektrofotometri menunjukkan bahwa fraksi kloroform memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah dengan nilai IC₅₀ sebesar 3349,936 µg/mL, sedangkan vitamin C sebagai kontrol positif memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dengan IC₅₀ sebesar 2,973 µg/mL.

Kata Kunci : Kulit Buah Naga Merah, Aktivitas Antioksidan, Fraksi Kloroform, Metode DPPH.

ABSTRACT

Red dragon fruit (*Hylocereus lemairei* Britton and Rose) is one of the the plants that potentially as natural antioxidant. Red dragon fruit peel which consists approximately 22% of the whole fruit weight is known to have antioxidant activity at the level of extract but has not been tested at the level of fraction. The purpose of this study is to determine the antioxidant activity of red dragon fruit peel at the level of fraction using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. The extraction was done by maceration using chloroform and then fractionated liquid-liquid by n-hexane, chloroform, and methanol. Chloroform fraction was obtained was tested phytochemical. Preliminary test of antioxidant activity performed using thin layer chromatography (TLC) with stationary phase of silica gel 60 F₂₅₄ and mobile phase of chloroform:methanol (1,9:0,1) with reactant DPPH 0,2%. The Antioxidant activity was measured using UV-Vis spectrophotometer and was expressed as value of IC₅₀. Based on the result of phytochemical screening were known that chloroform fraction contains flavonoid and triterpenoid compounds. Preliminary test result of antioxidant activity with TLC showed of whitish yellow spots on the R_f value of 0,60; 0,84; 0,90; and 0,96. Result of spectrophotometric measurement showed that chloroform fraction had very weak antioxidant activity with IC₅₀ at 3349,936 µg/mL, whereas vitamin C as positif control had very powerful antioxidant activity with IC₅₀ at 2,973 µg/mL.

Keywords: Red dragon fruit peel, Antioxidant activity, DPPH Method, Chloroform fraction.

PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan molekul yang memiliki elektron tak berpasangan pada orbital luarnya sehingga bersifat sangat reaktif¹. Radikal bebas pada konsentrasi yang tinggi radikal bebas dapat menghasilkan stres oksidatif yang menyebabkan kerusakan struktur sel, termasuk kerusakan lipid, protein dan DNA. Adanya radikal bebas dalam tubuh menjadi penyebab dari berbagai penyakit kronis dan degeneratif². Radikal bebas dapat ditangkal oleh antioksidan. Antioksidan berdasarkan sumbernya dapat dibedakan menjadi antioksidan sintetik dan alami. Adanya kekhawatiran terhadap efek samping antioksidan sintetik berupa hepatomegali, mempengaruhi aktivitas enzim di hati serta karsinogenik, menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang terpilih³.

Buah naga merupakan salah satu jenis buah tropis dengan kandungan polifenol, antioksidan dan serat yang tinggi⁴. Tingkat konsumsi buah naga yang semakin meningkat, berdampak terhadap sisa kulit yang hanya dibuang begitu saja. Kulitnya yang mempunyai berat sekitar 22% dari berat buah belum dimanfaatkan secara optimal dan hanya dibuang sebagai sampah sehingga dapat menyebabkan pencemaran lingkungan⁵.

Aktivitas antioksidan kulit buah naga merah diketahui masih terbatas pada pengujian tingkat ekstrak. Diketahui bahwa aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit buah naga (IC_{50} 0,3 mg/mL) lebih tinggi daripada aktivitas antioksidan pada daging buahnya ($IC_{50} > 1$ mg/mL)⁶. Aktivitas antioksidan ekstrak kulit buah naga juga telah diuji dengan beberapa pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya. Ekstrak n-heksana kulit buah naga merah diketahui memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 853,543 μ g/mL⁷. Penelitian lain yang menguji aktivitas antioksidan kulit buah naga merah menunjukkan hasil yang lebih baik. Aktivitas antioksidan ekstrak metanol kulit buah naga merah memiliki nilai IC_{50} sebesar 634,292 μ g/mL⁸. Sementara pengujian terhadap ekstrak kloroform kulit buah naga merah memberikan aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 43,836 μ g/mL⁹.

Berdasarkan hal di atas diketahui uji aktivitas antioksidan kulit buah naga merah masih terbatas pada uji terhadap ekstrak saja. Penelitian yang lebih lanjut mengenai uji aktivitas antioksidan dari hasil fraksinasi

khususnya fraksi kloroform masih belum dilakukan. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antioksidan pada tingkat fraksi.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas (Pyrex), bejana maserasi, *rotary evaporator* (Heidolph tipe Hei-VAP), *waterbath* (Mettler tipe WNB14), corong pisah (Pyrex), bejana KLT, lampu UV 366 nm (Merck tipe 1.13203.0001), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu tipe 2450).

Bahan yang digunakan 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 n-heksana *p.a* (Merck kode bahan No.1.04367.2500), plat 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 berupa bagian kulit buah naga merah (*Hylocereus lemairei* Britton dan Rose) yang diperoleh dari 28,29 Kg buah naga merah segar. 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, Kabupaten Pontianak, Kalimantan Barat.

Sampel kulit buah naga merah yang diperoleh sebanyak 6,70 Kg 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 nomor 20 hingga diperoleh serbuk halus yang homogen.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Sebanyak 503,68 g simplisia kering dimasukkan kedalam bejana maserasi dan ditambahkan pelarut kloroform *p.a* sampai semua sampel terendam oleh pelarut lalu ditutup dengan aluminium foil. Maserasi dilakukan selama lima hari, setiap 24 jam pelarut diganti dan dilakukan pengadukan tiga kali sehari. Hasil maserasi disaring untuk

memisahkan filtrat dan residunya. Filtrat yang diperoleh lalu dikumpulkan dan disaring. Kemudian filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum* dan *waterbath* pada suhu 45°C hingga menjadi ekstrak kental.

Fraksinasi dilakukan menggunakan metode Kartini dengan sedikit modifikasi¹⁰. Sebanyak 8,10 g ekstrak dimasukkan ke dalam corong pisah, difraksinasi berturut-turut dengan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana, kloroform dan metanol. 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 kloroform 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, dengan sedikit modifikasi¹¹. Uji pendahuluan diawali dengan mengaktifkan plat KLT pada oven dengan suhu 105°C selama 10 menit. Plat KLT selanjutnya ditotolkan fraksi kloroform dengan konsentrasi 1% sebanyak 5 µL menggunakan mikropipet 1 µL, pada jarak 0,5 cm dari batas bawah plat. Penotolan sampel dilakukan secara perlahan dengan volume yang ditotolkan sebanyak 1 µL sebanyak lima kali penotolan. Tiap-tiap penotolan, bercak dibiarkan hingga kering kemudian dielusi menggunakan fase gerak kloroform : metanol (1,9 : 0,1) sebanyak 2 mL. Jarak elusi 9 cm, setelah dikembangkan sampai batas pengembangan, elusi dihentikan, lalu lempeng diangin-anginkan sampai 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 pucat dengan latar belakang ungu.

Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis

Aktivitas antioksidan fraksi kloroform ditentukan menggunakan metode DPPH yang

digunakan oleh Nurliyana dkk, dengan sedikit modifikasi⁶. Sebanyak 1 mL fraksi kloroform dengan konsentrasi 300 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL, 600 µg/mL, dan 700 µg/mL ditambahkan ke dalam 2 mL DPPH 0,1 mM. Campuran selanjutnya dikocok dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit di tempat gelap. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya pada λ_{maks} 516,0 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.

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

Keterangan :

A = Nilai absorbansi

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 diperoleh persamaan $y = bx + a$ dengan a sebagai intersep, b sebagai slope dan nilai koefisien korelasi dinyatakan sebagai r. Nilai r yang baik mendekati -1 atau +1 tergantung pada nilai slope yang diperoleh⁶.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan berupa bagian kulit buah (perikarp) dari buah naga merah (*Hylocereus lemairei* (F.A.C.Weber) Britton dan Rose). Sampel diambil dari tanaman budidaya (kultivar) sehingga identitas jenis, lokasi tumbuh, keseragaman umur, serta masa panen tanaman dapat diketahui dengan jelas¹². 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. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan hasil yang diperoleh Jamilah dkk, dimana dalam penelitian tersebut bobot

kulit buah naga merah sebesar 22% dari keseluruhan berat buah⁵. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh genetik, perbedaan lokasi pengambilan sampel, rekayasa agronomi serta pemanenan¹². Bobot simplisia yang dihasilkan setelah melalui tahapan-tahapan pembuatan simplisia adalah 518,68 gram.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut kloroform. Maserasi dipilih karena dapat mengekstrak senyawa dengan baik dan dapat mencegah dekomposisi senyawa yang labil terhadap panas¹³. Prinsip maserasi yaitu adanya difusi cairan penyari ke dalam sel tumbuhan yang mengandung senyawa aktif. Difusi tersebut mengakibatkan perbedaan tekanan osmosis didalam dan diluar sel. Senyawa aktif kemudian terdesak keluar akibat adanya tekanan osmosis tersebut¹⁴.

Ekstrak yang diperoleh berupa ekstrak kental berwarna coklat tua dengan rendemen 1,654%. Nilai rendemen ini lebih tinggi dibandingkan penelitian Mitasari, yang menyatakan bahwa rendemen ekstrak kloroform kulit buah naga merah sebesar 0,36%⁹. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh ukuran partikel sampel, kondisi dan waktu ekstraksi, serta perbandingan jumlah sampel terhadap pelarut yang digunakan¹³.

Fraksinasi pada ekstrak kloroform bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan kelarutannya terhadap pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Proses fraksinasi dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya akan mempengaruhi jenis dan kadar senyawa bioaktif serta aktivitas antioksidannya¹⁵. Partisi terhadap ekstrak kloroform kulit buah naga merah dilakukan menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, dan metanol. Hasil fraksinasi dapat dilihat pada tabel 1.

Senyawa non polar yang berada pada ekstrak kloroform akan terdistribusi dalam pelarut n-heksana dan senyawa polar akan terdistribusi dalam pelarut metanol. Senyawa yang bersifat non polar antara lain klorofil, minyak atsiri, resin dan lemak¹⁶. Sementara senyawa yang bersifat polar antara lain alkaloid, fenolik, saponin, karotenoid dan tanin. Fraksi yang disari dari kloroform merupakan fraksi yang diambil untuk tahapan selanjutnya. Senyawa yang dapat disari oleh pelarut kloroform merupakan senyawa yang

bersifat semipolar seperti alkaloid, terpenoid/steroid, komponen fenolik, glikosida jantung, minyak atsiri dan flavonoid¹⁷.

Tabel 1. Hasil Fraksinasi Ekstrak Kloroform Kulit Buah Naga Merah

Jenis Pelarut	Warna fraksi	Rendemen (% b/b)
n-heksana	Coklat tua gelap	53,333
Metanol	Coklat tua terang	35,802
kloroform*	Coklat muda pucat	3,333

Keterangan : * fraksi yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan

Perbedaan jenis pelarut mempengaruhi jumlah rendemen tiap fraksi¹³. Tingginya rendemen pada n-heksana menunjukkan pelarut tersebut mampu mengekstrak lebih banyak komponen bioaktif dengan sifat kepolaran rendah. Hal ini terjadi karena n-heksana memiliki gugus non polar yang kuat, terlihat dari gugus karbon (non polar) pada struktur kimianya serta memiliki indeks polaritas yang paling rendah yaitu 0 (nol). Rendemen pada metanol lebih kecil dibandingkan n-heksana namun lebih besar dari kloroform. Metanol memiliki indeks polaritas 5,1 sehingga mampu mengekstrak lebih banyak komponen bioaktif dengan sifat kepolaran yang tinggi. Metanol memiliki gugus hidroksil (polar) sehingga bisa membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa polar yang terdapat pada sampel.

Fraksi kloroform memiliki rendemen paling rendah. Hal ini dikarenakan kloroform merupakan pelarut aprotik polar. Adanya sifat polar dengan menyebabkan kloroform dapat membentuk ikatan dipol-dipol dengan senyawa polar yang terdapat pada sampel namun ikatan ini lebih lemah bila dibandingkan dengan ikatan hidrogen yang terbentuk pada pelarut metanol. Selain itu sifat non polar yang dimiliki oleh kloroform juga lebih lemah bila dibandingkan dengan n-heksana. Hal tersebut yang menyebabkan rendahnya nilai rendemen yang diperoleh pada kloroform.

Berdasarkan hasil pemeriksaan skrining fitokimia diketahui bahwa fraksi kloroform kulit buah naga merah mengandung metabolit sekunder flavonoid dan triterpenoid. Skrining fitokimia fraksi kloroform dilakukan menggunakan uji tabung. Hasil skrining fitokimia fraksi kloroform kulit buah naga merah dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia Fraksi Kloroform 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 Wilstater 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.

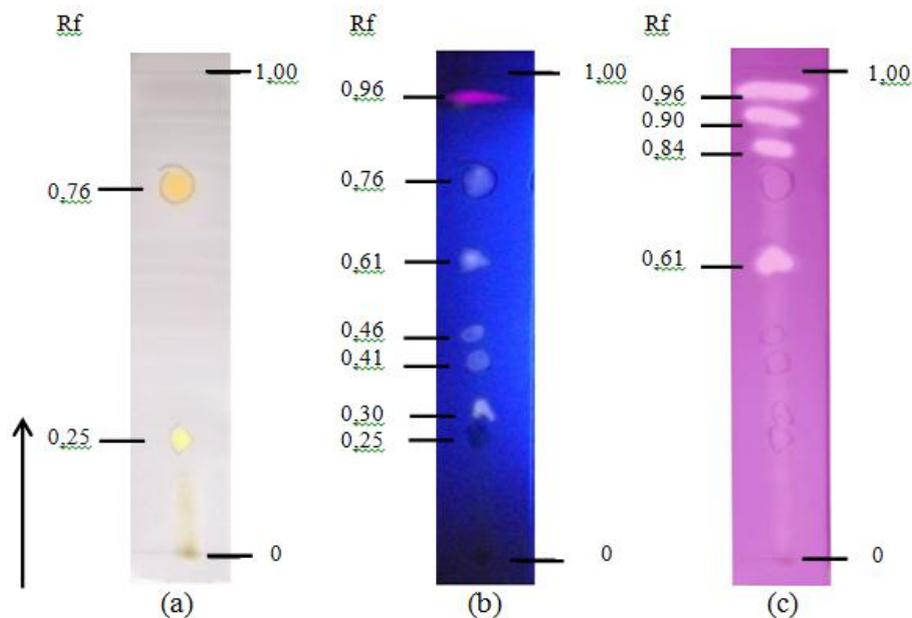
Hasil Uji Pendahuluan

Aktivitas Antioksidan Secara KLT

Pada uji pendahuluan aktivitas antioksidan secara kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ yang telah diaktifkan pada oven dengan suhu 105⁰C selama 10 menit dan fase gerak kloroform : metanol (1,9 : 0,1) serta pereaksi DPPH 0,2%. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh empat bercak yang memisah dengan nilai Rf 0,61; 0,84; 0,90 dan 0,96. Bercak yang diperoleh menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning keputih-putihan dengan latar ungu¹⁸. Hasil kromatogram fraksi kloroform kulit buah naga merah dapat dilihat pada gambar 1. Intensitas

warna kuning yang dihasilkan setelah disemprotkan DPPH dapat digunakan sebagai gambaran aktivitas peredaman DPPH oleh senyawa yang terkandung dalam bercak¹². Semakin kuat intensitas warna kuning yang dihasilkan maka semakin kuat aktivitas peredamannya.

Diperoleh bercak dengan intensitas warna kuning paling kuat hingga lemah yaitu Rf 0,96; Rf 0,84; Rf 0,90 dan Rf 0,61. Bercak pada Rf 0,61 diduga merupakan senyawa flavon. Senyawa flavon memiliki panjang gelombang maksimum 330-350 nm, saat disinari UV akan menghasilkan bercak kuning redup atau bercak berwarna putih terang (murup)¹⁷. Ini terbukti dengan bercak yang



Gambar 1. Hasil Kromatogram Fraksi Kloroform Kulit Buah Naga Merah Menggunakan Fase Diam Silika Gel 60 F₂₅₄ dan Fase Gerak Kloroform : Metanol (1,9 : 0,1). Penampakan Secara Visual (a); Sinar UV 366 nm (b); dan Larutan DPPH 0,2% (c).

tidak terlihat pada panjang gelombang tampak (380nm-780 nm) pada saat pengamatan visual dan baru terlihat saat disinari UV 366 nm berupa berwarna bercak putih. Bercak pada Rf 0,84 dan 0,90 diduga merupakan senyawa triterpenoid. Kedua bercak sebelumnya tidak tampak baik pada pengamatan visual maupun pengamatan menggunakan sinar UV. Senyawa triterpenoid yang dideteksi diduga hanya memiliki ikatan rangkap tak terkonjugasi. Sistem ikatan rangkap terkonjugasi memiliki struktur planar dan kaku sehingga akan mampu menyerap kuat pada daerah 200-800 nm¹⁹. Oleh karena itu triterpenoid hanya memiliki pita serapan yang lemah pada serapan sinar UV maupun sinar tampak sehingga bercak tidak tampak pada kedua pengamatan tersebut.

Bercak pada Rf 0,96 diduga merupakan senyawa betasianin. Ini terbukti saat dilakukan penyinaran menggunakan sinar UV memberikan bercak berfluoresensi merah jambu¹⁷. Bercak ini tidak tampak pada pengamatan secara visual. Hal ini dikarenakan senyawa betasianin memiliki dua panjang gelombang maksimum yaitu 270-280 nm dan 535-540 nm²⁰. Diduga bercak yang tampak pada sinar UV memiliki panjang gelombang 270- 280 nm. Selain keempat bercak yang telah disebutkan diatas, beberapa bercak tidak bereaksi saat disemprotkan DPPH baik bercak yang tampak secara visual maupun yang tampak pada sinar UV.

Pada pengamatan secara visual diperoleh dua bercak tampak yaitu pada Rf 0,25 dan 0,76. Senyawa yang diduga ada pada bercak pertama adalah flavonol. Bercak ber kuning menandakan terdapat senyawa flavonol²¹. Senyawa flavonol memiliki panjang gelombang maksimum utama berkisar antara 350-390 nm¹⁷. Senyawa yang diduga ada pada bercak kedua adalah senyawa betasianin. Keberadaan senyawa betasianin diidentifikasi berdasarkan bercak dengan warna jingga menandakan terdapat pigmen betasianin²¹. Senyawa betasianin memiliki dua panjang gelombang maksimum yaitu 270-280 nm dan 535-540 nm tergantung pelarut yang digunakan²⁰. Oleh sebab itu betasianin dapat dideteksi baik pada sinar tampak maupun pada sinar UV. Kedua bercak yang tampak secara visual tidak menghasilkan bercak kuning saat disemprotkan DPPH 0,2%. Diduga kedua bercak tidak memiliki gugus hidroksil yang cukup untuk meredam aktivitas radikal DPPH.

Pada pengamatan menggunakan fluoresensi sinar ultraviolet dengan panjang gelombang emisi 366 nm diperoleh tujuh bercak yang tampak seperti pada gambar 1 (b). Bercak pada Rf 0,25 tampak sebagai bercak berwarna coklat tua (gelap). Berdasarkan hasil pengamatan menggunakan sinar UV dapat diduga bahwa bercak tersebut adalah flavonol. Bercak dengan warna coklat tua (gelap) setelah disinari UV 366 nm menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah flavonol¹⁷. Pengamatan UV juga sejalan dengan hasil pengamatan secara visual. Bercak pada Rf 0,30; 0,41; 0,46; 0,61; dan 0,76 tampak sebagai bercak putih dengan berbagai intensitas warna. Bercak-bercak ini sebelumnya tidak tampak pada pengamatan secara visual (kecuali bercak pada Rf 0,76) dengan demikian dapat diasumsikan bahwa bercak-bercak tersebut memiliki panjang gelombang maksimum berada pada 190-380 nm. Bercak pada pengamatan dengan sinar ultraviolet tersebut diduga merupakan senyawa flavon. Senyawa flavon memiliki panjang gelombang maksimum 330-350 nm saat disinari UV akan menghasilkan bercak kuning redup ataupun bercak berwarna putih terang (murup)¹⁷.

Bercak Rf 0,76 yang diidentifikasi sebagai betasianin apabila disinari UV seharusnya berfluoresensi merah jambu, namun dari hasil pengamatan diperoleh pendar putih dengan intensitas warna lemah. Hal ini disebabkan betasianin memiliki dua panjang gelombang maksimum yaitu 270-280 nm dan 535-540 nm. Diduga bercak yang tampak secara visual merupakan bercak dengan panjang gelombang 535-540 nm. Adapun warna putih dengan intensitas lemah yang dihasilkan diduga merupakan senyawa flavon yang berikatan dengan betasianin. Diketahui betasianin yang terdapat dalam daun bunga hampir selalu disertai oleh flavon atau flavonol¹⁷. Diduga hal ini juga berlaku terhadap keberadaan betasianin pada kulit buah naga merah. Pada Rf 0,96 diperoleh bercak berpendar merah jambu kuat yang berukuran kecil. Bercak ini sebelumnya tidak tampak pada pengamatan visual. Senyawa yang diduga ada pada bercak tersebut adalah senyawa betasianin. Dari ketujuh bercak yang tampak secara ultraviolet hanya dua bercak (Rf 0,61 dan 0,96) yang menghasilkan bercak kuning saat disemprotkan DPPH 0,2%, sementara lima bercak lainnya menunjukkan

hasil negatif. Diduga kelima bercak memiliki gugus hidroksil yang sedikit ataupun tidak memiliki gugus hidroksil sama sekali sehingga tidak dapat mendonorkan atom hidrogen untuk dapat mengakibatkan molekul DPPH tereduksi yang diikuti dengan hilangnya warna ungu dari larutan DPPH. Hal ini dapat disebabkan karena struktur flavonoid, maupun akibat adanya glikosilasi maupun metilasi.

Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

Menggunakan Spektrofotometer UV-Visibel

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan prinsip spektrofotometri. 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 absorbansi²². Tahap awal yang dilakukan adalah pengukuran panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) larutan DPPH. Panjang gelombang maksimum DPPH yang digunakan untuk pengujian fraksi kloroform adalah 516,0 nm dengan absorbansi sebesar 0,961. Sementara panjang gelombang maksimum DPPH yang digunakan untuk pengujian vitamin C adalah 515,5 nm dengan absorbansi sebesar 1,244. Kedua panjang gelombang tersebut dapat digunakan sebab panjang gelombang dari absorbansi maksimum yang dapat digunakan untuk pengukuran dengan metode DPPH yaitu 515 nm - 520 nm²².

Uji aktivitas antioksidan fraksi kloroform kulit buah naga merah dengan metode DPPH dilakukan pada panjang gelombang maksimum yang telah didapat yaitu 516,0 nm. Digunakan sampel dengan lima konsentrasi yang meningkat. Penggunaan konsentrasi tersebut didasarkan pada penggunaan metode regresi dalam membuat persamaan garis yang didasarkan pada nilai absorbansi dan konsentrasi standar yang dibuat paling sedikit menggunakan lima rentang konsentrasi yang meningkat agar dapat memberikan serapan linier.

Berdasarkan hasil pengamatan visual, tampak bahwa fraksi kloroform kulit buah naga merah yang telah direaksikan dengan DPPH setelah masa inkubasi selama 30 menit tidak mengalami perubahan berarti yaitu tetap berwarna ungu. Padahal perubahan warna ungu menjadi kuning pucat menandakan

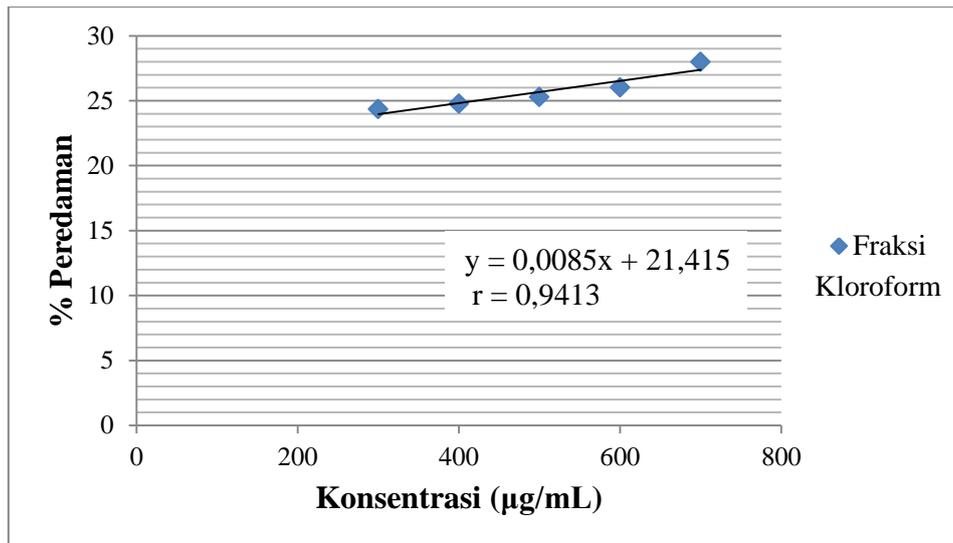
adanya aktivitas antioksidan²². Sampel yang telah diinkubasi lalu dianalisis absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah *Inhibitory Concentration* (IC_{50}). Senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat apabila nilai IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$, kuat apabila nilai IC_{50} antara 50-100 $\mu\text{g/mL}$, sedang apabila nilai IC_{50} antara 100-150 $\mu\text{g/mL}$, dan lemah apabila nilai IC_{50} antara 150-200 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} 200-1000 $\mu\text{g/mL}$ dinyatakan masih berpotensi sebagai antioksidan²². Nilai IC_{50} diperoleh secara ekstrapolasi menggunakan persamaan regresi yaitu, $y = 0,0085x + 21,415$. Dari persamaan tersebut diperoleh IC_{50} sebesar 3349,936 $\mu\text{g/mL}$. Kurva regresi linier pengujian aktivitas antioksidan fraksi kloroform dengan metode DPPH dapat dilihat pada gambar 2.

Berdasarkan hasil IC_{50} yang telah diperoleh dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah. Diduga hal ini disebabkan oleh faktor preparasi sampel serta kandungan metabolit yang terkandung pada fraksi kloroform.

Pada preparasi sampel khususnya pada proses pengeringan simplisia, panas yang digunakan berasal dari lampu sehingga selain menghasilkan panas juga menghasilkan sinar tampak yang secara kontinu menyinari simplisia. Pada simplisia kulit buah naga merah terdapat senyawa betasianin yang merupakan senyawa dengan aktivitas antioksidan kuat. Senyawa betasianin bersifat sensitif, stabilitasnya dapat dipengaruhi oleh pemanasan, perubahan pH, paparan sinar baik sinar tampak maupun sinar UV, perubahan kelembaban dan akibat adanya reaksi oksidasi selama proses pengeringan berlangsung²³.

Faktor yang paling mempengaruhi stabilitas betasianin adalah cahaya. Paparan cahaya secara kontinu dapat menyebabkan degradasi betasianin sebesar 15,6% dan degradasi tersebut dapat meningkat hingga 50% bila simplisia terus terpapar cahaya selama seminggu pada suhu ruangan²³. Penyerapan sinar tampak maupun UV oleh elektron pada kromofor betalain menyebabkan transisi π ke π^* yang dapat mengakibatkan penurunan energi aktivasi molekul sehingga meningkatkan reaktivitas molekul. Hal ini menyebabkan degradasi pada betasianin.



Gambar 2. Kurva Regresi Linier Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi Kloroform Kulit Buah Naga Merah

Pada penelitian Mitasari diketahui ekstrak kloroform kulit buah naga merah mengandung metabolit sekunder alkaloid, flavonoid dan triterpenoid⁹. Sementara hasil skrining fitokimia pada fraksi hanya menunjukkan hasil positif terhadap metabolit sekunder flavonoid dan triterpenoid. Oleh karena itu diduga senyawa alkaloid yang terdapat pada ekstrak bersifat polar sehingga pada saat fraksinasi tidak tersari oleh kloroform melainkan tersari oleh metanol.

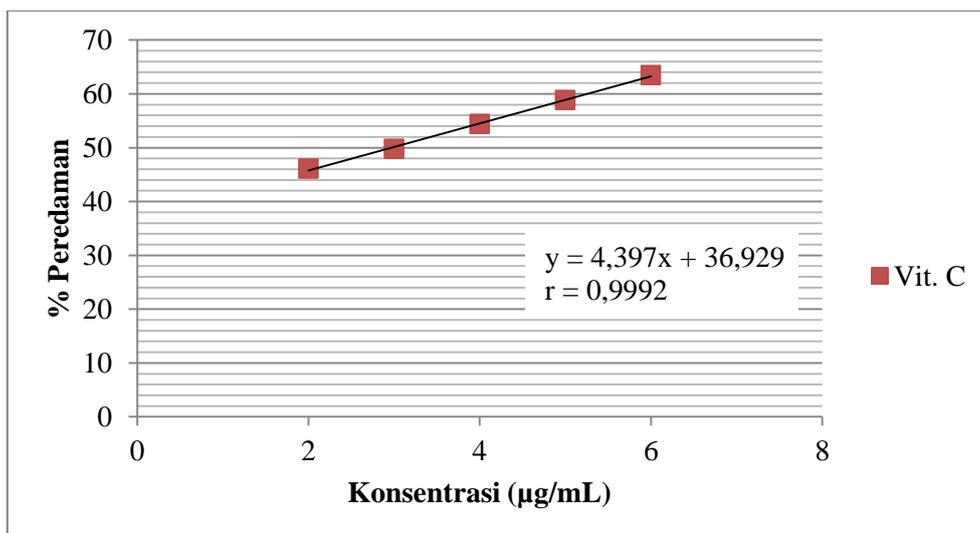
Berdasarkan IC_{50} yang diperoleh dapat dibandingkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak sangat kuat dibandingkan pada fraksi (43,836 µg/mL berbanding 3349,936 µg/mL). Diduga senyawa alkaloid yang terdapat pada ekstrak sangat berperan dalam memberikan aktivitas antioksidan yang kuat. Hal ini didukung oleh Maiza-Benabdesselam dkk, dalam penelitiannya terhadap ekstrak alkaloid *Fumaria bastardii* yang menyatakan bahwa senyawa alkaloid isokuinolin memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat baik sebagai *radical scavenger* maupun sebagai penghambat peroksidasi lipid. Namun senyawa alkaloid tidak memiliki aktivitas sebagai *metal chelation*²⁴.

Golongan senyawa yang diduga memberikan aktivitas antioksidan pada fraksi adalah flavonoid dan terpenoid. Senyawa flavonoid yang dimaksud berdasarkan uji KLT meliputi senyawa flavon dan betasianin. Aktivitas antioksidan pada senyawa flavonoid ditentukan oleh adanya gugus katekol pada cincin B dalam molekul flavonoid, jumlah

gugus OH bebas, ikatan ganda C_2-C_3 , dan adanya gugus 3-OH pada cincin C²⁵.

Rendahnya nilai IC_{50} dari fraksi kloroform disebabkan oleh keberadaan gugus katekol pada cincin B dan gugus 3-OH pada cincin C. Gugus katekol pada cincin B dan gugus 3-OH pada cincin C berperan penting dalam struktur flavonoid untuk meredam radikal bebas²⁵. Diduga senyawa flavonoid yang ada dalam fraksi tidak mengandung atau hanya memiliki salah satu gugus dari kedua gugus tersebut. Keberadaan gugus hidroksil pada flavonoid juga mempengaruhi aktivitas antioksidannya. Semakin banyak gugus hidroksi bebas pada flavonoid terutama pada cincin B maka semakin besar aktivitas antioksidannya³. Diduga senyawa flavonoid dan triterpenoid yang ada pada fraksi kloroform memiliki gugus OH bebas yang sedikit, sehingga jumlah atom hidrogen yang didonorkan tidak mampu meredam aktivitas radikal DPPH.

Adanya gugus lain dalam fraksi kloroform juga dapat menyebabkan flavonoid termetilasi. Perubahan atom -H menjadi gugus metil (-CH₃) melalui reaksi metilasi dapat menurunkan aktivitas antioksidan²⁶. Selain itu terjadinya glikosilasi juga dapat menurunkan kemampuan meredam aktivitas radikal DPPH²⁷. Diduga senyawa flavonoid yang ada bukan dalam bentuk aglikon melainkan dalam bentuk berikatan dengan glikosida sehingga menurunkan aktivitas antioksidannya. Untuk mengukur potensi antioksidan pada fraksi kloroform kulit buah



Gambar 3. Kurva regresi linier pengujian aktivitas antioksidan Vitamin C

naga merah maka dibandingkan aktivitas antioksidan fraksi kloroform dengan antioksidan kontrol positif.

Kontrol positif yang digunakan dalam adalah vitamin C. Secara umum, prosedur pengukuran aktivitas antioksidan vitamin C dilakukan seperti perlakuan saat pengukuran aktivitas antioksidan fraksi kloroform. Panjang gelombang maksimum DPPH yang digunakan untuk pengujian vitamin C adalah 515,5 nm dengan absorbansi sebesar 1,244. Hasil pengukuran vitamin C pada tabel 4, diperoleh persamaan regresi linier $y = 4,397x + 36,929$ dengan nilai koefisien korelasi 0,9992. Vitamin C sebagai kontrol positif mempunyai nilai IC_{50} sebesar 2,973 µg/mL. Nilai tersebut menunjukkan bahwa vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat karena memiliki nilai IC_{50} kurang dari 50 µg/mL. Kurva regresi aktivitas antioksidan vitamin C ditunjukkan sesuai gambar 3.

Perbandingan nilai IC_{50} dari fraksi kloroform kulit buah naga merah dengan nilai IC_{50} dari vitamin C menunjukkan perbedaan aktivitas antioksidan yang signifikan. Perbedaan ini dapat disebabkan karena kontrol positif yang digunakan merupakan senyawa murni sehingga didalamnya tidak ada senyawa lain yang dapat mengganggu proses peredaman radikal bebas. Vitamin C dapat menekan pembentukan spesies oksigen reaktif baik dengan cara menghambat kerja enzim maupun dengan mekanisme *metal chelation*. Selain itu vitamin C juga bekerja sebagai antioksidan primer dengan menghentikan tahap propagasi (*chain-breaking antioxidant*)

sehingga memberikan aktivitas antioksidan yang sangat kuat.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform kulit buah naga merah memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah, dengan senyawa yang diduga memberikan aktivitas antioksidan yaitu senyawa flavonoid (betasianin dan flavon) serta triterpenoid. Nilai IC_{50} dari fraksi kloroform kulit buah naga merah sebesar 3349,936 µg/ml, sedangkan nilai IC_{50} dari vitamin C sebagai kontrol positif memiliki sebesar 2,973 µg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius, Hal. 13;79-80.
- [2] Pham-Huy, L. A., He, H., and Pham-Huyc, C. 2008. Free Radical, Antioxidant in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* **4** (2):89-96.
- [3] Sunarni, T., Pramono, S., dan Asmah, R. 2007. Flavonoid Antioksidan Penangkap Radikal dari Daun Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl. Hook f. & Th.)). *Majalah Farmasi Indonesia.* **18** (3):111-116.
- [4] Omidzadeh, A., Yusof, R. M., Ismail, A., Roohinejad, S., Nateghi, L., and Bakar, M. Z. A. 2011. Cardioprotective Compounds of Red Pitaya (*Hylocereus lemairei*) Fruit. *J. Food. Agric. Environ.* **9** (3&4):152-156.

- [5] Jamilah, B., Shu, C. E., Kharidah, M., Dzulkifly, M. A., and Noranizan, A. 2011. Physico-chemical Characteristics of Red Pitaya (*Hylocereus lemairei*) Peel. *Int. Food. Res. J.* **18**: 279-286.
- [6] 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.
- [7] Putra, T. U., 2012. Uji Aktivitas Ekstrak n-Heksana 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. 52.
- [8] Romadhona, A., 2012. Uji Aktivitas Ekstrak Metanol 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. 51.
- [9] 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. 51; 68.
- [10] Kartini. 2008. Isolasi Glikosida Flavon dari Fraksi Etil Asetat *Plantago major* L. *Artocarpus*. **8** (2):86-90.
- [11] Demirezer, L. O., Kruuzum-Uz, A., Bergere, I., Schiewe, H. J., and 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.
- [12] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal. 7.
- [13] Tursiman, Ardiningsih, P., dan Nofiani, R. 2012. Total Fenol Fraksi Etil Asetat dari Buah Asam Kandis (*Garcinia dioica* Blume). *JKK*. **1** (1):45-48.
- [14] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal. 10-12.
- [15] Widyawati, P.S., Wijaya, C.H., Harjosworo, P.S., dan Sjuthi D. 2010. Pengaruh Ekstraksi dan Fraksinasi Terhadap Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) Ekstrak dan Fraksi Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less). *Seminar Rekayasa Kimia dan Proses*. Semarang.
- [16] Suryanto, E., Wehantuo, F., dan Raharjo, S. 2008. Aktivitas Penstabilan Senyawa Oksigen Reaktif dari Beberapa Herbal. *Jurnal Obat Bahan Alam*. **7**:62-68.
- [17] Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Penerbit ITB. Hal. 7-8; 49; 65; 70-72; 78; 88; 140; 156; 234.
- [18] Marlina, S. D., Suryanti, V., dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*. **3**(1): 26-31.
- [19] Gandjar, I. G., dan Rohman, A. 2009. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. Hal. 16; 240; 252-256; 281; 353-355; 359-360.
- [20] Azeredo, H. M. C. 2009. Betalain: Properties, Sources, Applications, and Stability—a Review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**: 2365-2376.
- [21] Samanta A., Das, G., dan Das, S.K., 2011. Roles of Flavonoid in Plants. *Int. J. Pharm Sci Tech.* **6** (1):12-35
- [22] Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarini J. Sci. Technol.* **26** (2):211-219.
- [23] Woo, K.K., Ngou, F.H., Ngo, L.S., Soong, W.K., and Tang, P.Y. 2011. Stability of Betalain Pigment from Red Dragon Fruit (*Hylocereus lemairei*). *Am. J. Food. Technol.* **6** (2):140-148.
- [24] Maiza-Benabdesselam, F., Khentache, S., Bougoffa, K., Chibane, M., Adach, S., Chapeleur, Y., Max, H., Laurain-Mattar, D. 2007. Antioxidant Activities of Alkaloid Extract of Two Algerian Species of *Fumaria*: *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardii*. *Rec. Nat. Prod.* **1** (2-3):28-35.
- [25] Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., and Trinajstić. 2003. Structure-Radical Scavenging Activity

- Relationships of Flavonoids. *Croat. Chem. Acta.* **6** (1):55-61.
- [26] Mikamo, E., Y. Okada., A. Semma., Y. Otto, and I. Morimoto, 2000. Studies On Structural Correlation-Ship With Antioxidant Activity of Flavonoids. *Jpn. J. Food Chem.* **7** (2):93-101.
- [27] Seeram N.P., and Nair, M. G.,2002. Inhibition of Lipid Peroxidation and structure-activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, antocyanidins, and catechins. *J. Agric. Food. Chem.* **50** (19):5308-5312.