

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental, untuk menentukan aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dan buah naga putih (*Hylocereus undatus*) berdasarkan nilai IC_{50} dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-2 pikrilhidrazil*).

B. Lokasi dan waktu penelitian

1. Lokasi

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang.
- b. Uji fitokimia dan pembuatan ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dan ekstrak kulit buah naga putih (*Hylocereus undatus*) di Laboratorium fitokimia program studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Uji aktivitas antioksidan di laboratorium instrument Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu penelitian :

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-April2023

C. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dan kulit buah naga putih (*Hylocereus undatus*) dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm.

2. Variabel tergantung

variabel tergantung pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Nilai IC_{50} dari ekstrak kulit buah naga merah dan kulit buah naga putih yang menyatakan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH
- b. Kategori nilai %inhibisi dari ekstrak kulit buah naga merah dan kulit buah naga putih

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah waktu maserasi, suhu *waterbath* dan *rotary evaporator*, penentuan panjang gelombang maksimum spektrofotometer UV-Vis, penentuan operating time spektrofotometer UV-Vis.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian adalah beaker gelas, gelas ukur, labu takar, corong kaca, kain flanel, batang pengaduk, thermometer, botol berwarna gelap, blender, timbangan elektrik, waterbath, tabung reaksi, pipet ukur, stopwatch, mikropipet dan spektrofotometer UV-VIS, tabung reaksi, gelas ukur, pipet tetes, oven, moisture balance dan penangas air.

2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah ekstrak kulit buah naga merah dan buah naga putih (diperoleh sekitar ungararan barat), etanol 96%, etanol pa, Magnesium (Mg), Asam klorida (HCl), $FeCl_3$ 10%, Natrium klorida (NaCl) 10%, kuersetin, DPPH.

E. Prosedur penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman kulit buah naga merah dan kulit buah naga putih dilakukan dilaboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi fakultas sains dan matematika Universitas Diponegoro Semarang. Hasil determinasi ini digunakan untuk menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan untuk menjamin kebenaran jenis atau spesies tanaman.

2. Pembuatan Simplisia

Buah naga merah dan buah naga putih yang sudah terkumpul dan sudah terpisahkan kulit dari buahnya selanjutnya dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran atau bahan-bahan asing kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu diangin-anginkan hingga tidak terdapat sisa air. kulit buah naga merah dan kulit buah naga putih dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan ditutupi kain hitam menggunakan bantuan sinar matahari tidak langsung dan dilakukan sortasi kering (Wahdaningsih, 2022). Simplisia yang sudah kering ditimbang dan dibuat serbuk dengan cara diblender sampai halus. Serbuk diayak menggunakan ayakan dengan derajat kehalusan 40 mesh (Rekayasa *et al.*, 2020).

3. Uji Standarisasi Non Spesifik Pada Simplisia

a. Uji kadar air

Setelah simplisia kering, dilakukan uji kadar air dengan cara menimbang cawan porselin kemudian dilanjutkan dengan menimbang masing-masing 2 gram serbuk simplisia, kemudian masukkan kedalam oven selama 3 jam dengan suhu 105°C. keluarkan cawan yang berisi simplisia lalu dinginkan dan timbang kembali (Himawan *et al.*, 2018) perhitungan kadar air menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

a = bobot sampel sebelum pemanasan (gram)

b = bobot sampel sesudah pemanasan (gram)

b. Uji kadar abu

Uji kadar abu pada simplisia kulit buah naga merah dan kulit buah naga putih dilakukan dengan cara memasukkan 2 gram serbuk simplisia kedalam kurs porselen yang sebelumnya telah ditimbang, kemudian panaskan dengan suhu 600°C selama 3 jam dengan alat *muffle furnace*. setelah itu timbang sisa abu dan hitung nilai kadar abu (Anggraeni, 2020).

Kadar abu dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ abu} = \frac{\text{Berat abu (g)}}{\text{Berat sampel (g)}} \times 100\%$$

Keterangan :

Berat abu = berat cawan dan sampel setelah pengeringan – berat cawan kosong

Berat sampel = berat cawan dan sampel sebelum pengeringan – berat cawan kosong

4. Pembuatan Ekstrak

a. Kulit buah naga merah

Serbuk simplisia kulit buah naga merah yang diperoleh ditimbang sebanyak 300 g kemudian dimeserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 3 L (1:10) selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari dilakukan penyaringan untuk mendapatkan filtrat menggunakan kain flanel dan residu diremeserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 900 mL (1:3) selama 2 hari.

Filtrat dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk memisahkan ekstrak dari cairan penyari dengan suhu 50°C (Septiawan *et al.*, 2020).

b. Kulit buah naga putih

Serbuk simplisia kulit buah naga putih yang diperoleh ditimbang sebanyak 300 g kemudian dimeserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 3 L (1:10) selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari dilakukan penyaringan untuk mendapatkan filtrat menggunakan kain flanel dan residu diremeserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 900 mL (1:3) selama 2 hari. Filtrat dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk memisahkan ekstrak dari cairan penyari dengan suhu 50°C (Septiawan *et al.*, 2020).

5. Uji Kadar Air Pada Ekstrak

Ekstrak kulit buah naga merah dan buah naga putih ditimbang masing-masing 2 g. ekstrak dikeringkan menggunakan oven selama 3 jam dengan suhu 105°C. keluarkan cawan yang berisi ekstrak lalu dinginkan dan timbang kembali (Himawan *et al.*, 2018) perhitungan kadar air menggunakan rumus sebagai berikut:

Keterangan:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

a = bobot sampel sebelum pemanasan (gram)

b = bobot sampel sesudah pemanasan (gram)

6. Uji Bebas Etanol

Pengujian bebas etanol pada ekstrak dilakukan secara kualitatif dengan cara memasukkan masing-masing ekstrak kental kedalam tabung reaksi yang berbeda kemudian ditambahkan dengan 2 tetes pereksi asam sulfat (H₂SO₄) dan 1 ml pereaksi kalium dikromat (K₂Cr₂O₇). Syarat ekstrak dikatakan bebas etanol jika warna tetap jingga dan tidak berubah menjadi warna biru kehijauan (Klau *et al.*, 2021)

7. Uji Skrining Fitokimia

a. Uji Flavonoid

Sampel diambil sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes etanol 96% kemudian diuapkan hingga kering. ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 10 mL HCl. Apabila terjadi suatu perubahan warna merah, jingga atau kuning maka mengandung flavonoid (Nintiasari dan Ramadhani, 2022).

b. Uji tanin

Sampel diambil sebanyak 5 ml kemudian ditetes dengan FeCl_3 1%. Apabila terjadi suatu perubahan dengan munculnya warna biru kehitaman atau hijau kecokelatan maka mengandung tanin (Nintiasari dan Ramadhani, 2022).

c. Uji saponin

Sampel diambil sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutal HCl 2N sebanyak 5 mL. larutan didinginkan dan dikocok dengan kuat selama 30 detik. Apabila terbentuk busa yang tidak hilang selama 30 detik menyatakan bahwa adanya saponin (Nintiasari dan Ramadhani, 2022).

d. Uji alkaloid

Sampel diambil sebanyak 5 ml dan ditambahkan 1 ml HCl 2N lalu ditambahkan 10 ml air, campur dan panaskan dengan penangas selama 2 menit, didinginkan dan disaring kemudian dibagi menjadi 2 bagian dan dimasukkan kedalam 2 tabung reaksi. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih pada pereaksi mayer dan warna merah jingga pada pereaksi dragendrof (Nintiasari dan Ramadhani, 2022).

e. Uji fenol

Sampel diambil 3 ml dan ditambahkan aquadest panas kemudian didinginkan pada suhu ruang. Setelah dingin ditambahkan 5 tetes larutan NaCl 10% dan 3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Hasil positif ditunjukkan adanya perubahan warna menjadi warna hitam kebiruan/ hitam kehijauan (Nintiasari dan Ramadhani, 2022).

8. Penimbangan DPPH (0,4 mM)

Molaritas DPPH yang dibutuhkan adalah 0,4 mM = 0,0004 M (4×10^{-4} M)

BM (Berat Molekul) DPPH = 394,32 g/mol

Volume larutan = 100 ml = 0,1 liter

Penimbangan DPPH = BM DPPH x Vol larutan x Molaritas DPPH = 394,32 g/mol x

0,1 L x 0,0004 = 0,0157728 g → 15,8 mg

9. Pembuatan larutan DPPH (0,4 mM)

Larutan DPPH 0,4 mM dibuat dengan melarutkan 15,8 mg serbuk DPPH ke 100 mL etanol pa dalam labu. Larutan DPPH yang diperoleh selanjutnya diukur operating time dan panjang gelombang maksimumnya (Kurniawati dan Sutoyo, 2021).

10. Pengujian Aktivitas Antioksidan

a. Penentuan Panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 2 mL ditambahkan etanol pa pada labu ukur 10 mL kemudian didiamkan selama 30 menit ditempat gelap. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm untuk memperoleh absorbansi (Pamungkas *et al.*, 2017).

b. Penentuan Operating Time DPPH

Larutan kerja DPPH 0,4 mM sebanyak 2 mL lalu ad sampai 10 ml dengan etanol pa. Larutan tersebut kemudian dibaca absorbansinya pada panjang

gelombang yang telah diperoleh dengan interval 1 menit sampai diperoleh absorbansi yang paling stabil (Alifni *et al.*, 2017).

c. Penentuan absorbansi blanko

Cara pembuatan larutan blanko dengan cara menambahkan larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 2 ml kemudian ditambahkan 2 ml etanol p.a ke dalam labu ukur 10 ml di aad sampai tanda batas, kemudian serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Susiloningrum dan Sari, 2021).

d. Pembuatan Larutan kuersetin sebagai pembanding

Kurva baku diawali dengan pembuatan larutan baku kuersetin 1000 ppm dengan cara menimbang sebanyak 10 mg kuersetin kemudian dilarutkan sebanyak 10 mL etanol p.a. Setelah itu larutan baku diencerkan menjadi larutan seri kadar dengan kadar 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm. Sebanyak 2 mL larutan DPPH, ditambahkan 2 ml larutan standar kuersetin kemudian ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 10 ml, lalu diinkubasi di tempat yang gelap selama operating time yang didapatkan, setelah itu pembacaan absorbansi seri kadar menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan gelombang maksimum (Susiloningrum dan Sari, 2021).

e. Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak kulit buah naga merah dan kulit buah naga putih

Ekstrak kulit buah naga merah dan ekstrak kulit buah naga putih diambil masing-masing sebanyak 10 mg dilarutkan 10 mL etanol sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Larutan ekstrak kulit buah naga merah diencerkan dengan berbagai seri kadar 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4ppm dan 5 ppm. Masing-masing konsentrasi pada setiap konsentrasi diambil 2 mL dimasukkan kedalam labu ukur,

lalu ditambahkan 2 mL DPPH 0,4 mM dan ditambahkan etanol p.a pada labu ukur 10 ml, kemudian diinkubasi selama operating time dan gelombang maksimum yang didapatkan. Kemudian masing-masing kadar seri konsentrasi diukur nilai absorbansinya pada gelombang maksimum (Nintiasari dan Ramadhani, 2022).

F. Analisa data

Data yang diperoleh berupa nilai absorbansi dari ekstrak kulit buah naga merah dan kulit buah naga putih serta pembanding kuersetin, kemudian dihitung persentase aktivitas antioksidannya dengan rumus :

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Absorban kontrol} - \text{absorban sampel}}{\text{absorban kontrol}} \times 100$$

Keterangan :

Absorbansi kontrol : absorbansi DPPH

Absorbansi sampel : absorbansi ekstrak kulit buah naga putih, ekstrak kulit buah naga merah dan pembanding kuersetin.

Setelah mendapatkan persentase dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier (x,y) untuk mendapatkan nilai IC₅₀ dimana x sebagai konsentrasi (ppm) dan y sebagai persentasi inhibisi (%) IC₅₀ sampel dan pembanding diperoleh dengan rumus:

$$Y = Bx + A$$

Nilai IC₅₀ didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50.

Selanjutnya hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak (ppm) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % peredaman (antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu Y). Data absorbansi yang diperoleh dibuat persamaan regresi linear yang menyatakan hubungan antara konsentrasi bahan uji (x) dengan aktivitas antioksidan rata-rata (y) dari suatu seri replikasi pengukuran sehingga diperoleh harga IC₅₀ yaitu konsentrasi bahan uji yang diperlukan untuk menangkap 50% radikal DPPH (Seta Rikantara *et al.*, 2022).

Analisis data yang diperoleh dari uji aktivitas antioksidan ekstrak kulit buah naga merah dan ekstrak kulit buah naga putih dianalisis menggunakan program SPSS dengan uji oneway ANOVA. Namun, langkah pertama yang dilakukan adalah uji normalitas terlebih dahulu untuk mengetahui data yang diperoleh telah berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas menggunakan uji Shapiro Wilk karena sampel kurang dari 50, suatu data yang dikatakan berdistribusi normal dengan nilai signifikan $>0,05$ (Suardi, 2019).