

## Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana*)

Nurhayati Bialangi<sup>1</sup>, Ulin Sahami<sup>1</sup>, Weny J.A. Musa<sup>1\*</sup>, Wiwin R. Kunusa<sup>1</sup>, La Ode Aman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kimia, Universitas Negeri Gorontalo, Jl. Prof. Ing. B. J Habibie, Gorontalo, 96554

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder serta mengetahui aktivitas antioksidan yang terkandung dalam ekstrak etil asetat daun *Z. mauritiana*. Tahap isolasi diawali dengan ekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etil asetat. Selanjutnya, uji fitokimia menunjukkan ekstrak etil asetat positif mengandung flavonoid, tanin dan terpenoid. Proses pemisahan dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan campuran eluen n-heksana : etil asetat (9:1 dan 8:2) dilanjutkan dengan kromatografi kolom. Fraksi-fraksi yang diperoleh dilakukan proses pemurnian menggunakan metode rekristalisasi. Isolat nomor 14 diduga murni berupa kristal jarum berwarna hijau kekuningan sebanyak 4,5 mg. Kemudian diuji kemurnian menggunakan KLT dua dimensi dengan eluen pertama n-heksana : etil asetat (8:2) dan eluen kedua kloroform : metanol (9:1) diperoleh satu bercak noda tunggal. Spektrum UV-Vis menunjukkan adanya gugus kromofor tak jenuh C=C (251 nm) dan kromofor C=O (283 nm). Sedangkan, spektrum IR menunjukkan adanya gugus ulur OH gugus, ulur C–H alifatik, gugus tekuk C–H, gugus fungsi C=O, C=C dan gugus fungsi ulur C–O. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa kemampuan reduktif dari ekstrak daun *Z. mauritiana* yang berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan standar vitamin C. Ekstrak daun *Z. mauritiana* memiliki aktivitas lebih rendah ( $IC_{50}$  489.9936  $\mu\text{g/ml}$ ) dibandingkan dengan standar vitamin C.

**Kata kunci:** *Z. mauritiana*; etil asetat ; antioksidan

### ABSTRACT

This study aims to isolate and identify secondary metabolites and to determine the antioxidant activity contained in the ethyl acetate extract of *Z. mauritiana* leaves. The isolation stage begins with maceration extraction using ethyl acetate as solvent. Furthermore, the phytochemical test showed that the ethyl acetate extract was positive for flavonoids, tannins and terpenoids. The separation process was carried out using thin layer chromatography with a mixture of n-hexane : ethyl acetate (9:1 and 8:2) eluent followed by column chromatography. The obtained fractions were purified using the recrystallization method. Isolate number 14 was suspected to be pure in the form of 4.5 mg yellowish green needle crystals. Then tested for purity using two-dimensional TLC with the first eluent n-hexane : ethyl acetate (8:2) and the second eluent chloroform : methanol (9:1) obtained one single spot. The UV-Vis spectrum showed the presence of an unsaturated chromophore C=C (251 nm) and a C=O chromophore (283 nm). The IR spectrum shows the presence of OH stretching groups, aliphatic C-H stretching groups, C-H bending groups, C=O, C=C functional groups and C-O stretching functional groups. The results of the antioxidant activity test showed that the reductive ability of the *Z. mauritiana* leaf extract was significantly different when compared to the standard vitamin C. The *Z. mauritiana* leaf extract had lower activity ( $IC_{50}$  489.9936  $\mu\text{g/ml}$ ) than the standard vitamin C.

**Keywords:** *Z. mauritiana*; ethyl acetate; antioxidant

Received: 14-01-2022, Accepted: 27-03-2023, Online: 30-04-2023

\*Corresponding author:  
weny@ung.ac.id

## PENDAHULUAN

Secara harfiah bahan alam dapat diartikan sebagai bahan-bahan yang bersumber dari alam (*natural resources*). Dalam bidang-bidang ilmu terkait kimia organik, farmasi dan ilmu pangan bahan alam didefinisikan sebagai komponen atau substansi kimia yang merupakan metabolit sekunder dapat berupa komponen tunggal/murni hasil isolasi maupun campuran dalam bentuk ekstrak atau sediaan kering yang bersumber dari makhluk hidup baik tumbuhan, hewan (terutama hewan laut), maupun mikroorganisme yang dieksplorasi dan dimanfaatkan karena aktivitas biologis (Nugroho, 2017).

Penggunaan bahan alam di Indonesia sebagai obat-obatan mulai meningkat seiring dengan perkembangan zaman, bahkan telah banyak diproduksi dalam skala besar. Masyarakat menilai bahwa obat tradisional memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan dengan obat-obatan modern. Salah satu bahan alam yang banyak dimanfaatkan untuk obat adalah tanaman bidara. Di India masyarakat memanfaatkan bidara sebagai obat diare, kencing manis, demam dan malaria. Sementara itu, di Negeri Jiran kulit kayu bidara dimanfaatkan untuk mengobati sakit perut dan daunnya dipercaya dapat mengatasi masalah kecantikan seperti jerawat, keriput dan lingkaran hitam pada bawah mata (Roosevelt & Ghari, 2018).

Terdapat berbagai jenis tanaman bidara, diantaranya bidara arab (*Ziziphus spina-christi* L.) (Pratama dkk., 2019), bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Hallier f.) (Noviasari, 2017) dan bidara laut (*Ziziphus mauritiana* L.) (Jannah, 2018). Tanaman bidara berpotensi sebagai antioksidan, antidiabetes, antiinflamasi, antimikroba, antikanker, antiplasmodial, hemolitik, obat penenang, ansiolitik dan analgesik (Talmale dkk., 2014). Menurut Al Ghasham dkk. (2017) hasil skrining fitokimia ekstrak daun bidara mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, fenol, kuinon, saponin, terpenoid dan tannin. Hal ini juga sesuai dengan hasil penelitian Bintoro dkk., (2017) bahwa daun bidara mengandung senyawa saponin dan triterpenoid. Sedangkan pada ekstrak kulit batang dan kulit akar bidara mengandung alkaloid, flavonoid dan tanin.

Tubuh manusia memiliki antioksidan alami didalamnya. Akan tetapi, antioksidan didalam tubuh ini jumlahnya tidak cukup untuk mengatasi semua radikal yang ada didalam tubuh sehingga diperlukan antioksidan dari luar tubuh yang dapat diperoleh dari alam (Samirana dkk., 2017). Senyawa antioksidan mempunyai berat molekul kecil tapi mampu menginaktivasi reaksi oksidasi dengan mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan elektronnya kepada senyawa radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Noviasari, 2017).

Bagian tanaman bidara yang memiliki kandungan sebagai antioksidan adalah daun. Daun bidara mengandung beberapa senyawa seperti flavonoid dan polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan didukung oleh penelitian sebelumnya Pratama dkk., (2019) bahwa ekstrak daun bidara yang diekstrak menggunakan etanol, kloroform, etil asetat, n-butanol dan n-heksana dapat menarik senyawa-senyawa seperti flavonoid, terpenoid, alkaloid dan saponin. Sementara penelitian Jain dkk., (2019) mengatakan kemampuan ekstrak etil asetat daun bidara dalam menghambat radikal bebas (% inhibisi) sebesar  $86,26 \pm 1,98\%$  dengan nilai  $IC_{50}$   $29,29 \pm 1,02$  tergolong kuat.

Berdasarkan fakta diatas, kajian ilmiah tentang kandungan metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan dari tanaman *Ziziphu mauritiana* khususnya bagian daun yang berasal dari daerah Gorontalo masih kurang, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengisolasi dan

mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder dan mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat daun *Ziziphus mauritiana* dengan metode DPPH. Penelitian ini diharapkan memperoleh data sehingga menjadi sumber informasi yang sangat bermanfaat untuk dikembangkan dalam bidang kimia dan farmakologi.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan alam yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bidara yang diambil di Kelurahan Kayumerah, Kecamatan Limboto, Kabupaten Gorontalo. Bahan kimia seperti etil asetat, n-heksana, metanol, etanol 96%, kloroform, asam asetat anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, FeCl<sub>3</sub> 1%, NaOH, HCl pekat, serbuk Mg, aquadest, pereaksi Wagner, pereaksi Lieberman-Burchard, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendroff, pereaksi Hager, silika gel (GF<sub>254</sub>), DPPH, asam askorbat (vitamin C), kertas saring, kapas dan aluminium foil.

### Alat

Peralatan yang digunakan adalah seperangkat alat kaca, maserasi, redistilasi, kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis. Neraca analitik, *vacuum rotary evaporator*, oven, penangas air, spektrofotometer UV-Vis (UV-Vis Thermo Aquamed 8000) dan FTIR (Thermo Scientific Nicolet).

### Prosedur Kerja

Sebelum melakukan tahap preparasi sampel terlebih dahulu dilakukan uji determinasi tanaman bidara yang bertujuan untuk mengetahui kebenaran dari jenis tanaman yang digunakan dalam penelitian dan untuk menghindari kesalahan dalam mengumpulkan bahan serta tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi, Jurusan Biologi, Universitas Negeri Gorontalo.

Daun bidara yang telah kering sebanyak 1200 gram dihaluskan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk kasar. Kemudian, sebanyak 400 gram sampel dimaserasi dengan pelarut etil asetat pada suhu ruang. Selama 3 × 24 jam. Setiap 24 jam dilakukan pengadukan, ekstrak disaring dan residunya dimaserasi kembali dengan pelarut etil asetat yang baru. Maserat etil asetat dievaporasi pada suhu paling tinggi 40°C menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental etil asetat. Selanjutnya, dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder.

Pemisahan dan pemurnian dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan berbagai variasi perbandingan untuk mencari eluen yang sesuai (*trial and error*). Setelah itu, pemisahan dilanjutkan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel sebanyak 16 gram dicampurkan dengan pelarut n-heksan sehingga terbentuk seperti bubur dan dimasukkan perlahan-lahan ke dalam kolom. Ekstrak kental etil asetat ± 2 gram dicampurkan dengan sedikit demi sedikit silika gel sebanyak 4 g sampai campuran tersebut kering seperti serbuk, kemudian dimasukkan ke dalam kolom. Setelah itu, mulai mengelusi menggunakan pelarut n-heksan 100%, dilanjutkan n-heksan banding etil asetat (9:1) sampai pada perbandingan etil asetat banding metanol (9:1) hingga metanol 100%.

Fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom setelah menguap pelarutnya, dilakukan pemurnian dengan metode rekristalisasi untuk mendapatkan isolat murni. Kemudian, diuji kemurniannya menggunakan KLT 2 dimensi, fitokimia isolat, serta identifikasi senyawa menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan IR.

### Uji Aktivitas Antioksidan

Sebanyak 0,019 mg serbuk DPPH ditimbang dan dilarutkan dengan etanol 96% hingga 100 ml dalam labu ukur. Larutan DPPH disimpan dalam botol gelap kemudian diukur panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometri UV- Vis. Standar antioksidan yang digunakan adalah vitamin C. Sebanyak 0,0049 gram vitamin C dilarutkan dengan etanol 96% dan diencerkan menjadi seri konsentrasi 25, 50,100,200 dan 400 µg/mL. Begitupun dengan larutan ekstrak etil asetat diencerkan menjadi konsentrasi yang sama dengan vitamin C. Larutan standar vitamin C dan ekstrak yang telah ditambahkan larutan DPPH dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

### Perhitungan Persen Inhibisi dan $IC_{50}$

Setelah diperoleh nilai absorbansi ekstrak etil asetat dari masing-masing konsentrasi, nilainya dimasukkan kedalam persamaan 1.

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi sampel})}{(\text{Absorbansi Kontrol})} \times 100 \quad (1)$$

Hasil perhitungan % inhibisi disubstitusikan ke dalam persamaan 2.

$$y = ax + b \quad (2)$$

dimana, konsentrasi ekstrak sebagai sumbu (x) dan nilai % inhibisi sebagai sumbu (y). Pada saat % Inhibisi = 50, maka untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  menggunakan persamaan 3.

$$50 = ax + b$$

$$x = \frac{50 - b}{a} \quad (3)$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel daun bidara segar telah dilakukan uji determinasi di Laboratorium Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Gorontalo dengan No. 021/UN47.B4.Bio.Lab Bio/ LL/2022. Hasil determinasi tanaman menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah daun bidara dengan nama latin *Ziziphus mauritiana*.

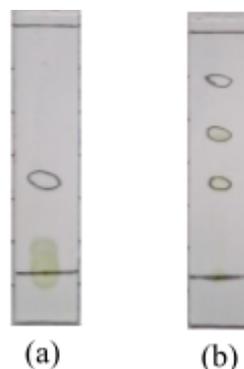
Hasil rendemen ekstrak kental etil asetat daun bidara diperoleh sebanyak 3,70 %. Ekstrak tersebut kemudian diuji fitokimia. Uji fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi secara kualitatif kandungan senyawa metabolit dengan cara direaksikan dengan beberapa reagen fitokimia. Rangkuman hasil uji fitokimia disajikan pada tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etil Daun *Z. mauritiana*

Uji	Pereaksi	Perubahan Warna	Hasil
Flavonoid	HCl pekat + Mg	Kuning kehijauan menjadi kuning kehitaman	Positif
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kuning kehijauan menjadi hijau	Positif
	NaOH	Kuning kehijauan menjadi kuning pucat	Positif
Alkaloid	Mayer	Kuning kehijauan menjadi oranye, tidak terdapat endapan putih	Negatif
	Dragendorff	Kuning kehijauan menjadi oranye tua, tidak terdapat endapan coklat	Negatif
	Wagner	Kuning kehijauan menjadi oranye tua, tidak terdapat endapan merah	Negatif
	Hager	Kuning kehijauan menjadi kuning pucat, tidak terdapat endapan kuning	Negatif
Saponin	Aquades panas	Kuning kehijauan, tidak terdapat busa stabil	Negatif
Tanin	FeCl <sub>3</sub> 1%	Kuning kehijauan menjadi hijau kehitaman	Positif
Terpenoid	Lieberman-Bouchar d+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kuning kehijauan menjadi hijau kehitaman, terdapat cincin jingga	Positif

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun bidara diduga mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid, tanin dan terpenoid. Hasil ini didukung oleh penelitian Jain dkk., (2019) dan Roosevelt & Ghari (2018), bahwa ekstrak etil asetat daun bidara mengandung sejumlah senyawa fenolik berupa flavonoid dan tanin. Begitu pula dengan hasil skrining fitokimia Agustina (2018) untuk fraksi etil asetat-air positif mengandung flavonoid dan tanin, dilengkapi dengan hasil skrining fitokimia Ambrin et al. (2020) yang mengatakan bahwa ekstrak etil asetat tanaman bidara mengandung senyawa terpenoid.

Pemisahan yang terbaik dalam KLT memiliki ciri yaitu terbentuknya bercak yang banyak dan terpisah dengan jelas (Kurniawati, 2018). Senyawa yang mempunyai Rf lebih besar berarti mempunyai kepolaran yang rendah, begitu juga sebaliknya. Hal tersebut dikarenakan fasa diam bersifat polar. Senyawa yang lebih polar akan tertahan kuat pada fasa diam, sehingga menghasilkan nilai Rf yang rendah. Jika Rf terlalu tinggi, maka yang harus dilakukan adalah mengurangi kepolaran eluen (Jannah, 2018). Hasil pemisahan menggunakan KLT dapat dilihat pada Gambar 1.

**Gambar 1.** Hasil pemisahan menggunakan KLT

Berdasarkan Gambar 1 diatas, diperoleh nilai Rf dari hasil kromatografi lapis tipis yang disajikan pada Tabel 2 berikut.

**Tabel 2.** Nilai Rf dari Dua Perbandingan Eluen

Eluen	Jumlah Noda	Harga Rf
n-heksan : etil asetat (9:1)	1	0,37
n-heksan : etil asetat (8:2)	3	0,37; 0,57; 0,8

Berdasarkan tabel 2 pada eluen pertama diperoleh 1 bercak noda dengan Rf 0,37 yang berada tidak jauh dari titik penotolan. Hal ini menandakan adanya senyawa yang bersifat polar yang tertahan pada fase diam silika gel. Tetapi jika dilihat pada plat KLT masih terdapat bercak noda hijau yang belum naik keatas. Oleh karena itu, plat KLT dielusi kembali dengan eluen yang berbeda menghasilkan 3 bercak noda yaitu Rf 0,37; 0,57 dan 0,8. Nilai Rf ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Maulana (2018) pada eluen kloroform : etanol : etil asetat (9:3:5) dan n-heksan : etil asetat (6:4) diperoleh nilai Rf masing-masing 0,30 dan 0,84 yang diduga adanya senyawa triterpenoid. Sedangkan, pada eluen n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) nilai Rf sebesar 0,56 diduga senyawa flavonoid.

Setelah diperoleh eluen yang cocok, ekstrak etil asetat dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi kolom. Kromatografi kolom merupakan suatu metode pemisahan yang didasarkan pada pemisahan daya absorpsi suatu absorben terhadap suatu senyawa. Hasil pemisahan kromatografi kolom diperoleh sebanyak 56 fraksi. Selanjutnya fraksi-fraksi tersebut diambil beberapa perwakilan berdasarkan warna-warna yang berbeda untuk diuji menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Pemilihan pemurnian difokuskan pada kelompok fraksi nomor 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 28, 29, 30. Dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan beberapa perbandingan fasa gerak diantaranya n-heksan : etil asetat (7:3). Profil kromatografi lapis tipis (KLT) hasil kromatografi kolom gravitasi disajikan dalam Gambar 2.

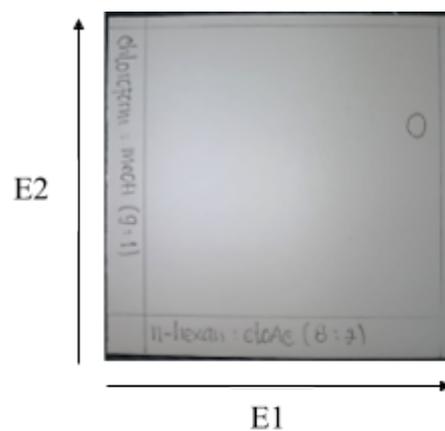


**Gambar 2.** Profil kromatografi KLT hasil kromatografi kolom gravitasi

Dari hasil analisis dengan teknik kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa jarak pemisahan yang terbentuk tergantung pada sifat polaritasnya. Senyawa yang bersifat

nonpolar dan sedikit polar bergerak paling jauh dari titik penotolan (dekat dengan *baseline* atas), sedangkan senyawa yang paling polar bergerak naik tidak jauh dari titik penotolan (dekat dengan *baseline* bawah) (Fauziah dkk., 2017). Fraksi yang memiliki faktor retensi (*R<sub>f</sub>*) sama digabungkan sehingga diperoleh 12 kelompok fraksi. Fraksi-fraksi tersebut kemudian dimurnikan dengan metode rekristalisasi menggunakan pelarut yang sesuai, biasanya di rekristalisasi dengan pelarut n-heksana terlebih dahulu. Kemudian dilarutkan sedikit dengan pelarut etil asetat dan dilakukan pemisahan kembali menggunakan KLT. Proses rekristalisasi ini dilakukan secara berulang kali tujuannya untuk mendapatkan isolat yang diduga murni. Setelah dilakukan beberapa kali rekristalisasi, maka yang diduga menjadi isolat murni adalah isolat nomor vial 14 dalam kelompok fraksi 6. Hasil rekristalisasi berupa kristal jarum berwarna hijau kekuningan sebanyak 4,5 mg.

Hasil isolat yang diduga murni diuji kemurniannya menggunakan KLT dengan sistem dua eluen. Eluen pertama yang digunakan n-heksana : etil asetat (8:2) dengan *R<sub>f</sub>* 0,6 dan eluen kedua kloroform : metanol (9:1) dengan *R<sub>f</sub>* 0,9. Bercak noda tunggal dengan *R<sub>f</sub>* 0,6 diperkuat oleh hasil penelitian Maulana (2018) yang juga memperoleh *R<sub>f</sub>* 0,65 pada eluen kloroform : etanol : etil asetat (9:3:5) diduga karena adanya senyawa triterpenoid. Hasil KLT dua dimensi dapat dilihat pada gambar 3.



**Gambar 3.** Hasil KLT dua dimensi

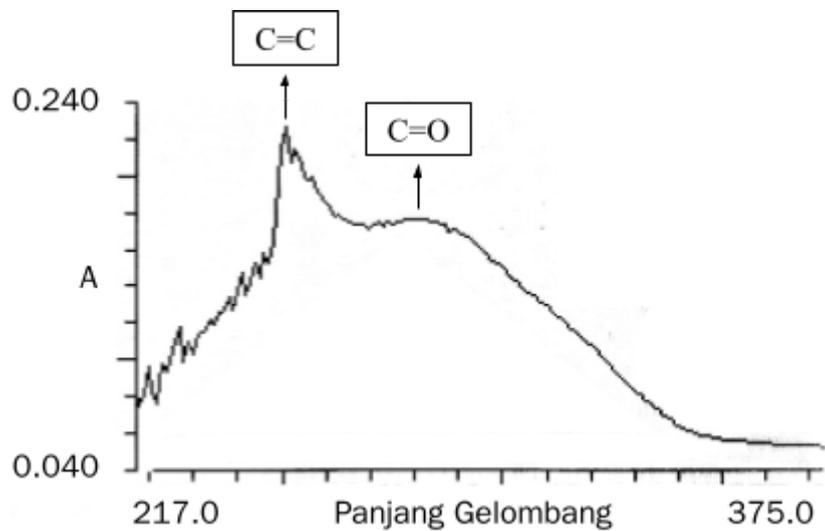
Uji fitokimia isolat 14 diperoleh hasil positif dengan terbentuknya cincin coklat atau violet (tabel 3). Oleh karena itu, isolat 14 diduga mengandung senyawa terpenoid. Hasil fitokimia ini sesuai dengan penelitian Ads dkk., (2018) dan Samirana dkk., (2017) yang mengatakan bahwa ekstrak dan fraksi etil asetat genus *Ziziphus* positif mengandung senyawa terpenoid.

**Tabel 3.** Hasil Uji Fitokimia Isolat 14

Uji	Pereaksi	Pengamatan	Hasil	Dokumentasi
Terpenoid	Kloroform, Asam asetat Anhidrat, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Pekat	Terjadi pembentukan cincin coklat atau violet	Positif	

Analisis senyawa isolat 14 dilanjutkan menggunakan spektrofotometer UV-Vis Thermo Aquamed 8000 (pada daerah UV panjang gelombang 217-375 nm) untuk penentuan

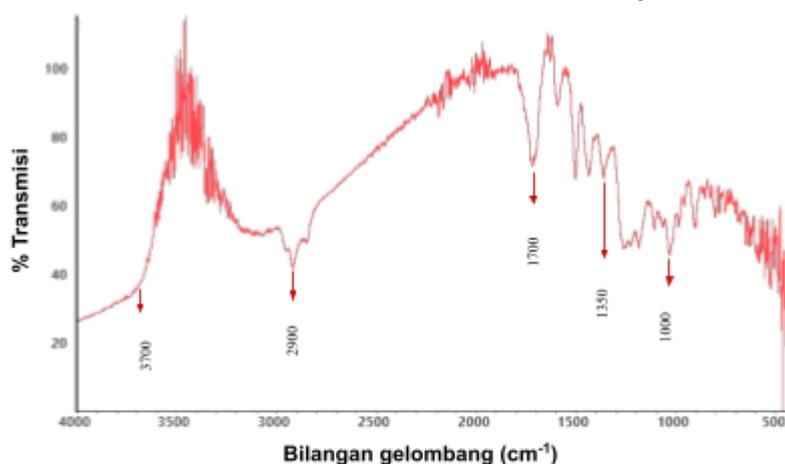
gugus-gugus kromofor berdasarkan panjang gelombang tertentu. Hasil uji spektrofotometer UV-Vis terhadap isolat nomor 14 dapat dilihat pada gambar 4.



**Gambar 4.** Hasil uji spektrofotometer UV-Vis terhadap isolat nomor 14

Berdasarkan analisis spektrofotometer UV-Vis diperoleh serapan maksimum pada panjang gelombang 251 nm yang mengindikasikan bahwa terjadi transisi elektron dari  $\pi \rightarrow \pi^*$  karena adanya gugus kromofor tak jenuh C=C dengan ikatan rangkap yang terkonjugasi. Hasil ini didukung oleh penelitian Rokhmania & Hidajati (2020) pada panjang gelombang 253 nm mengindikasikan adanya ikatan rangkap C=C yang terkonjugasi. Serapan selanjutnya dapat dilihat pada panjang gelombang 283 nm diduga diakibatkan oleh transisi elektron  $n \rightarrow \pi^*$  karena adanya suatu kromofor C=O (Sudjaji, 1985 dan Yadav dkk., 2014). Oleh karena itu, dari hasil analisis tersebut dapat diduga bahwa isolat nomor 14 mengandung senyawa terpenoid.

Spektrofotometer inframerah mengukur penyerapan radiasi IR yang dibuat oleh setiap ikatan dalam molekul, hasilnya berupa spektrum yang biasanya dinyatakan sebagai % transmisi terhadap bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ). Hasil analisis dengan spektrofotometer IR Perkin Elmer (berkisar antara 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ ) dapat dilihat pada gambar 5.



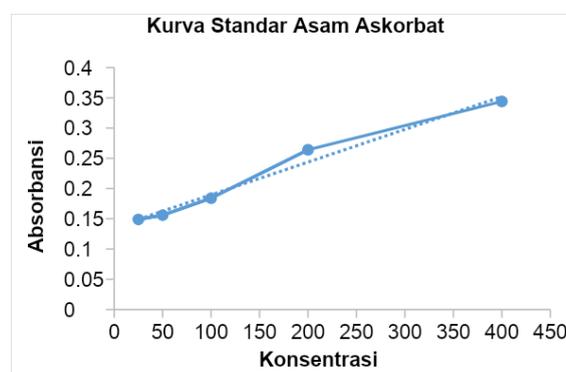
**Gambar 5.** Hasil analisis dengan spektrofotometer IR

Hasil spektrum inframerah dari isolat (bilangan gelombang, bentuk pita, intensitas, dan kemungkinan gugus fungsi) disajikan dalam tabel 4.

**Tabel 4.** Interpretasi Data Spektrum IR Isolat 14

Isolat	Bilangan Gelombang ( $cm^{-1}$ )					Intensitas	Kemungkinan Gugus Fungsi
	Fessenden (1986)	Supratman (2010)	Silverstein dkk. (2005)	(Samirana dkk., 2017)	(Rokhmani a & Hidajati, 2020)		
3700	3700-3000	3800-2700	3700-3200	3442	3468	Kuat	O–H
2900	3000-2800	2926-2853	2830-2695	2949	3074	Kuat	C–H
1700	1820-1640	1900-1500	1870-1540	1697	1686	Medium	C=O
1500	1700-1600	1700-1500	1900-1500	1544	1642	Medium	C=C
1350	1385-1360	1500-1300	1420-1330	1382	1452	Medium	C–H
1000	1260-1050	1300-800	1300-1100	1292	1360	Kuat	C–O

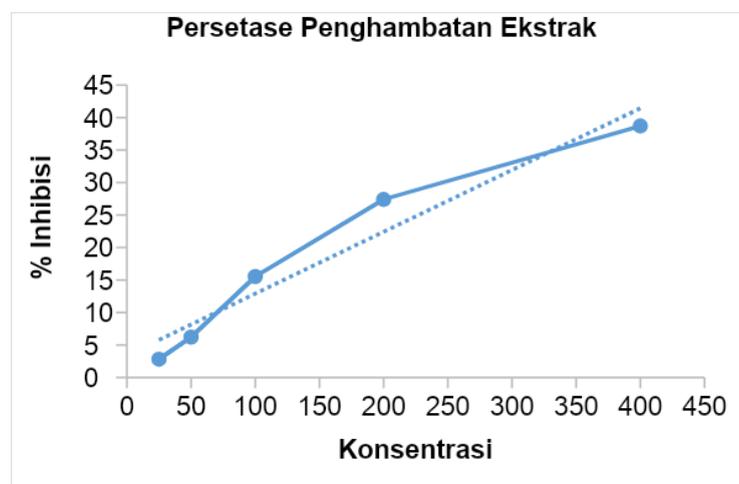
Berdasarkan data interpretasi spektrum inframerah isolat 14 yang diduga merupakan senyawa terpenoid menunjukkan adanya pita serapan melebar dengan intensitas kuat pada daerah bilangan gelombang  $3700\text{ cm}^{-1}$  yang disebabkan adanya gugus ulur OH. Dugaan ini diperkuat oleh Fessenden (1986) dan Silverstein dkk. (2005) pada masing-masing bilangan gelombang  $3700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  dan  $3700\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ . Pada pita serapan kedua tajam dengan intensitas kuat bilangan gelombang  $2900\text{ cm}^{-1}$ , diduga adanya gugus ulur C–H alifatik ( $-\text{CH}_3$  *stretching*) yang tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Samirana dkk. (2017) pada bilangan gelombang  $2949\text{ cm}^{-1}$  dan Rokhmania & Hidajati (2020) bilangan gelombang  $3074\text{ cm}^{-1}$ . Selain itu, pada daerah bilangan gelombang  $1350\text{ cm}^{-1}$  disebabkan adanya serapan gugus tekuk C–H ( $-\text{CH}_3$  *bending*), bilangan gelombang  $1700\text{ cm}^{-1}$  dan  $1500\text{ cm}^{-1}$  pita serapan tajam dengan intensitas sedang diduga adanya gugus fungsi C=O dan C=C. Sedangkan, pada daerah sidik jari dengan bilangan gelombang  $1000\text{ cm}^{-1}$  mengindikasikan gugus fungsi ulur C–O. Bilangan gelombang untuk gugus fungsi C=O, C=C dan C–O didukung oleh Samirana dkk. (2017) dan Rokhmania & Hidajati (2020) yang juga memperoleh hasil tidak jauh berbeda.



**Gambar 6.** Kurva standar asam askorbat

Prinsip dari metode DPPH adalah interaksi senyawa-senyawa antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron pada DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Uji aktivitas antioksidan ini dilakukan secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{max}$ ) DPPH diperoleh 518 nm dengan absorbansi blanko sebesar 0.354. Pada penelitian ini menggunakan asam askorbat (Vitamin C) sebagai antioksidan standar untuk pembuatan kurva standar. Asam askorbat telah terbukti menjadi antioksidan yang efektif oleh karena itu digunakan sebagai perbandingan (Maesaroh dkk., 2018).

Pada gambar 6 diperoleh persamaan garis linier vitamin C, yaitu  $y = 0,0005x + 0,1266$  dengan koefisien korelasi (R) adalah 0,9802 yang menyatakan bahwa variasi konsentrasi dengan absorbansi mempunyai hubungan erat.



**Gambar 7.** Persentase penghambat ekstrak

Hasil persamaan garis linier ekstrak daun *Z. mauritiana* (Gambar 6) diperoleh  $y = 0,0951x + 3,4016$  dengan koefisien korelasi (R) adalah 0,942. Hasil ini menunjukkan kemampuan reduktif dari ekstrak daun *Z. mauritiana* yang berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan standar vitamin C. Ekstrak etil asetat daun *Ziziphus mauritiana* menunjukkan aktivitas antioksidan lemah dengan nilai  $IC_{50}$  489.9936  $\mu g/ml$  yang berarti kemampuan ekstrak dalam menghambat atau mereduksi radikal bebas DPPH tergolong rendah karena nilai  $IC_{50} > 150$  ppm (Haeria dkk., 2016). Dengan demikian, hasil yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun *Z. mauritiana* secara nyata memiliki kemampuan reduktif terendah dibandingkan dengan standar vitamin C. Hasilnya berbeda jauh dengan penelitian sebelumnya oleh Jain dkk. (2019) dan Samirana dkk. (2016) yang mengatakan baik ekstrak etil asetat maupun fraksi etil asetat *Z. mauritiana* memiliki aktivitas antioksidan kuat.

Sifat biologis dan antioksidan dalam ekstrak daun *Z. mauritiana* yang berbeda dapat dikaitkan dengan polaritas dan sifat pelarut ekstraksi serta konstituen kimia yang diekstraksi (Ashraf dkk., 2015). Aktivitas antioksidan yang lemah ini antara lain disebabkan karena senyawa aktif yang terekstrak bukanlah merupakan senyawa murni antioksidan, dan diduga masih mengandung senyawa lainnya yang bertindak bukan sebagai antioksidan (Kuntari dkk., 2017). Selain itu, DPPH sensitif terhadap beberapa basa Lewis dan jenis pelarut serta

oksigen. DPPH hanya dapat larut dalam pelarut organik, dan gangguan absorbansi dari senyawa sampel dapat menjadi masalah untuk analisis kuantitatif (Kedare & Singh, 2011).

## SIMPULAN

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun *Z. mauritiana* mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, tanin dan terpenoid. Hasil rekristalisasi diambil fraksi nomor 14 berupa kristal jarum berwarna hijau kekuningan. Sedangkan, hasil uji kemurnian isolat nomor 14 menampakkan satu bercak noda tunggal pada KLT dua dimensi dengan eluen pertama n-heksana : etil asetat (8:2) dan eluen kedua kloroform : metanol (9:1). Spektrum UV-Vis menunjukkan adanya gugus kromofor tak jenuh C=C (251 nm) dan kromofor C=O (283 nm). Sedangkan, spektrum IR menunjukkan adanya gugus ulur OH, gugus ulur C–H alifatik, gugus tekuk C–H, gugus fungsi C=O, C=C dan gugus fungsi ulur C–O. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa kemampuan reduktif dari ekstrak daun *Z. mauritiana* yang berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan standar vitamin C. Ekstrak daun *Z. mauritiana* memiliki aktivitas lebih rendah ( $IC_{50}$  489.9936  $\mu g/ml$ ) dibandingkan dengan standar vitamin C.

## DAFTAR RUJUKAN

- Ads, E. N., Rajendrasozhan, S., Hassan, S. I., Sharawy, S. M. S., & Humaidi, J. R. (2018). Phytochemical Screening of Different Organic Crude Extracts from The Stem Bark of *Ziziphus spina-christi* (L.). *Biomedical Research*, 29(8), 1645–1652.
- Agustina, W. (2018). *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol, Fraksi n-Heksana, Etil Asetat dan Air dari Daun Bidara (Ziziphus mauritiana Lamk.) terhadap Salmonella typhi ATCC 13311*. Universitas Setia Budi.
- Al Ghasham, A., Al Muzaini, M., Qureshi, K. A., Elhassan, G. O., Khan, R. A., Farhana, S. A., Hashmi, S., El-Agamy, E., & Abdallah, W. E. (2017). Phytochemical Screening, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extract of *Ziziphus mauritiana* Lam. Leaves Collected from Unaizah, Saudi Arabia. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 6(3), 33–46.
- Ambrin, Dastagir, G., Jehan, B., & Adil, M. (2020). Antimicrobial and Phytochemical Evaluation of *Ziziphus mauritiana* var. *spontanea* Edgew. and *Oenothera biennis* L. *Pakistan Journal Zoological*, 52(5), 1810–1815.
- Ashraf, A., Sarfraz, R. A., Anwar, F., Shahid, S. A., & Alkharfy, K. M. (2015). Chemical Composition and Biological Activities of Leaves of *Ziziphus mauritiana* L. Native to Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 47(1), 367–376.
- Bintoro, A., Ibrahim, A. M., & Situmeang, B. (2017). Analisis dan Identifikasi Senyawa Saponin Dari Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana* L.). *Jurnal ITEKIMA*, 2(1), 84–94.
- Fauziah, E. D., Bialangi, N., & Musa, W. J. A. (2017). Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Aktif Terhadap Mortalitas Kutu Beras dari Ekstrak Etil Asetat Rimpang Jeringau (*A corus calammus* L.). *Jurnal Entropi*, 12(1), 25–32.
- Fessenden, R. J., & Fessenden, J. S. (1986). *Kimia Organik Edisi Tiga Jilid 1* (T. A. H. Pudjaatmaka (ed.)). Erlangga.
- Haeria, Hermawati, & Dg. Pine, A. T. U. (2016). Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.). *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*, 1(2), 57–61.
- Jain, P., Haque, A., Islam, T., Alam, A., & Mahmud, H. (2019). Comparative Evaluation of *Ziziphus mauritiana* Leaf Extracts for Phenolic Content, Antioxidant and Antibacterial

- Activities. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 0(0), 1–23.
- Jannah, M. (2018). *Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak dan Fraksi Daun Bidara Laut (Ziziphus Mauritiana L.) terhadap Sel Kanker Payudara (T47D) Melalui Metode MTT*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *Journal Food Scientists & Technologists*, 48(4), 412–422.
- Kuntari, Z., Sumpono, & Nurhamidah. (2017). Aktivitas Antioksidan Metabolit Sekunder Bakteri Endofit Akar Tanaman Moringa oleifera L (Kelor). *Jurnal Pendidikan Dan Ilmu Kimia*, 1(2), 80–84.
- Kurniawati, R. (2018). *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol, Fraksi n-Heksana, Etil Asetat, dan Air dari Buah Bidara (Ziziphus mauritiana Lamk.) terhadap Staphylococcus aureus ATCC 25923*. Universitas Setia Budi.
- Maesaroh, K., Kurnia, D., & Al Anshori, J. (2018). Perbandingan Metode Uji Aktivitas Antioksidan DPPH, FRAP dan FIC Terhadap Asam Askorbat, Asam Galat dan Kuersetin. *Chimica et Natura Acta*, 6(2), 93–100.
- Maulana, M. (2018). *Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Daun Bidara Arab (Ziziphus spina cristi. L) Berdasarkan Variasi Pelarut*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Noviasari, R. W. (2017). *Uji Aktivitas Antioksidan dan Antidiabetik dari Fraksi Ekstrak Daun Bidara Upas (Merremia mammosa (Lour.) Hallier f.)*. Universitas Jember.
- Nugroho, A. (2017). Buku Ajar: Teknologi Bahan Alam. In *Lambung Mangkurat University Press*. Lambung Mangkurat University Press.
- Pratama, I. P., Aji, N., & Yulia, N. (2019). Pengaruh Campuran Pelarut Etil Asetat dan N-Heksana terhadap Rendemen dan Kandungan Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Bidara Arab (Ziziphus sphina-christi L). *Jurnal Pharmacoscript*, 2(1), 1–8.
- Rokhmania, S. N., & Hidajati, N. (2020). Isolasi Senyawa Fenolik dari (Ziziphus Mauritiana Lamk) dan Uji Aktivitasnya sebagai Antijamur Candida Albicans. *UNESA Journal of Chemistry*, 9(1), 9–16.
- Roosevelt, A., & Ghari, A. L. G. I. S. (2018). Identifikasi Senyawa Kimia Daun Bidara (Ziziphus mauritiana Lam) dari Kabupaten Timor Tengah Selatan Provinsi NTT secara Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Kolom. *Jurnal Farmasi Sandi Karsa*, 4(7), 1–6.
- Samirana, P. O., Putra, P. A. S., & Leliqia, N. P. E. (2017). Uji Penangkapan Radika 2,2-Difenil-1-Pikrihidrazil dan Profil Bioautografi Ekstrak Etanol Kulit Batang (Ziziphus mauritiana Auct. non Lamk.). *Jurnal Farmasi Udayana*, 6(1), 55.
- Samirana, Putu Oka, Susidarti, R. A., & Rohman, A. (2017). Isolation and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging Activity of Active Compound from Jujube Tree (Zizyphus mauritiana Auct. non Lamk.). *International Journal of Food Properties*, 1–18.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (Seventh Ed). JOHN WILEY & SONS.
- Sudjaji. (1985). *Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Balai Aksara-Yudistira.
- Supratman, U. (2010). *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*. Widya Padjajaran.
- Talmale, S. A., Bhujade, A. M., & Patil, M. B. (2014). Phytochemical Analysis of Stem Bark and Root Bark of Zizyphus Mauritiana. *International Journal Of Innovative Science, Engineering & Technology*, 1(4), 526–535.
- Yadav, N., Yadav, R., & Goyal, A. (2014). Chemistry of Terpenoids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 27(45), 272–278.