



**PENENTUAN PROFIL BIOAUTOGRAFI DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN
EKSTRAK ETANOL DAUN BIDARA (*Ziziphus mauritiana* Auct. non Lamk.)
DENGAN METODE PENANGKAPAN RADIKAL DPPH**

Samirana, P. O.¹, Taradipta, I. D. M. R.¹, Leliqia, N. P. E.¹

¹Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Korespondensi: Putu Oka Samirana

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 0361-703837

Email: oka_samirana@unud.ac.id

ABSTRAK

Bidara atau yang dikenal dengan bahasa latin *Ziziphus mauritiana* Lam. telah diketahui memiliki beberapa aktivitas, diantaranya adalah aktivitas hepatoprotektif, antidiabetes, imunomodulator dan antioksidan. Selain itu terdapat penelitian yang melaporkan bahwa ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* memiliki aktivitas adaptogenik. Suatu teori menyatakan bahwa aktivitas antioksidan berkontribusi terhadap aktivitas adaptogenik yang dimiliki oleh suatu tanaman. Sehingga pada penelitian ini akan dilakukan uji antioksidan ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* serta penentuan profil bioautografi dengan KLT.

Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* memiliki aktivitas antioksidan dengan IC_{50} sebesar $59,52 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$. Dibandingkan dengan vitamin C yang memiliki nilai IC_{50} sebesar $2,73 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah. Hasil profil bioautografi menunjukkan bercak ke-4 dan 10 pada uji flavonoid, bercak ke-12 dan 15 pada uji saponin serta bercak ke-10 pada uji triterpenoid diduga memiliki aktivitas antioksidan.

Kata Kunci: *Ziziphus mauritiana*, Daun, Ekstrak Etanol, *Swimming Endurance Test*, Adaptogenik

ABSTRACT

Bidara or known by the Latin *Ziziphus mauritiana* Lam. has been known to have several activities, including hepatoprotective activity, antidiabetes, immunomodulators, and antioxidants. In addition, there are studies that report that the ethanol extract of *Z. mauritiana* leaves has adaptogenic activity. A theory suggests that antioxidant activity contributes to the adaptogenic activity possessed by a plant. So in this research will be tested the antioxidant extract ethanol leaves *Z. mauritiana* and the determination of bioautography profile with TLC.

The results showed that ethanol extract of *Z. mauritiana* leaf had antioxidant activity with IC_{50} of $59,52 \pm 1,2 \mu\text{g} / \text{mL}$. Compared with vitamin C which has an IC_{50} value of $2.73 \pm 0.05 \mu\text{g} / \text{mL}$, the ethanol extract of *Z. mauritiana* leaves has lower antioxidant activity. The bioautographic profile results show the 4th and 10th spots on the flavonoid test, the 12th and 15th spots on the saponin test and the 10th spot on the triterpenoid test alleged to have antioxidant activity.

Keywords: *Ziziphus mauritiana*, Leaf, Ethanolic Extract, *Swimming Endurance Test*, Adaptogenic

1. PENDAHULUAN

Bidara atau yang dikenal dengan bahasa latin *Ziziphus mauritiana* Lam. telah diketahui memiliki beberapa aktivitas, diantaranya adalah aktivitas hepatoprotektif, antidiabetes, imunomodulator dan antioksidan (Dahiru *et al.*, 2007; Bhatia *et al.*, 2010; Mishra and Bhatia, 2010; Perumal *et al.*, 2012). Selain itu Samirana dkk. (2015) melaporkan bahwa ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* memiliki aktivitas adaptogenik.

Aktivitas adaptogenik dari suatu tanaman didukung oleh beberapa golongan senyawa tertentu. Panossian *et al.* (1999) berpendapat bahwa senyawa dalam tanaman yang memiliki sifat adaptogenik terdiri dari tiga golongan senyawa yaitu triterpen, fenilpropanoid dan oksilipin. Senyawa golongan fenol termasuk fenilpropanoid pada tanaman adaptogen (misalnya flavonoid dan lignan) disintesis dari tirosin, secara struktural mirip dengan katekolamin (Vinod and Shivakumar, 2012; Panossian and Wikman, 2010). Senyawa golongan fenilpropanoid memiliki aktivitas antioksidan (Korkina, 2007), sehingga kemungkinan yang berkontribusi terhadap aktivitas adaptogenik adalah senyawa antioksidan.

Beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa daun *Z. mauritiana* memiliki aktivitas antioksidan. Perumal *et al.* (2012) melaporkan ekstrak metanol daun dari *Z. mauritiana* diketahui memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar $21,40 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ bila dibandingkan dengan standar BHT yang memiliki nilai IC_{50} sebesar $18,50 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$. Abalaka *et al.* (2011) juga melaporkan ekstrak etanol dan ekstrak heksan daun *Z. mauritiana* memiliki aktivitas penangkapan radikal DPPH dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar $101,02 \mu\text{g/ml}$ dan $124,21 \mu\text{g/mL}$ serta dibandingkan dengan standar asam askorbat yang memiliki nilai IC_{50} sebesar $78,12 \mu\text{g/mL}$.

Walaupun telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, namun data tersebut belum dapat dijadikan dasar untuk aktivitas antioksidan, mengingat kondisi tempat tumbuh tanaman yang menyebabkan perbedaan kandungan kimia yang dimiliki tumbuhan (Kardono, 2003). Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan uji konfirmasi aktivitas antioksidan ekstrak etanol dengan metode penangkapan radikal DPPH. Selain itu juga dilakukan penentuan profil bioautografi.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan Penelitian

Daun *Z. mauritiana* dari daerah Bukit Jimbaran, Kabupaten Badung, Bali, etanol 96%, plat silika gel GF₂₅₄ (Merck), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), bahan pelarut seperti amonia, etil asetat, butanol, asam asetat, kloroform, metanol dan toluen yang masing-masing berderajat pro analisis. Selain itu, digunakan juga pelarut yang berderajat teknis yaitu *aquadest*.

2.2 Alat Penelitian

Toples kaca, *blender*, sudip, sendok tanduk, pisau, alat gelas, timbangan analitik (AND[®]), kertas saring, tangki silinder gelas berukuran 30 × 10 cm, *Rotary evaporator* (Eyela[®]) bejana pengembang (CAMAG) dan lampu UV (CAMAG)

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Ekstraksi

Serbuk daun *Z. mauritiana* kering sebanyak 1 kg dimaserasi dengan 7,5 L pelarut etanol 96% selama $\pm 3 \times 24$ jam dengan dilakukan pengadukan sesekali. Ketika proses telah selesai dilakukan penyaringan. Residu dimaserasi kembali dengan 5 L etanol. Remaserasi dilakukan sebanyak 2 kali selama $\pm 2 \times 24$ jam. Ekstrak hasil maserasi atau filtrat yang dihasilkan ditampung menjadi satu dan diuapkan dengan menggunakan alat *Rotary evaporator* pada suhu 45-50°C, sehingga diperoleh ekstrak kental.

2.3.2 Uji Konfirmasi Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan diuji secara *in vitro* dengan mengukur kemampuan sampel menangkap radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Sampel uji (ekstrak etanol daun *Z. mauritiana*) dilarutkan dan diencerkan dengan metanol hingga diperoleh beberapa seri konsentrasi. Kontrol positif yang digunakan adalah vitamin C, dibuat dengan konsentrasi 1 mg/mL dalam metanol. Larutan DPPH disiapkan dengan menimbang 15,8 mg serbuk DPPH, kemudian dilarutkan dalam labu takar 100 mL dengan metanol hingga tanda batas.

Sebelum dilakukan pengukuran aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH, terlebih dahulu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum DPPH. Sebanyak 1,0 mL DPPH 0,4 mM ditambahkan dengan 4 mL metanol, kemudian campuran divorteks dan

dibiarkan selama 30 menit dalam ruang gelap. Campuran larutan ini diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 450-550 nm. Nilai panjang gelombang maksimal diamati dengan melihat nilai absorbansi tertinggi pada satu titik panjang gelombang.

Uji penangkapan radikal bebas DPPH dilakukan sesuai dengan metode yang diajukan oleh Kikuzaki *et al.* (2002). Sejumlah sampel tertentu ditambahkan dengan 1,0 ml DPPH 0,4 mM dan ditambahkan metanol sampai volume 5 mL. Campuran tersebut selanjutnya divorteks dan dibiarkan selama 30 menit. Campuran selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm dengan blanko yang digunakan adalah metanol. Pengukuran absorbansi juga dilakukan terhadap kontrol yang terdiri atas 1,0 ml DPPH dan 4,0 ml metanol. Senyawa pembanding digunakan dalam uji penangkapan radikal bebas DPPH ini adalah Vitamin C yang sudah diketahui sebagai antioksidan. Persentase penangkapan radikal bebas oleh sampel dapat dihitung dengan persamaan 1.

$$\text{Persen (\%)} \text{ penangkapan radikal DPPH} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan:

A₀ : absorbansi kontrol (tidak mengandung ekstrak uji)

A₁ : absorbansi sampel uji atau senyawa pembanding

Parameter yang digunakan untuk aktivitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal DPPH ini adalah IC₅₀, yaitu konsentrasi senyawa uji yang dibutuhkan untuk menangkap radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Nilai IC₅₀ diperoleh dengan membuat suatu persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan konsentrasi senyawa uji dengan persen aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH. Semakin kecil nilai dari IC₅₀, maka semakin kuat senyawa uji tersebut sebagai penangkap radikal DPPH.

2.3.3 Uji Antioksidan dengan KLT Bioautografi.

Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan tergantung dari golongan senyawa kimia yang akan diidentifikasi dengan KLT. Fase gerak yang digunakan dapat dilihat pada tabel 1.

Chamber dijenuhkan dengan fase gerak selama 30 menit. Larutan uji dibuat dengan cara sejumlah ekstrak kental daun *Z. mauritiana* Lam. dilarutkan dalam metanol. Sebanyak 10 µL larutan uji ditotolkan pada plat silika gel

GF₂₅₄. Plat KLT dielusi sampai tanda batas dalam bejana pengembang yang telah dijenuhkan. Setelah dielusi, plat KLT dikeluarkan dari bejana pengembang dan dikeringkan. Plat kemudian diamati pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm. Diamati spot dan warna yang dihasilkan. R_f dari masing-masing spot dihitung.

Tabel 1. Sistem Fase Gerak yang Digunakan untuk KLT-Densitometri (Harborne, 1987; Reich and Blatter, 2003; Markham, 1988).

Golongan Senyawa	Sistem Fase Gerak
Flavonoid	Butanol: Asam Asetat: Air (4:1:5 v/v)
Triterpenoid	Kloroform: Metanol (20:1 v/v)
Saponin	Kloroform: Metanol: Air (70:30:4 v/v)
Alkaloid	Toluen: Etil Asetat: Amonia (80:10:10 v/v)

Selanjutnya plat disemprot dengan DPPH 0,4 mM. Diamati adanya perubahan warna spot selama kurang lebih 10 menit. Hasil positif adanya penangkapan radikal DPPH oleh senyawa antioksidan ditandai dengan perubahan area spot yang semula ungu (setelah disemprot DPPH) menjadi warna kuning. Spot-spot yang mengalami perubahan warna dicatat nilai R_f-nya.

3. HASIL

3.1 Ekstraksi

Ekstrak kental yang diperoleh dari maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 61,42 gram dengan rendemen 6,14 % b/b.

3.2 Uji Antioksidan dengan KLT Bioautografi.

Hasil uji antioksidan dengan KLT Bioautografi dapat dilihat pada gambar 1.

4. PEMBAHASAN

Dari hasil uji aktivitas penangkapan radikal DPPH, ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* memiliki nilai IC₅₀ sebesar 59,52 ± 1,2 µg/mL sedangkan vitamin C memiliki nilai IC₅₀ sebesar 2,73 ± 0,05 µg/mL. Nilai IC₅₀ kemudian dianalisis dengan *Independent T-test* dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil analisis

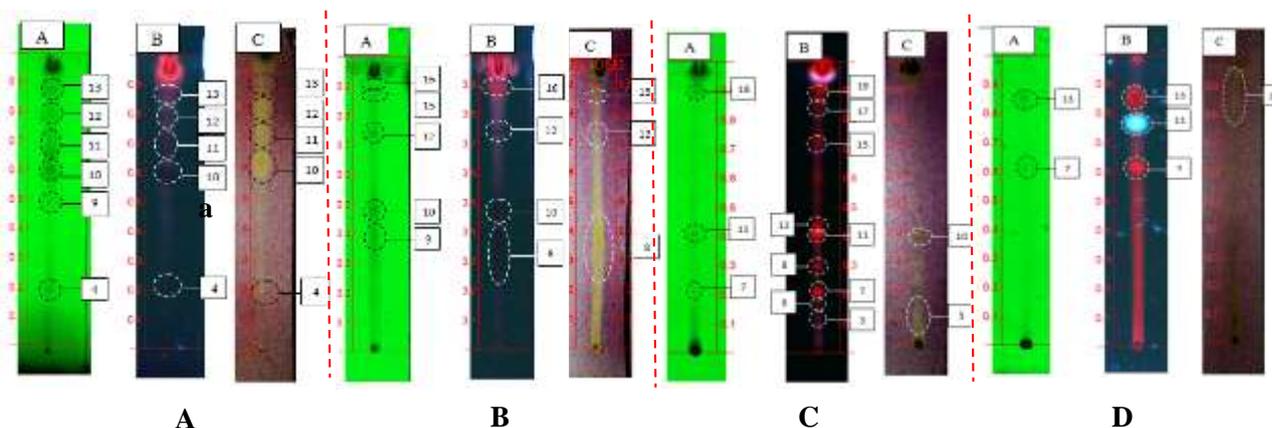
statistik dengan *Independent T-test* menunjukkan nilai IC_{50} ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* memiliki nilai yang lebih tinggi secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan nilai IC_{50} vitamin C. Dengan demikian ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan vitamin C, karena untuk menghambat 50 persen dari kadar radikal DPPH dibutuhkan konsentrasi ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* yang lebih banyak dibandingkan dengan vitamin C.

Pada penentuan profil bioautografi dengan KLT bertujuan untuk memperkirakan golongan senyawa apakah dalam ekstrak etanol *Z. mauritiana* yang kemungkinan memiliki aktivitas antioksidan.

Berdasarkan Gambar 1., Pada uji golongan senyawa flavonoid dengan KLT, bercak ke-4 dan 10 menghasilkan warna kuning, dimana senyawa antioksidan jika bereaksi dengan DPPH akan terbentuk warna kuning terang. Berdasarkan hasil tersebut golongan senyawa flavonoid yang terdapat pada bercak ke-4 diduga memiliki aktivitas antioksidan. Golongan senyawa flavonoid memiliki aktivitas antioksidan dengan mekanisme mendonorkan atom hidrogen kepada radikal bebas (Brewer, 2011).

Pada pengujian golongan senyawa saponin, bercak ke-12 dan 15 yang diduga golongan senyawa saponin menghasilkan warna kuning setelah disemprot dengan DPPH, sehingga senyawa saponin dalam ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* diduga memiliki aktivitas antioksidan. Dari beberapa penelitian telah dilaporkan bahwa senyawa golongan saponin mampu memiliki aktivitas antioksidan. Akinpelu *et al.* (2014), dalam penelitiannya menemukan bahwa senyawa saponin dalam tanaman *Erythrophelenum suaveolens* memiliki aktivitas antioksidan dengan mekanisme mendonorkan proton kepada radikal bebas.

Pada uji golongan senyawa triterpenoid, bercak ke-10 yang diduga sebagai golongan senyawa triterpenoid menghasilkan warna kuning setelah disemprot dengan DPPH. Sehingga triterpenoid pada bercak tersebut diduga memiliki aktivitas antioksidan. Dari beberapa penelitian telah dilaporkan bahwa senyawa golongan triterpenoid mampu memiliki aktivitas antioksidan. Misalnya pada penelitian Grace-Lynn *et al.* (2012), senyawa lantaden yang merupakan triterpenoid pentasiklik memiliki aktivitas penangkapan radikal DPPH.



Gambar 1. Profil KLT uji flavonoid (a), Saponin (b), Triterpenoid (c) dan Alkaloid (d) ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* di bawah sinar UV 254 nm (A), 366 nm (B) dan direaksikan dengan DPPH (C).

5. KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* memiliki aktivitas antioksidan dengan IC₅₀ sebesar 59,52 ± 1,2 µg/mL. Dibandingkan dengan vitamin C yang memiliki nilai IC₅₀ sebesar 2,73 ± 0,05 µg/mL, ekstrak etanol daun *Z. mauritiana* memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah. Hasil profil bioautografi menunjukkan bercak ke-4 dan 10 pada uji flavonoid, bercak ke-12 dan 15 pada uji saponin serta bercak ke-10 pada uji triterpenoid diduga memiliki aktivitas antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akinpelu, B.A., O.A. Igbeneghu, A.I. Awotunde, E.O. Iwalewa and O.O. Oyedapo. 2014. Antioxidant and Antibacterial Activities of Saponin Fractions of *Erythropheleum suaveolens* (Guill. and Perri.) Stem Bark Extract. *Scientific Research and Essay*. Vol. **9** (18): 826-833.
- Bhatia A. and M. Tulica. 2010. Hypoglycemic Activity of *Ziziphus mauritiana* Aqueous Ethanol Seed Extract in Alloxan-induced Diabetic Mice. *Pharmaceutical Biology*. Vol. **48** (6): 604-610.
- Brewer, M.S. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. **10**: 221-247.
- Dahiru, D. and O. Obidoa. 2007. Pretreatment of Albino Rats with Aqueous Leaf Extract of *Ziziphus mauritiana* Protects Against Alcohol Induced Liver Damage. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. Vol. **6** (2): 705-710.
- Grace-Lynn, C., I. Darah, Y. Chen, L.Y. Latha, S.L. Jothy and S. Sasidharan. 2012. In Vitro Antioxidant Activity Potential of Lantadene A, a Pentacyclic Triterpenoid of Lantana Plants. *Molecules*. Vol. **17**: 11185-11198.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terbitan Kedua. Bandung: Penerbit ITB. Hal. 127.
- Kardono, L. B. S. 2003. *Kajian Kandungan Kimia Mahkota Dewa (Phaleria marcocarpa)*. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi dan Obat Tradisional Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Hal. 56.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., and Taniguchi, H., 2002. Antioxidants Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 50, Page 2161-2168.
- Korkina, L.G. 2007. Phenylpropanoids as Natural Occuring Antioxidants: from Plant Defense to Human Health. *Cellular and Molecular Biology*. Vol. **53** (1): 15-25.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: Penerbit ITB. Hal. 20-26.
- Mishra, T. and A. Bhatia. 2010. Augmentation of Expression of Immunocytes' Function by Seed Extract of *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *J. Ethnopharmacol*. Vol. **127** (2): 341-5.
- Panossian, A., G. Wikman and H. Wagner. 1999. Plant Adaptogens III.* Earlier and More Recent Aspects and Concepts on Their Mode of Action. *Phytomedicine*. Vol. **6** (4): 287-300.
- Panossian, A. and G. Wikman. 2010. Review Effects of Adaptogens on the Central Nervous System and the Molecular Mechanisms Associated with Their Stress—Protective Activity. *Pharmaceuticals*. Vol. **3**: 188-224.
- Perumal, S., R. Mahmud, S.P. Piaru, L.W. Cai and S. Ramanathan. 2012. Potential Antiradical Activity and Cytotoxicity Assesment of *Ziziphus mauritiana* and *Syzygium polyanthum*. *Int.J.Pharmacol*. Vol.**8**(6): 535-541.
- Vinod, S. P. and H. Shivakumar. 2012. A Current Status of Adaptogens: Natural Remedy to Stress. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. S480-S490.