

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK N-HEKSAN, ETIL ASETAT, ETANOL 70% DAUN BIDARA (*Ziziphus spina-christi* L.) DENGAN METODE DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

Husna Dianah, Vera Nurviana, Diana Sri Zustika

Program Studi S-1 Farmasi, Universitas Bakti Tunas Husada Tasikmalaya,
Jl. Letjen Mashudi No. 20, Setiaratu, Kec. Cibeureum, Kota Tasikmalaya, Jawa Barat 46196
Email: dianasrizustika@universitas-bth.ac.id

Received: January 2025; Revised: February 2025; Accepted: March 2025; Available online: April 2025

ABSTRACT

Antioxidants are a group of compounds that are very important for the body because they can neutralize free radicals. Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) is a plant that has potential as a natural antioxidant. This study aimed to determine the differences in antioxidant activity of n-hexane, ethyl acetate, and 70% ethanol extracts of bidara leaves using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. Bidara leaves were obtained from Rajapolah, Tasikmalaya Regency, and extracted by the reflux method using n-hexane, ethyl acetate, and 70% ethanol solvents sequentially. Standardization of bidara leaf simplisia was performed including macroscopic and microscopic examination, phytochemical screening, and quality parameter testing. Antioxidant activity was determined quantitatively using DPPH spectrophotometric method with Vitamin C as the standard comparator. Results showed that the n-hexane, ethyl acetate, and 70% ethanol extract yields were 1.62%, 2.62%, and 7.4%, respectively. Phytochemical screening revealed the presence of alkaloids, flavonoids, polyphenols, quinones, saponins, monoterpenes, sesquiterpenes, steroids, and triterpenoids. Simplisia quality standardization met all *Materia Medika* Indonesia requirements: ash content $7.91 \pm 0.01\%$, water content $2 \pm 0\%$, water-soluble extract $14.44 \pm 0.1\%$, ethanol-soluble extract $12.83 \pm 0.08\%$, and drying shrinkage $8.25 \pm 0.04\%$. Qualitative antioxidant testing by TLC showed positive activity in ethyl acetate ($R_f = 0.8$) and 70% ethanol ($R_f = 0.1$ and 0.6) extracts. Quantitative results showed IC_{50} values of n-hexane extract 901 ppm, ethyl acetate extract 114 ppm (moderate activity), and 70% ethanol extract 93 ppm (strong activity). Statistical analysis using One Way ANOVA and Tamhane post hoc test confirmed that all three extracts have significantly different antioxidant activities ($p < 0.05$).

Keywords: Antioxidant; bidara leaves; DPPH; IC_{50} ; *Ziziphus spina-christi* L.

ABSTRAK

Antioksidan merupakan kelompok senyawa yang sangat penting bagi tubuh karena dapat meredam radikal bebas. Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) merupakan salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan alami. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan, etil asetat, dan etanol 70% daun bidara menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Daun bidara diperoleh dari Rajapolah, Kabupaten Tasikmalaya, dan diekstraksi dengan metode refluks menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol 70% secara bertingkat. Standarisasi simplisia daun bidara meliputi pemeriksaan makroskopik, mikroskopik, skrining fitokimia, dan penetapan parameter mutu. Aktivitas antioksidan ditentukan secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri DPPH dengan Vitamin C sebagai pembanding baku. Hasil penelitian menunjukkan nilai rendemen ekstrak n-heksan 1,62%, etil asetat 2,62%, dan etanol 70% 7,4%. Skrining fitokimia menunjukkan adanya alkaloid, flavonoid, polifenol, kuinon, saponin, monoterpen, seskuiterpen, steroid, dan triterpenoid. Standarisasi mutu simplisia memenuhi persyaratan MMI: kadar abu $7,91 \pm 0,01\%$, kadar air $2 \pm 0\%$, kadar sari larut air $14,44 \pm 0,1\%$, kadar sari larut etanol $12,83 \pm 0,08\%$, dan susut pengeringan $8,25 \pm 0,04\%$. Pengujian antioksidan kualitatif menggunakan KLT menunjukkan aktivitas positif pada ekstrak etil asetat ($R_f = 0,8$) dan etanol 70% ($R_f = 0,1$ dan $0,6$). Hasil kuantitatif menunjukkan nilai IC_{50} ekstrak n-heksan 901 ppm, etil asetat 114 ppm (kategori sedang), dan etanol 70% 93 ppm (kategori kuat). Analisis statistik menggunakan ANOVA satu arah dan uji Tamhane mengkonfirmasi bahwa ketiga ekstrak memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$).

Kata kunci: Antioksidan; daun bidara; DPPH; IC_{50} ; *Ziziphus spina-christi* L.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kepulauan yang kaya akan keanekaragaman hayati, dengan sekitar 30.000 jenis tanaman di mana 7.000 spesies di antaranya memiliki khasiat obat (Jumiarni dan Komalasari, 2017). Kekayaan tanaman obat ini menjadi potensi besar sebagai sumber senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan manusia, termasuk senyawa antioksidan alami.

Radikal bebas merupakan molekul kimia yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, sehingga bersifat sangat reaktif. Dalam tubuh, radikal bebas dapat mengakibatkan kerusakan oksidatif pada DNA, protein, dan lipid membran sel. Oksidasi yang disebabkan oleh reactive oxygen species (ROS) dapat menyebabkan disintegrasi membran sel, kerusakan protein, dan mutasi DNA, yang jika berkelanjutan dapat memicu berkembangnya berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, inflamasi, artritis, dan diabetes melitus (Dontha, 2016). Antioksidan berperan penting dalam menetralkan atau menghancurkan radikal bebas sebelum merusak sel, sehingga ketersediaan antioksidan yang memadai sangat diperlukan oleh tubuh (Indri *et al.*, 2016).

Tanaman bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) merupakan salah satu tanaman yang berpotensi sebagai sumber antioksidan alami yang menjanjikan. Tanaman ini telah lama digunakan dalam Traditional Chinese Medicine untuk mengobati berbagai penyakit seperti gangguan pencernaan, infeksi kulit, diare, kanker, dan demam (Lestari *et al.*, 2020). Berbagai penelitian telah membuktikan potensi tanaman ini sebagai antimikroba, antidiabetes, antipiretik, dan antikanker (Purnamasari dan Sagala, 2020). Daun bidara diketahui mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, dan polifenol yang semuanya merupakan senyawa antioksidan (Adzu dan Haruna, 2007), serta betulinik, asam semantik, berbagai senyawa flavonoid, saponin, dan triterpenoid (Asgarpanah, 2013).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Safrudin dan Nurfitasari (2018) menggunakan metode maserasi dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol menghasilkan nilai IC_{50} berturut-turut 211,83 ppm; 60,48 ppm; dan 33,48 ppm dengan vitamin C sebagai pembanding ($IC_{50} = 6,42$ ppm). Pada penelitian ini digunakan metode refluks sebagai alternatif ekstraksi karena metode maserasi memiliki kelemahan berupa waktu ekstraksi yang lama dan kebutuhan pelarut yang banyak. Refluks merupakan metode ekstraksi dengan pelarut pada titik didihnya selama waktu tertentu dengan pendingin balik, yang memungkinkan ekstraksi berlangsung lebih efisien (Lestari *et al.*, 2020). Penggunaan tiga pelarut berbeda kepolarannya (n-heksan, etil asetat, dan etanol 70%) bertujuan untuk memisahkan senyawa aktif berdasarkan tingkat polaritasnya sehingga dapat diketahui fraksi yang paling aktif sebagai antioksidan.

Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dipilih dalam penelitian ini karena merupakan metode yang paling umum digunakan, sederhana, cepat, akurat, reliabel, dan praktis untuk skrining aktivitas antioksidan (Kesuma, 2015). Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan, etil asetat, dan etanol 70% daun bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh dengan metode DPPH, dan membandingkannya dengan pembanding baku vitamin C.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan meliputi: lemari pengering simplisia, alat penggiling simplisia (Philips), neraca elektronik (Pioneer), alat refluks, labu bundar (Pyrex), shake waterbath (Memmert), mikroskop optik (Olympus), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S), plat KLT silica gel GF₂₅₄, dan peralatan gelas laboratorium lainnya.

Bahan yang digunakan meliputi: serbuk simplisia daun bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) dari Rajapolah, Kabupaten Tasikmalaya; n-heksan; etil asetat; etanol 70%; DPPH (Sigma-Aldrich); vitamin C; amonia 25%; kloroform; HCl p.a.; FeCl₃; gelatin 1%; serbuk Mg; amil alkohol; NaOH; eter; anisaldehyd; vanilin sulfat; dan metanol p.a.

Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Universitas Padjadjaran, guna memastikan kebenaran identitas tumbuhan yang digunakan. Determinasi dilakukan dengan cara mencocokkan ciri-ciri morfologi tanaman bidara terhadap pustaka acuan.

Preparasi Sampel

Daun bidara segar diperoleh dari Rajapolah, Kabupaten Tasikmalaya, Jawa Barat. Sampel dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran dan bahan asing, kemudian dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya dilakukan pengeringan di bawah sinar matahari, sortasi kering, dan penggilingan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Serbuk diayak menggunakan mesh 60 untuk memperoleh serbuk simplisia daun bidara yang homogen (Rina *et al.*, 2014).

Pemeriksaan Karakterisasi Mutu Simplisia

Pemeriksaan karakterisasi mutu simplisia daun bidara meliputi pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik, serta penetapan parameter mutu mengacu pada Farmakope Herbal Indonesia (Kemenkes, 2017). Parameter mutu yang ditetapkan meliputi: (a) kadar abu menggunakan metode pengabuan langsung pada suhu 600°C; (b) kadar air menggunakan metode destilasi azeotrop dengan toluen; (c) kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol menggunakan metode Soxhlet; serta (d) susut pengeringan pada suhu 105°C hingga bobot tetap.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap serbuk simplisia dan ketiga ekstrak daun bidara untuk mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung. Pengujian yang dilakukan meliputi: alkaloid (pereaksi Mayer dan Dragendorff), flavonoid (serbuk Mg + HCl p.a. + amil alkohol), tanin dan polifenol (FeCl₃ dan gelatin 1%), kuinon (NaOH), steroid dan triterpenoid (pereaksi Liebermann-Burchard), serta monoterpen dan seskuiterpen (anisaldehid atau vanilin sulfat) (Marjoni, 2016).

Ekstraksi

Sebanyak 300 gram serbuk simplisia daun bidara diekstraksi secara bertingkat menggunakan metode refluks dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol 70%, masing-masing selama 3 jam dan dilakukan tiga kali pengulangan. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian disaring dan diuapkan di atas waterbath hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = (\text{Bobot ekstrak kental} / \text{Bobot serbuk simplisia}) \times 100\%$$

Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian Antioksidan Kualitatif (KLT): Masing-masing ekstrak ditotolkan pada lempeng silica gel GF₂₅₄ yang telah diaktivasi pada suhu 105°C selama 30 menit. Elusi dilakukan dengan fase gerak n-heksan:etil asetat (7:3). Setelah elusi, lempeng disemprot dengan larutan DPPH 0,2%. Bercak berwarna kuning pucat pada latar belakang ungu menunjukkan adanya aktivitas antioksidan.

Pengujian Antioksidan Kuantitatif (DPPH): Larutan DPPH 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 50 mg serbuk DPPH dalam 50 mL metanol p.a. Larutan induk vitamin C 1000 ppm dan larutan uji masing-masing ekstrak 1000 ppm dibuat dalam metanol p.a. Panjang gelombang maksimum DPPH ditentukan pada rentang 400–800 nm. Operating time ditentukan dengan menginkubasi 1 mL larutan uji dengan 2 mL DPPH 25 ppm dan mengamati absorbansi setiap 5 menit selama 60 menit. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan mereaksikan 1 mL larutan uji (berbagai konsentrasi) dengan 2 mL larutan DPPH, kemudian diinkubasi selama waktu operating time yang telah ditetapkan, dan absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum. Persentase penghambatan dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Penghambatan} = ((A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}) / A_{\text{kontrol}}) \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ dihitung dari persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel (x) dan persentase penghambatan (y), yaitu $y = bx + a$, dengan memasukkan nilai $y = 50$. Kategori kekuatan antioksidan berdasarkan nilai IC₅₀ menurut Molyneux (2004) dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1. Kategori Kekuatan Antioksidan Berdasarkan Nilai IC₅₀ (Molyneux, 2004)

Nilai IC ₅₀ (ppm)	Kategori Antioksidan
< 50 ppm	Sangat kuat
50 – 100 ppm	Kuat
100 – 150 ppm	Sedang
150 – 200 ppm	Lemah
> 200 ppm	Sangat lemah

Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan menggunakan uji One Way ANOVA untuk membandingkan nilai IC_{50} ketiga ekstrak daun bidara. Uji normalitas (Shapiro-Wilk) dilakukan sebelum ANOVA, dan karena data tidak homogen (uji Levene, $p < 0,05$), digunakan uji Tamhane sebagai uji post hoc untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Seluruh analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman

Hasil determinasi yang dilakukan di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Universitas Padjadjaran memastikan bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan spesies *Ziziphus spina-christi* L. Konfirmasi identitas tanaman ini penting dilakukan sebagai langkah awal jaminan mutu untuk memastikan kebenaran dan keseragaman bahan baku yang digunakan dalam penelitian.

Hasil Pemeriksaan Makroskopik dan Mikroskopik Simplisia

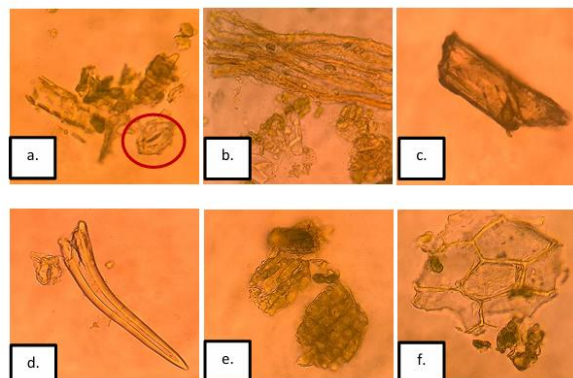
Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap daun segar dan serbuk simplisia daun bidara menggunakan panca indera. Hasil pemeriksaan makroskopik daun bidara disajikan pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Makroskopik Daun Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.)

Pemeriksaan	Daun Bidara Segar	Serbuk Simplisia
Warna	Hijau	Hijau
Bau	Bau khas daun	Bau khas daun, sedikit menyengat
Rasa	Tidak berasa	Sedikit pahit
Bentuk	Bulat telur oval, ukuran ± 5 cm, tulang daun 3, tepi tumpul	Serbuk halus

Pemeriksaan makroskopik menunjukkan bahwa daun bidara segar berbentuk bulat telur oval dengan ukuran kurang lebih 5 cm, memiliki 3 tulang daun, dan tepi daun tumpul atau membulat. Warna daun hijau muda hingga hijau tua. Setelah diproses menjadi serbuk simplisia, diperoleh serbuk halus berwarna hijau dengan bau khas daun yang sedikit menyengat dan rasa sedikit pahit. Karakteristik ini sesuai dengan deskripsi morfologi tanaman bidara yang dilaporkan oleh Van Steenis (2008 dalam Sareng, 2018).

Pemeriksaan mikroskopik serbuk simplisia daun bidara dilakukan dengan perbesaran 400 kali. Hasil pemeriksaan menunjukkan adanya fragmen-fragmen pengenal berupa stomata, serabut sklerenkim, serabut floem, rambut penutup, epidermis atas, dan sel gabus. Hasil pemeriksaan mikroskopik dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah ini.



Gambar 1. Mikrograf serbuk simplisia daun bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) perbesaran 400 $\times$: a. stomata, b. serabut sklerenkim, c. serabut floem, d. rambut penutup, e. epidermis atas, f. sel gabus.

Hasil Pemeriksaan Parameter Mutu Simplisia

Pengujian parameter mutu simplisia daun bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) dilakukan untuk memastikan kualitas simplisia yang digunakan memenuhi standar Farmakope Herbal Indonesia (Kemenkes, 2017). Hasil pemeriksaan parameter mutu simplisia dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini.

Tabel 3. Hasil Pemeriksaan Parameter Mutu Simplisia Daun Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.)

Parameter	Hasil (%)
Penetapan Kadar Abu	7,91 ± 0,01
Penetapan Kadar Air	2 ± 0
Penetapan Kadar Sari Larut Air	14,44 ± 0,1
Penetapan Kadar Sari Larut Etanol	12,83 ± 0,08
Susut Pengeringan	8,25 ± 0,04

Kadar abu total yang diperoleh adalah 7,91%, memenuhi persyaratan MMI (<10%). Penetapan kadar abu bertujuan mengetahui kandungan mineral internal dan eksternal serta kemurnian simplisia. Kadar air yang diperoleh sebesar 2%, jauh di bawah batas maksimal yang diperbolehkan (10%), sehingga simplisia tidak rentan terhadap pertumbuhan mikroorganisme selama penyimpanan. Kadar sari larut air sebesar 14,44% menggambarkan jumlah senyawa polar yang dapat tersari dalam air, sedangkan kadar sari larut etanol sebesar 12,83% menunjukkan kandungan senyawa yang larut dalam pelarut organik. Susut pengeringan sebesar 8,25% mengindikasikan bahwa zat yang menguap selama pengeringan, termasuk air dan minyak atsiri, berkontribusi sebesar 8,25% dari bobot simplisia. Seluruh nilai parameter mutu yang diperoleh telah memenuhi persyaratan standar Farmakope Herbal Indonesia (Kemenkes, 2017) dan Materia Medika Indonesia (MMI).

Hasil Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap serbuk simplisia daun bidara, serta ekstrak n-heksan, etil asetat, dan etanol 70% untuk mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan. Hasil skrining fitokimia secara lengkap disajikan pada Tabel 4 di bawah ini.

Tabel 4. Hasil Skrining Fitokimia Daun Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.)

Senyawa Metabolit	Simplisia	Ekstrak N-Heksan	Ekstrak Etil Asetat	Ekstrak Etanol 70%
Alkaloid	+	—	+	+
Flavonoid	+	+	+	+
Tanin	—	—	—	—
Polifenol	+	—	+	+
Kuinon	+	—	+	+
Saponin	+	—	+	+
Monoterpen dan Seskuiterpen	+	+	+	+
Steroid dan Triterpenoid	+	+	+	+

Keterangan: (+) = teridentifikasi; (—) = tidak teridentifikasi

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa simplisia daun bidara mengandung alkaloid, flavonoid, polifenol, kuinon, saponin, monoterpen dan seskuiterpen, serta steroid dan triterpenoid. Tanin tidak teridentifikasi pada semua sampel yang diuji. Hasil ini konsisten dengan laporan Adzu dan Haruna (2007) serta Lestari *et al.* (2020) yang menyebutkan kandungan senyawa bioaktif serupa pada daun bidara.

Alkaloid teridentifikasi positif pada simplisia, ekstrak etil asetat, dan ekstrak etanol 70% menggunakan pereaksi Dragendorff yang menghasilkan perubahan warna jingga, namun negatif pada ekstrak n-heksan karena alkaloid bersifat polar. Flavonoid teridentifikasi positif pada semua sampel, ditandai dengan terbentuknya warna merah-jingga pada penambahan serbuk Mg dan HCl. Uji polifenol menggunakan FeCl₃ menunjukkan hasil positif pada simplisia, ekstrak etil asetat, dan ekstrak etanol 70%, ditandai perubahan warna biru-hitam. Hasil negatif pada ekstrak n-heksan sesuai dengan sifat polifenol yang polar sehingga tidak larut dalam pelarut nonpolar. Senyawa saponin teridentifikasi pada simplisia, ekstrak etil asetat, dan ekstrak etanol 70%, ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil. Sedangkan monoterpen, seskuiterpen, steroid, dan triterpenoid teridentifikasi pada semua sampel menggunakan pereaksi vanilin sulfat dan Liebermann-Burchard. Keberadaan flavonoid dan polifenol

yang merupakan gugus senyawa fenolik dengan gugus hidroksil sebagai donor atom hidrogen menjadi dasar utama potensi antioksidan daun bidara (Wayan *et al.*, 2014).

Hasil Ekstraksi dan Rendemen Ekstrak

Ekstraksi bertingkat daun bidara menggunakan metode refluks dengan tiga pelarut berbeda kepolarannya menghasilkan ekstrak kental dengan nilai rendemen yang berbeda-beda. Hasil rendemen masing-masing ekstrak dapat dilihat pada Tabel 5 di bawah ini.

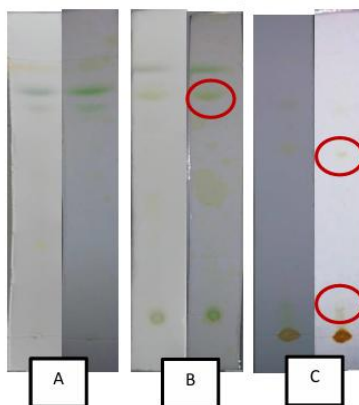
Tabel 5. Hasil Rendemen Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.)

Jenis Ekstrak	Bobot Ekstrak Kental (g)	Rendemen (%)
Ekstrak N-Heksan	4,86	1,62
Ekstrak Etil Asetat	7,86	2,62
Ekstrak Etanol 70%	22,20	7,4

Ekstrak etanol 70% menghasilkan rendemen tertinggi (7,4%), diikuti ekstrak etil asetat (2,62%), dan ekstrak n-heksan (1,62%). Rendemen etanol 70% yang paling tinggi disebabkan oleh sifat etanol yang merupakan pelarut semipolar yang dapat menyari senyawa-senyawa dengan berbagai tingkat polaritas, baik polar maupun nonpolar (Lestari *et al.*, 2020). Sebaliknya, n-heksan sebagai pelarut nonpolar hanya menyari senyawa-senyawa nonpolar seperti lemak, lilin, dan terpenoid nonpolar, sehingga menghasilkan rendemen terendah. Urutan rendemen ini konsisten dengan prinsip ekstraksi bertingkat yang dilakukan dari pelarut nonpolar ke polar.

Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kualitatif (KLT)

Pengujian aktivitas antioksidan secara kualitatif menggunakan KLT bertujuan untuk mengetahui keberadaan senyawa dalam ekstrak yang memiliki kemampuan meredam radikal bebas DPPH. Hasil uji KLT menggunakan penampak bercak DPPH 0,2% pada fase diam silica gel GF₂₅₄ dengan fase gerak n-heksan:etil asetat (7:3) dapat dilihat pada Gambar 2 di bawah ini.



Gambar 2. Kromatogram lapis tipis uji kualitatif aktivitas antioksidan sebelum dan sesudah penyemprotan DPPH 0,2%: A. Ekstrak N-Heksan, B. Ekstrak Etil Asetat, C. Ekstrak Etanol 70%. Fase diam: silica gel GF₂₅₄; fase gerak: n-heksan:etil asetat (7:3); ● = senyawa target antioksidan.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat menghasilkan bercak berwarna kuning pucat pada latar belakang ungu dengan nilai $R_f = 0,8$, sedangkan ekstrak etanol 70% menghasilkan dua bercak pada $R_f = 0,1$ dan $R_f = 0,6$. Sebaliknya, ekstrak n-heksan tidak menunjukkan bercak berwarna kuning setelah penyemprotan DPPH, yang mengindikasikan tidak adanya aktivitas antioksidan pada fraksi nonpolar ini.

Berdasarkan penelitian Pramiastuti *et al.* (2021), nilai $R_f = 0,8$ pada ekstrak etil asetat diduga berasal dari senyawa golongan fenolik atau steroid. Sementara nilai $R_f = 0,1$ dan $0,6$ pada ekstrak etanol diprediksi merupakan senyawa flavonoid, karena senyawa flavonoid umumnya memberikan aktivitas antioksidan pada R_f 0,2–0,75. Hasil ini mendukung data skrining fitokimia yang menunjukkan keberadaan senyawa fenolik dan flavonoid pada ekstrak etil asetat dan etanol 70%.

Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kuantitatif (DPPH)

Pengujian aktivitas antioksidan secara kuantitatif dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis menggunakan metode DPPH. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada penelitian ini adalah 516 nm, yang sesuai dengan kisaran panjang gelombang maksimum DPPH yang dilaporkan dalam literatur (515–520 nm). Waktu operating time yang diperoleh adalah 30 menit, yaitu waktu yang diperlukan agar reaksi antara larutan uji dan DPPH mencapai kestabilan.

Nilai IC_{50} yang merupakan konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal bebas DPPH dihitung berdasarkan persamaan regresi linier. Semakin kecil nilai IC_{50} , semakin kuat aktivitas antioksidannya. Hasil pengujian aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak dan vitamin C sebagai pembanding disajikan pada Tabel 6 di bawah ini.

Tabel 6. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Daun Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) dengan Metode DPPH

Sampel	Persamaan Regresi Linier	IC_{50} (ppm)	Kategori
Vitamin C (pembanding)	$y = 0,0711x + 0,3245$ $R^2 = 0,999$	2	Sangat kuat
Ekstrak N-Heksan	$y = 0,0143x + 37,115$ $R^2 = 0,9997$	901	Sangat lemah
Ekstrak Etil Asetat	$y = 0,094x + 39,235$ $R^2 = 0,9966$	114	Sedang
Ekstrak Etanol 70%	$y = 0,2064x + 30,8$ $R^2 = 0,9651$	93	Kuat

Vitamin C sebagai pembanding baku memiliki nilai $IC_{50} = 2$ ppm, yang dikategorikan sangat kuat karena merupakan senyawa murni. Ekstrak n-heksan menunjukkan nilai $IC_{50} = 901$ ppm (kategori sangat lemah), yang mengindikasikan tidak adanya aktivitas antioksidan yang bermakna. Hal ini terjadi karena sebagian besar senyawa antioksidan dalam daun bidara bersifat polar dan tidak dapat tersari oleh n-heksan yang nonpolar. Selain itu, proses pemanasan selama refluks dengan pelarut n-heksan yang bersuhu tinggi dapat menyebabkan kerusakan senyawa antioksidan yang termolabil (Tristantini *et al.*, 2016).

Ekstrak etil asetat menghasilkan nilai $IC_{50} = 114$ ppm yang termasuk kategori sedang (100–150 ppm). Keberadaan senyawa fenolik dan flavonoid yang terekstrak dalam etil asetat berperan dalam aktivitas antioksidannya, meskipun tidak seefektif ekstrak etanol. Ekstrak etanol 70% menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi di antara ketiga ekstrak dengan nilai $IC_{50} = 93$ ppm, termasuk kategori kuat (50–100 ppm). Nilai ini lebih kecil dibandingkan ekstrak n-heksana pada penelitian Safrudin dan Nurfitasari (2018) dengan maserasi ($IC_{50} = 211,83$ ppm) namun lebih besar dari fraksi metanolnya ($IC_{50} = 33,48$ ppm). Perbedaan nilai IC_{50} antar pelarut mengkonfirmasi bahwa senyawa antioksidan aktif dalam daun bidara lebih banyak bersifat polar.

Tingginya aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% dikaitkan dengan kandungan senyawa fenolik (alkaloid, flavonoid, polifenol, kuinon, dan saponin) yang lebih lengkap dibandingkan dua ekstrak lainnya. Senyawa fenolik memiliki gugus hidroksil aromatik yang dapat mendonorkan atom hidrogen kepada radikal bebas DPPH, sehingga menstabilkan radikal tersebut. Semakin tinggi kandungan senyawa fenolik dan flavonoid, semakin besar penurunan konsentrasi DPPH, dan semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Adawiah, 2015).

Hasil Analisis Statistik (One Way ANOVA)

Analisis statistik menggunakan uji One Way ANOVA menunjukkan bahwa hasil uji normalitas (Shapiro-Wilk) menghasilkan nilai $p > 0,05$, yang berarti data terdistribusi normal. Uji homogenitas varian (Levene) menghasilkan nilai Levene Statistic sebesar 12,401 dengan signifikansi 0,007 ($p < 0,05$), menunjukkan bahwa varian ketiga kelompok tidak homogen. Oleh karena data tidak homogen, digunakan uji Tamhane sebagai uji post hoc.

Hasil ANOVA menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$), yang berarti terdapat perbedaan rata-rata nilai IC_{50} yang bermakna di antara ketiga kelompok ekstrak. Uji Tamhane mengkonfirmasi bahwa perbedaan antara ekstrak n-heksan dengan ekstrak etil asetat maupun etanol 70% bersifat signifikan ($\text{sig} = 0,001 < 0,05$), demikian pula perbedaan antara ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol 70% ($\text{sig} = 0,000 < 0,05$). Dengan demikian, ketiga ekstrak daun bidara memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda secara signifikan satu sama lain, dengan urutan aktivitas antioksidan: etanol 70% > etil asetat > n-heksan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa standarisasi simplisia daun bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) menghasilkan parameter mutu yang memenuhi persyaratan Farmakope Herbal Indonesia, meliputi kadar abu $7,91 \pm 0,01\%$, kadar air $2 \pm 0\%$, kadar sari larut air $14,44 \pm 0,1\%$, kadar sari larut etanol $12,83 \pm 0,08\%$, dan susut pengeringan $8,25 \pm 0,04\%$. Ekstraksi bertingkat dengan metode refluks menghasilkan rendemen ekstrak n-heksan 1,62%, etil asetat 2,62%, dan etanol 70% 7,4%. Terdapat perbedaan aktivitas antioksidan yang signifikan ($p < 0,05$) di antara ketiga ekstrak daun bidara, dengan nilai IC_{50} berturut-turut: ekstrak n-heksan 901 ppm (sangat lemah/tidak aktif), ekstrak etil asetat 114 ppm (sedang), dan ekstrak etanol 70% 93 ppm (kuat). Ekstrak etanol 70% daun bidara menunjukkan aktivitas antioksidan terbaik di antara ketiga ekstrak yang diuji. Penelitian lanjutan disarankan berupa purifikasi dan fraksinasi lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa antioksidan aktif dari daun bidara.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Universitas Bakti Tunas Husada Tasikmalaya dan Herbarium Jatinarong Universitas Padjadjaran atas fasilitas yang diberikan, serta kepada seluruh pihak yang telah mendukung penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Adawiah, Sukandar D, Muawanah A. 2015. Aktivitas antioksidan dan kandungan komponen bioaktif sari buah namnam. Jurnal Kimia VALENSI, 1(November).
2. Adzu B, Haruna AK. 2007. Studies on the use of *Zizyphus spina-christi* against pain in rats and mice. African Journal of Biotechnology, 6(11): 1317–1324.
3. Agustina W, Nurhamidah, Handayani D. 2017. Skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan beberapa fraksi dari kulit batang jarak (*Ricinus communis* L.). Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia, 1(2): 117–122.
4. Aladin AL. 2017. Atlas Kromatografi Lapis Tipis Tumbuhan Obat Indonesia. Bogor: IPB Press.
5. Dontha S. 2016. A review on antioxidant methods. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 9(2): 14–32.
6. Hanani E. 2015. Analisis Fitokimia. Jakarta: EGC.
7. Herni Kusriani R, Nawawi A, Machter E. 2015. Penetapan kadar senyawa fenolat total dan aktivitas antioksidan ekstrak daun, buah, biji bidara (*Ziziphus spina-christi* L.). Prosiding SNaPP 2015 Kesehatan: 311–318.
8. Indri VM, Victoria YF, Lizma F, Rijai L. 2016. Identifikasi metabolit sekunder dan aktivitas ekstrak bunga tapak dara (*Catharanthus roseus*). Jurnal Sains dan Kesehatan, 1(1): 20–21.
9. Jumiarni WO, Komalasari O. 2017. Eksplorasi jenis dan pemanfaatan tumbuhan obat pada masyarakat suku Muna di permukiman kota Wuna. Traditional Medicine Journal, 22(April): 45–56.
10. Kemenkes RI. 2017. Farmakope Herbal Indonesia. Edisi II. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
11. Kesuma Y. 2015. Antioksidan Alami dan Sintetik. Padang: Andalas University Press.
12. Lestari G, Suciati I, Herlina. 2020. Formulasi sediaan sabun cair dari ekstrak daun bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.). Jurnal Farmasi Higea, 12(1): 1–10.
13. Marjoni R. 2016. Dasar-Dasar Fitokimia untuk Diploma III Farmasi. Jakarta: CV. Trans Info Media.
14. Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26(2): 211–219.
15. Nurazizah NI, Desmiaty F, Arsianti A. 2017. Standarisasi simplisia daun bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.). Prosiding Farma, 6: 900–905.
16. Pramiastuti O, Solikhati DI, Suryani A. 2021. Aktivitas antioksidan fraksi umbi bawang dayak (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb) dengan metode DPPH. Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik, 18(1): 55–66.
17. Purnamasari DR, Sagala Z. 2020. Uji aktivitas inhibitor enzim tirosinase ekstrak etanol daun bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) secara in vitro. Jurnal Farmasi Klinik Indonesia, 5(1): 35–44.
18. Rastuti U, Purwanti. 2012. Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun kalba (*Albizia falcata*) dan senyawa metabolit sekundernya. Molekul, 7(1): 33–42.

19. Rina W, Guswandi, Harrizul R. 2014. Pengaruh cara pengeringan dengan oven, kering angin, dan cahaya matahari langsung terhadap mutu simplisia herba sambiloto. *Jurnal Farmasi Higea*, 6(2): 126–133.
20. Safrudin N, Nurfitasari F. 2018. Analisis senyawa metabolit sekunder dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dari ekstrak daun bidara (*Ziziphus spina-christi* L.). *Jurnal Surya Medika*, 4(2): 11–20.
21. Setyowati WAE, Ariani SRD, Ashadi, Mulyani B, Rahmawati CP. 2014. Skrining fitokimia dan identifikasi komponen utama ekstrak metanol kulit durian (*Durio zibethinus* Murr.) varietas Petruk. *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VI*: 271–280.
22. Suharti T. 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrofotometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Malang: UB Press.
23. Sulastri E, Oktaviani C. 2015. Formulasi mikroemulsi ekstrak bawang hutan dan uji aktivitas antioksidan. *Jurnal Pharmascience*, 2(2): 1–14.
24. Tjitrosoepomo G. 2013. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
25. Tristantini D, Ismawati A, Pradana BT, Gabriel J. 2016. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH pada daun tanjung (*Mimusops elengi* L.). *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Universitas Indonesia*: 1–5.
26. Wayan N, Dewi OAC, Puspawati NM, Swantara IMD, Astiti IAR. 2014. Aktivitas antioksidan senyawa flavonoid ekstrak etanol biji terong belanda (*Solanum betaceum*, syn) dalam menghambat reaksi peroksidasi lemak pada plasma darah tikus Wistar. *Cakra Kimia*, 2(1): 9–16.
27. Wijanarko A. 2020. Standardisasi simplisia daun ciplukan. *Jurnal Farmasetis*, 9(1): 31–40.
28. Wulandari L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: Taman Kampus Presindo.