

Isolasi Senyawa Aromatik Diterpenoid dan Bioaktivitas Antioksidan dari Batang Tumbuhan Mimba (*Azadirachta indica*) Asal Pulau Poteran Madura

Isolation of Aromatic Diterpenoid Compound and Antioxidant Bioactivity from Steems of Neem (*Azadirachta indica*) From Poteran-Madura Island

Prima Agusti Lukis¹, Taslim Ersam²

¹ Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri

² Institut Teknologi Sepuluh Nopember

* prima.agusti.lukis@iik.ac.id

ABSTRAK

Senyawa aromatik diterpenoid telah berhasil diisolasi dari ekstrak etil asetat batang mimba (*Azadirachta indica*) asal Pulau Poteran-Madura yaitu 13-metiallil-nimbiol. Senyawa tersebut telah diisolasi menggunakan metode kromatografi kolom. Pemurnian senyawa dilakukan dengan metode rekristalisasi dengan metode satu pelarut yaitu *n*-heksana. Penentuan struktur dilakukan menggunakan data spektroskopi IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, NMR 2D serta perbandingan data yang telah dilaporkan sebelumnya. Berdasarkan pengujian antioksidan menggunakan radikal 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) yang telah dilakukan diketahui bahwa fraksi A₅ (IC₅₀ 233,08 µg/mL) menunjukkan bahwa fraksi tersebut memiliki aktivitas antioksidan lemah bila dibandingkan dengan vitamin C (IC₅₀ 22,22 µg/mL) sebagai kontrol positifnya.

Kata kunci: *Azadirachta indica*, aromatik diterpenoid, antioksidan, 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH)

ABSTRACT

Aromatic diterpenoid compounds had been isolated from the ethyl acetate extract of the stems of Neem (*Azadirachta indica*) from Poteran-Madura Island, 2-methylallyl-nimbiol. These compound was isolated by using column chromatography methods. These compound was purified by recrystallization using *n*-hexane as a solvent. The structure of this compound was identified using IR spectroscopy, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D NMR and previously reported structure. Antioxidant activity test using radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) showed that the A₅ (IC₅₀ 233,08 µg/mL) fraction have a weak antioxidant activity compared to Vitamin C (IC₅₀ 22,22 µg/mL) as a positive control.

Keywords: *Azadirachta indica*, aromatic diterpenoid, antioxidant, 2,2-diphenil-1- picrylhydrazyl (DPPH)

PENDAHULUAN

Elemen penting dalam kehidupan salah satunya adalah tumbuhan, karena memberikan berbagai manfaat. Salah satu fungsi tumbuhan adalah sebagai obat yang telah diwariskan turun temurun oleh nenek moyang bangsa Indonesia untuk mengobati berbagai macam penyakit. Ramuan pengobatan tradisional yang berasal dari tumbuhan dapat memanfaatkan bagian tumbuhan berupa akar, kulit batang, kayu, daun, bunga, buah atau bijinya (Furi et al., 2015). Banyak jenis tumbuhan yang sudah dimanfaatkan sejak lama sebagai makanan dan obat-obatan tradisional, akan tetapi belum banyak diketahui senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Senyawa kimia yang terdapat pada tumbuhan merupakan hasil dari metabolisme, baik metabolisme primer maupun metabolisme sekunder. Hasil metabolisme sekunder banyak memberikan efek fisiologis dan efek farmakologis yang lebih dikenal dengan senyawa kimia aktif. (Astuti et al., 2017).

Salah satu daerah yang menggunakan tumbuhan sebagai obat tradisional adalah Pulau Poteran-Madura. Pulau tersebut merupakan salah satu pulau kecil terluar yang terletak di Pulau Madura. Di pulau ini terdapat beberapa tumbuhan obat produktif yang berpotensi sebagai obat, yaitu Mimba (*Azadirachta indica*), Kacang kayu (*Cajanus cajan*), Kelor (*Moringa oleifera*), Saga (*Adenantha pavonima*), Sukun (*Artocarpus altilis*), Juwet (*Syzygium cumini*), Cabe jamu (*Piper retrofractum*, Vahl), Waru (*Hibiscus tiliaceus*), Kesambi (*Schleichera aleosa*), Pulai (*Alstonia scholaris*). Dalam penelitian ini dipilih tumbuhan mimba (*A. indica*) yang dimanfaatkan oleh penduduk sekitar sebagai obat untuk penyakit, seperti demam, sakit perut, gatal, pengurangan kadar gula darah, dan sebagainya.

Tumbuhan mimba paling banyak diteliti karena bahan aktif yang terdapat di dalamnya sangat berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat tradisional. Berbagai bagian tumbuhan mimba telah berhasil diisolasi lebih dari 140 senyawa kimia (Soegihardjo, 2007). Ada diantaranya, senyawa modifikasi diterpenoid berhasil diisolasi dari kulit akar mimba berdasarkan metode spektroskopi dan diberi nama nimbidiol (Majumder et al., 1987) dan dua senyawa diterpenoid baru yaitu nimbilicin dan nimbocidin juga berhasil diisolasi dari kulit akar mimba berdasarkan metode isolasi dan spektroskopi (Ara et al., 1989). Senyawa tanin juga telah berhasil dipisahkan dari senyawa lain yang terdapat pada ekstrak daun mimba dengan metode fraksinasi yang digunakan sebagai antibakteri *Salmonella typhi* (Ruwandha et al., 2021). Pada penelitian yang telah dilakukan Kusumawati et al (2021) menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi dari daun mimba memiliki potensi sebagai inhibitor α -glukosidase dalam mengatasi penyakit diabetes mellitus tipe 2. Ada juga penelitian yang terbaru menyebutkan bahwa senyawa limonoid dari tumbuhan mimba telah berhasil diuji secara *in silico* potensi antivirus terhadap reseptor RdRp SARS-CoV-2 (7BV2) (Ayuningrum, 2021). Senyawa-senyawa yang terdapat dalam tumbuhan mimba tersebut melalui penelitian bioaktivitas secara *in vitro* maupun *in vivo* telah menunjukkan aktifitas sebagai anti-inflamasi, anti-histamin, antipiretik, dan antijamur, tetapi masih jarang ditemukan senyawa dari mimba yang berpotensi sebagai antioksidan (Soegihardjo, 2007).

Penelitian terhadap akar dan batang mimba asal Pulau Poteran-Madura ini sebagai antioksidan belum banyak dilakukan, sehingga mendorong peneliti untuk melakukan isolasi dari akar dan batang mimba asal Pulau Poteran-Madura, kemudian dilakukan penentuan

struktur dan aktivitas antioksidan senyawa golongan terpenoid. Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan perekonomian masyarakat melalui budidaya tumbuhan antioksidan di pulau-pulau kecil sehingga masyarakat di pulau tersebut menjadi mandiri.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Bahan tumbuhan : Batang mimba yang diambil dari Pulau Poteran Madura, Indonesia, pada bulan Maret 2014.

Instrumen dan bahan kimia : Alat pengukur titik leleh *Fisher John-melting point Apparatus*. Spektrofotometer IR diukur dengan FT-IR PRESTIGE 21 (SHIMADZU). Spektrometer GC-MS spectra dengan GC/MS *Autosampler Agilent Technologies, 5973 inert, Mass Selective Detector*. Spektroskopi NMR-¹H and ¹³C-NMR menggunakan JEOL-Nuclear Magnetic Resonance (JNM ECS-400), dioperasikan pada 400.0 MHz menggunakan standar pelarut residual dan deuterasi. Kromatografi cair vakum (KCV) dilakukan menggunakan Merck Si gel 60 GF254 dan analisis Kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan plat Si gel (Merck Kieselgel 60 F254, 0.25 mm).

Prosedur Kerja

Ekstraksi dan Isolasi : Fraksi A=13 g dari ekstrak pekat etil asetat difraksinasi lebih lanjut dengan KCV menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (1-50%), selanjutnya dilakukan monitoring KLT. Pada proses KCV ini diperoleh 6 fraksi gabungan yaitu A1=1,6860 g, A2=1,0968 g, A3=1,6126 g, A4=0,5982 g, A5=1,4840 g dan A6=8,9691 g. Fraksi A5 berupa gel berwarna coklat, kemudian dilakukan rekristalisasi dengan n-heksana, dilanjutkan dengan etil asetat dan diklorometana dingin dan disaring menghasilkan endapan putih (A5a) sebanyak 0,0613 g. Endapan A5a direkristalisasi lagi dengan diklorometana dingin dan disaring menghasilkan endapan putih 5a(4,7mg), 5b(39,4mg), 5c(7,9mg), 5d(1,7mg) dan 5e(12,6mg). Selanjutnya endapan 5e dilakukan rekristalisasi menggunakan sistem satu pelarut yaitu n-heksana. Perlakuannya adalah 5e dilarutkan dalam n-heksana, dipanaskan dan disaring menghasilkan endapan putih 5f=10,2 mg dan filtrat bening. Endapan 5f dilarutkan kembali dengan n-heksana, lalu dipanaskan dan disaring menghasilkan endapan 5g=3,7 mg.

Uji Kemurnian : Uji kemurnian senyawa dilakukan menggunakan uji KLT dengan tiga eluen yang berbeda kepolarannya dan uji titik leleh. Setelah diperoleh senyawa murni, selanjutnya dilakukan elusidasi struktur senyawa dengan metode spektroskopi yaitu IR, NMR (1H, 13C, DEPT 135, HMBC) dan uji bioaktivitas antioksidan dengan metode DPPH (Mahmiah, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Ekstraksi : Sampel yang digunakan untuk isolasi yaitu fraksi A=13 g dari ekstrak pekat etil asetat kayu batang *A. indica* asal Pulau Poteran-Madura. Fraksi A tersebut dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan metode KCV menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (1-50%) berdasarkan gradien kepolaran. Proses fraksinasi ini menghasilkan 6 fraksi gabungan, dimana untuk fraksi A5 dilakukan rekristalisasi dengan 3 macam pelarut yaitu n-

heksana, etil asetat dan diklorometana, sehingga menghasilkan 5 subfraksi (5a-5e). Hasil rekristalisasi tersebut sebanyak 3,7 mg dan disebut sebagai senyawa **1**.

Uji kemurnian : Uji kemurnian senyawa dapat dilakukan dengan metode uji KLT menggunakan 3 macam eluen yang berbeda kepolaran dan uji titik leleh, dimana senyawa **1** memiliki titik leleh 180-181°C. Senyawa **1** dapat dikatakan sebagai senyawa murni, karena dengan uji KLT menggunakan 3 eluen yang berbeda kepolarannya tetap menunjukkan 1 noda dengan R_f yang berbeda dan memiliki perbedaan titik leleh ± 1°C (Kristanti, *et al.*, 2008).

Elusidasi struktur : Penentuan struktur pada senyawa **1** menggunakan spektrofotometer FTIR, spektroskopi NMR 1D dan 2D serta dengan perbandingan data dari penelitian sebelumnya. Dari data spektrofotometer FTIR menunjukkan serapan-serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi, diantaranya adalah pada bilangan gelombang ν_{maks} 3327 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus hidroksi, serapan pada bilangan gelombang ν_{maks} 3086 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus CH sp³ untuk aromatik dan ν_{maks} 2928 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus CH sp³ untuk alifatik. Serapan pada bilangan gelombang ν_{maks} 1656 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus karbonil, serapan pada bilangan gelombang ν_{maks} 1573 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus C=C aromatik yang diperkuat oleh serapan pada bilangan gelombang ν_{maks} 871 cm⁻¹ sebagai cincin aromatik disubstitusi.

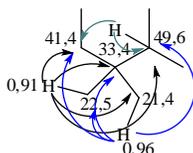
Penentuan struktur senyawa **1** dilanjutkan dengan menggunakan data spektrum ¹H-NMR seperti terlihat pada Tabel 1, dimana terdapat beberapa kelompok sinyal yang terdiri dari minimal 14 jenis proton. Sinyal yang dihasilkan adalah pada pergeseran kimia δ_H (ppm) 0,91 (3H, s); 0,97 (3H, s); 1,19 (3H, s); 1,23 (3H, s) dan 2,22 (3H, s) menunjukkan adanya lima metil *singlet*. Pergeseran kimia δ_H (ppm) 1,49 dan 1,52 (d, 2H, *J*=12,8 Hz); 1,62 dan 1,65 (d, 2H, *J*=14 Hz); 1,80 dan 1,81 (dd, 2H, *J*=4; 4,4 Hz) dan juga 2,57 dan 2,65 (d, 2H, *J*=15,8 Hz) menunjukkan adanya empat proton metilen. Adanya dua proton aromatik *singlet* posisi *para* terhadap satu sama lainnya dan posisi *orto* terhadap gugus hidroksi ditunjukkan pada pergeseran kimia δ_H (ppm) 7,81 (1H, s) dan 6,73 (1H, s). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa **1** memiliki cincin aromatik tetrasubstituen (Majumder *et al.*, 1987). Pergeseran kimia δ_H (ppm) 7,89 (1H, s) menunjukkan adanya ikatan rangkap C=C dan pada pergeseran δ_H (ppm) 2,17 (1H, s) menunjukkan adanya proton metin. Selain itu, senyawa **1** juga menunjukkan sinyal proton khas untuk gugus hidroksi pada pergeseran δ_H (ppm) 5,70 (1H, s).

Tabel 1. Data ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT 135 dan HMBC Senyawa **1** dalam CDCl₃

δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	DEPT	HMBC
0,91 (3H, s)	22,5	CH ₃	21,4; 33,4; 41,4; 49,6
0,96 (3H, s)	21,4	CH ₃	22,5; 33,4; 41,4; 49,6
1,19 (3H, s)	26,8	CH ₃	37,9; 49,6; 157,2
1,23 (3H, s)	15,3	CH ₃	22,4
1,49 (d, 2H, <i>J</i> =12,8Hz)	18,9	CH ₂	22,5; 37,9; 49,6
1,52 (d, 2H, <i>J</i> =12,8Hz)	18,9	CH ₂	37,9; 49,6
1,62 (d, 2H, <i>J</i> =14Hz)	37,9	CH ₂	37,9
1,65 (d, 2H, <i>J</i> =14Hz)	37,9	CH ₂	37,9
1,80 (dd, 2H, <i>J</i> =4; 4,4Hz)	41,4	CH ₂	22,5; 33,4; 36,1
1,81 (dd, 2H, <i>J</i> =4; 4,4Hz)	41,4	CH ₂	22,5; 36,1
2,22 (3H, s)	22,4	CH ₃	122,1; 130,8; 159,4
2,57 (d, 2H, <i>J</i> =15,8Hz)	36,1	CH ₂	49,6; 198,9
2,65 (d, 2H, <i>J</i> =15,8Hz)	36,1	CH ₂	49,6; 198,9
2,17 (1H, s)	49,6	CH	41,4; 49,6
6,73 (1H, s)	109,6	CH aromatik	37,9; 124,4; 159,4
7,81 (1H, s)	126,6	CH aromatik	159,4; 198,9; 15,3
7,89 (1H, s)	130,8	CH alkena	157,2; 198,9

-	38,0	-	-
-	122,1	-	-
-	124,4	-	-
-	157,2	-	-
-	159,4	-	-
-	198,9	-	-

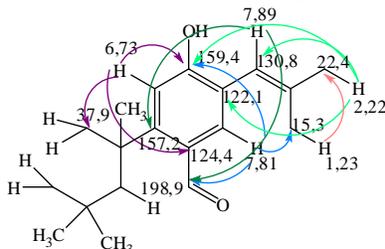
Data tersebut diperkuat dengan data spektrum ^{13}C -NMR yang menunjukkan bahwa senyawa **1** memiliki minimal 21 atom karbon. Data ^{13}C -NMR (Tabel 1) menunjukkan adanya sinyal karbon pada pergeseran kimia δ_{C} (ppm) 15,3; 21,4; 22,4; 22,5 dan 26,8 mengindikasikan adanya lima gugus metil. Sinyal karbon pada δ_{C} (ppm) 18,9; 36,1; 37,9; dan 41,4 menunjukkan adanya empat gugus metilen. Sinyal karbon pada δ_{C} 49,6 ppm menunjukkan adanya gugus metin, pada δ_{C} (ppm) 109,6 dan 126,6 menunjukkan pergeseran yang khas untuk karbon yang mengikat proton pada sistem aromatik. Sinyal karbon pada δ_{C} 130,8 ppm menunjukkan adanya ikatan rangkap C=C dan pada δ_{C} 159,4 ppm menunjukkan adanya karbon yang mengikat gugus hidroksi pada sistem aromatik. Selain itu, pada δ_{C} 198,9 ppm menunjukkan pergeseran yang khas untuk karbonil (Majumder *et al.*, 1987). Data tersebut juga diperkuat dengan data spektrum DEPT 135 (*Distortionless Enhancement of Polarization Transfer*) dan pengukuran NMR dua dimensi yaitu HMBC. Berdasarkan data spektrum DEPT 135 yang dapat dilihat pada Tabel 1 memperlihatkan adanya 13 atom karbon, yaitu lima gugus metil pada δ_{C} (ppm) 15,3; 21,4; 22,4; 22,5 dan 26,8. Ada empat gugus metilen pada δ_{C} (ppm) 18,9; 36,1; 37,9; dan 41,4. Selain itu, terdapat satu gugus metin (-CH) pada δ_{C} 49,6 ppm, ada dua ikatan rangkap C=C aromatik pada δ_{C} (ppm) 109,6 dan 126,6 serta ada satu ikatan rangkap C=C pada δ_{C} 130,8 ppm. Sedangkan atom karbon lain yang tidak muncul di spektrum DEPT 135 menunjukkan bahwa atom karbon tersebut merupakan atom C kuartener. Berdasarkan data korelasi HMBC pada Tabel 1, proton pada δ_{H} (ppm) 0,91 dan 0,96 (masing-masing 3H, s) memiliki tiga korelasi yang sama terhadap karbon tetangganya yaitu karbon pada δ_{C} (ppm) 49,6; 41,4; dan 33,4. Selain itu, terdapat dua korelasi berbeda antara kedua proton tersebut, yaitu proton pada δ_{H} 0,91 ppm berkorelasi dengan karbon δ_{C} 21,4 ppm dan δ_{H} 0,96 ppm berkorelasi dengan karbon δ_{C} 22,5 ppm. Proton metin pada δ_{H} 2,17 ppm (1H, s) berkorelasi dengan karbon δ_{C} (ppm) 41,4 dan 49,6. Berdasarkan analisa DEPT pada Tabel 1 menunjukkan bahwa karbon δ_{C} (ppm) 21,4 dan 22,5 merupakan karbon metil; 33,4 merupakan karbon kuartener; 41,4 merupakan karbon metilen dan 49,6 merupakan karbon metin. Memperhatikan pola korelasi antara ketiga sinyal proton dengan karbon tetangganya tersebut, dapat diprediksikan bahwa keempat karbon δ_{C} (ppm) 21,4; 22,5; 41,4 dan 49,6 tersubstitusi pada karbon kuartener δ_{C} 33,4 ppm. Berdasarkan analisa korelasi tersebut, maka korelasi parsial 1 untuk senyawa **1** ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Korelasi HMBC parsial 1 untuk senyawa **1**

Proton pada δ_{H} (ppm) 6,73 dan 7,81 (masing-masing 1H, s) menunjukkan bahwa kedua proton tersebut merupakan proton aromatik *singlet* yang tersubstitusi *para* terhadap satu sama lainnya. Kedua proton tersebut memiliki satu korelasi yang sama yaitu dengan karbon khas aromatik yang tersubstitusi gugus okso-aril yaitu hidroksi (δ_{C} 159,4 ppm) dan terdapat

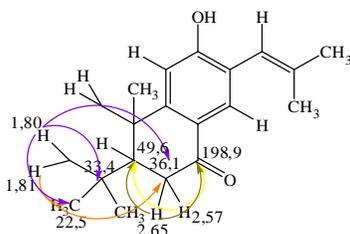
tiga korelasi berbeda antara kedua proton aromatik tersebut yaitu untuk proton (δ_H 6,73 ppm) memiliki korelasi dengan karbon kuartener (δ_C 124,4 ppm) dan karbon metilen (δ_C 37,9 ppm). Sedangkan untuk proton (δ_H 7,81 ppm) memiliki korelasi dengan karbon metil (δ_C 22,4 ppm) dan karbon karbonil (C=O) (δ_C 198,9 ppm). Proton pada δ_H 7,89 ppm (1H, s) adalah proton yang khas untuk ikatan rangkap C=C memiliki korelasi dengan karbon aromatik yang tersubstitusi (δ_C 157,2 ppm) dan karbon karbonil (δ_C 198,9 ppm). Oleh karena itu, posisi karbonil berikatan dengan karbon aromatik pada δ_C 124,4 ppm. Selanjutnya, proton metil (δ_H 2,22ppm) berkorelasi dengan karbon kuartener pada δ_C (ppm) 122,1; karbon C=C pada δ_C (ppm)130,8 dan karbon khas untuk aromatik yang tersubstitusi gugus oksi-aril yaitu gugus hidroksi pada δ_C (ppm) 159,4. Selain itu, proton metil pada δ_H 1,23ppm (3H, s) memiliki korelasi dengan karbon metil (δ_C 22,4 ppm). Berdasarkan analisa korelasi tersebut, maka korelasi parsial 2 untuk senyawa **1** ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Korelasi HMBC parsial 2 untuk senyawa **1**

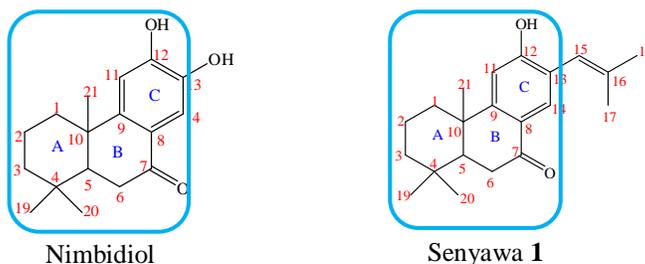
Proton aromatik dengan δ_H 6,73 ppm berada pada posisi *orto* terhadap gugus oksi-aril akibat adanya efek induksi dari keberadaan atom yang lebih elektronegatif. Bila dibandingkan dengan proton aromatik lainnya yaitu pada δ_H 7,81ppm yang berada pada posisi *meta* terhadap gugus oksi-aril akibat dari efek mesomeri dari cincin aromatik dan gugus alil yang menyebabkan kurang terlindungi, sehingga proton tersebut muncul pada pergeseran kimia yang lebih *down field*. Sedangkan karbon pada δ_C 130,8ppm berkorelasi dengan proton metil pada δ_H 2,22 ppm akibat adanya pengaruh anisotropi, sehingga lebih mengarah ke daerah *down field*.

Proton metilen pada δ_H (ppm) 1,80 dan 1,81 (masing-masing dd, 2H, $J=4$; 4,4Hz) memiliki dua korelasi yang sama yaitu dengan karbon metil (δ_C 22,5 ppm) dan karbon metilen (δ_C 36,1 ppm), ada satu korelasi yang berbeda antara kedua proton tersebut yaitu proton δ_H 1,80 ppm berkorelasi dengan karbon kuartener (δ_C 33,4 ppm). Selanjutnya, proton metilen pada δ_H (ppm) 2,57 dan 2,65 (masing-masing d, 2H, $J=15,8$ Hz) memiliki dua korelasi yang sama yaitu dengan karbon metin (δ_C 49,6 ppm) dan karbon khas untuk karbonil (C=O) (δ_C 198,9 ppm). Pola korelasi ini menunjukkan indikasi bahwa karbon metilen δ_C 36,1 ppm tersubstitusi pada karbon metin δ_C 49,6 ppm dan karbon karbonil δ_C 198,9 ppm. Prediksi ini diperkuat laporan dari Majumder *et al.* (1987) bahwa proton δ_H (ppm) 2,57 dan 2,65 mengindikasikan sinyal proton gugus metilen keton (-CH-CH₂-CO-C-) dari senyawa diterpen trisiklik podokarpan. Berdasarkan analisa korelasi tersebut, maka korelasi parsial 3 untuk senyawa **1** ditunjukkan pada Gambar 3.



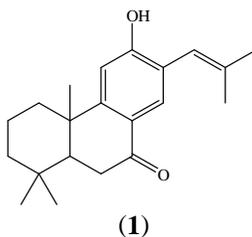
Gambar 3. Korelasi HMBC parsial 4 untuk senyawa 1

Analisa data di atas lebih diperkuat lagi dengan data perbandingan parsial dari literatur (Tabel 2 dan Gambar 4) yang menunjukkan bahwa senyawa **1** memiliki kemiripan struktur dengan senyawa nimbidiol (Majumder *et al.*, 1987; Xie *et al.*, 2011).



Gambar 4. Perbandingan struktur senyawa **1** dengan nimbidiol (Majumder *et al.*, 1987; Xie *et al.*, 2011)

Akan tetapi terdapat juga perbedaan antara kedua senyawa tersebut, yaitu terletak pada substituen yang terikat pada C-13. Pada senyawa nimbidiol terdapat substituen oksi aril yang terikat pada C-13, sedangkan pada senyawa **1** terdapat substituen metilallil yang terikat pada C-13 yang didukung dari data HMBC, sehingga pergeseran kimia (δ_C) C-13 pada nimbidiol lebih besar akibat adanya efek induksi dari keberadaan atom yang lebih elektronegatif. Berdasarkan analisa data di atas dapat disimpulkan menjadi struktur senyawa yang utuh, yaitu senyawa **1** merupakan senyawa dari golongan aromatik diterpenoid dengan nama 13-metilallil-nimbiol.



Tabel 2. Data perbandingan parsial $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa 1 dengan Nimbidiol (Majumder *et al.*, 1987; Xie *et al.*, 2011) dalam CDCl_3

Karbon posisi	Nimbidiol		Senyawa 1		
	$\delta_H(\text{ppm})$	$\delta_C(\text{ppm})$	$\delta_H(\text{ppm})$	$\delta_C(\text{ppm})$	
1.	α	1,71 (d, 2H, $J=13,8\text{Hz}$)	37,9	1,65 (d, 2H, $J=14\text{Hz}$)	37,9
	β	1,64 (m, 1H)		1,62 (d, 2H, $J=14\text{Hz}$)	
2.	α	1,48 (d, 2H, $J=13,2\text{Hz}$)	18,8	1,49 (d, 2H, $J=12,8\text{Hz}$)	18,9
	β	1,78 (dd, 2H, $J=13,2; 4,2\text{Hz}$)		1,52 (d, 2H, $J=12,8\text{Hz}$)	
3.	α	1,22 (m, 1H)	41,3	1,80 (dd, 2H, $J=4; 4,4\text{Hz}$)	41,4
	β	1,43 (m, 1H)		1,81 (dd, 2H, $J=4; 4,4\text{Hz}$)	
4.	-	33,2	-	33,4	

5.		2,15 (d, 1H, J=12,6Hz)	49,8	3,13 (d, 1H, J=6,8Hz)	49,6
6.	α	2,54 (dd, 2H)	35,9	2,57 (d, 2H, J=15,8Hz)	36,1
	β	2,66 (dd, 2H)		2,65 (d, 2H, J=15,8Hz)	
7		-	198,4	-	198,9
8		-	124,4	-	124,4
9		-	152,8	-	157,2
10		-	38,0	-	38,0
11		6,83 (1H, s)	110,1	7,89 (1H, s)	109,6
12		-	156,5	-	159,4
13		-	152,4	-	122,1
14		7,62 (1H, s)	121,9	7,81 (1H, s)	126,6
15		-	-	6,73 (d, 2H, J=12,8Hz)	130,8
16		-	-	-	122,1
17		-	-	1,23 (3H, s)	15,3
18		-	-	2,22 (3H, s)	22,4
19		0,94 (3H, s)	21,3	0,91 (3H, s)	22,5
20		0,88 (3H, s)	23,2	0,96 (3H, s)	21,4
21		1,14 (3H, s)	18,9	1,19 (3H, s)	26,8

Pengujian Bioaktivitas Antioksidan : Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan pada penelitian ini adalah metode radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Pada proses pengujian, zat uji akan mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal bebas DPPH sehingga DPPH tereduksi menjadi senyawa bukan radikal yaitu 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil yang stabil. Hal tersebut ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning pucat atau tidak berwarna (Molyneux, 2004). Fraksi *Guide line* merupakan subfraksi yang diperoleh dari hasil fraksinasi A₅ ekstrak etil asetat batang mimba (*A. indica*). Fraksi A₅ berturut-turut adalah subfraksi yang digunakan untuk isolasi senyawa **1**. Penentuan IC₅₀ dari fraksi A₅ adalah untuk mengetahui besarnya konsentrasi larutan uji yang mampu menangkap 50% radikal bebas DPPH dibandingkan dengan larutan blanko, dimana semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin tinggi aktivitasnya sebagai antioksidan (Molyneux, 2004). Setelah diperoleh prosentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, persamaan $y = Ax + B$ ditentukan dengan perhitungan secara regresi linear dimana x adalah konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) dan y adalah prosentase inhibisi. Data absorbansi fraksi A₅ terhadap peredaman DPPH dengan varian konsentrasi yang diperoleh kemudian juga dihitung persen inhibisinya menggunakan rumus yang sama, sehingga diperoleh nilai IC₅₀ 233,08 $\mu\text{g/mL}$ terhadap fraksi A₅. Pengujian aktivitas antioksidan terhadap fraksi A₅ (IC₅₀ 233,08 $\mu\text{g/mL}$) bila dibandingkan dengan vitamin C sebagai kontrol positif (IC₅₀ 22,22 $\mu\text{g/mL}$), fraksi tersebut memiliki aktivitas antioksidan lemah. Menurut Hanani *et al.* (2005), suatu bahan uji dikatakan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat apabila memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 200 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan untuk senyawa murni memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 100 $\mu\text{g/mL}$. Selain itu, Molyneux (2004) menyatakan bahwa bila nilai IC₅₀ yang diperoleh berkisar antara 200-1000 ppm, maka zat tersebut kurang aktif, namun masih berpotensi sebagai antioksidan. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi tersebut tidak dapat direkomendasikan sebagai agen antioksidan yang baik.

KESIMPULAN

Ekstrak etil asetat batang mimba (*A. indica*) asal Pulau Poteran Madura mengandung senyawa aromatik diterpenoid yaitu 13-metilallil-nimbiol (**1**). Berdasarkan hasil pengujian antioksidan menggunakan radikal DPPH yang telah dilakukan diketahui bahwa fraksi A₅ (IC₅₀ 233,08 $\mu\text{g/mL}$) menunjukkan bahwa fraksi tersebut memiliki aktivitas antioksidan lemah bila dibandingkan dengan vitamin C (IC₅₀ 22,22 $\mu\text{g/mL}$) sebagai kontrol positifnya.

Hal ini menunjukkan bahwa kedua fraksi tersebut tidak dapat direkomendasikan sebagai agen antioksidan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Departemen Kimia-Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya yang telah memberikan support selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Ara, I., Siddiqui, B.S., Faizi, S., Siddiqui, S. Diterpenoids from the Root Bark of *Azadirachta Indica*. *Z. Naturforsch.* 1989; 44b, 1279-1282.
- Astuti M.D., Tuti S, Kamilia M. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid dari Ekstrak n-Heksana Daun Kelopak Tambahan Tumbuhan Permot (*Passiflora foetida L*). *Sains dan Terapan Kimia.* 2017;11(2), 80-89.
- Ayuningrum, M. 2021. Studi *In Silico* Potensi Antivirus Senyawa Limonoid Tanaman Mimba (*Azadirachta indica A.Juss*) terhadap Reseptor RdRp SARS-CoV-2 (7BV2). Skripsi. Program Studi Farmasi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Furi M., Enda M, Zuhriyah. Isolasi dan Karakterisasi Terpenoid dari Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Meranti Kunyit (*Shorea conica*). *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia.* 2015;3(2), 38-42.
- Hanani, E., Mun'im, A., Sekarini, R. Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callyspongia sp.* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian.* 2005;2(3), 127-133.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., Kurniadi, B. 2008. Buku Ajar Fitokimia. Laboratorium Kimia Organik. Jurusan Kimia-FMIPA. UNAIR. Airlangga University Press. Surabaya.
- Kusumawati, N., Haryoto, Peni.I. Penghambatan Enzim Alpha-Glukosidase oleh Daun Mimba (*Azadirachta indica*) dan Rimpang Tamu Mangga (*Curcuma mangga*). *Jurnal Kefarmasian Indonesia.* 2021;11(1), 56-64.
- Mahmiah. 2011. Dua Senyawa Santon dengan Bioaktivitas Antimalaria dari Kayu Batang *Garcinia cylindrocarpa Kosterm.* Tesis, Program Magister-Bidang Keahlian Kimia Hayati. Jurusan Kimia. FMIPA-ITS
- Majumder, P.L., Maiti, D.C., Kraus, W., Bokel, M. Nimbidiol, A Modified Diterpenoid of the Root-Bark of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry.* 1987;26 (11), 3021-3023
- Molyneux, P. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 2004;26 (2), 211-219
- Ruwandha, D., Dwi, F.Y., Damayanti, I. Uji Aktivitas Tanin Daun Mimba (*Azadirachta indica*) Terhadap Bakteri *Salmonella typhi*. *Jurnal Kimia Riset.* 2021; 6(1), 77-85
- Soegihardjo, C.J. Mimba (*Azadirachta indica A.Juss*, Suku Meliaceae), Tanaman Multi Manfaat yang Dapat Menanggulangi Persoalan Rakyat Indonesia. *Jogjakarta. SIGMA.* 2007;10, 83-102
- Xie, Y., Ding, Z., Duan, W., Ye, Q. Isolation and Purification of Triterpenoid from *Celastrus aculeatus* Merr. by High-Speed Counter-Current Chromatography, *Journal Of Medicinal Plants Research.* 2011;6 (12), 2520-2525