

ISOLASI SENYAWA AKTIF EKSTRAK ETANOL BIJI ALPUKAT (*Persea americana*) DAN UJI TOKSISITAS TERHADAP *Artemia salina* Leach

Andi Nur Fitriani Abubakar, Aisyah, dan Maswati Baharuddin
Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar
e-mail: fitry_chemistry@yahoo.com

Abstract: Avocado seed (*Persea americana*) is recognized as one of medicinal plants. It contains several secondary metabolites, which have toxic activity. However, efforts to identify active compounds from avocado seeds (*Persea americana*) are still relatively rare. Therefore, isolation and toxicity assay have been conducted toward the active compound of avocado seed. Maceration one kilogram of seed dried powder by ethanol obtained 49,7464 gram extract. Separation of ethanol extract by column chromatography generated 0,0698 grams of pure white needle crystal, which is positively triterpenoid based on Lieberman-Buchard test. In addition, infrared spectrum showed the existence of OH, C=C, C-C, C=O, -C-H, -CH₃, -CH₂ and C-O stretch, which support the presumed compound. The result of toxicity test on *Artemia salina* Leach showed that the extract, fraction and pure isolates of the ethanol extract are toxic with LC₅₀ values 13,274 μg/mL; 9,528 μg/mL and 8,128 μg/mL, respectively.

Keywords: Avocado seeds (*Persea americana*), ethanol extract, toxicity, triterpenoid

1. PENDAHULUAN

Indonesia terkenal akan kekayaan sumber daya alam baik flora maupun fauna. Hal ini dapat dilihat bahwa hampir semua penduduk Indonesia memusatkan perhatiannya pada sektor pertanian baik di laut maupun di darat. Kekayaan alam Indonesia terutama berasal dari tumbuh-tumbuhan yang berguna baik sebagai bahan obat, pangan, buah-buahan, rempah-rempah, bangunan, industri dan sebagainya.

Salah satu kekayaan flora Indonesia yang paling banyak dieksplorasi adalah family *Lauraceae*. Famili *Lauraceae* atau suku kamfer-kamperan adalah salah satu suku anggota tumbuhan berbunga. Salah satu tumbuhan dari famili *Lauraceae* di antaranya alpukat (*Persea americana* Mill.). Di Indonesia, alpukat (*Persea americana* Mill.) banyak tumbuh di daerah pegunungan seperti di daerah Malino Kabupaten Gowa Sulawesi Selatan (Budiono, 1994).

Selama ini yang dikenal dari alpukat (*Persea americana* Mill.) hanya buahnya saja yang dapat dimanfaatkan sedangkan biji buah alpukat sampai saat ini hanya dibuang sebagai limbah yang dapat mencemari lingkungan.

Namun ternyata, biji alpukat merupakan salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai obat tradisional.

Beberapa penelitian dewasa ini membuktikan bahwa skrining fitokimia terhadap biji alpukat (*Persea americana* Mill) dengan menggunakan ekstrak etanol, menunjukkan bahwa biji alpukat (*Persea americana* Mill) mengandung golongan senyawa metabolit sekunder antara lain: alkaloid, tanin, flavonoid, polifenol, saponin, triterpenoid, kuinon, monoterpenoid dan seskuiterpenoid. Senyawa alkaloid, triterpenoid, tanin, dan flavonoid diduga dapat bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach pada kadar tertentu (Hariyana, 2008; Marlinda, 2013; Zuhrotun, 2007).

Berdasarkan hal tersebut, maka dalam penelitian ini dilakukan isolasi senyawa aktif ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill.) serta uji toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach. Dari penulisan ini diharapkan dapat diketahui komponen aktif biji alpukat (*Persea americana* Mill.) yang bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach serta dapat mengembangkan manfaat biji alpukat (*Persea americana* Mill.) sebagai obat alami atau tradisional.

2. METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah pisau, pipet tetes, penjepit, *microplate*, cawan, kaca arloji, cawan penguap, botol vial, tabung reaksi, pengaduk kaca, mortar, bunsen spiritus, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 10 mL, blender, bola hisap, gelas ukur 100 mL, gelas kimia 100 mL, erlenmeyer 250 mL, labu ukur 10 mL, pipet mikro, corong pisah, corong kaca, corong *Buchner*, oven, timbangan analitik, lampu penerang, lampu UV, *rotary evaporator*, dan seperangkat alat FTIR.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji alpukat (*Persea americana* Mill.), larva udang *Artemia salina*, aquabides, garam sigma NaCl, etanol, *n*-heksana, etil asetat, kloroform, larutan H₂SO₄ pekat, larutan NaOH 10%, pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, pereaksi FeCl₃, peraksi Liberman-Burchard, aluminium foil, kertas saring, pelat silika gel F₂₅₄, aquades dan tisu.

Prosedur Penelitian

Preparasi Sampel

Biji alpukat (*Persea americana* Mill.) dicuci bersih, diiris kecil-kecil dan dikeringkan sampai diperoleh berat konstan (kering) dan menjadi serbuk kering. Hasil yang diperoleh digunakan sebagai sampel penelitian.

Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi atau perendaman. Serbuk biji alpukat (*Persea americana* Mill.) ditimbang

sebanyak 1000 gram dan diekstraksi secara maserasi dengan pelarut etanol. Sampel yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam toples kaca, kemudian diisi dengan etanol hingga semua sampel terendam. Maserasi dilakukan selama 9 x 24 jam, dengan pergantian pelarut setiap 72 jam. Ekstrak etanol yang dihasilkan kemudian dievaporasi sehingga diperoleh ekstrak kental (Kholifah, 2009).

Uji Steroid dan Triterpen

Tiga tetes filtrat dipindahkan pada kaca arloji, kemudian ditetaskan pereaksi Liebermann-Bouchard (asam asetat glasial-asam sulfat pekat). Bila positif mengandung terpenoid, maka akan terbentuk warna merah hingga ungu dan bila positif steroid terbentuk warna biru atau hijau (Ani, 2011).

Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Ekstrak kental yang diperoleh di analisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) kemudian diteruskan dengan kromatografi kolom cair vakum (KKCV). Fraksi yang diperoleh pada proses KKCV di analisis KLT. Sehingga noda yang memiliki R_f yang sama digabung. Fraksi yang sudah digabung dilanjutkan pada kromatografi flash, sehingga diperoleh fraksi yang lebih sederhana. Kemudian dilakukan pemurnian dengan cara kristalisasi dan rekristalisasi dengan pelarut yang cocok, hingga diperoleh kristal murni yang ditandai dengan hasil KLT yang menunjukkan satu noda dan titik leleh yang akurat. Selanjutnya kristal yang diperoleh dianalisis menggunakan spektrofotometer FTIR (Mahmiah, 2006).

Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan *Artemia salina* Leach. Langkah-langkah yang dilakukan adalah (Meyer et al., 1982) :

Penetasan Larva udang

Disiapkan wadah untuk penetasan telur *Artemia salina* Leach dimana wadah tersebut terbagi menjadi 2 ruang yaitu ruang tertutup dan ruang terbuka. Kemudian NaCl 3,8 gram ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL aquabides. Larutan NaCl dipindahkan dalam wadah penetasan kemudian dimasukkan telur *Artemia salina* Leach pada sisi ruang yang tertutup dan pada ruang terbuka diletakkan lampu untuk menghangatkan suhu dalam penetasan dan lampu dinyalakan selama 48 jam untuk menetasakan telur sampai menjadi benur (naupli) yang siap digunakan. Larva udang yang akan diuji diambil dengan menggunakan mikropipet.

Persiapan Larutan Sampel yang Akan Diuji

Sampel (ekstrak atau senyawa murni) sebanyak 1,0 mg ditimbang dalam botol vial dan dilarutkan dengan 100 μ l DMSO. Selanjutnya larutan

sampel diencerkan dengan 150 μl aquabides sehingga volume total menjadi 250 μl , kemudian diambil 200 μl lalu diencerkan dengan 600 μl aquabides sehingga volume total menjadi 800 μl . Sehingga konsentrasi menjadi :

$$\frac{\frac{200 \mu\text{L}}{250 \mu\text{L}} \times 1 \text{ mg}}{800 \mu\text{L}} = \frac{0,8 \text{ mg}}{800 \mu\text{L}} = 0,001 \frac{\text{mg}}{\mu\text{L}} = 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 1000 \text{ ppm}$$

Selanjutnya dilakukan pengenceran dalam *microplate*. Pengukuran dilakukan triplo (tiga kali). Dalam *microplate* baris A dan B diisi sampel masing-masing 100 μL . Kemudian baris B sampai G ditambahkan 100 μL aquabides. Dari baris B dipipet 100 μL , dimasukkan ke baris C, dan dari C dipipet 100 μL dimasukkan ke D dan seterusnya. Terakhir dari G dipipet 100 μL dan dimasukkan ke H (-aquabides).

Prosedur Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

Media udang yang sudah menetas (berisi 7-15 ekor) dipipet 100 μL dan dimasukkan masing-masing kedalam lubang baris A-G pada *microplate* yang telah diisi sampel melalui pengenceran pada baris B, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam dihitung jumlah larva udang yang mati dan hidup pada tiap lubang *microplate*. Data yang diperoleh dicatat pada lembar pengamatan untuk mencari LC_{50} .

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Sebanyak ± 1000 gram sampel kering biji alpukat dicuci bersih untuk menghilangkan kotoran berupa debu atau kotoran lainnya yang dapat mengganggu dalam proses ekstraksi. Selanjutnya sampel kering biji alpukat direndam dalam pelarut etanol. Perendaman tersebut merupakan metode ekstraksi maserasi dimana pada proses ini senyawa aktif sampel dipindahkan dari sel menuju pelarut. Ekstrak cair yang diperoleh dari hasil maserasi selanjutnya dilakukan evaporasi untuk memisahkan pelarut dengan ekstrak sehingga diperoleh ekstrak kental.

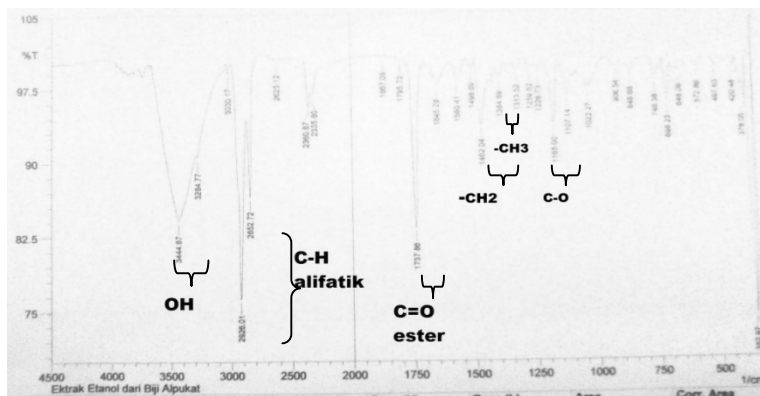
Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya di analisis dengan KLT menggunakan adsorben *silika gel* 60 F₂₅₄ untuk mengetahui eluen yang akan digunakan untuk KKC. Setelah dilakukan analisis KLT diperoleh eluen yang terbaik yaitu perbandingan *n*-heksana : etilasetat (8:2).

Proses selanjutnya, ekstrak etanol difraksinasi dengan KKC menggunakan adsorben *silika gel* G60 F₂₅₄ (70-200 mesh) sebagai fasa diam. Eluen *n*-heksana ditingkatkan terus kepolarannya dengan menambahkan etil asetat mulai dari perbandingan 100% *n*-heksana sampai 100% etil asetat. Hasil yang diperoleh dari fraksinasi tersebut berupa 12 fraksi. Fraksi-fraksi kemudian dianalisis dengan KLT untuk melihat penampakan nodanya. Fraksi yang memiliki kemiripan pola noda kemudian digabung ke dalam tiga fraksi A (1-4), B (5-7), dan C (8-12). Berdasarkan kemiripan yang terlihat, fraksi B (5-7)

berpotensi untuk dilanjutkan karena memperlihatkan adanya noda tunggal dan tanda-tanda kristal. Fraksi B (5-7) yang berupa padatan berwarna putih kekuningan difraksinasi dengan kromatografi kolom flash dan menghasilkan 40 fraksi. Kromatografi kolom flash pada fraksi B akan memisahkan fraksi-fraksi tersebut ke dalam golongan-golongannya. Sehingga hasilnya berupa senyawa metabolit sekunder utama yang terpisah dengan senyawa lainnya. Dari hasil pengamatan, fraksi yang menunjukkan adanya padatan atau kristal berbentuk jarum terdapat pada fraksi B₄ (24-25). Fraksi ini kemudian direkrystalisasi dengan etanol. Untuk menghilangkan pengotor-pengotornya, kristal dicuci dengan *n*-heksana secara berulang-ulang hingga diperoleh kristal berwarna putih. Selanjutnya, diteruskan dengan analisis KLT yang menunjukkan satu noda dengan nilai R_f 0,5 menggunakan eluen *n*-heksana : etil asetat (3:7).

Identifikasi lebih lanjut kristal putih berbentuk jarum sebanyak 0,0698 gram dilakukan dengan uji kelarutan, uji titik leleh, uji fitokimia dan identifikasi dengan spektroskopis IR. Uji kelarutan menunjukkan bahwa kristal ini tidak larut dalam *n*-heksana, sedikit larut dalam kloroform dan larut baik dalam etanol. Titik leleh kristal yang diperoleh adalah 241-243°C dengan trayek titik leleh tidak lebih dari 2°C yang mengindikasikan bahwa senyawa relatif telah murni. Pada uji fitokimia dengan NaOH 10% dan H₂SO₄ pekat tidak terjadi perubahan warna menunjukkan negatif terhadap flavanoid. Hal sama pada pereaksi Dragendorf, Wagner dan Meyer juga menunjukkan reaksi negatif terhadap alkaloid. Namun, uji warna dengan pereaksi Liebermand-Buchard menunjukkan reaksi positif terhadap terpenoid yang ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi ungu. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa tersebut merupakan golongan senyawa terpenoid.

Identifikasi ini diperkuat dari hasil analisis dengan spektroskopi IR. Adanya terpenoid dalam kristal didukung oleh spektrum IR berdasarkan serapan-serapan yang terlihat pada spektrum dibawah ini .



Gambar 1. Spektrum Infra Red ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill)

Hasil analisis pola serapan FTIR menunjukkan adanya serapan maksimum pada daerah 3444,87 cm⁻¹ yang memberi isyarat adanya gugus – OH. Vibrasi dari gugus alkohol yang didukung dengan munculnya serapan

pada bilangan gelombang 1107,14 cm^{-1} dari vibrasi C-O. Serapan yang tajam dengan intensitas kuat pada bilangan gelombang 2926,01 cm^{-1} dan 2852,72 cm^{-1} menunjukkan keberadaan -CH alifatik, yang memberi petunjuk adanya gugus metil (CH_3) dan metilena (CH_2). Dugaan ini diperkuat oleh adanya serapan pada daerah bilangan gelombang 1462,04 cm^{-1} dan 1384,89 cm^{-1} yang merupakan serapan dari - CH_2 dan - CH_3 yang mengindikasikan adanya senyawa triterpenoid. Serapan kuat pada daerah bilangan gelombang 1737,86 cm^{-1} diduga karena adanya gugus fungsi C=O dari ester yang diperkuat pada bilangan gelombang 1107,14 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ulur C-O. Adanya serapan pada bilangan gelombang 1645,28 cm^{-1} diduga merupakan serapan vibrasi ulur ikatan C=C ini diperkuat dengan vibrasi ulur -C=H pada bilangan gelombang 3030,17 cm^{-1} . Secara keseluruhan, hasil spektrum serapan yang diperoleh mendukung dugaan bahwa senyawa isolat adalah golongan senyawa terpenoid. Perbandingan spektrum isolat ini dengan spektrum triterpenoid isolat dari *Anredea cordifolia* Steen pada penelitian sebelumnya menguatkan dugaan bahwa senyawa isolat *Persea americana* Mill adalah golongan triterpenoid.

Tabel 1. Perbandingan hasil Spektrum Serapan IR Senyawa Isolat dengan Senyawa Triterpenoid

No	Daerah Serapan (cm^{-1})		Gugus Fungsi
	Senyawa Isolat <i>Persea americana</i> Mill.	Senyawa Triterpenoid <i>Anredera cordifolia</i> Steen	
1	3444,87	3448,72	-OH
2	2926,01	2924,09	C-H alifatik
3	2852,72	2854,65	C-H alifatik
4	1737,86	1735,93	C=O ester
5	1645,28	1627,92	C=C
6	1462,04	1465,90	C-H pada CH_2
7	1384,89	1381,03	C-H pada CH_3
8	1165,00	1172,72	C-C
9	1107	1087	C-O

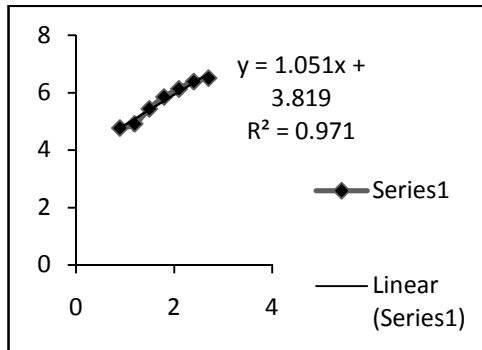
Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan pada masing-masing ekstrak kental, fraksinasi dan kristal (senyawa murni) ekstrak etanol dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach.

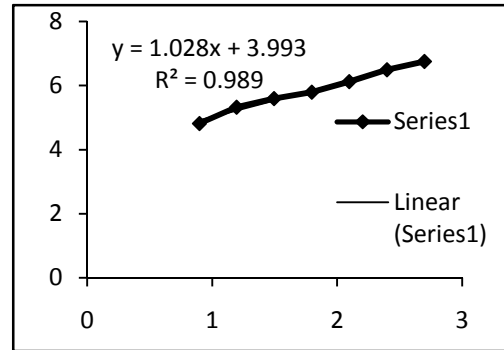
Perlakuan uji toksisitas dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Dari hasil pengamatan dengan menggunakan uji BSLT diketahui bahwa nilai LC_{50} dari ekstrak, fraksi dan isolat murni biji alpukat (*Persea americana* Mill.) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Toksisitas

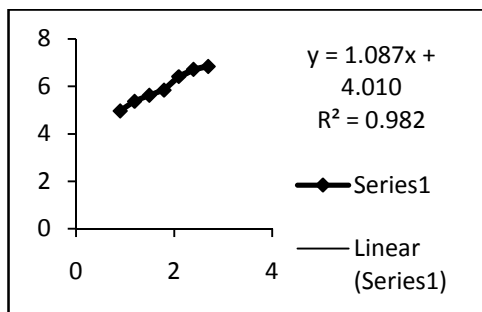
Sampel	LC ₅₀ (μg/mL)	Keterangan
Ekstrak kental	13,274	Sangat Toksik
Fraksinasi	9,528	Sangat Toksik
Kristal/isolat murni	8,128	Sangat Toksik



(a)



(b)



(c)

Gambar 2. Grafik analisis regresi log konsentrasi dengan tingkat mortalitas (a) ekstrak etanol (b) fraksi ekstrak etanol (c) isolat murni ekstrak etanol

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi dan isolat murni biji alpukat (*Persea americana* Mill.) bersifat toksik. Dari analisis regresi antara log konsentrasi dan mortalitas (%) larva udang, diketahui nilai LC₅₀ dari masing-masing sampel (ekstrak, fraksi, isolat murni). Hasil analisis yang dilakukan menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kuat antara log konsentrasi dan mortalitas larva udang. Semakin besar nilai konsentrasi masing-masing sampel maka mortalitas terhadap larva udang juga semakin besar. Adanya penambahan konsentrasi menyebabkan kematian larva udang mengalami peningkatan.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan uji fitokimia dan hasil spektrum senyawa aktif dari ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill.) teridentifikasi sebagai senyawa golongan triterpenoid dengan titik leleh 241-243°C.

Nilai *Median Lethal Concentration* (LC₅₀) ekstrak, fraksi dan isolat murni dari ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill.) berturut-turut 13,274 µg/mL; 9,528 µg/mL dan 8,128 µg/mL.

Saran

Dari hasil penelitian ini disarankan untuk dilakukan identifikasi lebih lanjut dari ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan menggunakan instrumen lain seperti MS dan NMR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti berterima kasih kepada ibu Aisyah, S.Si., M.Si dan ibu Maswati Baharuddin, S.Si., M.Si yang telah membimbing dalam penelitian ini serta staf Laboratorium Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar yang telah membantu dalam proses analisis.

DAFTAR PUSTAKA

- Ani, R., 2011, "Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak n-Heksan dari Kulit Batang Api-api (*Avicennia alba Blume*).” *Skripsi Sarjana*, FMIPA Universitas Negeri Makassar.
- Budiono, R., 1994, "Tinjauan Umum Tentang Famili Lauracea," *Unitas*, vol 2, no. 2.
- Hariyana, A., 2008, *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Cet. VI; Jakarta: Penebar Swadaya.
- Kholifah, 2009, "Dua Senyawa Terpenoid Alkohol Dari Rimpang Lengkuas Merah", *Jurnal Sains dan Terapan Kimia*, Vol. 2 No. 1 (FMIPA.Universitas Lambung Mangkurat)., h. 46.
- Mahmiah, 2006, "Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Kulit Batang Tumbuhan *Saccopetalum horsfieldii Benn* Laboratory of Chemistry," (Hang Tuah University, Surabaya).
- Marlinda, M., 2013, "Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.).
- Zuhrotun, 2007, "Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) Bentuk Bulat". *Karya Ilmiah*, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jatinangor.