

IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER EKSTRAK ETIL ASETAT BIJI ALPUKAT (*Persea americana* Mill.) DAN UJI TOKSISITAS TERHADAP LARVA UDANG *Artemia salina* Leach.

Musyarrifah, Asriani Ilyas, dan Maswati Baharuddin
Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar
Email: phepenk_iphe@ymail.com

Abstract: Since ancient times the people of Indonesia have known, and using nutritious plant as one of the efforts in the prevention of health problems. Plants belonging to the family Lauraceae is one of a group of plants commonly used by communities as traditional medicine, one of which is Avocado (*Persea americana* Mill.) Especially in the seeds, which contain secondary metabolites, namely polyphenols, tannins, flavonoids, triterpenoids, quinone, monoterpenoid and sesquiterpenoid and saponins. This study aims to identify the secondary metabolites contained in the seeds of avocado (*Persea americana* Mill.) And determine the toxicity of extracts and pure compounds using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Avocado seed solvent extracted using ethyl acetate and the extract obtained was tested group and toxicity testing. The results showed that the ethyl acetate extract of avocado seeds contain phytochemicals based on test results of secondary metabolites, the flavonoids, alkaloids and steroids. Avocado seed solvent extracted using ethyl acetate and the extract obtained was tested group and toxicity testing. The results showed that the ethyl acetate extract of avocado seeds contain phytochemicals based on test results of secondary metabolites, the flavonoids, alkaloids and steroids.

Keywords: *Persea americana* Mill., IR spectroscopy, flavonoids, toxicity test

1. PENDAHULUAN

Alpukat (*Persea americana* Mill) merupakan tanaman yang berasal dari genus *persea* yang tergabung dalam famili *lauraceae*. Dimana tumbuhan ini banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, biji alpukat mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder, yaitu polifenol, tanin, flavonoid, triterpenoid, kuinon, monoterpenoid dan sesquiterpenoid, sedangkan saponin hanya terdeteksi dalam ekstrak.

Beberapa senyawa tersebut, diperkirakan berpotensi sebagai antikanker. Sebagaimana yang telah diketahui bahwa kanker merupakan penyakit penyebab kematian tertinggi di negara berkembang. Oleh karena itu, banyak peneliti yang melakukan penelitian untuk memperoleh senyawa-

senyawa toksik yang berasal dari alam dan berpotensi sangat besar untuk terhadap kanker, salah satunya adalah biji alpukat dan nantinya akan dikembangkan pemanfaatannya sebagai salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai antikanker.

Salah satu metode yang digunakan untuk menguji sifat toksik adalah uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Lecah., dimana uji ini memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa-senyawa antikanker, sehingga dapat digunakan sebagai skrining awal untuk mencari senyawa antikanker.

Sifat toksisitas dapat diketahui dengan melihat jumlah kematian pada larva udang *Artemia salina* Lecah. pada konsentrasi tertentu. Suatu ekstrak dikatakan toksik jika memiliki nilai LC_{50} (konsentrasi yang membunuh 50% larva udang) $< 1000 \mu\text{g/mL}$.

Dengan demikian sebagai uji pendahuluan aktivitas antikanker dari buah, biji dan daun *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. dilakukan uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Untuk mengetahui kemungkinan senyawa yang bertanggungjawab terhadap aktivitas tersebut dilakukan identifikasi menggunakan spektroskopi IR.

2. METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu alat-alat gelas, lampu UV 256-350 μm , kolom flash, kolom vakum, rotary evaporator dan seperangkat alat FTIR.

Bahan yang digunakan yaitu biji alpukat, etil asetat, *Artemia salina* leach., garam murni sigma.

Cara kerja

Preparasi sampel

Biji buah alpukat (*Persea americana* Mill) dicuci yang bersih, diiris tipis-tipis dan dikering anginkan selama kurang lebih satu minggu sampai diperoleh berat konstan, kemudian hasilnya digunakan sebagai sampel penelitian.

Ekstraksi

Serbuk biji alpukat ditimbang sebanyak 1000 g dan diekstraksi secara maserasi menggunakan etil asetat p.a sebanyak 6 L kemudian sampel dimaserasi dengan etil asetat selama 3 x 24. Ekstrak pemekatan digunakan untuk uji toksisitas dengan metode BSLT, uji fitokimia dan identifikasi dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Uji Alkaloid

Test dengan pereaksi Dragendorf

Ditambahkan dua tetes pereaksi Dragendorf, jika terjadi warna jingga atau endapan coklat maka simplisia tersebut mengandung alkaloid.

Test dengan pereaksi Mayer

Jika dengan pereaksi Mayer terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam methanol maka ada kemungkinan terdapat alkaloid.

Uji Flavonoid

Pemeriksaan golongan flavonoid dapat dilakukan uji yang dapat diketahui melalui perubahan warna, yaitu :

Test dengan NaOH 10%

Ditambahkan beberapa mililiter sampel dalam alkohol 2-4 tetes larutan NaOH 10%.Perubahan warna yang terjadi diamati dari kuning tua menjadi kuning muda.

Test dengan H₂SO₄ (pekat)

Ditambahkan beberapa mililiter sampel dalam alkohol 2-4 tetes larutan H₂SO₄ pekat.Perubahan warna yang terjadi diamati dari kuning tua menjadi merah tua.

Test dengan FeCl₃

Diteteskan pereaksi besi (III) klorida, perubahan warna yang terjadi biru hitam atau kompleks biru.

Uji Triterpenoid dan Steroid

Diteteskan pereaksi Lieberman-Bourchard (asam asetat glasial-asam sulfat pekat) pada filtrat, bila positif terpenoid terbentuk warna merah hingga ungu dan bila positif steroid terbentuk warna biru atau hijau.

Fraksinasi dengan KKCVC dan Kromatografi Flash

Ekstrak kental di lanjutkan pada tahap fraksinasi KKCVC dengan berbagai perbandingan pelarut polar dan non polar (etil asetat dan n-heksana). Penampakan noda yang sama dari hasil KLT dan menunjukkan tanda-tanda kristal kemudian digabungkan dan dilanjutkan pada tahap kromatografi kolom flash. Senyawa murni yang diperoleh diuji kemurniannya dan diidentifikasi dengan spektroskopi IR.

Uji Toksisitas terhadap Artemia salina Leach.

Penetasan *Artemia salina* Leach.

Penetasan telur *Artemia salina* Leach di lakukan di dalam bejana yang dibagi dua bagian, yaitu daerah terang (diberi lampu penerangan) dan daerah gelap (ditutup dan berisi NaCl (sigma) 3,8 gram dan dilarutkan dalam 100 mL aquabidest. Pada bagian telur ditutup dan lampu dinyalakan selama 48 jam untuk menetasakan telur. Larva udang yang akan diuji diambil dengan menggunakan pipet tetes.

Pembuatan Larutan Sampel yang Akan Diuji

Sampel 1 mg dengan 100 μL DMSO dan diencerkan dengan 150 μL aquabidest sehingga volume total menjadi 250 μL . kemudian diambil 200 μL lalu diencerkan dengan 600 μL aquabidest hingga volume sampel menjadi 800 μL sehingga konsentrasi sampel 1000 ppm

Selanjutnya pengenceran dalam mikroplate. Pengukuran dilakukan triplo. Dalam mikroplate baris A dan B masing-masing diisi sampel 100 μL . kemudian baris B-G diberi aquabidest sebanyak 100 μL . dari baris B dipipet 100 μL dimasukkan ke baris C, dan dari C dipipet 100 μL dimasukkan ke baris D, dari baris D dipipet 100 μL dimasukkan ke baris E dan seterusnya hingga baris G.

Uji Toksisitas terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach.) dengan BSLT

Media udang yang sudah menetas (berisi 7-15 ekor) dipipet 100 μL dan dimasukkan masing-masing ke dalam lubang A-G pada mikroplate yang telah diisi sampel melalui pengenceran pada baris B. kemudian diinkubasi selama 24 jam kemudian dihitung jumlah larva yang hidup dan mati pada mikroplate. Data yang diperoleh akan dianalisis probit untuk menentukan nilai LC_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat Biji Alpukat (*Persea Americana* Mill.)

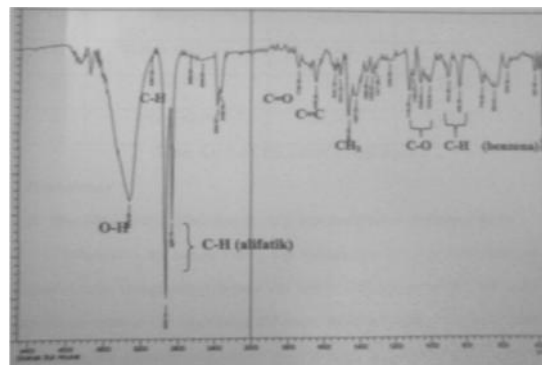
Sampel biji alpukat (*Persea Americana* Mill.) yang telah dimaserasi dengan pelarut etil asetat selama 3 x 24 jam dan dievaporasi sehingga diperoleh ekstrak kental etil asetat sebanyak 28,7565 gram selanjutnya dilakukan uji fitokimia. Hasil uji fitokimia diperoleh bahwa biji alpukat mengandung senyawa alkaloid, flavonoid dan steroid

Selanjutnya Ekstrak etil asetat kemudian difraksinasi KKCVC diperoleh 12 fraksi dan digabung menjadi 5 fraksi gabungan, yaitu fraksi A (fraksi 1-3), fraksi B (fraksi 4), fraksi C (fraksi 5-6), fraksi D (fraksi 7-8) dan fraksi E (fraksi 9-12) (Lampiran 9.3.). Fraksi D memungkinkan untuk dilanjut ke kromatografi kolom gravitasi karena menampilkan noda yang sederhana dan terdapat tanda-tanda Kristal. Hasil kromatografi kolom gravitasi diperoleh 34 fraksi dan digabungkan menjadi 3 fraksi gabungan berdasarkan kemiripan noda (lampiran 8.4.). Kristal yang diperoleh dari fraksinasi kolom gravitasi berupa Kristal berwarna putih kekuningan dan direkskristalisasi hingga murni yang ditandai dengan munculnya satu noda pada hasil KLT.



Gambar 1. Kromatografi Lapis Tipis Kristal

Kristal yang diperoleh selanjutnya di uji pereaksi, uji kemurnian dengan 3 sistem eluen dan identifikasi dengan spektroskopi IR. Hasil identifikasi terhadap uji pereaksi NaOH 10% menunjukkan positif terhadap flavonoid. Identifikasi diperkuat dengan hasil analisis spektroskopi IR berdasarkan serapan-serapan yang terlihat pada tabel dan spektrum di bawah ini:



Gambar 2. Hasil identifikasi spektrum spektroskopi IR

Pada daerah serapan yang lebar dengan bilangan gelombang 3309,85 adalah gugus O-H bebas. Puncak yang lebar tersebut terbentuk akibat dari vibrasi antarmolekul hidrogen. Terdapat gugus C-H (aromatik) pada gelombang 3080,32 diperkuat dengan adanya gugus C=C (aromatik) pada spektrum 1645,28 dan C-H (alifatik/alkana) pada gelombang 2922,16 dan 2850,79.

Gugus O-H yang diperoleh lebih diperkuat lagi dengan adanya serapan lemah dari gugus C-H sebagai corak substitusi pada inti aromatik (benzena tersubstitusi) dengan gelombang 846,75 cm^{-1} . Serapan pada spektrum 1739,79 cm^{-1} mengindikasikan adanya gugus C=O (karbonil) dan pada spektrum 1109,07-1018,41 cm^{-1} menunjukkan adanya C-O (alkohol). Dari serapan tersebut menunjukkan senyawa flavonoid. Sama halnya dengan penelitian sebelumnya, di mana memperlihatkan adanya serapan-serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi, diantaranya adalah pada 3417,4 cm^{-1}

yang menunjukkan adanya serapan melebar sebagai vibrasi ulur. Vibrasi pada $2922,6\text{ cm}^{-1}$ dan $2862,7\text{ cm}^{-1}$ memberi petunjuk adanya vibrasi -CH alifatik dan serapan khas C=O terkhelat dengan hidroksi ditunjukkan oleh bilangan gelombang $1740,8\text{ cm}^{-1}$. Berdasarkan data tersebut mempunyai vibrasi gugus -OH, gugus C=O, -CH alifatik dan diindikasikan sebagai senyawa flavonoid.

Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach.

Sampel uji (ekstrak kental, fraksi dan Kristal murni) yang telah dibuat, diencerkan dalam mikroplate hingga diperoleh konsentrasi sampel 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,50 ppm, 31,25 ppm, 15,62 ppm dan 7,81 ppm.

Hasil uji toksisitas ekstrak, fraksi dan kristal etil asetat biji alpukat, pada tabel berikut:

Tabel 1. Hasil Uji Toksisitas Biji Alpukat

No.	Sampel	LC ₅₀ (ppm)	Keterangan
1.	Ekstrak etil asetat	24,949	Toksik
2.	Fraksi D	8,204	Toksik
3.	Kristal murni	24,342	Toksik

Berdasarkan hasil analisis kurva perbandingan nilai probit kematian larva dan konsentrasi sampel, menjelaskan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka makin tinggi tingkat kematian larva.

Meyer (1982), menjelaskan bahwa suatu ekstrak menunjukkan aktivitas ketoksikan dalam BST jika ekstrak dapat menyebabkan kematian 50 % hewan uji pada konsentrasi kurang dari 1000 ppm. Pernyataan di atas menunjukkan ekstrak bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* karena memiliki nilai LC₅₀ < 1000 ppm.

Hasil pengujian ekstrak etil asetat biji alpukat dengan berbagai konsentrasi terhadap larva udang *Artemia salina* Leach diperoleh nilai LC₅₀ 24,949 ppm menunjukkan bahwa pada ekstrak etil asetat memiliki daya toksik yang sangat tinggi. Hasil ini pula diperkuat dengan hasil penelitian sebelumnya pada ekstrak etanol biji alpukat, di mana hasil tersebut menjelaskan bahwa pada ekstrak kental biji alpukat kering bersifat toksik dengan nilai LC₅₀ 36,078 mg/L.

Adapun hasil uji toksisitas yang diperoleh dari fraksi adalah bahwa fraksi tersebut memiliki efek sangat toksik dibandingkan dengan ekstrak dengan nilai LC₅₀ 8,204 ppm. Adapun hasil uji untuk yaitu nilai LC₅₀ kristal (senyawa murni) biji alpukat adalah 24,342 ppm dan memiliki efek sangat toksik.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

- Metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etil asetat biji alpukat (*Persea americana* Mill.) adalah senyawa golongan flavonoid.
- Nilai Lethal Concentration₅₀ (LC₅₀) dari ekstrak etil asetat dan senyawa murni dari biji alpukat (*Persea Americana* Mill.) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. masing-masing adalah 24,949 ppm dan 24,342 ppm.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disarankan sebagai berikut:

- Sebagai bahan informasi tambahan bagi peneliti lain yang ingin melakukan penelitian lebih lanjut mengenai biji alpukat (*Persea americana* Mill.)
- Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai kandungan metabolit sekunder biji alpukat (*Persea americana* Mill.) yang bermanfaat bagi kesehatan khususnya pengobatan kanker.
- Sebagai informasi bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya kimia organik bahan alam dan menjadi pemacu bagi pengembangan disiplin ilmu lainnya yang terkait, seperti biokimia, kesehatan, pertanian dan industri.

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, Makassar.
- Malangngi, L., dkk, 2012, "Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Antioksidan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.)", *Jurnal MIPA UNSRAT Online*, Vol 1 No 1 hal 5-10, <http://ejournal.unsratac.id/index.php/jmuo>, diakses 1 Januari 2013.
- Masroh, L. F., 2010, "Isolasi Senyawa Aktif dan Uji Toksisitas Ekstrak Heksana Daun Pecut Kuda (*Stachytharpheta jamaicensis* L. Vahl)", *Skripsi sarjana*, Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains Dan Teknologi Uin Maulana Malik Ibra.
- Zahra, U., 2012, "Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak n-Heksan dari Umbi Lobak (*Raphanus sativus* Lamk)", *Skripsi Sarjana*, Makassar: Jurusan Kimia UIN Alauddin Makassar.
- Zulrotun, A., 2007, "Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana*) Bentuk Bulat", *Karya Ilmiah*, Bandung: Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran.