

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIOKSIDAN 2-ETILHEKSIL-4-METOKSISINAMAT DARI EKSTRAK BIJI ALPUKAT (*Persea americana* Mill.)

Isolation and Identification of Antioxidant Compounds 2-Ethylhexyl-4-methoxycinnamate from Avocado Seed Extract (Persea americana Mill.)

Fauzy Rachman^{1)*}, Eris Septiana¹⁾, Rika Damayanti²⁾, Yadi¹⁾, Yatri Hapsari¹⁾, Siti Irma Rahmawati¹⁾, Fauzia Nurul Izzati¹⁾, Bustanussalam¹⁾, Partomuan Simanjuntak³⁾

¹⁾Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, Bogor, Indonesia, 169111

²⁾Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan, 126402

³⁾Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Serpong, Tangerang, 153143

INFO ARTIKEL

Article history:

Diterima: 03 Februari 2021

Direvisi: 23 April 2021

Disetujui: 21 Mei 2021

Kata kunci:

Persea americana; DPPH; metode peredaman radikal bebas

Keywords:

Persea americana; DPPH; free radical scavenging method

ABSTRAK/ABSTRACT

Alpukat (*Persea americana* Mill.) merupakan tanaman yang banyak ditemukan di daerah tropis seperti Indonesia. Selama ini masyarakat hanya memanfaatkan daging buahnya saja untuk dikonsumsi, kemudian bagian bijinya dibuang. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, menguji dan mengidentifikasi senyawa aktif antioksidan dari ekstrak biji alpukat yang dilakukan dari Januari sampai Juni 2018 di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI. Buah alpukat yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari Pasar Induk Cibitung, Bekasi. Ekstraksi dilakukan secara bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, etanol 96%, dan air. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas menggunakan reagen 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), penentuan struktur kimia senyawa aktif antioksidan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis, Spektroskopi Inframerah Transformasi Fourier (FTIR), dan GCMS. Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% memiliki aktivitas antioksidan tertinggi pada isolat EtOH.4.3.1 sebagai isolat paling aktif dengan IC₅₀ sebesar 23,07±1,63 µg.ml⁻¹. Hasil identifikasi berdasarkan data spektrofotometri UV-Vis, Spektroskopi Inframerah Transformasi Fourier, dan GCMS menunjukkan bahwa isolat EtOH.4.3.1 biji alpukat mengandung senyawa 2-etilheksil-4-metoksisinamat, yang terbukti memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Analisis lebih lanjut perlu dilakukan menggunakan spektrometri Resonansi Magnetik Inti (RMI) proton dan karbon untuk memastikan jumlah dan posisi proton serta karbon dalam struktur kimia tersebut.

Avocado (Persea americana Mill.) is a plant widely found in tropical regions such as Indonesia. Currently, people only consume the avocado flesh and dispose of the seed. This study aimed to examine the antioxidant activity, isolate and identify the active antioxidant structure from avocado seed extracts. The trial was conducted from January to June 2021 at the Chemical Laboratory of Natural Substance, Research Center for Biotechnology, LIPI. The avocado fruit used in this research was obtained from Cibitung Central Market, Bekasi. The solvents used in the extraction were n-hexane, ethyl acetate, 96% ethanol, and water with multilevel extraction. Antioxidant activity was tested using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical method. The structure of the active compound was determined using UV-Vis spectrophotometry, Fourier Transformation Infrared Spectroscopy (FTIR), and GCMS. The 96% ethanol extract had the highest antioxidant activity with EtOH.4.3.1 isolate as the most active antioxidant isolate with IC₅₀ 23,07±1,63 µg.ml⁻¹. The identification results of isolate EtOH.4.3.1 of avocado seed extract with UV-Vis spectrophotometry, FTIR, and GCMS indicated 2-Ethylhexyl-4-methoxycinnamate acting as an antioxidant. Further analysis with Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectrometry of protons and carbon is required to determine the number and position of protons and carbon in the chemical structure.

* Alamat Korespondensi : fauzy_heroes@yahoo.com

PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan yang menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan dengan mengikat ataupun menyerang elektron molekul di sekitarnya, sehingga memicu terbentuknya radikal baru karena terjadinya reaksi berantai (*chain reaction*) dan akan berhenti apabila diredam oleh senyawa antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat mencegah terjadinya proses oksidasi dengan mendonorkan elektron kepada senyawa radikal bebas sehingga reaksi berantai dapat dihentikan.

Masyarakat telah lama menggunakan tanaman untuk pengobatan atau menjaga kesehatan termasuk, alpukat (*Persea americana* Mill.). Ekstrak etanol daun alpukat pada konsentrasi 100 µg.ml-1 memiliki aktivitas antioksidan sebesar 96,95% (Pontoan 2016). Hal ini disebabkan daun alpukat mengandung flavonoid, kuersetin, dan polifenol (Anggorowati, Priandini and Thufail 2016). Biji buah alpukat juga mengandung senyawa golongan polifenol, flavonoid, triterpenoid, dan tanin (Rahman *et al.* 2015), Selama ini masyarakat hanya memanfaatkan daging buah alpukat saja untuk dikonsumsi, sedangkan bagian bijinya belum dimanfaatkan dan hanya dibuang sebagai limbah organik. Namun, beberapa penelitian menunjukkan bahwa biji alpukat memiliki khasiat untuk kesehatan, seperti antioksidan (Sutrisna *et al.* 2015), antikolesterol (Sunusmo *et al.* 2018), dan antibakteri (Nailufar 2017). Hasil penelitian Sutrisna *et al.* (2015) menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji alpukat tanpa maserasi bertingkat memiliki aktivitas antioksidan cukup baik, dengan nilai IC50 sebesar 41,5 µg.ml-1. Oleh karena itu, biji alpukat dapat dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan alami dan memberikan nilai tambah (Segovia *et al.* 2018).

Metode pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak biji alpukat biasanya dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas menggunakan reagen 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Metode DPPH memiliki beberapa keuntungan, yaitu sederhana, cepat, praktis, dan akurat (Christalina *et al.* 2017). Aktivitas antioksidan dari suatu ekstrak tanaman dapat diukur kekuatannya berdasarkan besarnya nilai IC50 (Inhibition Concentration 50). Apabila nilai IC50 < 50 µg.ml-1 maka dikategorikan memiliki antioksidan sangat kuat, IC50 antara 50-100 µg.ml-1 digolongkan kuat, IC50 berkisar antara 100-250 µg.ml-1 termasuk sedang, dan jika IC50 yang dimiliki antara 250-500 µg.ml-1 maka termasuk lemah (Suratmo 2009).

Hasil penelitian tentang aktivitas antioksidan dan identifikasi senyawa aktif yang berperan sebagai antioksidan dari biji alpukat masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan dan mengidentifikasi senyawa aktif antioksidan dari ekstrak biji alpukat.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan irisan kering biji alpukat

Penelitian dilakukan dari bulan Januari sampai dengan bulan Juni 2018 di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI. Buah alpukat yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Pasar Induk Cibitung, Bekasi, Jawa Barat pada bulan Januari 2018. Buah alpukat yang digunakan adalah buah yang sudah tua atau matang dengan ciri kulit berwarna hijau kehitaman dengan tekstur kulit kasar dan terasa empuk atau lunak ketika ditekan. Buah alpukat dibelah dan diambil bijinya, kemudian biji tersebut dicuci, diiris tipis dengan ketebalan kurang lebih 2 mm, selanjutnya dikeringkan di bawah sinar matahari selama tiga hari hingga diperoleh irisan tipis biji alpukat kering. Kekeringan biji alpukat didasarkan pada hasil pemeriksaan secara fisik bahwa irisan mudah hancur kalau diremas dengan tangan. Irisan tipis biji alpukat yang sudah kering disimpan dalam wadah bersih, kering, dan tertutup rapat.

Ekstraksi

Sebanyak 1 kg irisan biji alpukat yang telah kering diekstraksi secara bertingkat dengan teknik maserasi menggunakan pelarut non polar (n-heksana), semi polar (etil asetat), polar (etanol 96%), serta refluks menggunakan pelarut polar (air) untuk mendapatkan ekstrak kental biji alpukat. Irisan tipis biji alpukat kering dimaserasi dengan n-heksana selama 24 jam, lalu disaring, kemudian filtrat n-heksana dipekatkan menggunakan vacuum rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental n-heksana. Ekstraksi menggunakan pelarut n-heksana diulang sebanyak empat kali. Residu kemudian dimaserasi kembali dengan etil asetat selama 24 jam, kemudian disaring. Filtrat etil asetat dipekatkan menggunakan vacuum rotary evaporator sampai diperoleh ekstrak kental etil asetat. Ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat diulang sebanyak enam kali. Residu kemudian dimaserasi dengan etanol 96% selama 24 jam, lalu disaring. Selanjutnya filtrat etanol 96% dipekatkan menggunakan vacuum rotary evaporator hingga

diperoleh ekstrak kental etanol. Ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dilakukan sebanyak delapan kali. Residu direfluks dengan air sebanyak dua kali dan disaring, filtrat air dipekatkan menggunakan vacuum rotary evaporator, sedangkan residu terakhir dibuang. Rendemen dari ekstrak kental n-heksana, etil asetat, etanol, dan air dari biji alpukat diukur, kemudian diuji aktivitas antioksidannya dengan metode peredaman radikal bebas menggunakan reagen DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).

Uji aktivitas antioksidan

Pengujian awal aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal DPPH dilakukan pada konsentrasi 100 µg.ml⁻¹ untuk masing-masing ekstrak. Ekstrak dengan konsentrasi 500 µg.ml⁻¹ dipipet 600 µl dan direaksikan dengan 0,6 ml DPPH 0,4 mM kemudian ditambahkan metanol pro analisis sampai total campuran menjadi 3 ml. Campuran tersebut selanjutnya diinkubasi dalam waterbath dengan suhu 37°C selama 30 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm (Widowati *et al.* 2016). Nilai serapan yang diperoleh dari uji aktivitas antioksidan digunakan untuk menentukan persen peredaman hambatan yang dihitung dengan rumus.

$$\% \text{hambatan} = \frac{\text{serapan blangko} - \text{serapan sampel}}{\text{serapan blangko}} \times 100\%$$

Besarnya aktivitas antioksidan setiap ekstrak dan fraksi diukur berdasarkan nilai IC₅₀, semakin kecil nilai nilai IC₅₀, semakin kuat aktivitasnya. Antioksidan dinyatakan aktif bila menghambat radikal bebas lebih dari 80%, dinyatakan sedang bila menghambat radikal bebas 50-80% dan dinyatakan tidak aktif bila menghambat radikal bebas kurang dari 50%. Isolat yang diperoleh dari hasil KLT preparatif diuji aktivitas antioksidannya pada lima seri konsentrasi menggunakan reagen DPPH 0,4 mM, kemudian dihitung persen hambatan dan nilai IC₅₀. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak akan memiliki nilai absorbansi yang semakin kecil dan nilai persen inhibisi yang semakin besar. Nilai IC₅₀ diperoleh dari perpotongan garis antara daya hambatan dengan sumbu konsentrasi, kemudian dimasukkan ke persamaan $y = a + bx$ dimana $y = 50$ dan nilai x menunjukkan IC₅₀. Suatu ekstrak dinyatakan aktif apabila nilai IC₅₀ kurang dari 100 µg.ml⁻¹. Senyawa yang menunjukkan aktivitas antioksidan terkuat ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ terkecil, kemudian diekstraksi untuk dianalisis

kandungan senyawa kimianya secara spektrofotometri UV-Vis.

Penentuan fase gerak dengan kromatografi lapis tipis

Fase gerak yang digunakan untuk optimasi kromatografi kolom I ditentukan dengan melihat profil bercak yang dihasilkan dari fase gerak yang terdiri dari campuran dua atau lebih pelarut dengan perbandingan tertentu. Campuran pelarut yang digunakan sebagai fase gerak adalah n-heksana-etil asetat (1:1), diklorometana-metanol (20:1), diklorometana-metanol (10:1), diklorometana-metanol (6:1), diklorometana-metanol (2:1), dan diklorometana-metanol (1:1) dengan fase diam silika gel 60.

Fraksinasi dengan kromatografi kolom

Ekstrak biji alpukat dengan aktivitas antioksidan tertinggi difraksinasi dengan kromatografi kolom I secara gradien, dengan fase diam silika gel 60 dan fase gerak diklorometana, delapan formula diklorometana-metanol (20:1, 15:1, 10:1, 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1), dan metanol. Eluat ditampung menggunakan botol vial, kemudian dilakukan KLT untuk menentukan penggabungan eluat fraksi yang memiliki pola sama. Selanjutnya diuji aktivitas antioksidan dari fraksi gabungan hasil kromatografi kolom I dan gabungan fraksi hasil kromatografi kolom I yang mempunyai persen inhibisi tertinggi difraksinasi dengan kromatografi kolom II secara gradien yaitu diklorometana-metanol (10:1 dan 5:1). Setelah pengujian aktivitas antioksidan terhadap fraksi gabungan hasil kromatografi kolom II, gabungan fraksi hasil kromatografi kolom II dimurnikan dengan KLT preparatif dengan cara menotolkan sampel pada lempeng KLT kaca silika dalam bentuk pita, lalu dimasukkan ke dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan fase gerak etil asetat-metanol (10:1) dan hasil KLT preparatif diuji aktivitas antioksidannya kembali.

Identifikasi senyawa kimia antioksidan

Spektrum yang diperoleh dari spektrofotometri UV-Vis dianalisis untuk mengetahui panjang gelombang maksimum dan melihat ada atau tidaknya gugus kromofor pada isolat. Spektrum yang diperoleh dari spektrofotometri FT-IR dianalisis untuk melihat adanya gugus fungsional pada isolat berdasarkan bilangan gelombangnya. Kromatogram yang diperoleh dari Kromatografi Gas-Spektrometri Massa dianalisis untuk mengetahui kandungan

senyawa kimia berdasarkan pola fragmentasi dari fraksi tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen ekstrak biji alpukat

Rendemen ekstrak kental hasil maserasi bertingkat dari 1 kg irisan biji alpukat yang sudah kering dan ekstraksi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan etanol 96% adalah berturut-turut 8,31 g (0,83%), 12,02 g (1,20%), dan 21,97 g (2,20%). Residu dari proses maserasi pembuatan ekstrak etanol 96% dikumpulkan, kemudian direfluks menggunakan pelarut polar (air) dan diperoleh ekstrak kental sebanyak 5,22 g (2,09%). Hasil ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi, yaitu secara bertingkat dan tidak bertingkat, menghasilkan rendemen yang berbeda. Rendemen yang lebih banyak pada maserasi tidak bertingkat kemungkinan karena pelarut etanol 96% dapat menarik semua senyawa non polar dan polar dari simplisia biji alpukat. Sementara itu, pada ekstraksi secara bertingkat pelarut etanol 96% hanya menarik senyawa polar saja, sedangkan senyawa non polar sudah ditarik terlebih dahulu oleh pelarut non polar *n*-heksana dan senyawa semi polar ditarik oleh pelarut etil asetat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode maserasi tidak bertingkat lebih sesuai untuk ekstaksi serbuk kering biji alpukat.

Aktivitas antioksidan ekstrak biji alpukat

Uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH menunjukkan ekstrak etanol 96% paling aktif sebagai antioksidan dibandingkan ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan air dengan persen inhibisi sebesar 93,78%±0,13. Persen inhibisi tertinggi kedua adalah ekstrak air, kemudian diikuti dengan ekstrak etil asetat dan *n*-heksana (Tabel 1).

Tabel 1. Nilai inhibisi ekstrak biji alpukat pada konsentrasi 100 µg.ml-1

Table 1. Inhibition value of avocado seed extract at a concentration of 100 µg.ml-1

No.	Ekstrak/Extract	Inhibisi±St.Dev/ Inhibition±St.Dev (%)
1	<i>n</i> -heksana	9,61±1,10
2	etil asetat	32,72±0,99
3	etanol 96%	93,78±0,13
4	air	89,32±0,46

Rendahnya nilai inhibisi ekstrak *n*-heksana dan etil asetat diduga karena senyawa non polar dan semi polar yang memiliki aktivitas antioksidan hanya sedikit. Sementara nilai inhibisi yang tinggi dari ekstrak etanol 96% dan air diduga disebabkan karena senyawa polar yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan seperti senyawa polifenol, flavonoid, dan tanin cukup banyak (Indrawati *et al.* 2013). Aktivitas antioksidan dapat dihasilkan oleh senyawa lain selain fenol dan flavonoid yang ada di dalam tanaman (Septiana dan Simanjuntak 2018). Nilai inhibisi ekstrak air lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak etanol 96% meskipun sifat kedua pelarut sama-sama polar. Hal ini dikarenakan senyawa polar yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan sudah ditarik terlebih dahulu oleh pelarut etanol 96% (pelarut universal). Senyawa yang ditarik oleh pelarut air adalah senyawa sangat polar yang mungkin tidak dapat ditarik oleh pelarut etanol 96% seperti glikosida kompleks.

Nilai inhibisi dapat mengindikasikan suatu sampel memiliki aktivitas antioksidan tinggi ataupun rendah. Nilai inhibisi ekstrak etanol 96% dipilih untuk dilanjutkan ke tahap pemurnian dengan kromatografi kolom. Afinitas senyawa ekstrak air pada saat fase diam sangat kuat karena senyawa sangat polar bertemu dengan fase diam silika gel 60, sehingga menyebabkan proses isolasi menjadi lebih sulit karena bercak KLT akan berekor. Hasil kromatografi kolom I diperoleh 84 fraksi. Fraksi yang didapat kemudian diuji dengan KLT dan fraksi yang memiliki pola KLT sama kemudian digabung menjadi 6 fraksi gabungan (Tabel 2). Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH diperoleh fraksi EtOH.4 sebagai fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi. Peredaman radikal bebas dari fraksi EtOH.4 pada konsentrasi 100 µg.ml-1 yaitu sebesar 93,12%±0,11 (Tabel 2).

Tabel 2. Nilai inhibisi fraksi hasil kromatografi kolom I ekstrak etanol 96% biji alpukat pada konsentrasi 100 µg.ml-1

Table 2. Inhibition value fraction from column chromatography I of avocado seed extracted with ethanol 96% at a concentration of 100 µg.ml-1

No.	Kode Ekstrak/ Extract code	Inhibisi±St.Dev/ Inhibition± St.Dev (%)
1	EtOH.1	10,72±0,30
2	EtOH.2	2,29±0,82
3	EtOH.3	80,66±0,58
4	EtOH.4	93,12±0,11
5	EtOH.5	69,56±3,30
6	EtOH.6	29,08±3,68

Aktivitas antioksidan dari bahan yang diuji dinyatakan aktif apabila menghambat radikal bebas lebih dari 80%, aktivitas dinyatakan sedang bila menghambat 50-80% dan dinyatakan tidak aktif bila menghambat kurang dari 50% (Molyneux and others, 2004). Berdasarkan hasil uji tersebut fraksi EtOH.4 dan EtOH.3 dinyatakan aktif sebagai antioksidan, sedangkan untuk fraksi EtOH.5 dinyatakan sedang keaktifannya dan fraksi EtOH.1, EtOH.2, dan EtOH.6 dinyatakan tidak aktif sebagai antioksidan karena persentase hambatan untuk ekstrak biomassa di bawah 50%.

Berdasarkan hasil KLT sebelumnya, fraksi EtOH.4 belum menunjukkan satu bercak sehingga dilanjutkan ke tahap pemurnian, yaitu kromatografi kolom II dan diperoleh 87 fraksi. Fraksi yang memiliki pola KLT sama kemudian digabung menjadi 4 fraksi (Tabel 3). Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH diperoleh fraksi EtOH.4.3 sebagai fraksi yang memiliki persen inhibisi tertinggi bila dibandingkan dengan ketiga fraksi lainnya. Peredaman radikal bebas dari fraksi EtOH.4.3 pada konsentrasi 100 µg.ml⁻¹ yaitu sebesar 93,58%±0,13 (Tabel 3).

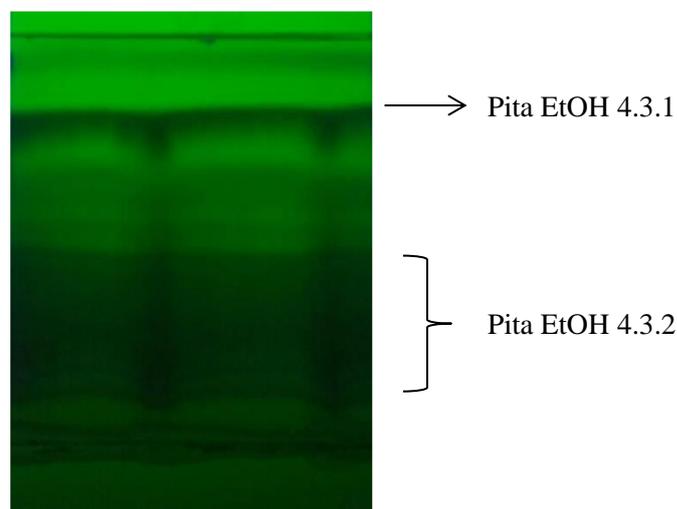
Tabel 3. Nilai inhibisi fraksi hasil kromatografi kolom II ekstrak etanol 96% biji alpukat pada konsentrasi 100 µg.ml⁻¹

Table 3. Inhibition value fraction from column chromatography II of avocado seed extracted with ethanol 96% at a concentration of 100 µg.ml⁻¹

No.	Kode Ekstrak/ Extract code	Inhibisi±St.Dev/ Inhibition±St.Dev (%)
1	EtOH. 4.1	22,67±1,28
2	EtOH. 4.2	71,75±1,14
3	EtOH. 4.3	93,58±0,13
4	EtOH. 4.4	86,15±1,96

Berdasarkan hasil uji tersebut, fraksi EtOH.4.3 yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, kemudian dimurnikan lebih lanjut menggunakan KLT preparatif untuk memudahkan pengambilan senyawa yang diinginkan dan dilanjutkan ke tahap identifikasi. Berdasarkan hasil optimasi fase gerak untuk KLT preparatif maka diperoleh fase gerak etil asetat-metanol (10:1) yang memberikan pemisahan komponen yang lebih baik.

Hasil analisis kromatogram KLT dari fraksi EtOH 4.3 ekstrak biji alpukat secara garis besar menunjukkan dua pita, yaitu pita EtOH.4.3.1 dan pita EtOH.4.3.2 (Gambar 1). Pemilihan banyaknya pita yang terlihat di bawah sinar UV 254 nm sesuai dengan banyaknya bercak yang muncul pada saat



Gambar 1. Kromatogram KLT preparatif fraksi EtOH 4.3 dari ekstrak etanol 96% biji alpukat

Figure 1. Preparative TLC chromatogram for EtOH 4.3 fraction from avocado seed 96% ethanolic extract

Keterangan:

Fase diam : silika gel GF₂₅₄

Fase gerak : etil asetat-metanol (10:1)

Keterangan : kromatogram dilihat di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm

Note:

Stationary phase : silica gel GF₂₅₄

Mobile phase : ethyl acetate-methanol (10: 1)

Description : chromatogram viewed under UV light with a wavelength of 254 nm

optimasi menggunakan fase gerak etil asetat-metanol (10:1). Hasil KLT preparatif dilanjutkan ke tahap identifikasi senyawa kimia secara spektrofotometri UV-Vis, FT-IR, dan GCMS dan diuji IC₅₀-nya menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH.

Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH menunjukkan isolat yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi adalah isolat EtOH.4.3.1 dengan persen inhibisi sebesar 90,67%±0,43 (Tabel 4). Nilai inhibisi isolat EtOH.4.3.2 jauh lebih rendah dibandingkan EtOH.4.3.1, mungkin disebabkan adanya kandungan pada fraksi EtOH.4.3 yang menurunkan aktivitas senyawa tersebut.

Tabel 4. Nilai inhibisi fraksi EtOH 4.3 biji alpukat hasil KLT preparatif pada konsentrasi 100 µg.ml-1

Table 4. Inhibition value of the EtOH fraction 4.3 of avocado seeds resulting from preparative TLC at a concentration of 100 µg.ml-1

No.	Kode Ekstrak/ Extract code	Inhibisi±St.Dev/ Inhibition±St.Dev(%)
1	EtOH. 4.3.1	90,67±0,43
2	EtOH. 4.3.2	59,86±1,61

Nilai IC₅₀ yang diperoleh dari isolat EtOH.4.3.1 yaitu sebesar 23,07±1,63 µg.ml-1 (Tabel 5). Nilai IC₅₀ yang diperoleh tergolong aktivitas antioksidan yang sangat kuat karena nilai IC₅₀ yang dimiliki kurang dari 50 µg.ml-1 (Suratmo 2009). Vitamin C digunakan sebagai kontrol positif karena memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat yang disebabkan oleh adanya empat gugus hidroksil pada strukturnya.

Vitamin C diuji aktivitas antioksidannya dengan metode peredaman radikal bebas DPPH dan diperoleh bahwa aktivitas antioksidan vitamin C tujuh kali lebih kuat dibanding isolat EtOH.4.3.1. Selanjutnya dilakukan identifikasi senyawa kimia secara spektrofotometri UV-Vis, FT-IR, dan GCMS untuk isolat EtOH.4.3.1.

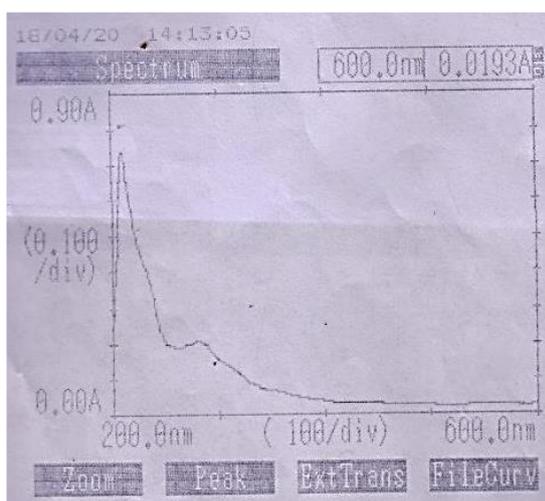
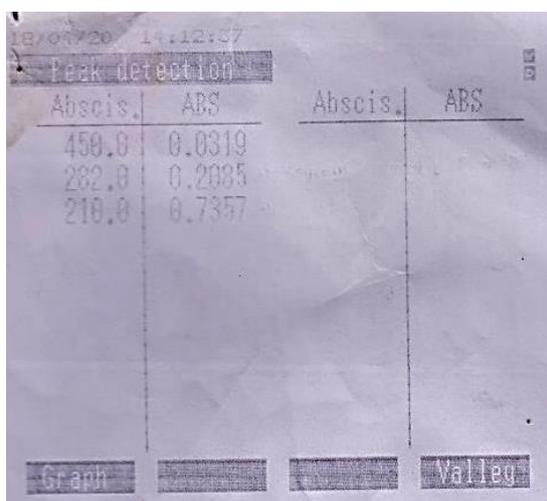
Analisis spektrofotometri UV-Vis

Pengukuran secara spektrofotometri UV-Vis dilakukan pada panjang gelombang 200-600 nm, memberikan serapan 0,2085 dan 0,7357 berturut-turut pada panjang gelombang 282 nm dan 210 nm (Gambar 2). Panjang gelombang maksimum (210 nm) memberikan serapan yang paling tinggi sehingga menunjukkan adanya gugus kromofor. Panjang gelombang maksimum 210 nm menunjukkan gugus acrolein (C₃H₄O) (Basseter and Silverstein, 1992). Selanjutnya, dilakukan identifikasi secara spektrofotometri FT-IR dan GCMS.

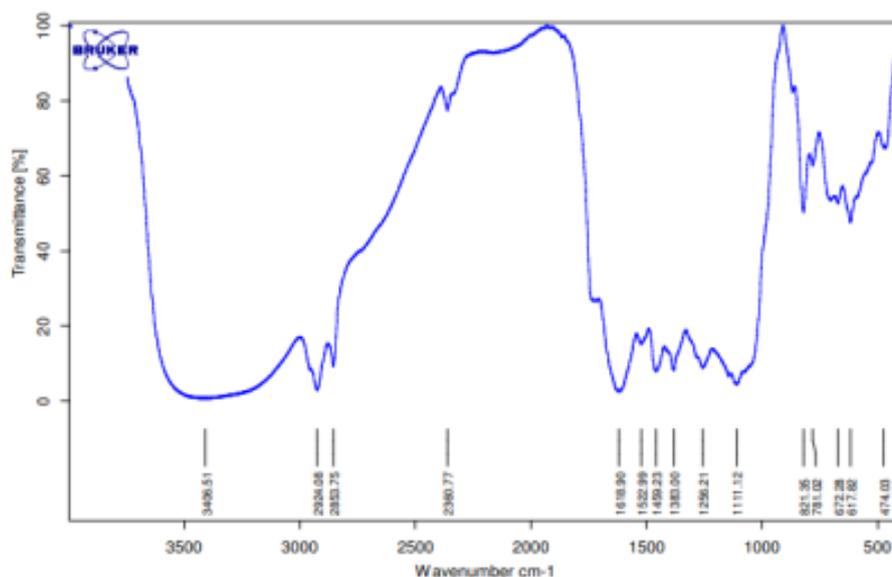
Tabel 5. Nilai IC₅₀ isolat EtOH 4.3.1 biji alpukat dan vitamin C

Table 5. IC₅₀ value of EtOH 4.3.1 isolate of avocado seed and vitamin C

No.	Kode ekstrak/ Extract code	Konsentrasi/ Concentration (µg.ml ⁻¹)	Inhibisi±St.Dev/ Inhibition±St.Dev(%)	IC ₅₀ ±St.Dev/ IC ₅₀ ±St.Dev (µg.ml ⁻¹)
1	EtOH 4.3.1	5	31,36±0,28	23,07±1,63
		10	41,26±2,15	
		25	56,96±1,46	
		50	73,51±0,35	
		100	92,55±0,37	
2	Vit. C	1	28,08±1,50	3,14±0,07
		3	45,71±0,14	
		5	70,75±0,14	
		7	95,50±0,49	
		9	96,30±0,35	



Gambar 2. Spektrum UV-Vis isolat EtOH.4.3.1
Figure 2. UV-Vis spectrum of EtOH isolates. 4.3.1



Gambar 3. Spektrum Spektroskopi Inframerah Transformasi Fourier senyawa dalam isolat EtOH.4.3.1 menggunakan cakram KBr

Figure 3. Fourier Transform Infra Red spectrum of compounds in EtOH.4.3.1 isolates using KBr disc

Tabel 6. Perkiraan gugus yang terdapat dalam isolat EtOH 4.3.1 dari ekstrak etanol biji alpukat
Table 6. Estimated groups contained in EtOH 4.3.1 isolates from avocado seed ethanolic extract

No.	Bilangan gelombang/ Wave number (cm ⁻¹)	Range bilangan Gelombang/Wave number range (cm ⁻¹)	Intensitas/Intensity	Ikatan/Bond
1.	1.256,21 1.111,12	1.050-1.300	Kuat	C-O
2.	2.924,08 2.853,75	2.850-2.970	Kuat	C-H Alkana
3.	821,35 781,02	675-995	Kuat	C-H Alkena

Analisis spektra kromatografi gas-spektrometri massa

Hasil analisis isolat EtOH.4.3.1 secara GCMS menunjukkan beberapa senyawa kimia dalam isolat yang ditandai dengan munculnya beberapa puncak kromatogram (peak) dengan ketinggian berbeda-beda (Tabel 7). Hal ini dapat disebabkan karena adanya faktor pengotor. Peak senyawa kimia yang terkandung di dalam isolat EtOH.4.3.1 dianalisis, terutama untuk senyawa yang memiliki kemiripan (qual) lebih dari 90%.

Berdasarkan analisis GCMS dari isolat EtOH.4.3.1 diduga senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan adalah 2-etilheksil-4-metoksisinamat karena memiliki nilai qual tertinggi sebesar 93% (Tabel 7). Identifikasi senyawa 2-etilheksil-4-metoksisinamat hasil analisis GCMS, juga didukung oleh analisis secara spektrofotometri UV-Vis dan FT-IR (Tabel 6). Pada spektrum FT-IR, isolat EtOH.4.3.1 mengandung gugus fungsi C-O, C-H alkana, dan C-H alkana, sedangkan

berdasarkan analisis spektrofotometri UV-Vis menunjukkan terdapat gugus kromofor acrolein pada panjang gelombang maksimum 210 nm dengan serapan sebesar 0,7357 (Gambar 2).

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa nilai persen inhibisi senyawa 2-etilheksil-4-metoksisinamat sebesar 96,5% lebih besar dari nilai persen inhibisi vitamin C sebesar 72,6% pada konsentrasi yang sama (Kumar *et al.* 2014). Tingginya persen inhibisi tersebut membuktikan bahwa senyawa 2-etilheksil-4-metoksisinamat memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, senyawa ini juga digunakan sebagai salah satu bahan penyusun dalam sediaan tabir surya karena dapat menyerap sinar pada panjang gelombang 290–320 nm pada daerah UV B (Anggraini and Hayun 2013). Berdasarkan struktur kimia yang diperoleh, kemungkinan mekanisme kerja antioksidan dari senyawa 2-etilheksil-4-metoksisinamat adalah dengan mendonorkan atom hidrogennya yang berikatan dengan karbon kepada senyawa radikal sehingga senyawa tersebut berubah

Tabel 7. Perkiraan senyawa yang terdapat pada isolat EtOH.4.3.1 berdasarkan analisis GCMS

Table 7. Possible compounds contained in EtOH.4.3.1 isolates based on GCMS analysis

No.	Waktu retensi/ Retention time (menit/minute)	Area (%)	Qual (%)	Kemungkinan senyawa/ Possible compounds
1.	30,634	3,84	93	2-etilheksil-4-metoksisinamat
2.	30,923	3,74	90	cholesta-3,5-diena
3.	29,855	9,88	70	asam oktadekanoat
4.	31,661	5,22	64	1,2-asam benzenedikarboksilat, di-2-propenilester
5.	28,675	24,04	50	asam butirat

menjadi lebih stabil. Semakin banyak gugus hidroksilnya maka semakin besar kemampuan menangkap radikal DPPH. Aktivitas antioksidan ekstrak biji buah alpukat diduga adalah hasil kontribusi senyawa fenolik. Senyawa fenolik dilaporkan mempunyai aktivitas antioksidan karena sifat redoksnya, yaitu berperan sebagai agen pereduksi, pemberi hidrogen, peredam oksigen singlet, dan juga sebagai pengkelat logam yang potensial (Febrianti and Zulfikar 2016).

Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% biji alpukat terbukti memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa IC50 ekstrak etanol 70% biji alpukat sebesar 41,5 µg.ml-1 (Sutrisna *et al.* 2015), dan nilai IC50 fraksi n-butanol biji alpukat sebesar 19,01 µg.ml-1. Kandungan metabolit sekunder pada biji alpukat yang merupakan senyawa antioksidan potensial adalah senyawa fenolik (Anggraeny *et al.* 2017), yang dapat dikonsumsi manusia.

Analisis lebih lanjut diperlukan untuk memperkuat data mengenai struktur senyawa yang telah diperoleh. Disarankan untuk menggunakan spektrometri Resonansi Magnetik Inti (RMI) proton dan karbon untuk memastikan jumlah dan posisi proton serta karbon dalam penentuan struktur senyawa kimia tersebut.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol 96% biji alpukat memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dibandingkan dengan ekstrak n-heksana, etil asetat, dan air. Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% memiliki aktivitas antioksidan tertinggi pada isolat EtOH.4.3.1 yang merupakan isolat teraktif dengan IC50 sebesar 23,07±1,63 µg.ml-1. Hasil identifikasi isolat EtOH.4.3.1 berdasarkan data spektrofotometri UV-Vis, FT-IR, dan GCMS menunjukkan bahwa isolat tersebut mengandung senyawa 2-etilheksil-4-metoksisinamat, yang terbukti memiliki aktivitas

sebagai antioksidan. Analisis lebih lanjut dengan spektrometri Resonansi Magnetik Inti (RMI) proton dan karbon diperlukan untuk memastikan jumlah dan posisi proton serta karbon dalam struktur kimia tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Laboratorium Kimia Bahan Alam, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI yang telah menyediakan sarana dan prasarana penelitian sehingga penelitian ini dapat diselesaikan tepat waktu.

PERNYATAAN KONTRIBUTOR

Fauzy Rachman, Eris Septiana, dan Yatri Hapsari berperan sebagai kontributor utama. Siti Irma Rahmawati, Fauzia Nurul Izzati, Bustanussalam, Yadi, Partomuan Simanjuntak, dan Rika Damayanti berperan sebagai kontributor anggota.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggorowati, D.A., Priandini, G. & Thufail, T. (2016). Potensi Daun Alpukat (*Persea Americana* Miller) sebagai Minuman Teh Herbal yang Kaya Antioksidan. *Industri Inovatif: Jurnal Teknik Industri*, 6 (1), 1–7.
- Anggraeny, D., Rumengan, Inneke, F.M., Djarkasi, Gregoria S.S., Suptijah & Pipih (2017). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) yang Disalut dengan Nanokitosan. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 5 (2), 6-11.
- Anggraini, T.D. & Hayun, D.J. (2013) Uji Stabilitas Fisik dan Penentuan Nilai SPF secara In Vitro dari Krim Tabir Surya yang Mengandung Butil Metoksidibenzoilmetan dan Oktil

Metoksisinamat dengan Penambahan Titanium Dioksida. Skripsi. *Universitas Indonesia*.

- Basseter, G.C. & Silverstein, R.M. (1992) Spectrophotometric Identification of Organic Compounds. *Wiley, New York*, p. 111.
- Christalina, I., Susanto, T.E., Ayucitra, A. & Setiyadi (2017). Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Alami Ekstrak Fenolik Biji Pepaya. *Widya Teknik*, 12 (2), 18–25.
- Febrianti, N. & Zulfikar, M. (2016). Aktivitas Antioksidan Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) dan Buah Stroberi (*Fragaria vesca* L.). *Prosiding Symbion (Symposium on Biology Education)*, 613–620.
- Indrawati, N.L. & Razimin, S.S. (2013). *Bawang Dayak: Si Umbi Ajaib Penakluk Aneka Penyakit*. AgroMedia.
- Kumar, V., Jahan, F., Kameswaran, K. & Mahajan, R.V. (2014). Eco-Friendly Methodology for Efficient Synthesis and Scale-Up of 2-Ethylhexyl-p-Methoxycinnamate Using *Rhizopus Oryzae* Lipase and its Biological Evaluation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Oxford University Press, 41 (6), 907–912. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1429-0>.
- Molyneux, P. (2004). The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakar J. Sci. Technol*, 26 (2), 211–219.
- Nailufar, L. (2017). *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Alpukat (Persea americana mill.) Terhadap Penutupan Luka Infeksi Staphylococcus aureus pada Mencit (Mus musculus)*. Diploma Thesis, Universitas Muhammadiyah Surabaya.
- Pontoan, J. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan dan Tabir Surya dari Ekstrak Daun Alpukat (*Persea americana* M.). *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal*, 1 (1), 55-66. <https://doi.org/10.52447/inspj.v1i1.241>.
- Putri, A.A.S & Hidajati, N. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Nyiri Batu (*Xylocarpus moluccensis*). *Unesa Journal of Chemistry*, 4 (1), 37-42.
- Rahman, S., Kosman, R. & Sudrianto (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Infusa Biji Alpukat (*Persea americana*) dan Biji Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Diabetes Mellitus dengan Parameter Mda. *As-Syifaa Jurnal Farmasi*, 7(1), pp. 34–42. doi : 10.33096/jifa.v7i1.23
- Segovia, F.J., Hidalgo, G.I., Villasante, J., Ramis, X. & Almajano, M.P. (2018). Avocado Seed: A Comparative Study of Antioxidant Content and Capacity in Protecting Oil Models from Oxidation. *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 23 (10), 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules23102421>.
- Septiana, E. & Simanjuntak, P. (2018). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Batang *Calophyllum pulcherrimum*, *C. soulattri* dan *C. teysmannii*. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*, 29 (2), 59–68. doi : 10.21082/bullitro.v29n2.2018.59-68
- Skoog, D.A., Holler, F.J. & Crouch, S.R. (2016). *Principles of Instrumental Analysis*. Cengage Learning.
- Sunusmo, Arlianto, R. & Sujono, T.A. (2018). *Uji Efektivitas Antikolesterol Ekstrak Biji Alpukat pada Tikus Jantan Galur Wistar Secara Invivo Beserta Skrining Fitokimia*. Skripsi thesis, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Suratmo (2009). Potensi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Antioksidan. [http://fisika.brawijaya.ac.id/dalam_Putri,A.A.S.dan_Hidajati,N.\(2015\)UjiAktivitasAntioksidanSenyawaFenolikEkstrakMetanolkulitBatangTumbuhanNyiriBatu\(Xylocarpusmoluccensis\)ActivityAntioxidantTestofPhenolicCompoundMethanolextractfromStemBarkNyiriBatu\(Xylocarpusmoluccensis\).UnesaJournalofChemistry,4\(1\),37-42](http://fisika.brawijaya.ac.id/dalam_Putri,A.A.S.dan_Hidajati,N.(2015)UjiAktivitasAntioksidanSenyawaFenolikEkstrakMetanolkulitBatangTumbuhanNyiriBatu(Xylocarpusmoluccensis)ActivityAntioxidantTestofPhenolicCompoundMethanolextractfromStemBarkNyiriBatu(Xylocarpusmoluccensis).UnesaJournalofChemistry,4(1),37-42)
- Sutrisna, E.M., Triharyanti, I., Munawaroh, R. & Mahendra, A.D. (2015). Efek Antioksidan Ekstrak Etanol 70% Biji Alpukat (*Persea americana* Mill) dengan Metode DPPH. *University Research Colloquium 2015*, 167-170.
- Widowati, T., Bustanussalam, Sukiman, H. & Simanjuntak, P. (2016). Isolasi dan Identifikasi Kapang Endofit dari Tanaman Kunyit (*Curcuma longa* L.) sebagai Penghasil Antioksidan. *Biopropal Industri*, 7 (1), 9–16.