



AVOCADO SEED EXTRACTS (*Parsea americana* Mill.) BIOACTIVE COMPOUNDS PROFILE AS A SOURCE OF ANTIOXIDANTS

Siti Jubaidah¹, Nurul Fatimah¹, Novi Milasari¹, Eka Kumalasari², Dwi R. Febrianti²

¹Departement of Pharmacy, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Samarinda, Samarinda, Indonesia

²Departement of Pharmacy, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan ISFI Banjarmasin, Banjarmasin, Indonesia

Submitted 24 February 2023; Revised 13 November 2023; Accepted 24 December 2023; Published 30 December 2023

*Corresponding author: ida_mapro13@yahoo.com

Abstract

The use of synthetic antioxidants in high doses is reported to be toxic and carcinogenic. Avocado seeds are not used because the waste in avocado seeds contains many phytochemicals. Research on avocado seeds has been carried out mainly as antioxidants using 70% and 100% ethanol solvents with the FRAP and DPPH methods. There is no detailed information on antioxidant testing using 95% ethanol solvent with the ABTS method (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) which is associated with active phenolic compounds, flavonoids and proanthocyanidins as chemical compounds which are natural sources of antioxidants. tall. The results of this research using 95% ethanol extract on avocado seeds contain secondary metabolites, namely alkaloids, flavonoids, saponins, tannins, and steroids. Has a phenolic content of 62.18%GAE±0.73, flavonoids of 0.157%QE±0.01, proanthocyanidins 2.1841 mg/L±0.25 With IC₅₀ vitamin C and a sample of 0.6419 mg/L±0,04 ; 3.2467 mg/L±0.27. This antioxidant activity has a very strong category. The results of data analysis using the LSD test showed the sig. 0.00 < 0.05 which can be concluded that there is a significant difference in the levels of phenolics, flavonoids, proanthocyanidins on antioxidant activity.

Keywords: Antioxidants, Avocados, ABTS, Phenolics, Flavonoids, Proanthocyanidins.

SENYAWA BIOAKTIF EKSTRAK BIJI ALPUKAT (*Parsea americana* Mill.) SEBAGAI SUMBER ANTIOKSIDAN

Abstrak

Penggunaan antioksidan sintetik dalam dosis tinggi dilaporkan bersifat toksik dan karsinogenik. Pada biji alpukat tidak dimanfaatkan karena limbah pada biji alpukat ini memiliki kandungan fitokimia yang banyak. Penelitian tentang biji alpukat telah banyak dilakukan terutama sebagai antioksidan menggunakan pelarut etanol 70% dan 100% dengan metode FRAP dan DPPH. Belum ada informasi secara terperinci pada pengujian antioksidan menggunakan pelarut etanol 95% dengan metode ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) yang dihubungkan dengan senyawa aktif fenolik, flavonoid dan proantosianidin sebagai senyawa kimia sumber antioksidan alami yang tinggi. Hasil dari penelitian yang telah dilakukan ini menggunakan ekstrak etanol 95% pada biji alpukat mengandung metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid. Memiliki kadar fenolik sebesar 62,18%GAE±0,73, flavonoid sebesar 0,157%QE±0,01, proantosianidin 2,1841 mg/L±0,25 Dengan IC₅₀ vitamin C dan sampel sebesar 0,6419 mg/L±0,04 ; 3,2467 mg/L±0,27. Aktivitas antioksidan ini memiliki kategori yang sangat kuat. Hasil analisis data menggunakan tes LSD menunjukkan nilai sig. 0,00 < 0,05 yang dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan pada kadar fenolik, flavonoid, proantosianidin terhadap aktivitas antioksidan.

Kata Kunci: Antioksidan, Alpukat, ABTS, Fenolik, Flavonoid, Proantosianidin.

1. Pendahuluan

Antioksidan merupakan zat yang memiliki kemampuan untuk memperlambat proses oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas. Salah satu mekanisme kerja bahan kimia antioksidan adalah mendonorkan atom hidrogen atau proton ke senyawa radikal sehingga dapat melengkapi kekurangan elektron yang dibutuhkan oleh radikal bebas dan memblokir pembentukan reaksi berantai yang membuat senyawa radikal lebih stabil¹.

Penggunaan molekul antioksidan dalam makanan dan obat berkembang pesat. Antioksidan terdiri dari dua bagian yaitu sintetis dan alami, tergantung dari sumbernya². Masyarakat banyak mengonsumsi antioksidan sintetis, antara lain *Butylated Hydroxyl Anisole* (BHA) dan *Butylated Hydroxyl Toluene* (BHT). Efek negatif dari antioksidan sintetis ini dikhawatirkan dapat menimbulkan efek samping yang berbahaya bagi kesehatan karena bersifat karsinogenik. Berbagai studi mengenai BHA dan BHT menunjukkan bahwa bahan tersebut secara *in vivo* dapat menimbulkan gangguan pada sistem endokrin pada tikus dengan dosis 75 mg/kg³. Antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan. Banyak bahan pangan lokal di Indonesia yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan alami. Namun, karena sangat sedikit publikasi tentang hal ini, hanya sebagian kecil individu yang mengetahui makanan daerah mana yang kaya akan antioksidan⁴.

Salah satu antioksidan alami yang dapat digunakan adalah tanaman alpukat. Sebagian masyarakat memanfaatkan tumbuhan ini hanya untuk diambil buahnya saja, sedangkan bagian lain seperti bijinya tidak dimanfaatkan karena tidak dimakan dan dibuang sebagai limbah⁵. Ampas biji banyak mengandung senyawa fitokimia yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan seperti: fenolik, flavonoid, tanin, saponin, oksalat, asam fitat dan alkaloid⁶. Senyawa tanin seperti turunan proantosianidin memiliki aktivitas antioksidan⁷.

Penelitian terhadap biji alpukat telah banyak dilakukan terutama sebagai antioksidan. Penggunaan pelarut etanol 70%

dan 100% memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dengan konsentrasi pekat, metode FRAP sebesar 0,73 mg/ml dibandingkan dengan etanol 70% yang hanya 0,28 mg/mL⁸. Aktivitas antioksidan biji alpukat menggunakan metode DPPH dengan pelarut etanol 70% dengan IC₅₀ sebesar 15,39 mg/L memiliki kategori kuat⁹. Faktor-faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi adalah jenis pelarut, rasio bahan pelarut yang digunakan¹⁰. Etanol adalah jenis pelarut yang sering digunakan untuk mengekstraksi pada tumbuhan dan tanaman herbal¹¹. Tidak ada informasi rinci tentang pengujian aktivitas antioksidan menggunakan pelarut etanol 95%, pelarut ini dapat menarik senyawa aktif yang bersifat polar dan non polar. Variasi kepolaran pelarut akan mempengaruhi jumlah ekstrak yang dihasilkan, komposisi fitokimia dan uji aktivitasnya¹². Hal ini dapat dijadikan acuan untuk pengujian antioksidan ekstrak dengan menggunakan konsentrasi yang berbeda, Metode pengujian antioksidan yang berbeda seperti metode ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid). Metode ABTS dapat digunakan pada pelarut air maupun pelarut organik lainnya seperti etanol dan memiliki waktu reaksi yang lebih cepat serta dapat bekerja pada rentang pH yang luas¹³.

Berdasarkan informasi di atas, maka perlu dilakukan kajian Potensi Biji Alpukat (*Parsea Americana* Mill.) sebagai Sumber Antioksidan dan pengujian senyawa bioktif yang terkandung di dalamnya seperti fenolik, flavonoid dan proantosianidin bagian dari tannin yang belum dilaporkan pada biji alpukat yang diperoleh dari Provinsi Kalimantan Timur. Pentingnya penelitian ini adalah limbah tumbuhan dapat dimanfaatkan sebagai obat herbal antioksidan bagi kesehatan.

2. Metode

2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik (OHAUS®), seperangkat alat gelas (Pyrex®), maserator (IKA®), batang pengaduk, ayakan *mesh* 60, mikropipet (Vitlab®), blue tip, kaca arloji, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-

1800®), kuvet, neraca analitik (Ohaus®) dan rak tabung reaksi.

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah aluminium foil, biji alpukat. Ethanol 95% (onemed®), HCl pekat 37% (Merck®), reagen Mayer, Bouchardat, Dragendroff, serbuk Mg, Amil Alkohol, FeCl₃ 10%, CH₃COOH Anhidrat, H₂SO₄ 98%, K₂S₂O₈, Kuersetin, ABTS, Asam Askorbat pa (Merck®), Na₂CO₃ 7,5% , Follin Ciocalteu, AlCl₃, Katekin pa. Semua bahan kimia yang tidak disebutkan secara rinci diperoleh dari Sigma (Sigma-Aldrich Jerman).

2.3. Prosedur

2.3.1. Persiapan ekstrak etanol biji alpukat

Serbuk simplisia digunakan sebanyak 200 g dengan pelarut etanol 95% sebanyak 2 L untuk mengekstraksinya dengan metode maserasi.

2.3.2. Skrining Fitokimia

Uji alkaloid dilakukan menggunakan pereaksi Mayer dan Wagner. Pisahkan tabung A dan B masing-masing menerima 0,01 mg ekstrak sebelum dikocok dengan 0,5 mL HCl 2% untuk memastikan campuran yang konsisten. Tabung A dan B masing-masing mendapatkan sekitar 2 sampai 3 tetes reagen Mayer dan reagen Wagner. Jika tabung A berwarna putih dan tabung B berwarna coklat, maka sampel tersebut mengandung alkaloid¹⁴.

Pengujian kandungan flavonoid dilakukan dengan cara 0,01 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan air mendidih secukupnya. Filtrat diambil sebanyak 5 mL dan ditambahkan 2 cm serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat kemudian dikocok. Jika terbentuk warna merah, kuning atau jingga menandakan adanya flavonoid¹⁴.

Teknik Forth digunakan untuk menganalisis kadar saponin dalam ekstrak. Sebanyak 0,01 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL air panas. Sampel akan membentuk busa kemudian ditambahkan 1 mL HCl 2N. Jika busa tidak hilang selama 30 detik maka ekstrak positif mengandung saponin¹⁴.

Pada pengujian tanin dalam ekstrak, dilakukan dengan tahapan beberapa tetes larutan besi (III) klorida 10% ditambahkan ke dalam 1 mL ekstrak. Jika terbentuk endapan biru tua atau hitam kehijauan, ekstrak tersebut positif mengandung tanin¹⁴.

Pengujian triterpenoid dan steroid pada sampel ekstrak biji alpukat, 0,01 mg dicampurkan dengan 2 mL kloroform 98% dalam tabung reaksi dan dikocok, disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap sampai kering kemudian ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat 98% dan 3 tetes H₂SO₄ 98%. Jika terbentuk warna merah, jingga, kuning maka sampel mengandung triterpenoid dan jika terbentuk warna hijau sampel mengandung steroid¹⁴.

2.3.3. Penentuan Kadar Fenolik

Sebanyak 0,1 mL ekstrak etanol tumbuhan ditambahkan 3,9 mL aquades dan 0,5 mL pereaksi Folin Ciocalteu (1:10 dalam air suling). Larutan didiamkan selama 3 menit kemudian ditambahkan 2 mL Na₂CO₃ 7,5% dan diukur absorbansinya pada λ maks 756,5 nm. Digunakan asam galat sebagai baku pembanding. Kandungan total fenol dinyatakan sebagai mg ekivalen asam galat tiap 1 g berat ekstrak. Pengukuran sampel dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

2.3.4. Penentuan Kadar Flavonoid

Ditimbang masing-masing ekstrak sebanyak 10 mg yang dilarutkan dengan etanol 95% sebanyak 10 mL, kemudian disaring dengan kertas saring sebanyak 2 kali. Larutan uji diambil 2 mL, kemudian direaksikan dengan 0,1 mL AlCl₃ 10% dan 0,1 mL Kalium asetat 1 M dan aquadest 2,8 mL. Larutan campuran tersebut didiamkan selama 30 menit dan diukur absorbansinya pada λ max 417 nm. Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Kandungan flavonoid dalam ekstrak etanol dinyatakan sebagai mg kuersetin/g berat ekstrak¹⁵. Pengujian dilakukan replikasi 3 kali.

2.3.5. Penentuan Kadar Proanthosianidin

Sampel ditimbang sebanyak 3 mg dilarutkan dalam 10 mL metanol. Kemudian,

0,5 mL ekstrak ditambahkan ke dalam 12,5 mL metanol dan dipanaskan selama 5 sampai 10 menit. Proses ini dilakukan sebanyak tiga kali. Jumlah tanin terkondensasi diukur dalam mg katekin/kg ekstrak.

2.3.6. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS

Pengujian prosedur dilakukan berdasarkan metode Emad A. Shalaby¹⁶. Larutan ABTS dibuat dengan mencampurkan 5 mL larutan 7 mM stok ABTS dan 5 mL larutan kalium persulfat 2,45 mM, campuran diinkubasi selama 12-16 jam. ABTS - kalium persulfate diambil sebanyak 1 mL dan ditambah etanol 95% sampai volume 50 mL. Ekstrak ditimbang sebanyak 50 mg dan dilarutkan dalam etanol 95% sampai 50 mL diencerkan dan dibuat konsentrasi (1,0; 1,5; 2,5; 3,5; dan 4,5 mg/L). Masing – masing konsentrasi ekstrak dicampur dengan 0,9 mL larutan ABTS. Campuran diinkubasi dalam ruang gelap selama 6 menit, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 748 nm dengan spektrofotometer uv-visible. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali dengan vitamin C sebagai pembanding. Nilai persentase redaman dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ peredaman} = \frac{(A \text{ Blanko} - A \text{ ekstrak})}{A \text{ Blanko}} \times 100\%$$

A Blanko = Absorbansi tidak mengandung sampel

A Ekstrak = Absorbansi Ekstrak

Hasil perhitungan % peredaman dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak (mg/L) sebagai absis (sumbu x), dan nilai % inhibisi antioksidan sebagai ordinat (sumbu y). Nilai IC₅₀ dihitung pada saat % nilai hambatan sebesar 50% dengan menggunakan **Tabel 1. Hasil Penapisan Fitokimia**

persamaan : $y = bx+a$

2.3.7. Analisis statistik

Data hasil penentuan kadar fenolik, flavonoid total dan proantosianidin dinyatakan dalam kadar rata-rata zat \pm SD. Hasil aktivitas antioksidan dinyatakan dalam rata-rata IC₅₀ \pm SD menggunakan versi Microsoft Excel 15 dan Data yang didapat diuji dengan statistik ANOVA jika data berdistribusi normal. Data yang berdistribusi normal dan homogen, selanjutnya diuji LSD (*Least Square Difference*) dengan tingkat kepercayaan 95%. Data diolah dengan menggunakan program IBM SPSS versi 22.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Penentuan Tumbuhan

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji alpukat. Bibit alpukat diperoleh di Jalan Wahid Hasyim, Kecamatan Samarinda Utara, Kabupaten Samarinda. Penentuan tumbuhan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Konservasi Keanekaragaman Hayati Hutan Tropis Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman Samarinda Kalimantan Timur. Hasil determinasi tanaman ini berdasarkan Nomor Surat hasil determinasi 138/UN 17.4.08/LL/2022 tanaman tersebut memiliki nama spesies *Persea americana* Mill. dengan nama Indonesia, Alpukat.

3.2. Tes skrining fitokimia

Uji skrining fitokimia merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui atau memberikan gambaran golongan senyawa yang terkandung dalam tumbuhan yang diteliti. Hasil uji skrining fitokimia ekstrak

	Golongan Senyawa	Hasil tes	Informasi
Alkaloid	Pereaksi Mayer	+	Terbentuk endapan berwarna putih
	Pereaksi Wagner	+	Terbentuk endapan coklat
	Reagen Dragendorf	+	Terbentuk endapan jingga
Flavonoid		+	Larutan berwarna jingga
Saponin		+	Busa Stabil
Tanin		+	Larutan Warna Hijau Kehitaman
Saponin		+	Larutan Warna Biru Kehijauan

etanol biji alpukat dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel berikut menunjukkan hasil uji skrining fitokimia terhadap keberadaan metabolit sekunder, seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid, dalam ekstrak etanol biji alpukat. Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Aloisius (2020)¹⁷ pada ekstrak methanol biji alpukat mengandung metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid.

Pengujian adanya metabolit sekunder flavonoid yang terkandung dalam suatu sampel dapat dilakukan pengujian serbuk Mg dan HCl pekat¹⁸. Pengujian flavonoid dikatakan positif jika terbentuk warna merah, jingga atau kuning pada lapisan amil alkohol¹⁹. Penambahan serbuk Mg dan HCl pekat pada uji fungsional flavonoid untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terjadi perubahan warna menjadi jingga, kuning, atau merah ungu yang membentuk garam flavilium²⁰.

Saponin merupakan senyawa aktif permukaan yang mudah dideteksi melalui kemampuannya membentuk busa. Adanya busa berkelanjutan pada ekstrak biji alpukat menunjukkan adanya bahan kimia saponin. Gugus saponin mengandung gugus glikosil polar dan gugus steroid dan triterpenoid non polar. Senyawa yang memiliki gugus non polar dan polar akan aktif dipermukaan²¹. Pengujian adanya metabolit sekunder saponin pada sampel menghasilkan buih atau buih selama kurang lebih 10 menit yang tetap bertahan meskipun telah ditambahkan HCl 2N, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji alpukat mengandung saponin. Hal ini sesuai dengan penelitian Alosius (2020)¹⁷ yang menyatakan bahwa munculnya buih menandakan adanya glikosida yang memiliki kemampuan membentuk buih pada air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Saponin berkhasiat sebagai antitusif, ekspektoran, dan memiliki aktivitas antiinflamasi karena dapat menghambat pelepasan zat proinflamasi yang dirangsang oleh lipopolisakarida²².

Tanin merupakan senyawa yang cenderung bersifat polar karena memiliki gugus hidroksi. Identifikasi senyawa tanin

dilakukan melalui penambahan $FeCl_3$ ¹⁷. Pada penelitian ini diperoleh warna hijau kehitaman sehingga tanin yang terdapat dalam ekstrak etanol biji alpukat menunjukkan bahwa senyawa tanin mengalami hidrolisis.

Uji triterpenoid/steroid berdasarkan kemampuan senyawa tersebut membentuk warna H_2SO_4 pekat dalam pelarut asam asetat anhidrida¹⁴. Prinsip dari reaksi ini adalah pelepasan H_2O dan penggabungan dengan karbokation. Hasil uji steroid/triterpenoid menunjukkan bahwa ekstrak biji alpukat positif mengandung steroid dengan warna hijau kebiruan. Senyawa ini berkhasiat sebagai antibakteri, pencegah serangga dan mikroba, meningkatkan stamina dan anti inflamasi^{22,23}.

3.3. Penentuan Kadar Fenolik

Kandungan fenolik ditentukan dengan menggunakan Folin-Ciocalteu reagen. Teknik kerja yang lebih sederhana dan digunakan pereaksi Folin-Ciocateau karena senyawa fenolik dapat bereaksi dengan Folin membentuk larutan yang dapat diukur absorbansinya. Larutan standar atau referensi yang digunakan adalah asam galat, yang merupakan fenolik alami dan stabil. Asam galat direaksikan dengan pereaksi Folin-Ciocalteu menghasilkan warna kuning yang menandakan mengandung fenolik, kemudian ditambahkan larutan natrium karbonat sebagai media basa. Selama reaksi berlangsung, gugus hidroksil pada fenolik bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu membentuk kompleks berwarna biru. Warna biru yang terbentuk akan semakin pekat, setara dengan konsentrasi ion fenolik yang terbentuk. Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka warna yang dihasilkan semakin gelap²⁴.

Pengukuran kandungan fenolik menggunakan spektrofotometri UV- Vis, kandungan fenolik pada ekstrak dinyatakan sebagai *Gallic Acid Equivalent* (GAE), yaitu jumlah miligram asam galat dalam setiap gram ekstrak. Kandungan fenolik total biji alpukat diperoleh sebesar 62,18% GAE \pm 0,73.

3.4. Penentuan Kadar Flavonoid

Berdasarkan hasil skrining fitokimia

ekstrak etanol biji alpukat mengandung senyawa flavonoid oleh karena itu penelitian dilanjutkan dengan penetapan kadar flavonoid dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Metode spektrofotometri UV-Vis dipilih karena metode yang sederhana, mudah, dan cepat dibandingkan dengan metode yang lain, selain itu dapat digunakan untuk analisis suatu zat berwarna maupun tidak berwarna dalam kadar kecil²⁵. Analisis kadar flavonoid dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis karena flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak²⁶.

Kajian ini menggunakan kuersetin sebagai larutan pembanding/standar karena merupakan senyawa yang paling luas penyebarannya. Kuersetin umumnya merupakan komponen yang paling banyak terdapat pada tanaman²⁷. Kuersetin juga merupakan salah satu senyawa golongan flavonoid yang dapat bereaksi dengan $AlCl_3$ membentuk kompleks. dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari golongan flavon dan flavonol²⁸.

Penentuan kadar flavonoid ini terdiri dari 4 langkah penelitian yaitu penentuan operating time, penentuan panjang gelombang, perhitungan kurva standar dan perhitungan kadar sampel.

a. Penentuan *Operating time*

Penentuan *operating time* bertujuan untuk menentukan waktu kerja paling baik atau paling stabil, yaitu saat sampel (kuersetin) bereaksi sempurna dengan reagen warna ($AlCl_3$). Waktu kerja ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan absorbansi²⁹. *Operating time* ditentukan dengan mengukur absorbansi dari larutan baku kuersetin pada konsentrasi 20 mg/L dengan panjang gelombang teori 417 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis, didapatkan operating time yang stabil pada menit ke 10 dengan absorbansi 0,675 diukur selama 30 menit.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum ini bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang pada serapan maksimum dari sampel atau mengetahui daerah pemberian serapan maksimum untuk analit yang akan dianalisa sehingga meningkatkan proses penyerapan larutan terhadap sinar³⁰. Penentuan panjang gelombang maksimum ditentukan dengan rentang 400-500 nm, diperoleh hasil yaitu 434 nm sedangkan teori gelombang panjang 417 nm.

c. Kurva Standar Determinasi

Kurva pengukuran baku bertujuan untuk mengetahui persamaan linier atau menghitung konsentrasi sampel melalui rumus persamaan garis yang diperoleh³¹. Penentuan kurva baku diperoleh dengan metode pembacaan absorbansi dalam larutan kuersetin pada konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25 mg/L. Setiap konsentrasi dilakukan pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 434 nm serta menggunakan blanko, blanko yang digunakan adalah etanol 95%. Hasil pengukuran absorbansi pada beberapa konsentrasi diperoleh persamaan $y = 0,0213x + 0,2371$ dengan nilai koefisien korelasi (R^2) = 0,9981. Persamaan tersebut digunakan sebagai pembanding dalam analisis kadar flavonoid kuersetin terhadap ekstrak etanol biji alpukat.

d. Pengukuran Kadar Sampel

Pengukuran kadar sampel dilakukan dengan cara menimbang ekstrak etanol biji alpukat sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam 10 ml etanol 95% sehingga didapatkan 1000 ppm. Dari larutan 1000 mg/L dipipet 2 mL masukkan kedalam tabung reaksi ditambah 0,1 mL $AlCl_3$ 10% dan kalium asetat M 0,1 mL dan aquadest 2,8 mL. Setelah itu diinkubasi selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan pembacaan absorbansi dengan panjang gelombang 434 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Fungsi dari penambahan $AlCl_3$ 10% untuk memberikan efek batokromik yaitu menggeser ke panjang gelombang yang lebih

tinggi, dan terjadi juga peningkatan intensitas larutan standar quersetin menghasilkan warna yang lebih kuning. Sehingga reaksi warna yang terbentuk dapat diamati dengan mata telanjang dan dapat diukur pada spektrofotometri UV-Vis, dan asam asetat 5% berfungsi sebagai penstabil agar efek batokromik yang terjadi dapat dipertahankan. Sedangkan perlakuan inkubasi (*Operating Time*) selama 10 menit bertujuan agar reaksi berjalan sempurna, sehingga memberikan intensitas warna yang maksimal³². Pengukuran serapan panjang gelombang maksimum dilakukan pada kisaran sekitar 350-550 nm³³.

Penentuan kadar flavonoid pada ekstrak etanol biji alpukat dilakukan dengan 3 kali pengulangan untuk mendapatkan keakuratan data dan mendapatkan hasil yang baik. Nilai absorbansi yang diperoleh dari spektrofotometri UV-Vis kemudian dihitung kandungan flavonoid total yang terkandung dalam ekstrak etanol biji alpukat menggunakan persamaan garis yang diperoleh dari kurva standar. Berdasarkan hasil penentuan kadar flavonoid pada ekstrak etanol biji alpukat, diperoleh kadar rata-rata sebesar 0,157%.

3.5. Penentuan Kadar Proantosianidin

Proantosianidin atau tanin terkondensasi merupakan oligomer atau unit polimer flavan-3-ol yang tersebar luas pada kelompok tanaman seperti apel, blueberry, coklat, anggur dan kulit kayu pinus. Flavonoid merupakan metabolit sekunder dari polifenol dan banyak ditemukan pada tumbuhan dan makanan serta memiliki berbagai efek biologis seperti antivirus, antiinflamasi³⁴, kardioprotektif,

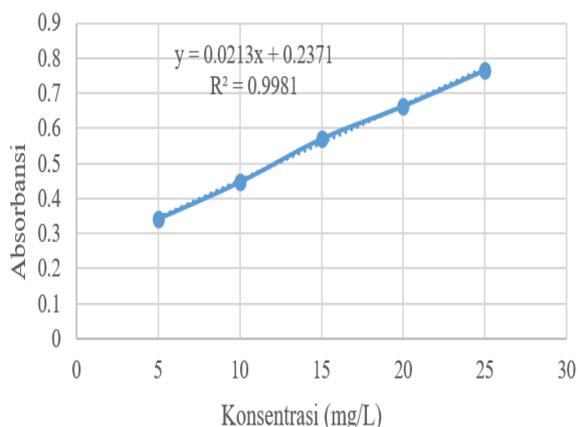
antidiabetik, antikanker³⁵, anti penuaan, dan antioksidan³⁶.

Kandungan proantosianidin berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan karena tanin terkondensasi/proaantosiandini merupakan salah satu antioksidan alami pada tumbuhan. Penentuan kadar dari proanthosianidin menggunakan katekin sebagai pembanding. Dilakukan dengan metode sederhana dengan menambahkan pelarut metanol pekat yang diukur pada serapan maksimum pada panjang gelombang 202 nm. Didapatkan kadar proantosianidin sebesar 2,1841 mg/L \pm 0,25. Kadar proantosianidin ini lebih kecil dibandingkan kandungan total fenol, karena senyawa aktif ini merupakan bagian dari senyawa fenolik yang terbentuk secara alami.

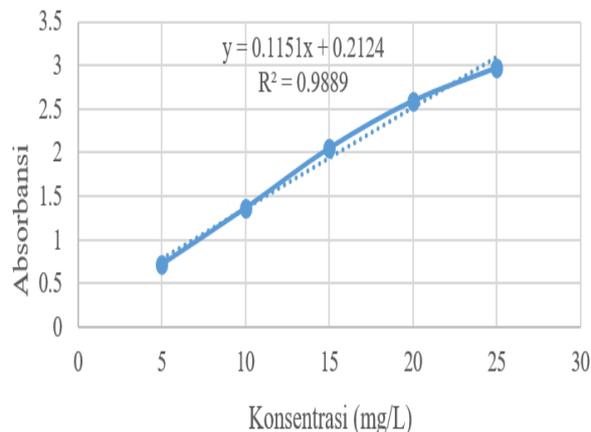
Larutan katekin dibuat dengan beberapa konsentrasi (5;10;15;20;25) mg/L. Diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,115x + 0,212$ dengan nilai koefisien korelasi (R^2) = 0,9889. Nilai R yang mendekati 1 menunjukkan kurva standar linier dan terdapat hubungan antara konsentrasi larutan katekin dengan absorbansi serapannya. Semakin besar konsentrasi maka akan semakin tinggi pula nilai absorbansi yang diperoleh dan dari hasil tersebut dapat dikatakan korelasi tersebut positif³⁷.

3.6. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Biji Alpukat

Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol biji alpukat dilakukan dengan menggunakan metode ABTS, metode ABTS merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan. Kelebihan



Gambar 1. Kurva Standar Kuersetin



Gambar 2. Kurva Standar Katekin

Tabel 2. Hasil Data Penelitian dan Kajian Literatur

Parameter	Hasil Penelitian menggunakan EtOH 95%	Literatur EtOH 70% (Ademoyegun et al, 2016)(8)
Fenolik	62,18% GAE \pm 0,73	5,03 mg GAE/100 g \pm 0,32
Flavonoid	0,157% QE \pm 0,01	0,46 mg/100g \pm 0,12
Proantosianidin	2,1841 mg/L \pm 0,25	0,15 mg/g \pm 0,04
IC50 Vitamin C ABTS	0,6419 mg/L \pm 0,04	-
IC50 Biji Alpukat ABTS	3,2467 mg/L \pm 0,27	-

metode ABTS yaitu dapat digunakan untuk pengujian pada senyawa lipofilik maupun hidrofilik³⁸, mudah larut dalam air dibandingkan metode DPPH, meskipun pada pengerjaannya menggunakan pelarut etanol karena untuk menyesuaikan dengan pelarut dari ekstrak yang digunakan dan metode ABTS memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi dalam mengidentifikasi aktivitas antioksidan karena memiliki kinetika reaksi yang lebih cepat dan memiliki respon lebih tinggi terhadap antioksidan³⁹. Prinsip metode ABTS yaitu suatu kemampuan antioksidan dalam menstabilkan senyawa radikal bebas dengan memberikan radikal proton dari suatu radikal bebas, hal ini terlihat dari penurunan warna hijau-biru menjadi tidak berwarna³⁸.

Pengukuran panjang gelombang maksimum pada penelitian ini dilakukan pada rentang panjang 650-800 nm. Larutan ABTS encer menggunakan etanol 95% memiliki panjang gelombang maksimum 748 nm. Vitamin C digunakan sebagai kontrol positif karena asam askorbat merupakan salah satu sumber antioksidan yang sangat kuat, stabil, dan mudah ditemukan serta memiliki harga yang terjangkau⁴⁰. Pada penelitian rangkaian larutan ini konsentrasi vitamin C yang digunakan adalah 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/L. Konsentrasi ini dipilih karena pada konsentrasi rangkaian larutan terdapat warna gradasi dari biru menjadi biru pudar, warna gradasi terjadi karena antioksidan memberikan elektron pada radikal ABTS sehingga terjadi perubahan warna dari biru kehijauan menjadi pudar atau bening. Semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi pula redaman radikal bebas oleh antioksidan dan warna larutan akan semakin pudar, reaksi antara radikal ABTS dan antioksidan berakhir jika larutan warna

menjadi tidak ada lagi atau bening⁴¹.

IC₅₀ adalah konsentrasi antioksidan yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas bebas⁴². Persamaan garis yang diperoleh berbentuk $y = bx + a$, dengan nilai y adalah 50 dan nilai x adalah IC₅₀⁴³. Berdasarkan penelitian diperoleh nilai IC₅₀ Vitamin C sebesar 0,6419 mg/L sehingga asam askorbat dapat dikategorikan sebagai antioksidan yang sangat kuat. Suatu senyawa yang memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 50 mg/L maka senyawa yang tergolong antioksidan aktivitasnya sangat kuat⁴⁴.

Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Biji Alpukat. Konsentrasi seri larutan dalam ekstrak yaitu 1,0; 1,5; 2,5; 3,5 dan 4,5 ppm. Perbedaan konsentrasi rangkaian larutan konsentrasi ditentukan oleh kemampuan pencelupan radikal bebas ABTS oleh ekstrak, perendaman yang dihasilkan terjadi perubahan warna larutan dari warna biru kehijauan menjadi pudar tidak berwarna³⁸. Semakin tinggi konsentrasi maka semakin banyak kandungan metabolit sekunder yang berkhasiat sebagai antioksidan dalam larutan uji, sehingga metabolit sekunder dapat mendonorkan atom H pada radikal bebas ABTS dan radikal ABTS menjadi lebih stabil.

Semakin kecil nilai IC₅₀ maka aktivitas antioksidan akan semakin baik⁴². Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antioksidan sebanyak tiga kali, nilai IC₅₀ ekstrak etanol biji alpukat sebesar 3,2467 ppm sehingga ekstrak etanol biji alpukat dapat dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat. Suatu senyawa yang memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm maka senyawa tersebut dikategorikan sebagai aktivitas antioksidan yang sangat kuat⁴⁴.

Senyawa aktif dari biji alpukat

yaitu fenolik, flavonoid, proantosianidin lebih banyak pada pelarut etanol 95% dibandingkan pelarut etanol 70%. Hal ini mempengaruhi bahwa pelarut dalam suatu ekstraksi merupakan faktor penting dalam bioaktif senyawa ekstrak pada tumbuhan. Pemilihan pelarut yang terbaik pada proses senyawa yang akan diekstrak adalah pelarut yang mudah dipisahkan (menguap) dan dimurnikan kembali.

Analisis hasil Berdasarkan uji LSD menunjukkan bahwa uji tersebut memiliki signifikansi $0,00 < 0,05$ dengan keputusan yang berarti terdapat perbedaan bermakna dari hasil kadar fenolik, flavonoid dan proantosianidin dengan aktivitas antioksidan.

4. Kesimpulan

Hasil penelitian ini diperoleh ekstrak etanol biji alpukat 95% mengandung metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid. Kadar fenoliknya sebesar 62,18% $GAE \pm 0,73$, flavonoid 0,157% $QE \pm 0,01$, proanthosiaanidin 2,1841 mg/L $\pm 0,25$ Dengan IC_{50} vitamin C dan sampel 0,6419 mg/L $\pm 0,04$; 3,2467 mg/L $\pm 0,27$. Aktivitas antioksidan ini sendiri termasuk kategori sangat kuat.

Ucapan Terimakasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada LPPM Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Samarinda yang telah memberikan dana penelitian internal ini pada pada Tahun 2022.

Referensi

- Pietta PG, Flavonoids as antioxidants, J. Nat. Prod., 2000 ; 63 (7):1035–1042.
- Cahyadi, W. Bahan tambahan pangan. Jakarta: Bumi Aksara. 2006
- Pop A, Berce C, Bolfa P, Nagy A, Catoi C, Dumitrescu IB, Silaghi-Dumitrescu L and Loghin F, Evaluation of the possible endocrine disruptive effect of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and propylgallate in immature female rats. Farmacia, 2013; 61(2), 202–211.
- Inggrid HM, Santoso H. Ekstraksi antioksidan dan senyawa aktif dari buah kiwi (*actinidia deliciosa*). (Disertasi). Bandung: Universitas Katolik Parahyangan; 2014.
- Oboh G, Odubanjo VO, Bello F, Ademosun AO, Oyeleye SI, Nwanna EE, Ademiluyi AO. Aqueous extracts of avocado pear (*Persea americana* Mill.) leaves and seeds exhibit anti-cholinesterases and antioxidant activities in vitro. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2016 ;27(2):131-40. doi: 10.1515/jbcpp-2015-0049. PMID: 26812783.
- Bahru TB, Tadele ZG, Ajebe EG, A review on avocado seed: functionality, composition, antioxidant and antimicrobial. Properties Chemical Science International Journal. 2019;27 (2): 1-10.
- De la R, Milagro, F.I, Campión, J, Boqué, N. and Martínez, J.A. Healthy properties of proanthocyanidins. BioFactors. 2010: 36 (2) :159-168. <https://doi.org/10.1002/biof.79>
- Ademoyegun, Olufemi, Adeboyejo, Folasade. Antioxidant properties of *persea americana* m. seed as affected by different extraction solvent. 10.13140/RG.2.1.1714.2165. Journal of Advances in Food Science & Technology. 2016;3(2): 101-106, International Knowledge Press www.ikpress.org
- Sutriningsih, Irna WA. Uji antioksidan dan formulasi sediaan make gel peel off dari ekstrak biji alpukat (*persea americana* mill) dengan perbedaan konsentrasi pva (polivinil alkohol). (Tugas Akhir) Fakultas Farmasi Universitas 17 Agustus 1945. Jakarta; 2017.
- Prasetyowati, R.P, Tera. F. Pengambilan minyak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan metode ekstraksi. Jurnal Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Sriwijaya, Palembang. 2010;17(2):16-24.
- Delazar, A., L. Nahar., S. Hamedeyaz dan, Satyajit SD. Microwave-assisted extraction in natural products isolation natural products isolation, methods in molecular biology. Springer Science, New York. 2012. 864:215-218

12. Buhian, W. et al. Bioactive metabolite profiles and antimicrobial activity of ethanolic extracts from *Muntingia calabura* L. leaves and stems. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016;6(8):682–685. doi: 10.1016/j.apjtb.2016.06.006.
13. Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, KM., Özyürek, M., Güçlü, K.. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 2013;85(5), 957–998. (diunduh 22 Desember 2023). Tersedia dari: <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>.
14. Sangi M, Runtuwene MR, Simbala HE. Analisis fitokimia tanaman obat di kabupaten minahasa utara . *Kimia.Prog* .2008;1(1):47–53.
15. Suryanto , E.; Wehantouw F. Aktivitas Penangkap radikal bebas dari ekstrak fenolik daun sukun (*Artocarpus altilis* F.). *Progres Kimia* . 2009;2(1):1-7
16. Shalaby EA, Shanab SM. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* . 2013;42 (5).
17. Aloisius M, Kopon, Anselmus B, Baunsele, Erly G. Boelan. Penapisan senyawa metabolit sekunder ekstrak metanol biji alpukat (*Persea Americana* Mill.) asal pulau Timor. *Jurnal Akta Kimia Indonesia*. 2020;5(1): 43-52.
18. Harbone JB. Metode panduan fitokimia untuk cara modern menganalisis tumbuhan. Diterjemahkan oleh Padmawinata , Penerbit K.ITB-Press. Bandung. 1987 : 103-234.
19. Marjoni R. Dasar fitokimia , CV Trans Info Media. Jakarta Timur; 2016.
20. Setiabudi DA, Tukiran. uji penapisan fitokimia ekstrak metanol kulit batang tanaman clampok watu (*Syzygium littorale*), *UNESA Journal Of Chemistry*. 2017;6(3):155-160.
21. Suryanto E, Wehantouw F. Aktivitas penangkap radikal bebas dari ekstrak fenolik daun sukun (*Artocarpus altilis* F.). *chemprog* [Diunduh 26 Desember 2023]. 2019;2(1):1-7. Tersedia dari: <https://ejournal.unsrat.ac.id/v3/index.php/chemprog/article/view/56>
22. Hasim., Arifin YY, Andrianto D. dan Faridah DN.. Ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antioksidan dan anti inflamasi , *Jurnal Teknologi Aplikasi Pangan*. 2019;8(3): 86-93.
23. Firdiyani F., Agustini TW, Ma'ruf WF. Ekstraksi senyawa bioaktif sebagai antiosida alami spirulina plantensis segar dengan pelarut berbeda, *JPHPI*. 2015;18(1), 28-37.
24. Tahir, M., Muflihunna , A., Syafrianti . Penentuan kandungan fenolik total ekstrak etanol daun nilam (*pogostemon kabin benth*) dengan metode spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia* . 2017;4(1):215. Tersedia dari: <http://www.jurnal.farmasi.umi.ac.id>
25. Asmorowati, Penetapan kadar flavonoid total alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan metode spektrofotometri. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 2019;15(2):51-63.
26. Aminah., Tomayahu , N., Abidin, Z. Penentuan kadar flavonoid total ekstrak etanol kulit buah alpukat (*Persea americana* Mill.) Dengan Metode Spektrofotometri Uv -Vis, *Journal Phytopharmaka Indonesia*. 2017; 4(2):226-230.
27. Koirwoa , YA, Fatimawali ., Wiyono , WI. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.). 2012:47-52.
28. Kamtekar S, Keer V, Patil V. Estimation of phenolic content, flavonoid content, antioxidant and alpha amylase inhibitory activity of marketed polyherbal formulation. *J Appl Pharm Sci*. 2014; 4(09):61-65.
29. Rastuti U, Purwati. Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun kalba (*Albisia falcataria*) dengan metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Pikrylhidrazyl) dan identifikasi senyawa metabolit sekunder. *Molekul* . 2012; 7(1):33-42.

30. Mangiwa S, Futwembun A, Awak PM. Kadar asam klorogenat (CGA) pada biji kopi arabika (*Coffea arabica*) asal wamena papua. *Jurnal Ilmu Pendidikan Kimia*. 2015; 3 (2):313-317.
31. Syamsul ES, Hakim YY, Nurhasnawati H. Penentuan kadar flavonoid ekstrak daun kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm.F.) Bedd.) dengan metode spektrofotometri UV-Vis. 2019;1(1):11-20.
32. Supriningrum R, Nurhasnawati H, Putri M. Penentuan kadar flavonoid ekstrak etanol umbi bawang tiwai (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) berdasarkan ukuran serbuk simplisia. *Ilmu Media*. 2017; 10(1): 42-46.
33. Jubaidah S, Nurhasnawati H. Penentuan kadar flavonoid total umbi tabar kedayan (*Aristolochia foveolata* Merr) *Jurnal Al-Kimia*. 2019;6 (2):138.
34. Wang Q, Jin J, Dai N, Han N, Han J, Bao B. Anti-inflammatory effects, nuclear magnetic resonance identification, and high-performance liquid chromatography isolation of the total flavonoids from *Artemisia frigida*. *J Food Drug Anal*. 2016 24(2):385-391.
35. Marzouk M. Flavonoid constituents and cytotoxic activity of *Erucaria hispanica* (L.) Druce growing wild in Egypt. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016 ; 9(1):411-415.
36. Munhoz V M, Longhini R, Souza JR. P, Zequi, J, Mello E, Lopes, GC Mello, JC. Extraction of flavonoids from *Tagetes patula*: Process optimization and screening for biological activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2014; (24):576-580.
37. Gandjar, IG, Rohman A. Analisis kimia farmasi. Yogyakarta: Perpustakaan Pelajar. 2007: 15-25.
38. Sukweenandhi J, Yunita O, Setiawan F, Kartini, Siagian MT, Danduru AP, Avanti C. Antioxidant activity screening of seven Indonesian herbal extract. *Jurnal Biodiversitas*. 2020;21(5):2062-2067.
39. Lee K.J., Oh. Y.V., Cho.W.K, Ma J.Y., online screening HPLC assay, Hindawi Publishing Corporation. 2015: 1-15.
40. Oliviera SD, Souza GA, Eckert CR., Silva TA, Sobral ES, Favero OA, Ferreira MJP, Romoff P, Baader WJ. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Quim Nova*. 2006;37(3):497-503.
41. Rahmatika A. Formulasi dan uji aktivitas sediaan antioksidan krim ekstrak etanol 70% daun ashitaba (*Angelica keiskei* Koidz) dengan setyl alcohol sebagai bahan pengaku (Skripsi). Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah ; 2017.
42. Azizah S, Nuramsiar. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun hutan kedondong (*Spondias pinnata* (L.) Kurtz.) dengan berbagai metode spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Wiyata*. 2019; 2 (1):25-28.
43. Wulansari AN. Cantigi ungu alternatif (*Vaccinium varingiaefolium*) sebagai antioksidan alami : Review, *Pharmaka Supplements*. 2018;16(2) : 419-429.
44. Sari WY, Yuliasuti D. and A Featurerahma A. Aktivitas antioksidan krim dari fraksi etanol stroberi 70% menggunakan metode DPPH, *Jurnal Farmasi*. 2020;9(2):107-112.