

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tanaman Alpukat Mentega**

##### **1. Klasifikasi Tanaman Alpukat Mentega.**

Tanaman alpukat mentega adalah jenis tanaman yang banyak dimanfaatkan buahnya. Dagingnya banyak dikonsumsi manusia, dapat dikonsumsi secara langsung maupun dikonsumsi sebagai jus dan kreasi minuman lain. Alpukat mentega merupakan buah beri besar dengan satu biji serta memiliki kandungan lemak tinggi. Kedudukan tanaman alpukat mentega dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan diklasifikasikan antara lain sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i> (Tumbuhan)
SubKingdom	: <i>Tracheobionta</i> (Tumbuhan Berpembuluh)
Super Divisi	: <i>Spermatophyta</i> (Tumbuhan Berbiji)
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i> (Tumbuhan Berbunga)
Anak divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i> (Tumbuhan Dikotil)
Sub Kelas	: <i>Magnoliidae</i>
Bangsa	: <i>Ranales</i>
Ordo	: <i>Laurales</i>
Famili	: <i>Lauraceae</i>
Genus	: <i>Persea</i>
Spesies	: <i>Persea americana</i> Mill

(Nurchayono, 2022).

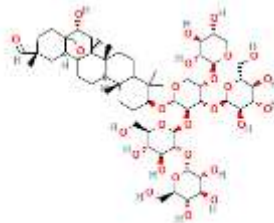
##### **2. Morfologi Tanaman Alpukat.**

Tanaman alpukat adalah tanaman yang ditanam secara monokultur yang awalnya banyak sekali tumbuh di Meksiko dan Amerika tengah. Hampir seluruh bagian dari tanaman alpukat mentega bisa dimanfaatkan mulai dari buah, batang dan kulitnya. Buah alpukat memiliki beragam jenis dan varietas, dan salah satu yang paling banyak digemari adalah alpukat mentega. Jika dilihat sekilas, bentuk alpukat jenis ini tak jauh berbeda dengan alpukat pada umumnya, akan tetapi buah alpukat jenis ini memiliki daging yang lebih lembut dan tebal karena kaya akan lemak. Tanaman alpukat mentega termasuk kategori jenis akar tunggang, dengan tekstur batang berkayu, bentuk daun alpukat mentega seperti bulat telur memanjang bertekstur tebal, bunganya tergolong bunga majemuk, buah alpukat mentega memiliki bentuk bulat

telur dengan warna hijau kekuningan, dan biji alpukat mentega terletak ditengah buah dengan bentuk menyerupai bulat telur (Elfianis, 2022).

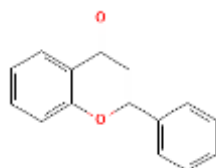
Buah alpukat kaya akan alkohol lemak, karotenoid, karbohidrat, turunan lignan, turunan furan, asam galat, kalium hingga 60%, antosianidin dan lain-lain. Berdasarkan hasil analisis Alsuhendra (2007) menyatakan biji alpukat mentega memiliki kandungan air sebesar 12,67% dan kandungan mineral 0,54% lebih tinggi dibandingkan biji buah lain. Biji buah alpukat mentega terdiri dari campuran kompleks senyawa polifenol. Selain itu, biji alpukat mentega mempunyai beberapa aktivitas biologi seperti aktivitas antioksidan, fungisida, hypolipidemic, antihipertensi, larvasida, dan amoebicidal. Biji buah alpukat menyumbang 13-18% berat seluruh buah yang tidak digunakan. Kurangnya penggunaan biji alpukat secara komersial hingga saat ini dikaitkan dengan tidak adanya informasi mengenai senyawa antinutrisi yang ada di dalamnya. Kehadiran zat-zat seperti oksalat, beberapa tanin, asam hidroksida, glikosida sianogenik-amigdalin dan persin yang terdeteksi dalam biji alpukat. Oleh karena itu, semakin banyak penelitian yang berfokus pada sifat-sifat berharga dari biji alpukat dan kemungkinan penggunaan lebih lanjut (MDPI, 2023).

Simplisia dan ekstrak etanol biji alpukat mentega memperlihatkan hasil bahwa biji alpukat mentega mengandung senyawa triterpenoid, kuinon, saponin, tanin, polifenol, flavonoid, monoterpenoid dan sesquiterpenoid (Naomi, 2016). Saponin (polar) yaitu metabolit sekunder kelompok glikosida triterpenoid atau steroid aglikon. Saponin terdiri dari satu atau lebih gugus gula yang berikatan dengan aglikon atau sapogenin, sehingga mampu membentuk kristal berwarna kuning dan amorf, berbau menyengat. Saponin sebagai senyawa non volatile dan sangat larut dalam air dan alkohol, akan tetapi membentuk busa koloid di dalam air dan bersifat detergen (Chapagain, 2005).



**Gambar 1. Struktur Kimia Saponin (PubChem, 2007)**

Flavonoid (polar) yaitu senyawa polifenol yang bersifat agak asam dan dapat larut dalam basa, karena merupakan senyawa polihidroksi (gugus hidroksil) maka juga bersifat polar yang dapat larut dalam pelarut polar seperti aseton, air, butanol, metanol, etanol, dimetil sulfoksida, dimetilformamida. Adanya gugus glikosida yang terikat pada gugus flavonoid mengakibatkan cenderung menyebabkan flavonoid mudah larut dalam air (Nurfauziah, 2016).



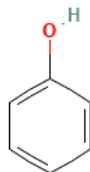
**Gambar 2. Struktur Kimia Flavonoid (PubChem, 2005)**

Alkaloid (polar) adalah sebuah golongan senyawa basa bernitrogen. Alkaloid juga tersedia dalam bentuk cair, misalnya nikotin dan koniin. Kebanyakan alkaloid juga tidak berwarna. Alkaloid hanya larut dalam pelarut organik dan bersifat basa. Kebasaan pada alkaloid mengakibatkan senyawa tersebut mudah mengalami dekomposisi terutama oleh panas dan sinar dengan adanya oksigen (Lenny, 2006).



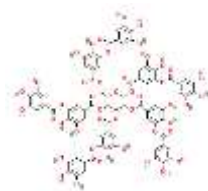
**Gambar 3. Struktur Kimia Alkaloid (PubChem, 2005)**

Golongan senyawa fenol bersifat polar, Senyawa fenol dan flavonoid merupakan senyawa yang dapat larut dalam pelarut polar hingga non-polar (Shahidi and Naczka., 1995). Fenol ( $C_6H_5OH$ ) memiliki bentuk cair, berwarna putih, memiliki titik didih  $181,75\text{ }^\circ C$  dengan spesifik gravity 1,07125/4 asam benzoat oksigen fenol karbon dioksida I- 6. Fenol yang direaksikan dengan formaldehid akan membentuk resin novolak yaitu monomethylol phenol (Rokhati, 2008).



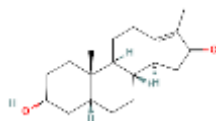
**Gambar 4. Struktur Kimia Fenol (PubChem, 2004)**

Tanjin memiliki gugus fenol dan sifat koloid, sehingga di dalam air bersifat koloid dan asam lemah. Semua jenis tanin dapat larut dalam air, dengan kelarutan yang tinggi dan meningkat dalam air panas. Tanin juga larut dalam pelarut organik seperti metanol, etanol, aseton, dan lainnya. Tanin umumnya memiliki berat molekul tinggi dan mudah teroksidasi menjadi polimer. Tanin berbentuk amorf dan tidak memiliki titik leleh. Warna tanin bervariasi dari putih kekuningan hingga coklat terang, tergantung pada sumbernya. Tanin berbentuk serbuk atau berlapis seperti kulit kerang, dengan bau khas dan rasa sepat (Browning, 1966).



**Gambar 5. Struktur Kimia Tanjin (PubChem, 2007)**

Steroid dan terpenoid bersifat non polar. Steroid merupakan cairan tidak berwarna. Steroid mempunyai bau yang khas, serta indeks bias tinggi, Steroid merupakan senyawa optik aktif, kerapatan lebih kecil dari air, larut dalam pelarut organik seperti eter dan alkohol (Sirait, 2007:213).



**Gambar 6. Struktur Kimia Steroid (PubChem, 2005)**

Alpukat memiliki kandungan vitamin E yang dapat menghaluskan kulit. Kombinasi vitamin A dan vitamin E dapat digunakan dan berguna sebagai perawatan kulit, berguna untuk membuat kulit menjadi kenyal, dapat menghilangkan kerutan, serta membuat kulit terlihat lebih segar dan muda. Alpukat mentega juga memiliki kandungan asam oleat yang berperan sebagai antioksidan yang sangat kuat untuk menangkap radikal bebas dalam tubuh manusia yang diakibatkan oleh polusi (Mustopa, 2015). Diketahui bahwa biji dari buah alpukat mentega memiliki kandungan senyawa fenolat yang berguna sebagai antioksidan (Soong dan Barlow, 2004).

## **B. Simplisia**

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (Depkes, 1979). Simplisia standar adalah simplisia yang telah memenuhi syarat mutu yang telah ditentukan (Depkes, 2008) diantaranya memenuhi kadar air (standar yang ditetapkan) menurut Farmakope Herbal Indonesia (Depkes, 2008). Simplisia dibagi menjadi 3 jenis yaitu simplisia dari sumber hewani, nabati serta mineral. Berikut ini adalah kelebihan dan kekurangan dari simplisia, Kelebihannya yaitu karena bersumber dari alam, maka kandungan obat-obatan kimianya terbilang lebih kecil dan memiliki efek samping rendah, cocok untuk penyakit degeneratif dan metabolik, komposisi yang baik dan saling mendukung efek pengobatan. Kekurangannya, belum terstandar, belum melalui uji klinik, mudah tercemar, dan efek farmakologis lemah.

Tahapan proses pembuatan simplisia terdiri dari beberapa rangkaian kegiatan, mulai dari sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering dan penyimpanan. Biji alpukat yang sudah disortir dibersihkan dan dicuci dari benda asing untuk menghindari kontaminasi, biji alpukat dipotong sehingga ukurannya menjadi lebih kecil untuk mempercepat proses pengeringan bawah matahari (secara tidak langsung) atau dengan diangin-anginkan, tujuan pengeringan dilakukan untuk mengurangi masa air pada biji, biji yang sudah kering dihaluskan menjadi serbuk dengan blender dan disaring dengan ayakan ukuran 40 mesh (Arisanti, 2010).

Mutu simplisia dilihat dengan standarisasi simplisia berupa pengujian kualitatif yang meliputi uji organoleptik, makroskopik, mikroskopik dan identifikasi kandungan kimia simplisia serta pengujian kuantitatif meliputi pengujian bahan organik asing, kadar air dan kadar abu (Pim, 2021).

## **C. Ekstraksi**

Ekstraksi adalah metode paling banyak digunakan untuk memisahkan senyawa suatu bahan alam. Ekstraksi ini dilakukan dengan menggunakan satu atau beberapa zat pelarut yang disesuaikan dengan senyawa yang ingin dipisahkan atau diambil. Ekstraksi dibedakan menjadi 2. Ekstraksi cair-cair, yaitu ekstraksi dengan proses pemisahan senyawa suatu larutan dengan memakai cairan sebagai bahan pelarutnya

dan ekstraksi padat-cair, yaitu proses ekstraksi dengan pemisahan senyawa dari padatan memakai cairan sebagai bahan pelarutnya. Pelarut yang direkomendasikan untuk proses ekstraksi yaitu pelarut yang memiliki daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang ingin diekstraksi. Hal ini dipengaruhi dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang ingin diekstraksi. Jika senyawa yang ingin diekstraksi bersifat polar maka disarankan untuk menggunakan pelarut yang juga memiliki sifat polar, begitupun sebaliknya (Sholihatin, 2019).

Prinsip metode maserasi ialah berdasarkan distribusi zat terlarut atau yang dapat larut dalam pelarut tertentu. Proses ekstraksi dengan teknik maserasi membutuhkan pengocokan atau pengadukan beberapa kali pada suhu ruang. Maserasi sangat mudah dan sangat sederhana karena cukup dengan merendam serbuk simplisia yang akan di ekstrak menggunakan pelarut selama beberapa hari di suhu ruang, maserasi cocok dilakukan untuk senyawa yang mudah rusak terhadap pemanasan. Metode ini dipilih untuk mengekstrak simplisia yang mudah larut dalam pelarut, bebas lilin, tiraks dan benzoin. Kelemahan metode ini adalah membutuhkan waktu yang cukup panjang (berhari-hari) dan menggunakan jumlah pelarut yang tidak sedikit (Sholihatin, 2019).

Pemilihan pelarut untuk ekstraksi pada penelitian ini didasari oleh Fadly dkk (2019) yang mengungkapkan bahwa etanol 96% merupakan pelarut yang paling maksimal menarik senyawa fenolik dan flavonoid. Selfiana (2019) menyatakan etanol 96% termasuk dalam kategori pelarut universal yang mampu menarik senyawa yang diinginkan. Etanol lebih aman digunakan karena bersifat netral dibandingkan dengan pelarut lain. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak biji alpukat etanol 96% dan etanol 70% berturut-turut adalah  $23,07 \pm 1,63 \mu\text{g/mL}^{-1}$  (Rachman *et al.*, 2017) dan 31,5 ppm (Sutrisna *et al.*, 2015), ini artinya aktivitas antioksidan yang dihasilkan oleh ekstrak etanol 96% biji alpukat lebih baik dari ekstrak etanol 70%.

Faktor yang mempengaruhi maserasi adalah suhu dan waktu maserasi, tujuan durasi maserasi yang lama supaya kontak antara pelarut dengan bahan yang akan diekstrak meningkat, sehingga lebih banyak bahan aktif yang terlarut. Semakin banyak volume pelarut yang ditambahkan dan semakin lama waktu maserasi yang dilakukan maka senyawa yang terekstrak yang didapatkan semakin banyak (Chairunnisa *et al.*, 2019).

#### D. Fraksinasi

Fraksinasi adalah teknik yang dipakai untuk mengelompokkan kandungan kimia suatu ekstrak berdasarkan dari tingkat kepolarannya. Proses fraksinasi memakai dua pelarut yang tidak bercampur dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak tersebut akan memisah menyesuaikan dengan tingkat kepolarannya (non-polar, semi-polar dan polar). Pelarut yang umumnya dipakai untuk fraksinasi adalah *n*-heksan (non-polar), etil asetat (semi polar), metanol (polar) ( Hawkins dan Rahn, 1997). Prinsip kerja fraksinasi yaitu memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran yang berbeda dalam dua pelarut yang berbeda pula kepolarannya. Pemisahan senyawa menjadi fraksi bergantung pada jenis simplisia (Pratiwi *et al.*, 2016).

Menurut Agus (2013) Fraksinasi bisa dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair (ECC), kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi kolom (KK), *size-exclusion chromatography* (SEC), *solid-phase extraction* (SPE). ECC (Ekstraksi cair-cair) merupakan proses pemisahan fase cair yang memanfaatkan perbedaan kelarutan zat terlarut yang akan dipisahkan antara larutan asal dan pelarut pengeksrak. Keunggulan lain dari ekstraksi cair dapat beroperasi pada kondisi ruang, dapat memisahkan sistem yang memiliki sensitivitas terhadap temperatur, dan kebutuhan energinya relatif kecil.

Prinsip dasar ekstraksi cair-cair melibatkan pengontakan larutan dengan pelarut lain yang tidak saling melarut dengan pelarut asal dan memiliki densitas berbeda, sehingga setelah beberapa saat penambahan pelarut akan terbentuk dua fasa. Hal ini menyebabkan perpindahan massa dari pelarut asal ke pelarut pengeksrak. Perpindahan zat terlarut ke dalam pelarut baru terjadi karena adanya dorongan yang muncul akibat perbedaan potensial kimia antara kedua pelarut.

Faktor yang dalam mempengaruhi kesempurnaan fraksinasi antara lain suhu, tekanan, kolom fraksinasi, dan rasio refluks. Hasil yang didapatkan dari serangkaian proses fraksinasi disebut dengan fraksi (Sidabutar *et al.*, 2022). Pada penelitian ini dipilih pelarut *n*-heksan, etil asetat, *n*-butanol dan air dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda. Air memiliki polaritas yang tinggi karena ikatan hidrogen dan perbedaan muatan dalam molekulnya, sementara *n*-butanol lebih non polar karena molekulnya lebih seimbang secara elektronik, *n*-butanol memiliki tingkat kepolaran yang berada di antara etil asetat dan air.

### **E. Antioksidan**

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang bertugas menjaga sel-sel tubuh dari kecacatan maupun kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Tubuh manusia alaminya memproduksi antioksidan dalam jumlah tertentu yang berfungsi untuk melawan berbagai radikal bebas dalam tubuh, tetapi radikal bebas yang terlalu banyak terkadang tidak dapat dikontrol atau dihadapi oleh antioksidan alami ini sehingga tubuh membutuhkan senyawa antioksidan tambahan untuk menghambat efek samping yang ditimbulkan radikal bebas. Prinsip kerja dari senyawa antioksidan yaitu melindungi sel tubuh dengan mengembalikan elektron pada sel yang tidak stabil. Kerusakan organ bisa dicegah dari radikal bebas yang menyerang. Radikal bebas dapat bersumber dari alat-alat elektronik seperti HP, TV, kemudian kondisi stres, merokok, sinar matahari (UV), bahan kimia, alkohol, polusi, junk food, dan tidak cukup waktu istirahat (Haerani *et al.*, 2018).

Radikal bebas diartikan sebagai molekul yang membawa satu atau bahkan lebih elektron yang tidak berpasangan dan mampu eksis secara mandiri. Radikal bebas mempunyai sejumlah elektron ganjil sehingga menjadikannya berumur pendek, bersifat sangat reaktif, dan juga tidak stabil. Radikal bebas dapat bereaksi sangat cepat dengan molekul lain dengan cara menangkap elektron untuk membuat dirinya menjadi stabil (KBBI). Radikal bebas akan menjadi seimbang dengan mengambil elektron pada molekul terdekat. Molekul yang diserang akan menjadi radikal bebas akibat dari kehilangan elektron dan terus-menerus memulai reaksi berantai sehingga menyebabkan kerusakan pada sel (Suryadinata, 2018). Radikal bebas terbentuk dari hasil metabolisme ataupun memang sengaja dibentuk untuk menetralisasi virus dan bakteri yang terdapat pada sistem imunitas tubuh manusia (Berawi dan Agverianti, 2017).

Kegunaan antioksidan antara lain adalah sebagai penangkal radikal bebas, pencegah kerusakan sel dan kerusakan organ, menghambat berbagai macam penyakit, seperti penyakit jantung, penyakit ginjal, stroke, menjaga kulit dan menghambat penuaan dini, selain itu juga dapat meningkatkan kualitas daya tahan tubuh manusia. Fitokemikal adalah antioksidan yang dimanfaatkan tumbuhan untuk melindungi diri dari radikal bebas. Adapun fitokemikal yang dikenal saat ini dibagi menjadi 4 golongan yaitu karotenoid, flavonoid, polifenol, dan alil sulfida (Kemenkes, 2022).



Mekanisme kerja antioksidan senyawa flavonoid yaitu menangkap ROS (*Reactive Oxygen Species*) secara langsung, lalu mencegah regenerasi ROS, dan meningkatkan aktivitas antioksidan enzim antioksidan seluler (Akhlaghi dan Bandy., 2009). Senyawa saponin meredam superoksida dengan pembentukan intermediet hiperoksida sehingga dapat mencegah kerusakan biomolekuler yang ditimbulkan oleh radikal bebas (Hasan *et al.*, 2022). Mekanisme alkaloid sebagai antioksidan mendonorkan atom H-nya pada radikal bebas (Chung dan Shin, 2007). Senyawa fenolat melawan radikal peroksida (ROO\*) (Adedapo, 2008) dan radikal hidroksil (HO\*), dengan mentransfer atom hidrogen, mentransfer elektron tunggal, kehilangan proton sekuensial, dan chelation logam transisi lalu membentuk reaksi fenoksi yang stabil (Lim *et al.*, 2007).

#### F. Metode Uji Antioksidan

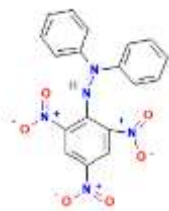
Pengujian aktivitas antioksidan dilihat berdasarkan mekanisme kerja (reaksi kimia) yaitu berbasis transfer atom *Hydrogen Atom Transfer Based* (HAT) dan transfer *Elektron Transfer Based* (ETB) (Gupta, 2015; Xiao *et al.*, 2020). Metode berbasis HAT mengukur aktivitas antioksidan dalam menjebak radikal bebas dengan donasi atom hidrogen, metode tersebut diantaranya *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC), total peroxy radical-trapping antioxidant parameter (TRAP),  *$\beta$ -Carotene bleaching assay* (Gupta, 2015; Pisoschi *et al.*, 2016). Metode berbasis ETB mengukur kemampuan reduktif antioksidan terhadap radikal bebas dengan mengandalkan transfer elektron, yang termasuk metode ini diantaranya *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), *cupric reducing antioxidant capacity* (CUPRAC), *Ferrous Ion Chelating* (FIC) (Gupta, 2015; Pisoschi *et al.*, 2016). 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), dan 2,2-azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid (ABTS) merupakan metode yang dianggap menggunakan kedua basis (HAT atau ETB) (Pisoschi *et al.*, 2016).

Prinsip metode pengujian FRAP yaitu kemampuan antioksidan dalam mereduksi kompleks ferri (Fe<sup>3+</sup>) dari *ferritripyridyl-triazine* (TPTZ) menjadi kompleks ferro (Fe<sup>2+</sup>) ditandai oleh perubahan warna menjadi biru dan dapat diukur pada panjang gelombang 593 nm (Dontha, 2016). Prinsip metode FIC mengukur kemampuan suatu senyawa antioksidan bersaing dengan ferrozine membentuk kelat

dengan ion besi (Elmastas *et al.*, 2006). Prinsip metode ABTS yaitu menstabilkan radikal bebas dengan mendonorkan proton kepada radikal bebas, ditandai dengan pemudaran warna dari warna biru kehijauan menjadi tidak berwarna seiring tereduksinya kation radikal ABTS (Shalaby *et al.*, 2014). Prinsip metode CUPRAC yaitu reaksi reduksi-oksidasinya sederhana antara antioksidan dengan radikal bebas, yang dapat diukur melalui reduksi ion cupri ( $\text{Cu}^{2+}$ ) menjadi cuprous ( $\text{Cu}^+$ ) dengan cara donor elektron oleh antioksidan (Dontha, 2016).

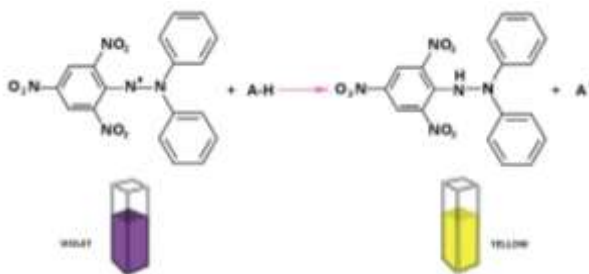
### G. Metode DPPH

Prinsip kerja dari metode DPPH yaitu reaksi oksidasi-reduksi (Purwanti, 2019). DPPH merupakan suatu radikal bebas sintetik yang dapat larut dalam senyawa polar seperti etanol dan metanol (Malik *et al.*, 2013). DPPH akan bereaksi dengan dua cara yaitu mekanisme donor atom hidrogen dan donor elektron, dimana DPPH yang bersifat radikal akan mengambil atom hidrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron (Apak *et al.*, 2013 Malik *et al.*, 2013).



Gambar 7. Rumus Kimia Bangun DPPH (PubChem, 2005)

DPPH (2,2 *diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dipakai untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan melalui kemampuannya menangkap radikal bebas. Aktivitas antioksidan diukur dan dinilai berdasarkan transfer elektron yang dilakukan oleh antioksidan. DPPH berwarna ungu pekat akan memberikan serapan maksimal pada panjang gelombang 517 nm tetapi setelah mengalami proses reduksi maka DPPH akan berubah menjadi senyawa *difenil pikril hidrazin* yang berubah warnanya secara berangsur-angsur memudar menjadi warna kuning dan nilai serapannya akan menunjukkan nilai yang sebanding dengan jumlah elektron yang diterima (Sunarni *et al.*, 2007).



Gambar 8. Reduksi DPPH oleh senyawa antioksidan (chimactiv, 2008).

Metode DPPH ini bisa memakai salah satu pelarut etanol atau metanol, dan dari pelarut tersebut tidak akan mempengaruhi reaksi antara sampel yang dipakai untuk uji aktivitas antioksidan dengan DPPH, intensitas warna dari larutan uji dinilai atau diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Uji aktivitas antioksidan ini memakai parameter berupa nilai konsentrasi efektif atau  $EC_{50}$  (konsentrasi efektif) atau bisa juga menggunakan nilai  $IC_{50}$  (konsentrasi hambat) (Marcelina, 2023).  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % radikal bebas DPPH. Semakin kecil harga  $IC_{50}$  maka antioksidan itu semakin kuat, sedangkan % inhibisi yang tinggi dikatakan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Cahyana, 2002).

Tabel 1. Kategori nilai  $IC_{50}$

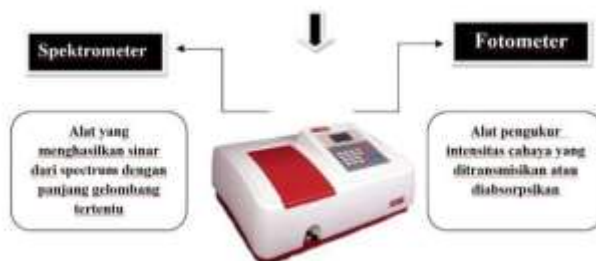
Konsentrasi (ppm)	Kategori
Kurang dari 50	Sangat kuat
51-100	Kuat
101-150	Sedang
151-200	Lemah
Lebih dari 200	Sangat lemah

Sumber : (Marcelina, 2023).

## H. Spektrofotometer

Spektrofotometer adalah gabungan dari spektrometer dan fotometer. Alat ini dipakai sebagai pengukur absorbansi sebuah sampel yang berfungsi sebagai panjang gelombang. Spektrofotometer UV VIS merupakan salah satu jenis dari spektrofotometer. Spektrofotometer UV VIS merupakan jenis spektrofotometer yang fungsinya adalah untuk mengukur di daerah *ultraviolet* dan di daerah yang tampak. Spektrofotometer UV VIS sering dipakai untuk menganalisis senyawa kimia. Kegunaan utama dari spektrofotometer yaitu untuk menganalisis berapa besar atau berapa banyak konsentrasi suatu senyawa yang diuji. Spektrofotometer UV VIS berfungsi untuk melakukan identifikasi nilai absorpsi sampel dari sumber sinar ultraviolet dan sumber sinar tampak.

Prinsip kerja spektrofotometer berfokus pada dispersi cahaya yang mana cahaya akan berpecah menjadi berbagai bagian spektrum warna. Spektrofotometer UV VIS memiliki prinsip yang berjalan lurus dengan Hukum Lambert (hukum yang menjelaskan tentang absorpsi atau penyerapan dengan intensitas cahaya) (Yusnia, 2022).



Gambar 9. Spektrofotometer UV-VIS (Jumriani, 2019)

### I. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis merupakan metode pemisahan kromatografi yang sudah banyak digunakan. Keuntungan metode analisis KLT dibandingkan metode analisis KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) adalah analisis dari beberapa sampel bisa dipakai secara simultan dengan memakai fase gerak jumlah kecil sehingga lebih hemat waktu dan biaya. Teknik pemisahannya sederhana dengan peralatan yang minimal dan juga ramah lingkungan (Wulandari, 2016). Prinsip kerja KLT adalah dengan memisahkan sampel berdasarkan kepolaran dari sampel dengan pelarut fase gerak yang dipakai. Teknik KLT menggunakan fase diam dalam bentuk plat tipis yang sudah dilapisi silika dan fase geraknya bisa berupa campuran air atau variasi pelarut organik lainnya. Tahapan kerja KLT terdiri dari proses adsorpsi, desorpsi, dan elusi. Adsorpsi terjadi saat larutan sampel ditotolkan ke fase diam (plat KLT) dengan pipa kapiler, komponen-komponen dalam sampel akan terabsorpsi di dalam fase diam, dan terelusi (Husna dan Mita, 2020). Mekanisme absorpsi sampel setelah penotolan pada plat dengan fase gerak yang berisi pelarut tunggal atau campuran beberapa pelarut di dalam chamber. Solut akan terbawa oleh fase gerak yang disebut dengan mekanisme elusi hingga mencapai jarak tertentu (Nugraha, 2021).

Tabel 2. Fase Gerak yang Umum Digunakan

Senyawa	Fase Gerak
Alkaloid	Etil asetat : Dietilamin : Toluena (2:1:7)
	Etil asetat : Ammonium : Toluena(2:1:7)
Flavonoid	Etil asetat : asam asetat : asam format : air (100:11:11:26)
	Etil asetat : asam format : air dengan berbagai perbandingan
Saponin	Kloroform : air : metanol (70:4:30)
	Butanol : Asam asetat : Air (5:1:4)
	Ammonia : etil asetat : air : etanol (1:65:9:25)
Tanin	Etil asetat : asam format : air dengan berbagai perbandingan, tidak atau dengan asam asetat
	Toluene : etil asetat (98:2)
	Etil asetat : heksana: asam asetat : eter (4:2:2:2)

Sumber: (Rafi *et al.*, 2017)

Reagen pereaksi yang digunakan untuk deteksi pada tiap senyawa metabolit menggunakan bahan yang berbeda-beda. Identifikasi pada senyawa alkaloid menggunakan pereaksi dragendorff, flavonoid dapat dideteksi dengan uap amonia atau dengan pereaksi sitroborat, untuk senyawa golongan steroid/triterpenoid dideteksi dengan lieberman buchard. Pereaksi  $FeCl_3$  dipergunakan secara luas untuk mengidentifikasi senyawa fenol termasuk tanin. Anisaldehyd asam sulfat adalah pereaksi semprot yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa terpenoid (Prastika *et al.*, 2021).

Rf (factor retardasi atau faktor retensi), merupakan perbandingan antara jarak yang ditempuh oleh komponen dengan jarak yang ditempuh eluen. Semakin besar nilai Rf dari sampel maka semakin besar pula jarak Bergeraknya senyawa tersebut pada plat kromatografi lapis tipis. Beberapa hal yang mempengaruhi nilai Rf antara lain adalah : suhu, jenis kertas, tebal kertas, dan jenis eluen. Berdasarkan mekanismenya, tergolong ke dalam kromatografi adsorpsi (Suhanda, 2012).

Nilai Rf dapat dihitung dengan rumus berikut :

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

## J. Landasan Teori

Alpukat salah satu tumbuhan yang dimanfaatkan masyarakat secara turun temurun sebagai bahan obat tradisional. Alpukat (*Persea americana* Mill.) merupakan tumbuhan yang banyak mengandung senyawa yang bersifat antioksidan (Suryanto, 2012). Hal tersebut dibuktikan dari uji pada ekstrak etanol daun alpukat  $IC_{50}$  24,863  $\mu\text{g/mL}$

(Anggorowati *et al.*, 2016), fraksi etil asetat  $IC_{50}$  16,51  $\mu\text{g/mL}$  (Insie, 2013), ekstrak etanol kulit alpukat  $IC_{50}$  5,03  $\mu\text{g/mL}$ , fraksinasi etil asetat kulit alpukat  $IC_{50}$  sebesar 2,78 $\mu\text{g/mL}$  (Pratiwi *et al.*, 2016). Ekstrak etanol 96% biji alpukat mentega  $IC_{50}$  sebesar 23,07 $\pm$ 1,63  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Rachman *et al.*, 2017). Berdasarkan data tersebut terlihat bahwa masing-masing fraksi bagian tanaman alpukat memiliki aktivitas antioksidan yang sangat baik, ekstrak biji alpukat dengan aktivitas antioksidan terbaik didapatkan dari ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%, serta dapat ditarik kesimpulan bahwa pelarut 96% memberi pengaruh nyata terhadap nilai  $IC_{50}$  dan fraksi etil asetat biji alpukat memiliki potensi aktivitas antioksidan yang sangat baik.

Senyawa metabolit sekunder yang memiliki potensi aktivitas antioksidan adalah fenolik. Fenol memiliki cincin benzena aromatik dan dinilai sebagai antioksidan yang paling melimpah. Senyawa fenolik, diantaranya asam fenolik, stilbenes, flavonoid, tanin, dan kumarin (Wardani *et al.*, 2020). Sebagian besar dari senyawa golongan alkaloid, tanin/polifenol, flavonoid, dan saponin merupakan senyawa yang bersifat semi polar atau polar (Hardiana *et al.*, 2012). Flavonoid dapat digolongkan sebagai senyawa polar karena memiliki sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi. Alkaloid bersifat polar, steroid dan terpenoid bersifat non polar (Sriningsih, 2009). Saponin bersifat polar karena dapat larut dalam pelarut seperti air tetapi saponin juga bersifat non polar karena memiliki gugus hidrofob yaitu aglikon (sapogenin) (Ningsih *et al.*, 2016) sehingga digunakan 4 pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda *n*-heksan (polar), etil asetat (semi polar), *n*-butanol (polar) dan air (memiliki tingkat kepolaran lebih tinggi dibandingkan dengan *n*-butanol) untuk menarik masing-masing senyawa tersebut.

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dalam penelitian ini adalah pelarut etanol 96%. Ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dilakukan karena etanol 96% merupakan pelarut universal yang mampu menarik senyawa yang bersifat polar hingga non polar maserasi dilakukan 2x24 jam dengan sesekali pengadukan agar mendapatkan hasil ekstrak yang lebih optimal (Ambaro *et al.*, 2020). Fraksinasi merupakan metode pemisahan senyawa yang didasarkan pada dengan prinsip sifat-sifat kelarutan komponen target dan distribusinya dalam berbagai pelarut tidak saling bercampur, sebagian komponen larut pada fase pertama dan sebagian larut pada fase kedua. Syarat pelarut

untuk fraksinasi yakni memiliki kepolaran yang sesuai dengan komponen target dan harus terpisah meskipun telah mengalami pengocokan saat proses ECC yang ditandai dengan terbentuknya dua lapisan fase yang tidak saling campur. Kelebihan dari metode ini adalah komponen bioaktif yang lebih spesifik dan waktu ujinya cepat (Nwodo, 2011). Pelarut yang dipilih dalam penelitian ini berdasarkan perbedaan tingkat masing-masing kepolaran. Pelarut *n*-butanol bersifat polar, *n*-heksan adalah pelarut non-polar, etil asetat bersifat semi polar dan air bersifat polar (Munawaroh *et al.*, 2010).

Metode DPPH dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu pelarut, baik etanol atau metanol, dari pelarut tersebut tidak akan mempengaruhi reaksi antara sampel yang dipakai untuk uji aktivitas antioksidan dengan DPPH, intensitas warna dari larutan uji dinilai atau diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Spektrofotometer UV VIS berfungsi untuk melakukan identifikasi nilai absorpsi sampel dari sumber sinar ultraviolet dan sumber sinar tampak. DPPH akan bereaksi dengan dua cara yaitu mekanisme donor atom hidrogen dan donor elektron, dimana DPPH yang bersifat radikal akan mengambil atom hidrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron (Apak *et al.*, 2013 Malik *et al.*, 2013). Pengurangan radikal DPPH bergantung pada jumlah gugus hidroksil dalam antioksidan, sehingga metode ini memberikan indikasi ketergantungan struktural atau kemampuan antioksidan dari antioksidan biologis. Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan prinsip spektrofotometri. Senyawa DPPH berwarna ungu tua dan terdeteksi pada panjang gelombang sekitar 517 nm dalam spektrum cahaya tampak. Senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan jika mampu mendonorkan atom hidrogen untuk berikatan dengan DPPH, membentuk DPPH tereduksi yang ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning pucat (Molyneux, 2004).

$IC_{50}$  (*inhibition concentration*), yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Semakin kecil harga  $IC_{50}$  maka antioksidan itu semakin kuat, sedangkan % inhibisi yang tinggi dikatakan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Nilai serapan larutan DPPH sebelum dan sesudah penambahan larutan uji dihitung sebagai persen inhibisi (% inhibisi). Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi ekstrak (ppm) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % inhibisi (antioksidan) sebagai

ordinatnya (sumbu Y). Nilai  $IC_{50}$  dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50%.  $Y = aX + b$  (Cahyana, 2002).

### **K. Hipotesis**

Pertama, ekstrak etanol 96% biji alpukat mentega (*Persea americana* Mill.) yang diuji dengan metode DPPH berpotensi aktivitas antioksidan dan menghasilkan nilai  $IC_{50}$  yang kuat.

Kedua, Fraksi etil asetat akan menghasilkan nilai  $IC_{50}$  paling baik.

Ketiga, golongan senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi teraktif antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan polifenol. Senyawa-senyawa tersebut diidentifikasi secara KLT.