

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah alpukat mentega (*Persea americana* Mill.) dari daerah Kecamatan Tawangmangu Kabupaten Karanganyar Jawa Tengah.

Sampel yang dipilih merupakan biji utuh buah alpukat mentega yang dipanen pada awal tahun (3 bulan pertama). Biji yang dipilih berasal dari buah matang yang daging buahnya bertekstur lembut dan tidak lembek akibat terlalu matang, tidak terlalu keras akibat belum matang dengan sempurna, biji yang masih segar, dan tidak rusak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama.

Variabel utama pertama penelitian ini adalah potensi aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol, air biji alpukat mentega ekstrak maserasi etanol 96% dengan metode DPPH. Variabel utama kedua berupa identifikasi secara KLT golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi dengan aktivitas antioksidan terbaik.

2. Klasifikasi Variabel Utama.

Variabel utama dilakukan setelah proses identifikasi, lalu dilakukan pengelompokkan ke dalam kategori variabel, meliputi: variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel terikat. Variabel bebas adalah kriteria yang dilakukan saat penelitian yang memiliki pengaruh pada variabel terikat. Variabel terikat tidak lain adalah inti dari persoalan penelitian yaitu pengaruh selain dari yang diakibatkan oleh variabel bebas. Penelitian ini terdiri dari variabel bebas yaitu fraksi biji alpukat mentega, variabel terikat berupa potensi antioksidan, dan variabel terkontrol yang terdiri dari variasi pelarut saat proses fraksinasi.

3. Definisi Operasional Variabel.

Pertama, buah alpukat mentega yang segar dan matang yang berasal dari Kecamatan Tawangmangu Kabupaten Karanganyar Jawa Tengah dibelah dua, pisahkan antara daging buah dan bijinya. Sampel dalam penelitian ini adalah kumpulan dari biji alpukat mentega yang telah dipilih.

Kedua, serbuk biji alpukat mentega yang dihasilkan adalah biji alpukat mentega yang sudah melewati proses sortasi basah berupa pengambilan dan pencucian dengan air mengalir bertujuan untuk memisahkan kotoran dengan sampel. Selanjutnya dilakukan pengeringan dengan cahaya matahari secara tidak langsung atau ditutup kain hitam polos, penyerbukan dengan bantuan blender dan pengayakan menggunakan ayakan ukuran no 40.

Ketiga, ekstrak biji alpukat mentega adalah hasil yang didapatkan dari proses ekstraksi dengan metode maserasi dengan penambahan pelarut berupa etanol 96% kemudian dipekatkan menggunakan alat *Rotary evaporator*.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah hasil fraksinasi ekstrak etanol 96% biji alpukat dengan pelarut *n*-heksan. Fraksi etil asetat adalah residu fraksi *n*-heksan yang difraksinasi dengan etil asetat. Fraksi *n*-butanol adalah residu fraksi etil asetat berupa air yang kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-butanol, dan fraksi air adalah sisa akhir fraksinasi.

Kelima, aktivitas antioksidan merupakan kegiatan suatu senyawa meredam radikal bebas dan bertugas menjaga sel-sel tubuh dari kecacatan maupun kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas.

Keenam, parameter yang dipakai untuk menilai potensi aktivitas antioksidan senyawa adalah dengan melihat nilai IC_{50} (*inhibitory concentration*). Persen inhibisi (% inhibisi) kemampuan senyawa antioksidan sampel menangkap radikal bebas pada konsentrasi larutan uji. IC_{50} merupakan konsentrasi suatu zat antioksidan dalam memberikan penghambatan sebesar 50%. Makin kecil IC_{50} maka antioksidan itu semakin kuat menghambat radikal bebas.

Ketujuh, analisis data dari uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*).

C. Bahan dan Alat

1. Bahan.

Bahan utama pada penelitian ini adalah tanaman alpukat mentega yang diperoleh dari Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Bahan lainnya berupa bahan-bahan kimia berupa etanol 96%, *n*-heksan, *n*-butanol, etil asetat, *aquades* dan senyawa DPPH, Bouchardat LP, asam asetat, sitoborat, uap ammonia, asam format, $FeCl_3$, kloroform, metanol, toluen, dietilamin, dragendorff, HCl pekat, kuersetin.

2. Alat.

Alat yang digunakan selama penelitian ini yaitu pisau, alat tulis, timbangan analitik, blender, ayakan mesh no 40, batang pengaduk, gelas ukur, gelas beker, pipet tetes, kertas saring, kain flanel, *rotary evaporator*, eksikator, botol maserasi, corong pemisah, stiker label, vial, jar, *blender*, *oven*, *aluminium foil*, gravimetri, spektro UV-Vis, kurs, corong kaca, corong plastik, tabung reaksi, korek, kaki tiga, seperangkat KLT, kain hitam, cawan, drigen, *ring*, tiang penyangga.

D. Metode Penelitian

1. Identifikasi Tanaman.

Identifikasi adalah proses yang dipakai untuk mengetahui keaslian suatu tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi pada biji alpukat mentega yang dilakukan di B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional) Tawangmangu, Karanganyar. Bagian tanaman yang dilakukan identifikasi tidak hanya bagian biji saja, melainkan dalam bentuk buah alpukat mentega yang utuh.

2. Pengambilan Bahan Penelitian.

Bahan penelitian berupa biji dari alpukat mentega didapatkan dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel yang diambil adalah biji alpukat mentega matang yang segar lalu dilakukan proses pengeringan untuk dibuat serbuk simplisia biji alpukat mentega.

3. Pengeringan Simplisia.

Biji alpukat mentega yang sudah dipisahkan dari daging buahnya dibersihkan dengan air yang mengalir lalu ditiriskan. Biji diiris tipis untuk mempersingkat proses pengeringan dan proses penyerbukan. Proses pengeringan dilakukan menggunakan oven temperature 40°C hingga kering (Santoso, 2015).

4. Pembuatan Serbuk Biji Alpukat Mentega.

Biji buah alpukat mentega yang sudah kering perlu disortasi terlebih dahulu agar tidak ada benda asing yang masuk. Setelah melalui proses sortasi kering biji alpukat mentega dilanjutkan ke proses pembuatan serbuk. Proses ini dilakukan dengan menggiling simplisia biji alpukat mentega dengan blender hingga dirasa cukup halus. Setelah digiling, serbuk simplisia diayak dengan ayakan mesh nomor 40, serbuk yang tidak lolos diblender kembali sampai semua serbuk lolos dari ayakan (Khasanah *et al.*, 2014).

5. Uji Karakteristik Serbuk Simplisia Biji Alpukat Mentega.

Pemeriksaan organoleptik serbuk simplisia biji alpukat mentega. Identifikasi serbuk simplisia biji alpukat mentega dilakukan secara organoleptis menggunakan mata telanjang meliputi bentuk, bau, rasa, warna dari serbuk simplisia (Rusli, 2019). Penetapan susut pengeringan serbuk simplisia biji alpukat mentega. Susut pengeringan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan dengan metode tertentu. Penelitian ini menggunakan metode gravimetri sebagai berikut, ditimbang dengan saksama 1 hingga 2 g simplisia dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu yang ditentukan dan ditara. Bahan dalam botol timbang diratakan dengan menggoyangkannya hingga membentuk lapisan setebal sekitar 5 hingga 10 mm. Masukkan botol ke dalam ruang pengering (*oven* 105°C) dengan tutup terbuka dan keringkan hingga beratnya tetap. Biarkan botol dalam keadaan tertutup dan mendinginkan dalam eksikator hingga mencapai suhu ruang. Dilakukan pengulangan sebanyak 3x untuk mendapatkan data yang baik, data yang didapatkan kemudian dicatat dalam *log book* (Menkes, 2017).

6. Pembuatan Ekstrak Biji Alpukat Mentega.

Ekstrak biji alpukat mentega dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% perbandingan 1 bagian serbuk simplisia kering dengan 10 bagian pelarut. Serbuk biji alpukat mentega sebanyak 500gr dimasukkan ke dalam botol maserasi, tambahkan 5000 mL pelarut etanol 96%. Serbuk direndam selama 6 jam pertama, sesekali dilakukan pengadukan, didiamkan selama 18 jam sehingga totalnya menjadi 24 jam proses maserasi. Hasil maserasi selama 24 jam dipisahkan dengan menggunakan kain flanel. Ekstraksi maserasi kemudian diulangi (re-maserasi) dengan pelarut etanol 96% sebanyak setengah volume dari volume ekstraksi pertama. Setelah proses re-maserasi selesai, seluruh maserasi dikumpulkan kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C sehingga diperoleh ekstrak kental biji alpukat mentega etanol 96%. Rendemen kemudian dihitung dengan menggunakan rumus. Rendemen ekstrak dihitung berdasarkan perbandingan berat akhir (berat ekstrak yang dihasilkan) dibagi dengan berat awal (berat biomassa sel yang digunakan) dikalikan 100% (Menkes, 2017).

7. Uji Karakteristik Ekstrak Biji Alpukat Mentega.

Uji organoleptik ekstrak biji alpukat mentega. Pemeriksaan ekstrak biji alpukat mentega secara organoleptik dengan mata telanjang meliputi bentuk, warna, dan bau dari ekstrak biji alpukat mentega. Penetapan kadar air ekstrak biji alpukat mentega. Penetapan kadar air ekstrak biji alpukat mentega menggunakan metode gravimetri. Metode Gravimetri yaitu dengan cara ditimbang seksama lebih kurang 10 g sampel, masukkan ke dalam wadah yang telah ditara. Keringkan pada suhu 105° selama 5 jam, dan timbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang pada selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,0005gram. Dilakukan pengulangan sebanyak 3x untuk mendapatkan data yang baik, data yang didapatkan kemudian dicatat dalam *log book* (Menkes, 2017).

8. Uji Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Biji Alpukat Mentega.

Identifikasi senyawa kimia atau uji fitokimia adalah metode pengujian awal untuk melihat kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak biji alpukat mentega. Uji fitokimia kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak biji alpukat ini menggunakan uji tabung.

8.1 Identifikasi Flavonoid. Ditimbang 1 gram ekstrak ditambah 10 mL air dan dididihkan selama 15 menit lalu disaring. Diambil 5 mL filtrat dan beri 3 tetes HCl pekat. Dikatakan positif jika hasil berwarna merah (Marcelina, 2023).

8.2 Identifikasi Tanin. Disiapkan 1 g ekstrak tambahkan 10 mL air panas dan dididihkan selama kurang lebih selama 15 menit dan saring. Filtrat diambil sebanyak 5 mL lalu ditambahkan FeCl₃ 1%. Uji dikatakan positif jika terbentuk warna biru kehitaman (Robinson, 1995).

8.3 Identifikasi Alkaloid. Ditimbang kurang lebih sekitar 500 mg ekstrak, kemudian ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air, lalu panaskan di atas penangas air selama 2 menit, setelah itu dinginkan dan saring. Diambil dan letakkan 3 tetes filtrat pada kaca arloji atau 5 ml filtrat masukkan dalam tabung, lalu tambahkan pereaksi Dragendorff. Jika terbentuk endapan, maka ekstrak mengandung alkaloid (Mustopa, 2015).

8.4 Identifikasi Saponin. Disiapkan 0,5 g ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 10 mL air panas kemudian dinginkan dan kocok kuat selama 10 detik, diamati busa yang

terbentuk stabil selama 10 menit dengan tinggi 1-10 cm, agar buih tidak hilang tambahkan 1 tetes HCl 2 N (Depkes RI, 1995).

8.5 Identifikasi Terpenoid. Disiapkan 1 g ekstrak tambahkan 10 mL air panas dan dididihkan selama kurang lebih selama 15 menit dan saring. Filtrat diambil sebanyak 5 mL lalu ditambahkan reagen H₂SO₄. Jika terbentuk warna orange atau merah maka positif terpenoid (Bahriul *et al.*, 2014).

9. Pembuatan Fraksi Biji Buah Alpukat.

Pembuatan fraksi biji alpukat metode ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah. Sejumlah 10 gram sampel ekstrak ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam beaker glass, ditambahkan pelarut etanol 96% (5-10 mL) ad 75mL *aquadest*. Larutan dimasukkan ke dalam corong pisah dengan penambahan pelarut *n*-heksan sebanyak 75 mL, fraksinasi dengan cara digoyang ke arah badan selama beberapa saat dan sesekali dibuka aliran udara corong pemisah.

Tiap tahap fraksinasi dengan pelarut yang berbeda dilakukan sebanyak 3 kali, pisahkan fase *n*-heksan (lapisan atas) dan fase air, tampung fase *n*-heksan di dalam wadah tertentu, hasil fraksinasi pertama diperoleh fraksi *n*-heksan. Fase air residu dari fraksi *n*-heksan ditampung dan difraksinasi kembali menggunakan pelarut etil asetat 75mL sebanyak 3x pengulangan, pisahkan fase air dan fase etil asetat, diperoleh fraksi etil asetat. Fase air atau residu fraksi etil asetat di fraksinasi menggunakan *n*-butanol 75mL sebanyak 3 kali dengan cara yang sama. Pisahkan fase *n*-butanol dan fase airnya, fase *n*-butanol yang ditampung disebut fraksi *n*-butanol. Diperoleh fraksi *n*-heksan, fraksi *n*-butanol, fraksi etil asetat dan fraksi air (fase residu) akhir fraksinasi yang dilakukan dengan metode ECC. Keempat fraksi yang sudah ditampung kemudian dipekatkan di *waterbath*.

10. Uji Potensi Aktivitas Antioksidan.

Pengujian potensi antioksidan fraksi-fraksi biji alpukat metode DPPH dengan pengukuran absorbansinya menggunakan alat Spektrofotometer UV-Vis, adapun tahapannya adalah sebagai berikut:

10.1 Pembuatan Larutan Stok DPPH 0,4mM. Rumus yang digunakan untuk mencari kebutuhan DPPH yang akan digunakan adalah $BM\ DPPH \times Vol\ Larutan \times Mol\ DPPH$, yang dihitung dari $BM\ DPPH$ sebesar $394,32\ g/mol \times 100\ mL \times 0,4\ mM = 15,77mg$. Ditimbang seksama serbuk DPPH 15,77 mg, kemudian dilarutkan menggunakan etanol pa sampai tanda pada labu takar 100mL, sehingga diperoleh

konsentrasi 0,4mM (157,7 ppm). Pembuatan DPPH dalam labu takar dilapisi aluminium foil (harus tertutup rapat). Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar (lapisi dengan aluminium foil) dan diukur serapannya (Susiloningrum dan Sari, 2021).

10.2 Pembuatan Larutan Baku Kuersetin Sebagai Kontrol Positif. Membuat larutan baku kuersetin dengan menimbang 10 mg serbuk kemudian dilarutkan di dalam etanol pa sebanyak 100 mL, setelah dihomogenkan maka didapatkan larutan baku kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm. Dibuat seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm (Susiloningrum dan Sari, 2021).

10.3 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Etanol 96% Biji Alpukat Mentega. Penimbangan ekstrak untuk replikasi pertama ditimbang sebanyak 51 mg. Replikasi kedua, ekstrak ditimbang sebanyak 51 mg. Replikasi ketiga, ekstrak ditimbang sebanyak 50 mg. Tiap-tiap penimbangan dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm, ekstrak dilarutkan menggunakan etanol pa. Tiap replikasi ekstrak etanol 96% biji alpukat mentega dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 20, 40, 60, 80, 100 ppm.

10.4 Pembuatan Larutan Stok Fraksi *n*-Heksan. Penimbangan fraksi *n*-heksan untuk replikasi pertama ditimbang sebanyak 50 mg. Replikasi kedua, fraksi *n*-heksan ditimbang sebanyak 51 mg. Replikasi ketiga ditimbang sebanyak 50 mg. Tiap replikasi penimbangan dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm yang dilarutkan menggunakan etanol pa. Larutan fraksi *n*-heksan tersebut dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 20, 40, 60, 80, 100 ppm.

10.5 Pembuatan Larutan Stok Fraksi Etil Asetat. Penimbangan fraksi etil asetat untuk replikasi pertama ditimbang sebanyak 50 mg. Replikasi kedua fraksi etil asetat ditimbang sebanyak 51 mg. Replikasi ketiga ditimbang sebanyak 50 mg. Tiap replikasi penimbangan dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm yang dilarutkan menggunakan etanol pa. Larutan fraksi etil asetat tersebut dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 20, 40, 60, 80, 100 ppm.

10.6 Pembuatan Larutan Stok Fraksi *n*-Butanol. Penimbangan fraksi *n*-butanol untuk replikasi pertama ditimbang sebanyak 50 mg. Replikasi kedua fraksi etil asetat ditimbang sebanyak 50 mg. Replikasi ketiga ditimbang sebanyak 50 mg. Tiap replikasi penimbangan dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm yang dilarutkan menggunakan etanol pa. Larutan fraksi *n*-butanol tersebut dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 20, 40, 60, 80, 100 ppm.

10.7 Pembuatan Larutan Stok Fraksi Air. Penimbangan fraksi air untuk replikasi pertama ditimbang sebanyak 50 mg. Replikasi kedua fraksi etil asetat ditimbang sebanyak 50 mg. Replikasi ketiga ditimbang sebanyak 50 mg. Tiap replikasi penimbangan dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm yang dilarutkan menggunakan etanol pa. Larutan fraksi air tersebut dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 20, 40, 60, 80, 100 ppm.

10.8 Penentuan Panjang Gelombang (λ maks) DPPH. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengetahui daerah serapan dari larutan DPPH yang menghasilkan nilai absorbansi dengan memakai spektrofotometri Uv-Vis (Sukmawati et al., 2018). Di pipet 1 mL larutan stok DPPH 0,4mM ke dalam labu takar 5mL ditambah etanol p.a. Hingga tanda batas. Campuran tersebut dihomogenkan, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500-525 nm (Susiloningrum dan Sari, 2021).

10.9 Penentuan *Operating Time*. Larutan stok DPPH 0,4mM di pipet 1 mL, dimasukkan dalam labu takar 5 mL lalu ditambahkan etanol pa sampai tanda batas, dari larutan tersebut kemudian dipipet sebanyak 2 mL dan ditambahkan dengan 2 mL seri konsentrasi terkecil larutan sampel. Penentuan *operating time* dilakukan pada panjang gelombang maksimal DPPH yang diperoleh sebelumnya. Interval waktu dari penentuan *operating time* yaitu dari menit ke 0-60 sampai didapat absorbansi yang stabil (Susiloningrum dan Sari, 2021).

10.10 Pembuatan Larutan Blanko DPPH. Larutan DPPH 0,4 mM dipipet sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas 5mL. Larutan didiamkan selama OT pada suhu ruang ditempat yang gelap (dibungkus aluminium foil). Ukur serapannya pada gelombang maksimum (Susiloningrum dan Sari, 2021).

10.11 Uji Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas. Masing-masing larutan yang akan diuji sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL DPPH ke dalamnya inkubasi selama OT pada suhu kamar dan terhindar dari cahaya. Absorbansinya dihitung dengan spektrofotometer UV-Vis pada gelombang maks. Prosedur kerja mulai dari penimbangan hingga penghitungan absorbansi dilakukan sebanyak 3x replikasi untuk menghindari *human error* dan ketidakvalidan data yang didapat.

10.12 Perhitungan Potensi Antioksidan. Aktivitas antioksidan diperoleh melalui absorbansi dari sampel ekstrak dan fraksi biji alpukat dibandingkan dengan absorbansi DPPH sehingga diperoleh

IC₅₀ aktivitas antioksidannya. Perhitungan persentase aktivitas antioksidan dapat menggunakan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = (\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}) / \text{absorbansi kontrol} \times 100\%$$

Hasil akhir adalah menentukan IC₅₀% (inhibition concentration 50%) dengan menggunakan persamaan regresi linier $y = a + bx$ dimana x adalah konsentrasi (ppm) dan y adalah persentase inhibisi (%).

11. Uji KLT Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Fraksi Biji Alpkat Mentega Yang Memiliki IC₅₀ Terbaik

Cara kerja metode KLT adalah sampel ditotolkan pada lempeng fase diam GF254 yang sudah diberi garis tanda batas, dengan fase gerak yang sesuai (yang sudah dijenuhkan) dalam chamber, baku pembanding disesuaikan dengan masing-masing senyawa yang ingin diidentifikasi serta bantuan penambahan reagen deteksi tertentu. Setelah di fase diam terelusi sempurna oleh fase gerak, keringkan lempeng dengan cara diangin-anginkan. Diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, beri tanda pada bercak yang terlihat di lempeng (dilingkari menggunakan pensil), kemudian dihitung nilai Rf masing-masing bercak. Senyawa dikatakan positif (+) jika memiliki nilai Rf yang sesuai dengan baku pembanding atau timbul warna yang sama dengan baku setelah diberi reagen deteksi.

11.1 Identifikasi Flavonoid. Identifikasi flavonoid dengan KLT menggunakan fase diam silika gel GF254, fase gerak *n*-butanol (4) : asam asetat (1) : air (3), baku pembanding menggunakan kuersetin dengan pereaksi berupa uap amonia atau *sitroborat*. Setelah diberi pereaksi *sitroborat* oven selama 4 menit pada suhu 110° C, pada sinar UV 366 berfluoresensi berwarna kuning kehijauan (Feliana, 2018).

11.2 Identifikasi Triterpenoid. Identifikasi Triterpenoid dengan KLT menggunakan fase diam silika gel GF254, fase gerak *n*-heksan (1) : etil asetat (1) atau kloroform (9) : metanol (1), pereaksi semprot *anisaldehid*, noda berwarna biru atau ungu (Harbone, 1987).

11.3 Identifikasi Saponin. Identifikasi saponin dengan KLT menggunakan fase diam gel silika GF 254, fase gerak kloroform : metanol : air (60:30:10), baku pembanding sapogennin dan reagen semprot *Anisaldehyd* atau *Liebermann Burchard (LB)*, dengan pereaksi *Anisaldehyd* penampak noda berwarna biru *violet* kadang kekuningan (Sarker 2006).

11.4 Identifikasi Alkaloid. Identifikasi alkaloid dengan KLT menggunakan fase diam silika gel GF254, fase gerak Toluena : etil asetat (7:3), baku pembanding piperin, dengan reagen semprot dragendorff, positif alkaloid jika muncul bercak jingga kemerahan pada lempeng, dengan reagen semprot *Anisaldehyd* penampak noda pada sinar UV 254 memadamkan fluoresensi pada sinar uv-366 berfluoresensi biru atau kuning (Izzah et al., 2019).

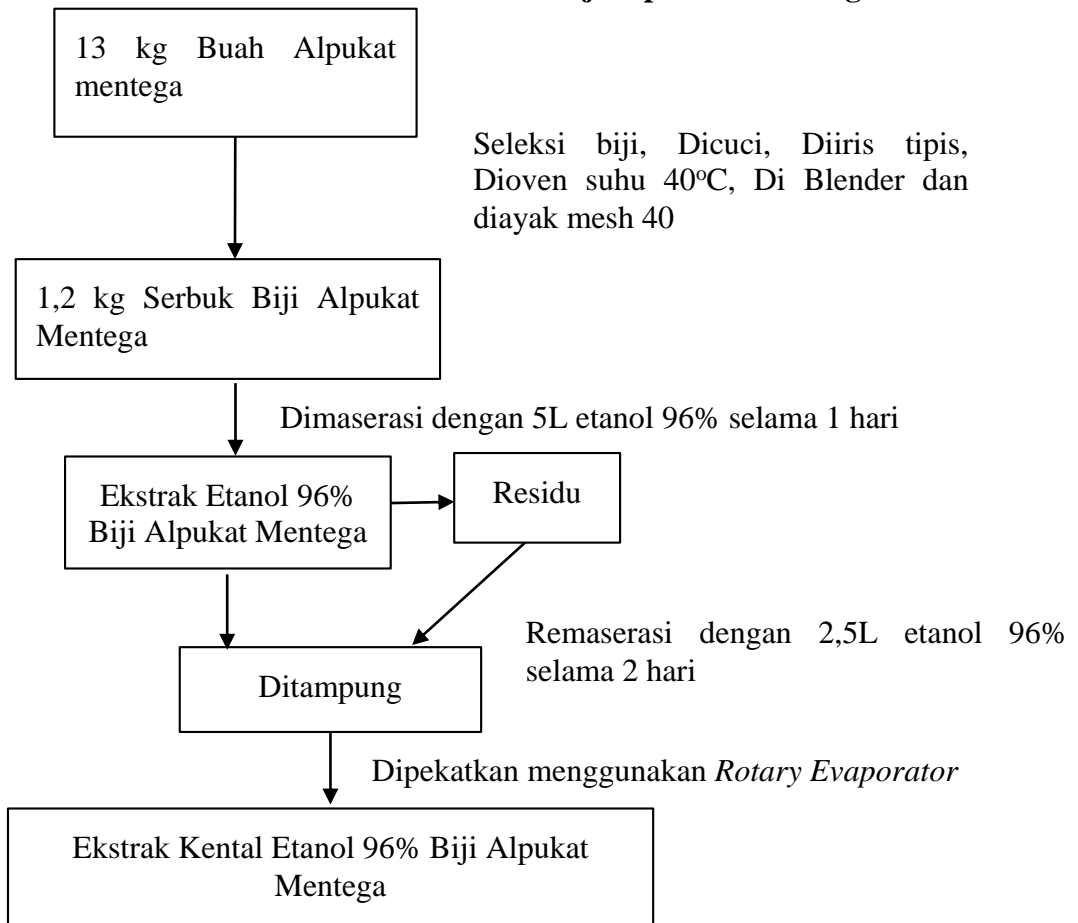
E. Analisis Data

Analisis data hasil yang diperoleh dari pengujian aktivitas antioksidan SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Analisis memakai *Shapiro-Wilk*, data dikatakan berdistribusi normal jika mendapatkan nilai $p > 0,05$ kemudian dilanjutkan analisis data menggunakan *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%. Jika ada perbedaan data yang signifikan maka analisis data dilanjutkan menggunakan uji Tukey HSD. Uji Tukey HSD (*Honestly Significant Different*) digunakan untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memiliki pengaruh berbeda signifikan. Uji ini adalah perbaikan dari LSD, karena uji Tukey HSD membandingkan mean tanpa disertai perencanaan terlebih dahulu (Marcelina, 2023). Data aktivitas DPPH fraksi-fraksi dan ekstrak biji alpukat mentega dihitung dengan persamaan regresi linier dan ketentuan IC_{50} nya. Dihitung dengan rumus:

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

F. Skema Penelitian

1. Peimbuiatan Eikstrak Eitanol 96% Biji Alpuikat Meinteiga



2. Peimbuiatan Fraksi

