

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian eksperimental ini dilakukan untuk menguji aktivitas antioksidan ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan menggunakan variasi pelarut berupa etanol 70%, n-heksana, dan etil asetat. Proses ekstraksi dilakukan dengan tujuan memperoleh senyawa bioaktif sesuai tingkat polaritas masing-masing pelarut sehingga dapat diketahui perbedaan potensi antioksidan dari tiap fraksi ekstrak yang dihasilkan. Aktivitas antioksidan kemudian dianalisis menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*), yaitu suatu metode yang mengukur kemampuan senyawa dalam mereduksi radikal bebas stabil berdasarkan perubahan warna larutan uji yang diamati melalui spektrofotometri pada panjang gelombang tertentu. Penggunaan metode DPPH dipilih karena sifatnya sederhana, cepat, serta memiliki sensitivitas yang baik dalam menilai efektivitas senyawa antioksidan. Hasil pengujian dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan gambaran mengenai tingkat aktivitas antioksidan ekstrak biji alpukat yang diperoleh dari masing-masing pelarut, sehingga dapat diketahui pelarut yang paling efektif dalam mengekstraksi senyawa aktif.

3.2 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), Kota Bogor, dengan kriteria khusus berupa biji alpukat yang berasal dari buah segar berwarna hijau serta dalam kondisi baik tanpa tanda-tanda pembusukan. Pemilihan sampel dengan ketentuan tersebut dilakukan untuk memastikan kualitas bahan baku tetap terjaga, sehingga kandungan senyawa bioaktif di dalam biji alpukat tidak mengalami degradasi akibat proses fisiologis maupun mikrobiologis. Kriteria ini juga ditetapkan agar hasil penelitian mengenai aktivitas antioksidan dapat lebih akurat dan representatif, mengingat kualitas sampel sangat menentukan keberhasilan proses ekstraksi serta efektivitas senyawa yang diperoleh.

3.3 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.3.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas etanol 70%, n-heksana, etil asetat, etanol p.a., serta akuades sebagai pelarut utama. Reagen yang dipakai untuk uji fitokimia meliputi reagen Dragendorff, serbuk magnesium, larutan gelatin, NaCl 10%, reagen Lieberman-Burchard, reagen Wagner, FeCl₃ 1%, HCl 2 N, dan HCl pekat. Selain itu, digunakan pula kuersetin sebagai standar pembanding untuk uji flavonoid, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) untuk pengujian aktivitas antioksidan, serta vitamin C sebagai kontrol positif. Seluruh bahan tersebut dipilih berdasarkan fungsinya masing-masing dalam mendukung proses ekstraksi, identifikasi kandungan metabolit sekunder, dan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak biji alpukat.

3.3.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas berbagai instrumen laboratorium yang mendukung proses ekstraksi, identifikasi, dan analisis sampel. Peralatan gelas yang digunakan meliputi labu ukur 5 ml, 10 ml, 25 ml, dan 100 ml (*Pyrex*), corong kaca (*Pyrex*), kaca arloji, batang pengaduk, gelas beker (*Pyrex*), corong pisah, kuvet (*HELLMA*), gelas ukur (*Pyrex*), serta tabung reaksi (*Iwaki*) beserta rak tabung reaksi. Peralatan tambahan yang digunakan yaitu aluminium foil, kertas saring, vial putih, cawan porselen, dan pipet tetes. Instrumen analitik yang mendukung penelitian ini meliputi spektrofotometri UV-Vis (*Thermo Scientific Evolution*), timbangan analitik (*Adam*), waterbath (*Memmeth*), serta *rotary evaporator* (*RE 100-Pro*). Seluruh peralatan tersebut berfungsi untuk memastikan proses penelitian, mulai dari persiapan sampel hingga analisis hasil, dapat dilakukan secara sistematis dan akurat.

3.4 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Tabel 3.1 menunjukkan definisi operasional variabel penelitian yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi biji alpukat.

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Variabel	Definisi Operasional	Indikator	Skala Ukur
Variabel Bebas			
Jenis pelarut ekstraksi	Jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi biji alpukat (<i>Persea americana</i> Mill)	Etanol 70%, Etil asetat, N-heksan	Nominal
Konsentrasi larutan uji	Tingkat konsentrasi ekstrak/fraksi biji alpukat yang diuji aktivitas antioksidan	5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm	Rasio
Variabel Terikat			
Nilai IC ₅₀	Konsentrasi ekstrak/fraksi yang mampu menghambat 50% radikal bebas DPPH	Hasil perhitungan persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel dengan persen inhibisi	Rasio
Aktivitas antioksidan	Kemampuan ekstrak/fraksi biji alpukat dalam mereduksi radikal bebas DPPH yang ditunjukkan dengan perubahan absorbansi pada panjang gelombang 515 nm	Absorbansi larutan DPPH yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis	Rasio

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Sampel Biji Alpukat

Sebanyak 5 kg biji alpukat dipersiapkan dengan cara dicuci terlebih dahulu hingga benar-benar bersih untuk menghilangkan kotoran, sisa daging buah, maupun kontaminan lain yang dapat memengaruhi kualitas hasil ekstrak. Biji yang telah bersih kemudian diiris tipis dengan tujuan memperluas permukaan

bahan sehingga proses pengeringan berlangsung lebih efisien. Tahap pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu kurang dari 60°C untuk menurunkan kadar air tanpa merusak kandungan senyawa bioaktif di dalam biji. Pengendalian suhu pada tahap ini sangat penting karena paparan panas berlebih dapat menyebabkan degradasi senyawa aktif, khususnya senyawa yang bersifat termolabil. Setelah mencapai tingkat kekeringan yang sesuai, sampel biji alpukat digiling hingga menjadi serbuk simplisia guna memperkecil ukuran partikel. Proses penggilingan ini dilakukan agar luas permukaan bahan semakin besar, sehingga mempermudah pelarut dalam menembus jaringan sel saat tahap ekstraksi. Serbuk yang dihasilkan kemudian diayak untuk mendapatkan ukuran partikel yang seragam, sehingga meningkatkan homogenitas bahan dan memaksimalkan efisiensi proses ekstraksi berikutnya. Tahapan tersebut dilakukan secara sistematis untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan memiliki kualitas baik dan konsistensi yang memadai dalam analisis laboratorium (Sutriningsih, 2016).

3.5.2 Ekstraksi Sampel Biji Alpukat

Proses maserasi dilakukan dengan menggunakan 500 gram serbuk simplisia biji alpukat yang diekstraksi dalam perbandingan 1:10 (b/v) menggunakan pelarut etanol 70%. Tahapan maserasi berlangsung selama 24 jam di dalam wadah tertutup untuk mencegah penguapan pelarut dan menjaga kestabilan senyawa aktif yang terkandung di dalam sampel. Selama proses berlangsung dilakukan pengadukan sesekali agar pelarut dapat lebih merata menembus jaringan simplisia sehingga senyawa bioaktif dapat terekstraksi secara optimal. Setelah selesai, filtrat hasil maserasi disaring guna memisahkan residu padat dari larutan ekstrak. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator hingga menghasilkan ekstrak kental yang lebih pekat dan bebas dari pelarut. Tahap terakhir adalah perhitungan rendemen untuk mengetahui persentase ekstrak yang berhasil diperoleh dari total berat bahan awal, sehingga dapat menjadi parameter efisiensi metode ekstraksi yang digunakan (Hastuti, 2023).

Persentase rendemen dihitung menggunakan rumus yang tercantum dalam Depkes RI (2017).

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak (gram)}}{\text{Bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\%$$

3.5.3 Fraksinasi

Ekstrak kental hasil ekstraksi sebelumnya akan difraksinasi menggunakan dua jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Pelarut pertama terdiri dari campuran n-heksan dan etanol, sedangkan pelarut kedua menggunakan etil asetat dan etanol. Pada tahap awal, ekstrak biji alpukat dilarutkan dalam etanol dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya, pelarut n-heksan ditambahkan dengan volume yang sama ke dalam corong pisah, kemudian dikocok (digojok) hingga terbentuk dua lapisan yaitu, lapisan etanol dan lapisan n-heksan. Lapisan n-heksan dipisahkan dan ditampung dalam gelas kaca, dan proses ini diulang hingga diperoleh fraksi n-heksan sebanyak 1 liter. Setelah fraksi n-heksan diperoleh, lapisan etanol yang tersisa kemudian ditambahkan dengan etil asetat dalam volume yang sama. Campuran dikocok kembali hingga terbentuk lapisan etil asetat. Lapisan dipisahkan secara hati-hati dan dikumpulkan dalam wadah gelas hingga volume fraksi etil asetat mencapai 1 liter. Sesudah proses fraksinasi diselesaikan, pelarut pada masing-masing fraksi n-heksan, etil asetat, dan etanol dihilangkan dengan bantuan rotary evaporator, sehingga terbentuk fraksi kental dari tiap pelarut. Fraksi-fraksi pekat yang telah dihasilkan kemudian dijadikan sampel untuk pengujian aktivitas antioksidan. Uji dilakukan melalui metode DPPH yang selanjutnya dikombinasikan dengan kromatografi lapis tipis guna memperkuat identifikasi senyawa aktif yang berperan (Maravirnadita, 2019).

3.6 Uji Fitokimia

3.6.1 Identifikasi Polifenol

Sebanyak 0,5 gram ekstrak biji alpukat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 ml etanol sebagai pelarut. Campuran tersebut selanjutnya diberi tambahan dua hingga tiga tetes larutan FeCl_3 1% sebagai

reagen penguji. Reaksi yang terjadi antara ekstrak dengan larutan FeCl_3 menghasilkan perubahan warna khas yang mengindikasikan adanya senyawa polifenol pada sampel. Hasil positif dari uji ini menunjukkan bahwa ekstrak biji alpukat mengandung metabolit sekunder golongan polifenol, yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan tinggi karena kemampuannya mendonorkan atom hidrogen atau elektron untuk menetralkan radikal bebas. Uji sederhana ini berfungsi sebagai langkah awal untuk memastikan keberadaan senyawa aktif sebelum dilakukan analisis lanjutan secara kuantitatif maupun kualitatif dengan metode instrumen yang lebih spesifik.

3.6.2 Identifikasi Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram serbuk biji alpukat diekstraksi menggunakan etanol 70%, kemudian ditambahkan lima tetes HCl 2N sebelum dipanaskan di atas penangas air selama dua menit. Setelah didinginkan, campuran disaring untuk memperoleh filtrat yang selanjutnya dibagi menjadi tiga bagian uji dengan pereaksi berbeda. Pengujian pada tabung pertama menggunakan pereaksi Mayer menunjukkan hasil positif alkaloid dengan terbentuknya endapan berwarna putih. Sementara itu, pada tabung kedua yang ditambahkan pereaksi Wagner, keberadaan alkaloid ditandai dengan munculnya endapan jingga hingga merah kecoklatan. Hasil serupa juga ditunjukkan pada tabung ketiga dengan pereaksi Dragendorff, di mana terbentuk endapan jingga hingga merah kecoklatan yang semakin memperkuat adanya senyawa alkaloid dalam ekstrak. Kehadiran alkaloid dalam ekstrak biji alpukat memberikan indikasi bahwa sampel memiliki kandungan metabolit sekunder yang penting. Senyawa alkaloid sendiri dikenal luas sebagai komponen bioaktif dengan beragam potensi aktivitas biologis, termasuk sebagai antimikroba, antioksidan, hingga antikanker. Fakta ini menegaskan bahwa keberadaan alkaloid dalam biji alpukat dapat mendukung pemanfaatannya sebagai sumber bahan alam yang bernilai farmakologis. Temuan ini sejalan dengan pernyataan Malik *et al.* (2014) yang menyebutkan bahwa alkaloid merupakan salah satu golongan metabolit sekunder yang sering dijumpai pada tanaman dan memiliki aktivitas biologis yang signifikan. Hasil skrining fitokimia pada biji alpukat tidak hanya

memberikan data pendukung identifikasi kandungan senyawa, tetapi juga membuka peluang lebih lanjut untuk eksplorasi aktivitas farmakologis dari ekstrak tersebut.

3.6.3 Identifikasi Flavonoid

Ekstraksi fitokimia yang dilakukan dengan melibatkan pencampuran 0,5 gram ekstrak biji alpukat ke dalam 5 ml akuades, pemanasan singkat selama lima menit, serta penyaringan hingga diperoleh filtrat jernih, kemudian diikuti penambahan serbuk magnesium sebanyak 0,1 gram dan 1 ml HCl pekat, menghasilkan reaksi kimia yang terindikasi melalui transformasi warna menjadi kuning kemerahan atau jingga, suatu fenomena khas yang menandai keberhasilan uji Shinoda dalam mendeteksi flavonoid. Metode ini, yang berakar pada interaksi reduktif magnesium dengan asam kuat hingga membentuk kompleks kromofor berwarna, memberikan dasar interpretatif bahwa senyawa flavonoid memang terkandung dalam ekstrak biji alpukat. Flavonoid, yang dikenal luas sebagai metabolit sekunder dengan aktivitas biologis menonjol, memiliki peranan protektif melalui mekanisme donasi elektron atau atom hidrogen sehingga mampu menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan oksidatif yang menjadi faktor risiko utama penyakit degeneratif. Keberadaan senyawa ini menempatkan biji alpukat sebagai entitas biologis yang layak dipertimbangkan dalam pengembangan produk farmasi maupun pangan fungsional, sebab aktivitas antioksidan flavonoid tidak hanya bersifat protektif terhadap sel, tetapi juga berkontribusi terhadap stabilitas sistem biologis secara keseluruhan. Penegasan akan hal ini sejalan dengan laporan terdahulu yang menyoroti signifikansi flavonoid dalam meningkatkan aktivitas antioksidan berbagai spesies tumbuhan (Dewi *et al.*, 2021).

3.6.4 Identifikasi Saponin

Prosedur identifikasi saponin dilakukan dengan mencampurkan 0,5 gram ekstrak biji alpukat ke dalam akuades, kemudian dikocok intensif selama lima menit hingga terbentuk larutan homogen. Reaksi positif ditandai dengan kemunculan busa yang stabil, bahkan setelah penambahan dua tetes HCl 2N,

yang secara khas mengonfirmasi keberadaan saponin sebagai metabolit sekunder. Fenomena ini berkaitan dengan sifat surfaktan alami saponin yang mampu menurunkan tegangan permukaan air, sehingga memfasilitasi pembentukan serta kestabilan busa. Deteksi saponin dalam ekstrak biji alpukat tidak hanya relevan sebagai bukti komposisi fitokimia, tetapi juga memiliki implikasi biologis dan farmakologis yang luas, mengingat senyawa ini telah dilaporkan berperan sebagai antibakteri, antijamur, imunomodulator, dan agen penurunan kadar kolesterol. Sifat bioaktif tersebut menjadikan saponin sebagai komponen bernilai tinggi dalam pengembangan produk kesehatan, baik dalam ranah obat tradisional maupun formulasi farmasi modern. Keberadaan saponin pada ekstrak biji alpukat tidak hanya menambah dimensi penting dalam profil fitokimianya, tetapi juga memperkuat dasar ilmiah yang mendasari potensinya sebagai sumber senyawa bioaktif dengan prospek terapeutik menjanjikan dalam bidang kesehatan dan nutrasetikal (Malik *et al.*, 2014).

3.6.5 Identifikasi Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak biji alpukat dilarutkan dalam etanol 70% kemudian ditambahkan air destilasi dan dipanaskan menggunakan penangas air selama sepuluh menit. Setelah itu, larutan disaring hingga diperoleh filtrat jernih yang siap untuk tahap uji selanjutnya. Filtrat tersebut dicampurkan dengan larutan gelatin 1% dalam NaCl 10% yang berfungsi sebagai reagen penguji. Hasil positif keberadaan senyawa tanin ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna putih setelah penambahan reagen, sesuai dengan prinsip dasar bahwa tanin mampu berinteraksi dengan protein sehingga menghasilkan presipitasi khas. Kehadiran tanin dalam ekstrak biji alpukat memberikan informasi penting mengenai kandungan metabolit sekunder pada tanaman ini. Senyawa tanin dikenal memiliki berbagai aktivitas biologis, termasuk sebagai antioksidan yang efektif dalam menangkal radikal bebas, antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen, serta astringen yang mampu memberikan efek pengendalian pada jaringan biologis. Hasil uji ini tidak hanya membuktikan adanya tanin dalam ekstrak biji alpukat, tetapi juga memperkuat potensinya sebagai sumber bioaktif yang

dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan maupun pengembangan produk berbasis bahan alam (Malik *et al.*, 2014).

3.6.6 Identifikasi Terpenoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak biji alpukat dilarutkan dalam etanol 70%, kemudian ditambahkan pereaksi Lieberman-Burchard sebagai reagen penguji. Perubahan warna yang muncul menjadi indikator keberadaan senyawa, di mana warna biru kehijauan menunjukkan adanya steroid, sedangkan warna merah keunguan atau cincin kecokelatan mengindikasikan keberadaan triterpenoid. Prinsip dasar dari uji ini adalah interaksi antara senyawa terpenoid dengan pereaksi kimia yang menghasilkan kompleks berwarna khas sehingga memudahkan identifikasi secara kualitatif. Temuan positif dari uji ini menegaskan bahwa ekstrak biji alpukat mengandung senyawa metabolit sekunder golongan terpenoid. Kehadiran senyawa tersebut penting karena terpenoid diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis yang signifikan, antara lain sebagai antiinflamasi yang membantu meredakan peradangan, antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme, serta antioksidan yang berperan dalam menetralkan radikal bebas. Kandungan terpenoid dalam ekstrak biji alpukat semakin memperkuat potensi penggunaannya sebagai sumber bahan alam dengan manfaat kesehatan yang luas (Khotimah, 2016).

3.7 Uji Aktivitas Antioksidan Biji Alpukat dengan Metode DPPH

3.7.1 Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 4 mg serbuk DPPH ditimbang dengan hati-hati untuk dibuat larutan dengan konsentrasi 0,4 mM. Serbuk tersebut mula-mula dilarutkan dalam gelas beaker menggunakan etanol p.a. hingga tercampur homogen. Setelah itu, larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan etanol p.a. sampai mencapai tanda batas sehingga diperoleh volume yang sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan. Prosedur ini menghasilkan larutan DPPH dengan konsentrasi stabil yang dapat digunakan sebagai reagen uji aktivitas antioksidan. Stabilitas larutan sangat penting karena DPPH

merupakan radikal bebas yang sensitif terhadap kondisi lingkungan, sehingga proses pelarutan dan pengenceran harus dilakukan secara tepat untuk menjaga konsistensi hasil. Larutan DPPH inilah yang digunakan pada metode peredaman radikal bebas, salah satu teknik standar dalam analisis fitokimia untuk mengevaluasi kemampuan suatu ekstrak atau senyawa dalam menetralkan radikal bebas. Tahap pembuatan larutan DPPH menjadi fondasi penting dalam analisis aktivitas antioksidan karena menentukan akurasi dan reliabilitas pengukuran yang dilakukan pada sampel uji (Kusuma, 2020).

3.7.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH merupakan tahap penting yang harus dilakukan sebelum pengujian aktivitas antioksidan, karena panjang gelombang tersebut menjadi acuan utama dalam pengukuran serapan radikal bebas. Pada tahap ini, sebanyak 4 ml larutan DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM dipipet ke dalam labu ukur 5 ml, kemudian ditambahkan etanol p.a. hingga volume tepat pada tanda batas. Setelah larutan tercampur homogen, campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C agar reaksi antara DPPH dan pelarut mencapai kondisi stabil. Proses inkubasi ini diperlukan untuk memastikan bahwa tidak terjadi perubahan signifikan pada struktur radikal bebas sebelum pengukuran dilakukan. Setelah itu, absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Hasil pengukuran ini memberikan informasi mengenai panjang gelombang maksimum, yaitu titik serapan tertinggi yang dimiliki oleh larutan DPPH. Penentuan panjang gelombang maksimum menjadi krusial karena memungkinkan aktivitas antioksidan sampel diuji pada kondisi yang paling sensitif dan akurat. Hal ini juga meminimalisasi kemungkinan kesalahan pengukuran akibat fluktuasi serapan pada panjang gelombang lain. Dengan adanya data panjang gelombang maksimum, analisis lanjutan terhadap aktivitas peredaman radikal bebas dapat dilakukan dengan lebih terstandar, sehingga hasil perhitungan nilai IC₅₀ dari sampel uji memiliki validitas yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah (Kusuma, 2020).

3.7.3 Pembuatan Larutan Stok Uji Ekstrak Biji Alpukat

Pembuatan larutan stok ekstrak biji alpukat dilakukan sebagai tahap awal sebelum pengujian aktivitas antioksidan, dengan tujuan memperoleh konsentrasi dasar yang stabil dan terukur. Sebanyak 5 mg ekstrak biji alpukat ditimbang secara cermat untuk menjamin ketepatan dosis, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker berisi etanol p.a. sambil diaduk hingga larut sempurna. Setelah larutan homogen, campuran tersebut dipindahkan ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan kembali etanol p.a. hingga tepat pada tanda batas. Proses ini menghasilkan larutan stok dengan konsentrasi 500 ppm yang bersifat seragam dan siap digunakan dalam tahap pengujian. Keberadaan larutan stok sangat penting karena berfungsi sebagai titik acuan dalam pembuatan variasi konsentrasi berikutnya, misalnya pada seri larutan uji dengan rentang konsentrasi tertentu yang dibutuhkan untuk analisis aktivitas antioksidan. Dengan adanya larutan stok, proses pengenceran dapat dilakukan secara sistematis dan konsisten, sehingga perbedaan konsentrasi dapat dikontrol dengan baik. Hal ini memungkinkan perhitungan efektivitas peredaman radikal bebas oleh ekstrak dilakukan secara kuantitatif dan dapat dipertanggungjawabkan. Selain itu, penggunaan konsentrasi stok 500 ppm memberikan fleksibilitas dalam penyusunan rentang konsentrasi uji yang lebih luas, sehingga gambaran aktivitas antioksidan ekstrak dapat dianalisis secara lebih komprehensif dan akurat.

3.7.4 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill)

Uji aktivitas antioksidan ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) dilakukan melalui penyiapan variasi konsentrasi larutan uji yang berasal dari larutan stok 500 ppm. Sebanyak 0,05 ml; 0,1 ml; 0,2 ml; 0,4 ml; dan 0,8 ml larutan stok dipipet secara teliti ke dalam labu ukur 10 ml yang dibungkus aluminium foil untuk menghindari paparan cahaya yang dapat memengaruhi kestabilan reagen. Masing-masing labu kemudian ditambahkan 2 ml larutan DPPH 0,4 mM, dilanjutkan dengan penambahan etanol p.a. hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi akhir 5 ppm, 10 ppm, 20

ppm, 40 ppm, dan 80 ppm. Larutan yang telah terbentuk dihomogenkan, ditutup rapat, lalu diinkubasi selama 30 menit guna memberikan waktu yang cukup bagi senyawa antioksidan dalam ekstrak untuk bereaksi dengan radikal bebas DPPH. Setelah proses inkubasi, pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Data absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung persentase peredaman radikal bebas. Persentase inhibisi ini kemudian dipakai sebagai dasar dalam penentuan nilai IC_{50} yang menggambarkan konsentrasi ekstrak yang mampu meredam 50% radikal bebas DPPH. Nilai IC_{50} tersebut berfungsi sebagai parameter kuantitatif yang menunjukkan kekuatan aktivitas antioksidan ekstrak biji alpukat. Melalui prosedur ini, evaluasi aktivitas biologis ekstrak dapat dilakukan dengan tingkat akurasi yang tinggi sehingga hasil yang diperoleh lebih dapat diandalkan (Handayani, 2018).

3.7.5 Pembuatan Larutan Pembanding Vitamin C

Pembuatan larutan pembanding vitamin C dalam uji aktivitas antioksidan ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) dilakukan melalui tahap penyiapan larutan uji dengan variasi konsentrasi yang berasal dari larutan stok 500 ppm. Volume larutan stok sebanyak 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,4 ml, dan 0,8 ml dipipet secara teliti ke dalam masing-masing labu ukur berkapasitas 10 ml. Labu ukur tersebut terlebih dahulu dibungkus dengan aluminium foil untuk mencegah degradasi akibat paparan cahaya yang berpotensi memengaruhi kestabilan reagen. Selanjutnya, ke dalam setiap labu ukur ditambahkan 2 ml larutan DPPH 0,4 mM, kemudian dilanjutkan dengan penambahan etanol p.a. hingga mencapai tanda batas, sehingga konsentrasi akhir larutan uji yang diperoleh adalah 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, dan 80 ppm. Setelah homogenisasi dilakukan, larutan-larutan tersebut ditutup rapat dan diinkubasi selama 30 menit dengan tujuan memberikan waktu interaksi maksimal antara senyawa antioksidan dalam sampel dan radikal bebas DPPH. Usai inkubasi, absorbansi setiap larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm untuk memperoleh data kuantitatif mengenai intensitas peredaman radikal bebas. Data absorbansi yang didapat kemudian

diolah untuk menghitung persentase inhibisi, yang selanjutnya dianalisis guna menentukan nilai IC_{50} , yakni konsentrasi larutan uji yang dibutuhkan untuk menetralkan 50% radikal bebas DPPH. Nilai IC_{50} dipandang sebagai parameter penting dalam penilaian kuantitatif aktivitas antioksidan, karena semakin kecil nilainya, semakin tinggi kemampuan senyawa dalam meredam radikal bebas. Melalui prosedur ini, efektivitas ekstrak biji alpukat sebagai sumber antioksidan alami dapat dievaluasi dengan tingkat akurasi tinggi, sehingga hasilnya memberikan dasar ilmiah yang kuat untuk mendukung potensi biologis yang terkandung (Handayani, 2018).

3.7.6 Optimasi Waktu Inkubasi

Optimasi waktu inkubasi dalam uji aktivitas antioksidan dilakukan melalui penyiapan larutan stok vitamin C yang diperoleh dengan cara menimbang 2,5 mg serbuk vitamin C secara teliti, kemudian melarutkannya dalam etanol p.a. pada labu ukur 25 ml hingga homogen. Larutan tersebut kemudian ditambahkan etanol p.a. hingga tanda batas untuk menghasilkan larutan stok dengan konsentrasi 100 ppm. Dari larutan stok ini dipipet berturut-turut 0,2 ml, 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, dan 1 ml ke dalam labu ukur 10 ml, lalu masing-masing diencerkan dengan etanol p.a. hingga volume penuh, sehingga diperoleh deret konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm. Deret konsentrasi ini digunakan sebagai larutan uji pembanding dalam analisis aktivitas antioksidan. Vitamin C dipilih sebagai standar karena sifatnya sebagai antioksidan larut air yang sangat kuat dengan kemampuan mendonorkan elektron untuk menetralkan radikal bebas, serta perannya yang vital dalam berbagai aktivitas biologis, termasuk sintesis kolagen, penyembuhan luka, dan perlindungan sel terhadap stres oksidatif. Perbandingan hasil aktivitas antioksidan ekstrak biji alpukat dengan vitamin C memungkinkan penilaian efektivitas biologis ekstrak dilakukan secara lebih terukur dan akurat. Dengan adanya acuan standar, evaluasi hasil pengujian menjadi lebih valid, sekaligus memberikan dasar ilmiah yang jelas dalam menafsirkan potensi antioksidan dari ekstrak maupun fraksinya. Prosedur ini memastikan bahwa hasil yang diperoleh tidak hanya

bersifat deskriptif, tetapi juga dapat dibandingkan secara kuantitatif dengan senyawa pembanding yang telah dikenal luas efektivitasnya (Alim *et al.*, 2022).

3.7.7 Perhitungan Nilai IC₅₀

Persentase inhibisi merupakan parameter penting yang digunakan untuk menggambarkan kemampuan suatu senyawa dalam menghambat radikal bebas, khususnya dalam uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Nilai inhibisi yang konsisten pada berbagai konsentrasi menjadi dasar dalam penentuan kurva hubungan antara konsentrasi dan aktivitas penghambatan radikal bebas, yang selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ sebagai indikator kekuatan aktivitas antioksidan suatu senyawa. Persentase inhibisi terhadap radikal bebas DPPH pada setiap konsentrasi larutan sampel dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\%Inhibisi = \frac{Absorbansi\ Blanko - Absorbansi\ Sampel}{Absorbansi\ Blanko} \times 100\%$$

Proses analisis aktivitas antioksidan dilakukan dengan memanfaatkan data persentase inhibisi yang diperoleh dari setiap variasi konsentrasi sampel. Data tersebut kemudian diplotkan dalam bentuk grafik, di mana konsentrasi sampel ditempatkan pada sumbu x dan persentase inhibisi pada sumbu y, sehingga hubungan keduanya dapat diamati secara visual. Dari grafik yang terbentuk, dilakukan perhitungan persamaan regresi linier dengan rumus umum $y = ax \pm b$. Persamaan ini menjadi acuan untuk menentukan titik konsentrasi yang mampu menghasilkan inhibisi sebesar 50%, yang dikenal dengan nilai IC₅₀. Parameter IC₅₀ dianggap krusial dalam menggambarkan kekuatan suatu ekstrak sebagai agen antioksidan, sebab menunjukkan konsentrasi minimum yang dibutuhkan untuk menetralkan setengah jumlah radikal bebas yang ada. Semakin rendah nilai IC₅₀ yang diperoleh, maka semakin tinggi potensi antioksidan yang dimiliki ekstrak, karena efektivitasnya dalam meredam radikal bebas tercapai pada konsentrasi yang lebih kecil. IC₅₀ tidak hanya berfungsi sebagai indikator kuantitatif potensi antioksidan, tetapi juga menjadi tolok ukur yang umum digunakan dalam penelitian fitokimia dan farmakologi

untuk membandingkan aktivitas biologis berbagai jenis ekstrak maupun senyawa murni.

$$y = ax + b$$

keterangan:

y= nilai respon (absorbansi)

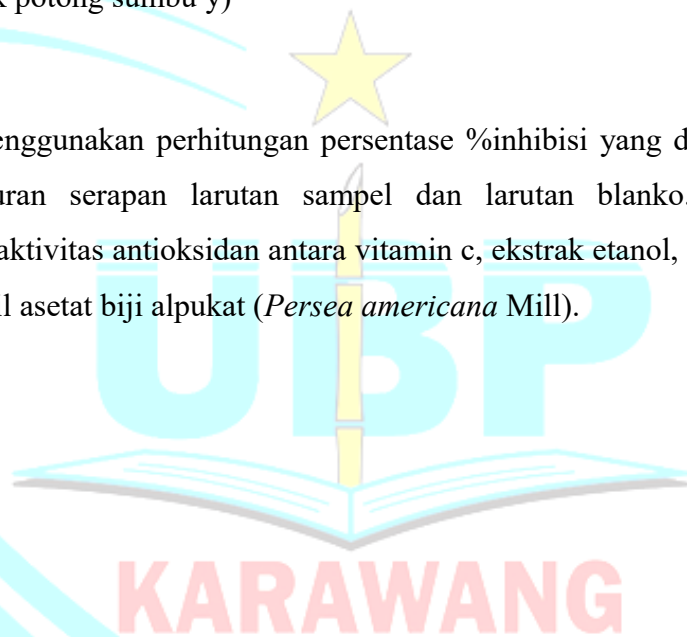
x= nilai konsentrasi larutan

a= kemiringan (*slope*) garis regresi

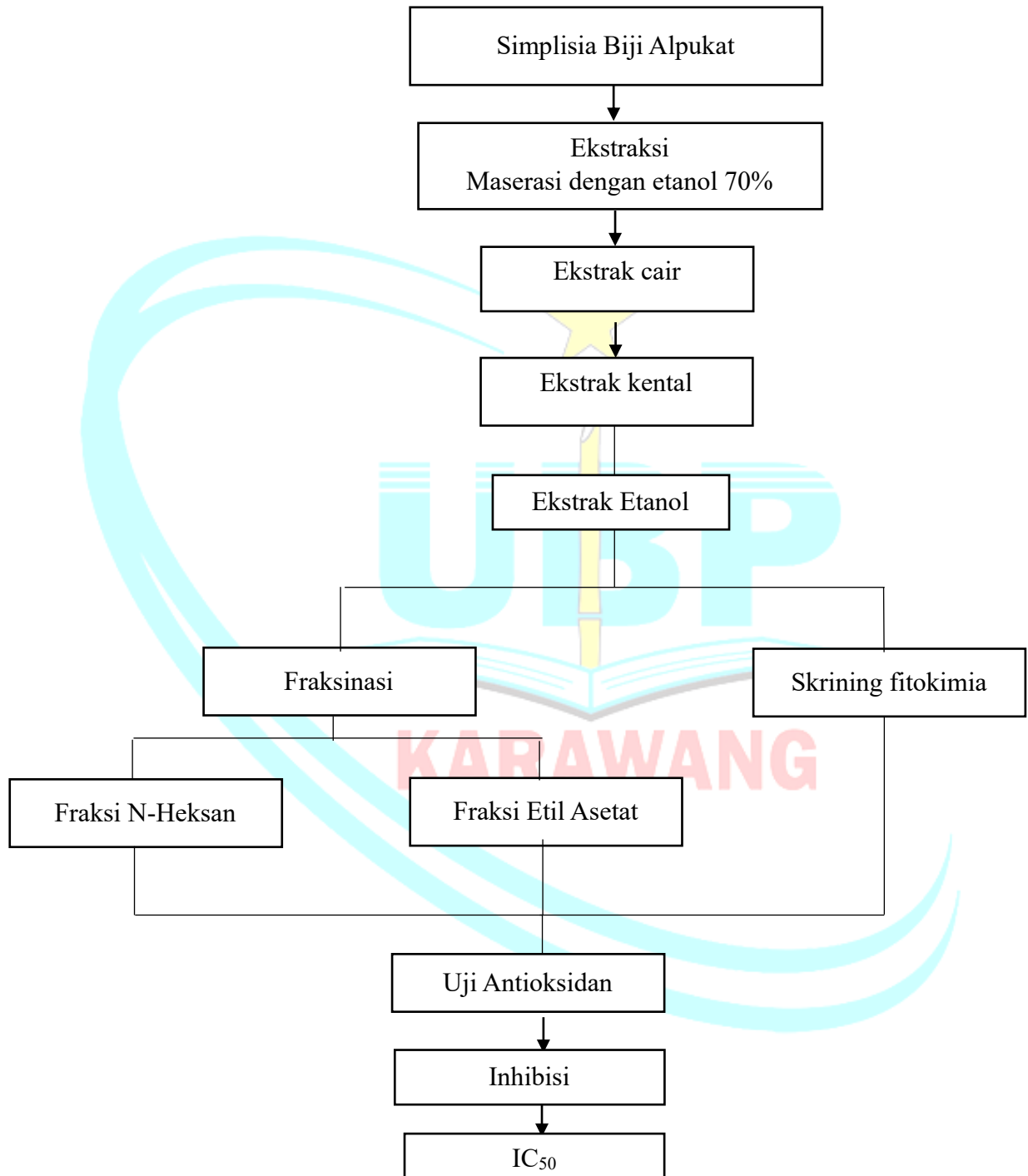
b= intersep (titik potong sumbu y)

3.8 Analisis Data

Analisis data menggunakan perhitungan persentase %inhibisi yang diperoleh dari hasil pengukuran serapan larutan sampel dan larutan blanko. Untuk mengetahui adanya aktivitas antioksidan antara vitamin c, ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat biji alpukat (*Persea americana* Mill).



3.9 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian