

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tinjauan Tanaman Alpukat

##### 1. Alpukat

Genus *Persea* terdiri dari 150 spesies, di mana 70 di antaranya ditanam di daerah yang lebih hangat di Amerika Selatan dan Amerika Tengah. Seluruh spesies lainnya dibudidayakan di Asia Tenggara dan Asia Timur. Karotenoid utama dalam Alpukat adalah lutein, *zeaxanthin*,  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, *neoxanthin*, dan *violaxanthin* adalah karotenoid lain dalam jumlah kecil serta tokoferol diidentifikasi dalam ekstrak asetonnya. Alpukat adalah buah tropis asli Amerika. Buah ini termasuk dalam keluarga *Lauraceae*. Alpukat berasal dari kata '*ahucatl*' dalam bahasa *Aztec*. 'Pir buaya' dan 'buah mentega' adalah nama alternatifnya. Buah ini telah dibudidayakan secara tradisional untuk tujuan makanan dan pengobatan karena kandungan nutrisinya yang tinggi serta sifat terapeutiknya (Muruganathan *et al.*, 2022).



Gambar 1. Tanaman alpukat (a), dan Biji buah alpukat (b)

Berdasarkan klasifikasi dan kedudukan tanaman alpukat menurut *Plantamor* (2024) dalam taksonomi tumbuhan:

Kerajaan	:	Plantae
Subkerajaan	:	Tracheobionta
Superdivisi	:	Spermatophyta
Divisi	:	Streptophyta
Kelas	:	Equisetopsida
Subkelas	:	Magnoliidae
Ordo	:	Laurales
Famili	:	Lauraceae
Genus	:	<i>Persea</i>
Spesies	:	<i>Persea americana</i> Mill.
Sinonim	:	<i>Laurus persea</i> L.

Tanaman Alpukat dikenal di berbagai wilayah dengan penyebutan berbeda, penyebutan tanaman ini di Indonesia: apokat; alpuket; alpukat, Malaysia: apukado; buah mentega; avokado, Vietnam: bo, Thailand: luk noei; awokhado. Filipina: abukado, Inggris: avocado, dan China: yiu lie.

## 2. Habitat Tumbuh

Alpukat termasuk keluarga *Lauraceae*, berasal dari dataran rendah-dataran tinggi meso-Amerika, yang meliputi wilayah India Barat, Guatemala, dan Meksiko. Habitat asli alpukat India Barat adalah dataran rendah, panas, dan lembab di hutan Amerika Tengah dengan musim kemarau yang pendek; alpukat Guatemala adalah dataran tinggi tropis dengan kondisi sejuk sepanjang tahun; alpukat Meksiko adalah yang paling tinggi (1.400-2.500 m), temperatur 14,2-19,8°C, curah hujan 665-1.562 mm, dan 6-8 bulan musim dingin-musim semi. Nilai gizi yang tinggi pada buah alpukat menyebabkan para penjajah di Amerika mendistribusikan tanaman ini ke daerah-daerah yang memiliki iklim yang sesuai (Sukamto *et al.*, 2014).

Alpukat diperkenalkan di Indonesia pertama kali pada awal abad ke-20. Alpukat masuk ke Indonesia adalah upaya eksplorasi dan pengenalan tumbuhan-tumbuhan pada pemerintahan kolonial Belanda sebagai sumber bahan pangan dan meningkatkan komoditas ekonomi. Alpukat memiliki ciri-ciri karakteristik di pulau Jawa sangat bervariasi terhadap varietas, lokasi tumbuh, dan kondisi lingkungan. Karakteristik umum alpukat di Pulau Jawa yang biasanya ditemui antara lain, bentuk dan ukuran, kulit buah, daging buah, biji buah, rasa buah, dan warna kulit ketika matang. Jenis alpukat yang tumbuh di pulau Jawa antara lain, alpukat *enormous*, alpukat hijau, alpukat *hass*, alpukat merah, alpukat keprok, alpukat mentega, alpukat bali, alpukat Borneo, alpukat krim, alpukat raja, alpukat kendil, alpukat miki, alpukat aligator, alpukat pluwang, dan, alpukat wina (Natasia & Facrureza, 2023)

## 3. Khasiat

Aktivitas biologis dari biji alpukat telah dilaporkan sebagai antioksidan, antihipertensi, larvasida, fungisida, hipolipidemik, dan baru-baru ini aktivitas amoebisida dan giardisida (Anaka *et al.*, 2009). Biji alpukat juga mengandung berbagai macam produk alami seperti fitosterol dan triterpen, asam lemak dengan ikatan olefinik, asetilenik, asam furanoat, dimer flavonol dan proantosianidin oligomerik, d-glukosida asam 8-hidroksyabscisat, dan asam d-glukosida epi-

dihidrofenolat. Biji alpukat dapat mengatasi hiperkolesterolemia, hipertensi, kondisi peradangan, dan diabetes. Biji alpukat memiliki aktivitas fungisida, anti mikroba, dan insektisida. Biji alpukat menunjukkan perbaikan gejala diabetes tipe 2, dengan menargetkan gamma reseptor yang diaktifkan proliferator peroksism dengan cara yang sama seperti obat anti diabetes kelas *thiazolinediones*. Penelitian lain mempelajari efek biji alpukat pada parameter yang berkaitan dengan penderita diabetes dan hipertensi seperti glukosa darah, kadar kolesterol dan glikogen dalam hati pada tiga model tikus, tujuan dari proyek ini adalah untuk melakukan penelitian tentang manfaat dan kemungkinan risiko mengonsumsi biji alpukat. Biji alpukat sebelumnya didehidrasi dengan menggunakan metode baru dengan menggunakan aliran udara pada suhu rendah untuk mengusulkan dan mengembangkan produk baru yang bernilai tinggi yang dapat menjadi suplemen makanan (Espinosa-Garza *et al.*, 2019).

#### **4. Kandungan Senyawa**

Biji alpukat mengandung senyawa bioaktif yang berbeda seperti procyanidin, senyawa fenolik, triterpenoid, asetogenin, asam lemak amina, dan asam lemah yang dapat digunakan sebagai antioksidan, antimikroba, insektisida, hipokolesterolemik, antidiabetes, antihipertensi, pengganti lipid, bahan dasar sabun, dan aplikasi lain dalam industri farmasi, bioteknologi, kimia, dan makanan. Laporan terkait dengan komposisi kimia biji alpukat, ditemukan hanya sedikit yang menggambarkan profil kimia yang mudah menguap atau lipofilik. Kandungan volatil minyak biji alpukat antara lain 32,5% asam heptadekanoat, 20,7% asam oleat, dan 46,7% asam linoleat. Pelarut yang lebih disukai untuk ekstraksi antioksidan atau senyawa fitokimia adalah pelarut dengan polaritas menengah seperti etanol (polar protik) atau aseton (aprotik). Fenol umumnya diekstraksi dengan etanol dan metanol, sedangkan polifenol diperoleh kembali dengan aseton (Soledad *et al.*, 2021).

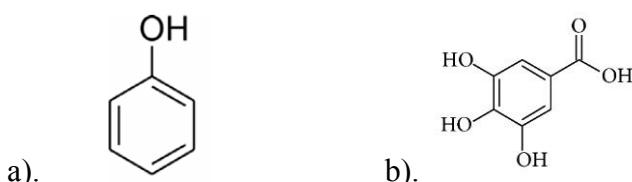
Senyawa bioaktif adalah komponen bahan kimia yang dipisahkan dari ekstraksi tanaman. Komponen-komponen biji alpukat adalah protein, gula, pati, lemak, dan air. Senyawa bioaktif yang terdapat dalam alpukat adalah fenolik, flavonoid, karotenoid, vitamin E, dan vitamin C. Kandungan fitokimia yang terdapat pada biji alpukat antara lain flavonoid, tanin, saponin, fenolat, kapasitas antioksidan, oksalat, fitat, dan alkaloid (Setyawan *et al.*, 2021). Polifenol adalah

salah satu senyawa bioaktif yang tersebar di seluruh bagian tanaman alpukat. Senyawa polifenol lain yang ditemukan dalam biji alpukat adalah *3-O-p-coumaroylquinic acid*, *3-O-caffeoylquinic acid*, *procyanidin trimer A(I)*, *procyanidin trimer A(II)*, *catechin*, atau *epicatechin gallate*. Penelitian lain menyebutkan bahwa biji alpukat memiliki kandungan tanin, saponin, dan flavonoid yang merupakan bagian dari polifenol (Setyawan *et al.*, 2021).

**Tabel 1. Kandungan fitokimia yang terdapat pada biji alpukat (Kurniawan & Rahmat, 2023)**

Komponen Fitokimia	mg/100g
Flavonoid	20.33±0.01
Tanin	0.76±017
Saponin	0.52±0.42
Oksalat	4.40±0.30
Alkaloid	5.40±0.00

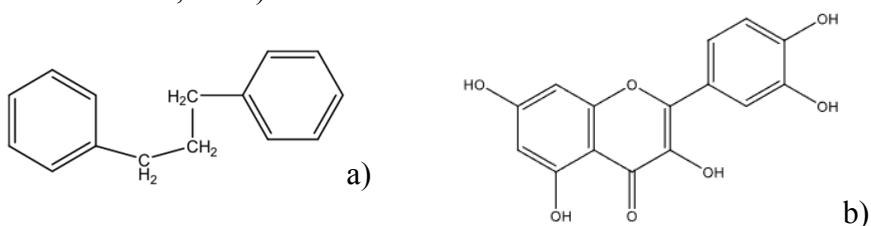
**4.1. Fenol.** Senyawa fenolik dan flavonoid merupakan metabolit sekunder terbesar yang terkandung dalam tumbuhan. Senyawa fenolik memiliki peranan penting sebagai antioksidan dalam rangka mencegah dan mengobati penyakit degeneratif dan kanker (Fajriah *et al.*, 2021). Asam fenolat, jumlah dan posisi gugus hidroksil fenolat secara langsung berkaitan dengan kemampuan membersihkan radikal bebas. Gugus hidroksil fenolik pada cincin benzena kurang dari 4, aktivitas antioksidan asam fenolik sebanding dengan jumlah gugus hidroksil fenolik. Gugus hidroksil fenolik merupakan gugus pendoron elektron, maka gugus tersebut dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dari hidroksil fenolik lainnya. Asam fenolik selain 4-H-3,5-DM-B/C/P, juga dihidroksi (3,4-DH) memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada asam fenolik lain dengan gugus asam karboksilat yang sesuai pada uji FRAP dan DPPH. Gugus hidroksil fenolik dan metoksi secara signifikan meningkatkan aktivitas antioksidan asam fenolik (Chen *et al.*, 2020).



**Gambar 2. Struktur Fenol (a) (Noer *et al.*, 2018), dan asam galat (b) (Lidya Tesalonika *et al.*, 2024)**

**4.2. Flavonoid.** Senyawa flavonoid dapat menangkal radikal bebas, juga mampu menghambat oksidasi lipid, serta memiliki aktivitas

antioksidan, antibakteri, antivirus, dan anti kanker (Ladeska *et al.*, 2022). Sifat flavonoid yang diunggulkan adalah kemampuannya untuk bertindak sebagai antioksidan dan penangkap radikal bebas. Koordinasi ion logam dengan ligan flavonoid dapat mempengaruhi faktor kinetik serta termodinamika reaksi, yang menyebabkan reaksi dengan radikal bebas lebih mudah dan lebih cepat terjadi. Koordinasi logam dapat mengubah potensial redoks ligan dan dengan demikian mempengaruhi aktivitas antioksidan flavonoid. Peningkatan aktivitas pembersihan radikal dari kompleks Cu(II)-kuersetin, yang menunjukkan nilai potensial redoks yang lebih rendah dibandingkan dengan kuersetin bebas. Oksidasi flavonoid yang lebih mudah dalam lingkup koordinasi tembaga disebabkan oleh destabilisasi strukturnya pada saat koordinasi (Arce & Saldías, 2021).



**Gambar 3. Struktur Flavonoid (a) (Noer *et al.*, 2018), dan Kuersetin (b) (Lidya Tesalonika *et al.*, 2024)**

## B. Karakterisasi Ekstrak

### 1. Parameter Non-Spesifik

**1.1 Kadar air dan susut pengeringan.** Penetapan kadar air dilakukan dengan cara *thermogravimetri* dengan tujuan untuk memberikan batasan minimal tentang besarnya kandungan air dalam bahan (Depkes RI, 2000). Kadar air berguna untuk mengetahui ketahanan penyimpanan dan untuk menghindari pengaruh aktivitas mikroba. Penelitian yang dilakukan Nurhaini *et al.*, (2020), kadar air ekstrak biji alpukat memiliki nilai  $15,6\% \pm 1,53$ , menurut Rudolf Voight 1994 standar mutu ekstrak kental yaitu 5-30%, jenis ekstrak mempengaruhi range kadar air. Susut pengeringan bertujuan memberikan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang saat proses pengeringan (Depkes RI, 2000). Menurut farmakope herbal Indonesia susut pengeringan ekstrak tidak boleh  $>10\%$  (Kemenkes RI, 2017).

**1.2 Kadar abu.** Kadar abu ekstrak bertujuan mengetahui kandungan mineral secara internal dan eksternal pada proses awal

hingga akhir, jika kadar abu total tinggi maka kandungan mineral ekstrak semakin tinggi. Kadar abu tidak larut asam bertujuan mengetahui proses pencucian pada bahan tanaman tidak bersih karena mengandung pasir atau pengotor yang tertinggal apabila tinggi kadarnya. Bahan ekstrak dipanaskan pada temperatur tinggi sehingga senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sampai hanya menyisakan unsur mineral dan anorganik (Depkes RI, 2000). Penelitian yang dilakukan Rivai *et al.*, (2019), kadar abu total biji alpukat yaitu  $4,996 \pm 0,012\%$ , dan kadar abu larut asam biji alpukat yaitu  $0,6352 \pm 0,0023\%$ .

## 2. Parameter Spesifik

**2.1 Identitas dan Organoleptik ekstrak.** Identitas ekstrak memberikan identitas obyektif dari nama, spesifikasi senyawa identitas dengan dilakukan determinasi tanaman, dan organoleptik yaitu pengamatan sederhana secara obyektif (Depkes RI, 2000). Penelitian yang dilakukan Nurhaini *et al.*, (2020), Ekstrak biji alpukat memiliki ciri-ciri karakteristik antara lain, warna coklat kehitaman, bentuk ekstrak kental, rasa pahit, dan bau khas biji alpukat.

**2.2 Senyawa terlarut dalam pelarut tertentu.** Penetapan ekstrak dengan pelarut alkohol atau air untuk ditentukan jumlah solut dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetri. Senyawa terlarut air dan etanol bertujuan menetapkan jumlah ekstrak lebih banyak terlarut dalam air (polar) atau terlarut dalam etanol (polar-nonpolar) (Depkes RI, 2000). Penelitian yang dilakukan (Nurhaini *et al.*, 2020), Senyawa larut air sebesar 34,8%, dan kadar senyawa larut etanol diperoleh sebesar 87,5%. Kadar senyawa ekstrak lebih larut dalam etanol dibandingkan dengan air disebabkan proses ekstraksi bahan menggunakan pelarut organik (etanol) sehingga senyawa organik yang tersari lebih besar daripada senyawa anorganik.

## C. Ekstraksi

### 1. Ekstraksi Konvensional

**1.1. Maserasi.** Metode ini, simplisia atau bubuk kasar ditempatkan pada wadah bersumbat yang terendam dalam pelarut dan didiamkan pada suhu kamar ( $24-29^{\circ}\text{C}$ ) dengan pengadukan yang intens sampai zat terlarut telah larut sempurna. Campuran disaring lalu *marc* (bahan padat lembab) ditekan, yang selanjutnya cairan yang telah didiamkan dipisahkan dengan penyaringan atau dekantasi. Metode

ekstraksi perlu memperhatikan beberapa hal seperti rasio pelarut terhadap bahan baku, kecepatan adukan, suhu dan waktu maserasi, derajat kehalusan simplisia (optimasi alat ekstraksi, simplisia yang halus akan semakin mudah terjerap di alat) (International Centre for Science & High Technology, 2008).

**1.2. Perkolasi.** Bejana sempit berbentuk kerucut merupakan alat yang digunakan dalam perkolası. Bahan padat perlu dibasahi pelarut dan didiamkan dalam wadah tertutup rapat selama  $\pm 4$  jam, massa dikemas, dan perkolator bagian atas ditutup. Tambahkan pelarut agar membentuk lapisan di atas massa, campuran dibiarkan maserasi pada bejana tertutup selama 24 jam. Saluran yang keluar dari bejana dibuka agar cairan di dalamnya menetes secara perlahan. Pelarut ditambahkan sesuai kebutuhan hingga tiga perempat dari volume yang dibutuhkan. Simplisia basah selanjutnya ditekan dan cairan hasil peras ditambahkan ke perkolat. Pelarut ditambahkan untuk memberikan volume yang dibutuhkan, sedangkan campuran cairan dipisah melalui penyaringan atau diikuti penuangan (International Centre for Science & High Technology, 2008).

**1.3. Soxhletasi.** Keuntungan metode soxhletasi dengan metode lain yaitu dapat mengekstraksi sejumlah besar obat menggunakan jumlah pelarut jauh lebih sedikit, sehingga ekonomis waktu, biaya, dan energi. Ekstraksi soxhletasi digunakan dalam skala kecil proses *batch* pada skala laboratorium. Metode ini jauh lebih ekonomis dan layak jika menjadi prosedur ekstraksi berkelanjutan pada skala menengah hingga skala besar (International Centre for Science & High Technology, 2008).

**1.4. Refluks.** Metode refluks menggunakan pelarut volatil yang akan menguap jika digunakan pada suhu tinggi, kemudian mengalami pendinginan pada bagian kondensor, uap akan mengembun kembali dan turun ke wadah sehingga keadaan pelarut akan tetap selama proses reaksi berlangsung (International Centre for Science & High Technology, 2008).

**1.5. Dekokta.** Pada proses ini, simplisia akan dilakukan perebusan dalam air pada volume serta waktu tertentu kemudian didinginkan dan disaring. Dekokta cocok jika mengekstraksi konstituen larut dalam air dan stabil terhadap pemanasan. Dekokta biasa digunakan pada pembuatan ekstrak *Ayurveda* disebut “*quath*” atau “*kawath*”. Rasio perbandingan awal terhadap air perlu ditetapkan,

misalnya perbandingan 1:4 atau 1:16, volume akan diturunkan menjadi seperempat dari volume asli dengan cara merebus selama prosedur ekstraksi berlangsung. Ekstrak pekat kemudian disaring dan digunakan atau dilakukan proses lebih lanjut (International Centre for Science & High Technology, 2008).

**1.6. Infusa.** Infus segar dibuat melalui cara maserasi simplisia dengan waktu singkat menggunakan air dingin atau air mendidih. Larutan yang encer dari unsur simplisia akan mudah larut (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit) (International Centre for Science & High Technology, 2008).

## 2. Ekstraksi Modern

**2.1. Ekstraksi arus berlawanan.** ada ekstraksi arus berlawanan (CCE), simplisia basah dihaluskan menggunakan penghancur cakram bergigi untuk menghasilkan bubur halus. Bahan akan diekstraksi serta dipindahkan menjadi satu arah (bentuk bubur halus) dalam silinder ekstraktor kemudian bersentuhan pelarut ekstraksi. Bahan awal bergerak semakin jauh maka ekstrak semakin pekat. Ekstraksi secara sempurna memungkinkan jika jumlah bahan dan pelarut serta laju aliran optimal. Proses yang sangat efisien akan memerlukan sedikit waktu sehingga tidak menimbulkan risiko pada suhu tinggi. Ekstrak pekat keluar pada salah satu ujung ekstraktor sedangkan simplisia basah (bebas dari pelarut) keluar melalui ujung yang lain (International Centre for Science & High Technology, 2008).

**2.2. Ekstraksi ultrasonik.** Prosedurnya melibatkan penggunaan Ultrasonografi (USG) pada frekuensi antara 20-2000 kHz, dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel, menghasilkan kavitas namun, penerapan pada skala besar terbatas karena mahal. Kelemahan ultrasonik yaitu efek merugikan terkadang terjadi, energi ultrasonik  $> 20$  kHz pada konstituen aktif tanaman obat akan membentuk radikal bebas dan akibatnya terjadi perubahan pada molekul obat (International Centre for Science and High Technology, 2008). Parameter kritis yang harus diperhatikan antara lain: frekuensi osilasi dan waktu, kedua hal ini akan menentukan tingkat efektivitas ekstraksi. Frekuensi osilasi meningkatkan permeabilitas dinding sel dan menghasilkan kavitas dan dapat memecah sel. Tetapi perlu diperhatikan bahwa peningkatan frekuensi osilasi akan meningkatkan suhu, sehingga haruslah dilakukan optimasi frekuensi osilasi dan waktu. Salah satu kelemahan terbesar

metode ini adalah memakan energi dan biaya yang tinggi serta kenaikan suhu dapat melarutkan tetapi juga mempengaruhi kestabilan senyawa yang diekstraksi.

**2.3. Ekstraksi Cair Superkritis.** Ekstraksi cair superkritis (SFE) adalah metode yang mengurangi penggunaan pelarut organik dan meningkatkan output senyawa. Metode ini dapat mengekstraksi bahan tanpa merusak matriks, sehingga digunakan untuk *decaffeinated coffee*. Faktor-faktor yang perlu diperhatikan antara lain tekanan, suhu, volume sampel, pengumpulan analit, campuran pelarut (*cosolvent*), kontrol tekanan dan aliran, serta pembatas. SFE menggunakan bejana ekstraksi yang berbentuk silinder (International Centre for Science & High Technology, 2008).

### 3. Pelarut

**3.1. Etanol.** Etanol 70% sebagai pelarut ekstraksi merupakan pelarut organik secara maksimal dapat menyari senyawa aktif dalam ekstrak. Pencampuran etanol dan air akan menarik sebagian senyawa aktif yang dapat tersari dalam etanol dan larut dalam air. Etanol dalam ekstraksi digunakan karena memiliki kelebihan antara lain, titik didih rendah sehingga mudah diuapkan, tidak toksik, ramah lingkungan, menghambat mikroba, dan melarutkan senyawa aktif pada tingkat kepolaran berbeda-beda (Marpaung *et al.*, 2020). Penelitian yang dilakukan (Adnan *et al.*, 2020), TPC dan TFC yang penting dimanifestasikan ekstrak disebabkan oleh radikal metil yang mudah terkonjugasi dengan senyawa fenolik atau flavonoid dalam melakukan solvasi yang efisien. Pelarut polar seperti etanol cenderung menarik senyawa flavonoid glikosida, rantai samping glikosida pada flavonoid memungkinkan ditarik oleh pelarut etanol (Nurisyah *et al.*, 2024).

**3.2. Aseton.** Aseton merupakan jenis pelarut organik yang bersifat semipolar dan aprotik, sehingga aseton dinilai cocok dalam mengekstraksi senyawa-senyawa yang bersifat semipolar dan nonpolar. Penggunaan aseton pada ekstraksi memungkinkan dalam membantu meningkatkan efisiensi ekstraksi senyawa-senyawa seperti flavonoid. Penggunaan aseton harus dilakukan dengan hati-hati karena sifatnya yang mudah terbakar dan beracun (Gunawan *et al.*, 2024).

## D. Antioksidan

### 1. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat terjadinya oksidasi. Oksidasi adalah reaksi kimia yang menghasilkan radikal

bebas serta menyebabkan reaksi berantai yang dapat merusak sel-sel organisme. Antioksidan, seperti asam askorbat (vitamin C) atau *tiol* mengakhiri reaksi berantai untuk menyeimbangkan keadaan oksidatif, tanaman dan hewan mempertahankan sistem kompleks antioksidan yang tumpang tindih seperti, *glutation* dan enzim (katalase dan *superoksid dismutase*) yang diproduksi secara internal atau antioksidan makanan vitamin C dan E. Induksi pertahanan antioksidan atau penurunan kadar ROS/RNS endogen merupakan indikator stres oksidatif yang cepat dan jelas (Salehi *et al.*, 2018).

Antioksidan didefinisikan sebagai zat yang mampu menghilangkan ROS dan turunannya (RNS dan RSS) secara langsung maupun secara tidak langsung bertindak mengatur pertahanan antioksidan atau menghambat produksi spesies reaktif. ROS merupakan diproduksi kelompok molekul melalui metabolisme seluler, aksi oksidasi mitokondria oleh kompartemen seluler lain akan menyebabkan produksi meningkat dengan kerusakan mitokondria. RNS dan RSS dihasilkan dari proses reaksi antara ROS dengan oksida nitrat dan *tiol*. ROS/RNS dapat menyebabkan kerusakan sel jika bergabung secara kovalen terhadap molekul lain dengan merangsang pertumbuhan sel abnormal serta induksi penuaan yang menyebabkan populasi sel terus-menerus yang dalam jumlah besar menghasilkan sitokin inflamasi. Antioksidan dapat memblokir produksi spesies reaktif-efek yang merusak dan, memblokir penuaan, peradangan, dan kanker. Fungsi antioksidan dapat diklasifikasikan sesuai dengan mekanisme kerjanya: (a) agen pencegah penekan pembentukan radikal baru (yang meliputi enzim, seperti SOD, CAT dan GPX, protein yang mengikat logam, seperti feritin dan *ceruloplasmin*, dan mineral seperti selenium (Se), tembaga (Cu), dan seng (Zn); (b) agen pemulung radikal yang menghambat inisiasi atau penyebaran rantai, yang meliputi *glutation*, albumin, flavonoid, vitamin C dan E, dan karotenoid; (c) enzim perbaikan serta *de novo* dapat memperbaiki dan menyusun membran sel kembali meliputi lipase, protease, reduktase metionin-sulfoksida, enzim perbaikan DNA, dan *transferase*; (d) agen pengadaptasi yang dapat menghasilkan enzim antioksidan lalu memindahkannya ke tempat esensial. Keseimbangan redoks sangat penting dalam pemeliharaan lingkungan mikro seluler yang sehat (Mut-Salud *et al.*, 2016).

## 2. Pengolongan Antioksidan

**2.1 Antioksidan berdasarkan sumber.** Antioksidan dikategorikan menjadi dua jenis yaitu, antioksidan sintetis (dihasilkan melalui proses sintesis kimia) dan antioksidan alami (diperoleh dari ekstraksi bahan alam). Terdapat lima jenis antioksidan sintetis yang banyak digunakan secara global, yaitu *butylated hydroxytoluene* (BHT), *butylated hydroxyanisole* (BHA), *propyl gallate*, *tert-butyl hydroquinone* (TBHQ), dan tokoferol, antioksidan ini dibuat secara sintetis untuk pemasaran. Antioksidan *diphenolic* (TBHQ) efektif dalam minyak nabati jika dibandingkan terhadap BHA dan BHT. Antioksidan primer seperti TBHQ memberikan atom hidrogen pada proses autooksidasi. Antioksidan alami pada tumbuhan biasanya terdiri dari senyawa fenol atau polifenol, termasuk dalam kategori flavonoid, kumarin, turunan asam sinamat, tokoferol, dan asam organik polifungsional. Polifenol alami bersifat multifungsi dan mampu bertindak sebagai pengurang, oksigen, singlet, serta pengikat logam, dan penjerat radikal bebas. Antioksidan alami juga memiliki kemampuan untuk meredam ( $O_2$ ) (Ayucitra *et al.*, 2011).

**2.2 Antioksidan berdasarkan fungsi.** Berdasarkan fungsi memiliki dua tipe antioksidan yaitu antioksidan primer dan antioksidan sekunder. Antioksidan primer berfungsi sebagai donor hidrogen, yakni mendonorkan atom hidrogen saat tahap inisiasi yang membentuk pada radikal peroksida. Antioksidan sekunder berfungsi sebagai pengaktif logam, agen pereduksi, dan pembersih oksigen. Perbedaan antioksidan primer yaitu antioksidan sekunder tidak mengubah radikal bebas menjadi molekul yang lebih stabil. Antioksidan sekunder berfungsi sebagai pengikat untuk ion logam, menonaktifkan oksigen singlet, bertindak sebagai pembersih oksigen atau menyerap radiasi ultraviolet. Antioksidan sekunder bertugas meningkatkan aktivitas antioksidan primer, contoh antioksidan sekunder antara lain, karotenoid, asam sitrat, dan vitamin C (asam askorbat) (Ayucitra *et al.*, 2011).

## 3. Metode Uji Antioksidan

**3.1 Tes ABTS.** ABTA atau *2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)* dikembangkan pertama kali oleh Miller dan Tim (1993) sebagai metode sederhana dan mudah diterapkan dalam mengukur kapasitas total antioksidan (TAC). Kapasitas antioksidan digunakan untuk menetralkan kation radikal stabil *2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)* sebuah kromofor biru-hijau dengan

lambda maksimum 734 nm, yang intensitasnya menurun dengan diikuti penambahan antioksidan. ABTS<sup>+</sup> dihasilkan dari ABTS karena adanya agen antioksidan kuat. Perubahan warna biru-hijau diukur sebagai penurunan signifikan dalam absorbansi, tergantung lamanya reaksi, konsentrasi sampel, dan aktivitas antioksidan intrinsik (Munteanu & Apetrei, 2021).

Uji TEAC digunakan untuk mengukur kapasitas antioksidan total dari zat murni, cairan tubuh, dan bahan nabati. Uji TEAC, mirip dengan metode netralisasi radikal lainnya, dapat diotomatisasi dan disesuaikan dengan teknik pelat mikro dan injeksi aliran. Tes ini juga dapat digabungkan dengan HPLC dengan menyertakan reaksi pasca kolom dengan kation radikal ABTS untuk memfasilitasi identifikasi antioksidan individu dalam campuran yang kompleks (Munteanu & Apetrei, 2021).

**3.2 Tes DPPH.** *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* atau DPPH merupakan radikal bentuk monomernya dalam keadaan padat, dan juga dalam bentuk larutan. Reaktivitas rendah yang unik dipengaruhi oleh “penyaringan struktur hidrazyl yang efisien di sekitar molekul” serta konjugasi yang diperpanjang lebih sedikit. Penghilangan gugus *p-nitro* hanya memiliki sedikit pengaruh, penghilangan gugus yang bertanggung jawab untuk melindungi gugus *o-nitro* menyebabkan peningkatan reaktivitas yang signifikan. Fakta bahwa kedua gugus fenil dipelintir memiliki efek buruk pada stabilitas konjugasi. Uji DPPH netralisasi didasarkan pada donasi elektron dari antioksidan di untuk menetralkan radikal DPPH, perubahan warna DPPH yang diukur pada 517 nm, dan perubahan warna sebagai indikator akibat aktivitas antioksidan. Metode netralisasi DPPH dengan aktivitas antioksidan dilaporkan sebagai EC<sub>50</sub> yaitu konsentrasi antioksidan efisien untuk mengurangi sebesar 50% konsentrasi DPPH awal (Munteanu & Apetrei, 2021).

Kerugian dari metode DPPH adalah kenyataan bahwa banyak antioksidan yang bereaksi cepat dengan radikal peroksida hampir atau seluruhnya *inert* terhadap DPPH. DPPH merupakan metode yang stabil, tersedia secara komersial dan tidak harus dibuat sebelum melakukan pengujian seperti ABTS (Dontha, 2016). DPPH memiliki kelebihan dalam eksperimen karena kemudahannya dan kekurangan pada saat pengukuran absorbansi harus dilakukan dengan teliti karena DPPH dapat menurunkan kadar antioksidan akibat faktor lain (sinar,

$O_2$ , pH, jenis pelarut), antioksidan lambat dalam bereaksi dan DPPH tidak cukup hanya menentukan senyawa antioksidan dan komponen alami. DPPH unggul karena proses pengukuran cepat, sederhana, dan biayanya murah, kekurangan lain DPPH yaitu radikal DPPH hanya dapat larut dalam pelarut organik (Al-Hmoud *et al.*, 2014).

**3.3 Tes FRAP.** Uji FRAP merupakan berbasis SET yang khas dalam mengukur reduksi kompleks antara ion besi ( $Fe^{3+}$ ) dengan ligan membentuk kompleks besi biru ( $Fe^{2+}$ ) melalui antioksidan pada lingkungan asam. FRAP ditentukan sebagai peningkatan absorbansi pada serapan 593 nm, hasil uji dinyatakan sebagai ekuivalen mikromolar  $Fe^{2+}$  atau kaitannya dengan antioksidan standar. Uji FRAP dilakukan pada kondisi pH asam ( $pH= 3,6$ ) untuk menjaga kelarutan besi. Reaksi pada pH rendah menurunkan potensial ionisasi yang mendorong transfer elektron dan meningkatkan potensial redoks, menyebabkan pergeseran dalam mekanisme reaksi yang dominan (Munteanu & Apetrei, 2021).

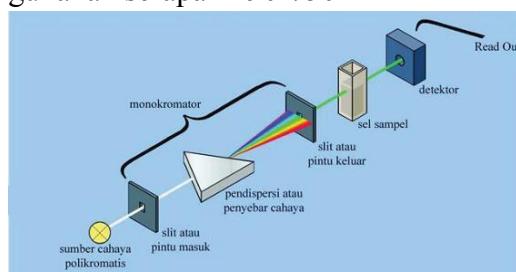
Tes FRAP menggunakan *tripyridytriazine* sebagai ligan penghubung ke ion besi, sementara ligan alternatif juga digunakan untuk mengikat ion besi, seperti *ferrozine* untuk menilai daya reduksi asam askorbat. Kalium *ferricyanide* telah menjadi pereaksi besi yang paling umum digunakan dalam tes FRAP. Tes FRAP sederhana, cepat dan hemat biaya, dan tidak memerlukan peralatan khusus. Hasil tes FRAP dapat bervariasi sesuai dengan waktu analisis yang diamati untuk reaksi antara antioksidan dan  $Fe^{3+}$  berkisar dari menit hingga beberapa jam. Titik akhir penyerapan titik tunggal mungkin tidak mewakili reaksi lengkap, karena berbagai antioksidan memerlukan waktu reaksi yang berbeda untuk deteksi (Munteanu & Apetrei, 2021).

#### 4. Spektrofotometri UV-Vis

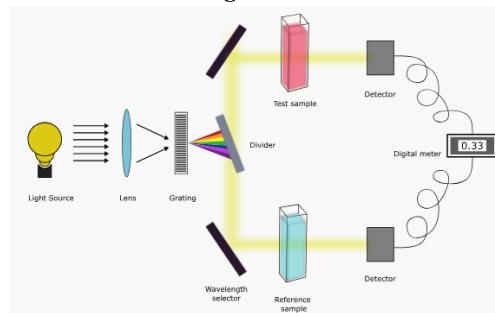
**4.1. Spektrofotometeri Uv-Vis.** Ultraviolet jauh memiliki panjang gelombang  $\pm 10\text{-}200$  nm, dan ultraviolet dekat memiliki panjang gelombang  $\pm 200\text{-}400$  nm. Sinar UV secara langsung tidak dapat terlihat oleh manusia, namun beberapa hewan, termasuk reptil, burung dan serangga dapat melihat sinar UV. Interaksi senyawa organik terhadap sinar UV dan sinar visibel dapat digunakan dalam menentukan struktur molekul dari senyawa organik. Molekul yang bereaksi dengan sinar antara lain, elektron ikatan dan elektron non-ikatan (bebas). Sinar UV dan sinar visibel yaitu energi interaksi elektron yang akan tereksitasi dari keadaan dasar ke tingkat tinggi, eksitasi elektron direkam oleh spektrum yang dinyatakan sebagai panjang gelombang ( $\lambda$ )

dan absorbansi. Elektron tereksitasi mengikuti besar panjang gelombang yang diabsorbsi, jika elektron tereksitasi banyak maka absorbnsi semakin tinggi. Spektrofotometri terdapat istilah terkait yaitu kromofor, auksokrom, efek batokromik atau pergeseran merah, efek hipokromik atau pergeseran biru, hipsokromik, dan, hipokromik. Kromofor yaitu molekul atau molekul yang mengabsorbsi sinar dengan kuat di daerah UV-Vis seperti heksana, aseton, benzena, karbonil, asetilen, karbon dioksida, gas nitrogen, dan karbon monooksida. Auksokrom yaitu gugus fungsi pasangan elektron bebas yang berikatan dengan ikatan kovalen tunggal pada kromofor yang mengintensifkan absorbnsi sinar UV-Vis pada kromofor, baik panjang gelombang hingga intensitas seperti, gugus amina, gugus alkaksi, gugus halida, dan gugus hidroksi.

**4.2. Tipe-tipe Spektrofotometer.** Spektrofotometer memiliki dua jenis instrumen yaitu *single-beam* dan *double-beam*. *Single-beam* yaitu instrumen yang digunakan untuk mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal, keuntungan instrumen ini yaitu sederhana, efisien, dan harganya murah. Panjang gelombang minimum instrumen ini yaitu 190-210 nm dan maksimum yaitu 800-1000 nm. *Double-beam* yaitu instrumen yang mempunyai dua sinar dibentuk oleh potongan cermin bentuk V disebut pemecah sinar, sinar pertama melewati blanko dan sinar kedua secara serentak melewati sampel. *Double beam* digunakan serapan 190-750 nm



Gambar 4. *Single-beam instrument*



Gambar 5. *Double-beam instrument*

### **4.3. Syarat Pengukuran Spektrofotometeri UV-Vis.**

Persyaratan pelarut antara lain, melarutkan sampel dengan sempurna, pelarut tidak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekul dan jernih, rendah atau tidak terjadi interaksi antara molekul senyawa yang dianalisis, kemurniannya tinggi. Spektrum UV-Vis memerlukan konsentrasi sampel, jika konsentrasi baik maka hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi akan linier ( $A \approx C$ ), nilai absorbansi berkisar antara 0,2-0,8 ( $0,2 \leq A < 0,8$ ) atau daerah hukum Lambert-Beer dengan lebar sel 1 cm, besarnya absorbansi senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi akan mengalami eksitasi elektron  $\pi \rightarrow \pi^*$ , jika Mr senyawa yang diukur tidak diketahui maka konsentrasi digunakan 10 ppm, jika absorbansi masih terlalu tinggi, larutan sampel harus diencerkan kembali, dan jika rendah maka sampel harus ditambah.

## **5. Optimasi Metode *Simplex Lattice Design* (SLD)**

**5.1. Design Expert.** *Design expert* merupakan *software* berbasis statistik produksi *state ease*. *Software design expert* rilis pertama kali tahun 1996 untuk melakukan desain eksperimental seperti menentukan formula optimum pada suatu sediaan, selain optimasi juga dapat menginterpretasikan faktor-faktor percobaan. *Software* ini terbagi menjadi tiga pilihan arah penelitian antara lain, *characterization*, *screening*, dan *optimization*.

**5.2. Metode *Design expert*.** *Optimization* membutuhkan paling banyak run per faktor, tetapi akan memberikan informasi terbanyak. Optimasi digunakan setelah mempersempit daftar faktor (<6) yang diketahui penting dan kemungkinan optimumnya ada pada wilayah yang sedang diuji, tiga metode yang dapat digunakan:

**5.2.1. Faktorial.** Faktorial merupakan persamaan regresi untuk memberikan model hubungan antara variabel respon dengan satu atau lebih variabel bebas. Faktor yaitu variabel independen yang mempengaruhi variabel dependen, faktor dibedakan menjadi dua faktor yaitu faktor kuantitatif (faktor numerik) dan kualitatif (faktor non-numerik). Level merupakan nilai atau tetapan faktor, sedangkan efek merupakan perubahan respon disebabkan variasi faktor, dan respon merupakan hasil percobaan yang dapat dikuantifikasi .

**5.2.2. Respon Surface Methodology (RSM).** RSM disebut juga *Box-Wilson Methodology* merupakan teknik statistik dan matematika untuk memodelkan dan menganalisis masalah di mana respon

dipengaruhi berbagai variabel. *Respon Surface Methodology* menghubungkan sebuah respon atau variabel *output* dengan data variabel *input* yang mempengaruhinya. Daerah yang memiliki respon optimum akan dibuat model untuk menghubungkan ke daerah tersebut sehingga analisis dilakukan untuk mencapai daerah yang paling optimal. Persamaan satu yaitu model regresi linear *multiple* terhadap dua variabel bebas. Variabel bebas disebut regresor atau variabel prediksi.  $\beta_0$  (nilai *intersep* tetap), dan  $\beta_1; \beta_2$  (koefisien regresi parsial  $\beta_1$  mengukur perubahan  $y$  setiap perubahan unit  $x_1$ ,  $\beta_2$  mengukur perubahan  $y$  setiap perubahan unit  $x_2$ ). Persamaan model ini mendekatkan pada daerah optimum melalui jalur optimasi, jika daerah optimum ditemukan maka persamaan kedua dapat digunakan.

**5.2.3. *Mixture*.** *Mixture* digunakan pada komponen formulasi yang dapat berubah secara proporsional satu sama lain. Persentase setiap variabel harus selalu bertambah sampai diperoleh nilai total yang tetap. Nilai faktor dalam *mixture* memiliki proporsi antara 0 dan 1. Salah satu metode dalam *mixture design* adalah *simplex lattice design* (SLD). *Simplex lattice design* yaitu metode optimasi untuk menentukan formula optimum suatu campuran bahan terhadap proporsi jumlah total dari suatu bahan berbeda harus 1 (100%). Bahan yang digunakan minimal terdiri dari dua bahan berbeda. Faktor pada *mixture* akan menentukan desain ruang atau daerah uji berdasarkan daerah uji, *software* akan menentukan titik uji setiap formula yang keluar. *Software design expert* menggunakan *the verticles*, *the overall centroid*, *the edge centers*, dan *the checkruns* sebagai titik uji. Titik akan mengalami pengulangan atau replikasi untuk mendapatkan nilai *pure error*. Respon yang didapatkan akan digambarkan sebagai plot kontur atau *contour plot*. Kontur plot memberikan titik optimum yang dicapai secara presisi. Pemodelan data menggunakan model matematika yaitu linear, *cubic*, *special cubic*, dan *quadratic*. Model dipilih berdasarkan signifikansi model, signifikansi *lack of fit*, *predicted r-square*, dan *adjusted r-square* saat analisis dengan ANOVA. Model dipilih jika memiliki probabilitas model dan probabilitas *lack of fit* < nilai  $\alpha$  (5%) berarti model berpengaruh signifikan terhadap respon. Formula optimum memiliki hasil dalam rentang batas pada setiap parameter, jika derajat *desirability* suatu formula mendekati 1 maka formula dinyatakan optimum.

**5.2.4. Combined.** *Combined* merupakan DOE (*Design of Experiment*) kombinasi antara RSM, faktorial, dan *mixture* digunakan dalam mempelajari variabel-variabel komposisi campuran terhadap variabel proses dalam satu DOE.

### E. Landasan Teori

Alpukat merupakan tanaman yang termasuk dalam keluarga tanaman berbunga *Lauraceae*, tanaman asli Amerika Tengah dan Meksiko. Biji alpukat mewakili persentase substansial (13%-17%) dari buah alpukat dan kaya akan berbagai komponen fungsional dan bioaktif, yaitu polisakarida, protein, lipid, mineral, dan vitamin. Biji alpukat mengandung banyak sekali bioaktif seperti fenolik, flavonoid, dan tanin terkondensasi. Ekstrak ini telah diperiksa untuk bioaktivitasnya, seperti anti-hiperglikemik, anti-kanker, anti-peradangan, anti-hiperkolesterolemia, antioksidan (Soledad *et al.*, 2021), anti-mikroba, dan anti-neurogeneratif, dengan berbagai penggunaan tradisional sebagai aplikasi dermatologis (Bangar *et al.*, 2022).

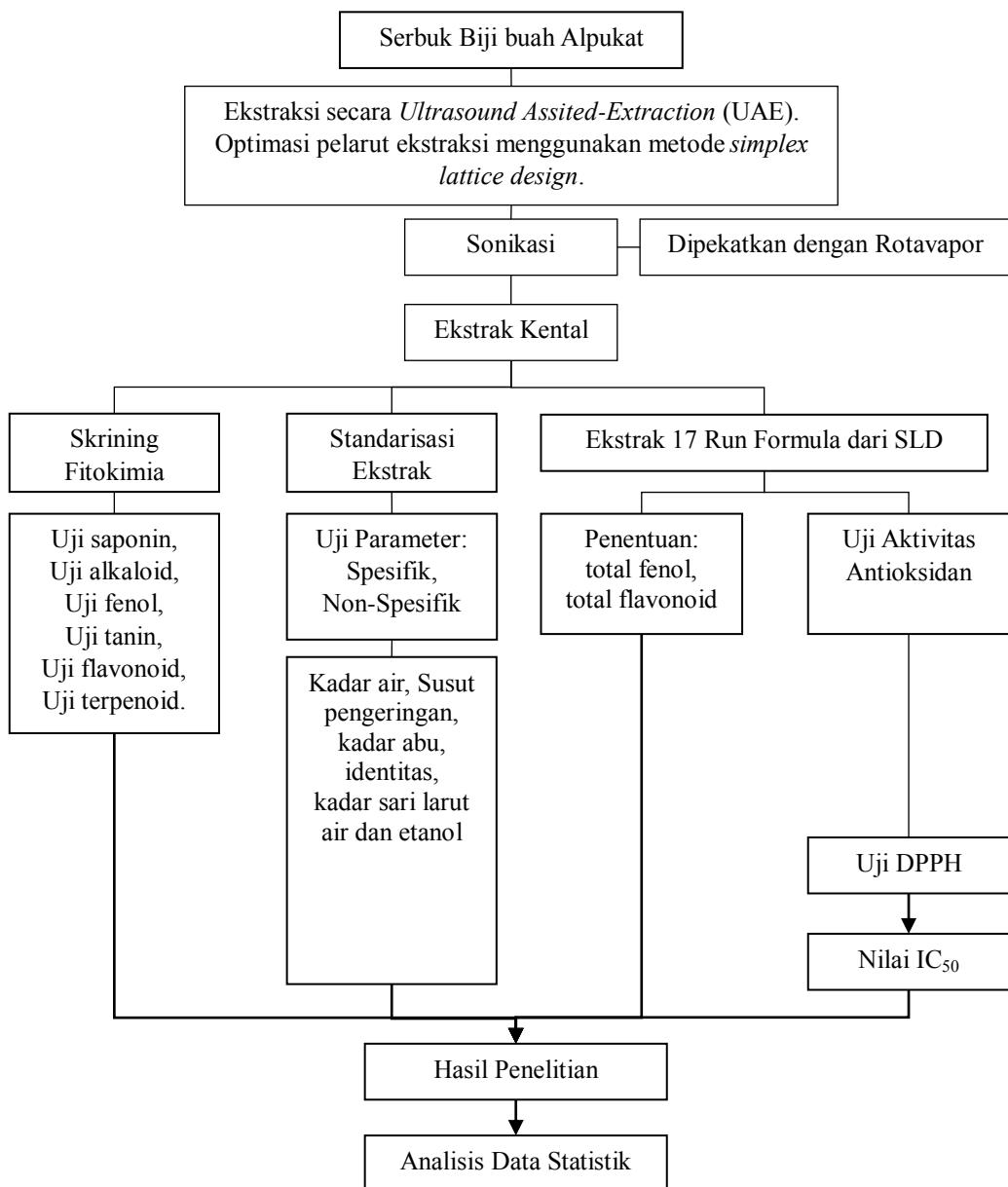
Komponen biji alpukat adalah protein, gula, pati, lemak, dan air. Senyawa bioaktif yang ditemukan dalam alpukat adalah flavonoid, karotenoid, fenolat, vitamin E, dan vitamin C. Kandungan fitokimia pada biji alpukat antara lain flavonoid, tanin, saponin, fenolat, kapasitas antioksidan, oksalat, fitat, dan alkaloid. Penelitian lain menyebutkan bahwa biji alpukat memiliki kandungan saponin, tanin, dan flavonoid merupakan bagian dari polifenol. Profil senyawa fenolik biji alpukat dapat diklasifikasikan menjadi alkanol, glikosida terpenoid, turunan yang mengandung cincin furan, flavonoid, dan kumarin (Setyawan *et al.*, 2021).

Ekstrak air dari biji alpukat menunjukkan potensi antioksidan dan dapat mencegah kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal. Komponen fenolik dan *procyanidin* (catekin dan epicatekin) pada biji alpukat menyumbangkan 38% aktivitas antioksidan dari buah alpukat utuh. Ekstrak etanolik biji alpukat *Hass* dan *Fuerte* memiliki banyak komponen fenolik. Potensi antioksidan yang dilaporkan sebesar 1175,1 dan 1881,4  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  untuk ekstrak kulit *Hass* dan *Fuerte*. Epicatekin dan catekin dalam biji dapat menstabilkan radikal peroksil ( $\text{ROO}^-$  anion ( $\text{O}_2^-$ ) dan superokksida). Katekin memiliki aktivitas menstabilkan 1,3;

2,5, dan 1,6 kali lipat lebih baik dalam menstabilkan ROO, O<sup>2</sup> dan spesies reaktif hipoklorit daripada epikatekin (Bangar *et al.*, 2022).

Ekstrak aseton dan etanol biji alpukat memiliki kandungan fenolik total sebesar 30,80 dan 30,25 GAE/100g, masing-masing, dan inisiasi DPPH sebesar 212,75 dan 183,75mg Trolox/100g. Ekstrak aseton biji alpukat menunjukkan daya reduksi yang lebih tinggi yaitu 56,35 ekuivalen asam askorbat (AAE)/100g dibandingkan ekstrak etanol (45,05g AAE/100g). Oleh karena itu, disarankan bahwa biji alpukat memiliki aplikasi potensial sebagai aditif antioksidan dalam produk makanan (Bangar *et al.*, 2022).

## F. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 6. Kerangka konsep penelitian

## G. Hipotesis

Adapun hipotesis pada penelitian ini antara lain sebagai berikut:

1. Perbandingan pelarut memengaruhi total fenol, total flavonoid, dan aktivitas antioksidan, semakin tinggi jumlah pelarut aseton, total fenol dan total flavonoid meningkat, dan aktivitas antioksidan tinggi (aktivitas antioksidan membaik).
2. Komposisi optimum dengan metode *simplex lattice design* menurut penelitian Rollando *et al.*, (2023), komposisi 100 % (0:100:0) (metanol:aseton:akuades) memberikan nilai desirability tertinggi: 0,884, menyiratkan akurasi ~88,4% memenuhi kriteria optimasi terhadap total fenol, flavonoid, dan aktivitas antioksidan.
3. Pelarut optimal menurut penelitian Weremfo *et al.*, (2020), nilai eksperimental dengan metode RSM yang diperoleh berkisar 47,25-89,39 mgGAE/g total fenol, 0,66-21,45 mgQE/g total flavonoid, 22,93-79,76 µg/mL penghambatan DPPH.