BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah deskriptif dengan pemeriksaan laboratorium kualitatif dan kuantitatif, mengunakan populasi yaitu kulit buah alpukat (*Persea americana Mill*.). Data yang diperoleh pada penetapan kadar flavonoid dilaporkan sebagai hasil penelitian. Penelitian ini menggunakan metode Eksperimental.

B. Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan variabel tunggal. Variabel tunggal yang dimaksud dalam penelitian ini adalah uji kualitatif dan kuantitatif pada kadar flavonoid yang ada dalam ekstrak kulit buah alpukat (*Persea americana Mill*.). Sampel yang diambil dalam penelitian ini yaitu buah alpukat yang segar yang ada di Kecamatan Selebar, Kota Bengkulu.

C. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Varibel	Definisi Operasional	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
Uji Kualitatif	Ekstrak etanol kulit buah alpukat (*Persea americana* Mill.)	1.Uji flavonoid dengan pereaksi wilstater	Mengandung senyawa flavonoid jika terebentuknya warna kuning.	nominal
		2.Uji flavonoid dengan pereaksi $FeCl_3$	Mengandung flavonoid jika terbentuknya warna hijau,merah,ungu,hitam dan biru.	
		3.Uji flavonoid dengan NaOH 10%	Mengandung flavonoid jika berwarna orange/jingga	
Uji Kuantitatif	Untuk mengetahui kadar flavonoid dalam ekstrak etanol kulit buah alpukat (*Persea americana* Mill.)	Spektrofotometri UV-Vis	persen%	Rasio

D. Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Bengkulu dan Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Bengkulu. Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Januari - Juni 2025

E. Tahap Penelitian

1. Tahap Pra Analitik

a. Pengurusan Perizinan

Pengurusan perizinan dilakukan dengan membuat surat izin penelitian pada laman https://poltekkesbengkulu.ac.id/ bagian layanan mahasiswa Poltekkes Kemenkes Bengkulu. Selanjutnya, untuk dilakukan determinasi dengan membawa sampel kulit buah alpukat ke Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Bengkulu.

b. Persiapan Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik, toples kaca, tabung reaksi, batang pengaduk, erlenmeyer, pipet tetes, pipet ukur, pipa kapiler, bola hisap, labu ukur, rak tabung, kertas saring, gelas kimia, corong, gunting, aluminium foil, kuvet, Spektrofotometri UV-Vis, dan Rotary evavorator

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah alpukat, etanol 70 %, HCl pekat, serbuk Magnesium (Mg), kuersetin, aquadest, AlCl3 10%, asam asetat 5%, NaOH 10%.

2. Tahap Analitik

a. Determinasi Tanaman

Pemeriksaan tanaman telah dilakukan di Laboratorium Universitas Bengkulu. Sampel yang dibawa berupa kulit buah alpukat

(*Persea americana* Mill.) yang diambil di Kecamatan Selebar, Kota Bengkulu.

b. Pengelolaan Sampel

1) Pengumpulan Sampel

Sampel diperoleh dari Kecamatan selebar, Kota Bengkulu. Sampel yang diambil adalah buah alpukat mentega yang sudah tua, ciri ciri buah alpukat mentega yang sudah tua berwarna hijau tua, kulit buah alpukat terasa sedikit keriput dan mengkilap.

2) Sortasi Basah

Pada tahap ini buah alpukat yang sudah siap di panen atau sudah tua dipisahkan antara kulit dan isinya, kemudian kulit alpukat yang telah dipisahkan dari isinya dipilih kembali dengan kriteria kulit seperti tidak busuk, tidak berlubang, dan sedikit mengkilap.

3) Pencucian

Pencucian dilakukan dengan mengunakan air PAM yang bersih dan mengalir untuk menghilangkan kotoran dan debu yang masih menempel pada kulit buah alpukat.

4) Pengeringan

Dilakukan secara alami dengan metode kering angin untuk menghilangkan kelembaban dan mencegah pertumbuhan jamur atau pembusukan.

5) Pemotongan atau Pemecahan

Setelah dikeringkan, simplisia dapat dipotong atau dipecah sesuai dengan ukuran yang diinginkan. Hal ini memudahkan penyimpanan dan pengunaan lebih lanjut.

6) Sortasi Kering

Dilakukan sortasi kering dimana kulit buah yang tampak tidak bagus atau kotoran yang tidak dapat dibersihkan pada sortasi sebelumnya maka dilakukan pemisahan.

7) Penyimpanan

Simplisia yang telah diolah harus disimpan dalam wadah yang kedap udara, kering, dan terlindung dari cahaya langsung. Penyimpanan yang baik akan mempertahankan kualitas dan keamanan simplisia.

c. Proses Ekstraksi

Sebanyak 500 gram simplisia kulit buah alpukat dimasukkan ke dalam wadah maserasi dan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% hingga serbuk simplisia terendam dengan baik. Proses ekstraksi ini berlangsung selama tiga kali lima hari. Setelah periode perendaman selesai, sampel yang telah dimaserasi disaring menggunakan kertas saring, menghasilkan filtrat I dan ampas. Proses remaserasi kemudian dilakukan sebanyak dua kali. Filtrat yang diperoleh dari semua tahap ini disatukan dan dipadatkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental yang diinginkan (Lasri Winarsih *et al*., 2021).

d. Uji Kualitatif Flavonoid

1. Identifikasi Senyawa Flavonoid Dengan Pereaksi *Wilstater*

Ekstrak kulit buah alpukat sebanyak 1 mL ditambahkan beberapa tetes HCl pekat, ditambahkan sedikit serbuk Mg. Reaksi positif mengandung flavonoid jika terjadi perubahan warna kuning (Aribowo, 2021).

2. Identifikasi Senyawa Flavonoid Dengan $FeCl_3$

Ekstrak daun sukun sebanyak 1 mL ditambahkan beberapa tetes $FeCl_3$. Reaksi positif mengandung flavonoid jika memberikan hasil warna hijau, merah, ungu, hitam, dan biru (Yulianis *et al.*, 2023)

3. Identifikasi Senyawa Flavonoid Dengan NaOH 10%

Ekstrak kulit buah alpukat sebanyak 1 mL ditambahkan beberapa tetes NaOH 10%. Reaksi positif mengandung flavonoid jika terjadi perubahan warna merah hingga orange/jingga (Aribowo, 2021).

e. Uji Kuantitatif Flavonoid

1. Pembuatan Larutan Baku Induk Kuersetin 0,1%

Pembuatan larutan baku induk kuersetin 0,1% dapat dilakukan dengan cara ditimbang sebanyak 100 mg baku standar kuersetin dan dilarutkan dengan etanol 70% sampai dengan 100mL (Asmorowati, 2019).

2. Pembuatan Larutan Baku Standar Kuersetin 0,01%

Larutan baku induk dipipet sebanyak 1 mL dan dicukupkan volumenya sampai 10 mL dengan etanol 70% sehingga diperoleh konsentrasi 0,01% (Asmorowati, 2019).

3. **Pembuatan Larutan Blanko**

   Pipet 1 ml larutan AlCl3 10% dan 8 ml asam asetat 5%, kemudian ditambahkan etanol 70% hingga volume mencapai 10 ml. Larutan blanko ini dibuat sebagai pembanding dengan sampel untuk pengukuran absorbansi (Pauner & Hamzah, 2022).

4. **Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (ƛ maks) Kuersetin**

   Larutan baku kerja kuersetin 0,01% sebanyak 1 ml diambil dan ditambahkan dengan 1 ml larutan AlCl3 10% serta 8 ml asam asetat 5%. Selanjutnya, pembacaan absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh digunakan untuk mengukur serapan dari sampel ekstrak kulit buah alpukat (Pauner & Hamzah, 2022).

5. **Penentuan *Operating Time***

   Larutan baku kerja kuersetin 0,01% sebanyak 1 ml diambil dan ditambahkan dengan 1 ml larutan AlCl3 10% dan 8 ml asam asetat 5%. Larutan tersebut kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum, dengan interval waktu 2 menit hingga diperoleh absorbansi yang tinggi. Selanjutnya, amati kurva hubungan antara absorbansi dan waktu untuk menentukan waktu

operasional (*operating time*). Absorbansi diukur menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Pauner & Hamzah, 2022).

6. Pembuatan Kurva Baku Kuarsetin

Larutan baku induk kuersetin 0,1% , kemudian dipipet sebanyak 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4mL; 0,5 mL; 0,6 mL dan ditambahkan etanol 70% sampai volumenya 5 mL sehingga diperoleh konsentrasi yaitu 0,004% , 0,006% , 0,008% , 0,01% , dan 0,012%. Masing-masing konsentrasi dari seri baku kuersetin dipipet 1 mL, kemudian ditambahkan 1 mL AlCl3 10% dan 8 mL asam asetat 5%, didiamkan selama *operating time*. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Asmorowati, 2019).

7. Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Kulit Buah Alpukat

Sebanyak 100 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dengan etanol 70% hingga mencapai volume 100 ml. Larutan tersebut kemudian dipipet sebanyak 1 ml, kemudian ditambahkan 1 ml larutan AlCl3 10% dan 8 ml asam asetat 5%. Sampel kemudian dibiarkan selama waktu (operating time). Absorbansi sampel diukur menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Asmorowati, 2019).

3. Analisis Data Penelitian

a. Perhitungan Nilai Rendemen

Hasil ekstrak kulit buah alpukat dihitung melalui persamaan:

$$\%\ \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang di dapat}}{\text{bobot simplisia yang di ekstraksi}} \times 100\%$$

b. Perhitungan Regresi Linier

Kadar flavonoid dihitung menggunakan persamaan regresi linier berdasarkan kurva kalibrasi yang dihasilkan dari pembacaan spektrofotometri UV-Vis. Data absorbansi yang diperoleh dari penentuan kadar flavonoid pada ekstrak kulit buah alpukat dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier sebagai nilai y. Berdasarkan persamaan tersebut, nilai x dapat dihitung untuk memperoleh konsentrasi flavonoid dalam larutan sampel kerja.

Persamaan regresi linier dinyatakan dengan:

$$\mathbf{y = a + bx}$$

Keterangan:

x = konsentrasi (%)

y = absorbansi

b = koefisien regresi (menyatakan slope / kemiringan kurva)

a = intersep

Rumus Penentuan Kadar Flavonoid Total (%)

$$F = \frac{C\ x\ V\ x\ Fp}{m}\ x\ 100\%$$

Kemenkes Poltekkes Bengkulu

C = konsentrasi (mg/ml)

V = volume (ml)

Fp = faktor pengenceran

m = berat sampel (mg) (Ariani *et al*., 2022)

Kemenkes
Poltekkes Bengkulu