

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian perbandingan kadar saponin ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) segar dan kering menggunakan spektrofotometer UV-Vis merupakan penelitian eksperimental. Pada penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap akhir.

Tahap persiapan merupakan tahap awal yaitu persiapan sampel daun waru, alat dan bahan yang akan dibutuhkan dalam penelitian. Tahapan selanjutnya yaitu tahap pelaksanaan, merupakan tahapan pembuatan sampel (ekstrak daun waru), uji kadar saponin. Tahap akhir dari penelitian ini yaitu pengujian kadar saponin ekstrak daun waru.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol daun waru.

3.2.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah sebagian ekstrak metanol daun waru.

3.3 Lokasi dan waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi

Penelitian dilakukan di Laboratorium Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang.

3.3.2 Waktu

Waktu penelitian ini dilakukan dalam kurun waktu bulan April-Juni 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) segar dan kering. Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini yaitu kadar saponin ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) segar dan kering.

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Sub variabel	Definisi	Parameter Uji	Alat Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas	Ekstrak daun waru (<i>Hibiscus tiliaceus</i> L.) segar dan kering	Hasil ekstrak daun waru yang diperoleh dari daun segar dan kering	Rendemen ekstrak	Timbangan analitik	Nominal
Variabel terikat	Kadar saponin	Kadar saponin yang terdapat pada ekstrak daun waru	Absorbansi	Spektrofotometer UV-Vis	Nominal

3.5 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian merupakan alat dan bahan yang digunakan untuk pengumpulan data. Berikut alat dan bahan yang digunakan meliputi

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : neraca analitik, perkamen, waterbath, cawan uap, tabung reaksi, rak tabung reaksi, oven, batang pengaduk, *beaker glass*, spektrofotometer UV-Vis.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : daun waru, metanol, diosgenin, aquadest, HCl 2N, Kloroform, H₂SO₄ 72%, vanilin.

3.6 Prosedur Kerja/Pengumpulan Data

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) dilakukan oleh peneliti.

Tahapan determinasi buah lerak adalah sebagai berikut :

1. Disiapkan tanaman daun waru.
2. Dicatat bentuk dan susunan tubuh buah lerak sebagai data.
3. Dicocokan data yang telah diperoleh dengan kata kunci determinasi tumbuhan sehingga ditemukan famili.
4. Dari famili diperoleh spesies, dan dilanjutkan ke atas sehingga diperoleh kingdom.

3.6.2 Pengambilan Sampel

Sampel Daun Waru diambil dari Desa Kedungrejo, Kecamatan Rowokangkung, Kabupaten Lumajang. Pengambilan dilakukan pada saat proses fotosintesis berlangsung maksimal sekitar pukul 09.00-12.00 dengan cara memetik daun yang sehat dan tidak berjamur hingga pada daun kelima dari pucuk (Jami, 2010).

3.6.3 Pengolahan Sampel

1. Daun Waru Segar

Sampel yang telah dikumpulkan kemudian dibersihkan dari kotoran, lalu dicuci dengan air bersih. Setelah itu sampel dibiarkan tetap segar kemudian dipotong kecil-kecil dan dihaluskan, sampel siap diekstraksi (Jami, 2010).

2. Daun Waru Kering

Sampel yang telah dikumpulkan kemudian dibersihkan dari kotoran, lalu dicuci dengan air bersih. Setelah itu sampel dipotong kecil-kecil dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 55°C selama 3 hari kemudian dihaluskan, sampel siap diekstraksi (Makkar, 2007).

3.6.4 Ekstraksi Daun Waru

3.6.4.1 Ekstrak Daun Waru Segar

1. Ditimbang daun waru segar sebanyak 65,4 gram (Kristianingsih, 2005)
2. Lakukan dengan metode maserasi dengan pelarut metanol p.a dengan perbandingan 1:6 berat sampel (Suharti. S, 2009).
3. Disaring ekstrak hingga didapatkan maserasi pertama
4. Remaserasi dengan metanol p.a perbandingan 1:2 berat sampel
5. Disaring filtrat hingga didapatkan maserasi kedua
6. Dipekatkan filtrat dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 70°C
7. Ditimbang ekstrak kental yang diperoleh dan ditentukan rendemennya

3.6.4.2 Ekstrak Daun Waru kering (Oven)

1. Ditimbang simplisia kering sebanyak 60 gram (Kristianingsih, 2005)
2. Lakukan dengan metode maserasi dengan pelarut metanol p.a dengan perbandingan 1:6 berat sampel (Suharti. S, 2009)
3. Disaring ekstrak hingga didapatkan maserasi pertama
4. Remaserasi dengan metanol p.a perbandingan 1:2 berat sampel
5. Disaring filtrat hingga didapatkan maserasi kedua
6. Dipekatkan filtrat dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 70°C
7. Ditimbang ekstrak kental yang diperoleh dan ditentukan rendemennya

3.6.5 Uji Pendahuluan

Uji kadar saponin secara kualitatif terdiri dari uji busa dan uji warna.

3.6.5.1 Uji busa (Eko, 2015)

1. Ditimbang 0,3 gram ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Ditimbang 10 mL aquadest kemudian dikocok kuat
3. Ditambahkan HCl 2N, diamati terbentuknya busa stabil selama kurang lebih 1 menit

3.6.5.2 Uji Warna (Eko, 2015)

1. Ditimbang 0,3 gram ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Ditambahkan 10 mL kloroform
3. Dipanaskan di dalam inkubator selama 5 menit sambil dikocok/diaduk
4. Ditambahkan pereaksi LB (*Lieberman Burchard*) hingga terbentuk cincin coklat pada permukaan tabung

3.6.6 Penentuan Kadar Saponin (Pasaribu, 2014)

1. Pembuatan larutan reagen vanilin dan H₂SO₄

Ditimbang 1,6 gram vanilin dan ditambahkan 20 mL pelarut etanol, kemudian dicampur. Pembuatan H₂SO₄ 72%, diambil H₂SO₄ 72 mL, ditambahkan 28 mL air sedikit demi sedikit.

2. Pembuatan larutan baku diosgenin

Ditimbang diosgenin 70 mg, dilarutkan dalam 50 mL metanol.

3. Pembuatan kurva standar

Pembuatan larutan standar didahului dengan pembuatan larutan induk 1400µg/mL yang dibuat dengan melarutkan 70 mg diosgenin ke dalam 50 mL metanol p.a (Pasaribu, 2014). Dibuat larutan dengan konsentrasi berturut-turut

adalah 602 μ g/mL, 798 μ g/mL, 994 μ g/mL, 1204 μ g/mL, 1400 μ g/mL, kemudian dilihat nilai absorbansi pada panjang gelombang 520 nm.

4. Penentuan kadar sampel

Ditimbang ekstrak daun waru sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 5 mL metanol. Dipindahkan larutan sebanyak 0,25 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan reagen vanilin sebanyak 0,25 mL dan penambahan H₂SO₄ 72% sebanyak 2,5 mL. Campuran divorteks dan dipanaskan pada waterbath dengan suhu 60°C selama 10 menit, kemudian didinginkan selama 3-4 menit dan absorbansinya dilihat pada panjang gelombang 520 nm pada alat spektrofotometri UV-Vis. Larutan blanko yang digunakan adalah metanol p.a, vanilin, dan H₂SO₄ (Pasaribu, 2014).

3.7 Analisis Data

Dalam penelitian ini analisis data diambil dari hasil uji kadar saponin pada daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan data diuji dengan menggunakan uji *Independent sample T-test*.