

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan kadar saponin ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) dengan metode pengeringan sinar matahari dan pengeringan oven. Adapun tahap dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

3.1.1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan yang dilakukan yaitu menentukan sampel penelitian, menentukan lokasi dan waktu penelitian, serta menghitung kebutuhan bahan, kemudian menyiapkan peralatan yang diperlukan sesuai dengan kebutuhan.

3.1.2. Tahap Pelaksanaan

Tahap pelaksanaan meliputi pemilihan daun waru lalu dicuci terlebih dahulu. Lalu dikeringkan dengan metode sinar matahari dan pengeringan oven, kemudian di ekstraksi daun waru dengan menggunakan pelarut metanol. Setelah itu, di uji kadar saponin pada panjang gelombang maksimal 200-800 nm menggunakan metode spektrometri UV-Vis.

3.1.3. Tahap Akhir

Pada tahap akhir dilakukan pengolahan data, analisis data dan membuat kesimpulan.

3.2. Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.).

3.2.2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 30,2 miligram ekstrak metanol daun waru.

3.3. Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1. Lokasi Penelitian

Proses pengeringan daun waru dengan sinar matahari dilaksanakan di Kepanjen. Proses pengeringan dengan oven, ekstraksi dan pengujian ekstrak saponin dilaksanakan di Laboratorium Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang.

3.3.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juni 2019.

3.4. Definisi Operasional Variabel

Pada penelitian ini terdapat dua variabel, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) dari pengeringan oven dan sinar matahari. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar saponin ekstrak buah lerak pengeringan oven dan sinar matahari yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Tabel 3.1 Definisi Oprasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Parameter Uji	Alat Ukur	Skala Ukur
Ekstrak daun waru (<i>Hibiscus tiliaceus</i> L.) dari pengeringan oven dan pengeringan sinar matahari.	Hasil ekstrak daun waru yang diperoleh dari pengeringan oven dan sinar matahari.	Rendemen ekstrak dan skining fitokimia senyawa saponin	Timbangan analitik	Nominal
Kadar saponin pada ekstrak	Kadar saponin yang terdapat pada ekstrak daun waru.	Absorbansi dan persamaan regresi linear.	Spektrofotometer UV-Vis	Nominal

3.5. Alat dan Bahan/Instrumen Penelitian

3.5.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, meliputi:

1. Neraca analitik
2. Toples untuk maserasi
3. Perkamen
4. Oven
5. Batang pengaduk
6. Waterbath
7. Cawan penguap
8. Tabung reaksi
9. Rak tabung reaksi
10. Gelas ukur
11. Kuvet
12. Spektrofotometer UV-Vis
13. Pipet volum
14. Pipet ukur
15. Pisau
16. Blender
17. Beaker glass

3.5.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, meliputi

1. Daun waru
2. Metanol p.a
6. H₂SO₄ 72%
7. HCl 2N

3. Diosgenin
4. Vanillin
5. Etanol p.a
8. Aquadest
9. Kloroform

3.6. Prosedur Kerja/Pengumpulan Data

3.6.1. Determinasi Daun Waru (Minarno, 2016)

Tujuan determinasi adalah untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan dalam penelitian. Determinasi tanaman daun waru dilakukan dengan cara mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman daun waru terhadap kunci determinasi tumbuhan.

Tahapan determinasi buah lerak adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan tanaman daun waru.
2. Mencatat bentuk dan susunan tubuh daun waru sebagai data.
3. Mencocokkan data yang telah diperoleh dengan kata kunci determinasi tumbuhan sehingga ditemukan keluarga.
4. Dari keluarga diperoleh spesies, dan dilanjutkan ke atas sehingga diperoleh kingdom

3.6.2. Persiapan Sampel

1. Mengambil daun waru dari Desa Kedungrejo, Kecamatan Rowokangkung, Kabupaten Lumajang. Pengambilan dilakukan pada saat proses fotosintesis berlangsung maksimal sekitar pukul 09.00 – 12.00 dengan cara mengambil daun yang sehat dan tidak berjamur mulai dari pucuk hingga daun kelima (Jami, 2010).
2. Membersihkan sampel dari kotoran, lalu dicuci dengan air bersih
3. Memotong daun waru kecil-kecil

4. Mengeringkan daun waru di bawah sinar matahari dengan ditutup menggunakan kain hitam
5. Mengeringkan daun waru sampai kering dan kadar air tidak lebih dari 10%
6. Mengeringkan daun waru dengan oven pada suhu 55°C selama 3 hari
7. Menimbang berat kering sampel (Minarno, 2016)
8. Menghaluskan dan mengayak menggunakan ayakan 12 mesh sehingga diperoleh serbuk kering daun waru.

3.6.3. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dalam penelitian ini dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol, yaitu sebagai berikut:

1. Mengambil serbuk kering daun waru sebanyak 20 gram
2. Maserasi dengan metanol p.a perbandingan 1:6 berat sampel (Minarno, 2016)
3. Menyaring simplisia hingga didapatkan maserat pertama
4. Melakukan remaserasi dengan metanol p.a perbandingan 1:2 sebanyak dua kali sampai mendekasi warna pelarut
5. Menyaring simplisia hingga didapatkan maserat kedua
6. Memekatkan filtrat dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 70°C (Sirait, Midian. 2007)
7. Menimbang ekstrak kental yang diperoleh dan menghitung rendemennya.

3.6.4. Uji Pendahuluan

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

3.6.4.1 Uji busa (Minarno, 2016)

1. Menimbang 0,1 gram ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Menambahkan 10 mL aquadest kemudian dikocok kuat

3. Menambahkan satu tetes HCl pekat, mengamati terbentuknya busa stabil selama kurang lebih 1 menit dengan ketinggian 1-3 cm

3.6.4.2 Uji warna (Minarno, 2016)

1. Menimbang 0,1 gram ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Menambahkan 10 mL kloroform
3. Memanaskan selama 5 menit, sambil dikocok
4. Menambahkan pereaksi LB. Jika terbentuk cincin coklat atau violet pada permukaan tabung maka menunjukkan adanya saponin triterpen, sedangkan warna hijau atau biru menunjukkan adanya saponin steroid.

3.6.5. Penentuan Kadar Senyawa Saponin (Pasaribu, T & et.al, 2014)

1. Pembuatan larutan reagen vanillin dan H₂SO₄
Menimbang 0,8 gram vanillin dan menambahkan 10 mL pelarut etanol, kemudian menghomogenkan. Pembuatan H₂SO₄ 72%, mengambil H₂SO₄ 72 mL dan menambahkan sedikit demi sedikit aquades sebanyak 28 mL.
2. Pembuatan larutan baku diosgenin
Pembuatan larutan baku diosgenin 0,5 mg/mL dengan cara menimbang diosgenin sebanyak 10 mg kemudian melarutkan dalam 20 mL metanol.
3. Penentuan 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. Membuat larutan dengan konsentrasi berturut-turut adalah 602µg/mL, 798µg/mL, 994µg/mL, dan 1204µg/mL, kemudian dilihat nilai absorbansi pada panjang gelombang 520 nm.

4. Penentuan kadar sampel

Menimbang ekstrak daun waru sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam 5 mL metanol. Memindahkan larutan sebanyak 0,25 mL ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan reagen vanillin sebanyak 0,25 mL dan H₂SO₄ 72% sebanyak 2,5 mL. Nilai absorbansi dilihat pada panjang gelombang 520 nm pada alat spektrofotometer UV-Vis. Larutan blanko yang digunakan adalah metanol p.a, vanillin, dan H₂SO₄.

3.7 Analisa Data

Analisis dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Kemudian data dianalisis statistik menggunakan uji *independent sample T-test* untuk mengetahui perbedaan kadar saponin daun waru hasil pengeringan sinar matahari dan pengeringan oven yang signifikan.

Dasar pengambilan keputusan:

1. Jika probabilitasnya $< 0,05$ maka H₁ diterima
2. Jika probabilitasnya $> 0,05$ maka H₁ ditolak

