

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian ini termasuk penelitian kuantitatif yang bertujuan untuk mengetahui kadar saponin yang terdapat dalam daun sirsak (*Annona muricata L.*) menggunakan metode gravimetri dan penelitian eksperimen laboratorium, dengan rancangan untuk mengetahui aktivitas antioksidan saponin pada daun sirsak menggunakan metode *1,1-diphenyl-2-picryl hidrazyl* (DPPH).

#### **B. Variabel Penelitian**

1. Variabel Independen (Variabel Bebas)

Variabel Independen dalam penelitian ini adalah kadar saponin dalam ekstrak metanol daun sirsak.

2. Variabel Dependen (Variabel Terikat)

Variabel Dependen dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan dalam saponin ekstrak metanol daun sirsak.

#### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

1. Lokasi Penelitian: Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Farmakognosi, laboratorium Mikrobiologi, dan laboratorium instrumen STIKes Ibnu Sina Ajibarang.
2. Waktu penelitian: penelitian dilakukan selama 1 bulan yaitu pada bulan Agustus 2022.

#### **D. Alat dan bahan**

1. Alat

Alat yang digunakan antara lain, Alat gelas (*Herma*<sup>®</sup>), eksikator (*Dianrui*<sup>®</sup>), mikro pipet (*Accumax pro*<sup>®</sup>), neraca analitik (*Matrix*<sup>®</sup>), oven (*D-Lab*<sup>®</sup>), rak tabung, refluks (*Pyrex*<sup>®</sup>), *rotary evaporator* (*D-Lab*<sup>®</sup>),

sendok besi, sendok tanduk (*Onit*<sup>®</sup>), tabung reaksi (*Pyrex*<sup>®</sup>), mikrotips, vortex (*B-one*<sup>®</sup>), kuvet (*Matrix*<sup>®</sup>), Spektrofotometri Uv-Vis (*D-Lab*<sup>®</sup>).

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan antara lain, Aluminum foil, Aquades, eter, etil asetat, HCL<sub>2</sub>N, Daun sirsak (*Annona muricata L.*), metanol, n-butanol, petroleum eter, dietil eter, kloroform, *Liebermann-Burchard*, kertas perkamen, kertas saring, tissue, vitamin C, *1,1-diphenyl-2-picryl hidrazyl* (DPPH).

## E. Langkah kerja

### 1. Pengambilan Sampel

Sampel daun sirsak diambil dari Desa Lumbir, Kecamatan Lumbir, Kabupaten Banyumas, Jawa tengah. Daun sirsak yang digunakan yaitu daun sirsak yang berwarna hijau tua dari daun ke 3-6 dari pucuk.

### 2. Determinasi Tumbuhan

Determinasi daun sirsak (*Annona muricata L.*) dilakukan untuk memastikan kebenaran sampel tanaman yang digunakan benar-benar (*Annona muricata L.*). Tanaman sirsak di determinasi di Laboratorium Lingkungan, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman.

### 3. Pengolahan Sampel

Sampel Daun sirsak (*Annona muricata L*) yang telah dikumpulkan disortasi basah kemudian dibersihkan dengan air mengalir, kemudian dikeringkan ditempat yang tidak terkena cahaya matahari langsung dan ditutup dengan kain hitam, dihaluskan dan diayak untuk memperoleh serbuk halus, kemudian disortasi kering setelah itu diekstraksi.

### 4. Identifikasi Saponin

Dimasukkan 0,5 g serbuk simplisia daun sirsak kedalam tabung reaksi. Lalu ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan dan dikocok kuat selama 10 detik hingga terbentuk busa dengan tinggi 1-2 cm. Kemudian tambahkan 1 tetes HCL<sub>2</sub>N melalui dinding tabung reaksi. Pada

penambahan 1 tetes HCL<sub>2</sub>N, busa tidak hilang berarti sampel mengandung saponin (Marpaung & Romelan, 2018). Identifikasi saponin dilakukan di Laboratorium Farmakognosi STIKes Ibnu Sina Ajibarang.

#### 5. Penentuan Jenis Saponin

Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia dimasukkan kedalam 10 ml kloroform dan dipanaskan selama 5 menit dengan penangas air sambil dikocok. Kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi LB (*Liebermann-Burchard*). Jika terbentuk cincin coklat atau violet maka menunjukkan adanya saponin triterpenoid, sedangkan warna hijau atau biru menunjukkan adanya saponin steroid (Suharto dkk, 2012). Penentuan jenis saponin dilakukan di Laboratorium Farmakognosi STIKes Ibnu Sina Ajibarang.

#### 6. Ekstraksi Sampel

Sebanyak 50 gram serbuk simplisia daun sirsak direfluks dengan metanol (1:10) selama 30 menit pada suhu 50-60°C. Sari metanolik dipisahkan dari ampas dan diuapkan dengan rotavapor pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental daun sirsak. Ekstrak yang diperoleh ditimbang dengan menggunakan neraca analitik dan dihitung rendemennya (Marpaung & Romelan, 2018). Ekstraksi Sampel dilakukan di Laboratorium Farmakognosi STIKes Ibnu Sina Ajibarang.

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental (g)}}{\text{Bobot simplisia (g)}} \times 100\%$$

#### 7. Penetapan Kadar Saponin

Sebanyak 1 gram ekstrak direfluks dengan 50 ml petroleum eter pada suhu 60 - 60°C selama 30 menit. setelah dingin larutan petroleum eter di buang dan residu yang tertinggal dilarutkan dalam 50 ml etil asetat.

Larutan dipindahkan ke corong pisah kemudian dipisahkan larutan etil asetat. Residu yang tertinggal dilarutkan dengan n-butanol sebanyak 3 kali masing-masing dengan 50 ml. Seluruh larutan tersebut dicampur dan diuapkan dengan rotary evaporator dengan suhu 60–70°C. Sisa penguapan

dilarutkan dengan metanol 10 ml kemudian larutan di teteskan kedalam 50 ml dieter etil sambil diaduk.

Endapan yang terbentuk dalam campuran dituang pada kertas saring yang telah diketahui bobotnya. Kertas saring dikeringkan kemudian ditimbang sampai bobot tetap. Selisih bobot kertas saring sebelum dan sesudah penyaringan di tetapkan sebagai bobot saponin dilakukan sebanyak 3 kali dengan hasil perhitungan kadar rata-ratanya dan dibuat pada tabel (Marpaung & Romelan, 2018).

Analisa data

Analisis kadar saponin dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$\frac{X2 - X1}{A} \times 100 = \dots \%$$

Keterangan :

X1 = bobot kertas saring (g)

X2 = bobot kertas saring + endapan (g)

A = bobot ekstrak daun sirsak (g)

Penetapan kadar Saponin dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Laboratorium Mikrobiologi STIKes Ibnu Sina Ajibarang.

## 8. Analisis Antioksidan

### a. Pembuatan Larutan DPPH (0,1 mM)

- 1) Menimbang DPPH sebanyak 1,98 mg.
- 2) Melarutkan DPPH ke dalam metanol sebanyak 50 ml.
- 3) Kocok hingga homogen, dan lapiasi seluruh tabung dengan aluminium foil sampai tidak ada bagian yang terpapar cahaya.

### b. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

- 1) Mengambil 2 ml dari larutan DPPH 0,1 mM
- 2) Ditambahkan dengan 2 ml metanol, dihomogenkan.
- 3) Kemudian diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit (Ulfah, 2016). Panjang gelombang yang digunakan 517 nm (Aminah dkk, 2016).

c. Pembuatan Larutan Uji

1) Larutan induk (1000 ppm)

Mengukur saponin ekstrak metanol daun sirsak dan melarutkan dalam metanol. Rasio berat ekstrak (mg) dengan metanol (ml) adalah 1:1.

2) Larutan Seri

Konsentrasi daun sirsak yang di uji yaitu 10 ppm, 50 ppm, 250 ppm, 500 ppm dan 750 ppm sebanyak 10 ml. Masing-masing konsentrasi larutan uji sebanyak 2 ml dimasukkan dalam vial. Ditambahkan larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 2 ml, dihomogenkan. Selanjutnya inkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit. Lalu ukur dengan absorbansi tertinggi. Setiap konsentrasi sampel dilakukan replikasi 2x (Muthia dkk, 2019).

d. Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Konsentrasi vitamin C yang diuji yaitu 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm dan 70 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan uji sebanyak 2 ml dimasukkan dalam vial. Ditambahkan larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 2 ml, dihomogenkan. Selanjutnya inkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit. Lalu ukur dengan absorbansi tertinggi. Setiap konsentrasi sampel dilakukan replikasi 2x (Artanti & Renita, 2018).

e. Analisis Data

Absorbansi dari kombinasi ekstrak yang diperoleh dibandingkan dengan absorbansi DPPH sehingga diperoleh % aktivitas antioksidannya. Perhitungan persentase aktivitas antioksidan dan menggunakan rumus :

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \frac{Ac - Ab}{Ac} \times 100\%$$

Keterangan :

Ac = Nilai absorbansi Blanko

Ab = Nilai absorbansi sampel

Data hasil penentuan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dihitung nilai  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentration*) dengan menggunakan persamaan regresi linier  $Y = aX + b$  dengan konsentrasi ekstrak (ppm) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % inhibisi (antioksidan) sebagai ordinat (sumbu Y). Nilai  $IC_{50}$  dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50% (Nastiti dkk, 2021). Pengujian aktivitas antioksidan dari saponin ekstrak metanol daun sirsak dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Instrumen. Dibawah ini tabel mengenai klasifikasi antioksidan menurut Molyneux 2004:

**Tabel 3.1 Klasifikasi aktivitas antioksidan**

| No | Nilai $IC_{50}$ | Antioksidan |
|----|-----------------|-------------|
| 1  | < 50            | Sangat kuat |
| 2  | 50-100          | Kuat        |
| 3  | 100-150         | Sedang      |
| 4  | > 151-200       | Lemah       |