

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yaitu eksperimental untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak buah harendong dengan variasi 3 pelarut meliputi pelarut polar, semi polar, dan non polar, serta melakukan pengujian toksisitas terhadap ekstrak buah harendong.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan Penelitian

Buah harendong (*M. malabathricum* L), Metanol, Etil asetat, N-heksan, aquadest, plat KLT, larva udang *artemia salina*, Kapas steril, Silika gel, FeCl₃, Mayer, Dragendorf, H₂SO₄, Lieberman-Burchard, NaOH, aluminium foil, tissue roll

3.2.2 Alat Penelitian

Alat maserasi (Maserator), timbangan digital, rak tabung, spatula, alat-alat gelas (Iwaki Pyrex®), vial 15 mL, cawan porselen, plat KLT, Lampu UV, lemari pendingin, *handscoon*

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu Pembuatan ekstrak buah harendong menggunakan tiga pelarut meliputi pelarut polar (metanol), semi polar (etil asetat), non polar (N-heksan), skrining fitokimia, serta pengujian bslt.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu rendemen ekstrak tiap pelarut, uji skrining fitokimia meliputi pengujian alkaloid, saponin, flavonoid, fenolik dan tanin, triterpenoid dan steroid, klt serta pengujian toksisitas terhadap *artemia salina*.

3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang selama kurang lebih 3 (tiga) bulan yaitu dari bulan Juni – Agustus 2021.

3.5 Pembuatan Reagen Untuk Uji Fitokimia & Pereaksi Penampak Bercak

Reagen yang digunakan pada Uji Fitokimia adalah :

1. Pereaksi Mayer

Sebesar 1,36 gr raksa (II) klorida diencerkan dengan 60 mL aquadest di dalam *beaker glass*. Kemudian pada *beaker glass* terpisah, 1 gr kalium iodida dilarutkan dengan 10 mL aquadest, kedua larutan tersebut dicampurkan serta disaring. Kombinasi ini dilarutkann hingga 100 mL di dalam labu ukur dengan aquadest.

2. Pereaksi Lieberman-Burchard

Sebesar 5 mL anhidrida asetat serta 5 mL asam sulfat pekat dicampurkan secara lama - lama di dalam *beaker glass*, kemudian dilarutkan sampai 100 mL dengan pelarut etanol.

3. Larutan Besi (III) Klorida 5%

Sebanyak 5 gr kristal besi (III) klorida dimasukan kedalam *beaker glass*. Kemudian diencerkan dengan aquadest hingga 100 mL.

4. Larutan Asam Sulfat 2 N

Sebesar 13,9 mL asam sulfat pekat dimasukan kedalam *beaker glass* yang telah berisi 100 mL aquadest secara lama-lama lewat bilik gelas, setelah itu diencerkan sampai volume 250 mL.

5. Larutan Natrium Hidroksida 1%

Sebesar 1 gr Natrium Hidroksida diencerkan dengan aquadest hingga volume 100 mL dalam *beaker glass*.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengelolaan Sampel

Sampel segar buah harendong matang dibersihkan dari kotoran atau benda asing lainnya serta dibasuh sampai higienis. Sampel ditiriskan serta

dikeringkan dalam oven di suhu 40-50 °C selama 4-5 hari sampai kadar air tetap konstan. Sampel yang telah kering kemudian digerus menggunakan blender serta diayak menggunakan mesh berukuran 100. Simplisia yang diperoleh dibungkus menggunakan plastik serta diamankan buat percobaan lebih lanjut. (Syafitri et al., 2014)

3.6.2 Ekstraksi sampel

Simplisia Buah Harendong (*M. malabathricum* L) diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan 3 pelarut berbeda, yaitu n-heksan, etil asetat, dan metanol. Pertama-tama, masukkan simplisia ke dalam maserator kemudian tambahkan pelarut n-heksan sampai simplisia terendam dan diamkan selama 1 hari sambil sesekali diaduk. Setelah itu, tampung filtrat dan keringkan residu. Selanjutnya residu kembali diekstraksi dengan pelarut dan cara yang sama. Residu diekstraksi lebih lanjut dengan menggunakan pelarut etil asetat dan metanol, prosesnya sama seperti tahap pertama yang membedakannya hanya pelarut yang digunakan dengan masing-masing tiga kali percobaan. Ulangi ekstraksi sampai diperoleh ekstrak cair. Ekstrak selanjutnya diuapkan dengan rotary evaporator hingga didapat ekstrak kental serta ditutup menggunakan aluminium foil lalu simpan di lemari pendingin. (Gloria & dkk, 2019)

3.6.3 Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

2 mL ekstrak buah harendong ditambahkan sedikit demi sedikit 10mL kloroform dan amonia 0,05N. Lalu saring filtrat dengan kapas dan masukan kedalam tabung reaksi tambahkan 10 tetes asam sulfat dan kocok pelan. Campuran didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan yakni, lapisan asam dan lapisan kloroform. Lapisan asam diambil menggunakan pipet tetes kemudian dimasukan kedalam tabung reaksi lalu tambahkan reagen mayer terbentuknya endapan putih menandakan golongan alkaloid (Abriyani & Fikayuniar, 2020)

b. Uji Flavonoid

2 mL ekstrak buah harendong ditambahkan 2 mL asam klorida pekat, kemudian ditambahkan serbuk magnesium, jika terbentuk warna jingga, merah muda sampai merah menunjukkan (+) flavonoid. (Abriyani & Fikayuniar, 2020)

c. Uji Saponin

2 mL ekstrak buah harendong ditambahkan 2 mL aquadest lalu kocok kuat selama 30 detik. Jika berbuih menandakan adanya saponin (Abriyani & Fikayuniar, 2020)

d. Uji Fenolik dan Tanin

2 mL ekstrak buah harendong ditambahkan FeCl_3 . Apabila terbentuk warna biru tua, hijau, atau hitam menandakan adanya fenolik dan tanin (Abriyani & Fikayuniar, 2020)

e. Uji Triterpenoid dan Steroid (Lieberman Buchard)

Lapisan kloroform ditetesi kedalam 3 plat tetes, biarkan mengering lalu masukan asam sulfat ke masing-masing lubang plat tetes lalu tambahkan setetes asetat anhidrida jika terbentuk warna hijau atau hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid, dan jika berwarna merah atau magenta menunjukkan adanya triterpenoid. (Abriyani & Fikayuniar, 2020)

3.7 Uji Toksisitas Menggunakan BSLT

3.7.1 Persiapan Larva *Artemia salina* L.

Persiapan larva dimulai dengan mengambil telur *A. salina* Leach sebanyak 1 gr. Penetasan dilakukan dengan cara merendam telur dalam air laut buatan sebanyak 2 L serta diberi cahaya dengan lampu pijar 40-60 watt dan diaerasi selama 2 hari. Air laut buatan dibikin dengan cara melarutkan 40 gr garam dalam 2 L air kemudian disaring. (Maukar, Runtuwene, & Pontoh, 2013)

3.7.2 Penyiapan Larutan Uji

Terbuat larutan baku dengan konsentrasi 2000 ppm. Dari larutan uji 2000 ppm, berikutnya dibikin lagi larutan uji dengan konsentrasi 1000, 500, 100 ppm dengan metode pengenceran. Buat kontrol (0 ppm) dicoba tanpa akumulasi ekstrak. (Maukar et al., 2013)

3.7.3 Uji toksisitas

Siapkan tabung 10 mL, setelah itu tiap - tiap larutan uji dipipet dengan konsentrasi larutan uji. Tidak hanya itu, tambahkan air laut serta 10 ekor larva *A. salina* umur 48 jam sampai volume menggapai 5 mL. Tiap konsentrasi diulang duplo serta dibandingkan dengan kontrol. Pengujian ini dicoba sepanjang 1 hari dan setelah itu dilihat jumlah kematian larva *A. salina* (Zuraida, 2018)

3.8 Analisis Data

Uji toksisitas ilustrasi ditetapkan dengan memandang besarnya nilai dari LC50 yang bisa mematikan *A. salina* hingga 50% serta dicoba perhitungan statistik dengan analisa probit (*probability unit*). Menurut Nurhayati *et al.* (2006), dampak toksisitas dianalisis dari pengamatan dengan persen mortalitas. (Zuraida, 2018)

$$\%Mortalitas = \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Abbott (1925) dalam Meyer *et al.* (1982) berkata apabila pada kontrol ada larva yang mati, hingga % kematian ditentukan dengan rumus:

$$\%Mortalitas = \frac{\text{uji-kontrol}}{\text{kontrol}} \times 100\%$$

Sehabis mengenali % Mortalitas larva *A. salina*, setelah itu dicari nilai probit lewat tabel probit dan diregresikan secara linier.

$$Y = a + bX$$

Penjelasan :

Y = Nilai probit

a = Konsentrasi regresi

b = Slope/kemiringan regresi

X = Logaritma10 konsentrasi uji