

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, dan Laboratorium Semi Solid Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian dilakukan selama 3 bulan terhitung dari bulan Agustus-Oktober 2021.

Tanaman yang akan dilakukan penelitian di peroleh di PT. Brataco Chemical dan dideterminasi terlebih dahulu untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang dipakai. Determinasi dilakukan di BRIN (Badan Riset dan Inovasi Nasional), Jakarta.

3.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan ialah Ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan ekstrak metanol batang senduduk (*Melastoma malabathricum* L.), air laut, aquadest, *n*-heksan, etil asetat, etanol, metanol *p.a.* hewan uji yang digunakan ialah larva *Artemia salina* L., sebagai pelarut tambahan digunakan larutan DMSO (Dimetil Sulfoksida) untuk membantu kelarutan *n*-heksan dalam aquades dan air laut.

3.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserator, aerator, cawan porselin, chamber, corong buchner, gelas kimia, pipet tetes, tabung reaksi, lampu pijar, lampu UV, mikropipet, pipa kapiler, rotatory evaporator, sendok tanduk, seperangkat alat uji BSLT, spatel besi, neraca analitik Vial 5 ml.

3.4 Persiapan sampel Ekstrak Batang Senduduk (*Melastoma malabathricum* L.)

Ekstrak *n*-heksan, etil asetat, metanol batang senduduk (*Melastoma malabathricum* L.) di pesan dari PT. Brataco Chemikal.

3.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia batang senduduk terdiri dari pengujian Alkaloid, flavonoid, tanin, kuinon, saponin serta Triterpenoid dan steroid.

3.5.1 Alkaloid

Simplisia sebanyak 1 gram ditambahkan dengan 50 ml air panas, lalu dididihkan selama 5 menit kemudian saring, lalu tambahkan dengan masing-masing

1% amonia dan kloroform. Setelah itu ambil lapisan kloroform dan ditempatkan pada tabung reaksi, lalu ditambahkan HCl 1 N dan kocok kuat hingga terbentuk lapisan. Lapisan asam di pipet dan dibagi menjadi tiga tabung berbeda, tabung reaksi 1 ditambahkan pereaksi mayer, dan tabung reaksi 2 ditambahkan pereaksi dragendrof dan tabung ke tiga digunakan sebagai blangko. Hasil positif ditunjukkan pada tabung reaksi 1 dengan membentuk endapan putih dan tabung reaksi 2 merah kecoklatan (Harborne, 1987).

3.5.2 Flavonoid

Simplisia sebanyak 1 gram ditambahkan dengan 50 ml air panas, lalu dididihkan selama 5 menit kemudian saring. Filtrat yang dihasilkan ditambahkan dengan sesepora serbuk Mg dan HCl 2N. Lalu tambahkan amilalkohol kocok kuat dan biarkan. Terbentuk warna kuning hingga merah yang menandakan hasil positif flavonoid (Harborne, 1987).

3.5.3 Tanin

Simplisia sebanyak 1 gram ditambahkan dengan 50 ml air panas, lalu dididihkan selama 5 menit kemudian saring. lalu ditambahkan pelarut gelatin 1%. Terbentuknya endapan putih menandakan hasil positif tanin (Harborne, 1987).

3.5.4 Kuinon

Simplisia sebanyak 1 gram ditambahkan dengan 50 ml air panas, lalu dididihkan selama 5 menit kemudian saring. Lalu ditambahkan larutan KOH 5%. Terbentuknya warna kuning hingga merah menandakan hasil positif kuinon (Harborne, 1987).

3.5.5 Saponin

Simplisia sebanyak 1 gram ditambahkan dengan 50 ml air panas, lalu dididihkan selama 5 menit kemudian saring. lalu dikocok dan didiamkan selama 15 menit. Terbentuknya busa yang persisten kurang lebih selama 10 menit menandakan hasil positif saponin (Harborne, 1987).

3.5.6 Triterpenoid dan Steroid

Sebanyak 1gram sampel digerus dengan 5 ml eter. Lalu pipet dan diuapkan hingga kering ke dalam residu ditetaskan pereaksi *Lieberman-Burchard* dan terbentuk warna ungu menandakan hasil positif triterpenoid, sedangkan

terbentuknya warna biru atau hijau menandakan hasil positif steroid (Harborne, 1987).

3.6 Uji Aktivitas Toksisitas dengan Metode BSLT

Pada pengujian aktivitas toksisitas menggunakan metode BSLT terdiri atas penyiapan larva *A. salina* L., Penyiapan larutan stok, penyiapan larutan stok dan larutan uji (Muaja *et al.*, 2013; Rizqillah, 2013).

3.6.1 Penyiapan Larva *A. salina* L.

Mula-mula dilakukan penetasan larva *A. salina* L. dengan cara merendam larva udang dalam wadah berbentuk kerucut yang berisi air laut atau air yang diberi garam dapur sebanyak 37 gram ke dalam 1 liter air tawar. Alat penetas dilengkapi dengan lampu sebagai sumber cahaya dan diberi aerator yang berfungsi sebagai penyuplai oksigen dan menjaga agar telur tidak mengendap, kemudian timbang larva sebanyak 5 gram per liter air. larva dimasukkan pada wadah dan akan menetas kira-kira 24 jam setelah ditaburkan. Selanjutnya larva dipindahkan dalam kotak kecil berisi 500 ml air laut yang telah terbagi menjadi dua ruang yang dihubungkan oleh lubang-lubang kecil. Ruang penetasan diberi kondisi gelap sedangkan yang lain diberi penerangan dan aerator. Larva yang baik akan berenang menuju ruang yang terang karena mereka bersifat fototropik. Larva udang akan siap untuk digunakan dalam pengujian setelah berumur 48 jam.

3.6.2 Penyiapan Larutan Induk

Setelah didapatkan larva *A. salina* L. dilakukan larutan induk dengan konsnetrasi 2000 ppm dengan menimbang masing-masing ekstrak *n-heksan*, etil asetat dan ekstrak metanol sebanyak 2000 mg dalam 100 ml akuades (khusus untuk ekstrak *n-heksan* di tambah DMSO sebelum di ad 100 ml sebanyak 2 ml), kemudian dibuat lagi larutan dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm dalam 10 ml aquadest, dengan mengambil 250 μ l, 500 μ l, 750 μ l, 1250 μ l, 2500 μ l, dan 5000 μ l dari larutan induk lalu dilarutkan dengan 10 ml akuades.

3.6.3 Pembuatan Larutan Uji untuk Keseluruhan Ekstrak yang di dapat

Setelahnya masukan 10 ekor larva *A. salina* L. ke dalam vial 10 ml lalu ditambahkan 9 mL air laut dan dicampurkan dengan 1 mL masing-masing

konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak pada tabung reaksi yang sudah terisi larva *A. salina* L. yaitu 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm dan 400 ppm yang masing-masing ekstrak memiliki konsentrasi berbeda-beda. Lakukan pengulangan sebanyak tiga kali pada masing-masing konsentrasi. Kontrol negatif dengan mencampurkan 10 ekor larva *A. salina* L. pada tabung reaksi yang dicampur dengan 10 mL air laut tanpa penambahan ekstrak.

3.7 Pengukuran Toksisitas

Pengukuran uji toksisitas dengan metode BSLT menggunakan larva *A. salina* L. diolah menggunakan metode analisis probit guna mendapatkan nilai LC₅₀. pengukuran dengan cara menghitung jumlah larva *A. salina* L. yang mati 50 % dari total larva uji (10 ekor). Kemudian nilai LC₅₀ dihitung menggunakan analisis probit. Berikut ini rumus dari efek toksisitas kematian larva *A. salina* L.:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva uji}} \times 100 \%$$

Kemudian membuat persamaan regresi linier, $y = a + bx$. Dengan keterangan:

y = nilai probit,

x = log konsentrasi,

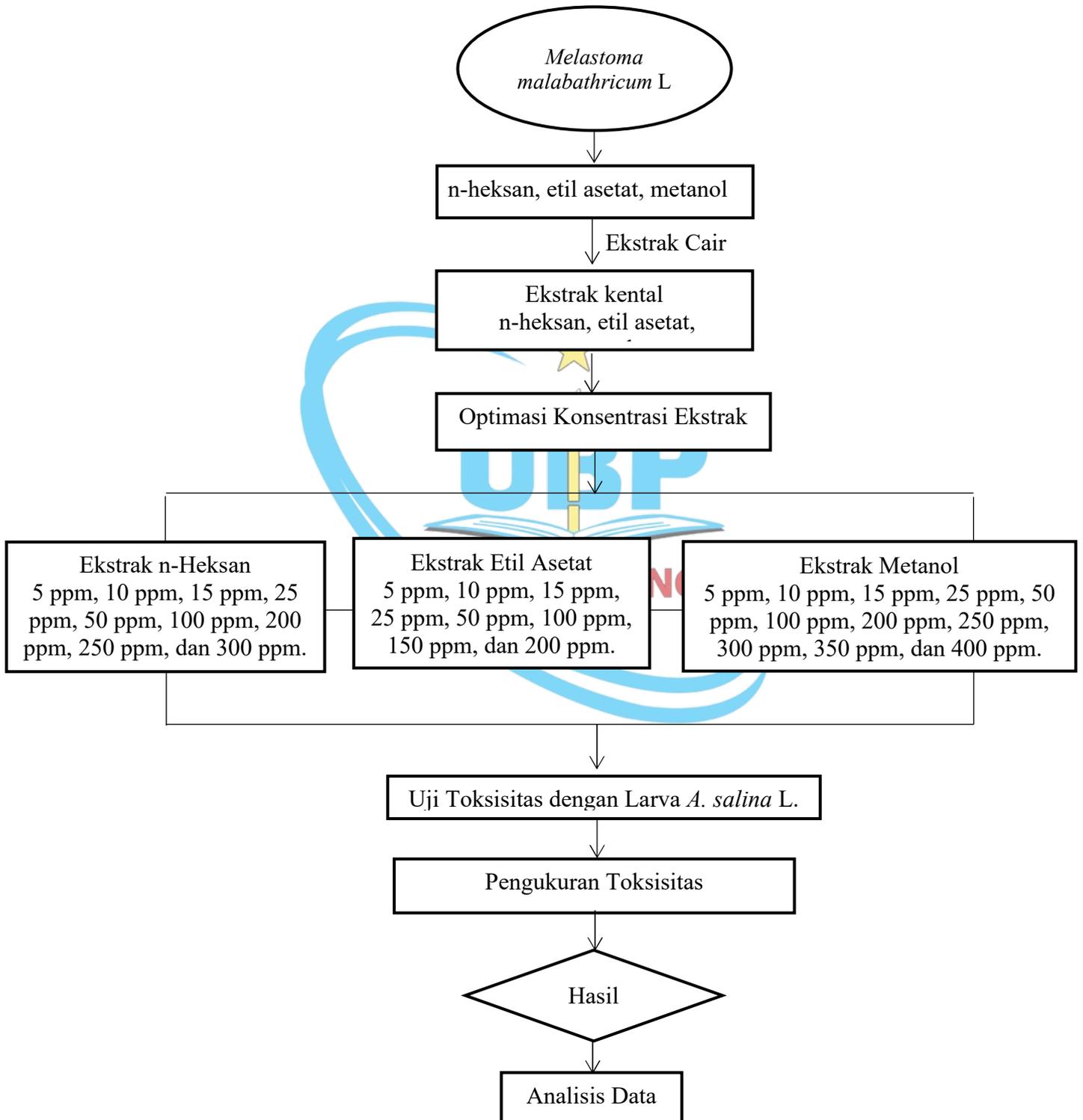
a = *Intercept* (garis potong)

b = *Slope* (kemiringan dari garis regresi linier)

Nilai LC₅₀ merupakan nilai y yang dimasukkan kedalam nilai $x = 50 \%$.

3.8 Diagram Alir Penelitian

Berikut ini merupakan diagram alir penelitian:



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian