

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian ekperimental dengan pendekatan *Post Test Only Control Group design* untuk menguji toksisitas akut kombucha daun tin (*Ficus carica*) terhadap larva udang (*Artemia salina*) dibagi menjadi 8 kelompok yang terdiri dari 1 kelompok kontrol negative dan 7 kelompok perlakuan dengan replikasi sebanyak 3 kali. Daun tin yang digunakan adalah varietas *green yordania*. Adapun rancangan dalam penelitian ini meliputi pengumpulan bahan, pembuatan simplisia, pembuatan kombucha daun tin, skrining fitokimia, penyiapan larva udang, pengujian toksisitas akut menggunakan metode *Brine shrimp lethality Test* (BSLT).

Jumlah hewan uji yang digunakan dalam masing-masing kelompok perlakuan adalah 10 ekor larva. Penentuan jumlah hewan uji tersebut dilakukan dengan menggunakan rumus Federer. Adapun rumusnya yaitu  $(t-1) \times (n-1) \geq 15$ . Sehingga didapatkan total jumlah hewan uji yang digunakan adalah 210 ekor.

#### **3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **3.2.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah kombucha daun tin yang berasal dari simplisia daun tin sebanyak 7 gram diseduh dalam 1000 mL air.

### 1.2.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah sebagian kombucha daun tin dengan konsentrasi tertentu yang digunakan untuk mengukur toksisitas berdasarkan nilai LC50

### 3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai dari pembuatan proposal yaitu bulan Desember 2018 hingga penelitian selesai dilakukan yakni bulan Mei 2019. Lokasi penelitian dilakukan di laboratorium Farmakognosi yang terdapat di Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang.

### 3.4 Definisi Operasional Variable

Penelitian ini memiliki dua variabel, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu konsentrasi kombucha daun tin yang digunakan. Sedangkan variabel terikat nya yaitu kematian larva udang (*Artemia salina* Leach)

**Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel**

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukuran	Skala Ukur
1.	Konsentrasi kombucha daun tin	Hasil teh asam daun tin yang ditentukan dan dapat memiliki efek toksik terhadap larva udang.	<i>Pipet Volume</i>	mL	Nominal
2	Toksisitas akut kombucha daun tin terhadap larva udang	Kemampuan kombucha daun tin menyebabkan kematian terhadap hewan uji yaitu larva udang	Visual	Jumlah	Nominal

### **3.5 Alat dan Bahan**

#### **3.5.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah panci, kompor, timbangan analitik, botol kaca, saringan, sendok, wadah plastik, lampu neon, lakban, aluminium foil, tabung reaksi, pipet volume, pipet ukur, beaker gelas, gelas ukur.

#### **3.5.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah simplisia daun tin, gula pasir, aquadest, kombucha, larva udang (*Artemia salina* Leach), air laut.

### **3.6 Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1 Pembuatan Simplisia Daun Tin**

Pembuatan simplisia daun tin dapat dilakukan dengan mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Hidayah (2017) dan telah dilakukan modifikasi tahapannya meliputi pengumpulan bahan baku yaitu daun tin varietas *Green yordania* dengan memilih daun yang masih muda hampir ke tua dan berwarna hijau. Selanjutnya tahap sortasi basah dengan cara membersihkan kotoran yang masih menempel pada daun serta pemilihan daun yang sehat. Kemudian daun tin dicuci bersih dengan air mengalir, direndam, dan posisikan daun tin dalam keadaan berdiri selama 24 jam untuk menghilangkan getahnya. Proses selanjutnya yaitu perajangan dan pengeringan daun tin dengan sinar matahari langsung. Tahap terakhir adalah sortasi kering.

#### **3.6.2 Pembuatan Kombucha Daun Tin**

Berdasarkan penelitian Umami (2018) menjelaskan cara pembuatan kombucha daun tin yaitu simplisia kering daun tin sebanyak 7 gram diseduh dengan

air hangat sebanyak 1000 mL, kemudian hasil seduhan disaring dan ditambahkan gula pasir sebanyak 100 mg. Ditambahkan starter kombucha pada seduhan daun tin yang sudah dingin. Selanjutnya seduhan daun tin disimpan pada suhu 27<sup>0</sup>C atau suhu ruang, difermentasi selama 12 hari.

### **3.6.3 Skrining Fitokimia**

Kombucha daun tin diuji kandungan metabolit sekundernya dengan cara skrining fitokimia. Adapun prosedur nya sebagai berikut:

#### 1) Alkaloid

Disiapkan 3 mL kombucha daun tin ditambah 5 mL HCl 2N didalam tabung reaksi, dipanaskan diatas penangas air selama 2-3 menit, sambil diaduk. Setelah dingin ditambahkan 0,3 gram NaCl, kemudian diaduk. Kemudian dibagi menjadi 3 bagian sebagai larutan IA, IB, dan IC. Kemudian masing-masing larutan ditambahkan pereaksi mayer, wagner dan dragen droft. Adanya kandungan alkaloid ditandai dengan terjadinya perubahan warna menjadi keruh, coklat keruh atau terjadi pengendapan (Harbone, 1987 dalam Az-zahro', 2018).

#### 2) Flavonoid

Disiapkan sampel kombucha daun tin sebanyak 2 mL didalam tabung reaksi ditambah etanol dengan perbandingan sama, kemudian dipanaskan. Setelah dipanaskan ditambahkan HCl pekat sebanyak 2 mL dan serbuk Mg. Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan perubahan warna menjadi merah tua atau coklat tua. (Harbone, 1987 dalam Az-zahro', 2018).

#### 3) Tanin

Disiapkan sampel kombucha daun tin sebanyak 2 mL didalam tabung reaksi ditambah air paas dengan perbandingan sama, kemudian ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  sebanya 3 tetes. Adanya tanin ditandai terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman (Harbone, 1987 dalam Az-zahro', 2018).

#### 4) Saponin

Disiapkan sampel kombucha daun tin sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan aquadest dengan perbandingan sama. Dikocok kuat selama 30 detik sampai 1 menit. Adanya kandungan senyawa saponin ditandai dengan adanya buih atau busa yang bertahan hingga lebih dari 1 menit (Harbone, 1987 dalam Az-zahro', 2018).

#### 5) Steroid

Disiapkan sampel kombucha sebanyak 2 mL didalam tabung reaksi ditambahkan kloroform, kemudian ditambahkan asam asetat anhidrat dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Adanya steroid ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi hijau gelap (Harbone, 1987 dalam Az-zahro', 2018).

### **3.6.4 Penyiapan larva udang (*Artemia salina* Leach)**

Penyiapan larva udang (*Artemia salina* Leach) dilakukan dengan menetasakan telur udang selama 48 jam sebelum dilakukan pengujian. Penetasan dilakukan dengan menggunakan wadah *beaker glass*. Kemudian dimasukkan 1 liter air laut kedalam wadah tersebut. Air laut yang digunakan memiliki pH sekitar 8-9. Salah satu bagian ruang dari wadah tersebut diberi lampu neon sebagai penerang untuk menghangatkan suhu ruang tersebut sehingga dapat merangsang proses penetasan larva udang (*Artemia salina* Leach). Lampu dinyalakan selama 48 jam

untuk menetas telur larva udang. Selain itu juga diberi aerator untuk membantu proses pernafasan dari *Artemia salina* Leach (Ajrina, 2013).

### **3.6.5 Konsentrasi Kombucha Daun Tin**

Untuk mendapatkan konsentrasi kombucha daun tin yang efektif maka dilakukan uji *trial and error* atau uji orientasi konsentrasi. Larutan induk yang digunakan dalam penelitian ini adalah kombucha daun tin kadar 100%. Kemudian dilakukan *trial and error* sebanyak tiga kali. *Trial and error* pertama dibuat larutan uji dengan melakukan pengenceran dari larutan induk dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% dan 90%. *Trial and error* kedua dibuat larutan uji kombucha daun tin dengan konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8% dan 9%. Sedangkan *trial and error* yang ke tiga adalah konsentrasi kombucha daun tin yang sekaligus digunakan sebagai uji toksisitas akut, adapun konsentrasinya yaitu 3% ; 2% ; 1% ; 0,1% ; 0,05% ; 0,02% dan 0,01%

### **3.6.6 Pembagian Kelompok Perlakuan**

Dalam penelitian ini terdapat 8 kelompok. Adapun bagiannya sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol negatif (K-) tidak diberi kombucha daun tin, hanya di beri air laut saja sebanyak 4 mL
2. Kelompok perlakuan 1 (P1) diberi kombucha daun tin dengan konsentrasi 3% sebanyak 2 mL dan air laut sebanyak 2 mL
3. Kelompok perlakuan 2 (P2) diberi kombucha daun tin dengan konsentrasi 2% sebanyak 2 mL dan air laut sebanyak 2 mL

4. Kelompok perlakuan 3 (P3) diberi kombucha daun tin dengan konsentrasi 1% sebanyak 2 mL dan air laut sebanyak 2 mL
5. Kelompok perlakuan 4 (P4) diberi kombucha daun tin dengan konsentrasi 0.1% sebanyak 2 mL dan air laut sebanyak 2 mL
6. Kelompok perlakuan 5 (P5) diberi kombucha daun tin dengan konsentrasi 0.05% sebanyak 2 mL dan air laut sebanyak 2 mL
7. Kelompok perlakuan 6 (P6) diberi kombucha daun tin dengan konsentrasi 0.02% sebanyak 2 mL dan air laut sebanyak 2 mL
8. Kelompok perlakuan 7 (P7) diberi kombucha daun tin dengan konsentrasi 0.01% sebanyak 2 mL dan air laut sebanyak 2 mL

Pemilihan konsentrasi kombucha daun tin yang digunakan dalam uji toksisitas akut adalah hasil dari *trial and error* yang ke tiga. Metode tersebut merupakan modifikasi dari metode yang terdapat dalam dalam Penelitian Cahyadi (2012), dimana dalam penelitian tersebut peneliti menggunakan menggunakan volume larutan yang ditambahkan dengan air laut hingga volume akhirnya 4 mL dalam masing-masing konsentrasi.

#### **1.6.7 Pelaksanaan Uji Toksisitas**

Uji toksisitas kombucha daun tin dilakukan dengan cara menyamakan volume air dari larutan didalam tabung uji. Volume air laut didalam tabung uji adalah 4 mL dengan konsentrasi kombucha daun tin masing-masing tabung berbeda. Kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang (*Artemia salina* Leach) ke dalam masing-masing tabung, dengan masing-masing konsentrasi terdapat 3 tabung, sehingga total larva udang tiap konsentrasi adalah 30 ekor. Kemudian

dibiarkan selama 24 jam, setelah itu dihitung jumlah total larva udang yang mati, ditunjukkan dengan tidak adanya pergerakan selama 10 detik pengamatan. Penghitungan jumlah larva yang mati bisa dilakukan dengan cara manual dengan bantuan penerangan cahaya lampu (Wulandari, 2014).

### **1.6.8 Prosedur Penghitungan nilai LC<sub>50</sub>**

Penentuan nilai LC<sub>50</sub> dilakukan dengan menggunakan metode analisis probit. Caranya yaitu dengan menghitung persen kematian hewan uji pada masing-masing konsentrasi. Persen kematian diperoleh dari hasil perkalian rasio 100% yaitu larva yang mati dibagi jumlah larva awal dikali 100% untuk masing-masing konsentrasi. Setelah itu dibandingkan dengan kontrol negatif dan dilakukan analisis hasil sehingga didapatkan nilai LC<sub>50</sub>. Dengan menggunakan metode analisis manual, maka dapat mengetahui nilai probit dengan mengkonversi nilai persen kematian pada tiap konsentrasi ke nilai probit dalam tabel probit.

Persentase kematian =  $\frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{Jumlah larva total awal}} \times 100\%$ . Kemudian dilanjutkan

dengan menggunakan bantuan *software* SPSS atau Microsoft Excell

### **3.7 Analisis Data**

Data hasil penelitian akan diolah dengan *microsoft excel* dengan analisis probit. Kemudian data yang diperoleh akan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik