

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode penelitian yang bersifat eksperimental bertujuan untuk mengetahui konsentrasi rebusan daun sukun yang bersifat toksik dengan beberapa konsentrasi rebusan terhadap *Artemia salina* Leach.

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap yaitu tahap pelaksanaan, tahap persiapan, dan tahap akhir. Tahap persiapan dalam penelitian ini meliputi penyiapan bahan daun sukun, persiapan alat dan bahan yang dibutuhkan. Tahap pelaksanaan meliputi determinasi daun sukun, pembuatan rebusan daun sukun, skrining fitokimia, dan uji toksisitas rebusan. Tahap akhir dalam penelitian meliputi pengumpulan data, menganalisis data, dan membuat kesimpulan.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi merupakan keseluruhan dari objek yang akan diteliti. Populasi dalam penelitian ini adalah rebusan daun sukun.

Sampel merupakan bagian dari populasi yang diteliti. Sampel yang digunakan dalam penelitian yaitu rebusan daun sukun dengan konsentrasi 300 µg/mL, 500 µg/mL, 700 µg/mL, 1000 µg/mL dan 1200 µg/mL.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pengambilan bahan diambil di daerah Manggarai Flores NTT. Pembuatan rebusan daun sukun dan pengujian toksisitas dengan metode BSLT dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Waktu penelitian dimulai dari bulan Mei 2019 sampai Juni 2019.

3.4 Definisi Operasional

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas yaitu konsentrasi rebusan daun sukun (*Artocarpus artilis*) sedangkan variabel terikat yaitu jumlah kematian larva *Artemia salina* Leach.

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Indikator	Skala Ukuran
1.	Kosentrasi rebusan daun sukun	Kosentrasi larutan uji dalam ppm yaitu 300 µg/mL, 500 µg/mL, 700 µg/mL, 1000 µg/mL dan 1200 µg/mL	Perbandingan mg daun sukun dengan liter aquadest	Numerik
2.	Presentasi kematian larva <i>Artemia salina</i> Leach	Larva yang tidak bergerak ketika diberikan zat dalam waktu 24 jam dapat membunuh 50% Larva <i>Artemia salina</i> Leach	Persentase kematian dapat ditentukan dengan rumus : jumlah larva yang mati dibagi dengan jumlah larva uji dikali 100%	Numerik

3.5 Instrumen Penelitian

3.5.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah penangas air, labu ukur, tabung reaksi, termometer, botol vial.

3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sukun (*Artocarpus artilis*), aquadest, metanol, HCl, FeCl₃, reagen mayer, reagen dragendrof.

3.6 Prosedur Kerja / Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan cara sebagai berikut :

3.6.1 Melakukan determinasi

Determinasi daun sukun dilakukan di Lembaga Balai Materia Medika Batu.

3.6.2 Pembuatan simplisia daun sukun

1. Disiapkan daun sukun segar
2. Dicuci daun sukun dengan air mengalir
3. Ditiriskan dan potong dengan ukuran ± 2 mm
4. Dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan ditutup menggunakan kain hitam sampai memperoleh berat konstan atau dengan menggunakan oven dengan suhu 60⁰C .

3.6.3 Pembuatan air rebusan daun sukun

1. Disiapkan daun sukun kering sebanyak 10 gram
2. Dicuci kemudian dimasukkan ke dalam panci
3. Ditambahkan aquadest sebanyak 2 L
4. Direbus dengan menggunakan api besar sampai mendidih pada suhu 90⁰C selama 45-60 menit dan sampai mencapai ½ dari ekstrak awal.
5. Disaring, lalu diisi dalam botol yang sudah disetarakan.

3.6.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolik sekunder yang terdapat dalam daun sukun yaitu kandungan alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, dan fenol.

3.6.4.1 Identifikasi senyawa alkaloid

Diambil rebusan daun sukun sebanyak 5 mL kemudian ditambahkan HCl 2 %, dipanaskan, dikocok dan disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut:

1. Sebanyak 2 mL filtrat ditambah dengan 2 tetes reagen Mayer, adanya senyawa alkaloid dengan terbentuknya endapan putih.
2. Sebanyak 2 mL filtrat ditambah dengan 2 tetes reagen Dragendorf, adanya senyawa alkaloid dengan terbentuknya endapan jingga.

3.6.4.2 Identifikasi senyawa flavonoid

Sebanyak 2 mL rebusan daun sukun ditambahkan 2 tetes metanol, dipanaskan kemudian ditambah serbuk Mg dan HCl 37% dan dikocok. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna merah

3.6.4.3 Identifikasi senyawa saponin

Sebanyak 2 mL rebusan daun sukun ditambahkan 3 mL aquades kemudian dikocok. Adanya senyawa saponin ditunjukkan dengan adanya busa selama 10 menit.

3.6.4.4 Identifikasi senyawa tanin

Sebanyak 2 mL rebusan daun sukun ditambahkan 2-3 tetes FeCl_3 . Hasilnya positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehitaman atau hijau kehitaman.

3.6.4.5 Identifikasi senyawa fenol

Sebanyak 2 mL rebusan daun sukun ditambahkan aquadest dan larutan FeCl_3 2-3 tetes. Terbentuknya warna coklat menandakan adanya senyawa fenol.

3.6.5 Uji Toksisitas Menggunakan Metode BSLT

1. Penyiapan larva *Artemia salina* Leach

Penyiapan larva dilakukan mengambil telur *Artemia salina* Leach sebanyak 1 g. Penetasan telur *Artemia salina* Leach dilakukan dengan cara merendam telur tersebut dalam air laut buatan sebanyak 2 L dan diberi penerangan dengan lampu pijar 40-60 watt serta diaerasi selama 48 jam. Air laut buatan dibuat dengan cara melarutkan 40 g garam dalam 2 L air kemudian disaring (Muaja *et al.*, 2013).

2. Penyiapan Larutan Stok

Dibuat larutan uji dengan konsentrasi 5.000 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian konsentrasi 5.000 $\mu\text{g/mL}$ ini diencerkan lagi dengan konsentrasi 300 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 700 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, dan 1200 $\mu\text{g/mL}$, dengan cara pengenceran. Untuk kontrol (0 ppm) dilakukan tanpa penambahan air rebusan (Baud *et al.*, 2014).

3. Uji Toksisitas

Disiapkan 5 wadah pengujian dan 1 wadah sebagai kontrol untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian tiap konsentrasi larutan dimasukkan 10 ekor Larva *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam. Larva *Artemia salina* Leach dikelompokkan dalam 6 perlakuan (rebusan daun sukun dengan konsentrasi 300 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 700 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, 1200 $\mu\text{g/mL}$ dan kontrol (konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$). Ke dalam setiap konsentrasi dimasukkan 10 larva *Artemia*

salina Leach dengan replikasi 3 kali. Pengamatan kematian dilakukan selama 1x24 jam terhadap larva *Artemia salina* Leach (Muaja *et al.*, 2013).

3.7 Analisis Data

Data pengujian toksisitas berdasarkan perhitungan jumlah larva yang mati dan jumlah larva yang masih hidup. Tingkat kematian diperoleh dengan membandingkan antara jumlah yang mati dibagi dengan jumlah total larva. Nilai LC_{50} diperoleh melalui penentuan nilai probit menggunakan Microsoft Excel (Muaja *et al.*, 2013).