

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode penelitian eksperimental dengan *post test only control group design* menggunakan uji BSLT ( *Brine Shrimp Lethality Test* ) untuk mengetahui toksisitas rebusan daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan beberapa konsentrasi irebusan yang digunakan. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu determinasi tumbuhan, pengumpulan bahan, pembuatan serbuk simplisia, skrining fitokimia, penyiapan bahan uji, dan penetasan larva udang, pelaksanaan uji dengan metode BSLT, dan analisis data.

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

##### 3.2.1 Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah larva udang *Artemia salina* Leach.

##### 3.2.2 Sampel

###### 3.2.2.1 Kriteria inklusi

Larva udang *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam yang masih bergerak aktif.

###### 3.2.2.2 kriteria Eksklusi

larva udang *Artemia salina* Leach yang tidak menunjukkan pergerakan.

### 3.2.2.3 Sampel yang di Butuhkan

Jumlah larva udang *Artemia salina Leach* yang digunakan adalah 10 ekor untuk setiap perlakuan. Pada penelitian ini terdapat 5 konsentrasi yaitu 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm, dan 2000 ppm. Terdapat satu kontrol negatif untuk memastikan hewan uji mati bukan karena faktor lain selain pemberian bahan uji. Kemudian dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk masing- masing perlakuan. Jadi, jumlah sampel total yang diperlukan adalah 180 ekor larva udang *Artemia salina Leach*.

### 3.3 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Februari hingga bulan Maret 2019 di Laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang.

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel**

No	Variabel	Definisi istilah	Cara ukur	Alat ukur	Skala ukur	Hasil ukur
1.	Konsentrasi rebusan daun kersen <i>Muntingia calabura L.</i>	Konsentrasi larutan uji dalam ppm	Konsentrasi baku kerja dikali dengan konsentrasi larutan induk	Labu ukur	Nominal	250ppm 500ppm 1000ppm 1500ppm 2000ppm
2.	Persentase mortalitas larva udang <i>Artemia salina</i> <i>Leach</i>	Hasil perhitungan total larva yang mati dibagi dengan jumlah larva awal dikali 100% untuk tiap kali replikasi	Jumlah larva mati dibagi jumlah larva awal dikali 100%	Mikrosoft Excel	Nominal	17% 40% 57% 80% 97%
3.	LC <sub>50</sub>	Konsentrasi suatu zat yang diberikan dalam 24 jam pada hewan coba yang dapat membunuh 50% hewan coba tersebut	Ditentukan melalui persamaan garis lurus dengan memasukkan nilai 5 (probit dari 50% kematian hewan coba) sebagai y sehingga dihasilkan x sebagai nilai log konsentrasi dan antilog sebagai nilai LC <sub>50</sub>	Mikrosoft Excel	Skala	LC <sub>50</sub> kurang dari 1000 ppm termasuk senyawa toksik. LC <sub>50</sub> lebih dari 1000 ppm termasuk senyawa tidak toksik.

### **3.5 Alat Dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu diantaranya : gelas ukur, gelas beaker, tabung reaksi, pipet ukur, pipet tetes, corong kaca, batang pengaduk, labu ukur, tangas air, alumunium foil, aquarium kecil, lampu, tabung reaksi dan aerator.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: daun kersen (*Muntingia calabura* L.), air laut buatan dengan konstrasi garam 20%, aquades, telur larva udang *Artemia salina* Leach,  $FeCl_3$ , serbuk magnesium, dan asam klorida 2N.

### **3.6 Prosedur Kerja**

#### 3.6.1 Mengambil Bahan

Bagian tumbuhan kersen (*Muntingia calabura* L.) yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun. Daun kersen dipetik dan ditimbang setelah itu dicatat hasil penimbangan daun kersen yang sudah dipetik dari pohonnya.

#### 3.6.2 Mendeterminasi Tumbuhan

Determinasi bagian tanaman kersen dilakukan dengan bantuan Lembaga Balai Material Batu.

#### 3.6.3 Menyiapkan bahan uji

Daun kersen yang sudah dipetik lalu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotorannya.

#### 3.6.4 Membuat Rebusan Daun Kersen

Daun kersen sebanyak 40gram yang telah di bersihkan dan dirajang kemudian direbus dengan air sebanyak 800ml menggunakan api sedang hingga menjadi

kurang lebih setengah volume awal. Setelah itu air rebusan daun kersen dipisahkan dari ampasnya dengan cara disaring (Nastiandari, 2016).

### 3.6.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder tanin, saponin, dan flavonoid yang terdapat pada daun kersen dengan metode pereaksi.

#### 1. Mengidentifikasi senyawa tanin

Rebusan daun kersen dipanaskan di atas tangas air lalu disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, setelah itu ditambahkan  $\text{FeCl}_3$ . Adanya senyawa tanin ditandai dengan adanya endapan berwarna biru kehitaman (Fadila et al., 2018).

#### 2. Mengidentifikasi senyawa flavonoid

Rebusan daun kersen dicampur dengan serbuk magnesium dan asam klorida 2N, lalu dipanaskan di atas tangas setah itu disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan alkohol setelah itu dikocok dengan kuat. Adanya senyawa flavonoid ditandai jika larutan berubah warna menjadi warna kuning hingga merah (Fadila et al., 2018).

#### 3. Mengidentifikasi senyawa saponin

Rebusan daun kersen dipanaskan di atas tangas kemudian disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, setelah itu dikocok filtrat dengan kuat selama 15 menit. Adanya senyawa saponin ditandai dengan adanya busa yang tidak hilang minimal 1 menit (Fadila et al., 2018).

#### 4. Mengidentifikasi senyawa alkaloid

Diambil rebusan daun kersen sebanyak 2 ml air rebusan daun kersen selanjutnya di tambahkan 5 tetes reagen Dragendrof. Jika larutan terbentuk endapan berwarna jingga maka positif mengandung alkaloid. selanjutnya untuk pengujian alkaloid menggunakan reagen mayer dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 ml air rebusan daun kersen kemudian ditambahkan 3 tetes HCl pekat kemudian ditambahkan 5 tetes reagen mayer. Jika terdapat endapan putih maka positif mengandung alkaloid. untuk pengujian alkaloid menggunakan reagen wagner dengan cara 2 ml air rebusan daun kersen ditamba 5 tetes reagen Wagner. Adanya kadungan senyawa alkaloid ditandai dengan adanya endapan warna coklat (Ergina and Pursitasari, 2014)

#### 3.6.6 Penetasan telur larva udang

Penetasan telur larva dilakukan dengan diambil telur *Artemia salina Leach* sebanyak 1,5 gram dan direndam telur tersebut dalam air laut buatan 20% sebanyak 2 liter dan diterangi dengan lampu serta diaerasi dengan aerator selama 48 jam (Millati, 2016).

#### 3.6.7 Membuat larutan induk

Larutan induk diambil dari hasil rebusan daun kersen.

#### 3.6.8 Membuat larutan baku kerja

Pembuatan larutan kerja diambil masing-masing dari larutan induk sebanyak 0,5 ml, 1ml,2ml,3ml,dan 4ml lalu di ad kan hingga 100ml (Setyowati, 2016).

#### 3.6.9 Melaksanakan uji BSLT ( *Brine Shrimp Lethaly Test* )

Disiapkan 5 tabung reaksi, lalu diisi tabung reaksi dengan 5ml larutan uji dari masing-masing konsentrasi larutan uji yaitu 250ppm, 500ppm, 1000ppm,

1500ppm, 2000ppm. Selanjutnya vial yang sudah berisi infusa daun kersen ditambahkan air laut hingga 10ml, setelah itu dimasukkan larva *Artemia salina Leach* sebanyak 10 ekor pada masing-masing vial. Disiapkan 1 tabung reaksi sebagai kontrol negatif yang diisi dengan air laut dan larva *Artemia salina Leach* sebanyak 10 ekor tanpa perlakuan apapun. Kontrol negatif ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat faktor lain yang membunuh hewan uji selain larutan uji. Masing-masing tabung selanjutnya diinkubasi dalam suhu kamar selama 24 jam dibawah penerangan lampu. Perhitungan dilakukan dengan melihat larva *Artemia salina Leach* yang mati pada jam ke-24 dari setiap konsentrasi. Cara menghitung larva udang yang mati yaitu dilakukan dengan cara manual dengan bantuan pengelihat mata di bawah penyinaran lampu LT agar larva *Artemia salina Leach* yang mati dapat terlihat dengan jelas. Uji BSLT dilakukan replikasi sebanyak 3 kali pada masing-masing kelompok perlakuan (Setyowati, 2016).

### **3.7 Analisa Data**

Data yang dikumpulkan merupakan data primer yang dihasilkan dengan menghitung angka mortalitas larva *Artemia salina Leach* yang mati. Angka mortalitas dihitung dengan LC<sub>50</sub> dengan memasukkan nilai probit ( 50% kematian larva *Artemia salina Leach* ).

Angka mortalitas dapat dihitung dengan rumus berikut : angka mortalitas Larva = (akumulasi mati / jumlah akumulasi hidup dan mati) x 100%

Angka probit dicari dengan menggunakan persamaan garis  $y = ax+b$

## Keterangan

a : log ppm

b : nilai probit

y : nilai probit dari 50% kematian hewan coba

x : merupakan nilai  $LC_{50}$  ketika diubah menjadi antilog X

(Reskianingsih,2014)