

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yaitu percobaan yang bertujuan untuk mengetahui uji toksisitas rebusan daun bidara laut menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Pengujian diawali dengan determinasi tanaman daun bidara laut agar diperoleh sampel yang tepat. Setelah hasil determinasi diketahui, daun dikumpulkan dan dicuci bersih. Pembuatan rebusan daun bidara laut dilakukan dengan cara merebus daun bidara laut berjumlah 3 gram daun dengan air sebanyak 600 ml dan direbus sampai air hanya tersisa 400 ml dan berubah warna. Alat yang digunakan untuk merebus yaitu penangas air atau kompor selama 15 menit suhu 48-60°C.

Untuk pengujian BSLT diawali dengan penyiapan telur larva udang *Artemia salina* L dan menetasakan larva udang dengan bantuan sinar lampu. Pengujian toksisitas dilakukan terhadap 10 larva udang setiap konsentrasi uji dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Jumlah rata-rata kematian larva diperoleh dengan menjumlahkan larva yang mati lalu dibagi dengan jumlah replikasi pada setiap konsentrasi dan perlakuan. Presentase kematian diperoleh dengan cara jumlah kematian larva dibagi total larva tiap konsentrasi.

Proses penelitian ini meliputi pengumpulan bahan baku, membuat larutan uji rebusan daun bidara laut, inkubasi larva udang selama 24 jam, perhitungan LC<sub>50</sub>, perhitungan % kematian larva, pencarian nilai probit pada tabel probit dan dilakukan interpretasi data.

### 3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seduhan daun bidara laut, sedangkan untuk sampel penelitian ini adalah sebagian seduhan daun bidara laut.

### 3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2020.

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3. 4 Definisi Variabel**

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Skala ukur	Hasil ukur
1.	Konsentrasi rebusan daun bidara laut	Hasil rebusan daun bidara dengan konsentrasi yang ditentukan dan memiliki efek toksik terhadap <u>larva udang</u>	Pipet volume	Skala nominal	mL
2.	LC <sub>50</sub>	Konsentrasi kematian larva udang 50% dengan konsentrasi yang telah ditentukan	Program statistik	Skala nominal	ppm

Dalam ilmu statistik, jenis data dibedakan menjadi empat macam skala sebagai berikut.

1. Skala nominal

Merupakan skala yang paling lemah dari semua skala pengukuran yang ada. Skala nominal membedakan suatu peristiwa dengan peristiwa yang lain berdasarkan nama.

2. Skala Ordinal

Merupakan skala pengukuran didasarkan pada jumlah relative beberapa karakteristik khusus yang dimiliki oleh setiap peristiwa. Pengukuran skala ordinal memungkinkan penyusunan peringkat dari masing-masing peristiwa yang terjadi.

3. Skala Interval

Pada skala interval, perbedaan peristiwa dapat diurutkan. Antara peringkat satu dengan yang lain memiliki arti. Dengan kata lain, selain bisa dibuat dalam peringkat data dapat pula dikuantitatifkan.

4. Skala Rasio

Merupakan pengukuran yang paling tinggi. Rasio adalah hasil pengukuran untuk nilai yang sesungguhnya, bukan kategori seperti pada skala nominal, ordinal, maupun interval.

### **3.5 Alat dan Bahan Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu diantaranya gelas ukur, beaker glass, tabung reaksi, pipet ukur, pipet tetes, corong kaca, batang pengaduk, labu ukur, aluminium foil, aquarium kecil, lampu, tabung reaksi dan aerator, kompor atau penangas air.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bidara laut (*Ziziphus mauritiana* L.), air laut, aquades, telur larva udang *Artemia salina* Leach, FeCl<sub>3</sub>, serbuk magnesium, dan asam klorida 2N.

### **3.6 Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1 Mengambil Bahan**

Bagian tumbuhan bidara laut (*Ziziphus mauritiana* L.) yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun. Daun bidara laut dipetik dan ditimbang setelah itu dicatat hasil penimbangan daun bidara laut.

#### **3.6.2 Mendeterminasi Tumbuhan**

Determinasi bagian tanaman bidara laut (*Ziziphus mauritiana* L.), dilakukan dengan bantuan UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu.

#### **3.6.3 Menyiapkan bahan uji**

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

#### **3.6.4 Membuat Rebusan Daun Bidara Laut**

Daun bidara laut sebanyak 7 helai (3 gram) yang telah di bersihkan dan dirajang kemudian direbus dengan air sebanyak 600 ml menggunakan api sedang hingga menjadi 400ml. Setelah itu air rebusan daun bidara laut dipisahkan dari ampasnya dengan cara disaring (Nurfitri, 2019).

#### **3.6.5 Cara Penetasan Larva Udang dan Perlakuannya**

Air laut sebanyak 1L dimasukkan dalam bejana penetasan, dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach. Selanjutnya diaerasi dengan cara memberikan aerator ke dalam bejana penetasan. Pada bagian telur ditutup dengan aluminium foil sehingga ruangan menjadi gelap dan lampu dinyalakan selama 48 jam untuk

menetaskan telur. Larva yang menetas akan menuju daerah yang lebih terang melalui sekat. Larva yang sehat bersifat fototropik dan siap dijadikan hewan uji setelah berumur 48 jam. Larva udang *Artemia salina* Leach yang akan diuji diambil dengan menggunakan pipet (Anwar et al., 2014).

### **3.6.6 Pembagian Kelompok Perlakuan**

Dalam penelitian ini terdapat 6 kelompok. Adapun pembagiannya sebagai berikut.

1. Kelompok kontrol negatif (K-) tidak diberi rebusan daun bidara laut, hanya di beri air laut saja sebanyak 250 mL.
2. Kelompok perlakuan 1 (P2) diberi rebusan daun bidara laut dengan konsentrasi 225 µg/ml sebanyak 7,5 mL dan air laut sebanyak 250 mL.
3. Kelompok perlakuan 2 (P3) diberi rebusan daun bidara laut dengan konsentrasi 150 µg/ml sebanyak 5 mL dan air laut sebanyak 250 mL.
4. Kelompok perlakuan 3 (P4) diberi rebusan daun bidara laut dengan konsentrasi 75 µg/ml sebanyak 2,5 mL dan air laut sebanyak 250 mL.
5. Kelompok perlakuan 4 (P5) diberi rebusan daun bidara laut dengan konsentrasi 15 µg/ml sebanyak 0,5 mL dan air laut sebanyak 250 mL.
6. Kelompok perlakuan 5 (P6) diberi rebusan daun bidara laut dengan konsentrasi 7,5 µg/ml sebanyak 0,25 mL dan air laut sebanyak 250 mL.

### **3.6.7 Pelaksanaan Uji Toksisitas**

Uji toksisitas rebusan daun bidara laut dilakukan dengan menyamakan volume air dari larutan didalam tabung uji. Volume air laut didalam labu ukur adalah 250 mL dengan konsentrasi rebusan daun bidara masing-masing labu ukur 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).

### **368 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. 
$$\text{Persentase kematian} = \frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{Jumlah larva total awal}} \times 100\%.$$
 Kemudian dilanjutkan dengan menggunakan bantuan software SPSS atau Microsoft Excel.

### **369 Skrining Fitokimia**

Rebusan daun bidara laut diuji kandungan metabolit sekundernya dengan cara skrining fitokimia. Adapun prosedurnya sebagai berikut.

#### 1) Alkaloid

Disiapkan 3 mL rebusan daun bidara laut 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. Dibagi

menjadi 3 bagian sebagai larutan IA, IB dan IC. Kemudian masing-masing larutan ditambahkan pereaksi mayer, wagner dan dragen droff. Adanya kandungan alkaloid ditandai dengan terjadinya perubahan warna menjadi keruh, coklat keruh atau terjadi pengendapan (Harbone, 1987).

## 2) Flavonoid

Disiapkan sampel rebusan daun bidara laut sebanyak 2 mL didalam tabung reaksi ditambah etanol dengan perbandingan sama, kemudian dipanaskan. Setelah dipanaskan ditambah HCl pekat sebanyak 2 mL dan serbuk Mg. adanya senyawa flavonoid ditandai dengan perubahan warna menjadi merah tua atau coklat tua (Harbone, 1987).

## 3) Tanin

Disiapkan sampel rebusan daun bidara laut sebanyak 2 mL didalam tabung reaksi, ditambahkan air panas dengan perbandingan sama, kemudian ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  sebanyak 3 tetes. Adanya tannin ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kehitaman (Harbone, 1987).

## 4) Saponin

Disiapkan sampel rebusan daun bidara laut sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan aquades 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).

### 3.7 Analisis Data

Data yang dikumpulkan merupakan data primer yang dihasilkan dengan cara menghitung angka mortalitas *Artemia salina* Leach yang mati setelah diberi perlakuan. Angka mortalitas dihitung dengan  $\text{LC}_{50}$  dengan memasukkan nilai probit (50% kematian larva *Artemia salina* Leach).

Angka mortalitas dapat dihitung dengan rumus :

Angka mortalitas larva = (akumulasi mati/jumlah akumulasi hidup dan mati) x 100%. Angka probit dicari dengan menggunakan persamaan garis  $y = a+bx$ .

Ket :  $a = \log \text{ ppm}$

$b = \text{nilai probit}$

$y = \% \text{ mortalitas}$

$x = \log \text{ konsentrasi (Reskianingsih, 2014a)}$



