

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui toksisitas rebusan rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*) dengan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) terhadap hewan uji *Artemia salina*. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan, yakni tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap akhir.

Tahap persiapan yaitu meliputi pengumpulan bahan, tahap pelaksanaan yang meliputi skrining fitokimia dan uji toksisitas rebusan rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*). Tahap akhir dalam penelitian meliputi pengumpulan data, menganalisis data, dan membuat kesimpulan.

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

Populasi merupakan keseluruhan dari obyek yang akan diteliti. Populasi dalam penelitian ini adalah rebusan rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*).

Sampel merupakan bagian dari populasi yang akan diteliti. Sampel yang digunakan dalam penelitian yaitu rebusan rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*) dengan konsentrasi 20.000 ppm, 40.000 ppm, 60.000 ppm, 80.000 ppm, dan 100.000 ppm. Perhitungan konsentrasi ppm dapat dilihat pada Lampiran 3.

#### **3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Waktu penelitian dimulain bulan Januari 2021 sampai bulan Mei 2021.

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1.

**Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel**

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Toksisitas rebusan rimpang temu putih terhadap larva <i>artemia salina L</i>	Kemampuan senyawa dalam rebusan temu putih untuk membunuh 50% populasi larva udang <i>artemia salina L</i>	Jumlah larva mati dibagi jumlah larva awal dikali 100%	LC <sub>50</sub>	Nominal

**3.5 Alat dan Bahan**  
Alat yang digunakan

dalam penelitian ini meliputi neraca digital, tabung reaksi Erlenmeyer 500 mL, beaker gelas 500 mL, batang pengaduk, pipet tetes, labu ukur, kertas saring, botol semprot, perkamen, aquararium, aerator, lampu 5 wat.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu meliputi serbuk simplisia rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*), air laut, larva udang *Artemia salina*, aquadest, HCl, logam Mg, FeCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Asam asetat anhidrat

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Pembuatan rebusan rimpang temu putih

Serbuk rimpang temu putih 40 gram kemudian direbus dengan air sebanyak 800 mL menggunakan api sedang hingga menjadi kurang lebih setengah volume awal sebanyak 300 mL. Kemudian air rebusan rimpang temu putih dipisahkan dari ampasnya dengan cara disaring. (Nastiandari, 2016).

### 3.6.2 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam rimpang temu putih yaitu kandungan flavonoid, saponin, tanin, terpenoid dengan menggunakan metode kualitatif (Simaremare, 2014).

#### 1. Identifikasi senyawa Flavonoid

Rebusan rimpang temu putih dimasukkan kedalam erlenmeyer. Ekstraksikan dengan pelarut n-Heksana atau petrolium eter 10 mL selanjutnya tutup dengan alumunium foil. Kocok perlahan lalu saring kedalam wadah erlenmeyer. Hasil saringan ditambah etanol/metanol 10 mL. 2 mL hasil ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi. Selanjutnya tambahkan 0,5 mL HCl pekat dan 0,5 g serbuk Mg. Adanya flavonoid ditandai dengan warna merah, orange, hijau.

#### 2. Identifikasi senyawa Terpenoid

Rebusan rimpang temu putih Diekstraksi dengan pelarut n-heksana/petrolium eter sebanyak 10 mL kemudian saring. Diambil sedikit lalu keringkan. Ditambahkan 3 tetes anhidrat asetat dan  $H_2SO_4$  pekat. Adanya senyawa terpenoid ditandai dengan warna ungu kemerahan.

#### 3. Identifikasi senyawa Tanin

Rebusan rimpang temu putih ditambahkan dengan beberapa tetes larutan besi(III)klorida 10%. Jika terjadi warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin.

#### 4. Identifikasi senyawa Saponin

Rebusan rimpang temu putih dididihkan selama 2-3 menit, dan selanjutnya didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuk buih putih yang stabil (Sastrawan *et al.*, 2013).

### 3.6.3 Uji Toksisitas Menggunakan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

#### 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 sebanyak 2 L dan diberi penerangan dengan lampu pijar 40-60 watt serta diaerasi selama 48 jam, menggunakan air laut (Muaja *et al.*, 2013).

#### 2. Pembuatan Larutan Induk

Larutan induk diambil dari hasil rebusan rimpang temu putih

#### 3. Pembuatan Larutan Baku Kerja

Larutan baku kerja dibuat dengan cara diambil 2 mL kemudian ditambahkan air laut 100 mL, sehingga diperoleh 20.000 ppm. Selanjutnya diambil 4 mL rebusan rimpang temu putih kemudian ditambahkan air laut 100 mL, sehingga diperoleh 40.000 ppm. Selanjutnya diambil 6 mL kemudian ditambahkan air laut 100 mL, sehingga diperoleh 60.000 ppm. Selanjutnya diambil 8 mL rebusan rimpang temu putih kemudian ditambahkan air laut 100 mL, sehingga diperoleh 80.000 ppm. Selanjutnya diambil 10 mL rebusan rimpang temu putih kemudian ditambahkan air laut 100 mL, sehingga diperoleh 100.000 ppm.

#### 4. Uji Toksisitas

Disiapkan 5 wadah vial, lalu diisi dengan 5 mL larutan uji dari masing-masing konsentrasinya yaitu 20.000 ppm, 40.000 ppm, 60.000 ppm, 80.000 ppm, 100.000 ppm. Selanjutnya vial yang berisi rebusan rimpang temu putih ditambahkan larva *Artemia Salina* Leach sebanyak 10 ekor pada masing-masing vial. Disiapkan 1 tabung reaksi sebagai control negative yang diisi dengan air laut dan larva *Artemia Salina* Leach

sebanyak 10 ekor tanpa perlakuan apapun. Control negative ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat faktor lain yang membunuh hewan uji selain larutan uji. Masingmasing 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 penglihatan mata di bawah penyinaran lampu TL (tublar lamp) 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 hasil pengujian BSLT dianalisis berdasarkan perhitungan jumlah larva yang mati dan yang masih hidup. Tingkat kematian atau mortalitas (%) diperoleh dengan membandingkan antara jumlah yang mati dibagi dengan jumlah total larva. Nilai  $LC_{50}$  diperoleh melalui penentuan nilai probit, yaitu mengkonversi nilai persen kematian dengan table probit. Plotting data antara nilai probit dengan log konsentrasi akan diperoleh persamaan garis regresi :  $y = ax+b$

Keterangan :

$y = 5$  (menyatakan larva udang yang mengalami kematian sejumlah 50% setelah masa inkubasi selama 24 jam).

$b =$  slope

$a =$  interscp

$x =$  menyatakan konsentrasi larutan yang menyebabkan kematian

