

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA Universitas Cenderawasih Jayapura. Waktu penelitian berlangsung dari bulan Maret sampai September 2024

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat gelas yaitu; gelas ukur, gelas kimia, labu erlenmeyer, pipet tetes, botol vial, mikropipet, corong kaca, corong pisah. Alat non gelas yaitu; timbangan analitik, blender, alat *rotary evaporator*, ayakan no. 50 mesh, *hot plate*, akuarium, *water pump aquarium*.

3.2.1 Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Diwoka (*Piper macropiper* Pennant). Bahan yang digunakan yaitu air garam buatan noniyodium, ammonia 25%, pereaksi dragendorff, serbuk magnesium, NaOH 1 N, etanol 70%, diklorometan, n-heksana, kertas saring, larva udang *Aretmia salina* L, aquadest.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Pembuatan Simplisia

Bahan penelitian diperoleh dari kota Wamena, Papua Pegunungan. Daun dicuci bersih dari kotoran-kotoran, kemudian dipotong-potong menjadi bagian lebih kecil, potongan daun Diwoka (*Piper macropiper* Pennant) kemudian dikeringkan atau diangin-anginkan tidak mengenai langsung paparan sinar matahari, daun Diwoka (*Piper macropiper* Pennant) yang sudah kering di blender hingga menjadi serbuk.

3.3.2 Ekstraksi

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode maserasi (Depkes RI 1986). Dimana serbuk simplisia daun Diwoka ditimbang sebanyak 200g dan direndam dengan menggunakan pelarut 1 L etanol 70% selama 3 hari sambil diaduk setiap satu kali 24 jam. Setelah itu, menyaring dan

mengumpulkan maserat untuk dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary vaccum evaporator* dengan suhu 50°C sehingga didapatkan ekstrak kental. Kemudian dilakukan perhitungan rendemen ekstrak dengan rumus:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{bobot awal simplisia}} \times 100\%$$

3.3.3 Uji Bebas Etanol

Ekstrak daun Diwoka diuji dengan bebas etanol 70% dan menggunakan uji kualitatif. Dalam pengujian ini, ekstrak diberi tambahan 2 tetes H₂SO₄ pekat dan 1ml larutan kalium dikromat. Adanya etanol dalam ekstrak ditunjukkan oleh perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan (Harbone, 1987).

3.3.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan tahap penelitian awal yang bertujuan untuk memberikan gambaran mengenai golongan senyawa yang terdapat pada tanaman yang diteliti. Metode skrining fitokimia dilakukan dengan melihat reaksi uji warna dengan menggunakan pelarut sebagai pereaksi warna meliputi pemeriksaan terhadap golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan fitosterol (terpenoid).

a. Pemeriksaan Alkaloid

Fraksi dilarutkan dengan 5 ml HCl 2N. Larutan yang didapat kemudian dibagi 2 tabung reaksi. Tabung ditambahkan pereaksi Dragendorff sebanyak 3 tetes dan terbentuknya endapan merah bata- jingga. Pada tabung kedua ditambahkan pereaksi Meyer sebanyak 3 tetes dan terbentuknya endapan putih-kekuningan. Menunjukkan kedua tabung adanya alkaloid.

b. Pemeriksaan Flavonoid

Fraksi sebanyak 2 ml dipanaskan, kemudian ditambahkan etanol 1 ml. Serbuk magnesium dan HCl 2N ditambahkan ke dalam larutan jika larutan membentuk merah menunjukkan adanya flavonoid.

c. Pemeriksaan Saponin

Fraksi ditambahkan dengan 10 ml akuades dalam tabung reaksi dikocok selama 10 detik secara vertikal. Terbentuknya busa yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm yang tidak hilang setelah penambahan HCl 2N, menunjukkan adanya saponin.

d. Pemeriksaan Tanin

Ekstrak ditambahkan dengan 1 ml larutan FeCl_3 10%. Jika terbentuk warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol dan tanin (Robinson, 1995).

e. Pemeriksaan Terpenoid

Sampel sebanyak 0,5 gram ditambahkan 2 ml kloroform. Filtrat ditambahkan beberapa tetes H_2SO_4 2N. Adanya terpenoid ditunjukkan dengan terjadinya warna kuning.

3.3.5 Penyiapan Larva *A salina* L.

Telur *Artemia salina* Leach dierami dalam wadah penetas telur yang terbagi menjadi dua bagian ruang terpisah: satu ruang gelap dan satu ruang yang diterangi oleh lampu pijar dengan kekuatan 40-60 watt. Penyekat di antara keduanya memiliki lubang berdiameter 2 mm. Air laut dimasukkan ke dalam wadah tersebut dan dioksidasi menggunakan aerator. Sekitar 1 gram telur larva *Artemia salina* Leach diambil dan direndam dalam 2 liter air laut. Telur-telur tersebut akan menetas setelah sekitar 24 jam menjadi larva. Larva yang berumur 48 jam dapat digunakan untuk melakukan uji toksisitas.

3.3.6 Preparasi Larutan Uji

Semua sampel diolah menjadi larutan stok dengan cara melarutkan 1 g ekstrak daun Diwoka masing-masing ke dalam 100 mL pelarut yang sesuai. Larutan stok ini memiliki konsentrasi 1000 ppm. Kemudian, larutan stok 1000 ppm diencerkan menjadi berbagai konsentrasi, yaitu 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, dan 1000 ppm. Sebagai kontrol negatif, dilakukan pengujian tanpa penambahan ekstrak atau pelarut. (Juniarti dkk, 2009).

3.3.7 Uji Aktivitas Sitoksik Metode BSLT

Larutan uji dimasukkan ke dalam vial dan kemudian dikeringkan secara perlahan hingga seluruh pelarut menguap selama beberapa hari pada suhu ruangan, sehingga aroma pelarut tidak lagi tercium. Proses pengeringan ini memastikan bahwa hasil penimbangan menunjukkan bobot yang stabil dan konsisten. Larutan kontrol negatif dibuat dengan cara yang serupa tanpa penambahan ekstrak. Larutan kontrol terdiri dari 5mL air laut yang mencakup

pelarut serta 1-2 tetes DMSO 1%. Penambahan 1-2 tetes (sekitar 50-100 µL) DMSO 1% bertujuan untuk meningkatkan kelarutan senyawa. DMSO merupakan cairan tak berwarna dengan rumus $(CH_3)_2SO$ yang berperan sebagai pelarut yang mampu melarutkan senyawa polar dan non-polar.

Vial yang berisi sampel dengan pelarut yang telah diuapkan diisi dengan 1 mL air laut. Kemudian, setiap vial diisi dengan 10 ekor larva menggunakan pipet tetes. Air laut ditambahkan ke setiap vial hingga mencapai volume 5 mL. Larva yang digunakan adalah larva *A. salina* L berumur 48 jam setelah menetas. Larva pada usia ini sangat responsif karena dinding selnya masih lembut, sehingga konsentrasi sampel yang rendah pun dapat menimbulkan efek yang dapat diamati. Jumlah larva *A salina* L. yang mati dihitung setelah 24 jam, dan pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan untuk setiap kondisi. (Juniarti dkk, 2009).

Untuk persentase kematian larva *A. salina* L, dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva } A. \text{ salina L mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Jika terjadi kematian pada kontrol uji dapat dikoreksi dengan rumus Aboot

$$\text{yaitu: } \% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva } A. \text{ salina L (mati - kontrol)}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

3.4 Analisis Data

Data hasil penelitian adalah data primer yang didapatkan dari jumlah larva *Artemia salina* L yang mati 24 jam setelah perlakuan pada tiap-tiap konsentrasi ekstrak daun Diwoka (*Piper macropiper* Pennant). Data tersebut selanjutnya dianalisis dengan analisis probit. Efek toksisitas terhadap *Artemia salina* L ditentukan berdasarkan analisis probit melalui tabel probit dan dibuat persamaan regresi linier antara log konsentrasi dan nilai probit dan dibuat persamaan regresi linier antara log konsentrasi dan nilai probit.

$$y = bx + a$$

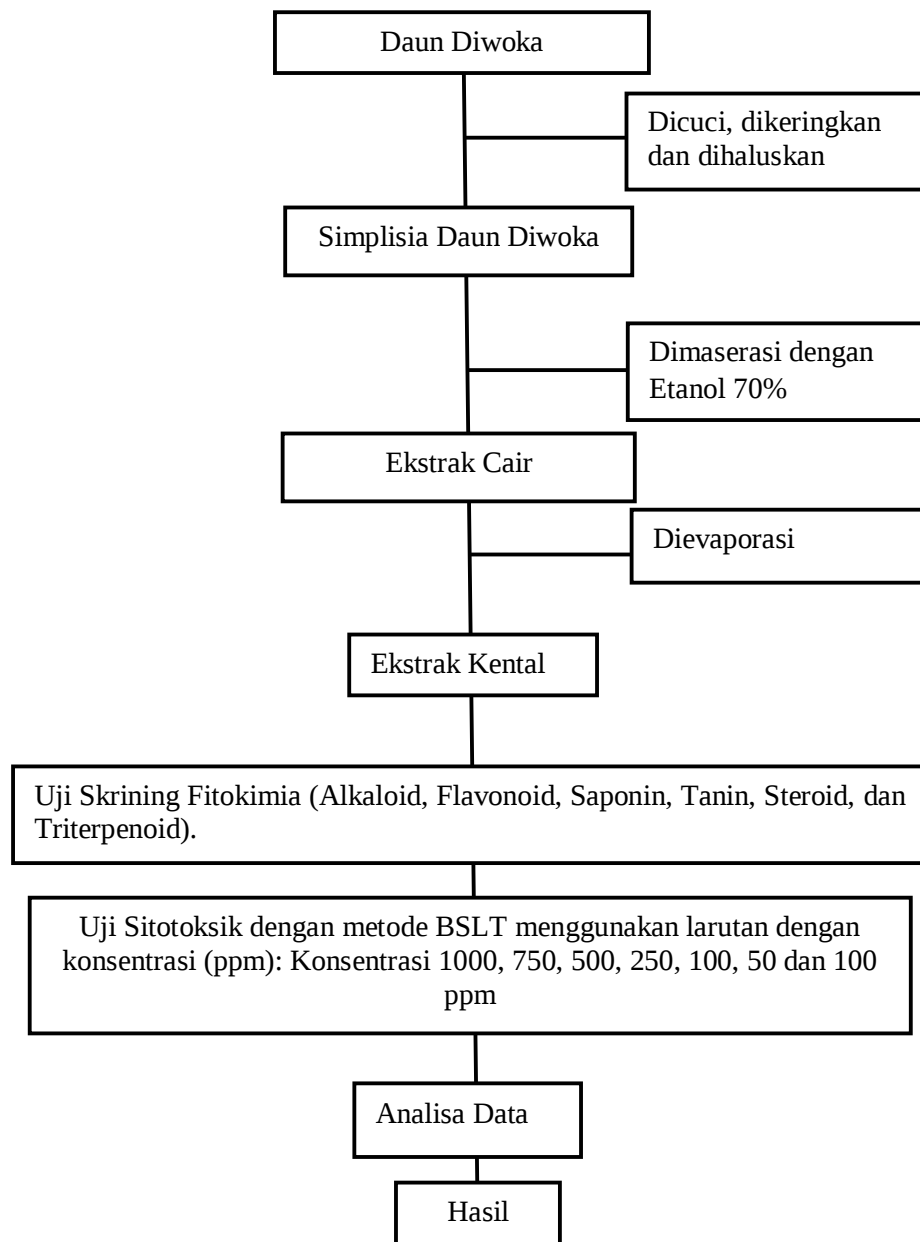
keterangan: y = angka probit, dan x = log konsentrasi

Persamaan tersebut dapat digunakan untuk mengetahui nilai LC_{50} komponen daun Diwoka (*Piper macropiper* Pennant) dengan memasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut sehingga diperoleh konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian.

Tabel 3.1 Kriteria Kekuatan Toksisitas

Toksisitas	Konsentrasi (ppm)
Sangat Toksik	≤ 30 ppm
Toksik	31 ppm – 1000 ppm
Tidak toksik	> 1000 ppm

3.5 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.4 Gambar Diagram Alir Penelitian