

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Program Studi Farmasi S-1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi pada bulan Januari sampai dengan bulan Maret 2025.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan merupakan timbangan analisis (Ohaus), waterbath (DFS), *rotary evaporator* (IKA), *moisture analyzer balance* (Ohaus), blender (Philips), bejana maserasi, seperangkat alat-alat gelas (*pyrex*), mikropipet (merk), penjepit kayu, lampu (Philips), botol bekas air mineral, selang, lampu 40 watt, pompa udara *aerator*, dan seperangkat alat pengujian larva udang (wadah khusus dari *cup* plastik).

3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan merupakan daun dan rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume), larva *Artemia salina* Leach, etanol 70%, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, H₂SO₄ pekat, FeCl₃, HCl 2N, serbuk Mg, HCl pekat, asetat anhidrat, etanol 96%, DMSO₄, stik pH, NaHCO₃, aquades, *aluminium foil*, kertas saring dan kain *flannel*.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium sederhana dengan *post-test only control group design* karena pengukuran hanya dilakukan pada

waktu tertentu setelah pemberian perlakuan pada hewan uji. Metode yang digunakan pada penelitian ini, menggunakan metode eksperimen untuk mengetahui toksisitas dari ekstrak temu blenyeh dengan variabel sebagai berikut :

3.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini merupakan konsentrasi ekstrak etanol daun dan rimpang temu blenyeh.

3.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini merupakan nilai LC_{50} atau hasil uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

3.3.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini merupakan faktor lingkungan seperti pH dan suhu serta dari keadaan larva udang *Artemia salina* Leach.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Sampel dari penelitian ini merupakan daun dan rimpang temu blenyeh yang diperoleh dari Wisata Kesehatan Jamu (WKJ) Kalibakung, Kabupaten Tegal dan dideterminasi di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi S1, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Pembuatan Serbuk Simplisia

Simplisia daun dan rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) diambil masing-masing sebanyak 5 kg kemudian dilakukan disortasi basah dengan cara dicuci sampai bersih

dan diiris tipis-tipis. Sortasi dilakukan dengan air bersih untuk membersihkan daun dan rimpang temu blenyeh dari kotoran yang menempel. Selanjutnya dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40-50°C sampai kering sempurna. Temu blenyeh yang telah kering kemudian dilakukan sortasi kering dan diserbuk menggunakan blender (Listina et al., 2023; Ramadhan et al., 2024).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 500 gram serbuk daun dan rimpang temu blenyeh diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% selama 3 x 24 jam dengan tiap 1 x 24 jam dilakukan pengadukan (A. Dewi et al., 2024; Sinaga et al., 2018). Kemudian disaring dan filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* dan diuapkan kembali menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen ekstrak total dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Istiqomah et al., 2021):

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat (gr)}}{\text{Berat sampel yang diperoleh (gr)}} \times 100\%$$

3.4.4 Standarisasi Ekstrak

Standardisasi ekstrak dilakukan untuk memperoleh ekstrak yang berkualitas. Terdapat dua parameter dalam standarisasi ekstrak sebagai berikut:

1. Uji parameter spesifik

Uji organoleptik dilakukan menggunakan pengamatan organoleptik yang melibatkan panca indera manusia yang meliputi pengamatan warna, bentuk, bau dan rasa dari ekstrak (Utami et al., 2020).

2. Uji parameter non-spesifik

Pada uji parameter non spesifik terdapat beberapa hal yang perlu diidentifikasi yaitu:

- a) Uji penetapan kadar air

Uji kadar air dilakukan menggunakan metode gravimetri (Narsa et al., 2022). Langkah pertama dalam pengujian kadar air pada ekstrak kental yaitu ditimbang terlebih dahulu sampel ekstrak kental sebanyak 0,5 gram dan masukkan ke dalam cawan yang ada di alat moisture analyzer. Proses pengukuran sampai diperoleh berat konstan dari ekstrak dan setelah pengukuran dilihat presentase dari kadar air yang ada di ekstrak tersebut (Prasetya & Endriyatno, 2025).

- b) Uji kadar abu total

Uji kadar abu dilakukan dengan cara memasukkan 2 gram ekstrak etanol kering dimasukkan ke dalam krus porselin dan dipijarkan pada suhu 600°C menggunakan tanur selama 1 jam. Sampel hasil pemijaran didinginkan dan ditimbang untuk mendapatkan bobot konstan. Perhitungan

bobot kadar abu total dengan rumus (Gurning & Simanjuntak, 2020):

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{Berat abu sisa pijaran}}{\text{Berat ekstrak etanol kering}} \times 100\%$$

c) Uji susut pengeringan

Ekstrak ditimbang sebanyak 1 gram, lalu dipanaskan sampai 30 menit pada 105°C dan ditempatkan dalam krus porselen yang telah ditarer. Sebelum ditimbang, ekstrak dihaluskan dengan mengocok krus porselin sampai membentuk lapisan setebal 5-10 mm. Masukkan ke dalam oven, buka tutupnya dan keringkan pada suhu 105°C sampai beratnya tertahan. Dinginkan dengan desikator. Lakukan replikasi sebanyak tiga kali, kemudian dihitung persentasenya. Perhitungan susut pengeringan dengan rumus (Pine et al., 2023):

$$\text{Susut Pengeringan (\%)} = \frac{\text{Berat awal}-\text{Berat akhir}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

3.4.5 Skrining Fitokimia

Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi metabolit sekunder dalam ekstrak sebagai berikut:

1. Uji Alkaloid

Uji alkaloid daun dan rimpang temu blenyeh dilakukan dengan cara mengambil 0,5 gram ekstrak daun dan rimpang temu blenyeh masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilakukan penambahan HCl 2N dipanaskan kemudian

didinginkan. Setelah itu disaring serta dilakukan penambahan pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, dan pereaksi Wagner. Hasil positif mengandung senyawa alkaloid jika direaksikan dengan pereaksi Mayer akan terbentuk endapan putih atau kuning, jika direaksikan dengan pereaksi Dragendorff akan terbentuk endapan merah kecoklatan, dan jika direaksikan dengan pereaksi Wagner akan terbentuk endapan cokelat (Muthmainnah, 2017; Shaikh & Patil, 2020).

2. Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara mengambil 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu tambahkan etanol sebanyak 5 mL dan panaskan selama 15 menit. Selanjutnya tambahkan beberapa tetes HCl pekat dan tambahkan juga 0,2 gram bubuk Mg, lalu diamati. Hasil positif dengan menunjukkan warna merah tua (Moningka et al., 2020).

3. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara mengambil 0,2 gram sampel ekstrak kemudian dilarutkan ke dalam 2 mL. Ditambahkan dengan 10 mL air sambil dikocok selama 1 menit, lalu ditambahkan 2 tetes HCl 1N. Bila busa yang terbentuk tetap stabil selama kurang lebih 5 menit, maka ekstrak positif mengandung saponin (Kartini et al., 2024).

4. Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan cara mengambil 0,5 gram dididihkan dengan air sejumlah 10 ml, disaring dan ditambahkan 10 tetes FeCl_3 hingga terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Ramadhan et al., 2024).

5. Uji triterpenoid dan steroid

Uji triterpenoid dan steroid dilakukan dengan cara mengambil 0,1 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 3 tetes asetat anhidrat kemudian 1 tetes H_2SO_4 pekat. Hasil positif steroid ditunjukkan dengan adanya perubahan warna hijau dan Triterpenoid ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi ungu atau merah (Ningsih et al., 2020).

6. Minyak atsiri

Uji minyak atsiri dilakukan dengan cara ekstrak kental 0,5 gram diencerkan dengan pelarut 1 mL kemudian atau dipanaskan di *hotplate* di atas gelas arloji hingga diperoleh residu. Hasil positif minyak atsiri ditandai dengan bau khas yang dihasilkan oleh residu tersebut (Rukmini et al., 2020).

3.4.6 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

Tahapan dalam uji toksisitas dengan metode BSLT dapat dilihat sebagai berikut:

1. Pembuatan air laut buatan

Timbang 20 gram garam ikan dilarutkan dengan 1 liter aquadest. Tambahkan NaHCO_3 sedikit demi sedikit. Aduk hingga

homogen. Lalu ukur pH nya dalam rentang 8 menggunakan pH meter (Okvianingsih et al., 2023).

2. Penetasan Telur *Artemia salina* Leach

Telur udang ditetaskan sekitar 36-48 jam sebelum dilakukan pengujian toksisitas. Penetasan dilakukan dalam wadah yang berisi 500 mL air laut buatan yang telah disesuaikan pH-nya 8-9. Diberikan penerangan menggunakan lampu 40 Watt untuk menjaga suhu penetasan pada kisaran 25–31°C dan merangsang proses penetasan dengan menggunakan aerator. Telur *Artemia salina* L sebanyak 50-150 mg dicuci terlebih dahulu, yakni ditaburkan dan direndam pada wadah berisi aquades selama 1 jam, setelah itu pada wadah berisi air laut buatan 500 mL, lalu dinyalakan aerator. Telur *Artemia salina* L dibiarkan selama 36-48 jam sampai menetas menjadi nauplii yang matang dan siap digunakan dalam percobaan. Telur akan menetas dalam waktu 18-48 jam dan akan bergerak secara alamiah menuju daerah terang sehingga larva udang terpisah dari kulit telur. Larva yang sehat bersifat fototropik dan siap dijadikan hewan uji pada umur 36-48 jam. Larva dipisahkan dari telurnya dengan pipet ke dalam wadah yang berisi air laut buatan (Justicia & Ardianti, 2021).

3. Pembuatan larutan stok

Larutan stok yang digunakan dibuat dengan cara ditimbang 200 mg ekstrak etanol daun dan rimpang temu blenyeh yang dilarutkan dalam 2 mL air laut. Jika sampel tidak larut atau

sukar larut, maka ditambahkan dimetil sulfoksida (DMSO) 1% sebanyak 0,1-50 µg atau 2 tetes saja dan ditambahkan air laut hingga volumenya mencapai 100 mL sehingga didapatkan konsentrasi larutan stok 2000 ppm (Handayani et al., 2022).

4. Pembuatan larutan uji

Larutan uji ekstrak etanol daun dan rimpang temu blenyeh dibuat dalam konsentrasi 100, 250, 500, 750, dan 1000 ppm. Setiap konsentrasi larutan uji dibuat 25 mL, dengan menambahkan larutan induk yang ditambahkan air laut buatan sampai tanda batas miniskus. Setiap larutan uji diuji sebanyak 3 kali pengulangan dengan 2 wadah yang berisi ekstrak daun dan rimpang temu blenyeh (Nasution et al., 2023).

5. Pengujian toksisitas

Uji toksisitas dilakukan pada masing-masing kelompok ekstrak sampel yang dibagi menjadi 6 kelompok uji yaitu 5 kelompok perlakuan (konsentrasi 100, 250, 500, 750, dan 1000 ppm) dan 1 kelompok kontrol atau pembanding (air laut). Setiap konsentrasi ekstrak sampel dibuat dalam 3 wadah. Selanjutnya, pada tiap konsentrasi larutan dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* Leach ke dalam wadah. Kelompok kontrol negatif (blanko) diberi perlakuan yang sama seperti larutan uji tetapi tidak ditambahkan ekstrak. Kemudian, pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva udang kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol lalu dihitung jumlah larva yang mati

dari tiap wadah kemudian dilanjutkan dengan analisa probit untuk menentukan nilai LC_{50} . Kriteria standar untuk menilai kematian larva udang adalah bila larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik (Safriani et al., 2023).

Persentase kematian larva dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Meyer et al., 1982):

$$\%Mortalitas = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva awal}} \times 100\%$$

3.4.7 Analisis Data

Teknik analisis dilakukan dengan mencatat jumlah larva yang mati pada setiap konsentrasi uji, kemudian dihitung persentase kematiannya. Data tersebut dianalisis menggunakan metode probit untuk memperoleh nilai LC_{50} . Selanjutnya, analisis statistik dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versi 25 untuk mengevaluasi perbedaan antar kelompok perlakuan.