BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Prodi S-1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi pada bulan januari sampai dengan bulan februari 2025.

3.2 Alat dan Bahan

3.3 Alat

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

3.4 Bahan

Sampel yang digunakan yaitu akar pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.), larva *Artemia salina* Leach, etanol 70%, n-heksana, serbuk Mg, HCl P, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorff, HCL 2N, asetat anhidrat, H_2SO_4, H_2SO_4 P, $DMSO_4$, garam, soda kue, stik pH, $NaHCO_3$, aquades, *aluminium foil*, kertas saring dan kain *flannel*.

3.5 Racangan 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. Perlakuan

dengan pemberian ekstrak akar pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) terhadap larva *Artemia salina* Leach.

Metode yang digunakan pada penelitian ini, menggunakan metode eksperimen untuk mengetahui toksisitas dari ekstrak akar pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.). Dengan variabel sebagai berikut:

1. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

   Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu jenis ekstrak dan konsentrasi ekstrak akar pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.)

2. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

   Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu nilai LC_{50} yaitu kematian larva udang *Artemia salina* Leach.

3. Variabel Terkontrol

   Variabel terekontrol dalam penlitian ini yaitu faktor lingkungan seperti pH dan suhu dari keadaan larva udang *Artemia salina* Leach, metode BSLT.

3.6 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tumbuhan dan Hewan

Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran identitas tumbuhan dan hewan yang akan digunakan dan menghindari kesalahan dalam pengambilan bahan. Bahan baku dalam penelitian ini menggunakan akar pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) yang diperoleh dari Wisata Kesehatan Jamu (WKJ) Desa Kalibakung, Kecamatan Balapulang, Kabupaten Tegal. Akar pule pandak yang digunakan berupa simplisia akar pule pandak berwarna coklat. Hewan yang digunakan yaitu larva udang

Artemia salina Leach yang diperoleh dari toko ikan di kota Tegal. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Pembuatan Serbuk Simplisia

Proses pembuatan serbuk simplisia yang pertama dilakukan yaitu mengambil 1 Kg simplisia akar pule pandak lalu digiling untuk dijadikan serbuk dan disimpan dalam toples kaca (Shah et al., 2020).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Akar Pule Pandak (*Raulwolfia serpentina*)

Ekstraksi akar pule pandak dilakukan dengan cara remaserasi menggunakan pelarut etanol 70% dan n-heksana. Ditimbang sebanyak 300 g simplisia akar pule pandak lalu ditambahkan pelarut 1200 mL hingga simplisia terendam seluruhnya. Ekstraksi dilakukan selama 3x24 jam terlindung dari cahaya dan dilakukan pengadukan setiap 24 jam. Pada hari ke 2 dan ke 3 pelarut disaring untuk dilakukan remaserasi sehingga diperoleh 3 filtrat untuk setiap pelarut. Filtrat kemudian dievaporasi dengan *rotary evaporator* lalu dilanjutkan dengan *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental etanol dan n-heksana dari akar pule pandak (Huliselan, 2015). Rendemen ekstrak etanol dan n-heksan dihitung dengan rumus nomor 1 (Mangirang et al., 2019):

$$\%\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (g)}}{\text{berat sampel (g)}} \text{ x } 100\% \quad (1)$$

3.4.4 Uji Parameter Ekstrak

1. Organoleptis

   Pengujian organoleptis dilakukan untuk mendapatkan hasil dari ekstrak yang meliputi uji warna, bau, rasa, dan bentuk (Reubun, 2024).

2. 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 kurs 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., kemudian dihitung persentasenya. Susut pengeringan dihitung dengan rumus nomor 2 (Pine et al., 2023):

$$\% = \frac{\text{Berat awal-Berat akhir}}{\text{Berat sampel}} \text{ x } 100\% \quad (2)$$

3. Kadar Air

   Uji kadar air dilakukan menggunakan *moisture analyzer* yang diset pada suhu 105°C dan secara otomatis akan langsung memeriksa ketika alat ditutup. Ambil 2 gram ekstrak ratakan di atas cawan aluminium. Alat kemudian ditutup dan diamkan hingga memberikan tanda. Angka yang tertera pada alat dapat dicatat dan diketahui kadar air dari simplisia. Jika kadar air yang diperoleh <1010% maka dinyatakan memenuhi syarat (Maharisti et al., 2022).

4. Kadar abu

Penetapan kadar abu total dilakukan dengan cara sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang (W1), ditempatkan dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditimbang (W0). Kemudian ekstrak dipijarkan sampai arang habis, didinginkan dan ditimbang (W2). Dihitung kadar abu bahan yang telah dikeringkan di udara dengan rumus nomor 3 (Nurzahra et al., 2022):

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{W2-W0}}{\text{W1}} \text{ x100\%} \quad (3)$$

Keterangan:
W0 = Bobot cawan kosong (gram)
W1 = Bobot cawan awal (gram)
W2 = Bobot cawan + ekstrak setelah di abukan (gram)

3.4.5 Skrining Fitokimia

Uji Skrining fitokimia yang dilakukan yaitu:

1. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak sampel ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai untuk tes alkaloid berikut:

a. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.
b. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.

c. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Dragendorff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan sedikitnya 2 reaksi dari 3 percobaan di atas (Putri & Nasution, 2022).

2. Uji Triterpenoid dan Steroid

Diambil sampel sebanyak 1 gram lalu ditambahkan 20 mL kloroform dan diletakkan didalam tabung reaksi yang kering, kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann Burchard (asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat). Reaksi positif akan ditunjukkan dengan adanya cincin berwarna jingga/ ungu untuk triterpenoid dan steroid dengan warna hijau kebiruan (Hasibuan et al., 2020).

3. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dengan 5 mL etanol dan dipanaskan selama ± 5 menit didalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah 3 tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 g bubuk Mg. Hasil positif ditunjukan dengan timbulnya warna merah tua (magenta) menunjukkan senyawa flavonol/flavonon, endapan merah menunjukkan senyawa flavon, dan endapan hijau menunjukkan senyawa glikosida/aglikon (Khasanah et al., 2020).

4. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL akuades dan dikocok kuat selama 10 detik. Adanya kandungan saponin ditunjukkan

dengan terbentuknya buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit dan buih setinggi 1 cm sampai 10 cm. Penambahan 1 mL HCL 2N buih tidak hilang (Dewi et al., 2021).

5. Uji Tanin

   0,5 gram ekstrak dididihkan dengan 10 mL air selama 14 menit, didinginkan lalu disaring dan ditambahkan 10 tetes $FeCl_3$ hingga terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Suharsanti 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

   Disiapkan air laut buatan dengan melarutkan soda ash dan 15 gram natrium klorida dalam 1 liter aquades (Lestari et al., 2019).

2. Penetasan Telur *A. salina* Leach

   Telur udang ditetaskan sekitar 36-48 jam sebelum dilakukan pengujian toksisitas, wadah yang diberi sekat ditengahnya, digunakan untuk penetasan telur udang kemudian ditambahkan air laut buatan yang sudah diukur PH-nya (8-9), wadah tersebut diberi penerangan dengan cahaya lampu 40-Watt untuk menghangatkan suhu dalam penetasan agar suhu penetasan 25°C-31ºC tetap terjaga dan merangsang proses penetasan dengan menggunakan *aerator*. Telur *A. salina* Leach 50-150 mg dicuci terlebih dahulu, lalu ditaburkan dalam wadah berisi air laut buatan lalu dinyalakan *aerator* (Lestari et al., 2019).

Telur *A. salina* Leach 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 (Lestari et al., 2019).

3. Persiapan Larutan Uji

Pembuatan larutan ekstrak 2000 ppm sebagai larutan induk. Sebanyak 200 mg ekstrak ditimbang dengan teliti kemudian dilarutkan dalam 100 mL air laut buatan sehingga diperoleh konsentrasi 2000 ppm. untuk ekstrak yang sukar laut, dapat ditambahkan DMSO 1% (3 tetes) untuk meningkatkan kelarutan. Sampel yang akan diuji disiapkan pada konsentrasi 100 ; 250 ; 500 ; 750 ; 1000 ppm. Setiap konsentrasi larutan uji dibuat 50 mL, dengan mengambil dari larutan induk kemudian ditambah air laut buatan sampai batas meniskus. Setiap larutan uji dibagi menjadi 3 wadah, tiap wadah berisi larutan uji masing-masing sebanyak 10 mL, untuk 3 kali pengulangan (Simatupang, 2021). Variasi konsentrasi ekstrak yang diuji dapat dilihat di Tabel 3.1

Tabel 3. 1 Variasi Konsentrasi Ekstrak Dalam Uji BSLT (Saragih et al., 2022)

Ekstrak	Seri Konsentrasi (ppm)					Replikasi
Etanol 96%	100	250	500	750	1000	3
N-heksan	100	250	500	750	1000	3
Kontrol negatif			-			3

4. Pelaksanaan Uji Toksisitas

10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam dimasukkan ke dalam botol yang telah berisi larutan ekstrak dan air laut. Untuk setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan (*triplo*). Air laut yang tidak diberi ekstrak sampel digunakan sebagai kontrol negatif. Botol percobaan disimpan dan dilakukan pengamatan setelah 24 jam. Jumlah larva udang yang mati dicatat kemudian dihitung presentase kematiaannya. Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan analisis probit (Simatupang, 2021). Persentase kematian larva dapat dihitung dengan rumus nomor 4 (Meyer et al., 1982):

$$\%\text{Mortalitas} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva awal}} \text{ x } 100\% \qquad (4)$$

3.7 Analisis Data

Teknik analisis dalam penelitian ini yaitu jumlah larva udang yang mati dicatat dan kemudian ditentukan Tingkat kematiannya. Informasi presentase kematian diolah menggunakan analisis probit dengan SPSS dan microsoft excel untuk memperoleh nilai LC_{50}.