

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan selama 2 bulan yaitu dari bulan Desember 2024 hingga Januari 2025 di Laboratorium Farmakologi Farmasi Prodi Farmasi S-1, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *waterbath* (DFS), bejana maserasi, gelas ukur (*pyrex*), gelas beker (*pyrex*), tabung reaksi (*pyrex*), erlenmeyer (*pyrex*), batang pengaduk, corong kaca (*pyrex*), pipet tetes, cawan petri (*iwaki*), *rotary evaporator* (IKA) kaca arloji, mikro pipet (*Dragonlab*), aerator (*Marvin*), timbangan analitik, saringan, lampu led (*philips*), aquarium, pH universal, dan kain gelap.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga pepaya, etanol 70% (*teknis*), soda kue, aquadest, larutan besi (III) klorida (FeCl_3), DMSO (*teknis*), natrium klorida (NaCl) (*teknis*), iodium (I), serbuk magnesium (Mg), asam klorida (HCl), asam asetat glasial (CH_3COOH) (*teknis*), asam sulfat (H_2SO_4) (*p.a*), ammonia (NH_3) (*p.a*), kloroform (CH_3Cl) (*p.a*), n-butanol ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$), dan kalium permanganat (KMnO_4).

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian kuantitatif dengan pendekatan eksperimen di laboratorium, pengujian toksisitas ekstrak etanolik bunga pepaya (*Carica Papaya* L.) terhadap larva udang (*Artemia Salina* L.) dengan menggunakan metode BSLT.

3.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak etanol bunga pepaya.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu jumlah kematian larva udang.

3.3.2 Variabel Terkendali

Variabel terkendali atau variabel kontrol pada penelitian ini yaitu prosedur uji toksisitas, prosedur ekstraksi dengan maserasi, dan 2 jenis sampel.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi S-1 Universitas Bhamada Slawi. Determinasi dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya tanaman yang akan diteliti dengan tanaman lain (Happy et al., 2021)

3.4.2 Preparasi Sampel

Sampel bunga pepaya yang digunakan untuk penelitian didapatkan dari Desa Kertaharja, Kecamatan Pagerbarang, Kabupaten Tegal. Dimana bunga pepaya yang masih segar dicuci bersih dengan air mengalir, kemudian ditiriskan dan ditimbang beratnya sebagai berat basah 4 kg. Setelah itu keringkan bunga pepaya dengan oven pada suhu 60°C sampai simplisia menjadi kering. Selanjutnya simplisia kering diblender dan diayak dengan mesh 80. Kemudian serbuk simplisia ditimbang (Wulan et al., 2022).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak

Serbuk bunga pepaya sebanyak 500 gram ditimbang, lalu dicampur dengan pelarut etanol 70% sebanyak 2000 mL (1:4). Etanol 70% digunakan karena lebih polar dan mampu menarik senyawa aktif lebih banyak. Diaduk secara berkala selama 5 menit hingga tercampur rata. Kemudian dilanjutkan dengan maserasi selama 3x24 jam. Hasil maserasi kemudian disaring dan diperoleh filtrat hasil penyaringan (Budiman & Hidayat, 2021).

Berikut ini rumus untuk menghitung persentase (%) rendemen ekstrak yaitu (Mangirang et al., 2019) :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat (gram)} \times 100\%}{\text{Berat awal simplisia (gram)}}$$

3.4.4 Uji Parameter Ekstrak

a. Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan mencium bau dari ekstrak, mengetahui rasa dari ekstrak, melihat warna ekstrak, serta melihat bentuk ekstrak bunga pepaya (Depkes RI, 2000).

b. 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 simplisia dan 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 <10%, maka dinyatakan memenuhi syarat (Maharisti et al., 2022).

c. Susut Pengeringan

Ditimbang ekstrak sebanyak 1 g dan dimasukkan ke dalam krus porselin tertutup yang sebelumnya sudah dipanaskan pada suhu 105 °C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang, ekstrak diratakan dalam krus porselin dengan menggoyangkan krus hingga membentuk lapisan setebal 5 mm – 10 mm, masukkan kedalam oven, buka tutupnya, keringkan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Dinginkan dalam eksikator, kemudian hitung persentasenya. Batas minimal atau rentang yang diperbolehkan mengenai kemurnian dan kontaminasi suatu ekstrak tidak lebih dari 10% (DEPKES RI, 2000).

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan:

W_1 = Bobot awal botol timbang dan ekstrak

W_2 = Bobot akhir botol timbang dan ekstrak

d. Kadar Abu

Ekstrak ditimbang 1 gram, dimasukkan ke dalam cawan krusibel yang telah dipijar dan ditara, dipijarkan perlahan-lahan hingga suhu yang menyebabkan senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sampai tinggal unsur mineral dan anorganik pada suhu, dinginkan dan timbang. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, syarat standar kadar abu adalah tidak lebih dari 16,6% (Kemenkes RI, 2017).

$$\text{Kadar abu} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 = Bobot krus kosong sebelum dikeringkan, dalam gram

W_1 = Bobot kosong + ekstrak awal

W_2 = Bobot kosong + ekstrak setelah diabukan

e. Uji Bebas Etanol

Ekstrak sebanyak 0,5 g ditambahkan 2 mL asam asetat dan 2 mL H_2SO_4 , kemudian dipanaskan. Reaksi positif bebas etanol ditunjukkan dengan tidak tercium bau ester wangi. Jika masih tercium bau ester

wangi, artinya masih ada kandungan etanol yang mengalami esterifikasi (Priamsari et al., 2020).

3.4.5 Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Sebanyak 1 mL larutan ekstrak etanol bunga pepaya dituang ke dalam *beaker glass* dan dilarutkan dengan kloroform dan NH_3 . Jika terjadi endapan, itu menandakan adanya alkaloid dalam sampel. Hasil pengujian dengan pereaksi mayer akan menghasilkan endapan putih, pereaksi Dragendorff akan menghasilkan endapan merah jingga, dan pereaksi Wagner akan menghasilkan endapan coklat pekat (Wulan et al., 2022).

b. Uji Saponin

Ekstrak etanol bunga pepaya sebanyak 0,5 ekstrak ditambah 10 mL aquades kemudian dididihkan dalam penangas air. Setelah itu campuran tersebut dikocok dan dibiarkan 15 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil (Rohmah et al, 2020).

c. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak etanol bunga pepaya ditambahkan 3 mL etanol 70%, kemudian disaring. Filtrat dicampur dengan sedikit serbuk magnesium 0,1 gram dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok. Hasil positif terlihat dari perubahan warna menjadi merah atau jingga (Wulan et al., 2022).

d. Uji Steroid

Ekstrak etanol bunga pepaya sebanyak 0,5 gram ditambahkan dengan 3 mL etanol 70% dan 2 ml H_2SO_4 pekat dan CH_3COOH . Terbentuknya warna ungu pekat kehijauan atau kehitaman menunjukkan adanya steroid dalam sampel (Rohmah et al, 2020).

e. Uji Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak kemudian dipanaskan selama beberapa menit. Setelah itu ditambahkan FeCl_3 1% beberapa tetes. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau (Rohmah et al, 2020).

f. Uji KLT

1. Flavonoid

Filtrat ditotolkan pada plat silika gel GF₂₅₄. Dielusi dengan (metanol : kloroform) perbandingan (1 : 3), kemudian dikeringkan dan diamati pada cahaya tampak, UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya plat disemprot dengan amonia, dikeringkan dan diamati kembali pada cahaya tampak, UV 254 nm dan 366 nm (Marliana et al., 2005)

2. Alkaloid

Selanjutnya yaitu uji KLT pada senyawa alkaloid, lempeng KLT terlebih dahulu diaktifkan dalam oven dengan suhu 110°C selama 10 menit. Setelah itu diberi garis batas atas dan batas bawah kemudian ekstrak ditotolkan pada lempeng KLT dan

dielusi dengan eluen yang sesuai kemudian diamati dibawah lampu UV dengan gelombang 254 nm setelah itu disemprotkan dengan pereaksi dragendorff. Proses identifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis menggunakan eluen (kloroform : metanol) perbandingan (1 : 4), tujuan dipilihnya dua pelarut tersebut karena masing-masing pelarut memiliki kepolaran yang berbeda sehingga senyawa-senyawa dengan kepolaran yang berbeda dapat terpisahkan dengan eluen tersebut. Deteksi bercak dengan menggunakan sinar UV 254 nm. Pada UV 254 nm lempeng akan berfluoresensi sedangkan sampel akan tampak berwarna gelap. lempeng KLT disemprot dengan pereaksi Dragendorff untuk menampakan noda atau bercaknnya. Setelah lempeng disemprot dengan pereaksi dragendorff terdapat bercak berwarna merah jingga. Bercak berwarna merah jingga ini menandakan adanya senyawa golongan alkaloid (AR. et al., 2019).

3. Saponin

Selanjutnya yaitu uji KLT pada senyawa saponin, lempeng alumunium silika gel GF₂₅₄, disiapkan dengan ukuran panjang 10 cm dan lebar 2 cm. Ekstrak kental yang telah dilarutkan dengan alkohol 95% ditotolkan pada lempeng tepi bawah dan diangin-anginkan beberapa saat. Lempeng dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi eluen yaitu campuran homogen

lapisan bawah pelarut antara (kloroform : metanol : aquades) perbandingan (13:7:2). Lempeng dibiarkan terelusi hingga eluen merambat sampai pada tanda garis tepi atas lempeng kemudian dikeluarkan dan dikeringkan di udara. Pengamatan noda menggunakan lampu UV 254 dan 366 nm. Lempeng juga disemprotkan dengan pereaksi Liebermann Burchard dan dipanaskan pada suhu 110°C selama 10 menit untuk memperjelas warna noda yang terbentuk (Mustiqawati & Yolandari, 2022),

4. Steroid-terpenoid

Pembuatan larutan uji golongan senyawa steroid-terpenoid secara KLT Dibatasi fase gerak yang terdiri dari (n-heksana : etil asetat) perbandingan (6:4), setelah itu dimasukkan ke dalam chamber dan dibiarkan sampai jenuh. Pada plat KLT ditotolkan ekstrak yang telah dilarutkan dengan kloroform, kemudian dimasukkan ke dalam chamber, dielusi sampai tanda batas, diambil dan dibiarkan hingga kering. Selanjutnya dilihat dibawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Deteksi dilakukan dengan menggunakan penyemprot Liebermann Burchard, selanjutnya dipanaskan selama 5 menit pada suhu 105°C (Nasution, 2020).

3.4.6 Uji Toksisitas

1. Penyiapan Larva Udang

Disiapkan sebuah wadah untuk menetasakan telur udang. Di dalam wadah itu, terdapat lampu untuk menjaga suhu tetap hangat selama proses penetasan. Di samping kanan wadah tersebut diisi dengan air laut buatan sebanyak 800 mL, pembuatan air laut buatan dengan cara menimbang 20 gram garam tidak beryodium atau garam ikan kemudian dilarutkan dalam 800 mL aquades dan ditambahkan soda kue hingga mencapai pH 8-9. Setelah itu dimasukkan 50 – 100 mg telur udang untuk ditetaskan, Pada bagian telur, tutup dengan alumunium foil dan nyalakan lampu selama 24-48 jam untuk menetasakan telur. Hewan uji yang digunakan memiliki usia 24 jam (Abasa et al., 2023). Larva udang yang cocok untuk uji BSLT adalah yang berusia 48 jam. Kematian larva udang di atas usia tersebut disebabkan oleh keterbatasan makanan, bukan toksisitas (Davis et al., 2019).

2. Pembuatan Larutan Induk Air Laut Buatan

Larutan induk dibuat dengan melarutkan 250 mg ekstrak bunga pepaya dan tambahkan air laut buatan sampai batas labu ukur 250 mL. Untuk ekstrak yang sulit larut, dapat ditambahkan DMSO 1% (5 tetes) untuk meningkatkan kelarutan (Budiman & Hidayat, 2021).

3. Pembuatan Larutan Stok Air Laut Buatan

Sampel yang akan diuji disiapkan dengan masing-masing konsentrasi 1000, 500, 200, 100, dan 50 ppm. Setiap konsentrasi larutan

stok kemudian ditambahkan air laut buatan sebanyak 50 mL hingga batas miniskus. Sebagai kontrol negatif, air laut buatan tanpa ekstrak bunga pepaya (Budiman & Hidayat, 2021). Kemudian dari larutan stok tersebut dibuat pengenceran dengan menggunakan rumus pengenceran (Budiman & Hidayat, 2021) :

$$V1.M1= V2.M2$$

Keterangan:

V1 : Volume awal

M1 : Konsentrasi awal

V2 : Volume akhir

M2 : Konsentrasi akhir

4. Pelaksanaan Uji Toksisitas

Disiapkan 5 wadah, 1 di antaranya sebagai kontrol negatif. Pada uji toksisitas, konsentrasi larutan uji untuk BSLT adalah 1000, 500, 200, 100, dan 50 ppm, serta larutan kontrol (0 ppm) dilakukan triplo (3 kali pengulangan). Setiap wadah berisi 10 ekor larva udang (*Artemia salina* L.) dan ditambahkan 1 mL larutan stok dari masing-masing konsentrasi sampel. Selama 24 jam, larva udang diamati setelah kematian. Setelah 24 jam, jumlah larva yang mati dihitung. Kriteria standar untuk menilai kematian larva udang adalah ketika larva tidak bergerak selama pengamatan (Budiman & Hidayat, 2021).

5. Analisis Data

Analisis data didasarkan pada perhitungan mortalitas larva yang mati dalam waktu 24 jam dan nilai lethal concentration 50% (LC₅₀)

dihitung dengan analisis probit menggunakan program EPA probit. Metode analisis statistik EPA Probit digunakan untuk menghitung besarnya LC₅₀ melalui analisis probit. Analisis ini diperkenalkan oleh Finney pada tahun 1971. Analisis probit sering digunakan dalam toksikologi untuk menilai tingkat toksisitas suatu bahan kimia terhadap organisme. Metode ini melibatkan pengujian respons organisme terhadap beragam konsentrasi bahan kimia yang spesifik, diikuti dengan perbandingan konsentrasi tersebut. Metode regresi linear digunakan untuk mendapatkan grafik garis lurus ketika probit kematian diubah ke dalam logaritma konsentrasi. Konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian dalam populasi hewan diperoleh dengan menarik garis dari 50% probit kematian (Jelita et al., 2020).

Data yang dikumpulkan adalah data primer dari pengamatan hewan uji, termasuk kelompok kontrol dan uji, yang kemudian dianalisis menggunakan *software* SPSS versi 25. Uji efek toksik dihitung dengan menentukan nilai LC₅₀. Nilai LC₅₀ dihitung dengan menghitung tingkat kematian (mortalitas) larva udang pada setiap konsentrasi. Jumlah larva udang yang mati pada setiap wadah dihitung selama 24 jam. Larva yang mati ditandai dengan larva yang tidak bergerak saat diamati. Presentase kematian larva udang dapat dihitung menggunakan rumus (Dewi et al., 2023).

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{Jumlah Larva Mati}}{\text{Jumlah Larva Total}} \times 100\%$$