

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan April 2015 di Laboratorium Kimia Universitas Medan Area.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kulit jengkol, larva *Artemia salina*, air laut buatan, metanol, n-heksan, aquades, HCl 2 N, FeCl₃, KI, Iodine (I₂), asam asetat pa, H₂SO₄ (p.a).

Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain aerator, water bath, cawan petridish, labu takar, Beaker glass, gelas ukur, spatula, pipet tetes, neraca analitik, mortal dan alu, saringan, kertas label, stopwatch, dan alat dokumentasi.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental yaitu dengan pengujian ekstrak kulit jengkol terhadap hewan uji yaitu larva udang *Artemia salina* Leach. Penelitian ini terdiri dari 3 tahap yaitu : *observasi*, *eksploratory*, dan *full scale test* untuk mendapatkan nilai LC₅₀ dalam 24 jam.

3.4 Prosedur Kerja

Pada penelitian ini yang akan dilakukan antara lain penyediaan pereaksi, penyediaan ekstrak kulit jengkol, uji fitokimia, penyediaan larva *Artemia salina* Leach, aklimasi hewan uji, observasi, eksploratory, dan full scale test.

3.4.1 Penyediaan pereaksi

Pereaksi-peraksi yang digunakan dalam penelitian ini antara lain HCl 2 N, FeCl₃ 1%, *Wagner*, dan *Lieberman-Burchard*.

1. Larutan HCl 2 N

Sebanyak 16,7 mL HCl pa dimasukkan kedalam labu takar 100 mL dan ditambah dengan aquades sampai tanda batas, dan dihomogenkan.

2. Larutan FeCl₃ 1%

Sebanyak 1 gram FeCl₃ dimasukkan kedalam labu takar 100 mL dan ditambahkan dengan aquades hingga tanda batas, dan dihomogenkan.

3. Pereaksi *Wagner*

Sebanyak 2 gram KI dimasukkan kedalam labu takar 100 mL dan ditambah dengan aquades dan diaduk hingga KI larut kemudian ditambah 1,27 gram Iodine (I₂) dan ditambah aquades hingga tanda batas, dan dihomogenkan.

4. Pereaksi *Lieberman-Burchard*

Sebanyak 20 ml asam asetat pa ditambah 10 ml H₂SO₄ (p.a) kemudian dilarutkan dengan 50 mL kloroform.

3.4.2 Penyediaan ekstrak kulit jengkol

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit jengkol yang sudah tua. Kulit jengkol segar ditimbang sebanyak 100 gram dan dipotong kecil-kecil. Lalu dikeringkan dengan cara dijemur dipanas matahari dengan kadar air mencapai 10%. Kemudian kulit jengkol yang telah kering digiling kemudian diayak dengan ayakan berukuran 150 mesh, lalu dimaserasi dengan metanol dan n-heksan dan didiamkan selama 24 jam. Kemudian dipanaskan diatas water bath dengan suhu 70°C untuk

menguapkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak kasar metanol dan n-heksan kulit jengkol. selanjutnya kedua ekstrak tersebut di skrining fitokimia.

3.4.3 Uji Fitokimia

Untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder dari ekstrak kulit jengkol, maka dilakukan uji fitokimia yang terdiri atas alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, tanin, dan saponin. Uji fitokimia dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan pereaksi-pereaksi yang spesifik untuk senyawa-senyawa tersebut.

1. Uji Senyawa Flavonoid

Pada uji senyawa flavonoid yaitu 3 ml sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium 0,1 Mg dan 1 ml HCl (p.a) dalam waktu 2-5 menit terjadi perubahan warna merah/ungu menunjukkan adanya flavonoid (metode *willstater*).

2. Uji Senyawa Terpenoid/Steroid

Pada uji senyawa terpenoid/steroid yaitu 3 ml sampel ditambahkan 3 tetes pereaksi Libermann Bourchard terbentuk warna hijau sampai biru menunjukkan steroid sedangkan warna merah jingga atau ungu menunjukkan triterpenoid.

3. Uji Senyawa Alkaloid

Pada uji alkaloid menggunakan pereaksi *Wagner* yaitu 3 ml sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 tetes pereaksi wagner hingga terbentuk endapan coklat muda.

4. Uji Senyawa Tanin

Uji senyawa tanin dilakukan dengan menggunakan pereaksi FeCl_3 1%.

Munculnya endapan hitam mengindikasikan positif senyawa tanin.

5. Uji Senyawa Saponin

Pada uji senyawa saponin dilakukan dengan menggunakan aquades dalam tabung reaksi lalu dikocok kuat selama 30 detik dan terbentuk busa permanen lebih dari 10 menit dengan penambahan 2 tetes asam klorida (HCl) 2 N. maka menunjukkan uji positif untuk saponin.

3.4.4 Penyediaan larva Udang *Artemia salina* Leach

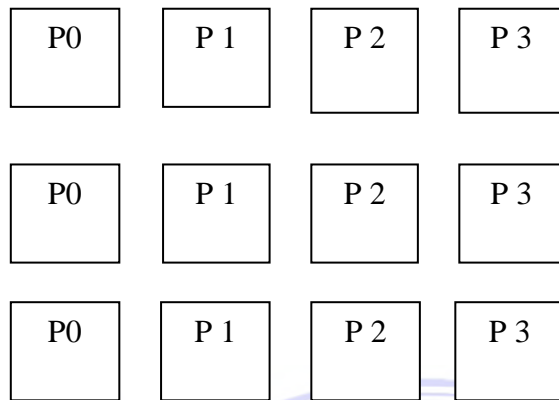
Larva *Artemia salina* diperoleh dengan cara menaburkan kista *Artemia* pada air laut buatan dengan cara melarutkan garam tidak beriodium ke dalam air yang telah dialiri udara dengan menggunakan aerator. Konsentrasi yang digunakan adalah 2% yaitu dengan melarutkan 20 g garam tiap 1 L air. Setelah didiamkan selama 18-20 jam kista akan menetas menjadi larva. Setelah menetas larva dipelihara hingga berumur 48 jam yang digunakan untuk uji toksisitas.

3.4.5 Aklimasi Hewan Uji

Larva udang *Artemia salina* diaklimatisasi selama 4 jam yang bertujuan untuk adaptasi larva, pada setiap petri digunakan 20 larva.

3.4.6 Observasi

Tahapan pertama yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu observasi. Observasi bertujuan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak yang menyebabkan mortalitas hewan uji 50 % selama 24 jam. Variasi konsentrasi yang digunakan yaitu 0%, 5%, 10%, 15%. Pada observasi ini digunakan 1 media sebagai kontrol dengan volume tiap petri 100 ml dan tiga ulangan. seperti pada gambar 4 bagan berikut ini. Pengamatan dilakukan selama 24 jam dengan selang waktu satu jam.



Gambar 4. Bagan Observasi

Keterangan :

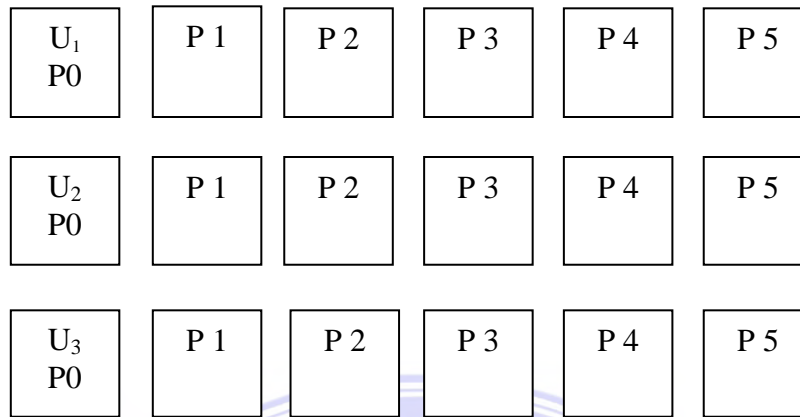
U₁P0 = Ulangan 1 (Kontrol) = 100 ml Air laut
 P1 (5%) = 5 ml ekstrak + 100 ml Air laut
 P2 (10%) = 10 ml ekstrak + 100 ml Air laut
 P3 (15%) = 15 ml ekstrak + 100 ml Air laut

U₂P0 = Ulangan 1 (Kontrol) = 100 ml Air laut
 P1 (5%) = 5 ml ekstrak + 100 ml Air laut
 P2 (10%) = 10 ml ekstrak + 100 ml Air laut
 P3 (15%) = 15 ml ekstrak + 100 ml Air laut

U₃P0 = Ulangan 1 (Kontrol) = 100 ml Air laut
 P1 (5%) = 5 ml ekstrak + 100 ml Air laut
 P2 (10%) = 10 ml ekstrak + 100 ml Air laut
 P3 (15%) = 15 ml ekstrak + 100 ml Air laut

3.4.7 Eksploratory

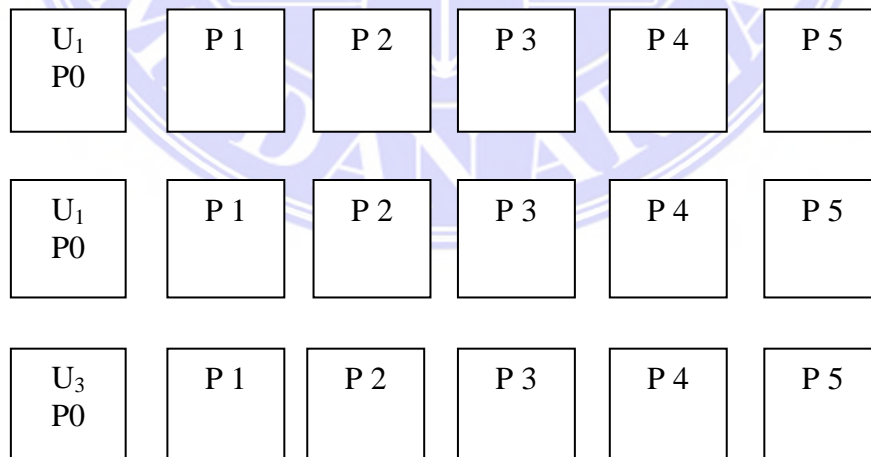
Setelah tahap observasi dilakukan akan didapatkan konsentrasi yang mendekati mortalitas 50%, maka akan dilanjutkan dengan tahapan kedua yaitu eksploratory. Pada tahap ini konsentrasi kemudian dipersempit dengan mengambil titik konsentrasi dibawah dan diatas konsentrasi hasil observasi dan kontrol dengan volume tiap petri 100 ml dan tiga ulangan, seperti pada bagan berikut ini. pengamatan dilakukan selama 24 jam dengan selang waktu 1 jam.



Gambar 5. Bagan Uji Eksploratory

3.4.8 Full scale test

Tahapan ketiga yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu full scale test, berdasarkan hasil uji eksploratory maka akan didapatkan konsentrasi yang paling mendekati 50%. Pada konsentrasi ini kemudian dipersempit yaitu mengambil titik konsentrasi dibawah dan diatas konsentrasi hasil eksploratory dan kontrol dengan volume 100 ml dan tiga ulangan, seperti pada bagan berikut ini. Pengamatan dilakukan selama 24 jam dengan selang waktu 1 jam.



Gambar 6. Bagan Full Scale test

3.5 Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil uji *observasi*, *eksploratory*, dan *full scale test* dianalisis menggunakan ANOVA, apabila ada beda nyata dilanjutkan dengan LSD. Rancangan percobaan yang digunakan dalam uji mortalitas adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Kemudian data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan korelasi dan regresi untuk mendapatkan nilai LC_{50} dalam 24 jam.

