

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Rancangan penelitian ini merupakan eksperimental murni (*True-Experimental Research*) dengan bentuk desain *Post-test Only Control Group*. Kelompok eksperimen merupakan kelompok yang mendapatkan perlakuan sedangkan kelompok kontrol tidak mendapatkan perlakuan. Setelah melakukan intervensi pada kelompok eksperimen maka dilakukan pengamatan serta membandingkan kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol, Etil asetat, n-heksan Bunga Kekara Laut (*Canavalia rosea*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dilakukan pada bulan Maret 2025 – Juni 2025 di Laboratorium Kimia Terpadu Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Panti Waluya Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Pisau, talenan, *beaker glass*, batang pengaduk, labu ukur 100 ml, oven, loyang, kertas roti, blender, toples kaca, aerator, ember, vial 5 ml, cawan penguap, cawan petri, pipet tetes, kertas saring, corong kaca, *rotary evaporator*, rak beserta tabung reaksi, kaca pembesar, timbangan analitik, aluminium foil, ayakan no 42, pengaduk kayu,

3.3.2 Bahan

Bunga kekara laut segar, etanol 70%, Etil asetat, n-Heksan, tween 20, serbuk magnesium, pereagen *mayer*, *Dragendorff*, *Bouchardat*, HCL pekat, FeCl_3 , bibit *Artemia salina* L, garam.

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi merupakan suatu objek penelitian yang memiliki karakteristik khusus yang sesuai dengan tujuan penelitian (Suryani *et al.*, 2023). Populasi yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah bunga kekara laut (*Canavalia rosea*) yang diperoleh dari pesisir pantai desa Sidoasri, Sumbermanjing Wetan, Kabupaten Malang.

3.4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian merupakan bagian dari populasi yang diambil sebagai sumber penelitian yang dapat mewakili seluruh populasi (Suryani *et al.*, 2023). Penelitian ini menggunakan sampel ekstrak etanol, etil asetat, n-heksan bunga kekara laut (*Canavalia rosea*).

3.4.3 Kriteria Inklusi

Kriteria sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga kekara laut yang berwarna pink keunguan, segar, mekar, memiliki putik dan bunga utuh, tidak berjamur, dan tidak busuk

3.4.4 Kriteria Eksklusi

Terdapat kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah bunga kekara laut berwarna kecoklatan, layu, memiliki bekas gigitan hama, berjamur dan busuk.

3.5 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.5.1 Variabel Penelitian

Variabel penelitian merupakan suatu variasi tertentu seperti atribut, sifat, nilai, atau kegiatan yang ditetapkan untuk dilakukan penelitian (Imanda *et al.*, 2019). Jenis variabel penelitian yang dilihat dari perannya, dibedakan dalam dua jenis yaitu :

1. Variabel *dependent* (terikat) merupakan suatu variabel yang dipengaruhi oleh sejumlah variabel lain. Pada penelitian ini yang menjadi variabel *dependent* adalah nilai LC₅₀ dari kematian *Artemia salina* L.

2. Variabel *independent* (bebas) merupakan suatu variabel yang memberikan pengaruh pada variabel lain. Pada penelitian ini yang menjadi variabel bebas adalah variasi konsentrasi ekstrak etanol, ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan dari bunga kekara laut (*Canavalia rosea*).
3. Variabel Terkontrol pada penelitian ini yaitu waktu maserasi, media hidup *Artemia salina*, waktu pemberian perlakuan selama pengujian.

3.5.2 Definisi Oprasional Variabel

1. Ekstrak merupakan sediaan dengan tingkat konsistensi yang kental dari suatu simplisia nabati yang sudah melewati proses ekstraksi bertingkat dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut yang memiliki sifat kepolaran berbeda yaitu n-heksan, etil asetat, etanol 70% yang kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C (dibawah titik didih pelarut) dengan kecepatan 70 rpm. Hasil ekstrak yang didapatkan kemudian dipekatkan dengan *water bath* dengan suhu 50°C hingga didapatkan hasil ekstrak yang lebih kental.
2. Metode maserasi bertingkat adalah suatu metode dengan cara melarutkan sampel menggunakan 3 pelarut secara bertahap, yaitu n-heksan, etil asetat, etanol 70% berdasarkan tingkat kepolaran yang berbeda.
3. Uji toksisitas akut merupakan metode uji yang digunakan untuk mengetahui tingkat toksisitas dari suatu senyawa setelah diberikan selama 24 jam dan dilakukan observasi.
4. *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan metode uji toksisitas untuk menguji bahan-bahan yang bersifat toksik menggunakan hewan uji larva udang *Artemia salina* L.
5. *Lethal Concentration 50* (LC_{50}) merupakan suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi suatu bahan atau senyawa yang menyebabkan kematian larva udang *Artemia salina* sebesar 50% dari jumlah hewan uji.
6. Bunga kekara laut merupakan bagian bunga dari tanaman kekara laut yang memiliki warna pink keunguan, segar, bentuk bunga yang mekar, memiliki putik dan bunga yang utuh, tidak berjamur dan tidak mengalami kebusukan.

3.6 Metode Analisis Data

3.6.1 Metode Analisis

1. Uji Toksisitas

Uji toksisitas akut menggunakan larva udang *Artemia salina* L diamati setelah 24 jam setelah pemberian ekstrak etanol, etil asetat dan n-heksan bunga kekara laut (*Canavalia rosea*). Pengamatan dilakukan dengan menggunakan kaca pembesar dibawah cahaya terang. Kriteria standar untuk melihat kematian larva udang apabila larva udang sudah tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik. Observasi jumlah kematian larva udang dalam masing-masing vial dan selanjutnya dilakukan analisis probit untuuk mengetahui nilai LC_{50} menggunakan SPSS.

Menurut Mayer dalam Andini *et al.*, 2021 :

Kategori	LC_{50} (ppm)
Sangat toksik	< 30
Toksik	30 – 1000
Tidak toksik	> 1000

3.6.2 Pengujian Hipotesa

1. Determinasi Tanaman

Penelitian ini diawali dengan melakukan uji determinasi bunga kekara laut (*Canavalia rosea*). Determinasi dilakukan untuk menentukan kesesuaian sampel dengan ciri-ciri morfologi bunga kekara laut (*Canavalia rosea*) yang dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu.

2. Preparasi Sampel

Bunga kekara laut (*Canavalia rosea*) disortasi dari kotoran, lalu ditiriskan. Bunga kekara laut (*Canavalia rosea*) dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 2x24 jam. Simplisia yang sudah kering dilakukan uji kadar susut air yang tidak boleh lebih dari 10%. Simplisia yang sudah kering dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan blender.

3. Ekstraksi

Pembuatan ekstrak bunga kekara laut (*Canavalia rosea*) dilakukan dengan metode maserasi bertingkat. Bunga kekara laut ditimbang sebanyak 500 g serbuk dan dimasukkan kedalam wadah toples kaca berukuran 2 L.

Serbuk bunga kekara laut (*Canavalia rosea*) ditambahkan dengan pelarut n-heksan (non-polar) sebanyak 1,5 L (1:3 b/v). Simplisia yang direndam ditutup rapat dan ditunggu selama 3x24 jam sambil beberapa kali diaduk. Setelah 3x24 jam, rendaman disaring menggunakan kertas saring sehingga akan menghasilkan maserat dan residu. Maserat disimpan dalam wadah dan diberi label, sedangkan residu diletakkan kembali dalam toples dan dilakukan remaserasi dengan pelarut n-heksan (non-polar) dan dibiarkan selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk (Putra *et al.*, 2024). Setelah 3x24 jam, rendaman disaring sehingga menghasilkan maserat dan residu. Hasil maserasi dari pelarut n-heksan (non polar) dapat digabungkan dengan sebelumnya dan diberi label 1.

Hasil residu dari maserasi menggunakan pelarut n-heksan (non-polar) dimaserasi dengan etil asetat (semi polar) dengan perbandingan (1:3 b/v). Rendaman ditutup rapat dan ditunggu selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah 3x24 jam maka dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring kemudian akan menghasilkan maserat dan residu. Maserat disimpan dalam wadah dan diberi label. Residu yang dihasilkan diremaserasi kembali dengan pelarut etil asetat (semi polar) dan dibiarkan selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk (Putra *et al.*, 2024). Setelah 3x24 jam, rendaman disaring menggunakan kertas saring sehingga menghasilkan maserat dan residu. Hasil maserasi dari pelarut etil asetat (semi polar) dapat digabungkan dengan sebelumnya dan diberi label 2.

Hasil residu dari maserasi menggunakan pelarut etil asetat (semi polar) dimaserasi dengan etanol 70% (polar) dengan perbandingan (1:3 b/v). Rendaman ditutup rapat dan ditunggu selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk. Setelah 3x24 jam maka dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring kemudian akan menghasilkan maserat dan residu. Maserat disimpan

dalam wadah dan diberi label. Residu yang dihasilkan diremaserasi kembali dengan pelarut etanol 70% (polar) dan dibiarkan selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk (Putra *et al.*, 2024). Setelah 3x24 jam, rendaman disaring menggunakan kertas saring sehingga menghasilkan maserat dan residu. Hasil maserasi dari pelarut etanol 70% (polar) dapat digabungkan dengan sebelumnya dan diberi label 3.

Hasil maserat dari 3 jenis pelarut dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dengan tekanan 15-20 psi dan kecepatan 70 rpm sampai menghasilkan ekstrak kental tapi yang memiliki konsistensi tidak terlalu padat. Ekstrak yang didapatkan setelah dari proses *rotary evaporator* diuapkan diatas *waterbath* dengan suhu 50°C sehingga terbentuk ekstrak kental. Ekstrak kental dari masing-masing pelarut disimpan dalam botol kaca gelap tertutup dan disimpan dalam lemari pendingin sebelum digunakan untuk pengujian.

4. Identifikasi Senyawa Kimia

a. Uji Flavonoid

Masing-masing ekstrak kental bunga kekara laut (*Canavalia rosea*) dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan etanol 96%. Larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan dengan serbuk Mg sebanyak 0,1 gram dan HCl pekat sebanyak 10 tetes kemudian dilakukan pengocokan secara perlahan. Positif mengandung flavonoid apabila terbentuk warna merah jingga atau kuning (Muthmainnah, 2019).

b. Uji Alkaloid

Masing-masing ekstrak kental bunga kekara laut (*Canavalia rosea*) dibagi menjadi 3 dalam tabung reaksi. Tabung pertama ditetesi dengan reagen *mayer*, positif mengandung alkaloid jika membentuk endapan berwarna putih atau kuning. Tabung kedua ditetesi dengan reagen *dragendorff*, positif mengandung alkaloid apabila terbentuk endapan berwarna jingga. Tabung ketiga ditetesi

dengan pereaksi bouchardat, positif mengandung alkaloid apabila terbentuk endapan coklat kehitaman (Muthmainnah, 2019).

c. Uji Saponin

Masing-masing ekstrak kental bunga kekara laut (*Canavalia rosea*) dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 10 ml air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Positif mengandung saponin jika terbentuk buih stabil setinggi 1-10 cm dalam waktu tidak kurang dari 10 menit (Muthmainnah, 2019).

d. Uji Steroid dan Triterpenoid

Masing-masing ekstrak kental bunga kekara laut (*Canavalia rosea*) dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereagen *bouchardat*. Positif mengandung terpenoid apabila terbentuk cincin berwarna jingga atau ungu. Positif mengandung steroid apabila terbentuk warna hijau kebiruan (Muthmainnah, 2019).

e. Uji Tanin

Masing-masing ekstrak kental bunga kekara laut (*Canavalia rosea*) dilarutkan kedalam 10 ml aquadest dan di panaskan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat yang dihasilkan ditambahkan dengan FeCl_3 3-4 tetes. Positif mengandung tanin apabila terbentuk warna hijau kehitaman (Muthmainnah, 2019).

5. Pembuatan Air Laut Buatan

Dibuat air laut buatan dengan salinitas 20.000 ppm dengan cara melarutkan 20 gram garam ke 1000 mL air terlebih dahulu, kemudian dihomogenkan sampai garam benar-benar larut. Air laut buatan dibuat dengan tujuan sebagai media penetasan *Artemia salina*.

6. Penetasan Kista *Artemia salina* Leach

Kista larva udang *Artemia salina* ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian ditetaskan dalam 1000 mL air laut buatan dengan salinitas 20.000 ppm. Proses penetasan kista larva udang *Artemia salina* selama 48 jam di bawah pencahayaan yang cukup memadai dan dilengkapi dengan *aerator*.

7. Pembuatan Larutan Induk

Ditimbang 20 gram garam dan dilarutkan dalam 1000 mL *aquadest* sebagai air larut dengan salinitas 20.000 ppm sebagai pelarut larutan induk. Kemudian membuat larutan induk 2000 ppm dengan cara menimbang 0,2 gram ekstrak etil asetat dan etanol 70% bunga kekara laut (*Canavalia rosea*) dan dilarutkan dalam 100 ml air laut buatan. Ekstrak n-heksane ditimbang sebanyak 0,2 gram dan ditambahkan tween 20 sebagai emulsifier sebanyak 10 μ L. Dari larutan induk 2000 ppm dilakukan pengenceran menjadi 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm; 31,25 ppm; 15,625 ppm; 7,8125 ppm; 3,90625 ppm; dan 1,953125 ppm. Masing-masing konsentrasi dimasukkan kedalam vial 5 mL dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Pada kelompok kontrol ekstrak etanol dan etil asetat hanya menggunakan air laut buatan tanpa diberikan penambah ekstrak. Pada kelompok control ekstrak n-heksan menggunakan air lat buatan dan juga kelompok kontrol air laut buatan + tween 20 dengan 3 kali replikasi.

8. Pengujian BSLT

Larva udang yang sudah menetas dalam waktu 48 jam kemudian dipipet sebanyak 10 ekor dan dimasukkan kedalam botol vial yang sudah diberi label, baik vial berisi larutan induk intervensi maupun kontrol. Setelah 24 jam maka dilakukan pengamatan terhadap larva udang *Artemia salina*. Observasi jumlah kematian larva udang dalam masing-masing ekstrak dan konsentrasi dalam vial dan selanjutnya dilakukan analisa probit untuk mengetahui nilai LC_{50} .

3.7 Kerangka Operasional

