

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan mulai dari bulan Mei sampai Juli 2018 (3 bulan). Bertempat di Herbarium Bogoriense – LIPI Cibinong untuk proses determinasi tumbuhan, Laboratorium Kimia – Universitas Muhammadiyah Sukabumi untuk proses maserasi, fraksinasi, dan skrining fitokimia, Laboratorium Nutrisi dan Pakan di BBPBAT Sukabumi untuk proses evaporasi, serta di Laboratorium Parasitologi Litbang Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (P2B2) Pangandaran untuk uji toksisitas biolarvasida.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu set alat maserasi, pengaduk kayu, alat penghalus (*chipper*), neraca analitik, saringan ukuran 40-60 *mesh*, pompa vakum, corong *Buchner*, rangkaian alat kromatografi vakum cair (KVC), *vacum rotary evaporator*, botol kaca, beaker gelas, nampan plastik, gelas plastik, spatula, dan peralatan gelas laboratorium lainnya.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini kertas saring *Whatman* 41, silika gel 7731 Merck 60 G, silika gel 7733 Merck 60 G, heksan, metanol (MeOH), etil asetat (EtOAc), akuades, kalium iodida (KI), merkuri klorida (HgCl₂), asam sulfat (H₂SO₄) pekat, asam klorida (HCl) pekat, serbuk magnesium (Mg), besi klorida (FeCl₃), asam asetat (CH₃COOH) glasial. Adapun objek penelitian ini yaitu daun dan batang *canar bokor* (*Smilax leucophylla* Blume) yang diperoleh dari daerah hutan Goalpara yang merupakan kaki Gunung Gede Pangrango, Sukabumi.

3.2.3 Larva Uji

Larva uji yang digunakan untuk uji toksisitas biolarvasida adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* asal Litbang Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (P2B2) Ciamis Pangandaran Jawa Barat.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Penyiapan Sampel Tumbuhan *Canar Bokor*

Tumbuhan *canar bokor* yang diperoleh dibersihkan dari kotoran seperti, debu, tanah atau bagian lain yang tidak diperlukan lalu diambil bagian batang dan daun *canar bokor*, selanjutnya dicuci dengan air, dan dikeringkan di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam sampai kering. Setelah itu, daun dan batang tumbuhan *canar bokor* tersebut dipotong-potong dan dihaluskan dengan alat penghalus, kemudian disaring dengan saringan 40-60 *mesh*, sehingga diperoleh serbuk dengan ukuran 40-60 *mesh* yang seragam (Rahmawati 2018).

3.3.2 Pembuatan Ekstrak Tumbuhan *Canar Bokor*

Tumbuhan *canar bokor* (*Smilax leucophylla* Blume) kering ditimbang sebanyak ± 1000 gram, lalu dimasukkan ke dalam set alat maserasi dan ditambahkan pelarut metanol sampai semuanya terendam. Selanjutnya dimaserasi selama 24 jam pada suhu kamar dan diulang sebanyak 3 kali maserasi. Filtrat yang dihasilkan ditampung dan dipekatkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat sampel (Pambayun 2007).

3.3.3 Skrining Fitokimia Ekstrak Batang *Canar Bokor* (Rahmawati 2018)

3.3.3.1 Uji Alkaloid

Ekstrak kasar sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 tetes kloroform dan beberapa tetes pereaksi Meyer yang dibuat dari satu gram KI dilarutkan dalam 20 mL aquades sampai semuanya larut, lalu ke dalam larutan KI tersebut ditambahkan 0,271 gram HgCl_2 sampai larut. Terbentuknya endapan putih mengindikasikan adanya alkaloid.

3.3.3.2 Uji Terpenoid atau Steroid

Ekstak kasar sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 1 ml CH_3COOH glasial dan 1 ml larutan H_2SO_4 pekat. Apabila warna larutan bagian atas menjadi hijau menandakan adanya kelompok senyawa steroid. Sedangkan apabila warna larutan bagian bawah berubah menjadi merah menunjukkan adanya kelompok senyawa terpenoid.

3.3.3.3 Uji Flavanoid

Ekstrak kasar sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan serbuk Mg sebanyak 1 gram dan larutan HCl pekat. Perubahan warna larutan menjadi warna jingga menandakan adanya flavonoid.

3.3.3.4 Uji Saponin

Ekstrak kasar sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan air dan dikocok dengan kuat selama 10 menit. Jika berbuih, menandakan adanya saponin.

3.3.3.5 Uji Tanin

Ekstrak kasar sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi, lalu ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl_3 5%. Perubahan warna menjadi hijau kehitaman menunjukkan keberadaan tanin.

3.3.4 Fraksinasi Ekstrak Tumbuhan *Canar Bokor*

Fraksinasi ekstrak metanol dengan kromatografi vakum cair (KVC), dengan menimbang ekstrak metanol tumbuhan *canar bokor* sebanyak 20 gram dan silika gel sebanyak 20 gram, kemudian diaduk hingga diperoleh campuran homogen dan kering. Pembuatan kolom silika dilakukan dengan cara memasukkan sedikit demi sedikit silika gel ke dalam kolom (*sintered glass*) sambil divakum untuk mendapatkan massa fase diam yang kompak dan padat. Sampel yang sudah dikeringkan dengan silika gel hingga menjadi serbuk dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam kolom (*sintered glass*) di atas fase diam dengan dilapisi kertas saring dan permukaan atas diusahakan rata sambil divakum.

Pelarut yang digunakan heksan, etil asetat, dan metanol dimulai dari pelarut yang paling nonpolar dan selanjutnya dengan pelarut yang lebih polar secara bertahap. Fraksinasi dilakukan dengan cara menuangkan pelarut dengan perlahan-lahan pada permukaan sampel dalam *sintered glass* yang dilapisi kertas saring sambil divakum sehingga pelarut melewati silika sebagai fase diam. Hasil fraksinasi kemudian ditampung dalam botol kaca dan dipisahkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Proses evaporasi dihentikan apabila larutan telah habis menguap, sehingga diperoleh fraksi kental (Rismawati 2018).

3.3.5 Uji Toksisitas Biolarvasida

Beaker gelas disiapkan untuk pengujian sebanyak enam beaker, dimana lima beaker digunakan untuk sampel ekstrak metanol, dan hasil fraksinasi daun tumbuhan *canar bokor* dan satu beaker sebagai kontrol negatif. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10, 50, 100, 250, dan 500 ppm dengan replikasi sebanyak 3 kali untuk setiap konsentrasi. Sebanyak 20 larva *Aedes aegypti* dimasukkan ke dalam beaker gelas yang berisi 200 mL larutan sampel bagian daun tumbuhan *canar bokor* yang telah dilarutkan terlebih dahulu dengan etanol 2% sebanyak 2 ml. Sebagai kontrol negatif dimasukkan 2 mL etanol 2% lalu ditambahkan akuades sampai volume 200 mL. Kemudian 20 ekor larva uji dimasukkan ke dalam larutan tersebut. Pengamatan kematian larva dilakukan pada waktu kontak 24 jam setelah perlakuan. Prosedur yang sama dilakukan terhadap sampel bagian batang tumbuhan *canar bokor* (Kadarohman *et al.* 2013).

3.3.6 Analisis Data

Hasil pengujian aktivitas biolarvasida kemudian dilakukan analisis probit untuk mencari konsentrasi kematian LC_{50} (*Lethal Concentration 50*) dan LT_{50} (*Lethal Time 50*) menggunakan program *software SPSS* probit analisis versi 23.