

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan bulan Juli 2013.

Tempat penelitian adalah Laboratorium Botani dan Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang diperlukan untuk penelitian ini adalah: aerator untuk menyuplai udara kedalam wadah, wadah digunakan sebanyak 18 buah untuk tempat hidup hewan uji, aluminium foil untuk menutup larutan maupun sampel agar tidak terkontaminasi dengan udara dilingkungan sekitar, batang pengaduk untuk mengaduk sampel baik yang akan direaksi maupun ketika reaksi berlangsung, *beaker glass* untuk menyimpan maupun membuat larutan, blender untuk menghaluskan organ *Selaginella willdenowii*, corong gelas untuk memasukkan atau memindahkan larutan cair dari satu tempat ke tempat lain dan juga sebagai tempat larutan yang akan disaring, *desikator* untuk menyimpan bahan-bahan yang harus kering dan juga dapat berfungsi sebagai pendingin alat atau bahan, *erlenmeyer* untuk wadah larutan, gelas

ukur untuk mengukur volume larutan, indikator universal untuk identifikasi keasamaan larutan/zat, kertas saring untuk menyaring larutan, lampu untuk memberi cahaya didekat wadah, mortal dan pastle untuk menghaluskan zat yang bersifat padat/kristal, oven untuk mengeringkan alat sebelum digunakan dan juga untuk mengeringkan bahan yang basah, pipet tetes untuk meneteskan atau mengambil larutan dalam jumlah kecil, tabung reaksi untuk mereaksi dua atau lebih zat, rak tabung reaksi untuk meletakkan tabung reaksi, dan spatula untuk mengambil bahan-bahan kimia dalam bentuk padatan.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: air aquades, ikan mas (*Cyprinus* sp.) sebagai hewan uji dalam penelitian sebanyak 54 ekor dan *Selaginella willdenowii* sebagai ekstrak yang diujikan dalam penelitian.

C. Rancangan Penelitian

Penelitian ini disusun dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 kali pengulangan. Perlakuan dengan menggunakan konsentrasi 0%, 5%, 10%, 20%, 40%, dan 50%. Konsentrasi perlakuan yang digunakan untuk uji toksisitas mengacu pada penelitian Rudiyanthi dan Ekasari (2009) yaitu 0%, 10%, 20%, 30%, dan 40% dari nilai LC_{50-96} jam. Masing-masing wadah berukuran besar diisi dengan 3 ekor ikan mas. Air aquades dan organ tumbuhan *Selaginella willdenowii* diencerkan secara berseri dalam 3 kali pengenceran selama 24 jam untuk memperoleh 6 tingkat perlakuan yang masing-masing ulangan akan diulang sebanyak 3 kali ulangan untuk setiap perlakuan, total keseluruhan unit percobaan adalah 54 percobaan.

D. Cara Kerja

1. Persiapan Tumbuhan *Selaginella willdenowii*

Sampel *Selaginella* diambil dari Taman Hutan Raya Wan Abdul Rachman sebagai tempat pertumbuhan tumbuhan *Selaginella* yang ada di Bandar Lampung. Bagian yang digunakan adalah keseluruhan dari tumbuhan ini baik akar, batang maupun daunnya.

2. Pembuatan Ekstrak Tumbuhan *Selaginella willdenowii*

1. Akar, batang, dan daun *Selaginella* dikeringkan di dalam oven dengan suhu 40°-50° C selama 5x24 jam sampai benar-benar kering.
2. *Selaginella* yang telah kering dipotong-potong lalu dihaluskan dengan blender kering.
3. *Selaginella* yang telah halus direndam (maserasi) dengan aquades selama 24 jam kemudian disaring, langkah ini diulang sebanyak 3 kali untuk menghasilkan ekstrak *Selaginella*.
4. Ekstrak *Selaginella* kemudian diuapkan di dalam oven dengan suhu 40-50° C hingga menjadi pasta dan siap digunakan sebagai larutan stok pada penelitian.

3. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak *Selaginella willdenowii*

Jumlah ekstrak yang digunakan sebagai perlakuan sebanyak 10 g + 10 g air aquades dengan total keseluruhan adalah 20 g di dalam 100 ml air. Pembuatan ekstrak perkonsentrasi dibuat sebanyak 3 kali karena dalam percobaan menggunakan 3 kali ulangan.

Konsentrasi 0 %

Konsentrasi 5 % → 1 cc (ekstrak) + 19 cc (air aquades) = 20 cc

Konsentrasi 10 % → 1 cc (ekstrak) + 9 cc (air aquades) = 10 cc

Konsentrasi 20 % → 1 cc (ekstrak) + 4 cc (air aquades) = 5 cc

Konsentrasi 40 % → 1 cc (ekstrak) + 1,5 cc (air aquades) = 2,5 cc

Konsentrasi 50 % → 1 cc (ekstrak) + 1 cc (air aquades) = 2 cc

4. Persiapan Wadah Hewan Uji

Wadah berukuran 2500 mL yang telah disterilisasikan, diisi air sebanyak 1000 mL.

Jumlah wadah yang digunakan sebanyak 18 buah.

5. Persiapan Juvenil Ikan Mas

Juvenil ikan mas dibeli di penyediaan benih ikan mas. Juvenil ikan mas untuk penelitian ini memiliki berat 3 g. Ikan yang digunakan sebanyak 54 ekor. Masing-masing 3 ekor ikan dimasukkan ke dalam 1 wadah yang berbeda untuk selanjutnya diberikan perlakuan. Wadah juga telah diisi air sebanyak 1000 mL.

6. Aklimasi

Juvenil ikan mas sebanyak 54 ekor diambil masing-masing 3 ekor untuk dimasukkan ke dalam 1 wadah yang berbeda untuk diberikan perlakuan. Wadah tersebut telah dilengkapi aerator. Juvenil ikan diaklimasi selama 1 hari. Setiap hari juvenil ikan mas diberi pakan komersil yang dibeli di tempat penjualan pakan ikan. Pakan tersebut diberikan secara 2 tahap yaitu pagi dan sore.

7. Perlakuan Ekstrak Terhadap Hewan Uji Ikan Mas (*Cyprinus sp.*)

Hewan uji yang digunakan dalam uji toksisitas adalah ikan mas (*Cyprinus sp.*) dengan berat tubuh sebesar 3 gram. Hewan uji diletakkan dalam 18 wadah dan masing-masing wadah berisi ikan mas sebanyak 3 ekor dengan 3 pengulangan.

8. Pengambilan Data

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah ikan mas yang mati di setiap wadah pada 12 jam setelah perlakuan, 24 jam, 36 jam, 48 jam, 60 jam, 72 jam, 84 jam, dan 96 jam pada tiap konsentrasi.

E. Parameter Penelitian

Menurut Mayer *et al.* (1982), efek toksisitas dianalisis dari pengamatan dengan persen kematian (mortalitas). Dengan mengetahui kematian juvenil ikan mas

(*Cyprinus* sp.). Kemudian dihitung LC_{50} dengan memasukkan nilai probit

(50 % kematian). Rumus Mortalitas:

$$\% \text{ Angka Mortalitas Juvenil} = (\text{juvenil mati} / \text{jumlah total juvenil}) \times 100\%$$

Untuk mencari angka probit dibuat persamaan garis : $y = bx + a$

dimana $y = \log$ konsentrasi

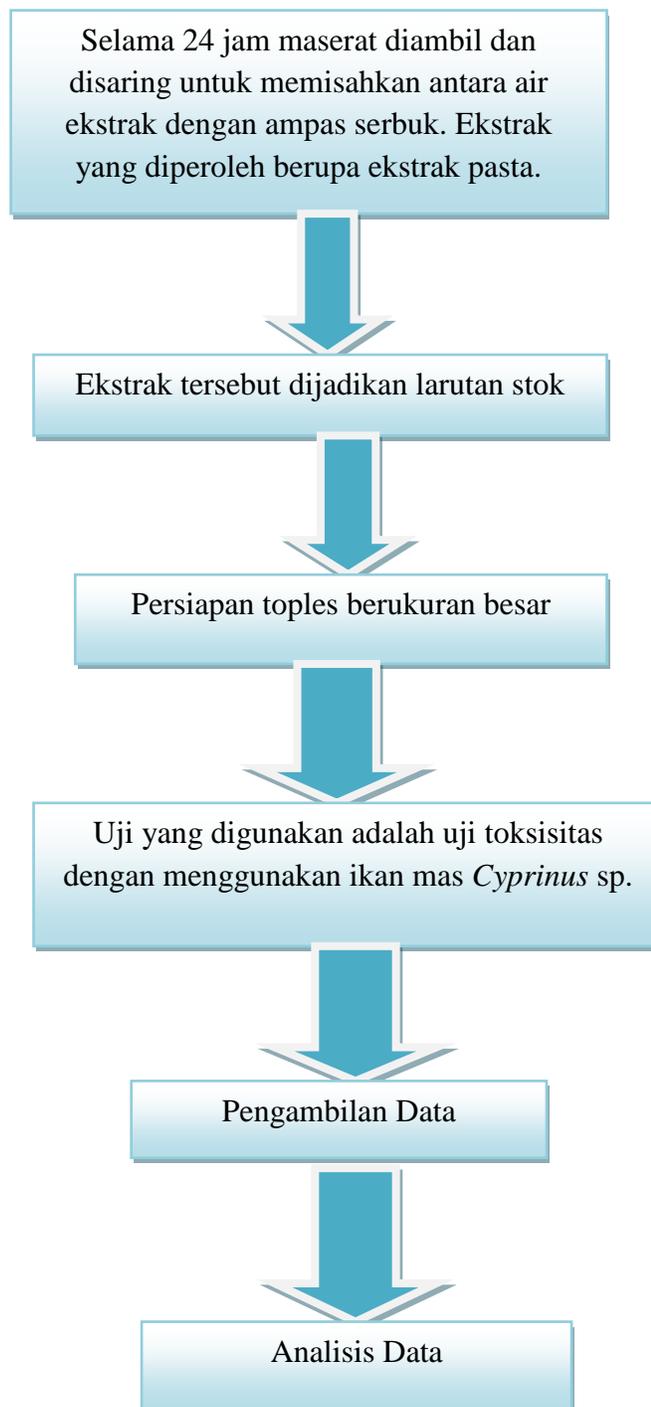
$x =$ Angka probit

F. Analisis Data

Penelitian ini disusun dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 kali pengulangan. Dengan konsentrasi 0%, 5%, 10%, 20%, 40%, dan 50%. LC_{50} ditentukan dengan persamaan regresi linier, hubungan antara konsentrasi dengan persentase kematian. Analisis data menggunakan varian satu arah (ANOVA) ($\alpha = 0,05$) untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan.

G. Diagram Alir





Gambar 3. Diagram alir penelitian