

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Juni 2013 di laboratorium Biologi Molekuler dan Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

#### **B. Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aerator yang berfungsi menyuplai udara ke dalam air akuarium serta mengeluarkan zat-zat hasil sisa-sisa pembakaran keluar dari akuarium. Aluminium foil digunakan untuk menutup larutan dan sampel agar tidak terkontaminasi dengan udara di lingkungan sekitar. Batang pengaduk digunakan untuk mengaduk sampel. Beaker glass berfungsi sebagai tempat untuk menyimpan dan membuat larutan. Blender digunakan untuk menghaluskan *Sellaginella* hingga menjadi tepung. Corong gelas berfungsi untuk memasukkan larutan cair dari satu tempat ke tempat lain. Desikator untuk menyimpan bahan-bahan agar tetap kering. Erlenmeyer digunakan sebagai wadah larutan. Gelas ukur digunakan untuk mengukur volume larutan. Indikator Universal digunakan untuk identifikasi keasaman larutan/zat. Kertas saring digunakan untuk menyaring larutan. Mortar dan Paster digunakan untuk menghaluskan zat yang masih bersifat padat/kristal. Oven untuk mengeringkan

alat-lat sebelum digunakan serta bahan-bahan yang akan digunakan yang masih dalam keadaan basah. Pipet tetes digunakan untuk mengambil larutan dalam jumlah sedikit. Rak tabung reaksi tempat untuk menyimpan tabung reaksi. Spatula digunakan untuk mengambil bahan-bahan kimia dalam bentuk padat. Tabung reaksi digunakan untuk mereaksikan ekstrak *Selaginella*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva *Artemia salina* Leach sebagai hewan yang akan diuji pada penelitian, *Selaginella willdenowii* sebagai bahan yang dibuat ekstrak, aquades sebagai pelarut ekstrak, air laut digunakan sebagai media untuk menetasakan *Artemia salina* Leach.

### **C. Rancangan penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan 7 perlakuan dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak 4 kali. Setiap perlakuan menggunakan *Artemia* sebanyak 14 ekor untuk melihat berapa banyak *Artemia* yang mati sebagai respon toksik tanaman *Selaginella*. Perlakuan tersebut adalah

1. 14 *Artemia* sebagai kontrol dengan pemberian ekstrak *Selaginella* sebanyak 0% .
2. 14 *Artemia* diberi ekstrak *Selaginella* sebanyak 2%
3. 14 *Artemia* diberi ekstrak *Selaginella* sebanyak 4%
4. 14 *Artemia* diberi ekstrak *selaginella* sebanyak 6%
5. 14 *Artemia* diberi ekstrak *Selaginella* sebanyak 8%
6. 14 *Artemia* diberi ekstrak *Selaginella* sebanyak 10%
7. 14 *Artemia* diberi ekstrak *Selaginella* sebanyak 12%.

8. 14 *Artemia* diberi ekstral *Selaginella* sebanyak 20 %

#### D. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak *Selaginella*

Jumlah ekstrak yang digunakan sebanyak 2 g + 2 g air aquades dengan total keseluruhan adalah 4 g di dalam 100 ml air. Pembuatan ekstrak perkonsentrasi dibuat sebanyak 4 kali karena dalam percobaan menggunakan 4 kali ulangan.

Konsentrasi 0 %

Konsentrasi 2 %  $\rightarrow$  0,1 cc (ekstrak) + 49,9 cc (air aquades) = 50 cc

Konsentrasi 4 %  $\rightarrow$  0,1 cc (ekstrak) + 24,9 cc (air aquades) = 25 cc

Konsentrasi 6 %  $\rightarrow$  0,1 cc (ekstrak) + 16,5 cc (air aquades) = 16,6 cc

Konsentrasi 8 %  $\rightarrow$  0,1 cc (ekstrak) + 12,4 cc (air aquades) = 12,5 cc

Konsentrasi 10 %  $\rightarrow$  0,1 cc (ekstrak) + 9,9 cc (air aquades) = 10 cc

Konsentrasi 12%  $\rightarrow$  0,1cc (ekstrak) + 8,2 cc (air aquades) = 8,3 cc

#### E. Cara Kerja

1. Persiapan Tanaman Paku *Selaginella* (*Selaginella willdenowii*)

Sampel paku *Selaginella* diambil di sekitar sungai yang berada di sekitar Taman Hutan Raya Wan Abdul Rachman. Bagian tumbuhan *Selaginella* yang akan digunakan sebagai bahan aktif adalah batang, daun, dan akar.

2. Pembuatan Ekstrak Tanaman *Selaginella willdenowii*

1. Batang, daun, dan akar *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) selama 24 jam kemudian disaring, langkah ini diulang sebanyak 3 kali untuk menghasilkan ekstrak *Selaginella*.
4. Ekstrak *Selaginella* digoyang dengan *shaker* selama 24 jam pada kecepatan rendah agar ekstrak homogen.
5. Ekstrak *Selaginella* kemudian diuapkan di dalam oven dengan suhu 40-50° C hingga menjadi pasta dan siap digunakan sebagai larutan stok pada penelitian.

### 3. Persiapan tempat penetasan *Artemia salina* Leach

Larva *Artemia* diperoleh dengan membeli telur *Artemia* kering yang telah dikemas dalam kemasan kaleng, yang kemudian akan ditetaskan untuk digunakan sebagai hewan uji. Pertama siapkan tempat untuk menetas *Artemia* dirancang menggunakan botol aqua berukuran 1,5 L, dibagi menjadi 2 bagian kemudian bagian atas botol dimasukkan ke dalam badan botol. Bagian tengah botol di lubangi dan diberi selang penghubung pada botol lainnya untuk tempat jalannya *Artemia* yang telah menetas.

### 4. Penetasan Hewan Uji *Artemia salina* Leach.

Penetasan hewan uji dilakukan dengan cara merendam kista dalam bentuk kering di dalam air laut yang diinkubasi dengan menggunakan sinar lampu

TL hingga menetas. Kista yang menetas disebut larva nauplius. Larva nauplius dipisahkan dalam wadah baru, larva yang dapat digunakan sebagai hewan uji adalah larva yang telah berumur 48 jam.

#### 5. Pelaksanaan uji Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Menurut Meyer *et al* (2010), Mc Laughlin dan Rogers (2011), serta Carballo *et al* (2005), metode yang digunakan untuk uji toksisitas adalah Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dengan larva *Artemia salina* Leach. Larva *Artemia salina* yang berumur 48 jam kemudian dipindahkan pada tempat yang berbeda dan siap digunakan sebagai hewan uji. Ekstrak *Selaginella* kemudian ditambah air laut sebanyak 5 tetes dan diaduk hingga larut merata. Ekstrak *Selaginella* yang telah larut dalam air laut disebut larutan sampel dengan masing-masing konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, dan 12%. Penentuan konsentrasi dilakukan dengan pengenceran larutan stok yang diencerkan menggunakan air laut dengan jumlah tertentu sehingga diperoleh masing-masing konsentrasi. Ulangan sebanyak 4 kali. Larva *Artemia* sebanyak 14 ekor dimasukkan ke dalam vial yang telah berisi larutan ekstrak sampel, Masing-masing vial kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar dibawah penerangan lampu TL 20 watt. Perhitungan dilakukan dengan menghitung jumlah larva *Artemia* yang mati disetiap vial pada jam ke-12 (efek akut) dan pada jam ke-24 (efek kronis) dari di setiap konsentrasi. Cara menghitung jumlah *Artemia* yang mati pada setia vial dihitung secara manual dengan mata telanjang di bawah penyinaran lampu TL agar terlihat *Artemia* yang telah mati.

## F. Parameter Penelitian

Parameter penelitian yang digunakan adalah angka mortalitas larva *Artemia*, angka mortalitas dihitung dengan  $LC_{50}$  dengan memasukkan nilai probit (50% kematian). Angka mortalitas larva dihitung dengan rumus berikut :

$$\text{Angka mortalitas Larva} = \frac{\text{akumulasi mati}}{\text{jumlah akumulasi hidup dan mati}} \times 100\%$$

Angka probit dicari dengan menggunakan persamaan garis  $Y = A + Bx$

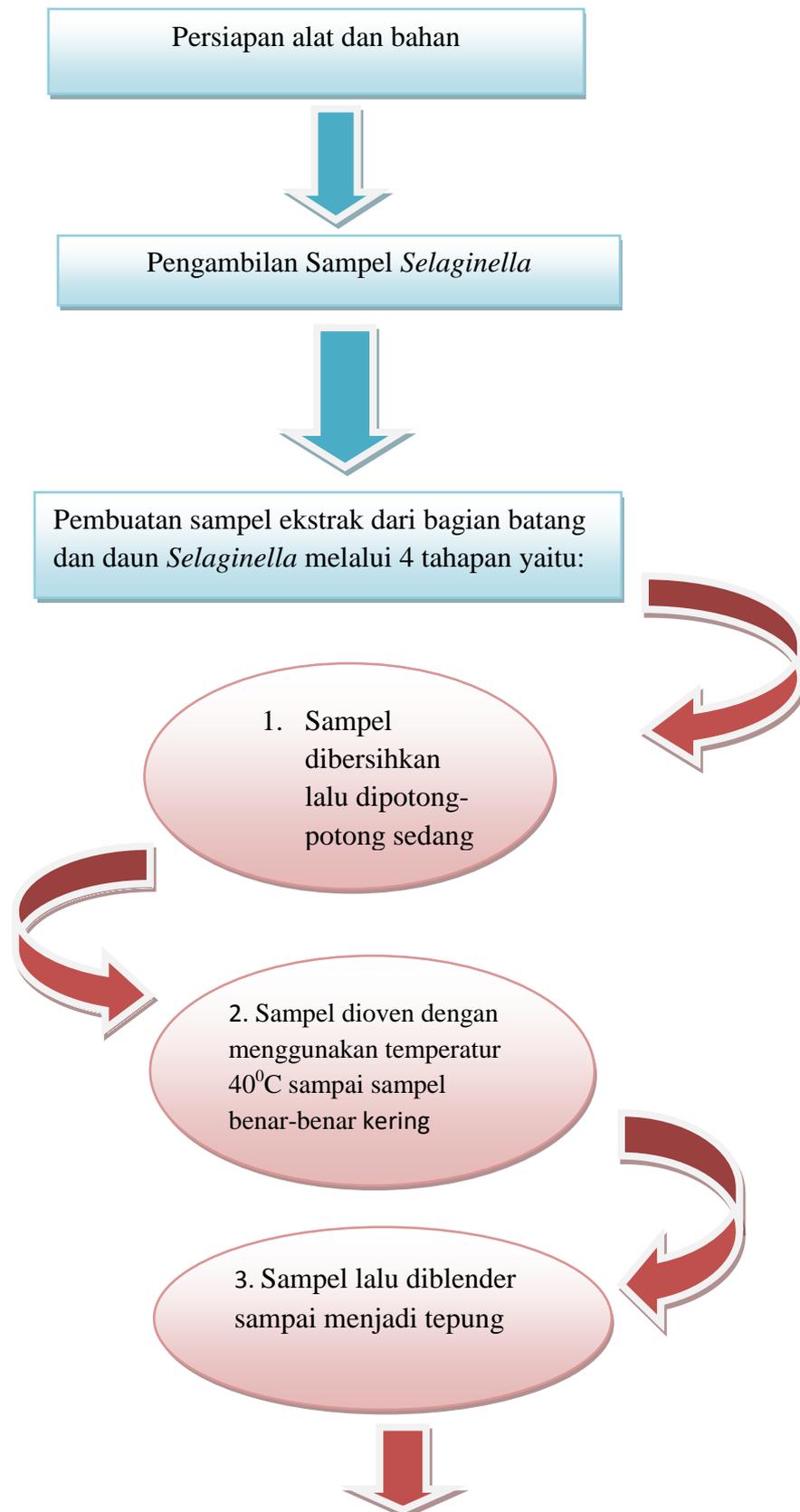
Keterangan Y= log konsentrasi  
X= Angka probit

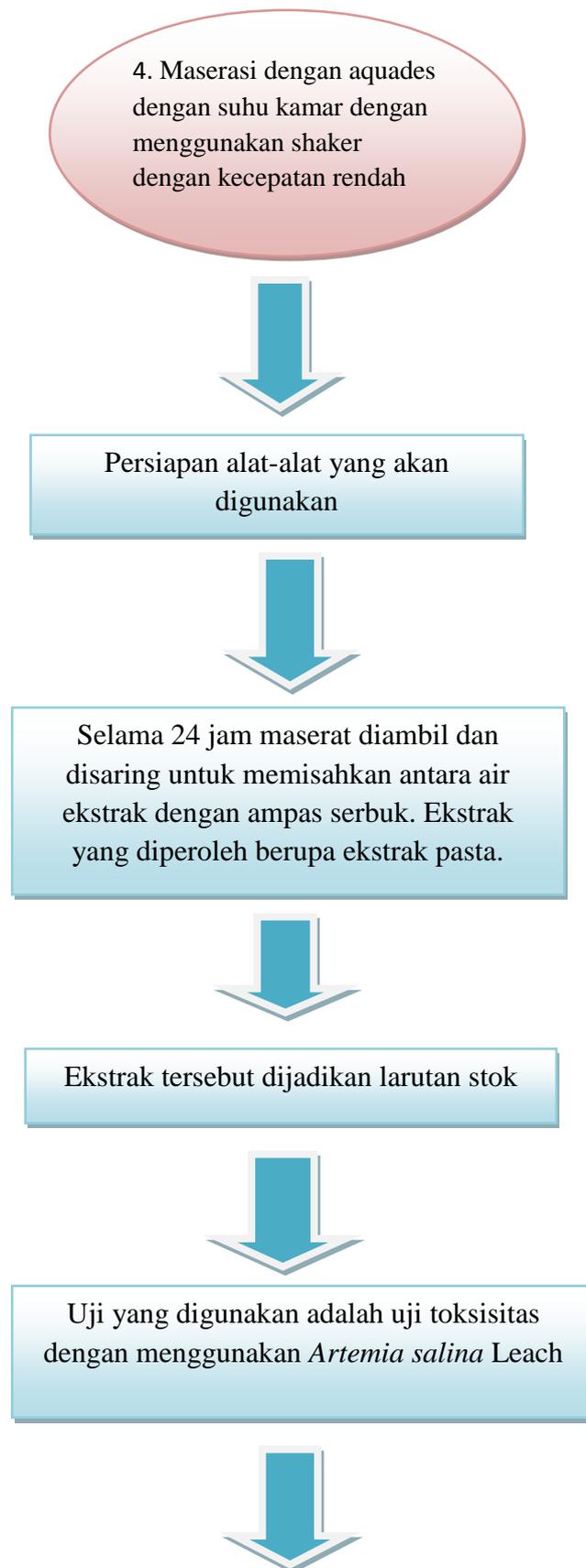
(Kanedi, Nurcahyani, Widiastuti, 2012)

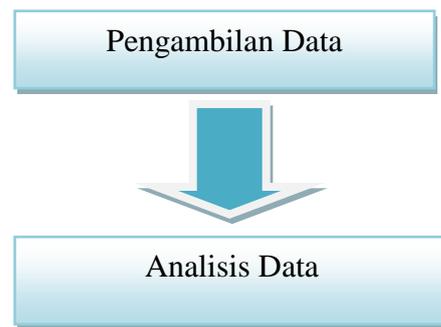
## G. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa data kematian *Artemia* yang dianalisis menggunakan varian satu arah (ANOVA) ( $\alpha = 0,05$ ) untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan.

## H. Diagram Alir







**Gambar 5. Diagram alir**