**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

* 1. **Rancangan Penelitian**

Penelitian ini bersifat deskriptif, untuk menggambarkan nilai LC50 pada ekstrak etanol bawang hitam. Sampel yang digunakan adalah bawang hitam. Data yang dikumpulkan berupa data kuantitatif dan kualitatif yang diambil dari hasil pengumpulan sampel, pembuatan ekstrak, karakterisasi simplisia, skrininig fitokimia, serta uji Sitotoksik dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

* + 1. **Variabel Penelitian**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi larutan uji ekstrak etanol bawang hitam. Variabel terikat pada penelitian ini meliputi kandungan kimia, karakteristik simplisisa dan sitotoksisitas.

* + 1. **Parameter Penelitian**

Parameter penelitian ini meliputi makroskopik, mikroskopik, kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut dalam asam, kadar sari larut dalam air, kadar sari larut dalam etanol serta metabolit sekunder senyawa alkaloid, flavanoid, tanin, saponin, glikosida, terpenoid/steroid dan nilai LC50**.**

* 1. **Jadwal dan Lokasi Penelitian** 
     1. **Jadwal Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan bulan Mei 2023.

* + 1. **Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al- Washliyah Medan.

* 1. **Bahan**

Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah bawang hitam *(Allium sativum* L.), telur *Artemia salina* Leach, garam tanpa iodium, etanol 96%, aquadest, pereaksi mayer, pereaksi bouchardat, preaksi dragendorf, pereaksi besi (III) klorida 1%, toluen, kloroform, asam klorida pekat, asam sulfat.

* 1. **Peralatan**

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah *magic jar,* wadah maserasi, rak dan tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, pipet ukur, batang pengaduk, hot plate, blender, ayakan, labu ukur, cawan penguap, kertas saring, kaca objek, mikroskop, timbangan analitik, vial, lemari pengering, *rotary evaporator* dan seperangkat alat pembiakan larva udang *Artemia salina* Leach yang terdiri dari wadah gelap, aerator dan lampu dengan intensitas cahaya rendah.

* 1. **Prosedur Penelitian dan Pemngumpulan Data**
     1. **Pengumpulan Sampel**

Pengumpulan sampel bawang hitam diambil dari bawang putih yang berasal dari Kota Tanjungbalai, Provinsi Sumatera Utara. Proses pengumpulan data bawang hitam dilakukan secara purposive samping, yaitu tanpa membandingkan dengan tumbuhan daerah lain.

* + 1. **Uji Determinasi**

Determinasi pada tumbuhan dilakukan di Herbarium Medanesse MEDA Universitas Sumatera Utara Medan.

* + 1. **Pembuatan Simplisia Bawang Hitam**

Bawang putih yang digunakan adalah bawang putih tunggal. Bawang tersebut dilakukan proses aging dengan temperatur 70° C menggunakan magic jar selama 25 hari. Selama proses *aging* tidak dilakukan penambahan bahan apapun. Bawang hitam yang dihasilkan lunak tidak berbau khas bawang yang menyengat dan rasanya manis dengan sedikit asam.

Sampel bawang hitam kemudian disortasi basah dengan tujuan untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan lainnya. Lalu dilakukan pencucian dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada sampel. Kemudian dilakukan perajangan dengan cara diiris tipis yang bertujuan untuk mempermudah saat proses pengeringan dan penggilingan. Selanjutnya dilakukan pengeringan dengan cara pengeringan buatan yaitu dimasukkan kedalam lemari pengering dengan suhu 40-50ͦ°C. Kemudian dilakukan sortasi kering, tujuan dari sortasi kering yaitu untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotoran lain yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering. Kemudian simplisia diserbukkan dengan menggunakan blender, diayak dan ditimbang. Serbuk simplisia yang diperoleh disimpan dalam wadah yang tertutup rapat (Depkes, RI, 1985)

* 1. **Pembuatan Karutan Pereaksi**
     1. **Larutan Pereaksi Bouchardat**

Larutkan 2 g iodium P dan 4 g kalium iodida P dalam air secukupnya hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Mayer**

Raksa (II) klorida sebanyak 1,35 g dilarutkan dengan 60 ml aquadest di dalam gelas ukur 100ml. Pada wadah lain larutkan 5 g kalium iodida dalam 10 ml aquadest. Kedua larutan dicampur dalam labu ukur 100 ml, lalu diencerkan dengan aquadest sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Dragendorff**

Sebanyak 20 ml larutan bismut nitrat 40% b/v dalam asam nitrat P dicampur dengan 50 ml larutan kalium iodida P 54,4% b/v, diamkan sampai memisah sempurna. Ambil larutan jernih dan encerkan dengan air secukupnya hingga 100 ml (Depkes RI, 1995)

* + 1. **Larutan Pereaksi Molish**

Sebanyak 3 g alfa-naftol dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N**

Larutan asam klorida P 7,293 % b/v (Depkes RI, 1995)

* + 1. **Larutan Pereaksi Liebermann-Bouchard**

Asam asetat anhidrida sebanyak 20 ml dipipet lalu dicampurkan dengan 1 ml asam sulfat pekat dalam gelas ukur (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 M**

Timbal (II) asetat sebanyak 15,17 g dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu dilarutkan dalam akuades bebas CO2 sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%**

Besi (III) klorida sebanyak 1 g dilarutkan dalam akuades dalam labu ukur 100 mL dan dicukupkan sampai garis tanda (Depkes RI, 1995)

* + 1. **Larutan Pereaksi Asam Nitrat 0,5 N**

Asam nitrat pekat sebanyak 44,3 ml dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu diencerkan dengan akuades sampai garis tanda (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Larutan Pereaksi Natrium Hidroksida 2 N**

Sebanyak 8 g kristal murni natrium hidroksida dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, lalu dilarutkan dalam akuades hingga volume 100 ml (Depkes RI, 1995)

* + 1. **Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2 N**

Asam sulfat pekat sebanyak 10,32 ml dipipet lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 ml lalu diencerkan dengan akuades sampai garis tanda (Depkes RI, 1995)

* 1. **Karakterisasi Simplisia**
     1. **Pemeriksaan Makroskopik**

Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan cara memperhatikan bentuk, ukuran, warna, rasa dan bau terhadap simplisia bawang hitam (*Allium sativum)* (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Pemeriksaan Mikroskopik**

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia bawang hitam dengan cara serbuk simplisia ditaburkan di atas objek glass ditetesi dengan aquadest sebanyak 1 tetes dan ditutup dengan deck glass, kemudian diamati di bawah mikroskop (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Penetapan Kadar Air**

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode Azeotropi. Alat terdiri dari labu alas bulat bulat 500 ml, alat penampung dan pendinginan, tabung penyambung dan penerima 10 ml.

1. Penjenuhan toluene

Sebanyak 200 ml toluen dan 2 ml aquadet dimasukkan ke dalam labu alas bulat, dipasang alat penampung dan pendingin, kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 ml.

1. Penetapan kadar air

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam labu yang berisi toluene jenuh, lalu dipanaskan selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes tiap detik. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendinginan dibilang dengan toluen. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,05 ml. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (v/b) (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Penetapan Kadar Sari Larut Air**

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia bawang hitam dimaserasi dengan 100 ml kloroforom P (2,5 mL kloroforom dalam 1000 mL aquadest) selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil sekali-sekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan. Disaring cepat, 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata (yang telah ditara) di atas penangas air hingga kering, sisa dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

* + 1. **Penetapan Kadar Sari Larut Etanol**

Ditimbang 5 g serbuk simplisia bawang hitam dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml etanol 96% dalam labu bersumbat sambil dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring, 20 ml filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara dan sisanya dipanaskan pada suhu 105° sampai bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Depkes RI, 1989).

* + 1. **Penetapan Kadar Abu Total**

Sebanyak 2 g serbuk simplisia bawang hitam ditimbang kemudian dimasukkan dalam krus porselen yang telah dipijarkan dan ditara. Krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pijaran dilakukan pada suhu 6000C selama 3 jam kemudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang dikeringkan di udara. Jika cara ini arang tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas, saring melalui kertas saring bebas abu. Dipijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama. Dimasukkan filtrat ke dalam krus, diuapkan.Dipijarkan hingga bobot tetap, ditimbang dan dihitung (Depkes RI, 1989).

* + 1. **Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam**

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, di didihkan dengan 25 ml asam klorida encer selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu yang telah diketahui beratnya, lalu sisa dipanaskan, kemudian didinginkan dan ditimbang sampai bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

* 1. **Pembuatan Ekstrak**

Pembuatan ekstrak bawang hitam dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia di masukkan kedalam bejana, kemudian dituangkan dengan 75 bagian etanol sebanyak 3750 ml dalam wadah tertutup rapat selama 5 hari terlindungi dari cahaya, sambil sering diaduk, lalu diperas sehingga didapat maserat I. Kemudian ampas yang diperoleh dibilas dengan 25 bagian etanol sebanyak 1250 ml, pindahkan kedalam bejana tertutup (maserat I dan maserat II) biarkan ditempat yang sejuk terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari, kemudian enap tuangkan atau disaring sehingga diperoleh hasil maserat, lalu dipekatkan dengan cara diuapkan pada rotary evaporator dengan suhu tidak lebih dari 500C hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1979).

* 1. **Skrinning Fitokimia**

Pembuatan ekstrak bawang hitam dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia di masukkan kedalam bejana, kemudian dituangkan dengan 75 bagian etanol sebanyak 3750 ml dalam wadah tertutup rapat selama 5 hari terlindungi dari cahaya, sambil sering diaduk, lalu diperas sehingga didapat maserat I. Kemudian ampas yang diperoleh dibilas dengan 25 bagian etanol sebanyak 1250 ml, pindahkan kedalam bejana tertutup (maserat I dan maserat II) biarkan ditempat yang sejuk terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari, 36 kemudian enap tuangkan atau disaring sehingga diperoleh hasil maserat, lalu dipekatkan dengan cara diuapkan pada rotary evaporator dengan suhu tidak lebih dari 50ºC hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1979).

* + 1. **Pemeriksaan Alkaloid**

Simplisia dan ekstrak bawang hitam ditimbang sebanyak 0,5 g, kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai untuk tes alkaloid sebagai berikut:

1. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.
2. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.
3. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Dragendorff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan sedikitnya 2 reaksi dari 3 percobaan di atas (Depkes RI, 1995).

* + 1. **Pemeriksaan Flavonoid**

Sebanyak 10 g serbuk simplisia dan ekstrak etanol bawang hitam ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 mL lalu ditambahakan 0,1 g serbuk Mg 37 dan 1 mL asam klorida pekat dan 2 mL amil alkohol lalu dikocok kemudian dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terbentuk warna merah, kuning, jingga pada lapisan alkohol (Depkes RI, 1995)

* + 1. **Pemeriksaan Tanin**

Sampel serbuk simplisia dan ekstrak etanol bawang hitam ditimbang sebanyak 0,5 g ditambah 10 mL aquades, dikocok dan disaring. Filtrat diencerkan dengan aquades sampai hampir tidak berwarna. Larutan diambil 2 mL ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Depkes, RI, 1995).

* + 1. **Pemeriksaan Saponin**

Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia dan ekstrak bawang hitam dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL aquades panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Penambahan 1 tetes larutan HCL 2 N, apabila busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Depkes, RI, 1995)

* + 1. **Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid**

Sampel serbuk simplisia dan ekstrak etanol bawang hitam ditimbang sebanyak 1 g kemudian dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Liebermann-Burchard). Terbentuknya warna ungu sampai merah ungu menunjukkan adanya triterpenoida dan terbentuknya warna biru hijau menunjukkan adanya steroid (Depkes, RI, 1995).

* + 1. **Pemeriksaan Glikosida**

Simplisia dan ekstrak bawang hitam masing-masing ditimbang sebanyak 3 gram, kemudian disari dengan 30 mL campuran 7 bagian etanol 96% dan 3 bagian aqua des ditambah dengan 10 mL HCl 2 N. Direfluks selama 30 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 mL filtrat ditambahkan 25 ml aquades dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok, lalu didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari dengan 20 mL campuran 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol dilakukan berulang sebanyak tiga kali. Kumpulan sari air diuapkan pada temperatur tidak lebih dari 500C. Sisanya dilarutkan dalam 2 mL metanol. Kemudian diambil 0,1 mL larutan percobaan dimasukkan kedalam tabung reaksi, diuapkan di penangas air. Pada sisa ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes pereaksi molish. Kemudian secara perlahan ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung, jika terbentuk cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida (Depkes, RI, 1995).

* 1. **Uji Sitotoksisitas Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**
     1. **Pembuatan Air Laut Buatan**

Air laut buatan dibuat dengan cara melarutkan 38 gram garam tanpa iodium dalam 1 liter air, lalu diaduk sampai homogen. Kemudian disaring dengan kertas Whatman (Djamil dan Tria, 2009).

* + 1. **Penetasan Larva *Artemia salina* Leach**

Penetasan telur dilakukan dalam wadah yang berisi media air laut buatan. Wadah yang digunakan dibagi menjadi dua bagian oleh sekat berlubang, yaitu bagian gelap dan bagian terang. Sekat berlubang menjadi jalan untuk larva yang telah menetas untuk bergerak secara alamiah ke arah terang. Kemudian pada bagian gelap dimasukkan satu sendok teh telur. Pada wadah bagian gelap ditutup dengan alumunium foil atau lakban hitam. Pada wadah bagian terang diberi penerangan dengan cahaya lampu agar suhu penetasan 25-300C tetap terjaga. Telur udang dibiarkan terendam selama 48 jam sampai telur menetas. Telur akan menetas dalam waktu 24-36 jam dan akan bergerak secara alamiah menuju daerah terang sehingga larva udang terpisahkan dari bagian telur atau kulit telur. Larva yang telah aktif bergerak siap digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian (Fadli et al, 2019).

* + 1. **Uji Sitotoksisitas Ekstrak Bawang Hitam**

Ekstrak etanol bawang hitam dibuat larutan induk nya 2000 ppm dengan menimbang 0,2 g ekstrak lalu dilarutkan dengan 100 mL air laut buatan. Kemudian diencerkan menjadi 10 konsetrasi untuk terlebih dahulu digunakan sebagai orientasi, yaitu konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/mL, dan 1 vial digunakan untuk kontrol negatif, masing-masing dengan tiga kali pengulangan. Vial disiapkan untuk tiap-tiap tingkat konsentrasi, masing-masing disediakan 3 vial dan replikasi sebanyak 3 kali. Vial diisi dengan sampel yang telah dilarutkan dengan air laut buatan sebanyak 10 mL. Sebanyak 10 ekor larva Artemia dimasukkan ke dalam masing-masing vial yang telah berisi senyawa uji. Kontrol negatif (blanko) diberi perlakuan yang sama seperti larutan uji tetapi tidak ditambahkan dengan ekstrak. Jumlah larva udang yang mati dalam tiap vial dihitung selama 24 jam. Tingkat toksisitas ditentukan dengan menghitung jumlah larva yang mati. Kriteria standar untuk menilai kematian larva udang adalah bila larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik (Supriningrum et al., 2016).

* 1. **Analisis Data**

Pengaruh ekstrak etanol terhadap larva *Artemia salina* Leach dilakukan dengan perhitungan analisis probit. Perhitungan dilakukan dengan membandingkan antara larva mati terhadap jumlah keseluruhan, sehingga diperoleh persen kematian dilihat dalam nilai tabel probit. Dari data tersebut akan diketahui nilai probit dimasukkan kedalam persamaan regresi, sehingga dapat nilai LC50.

Persamaan Regresi:

y = ax + b

Keterangan : x = Log Konsentrasi

a = Slope (kemiringan dari garis regresi linear)

y = Nilai Probit

b = Intercept (garis potong)

Data hasil penelitian uji toksisitas diolah dan ditampilkan dalam bentuk tabel dan kurva. Data dari uji toksisitas tersebut dianalisis dengan analisis tabel probit serta menggunakan Microsoft Office Excel untuk mencari regresi linier dengan hubungan antara nilai probit dengan log konsentrasi. Nilai LC50 dapat dihitung dengan memasukkan nilai 5 (probit 50% kematian hewan uji) sebagai y sehingga dihasilkan x sebagai nilai log konsentrasi. Antilog nilai x tersebut merupakan nilai LC50 (Fadli et al, 2019).