

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Objek dan Lokasi Penelitian**

Objek atau bahan penelitian adalah limbah penyulingan minyak akar wangi (*Vetiveria zizanoides*) yang diperoleh dari PT. Pulus Wangi Nusantara yang berlokasi di Kampung Legok Pulus Desa Sukakarya Kecamatan Samarang Kabupaten Garut Jawa Barat.

Adapun lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Riset dan Laboratorium Kimia Analitik Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI serta di Laboratorium Parasitologi Loka Litbang P2B2 (Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang) Ciamis Jawa Barat.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

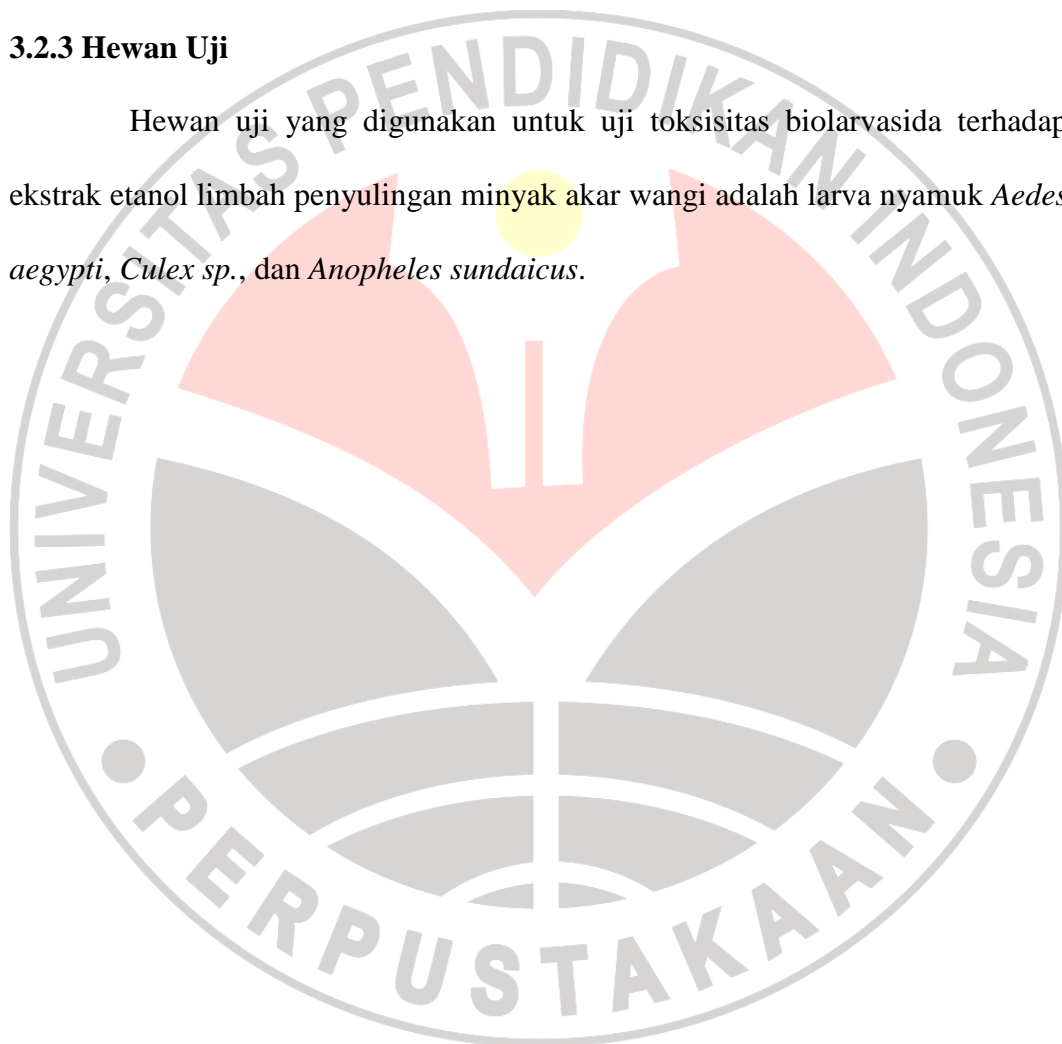
Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi (1) peralatan yang digunakan untuk mengekstraksi komponen aktif limbah penyulingan minyak akar wangi, yaitu set alat maserasi, pompa vacum, corong Buchner, *Vacum Rotary evaporator*, neraca analitik, mikropipet, dan peralatan gelas laboratorium lainnya; (2) alat untuk keperluan identifikasi komponen aktif pada ekstrak etanol limbah penyulingan minyak akar wangi, yaitu GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*); dan (3) peralatan untuk keperluan uji toksisitas biolarvasida.

### 3.2.2 Bahan

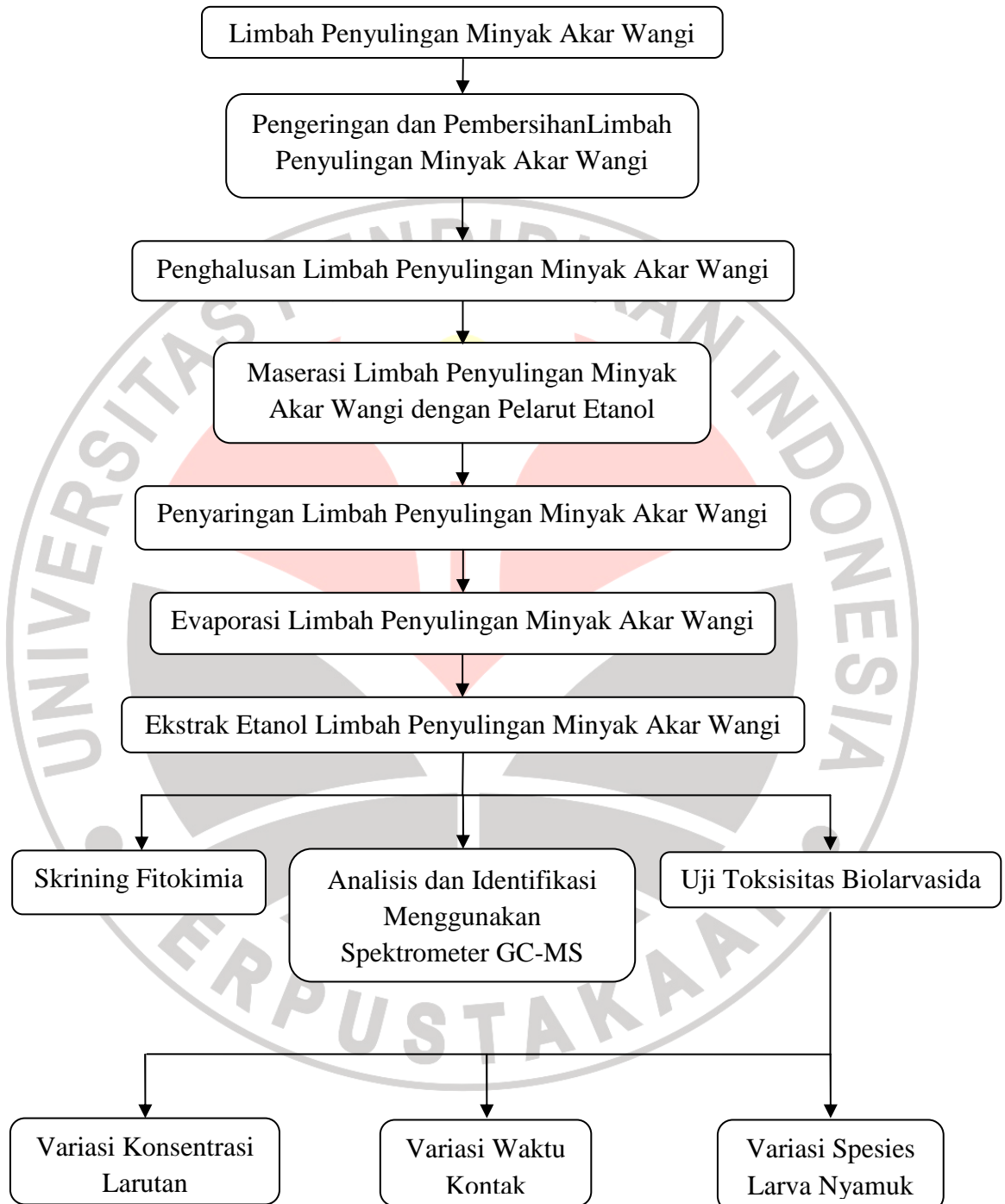
Bahan-bahan yang diperlukan untuk proses ekstraksi adalah etanol, aquades, dan kertas saring *Whatman*. Sedangkan untuk uji toksisitas biolarvasida adalah aquades, etanol, dan kain kassa.

### 3.2.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan untuk uji toksisitas biolarvasida terhadap ekstrak etanol limbah penyulingan minyak akar wangi adalah larva nyamuk *Aedes aegypti*, *Culex sp.*, dan *Anopheles sundaicus*.



### 3.3 Bagan Alir Penelitian



### **3.4. Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Penyiapan Sampel**

Sampel yang berupa limbah hasil penyulingan minyak akar wangi (*Vetiveria zizanoides*) yang masih basah karena mengandung air, terlebih dahulu dikeringkan di bawah sinar matahari. Kemudian dibersihkan dari debu, tanah atau bagian lain yang tidak diperlukan serta dicuci dan dikeringkan beberapa kali sampai benar-benar terbebas dari kotoran. Setelah itu, limbah tersebut dipotong-potong dan kemudian dihaluskan hingga diperoleh sampel yang berbentuk serbuk.

#### **3.4.2 Ekstraksi Limbah Penyulingan Minyak Akar Wangi**

Limbah penyulingan minyak akar wangi kering dan berukuran 40-60 mesh ditimbang sebanyak 800 gram, lalu dimasukkan ke dalam set alat maserasi dan ditambahkan pelarut etanol sampai semuanya terendam ( $\pm 6$  liter). Selanjutnya dimaserasi selama 24 jam pada suhu kamar dan diulang sebanyak 3 kali maserasi. Filtrat yang dihasilkan ditampung dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak sampel yang berupa ekstrak etanol limbah penyulingan minyak akar wangi (Pambayun, 2007).

#### **3.4.3 Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Limbah Penyulingan Minyak Akar Wangi (Indah, 2006 dan Harborne, 1987)**

##### **1. Tes untuk Alkaloid**

Ekstrak etanol limbah penyulingan minyak akar wangi sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam 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  $\text{HgCl}_2$  sampai larut. Terbentuknya endapan putih mengindikasikan adanya alkaloid.

## 2. Tes untuk Saponin

Ekstrak etanol limbah penyulingan minyak akar wangi sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan air dan dikocok dengan kuat selama 10 menit. Jika berbuih, menandakan adanya saponin.

## 3. Tes untuk Tanin

Beberapa tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  5% ditambahkan ke dalam 1 mL larutan ekstrak. Perubahan warna menjadi biru tua menunjukkan keberadaan tanin.

## 4. Tes untuk Terpenoid atau Steroid

Ekstak etanol limbah penyulingan minyak akar wangi diambil sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan dengan 1 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial dan 1 mL larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Jika warna berubah menjadi biru atau ungu, menandakan adanya kelompok senyawa steroid. Jika warna berubah menjadi merah, menunjukkan adanya kelompok senyawa terpenoid.

## 5. Tes untuk Flavonoid

Ekstrak etanol limbah penyulingan minyak akar wangi sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan serbuk Mg sebanyak satu gram dan larutan HCl pekat. Perubahan warna larutan menjadi warna kuning menandakan adanya flavonoid.

#### **3.4.4 Analisis dan Identifikasi Komponen Ekstrak Etanol Limbah Penyulingan Minyak Akar Wangi**

Ekstrak etanol limbah penyulingan minyak akar wangi dianalisis dan diidentifikasi kandungan senyawanya dengan menggunakan alat spektrometer GC-MS.

#### **3.4.5 Uji Toksisitas Biolarvasida Ekstrak Etanol Limbah Penyulingan Minyak Akar Wangi**

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui aktivitas biologi ekstrak etanol limbah penyulingan minyak akar wangi terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*, *Culex sp.*, dan *Anopheles sundaicus*. Media larva nyamuk *Aedes aegypti*, *Culex sp.*, dan *Anopheles sundaicus* dibuat dengan mengisi masing-masing kontainer dengan air. Telur dari nyamuk-nyamuk tersebut disimpan pada tempat yang terendam air sampai telur dari larva tersebut menetas hingga mencapai tahap instar III atau IV dan siap digunakan dalam pengujian. Enam kontainer plastik disiapkan untuk pengujian, dimana lima kontainer digunakan untuk sampel dan satu kontainer sebagai kontrol. Sampel dibuat dengan berbagai variasi konsentrasi, yaitu 500, 1000, 2000, 3000, dan 4000 ppm. Ditimbang ekstrak etanol limbah penyulingan minyak akar wangi pekat sebanyak 0,1 g untuk konsentrasi 500 ppm; 0,2 g untuk konsentrasi 1000 ppm; 0,4 g untuk konsentrasi 2000 ppm; 0,6 g untuk konsentrasi 3000 ppm; dan 0,8 g untuk konsentrasi 4000 ppm. Kemudian dilarutkan dalam 2 mL etanol, lalu ditambahkan dengan air sampai volume 200 mL. Masing-masing larutan tersebut dimasukkan ke dalam kontainer plastik yang berbeda. Setelah itu dimasukkan 25 ekor larva uji. Hal ini dilakukan sebanyak 3

kali pengulangan untuk masing-masing larva uji, yaitu *Aedes aegypti*, *Culex sp.*, dan *Anopheles sundaicus*.

Sebagai kontrol, ke dalam kontainer plastik dimasukkan 2 mL etanol lalu ditambahkan air sampai volume 200 mL. Kemudian 25 ekor larva uji dimasukkan ke dalam larutan tersebut. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan untuk masing-masing larva uji, yaitu *Aedes aegypti*, *Culex sp.*, dan *Anopheles sundaicus*. Sebagai pembanding, dibuat juga kontrol dengan tanpa penambahan etanol (hanya air saja). Pengamatan dilakukan sampai 24 jam setelah perlakuan terhadap kematian larva nyamuk. Untuk variasi waktu kontak, dilakukan pengamatan dengan waktu berkala selama 6 jam pertama selang satu jam. Setelah diperoleh data, maka dilakukan analisis probit dilakukan untuk mencari konsentrasi kematian (LC, *Lethal Concentration*) dan waktu kematian (LT, *Lethal Time*) (Suirta, dkk., 2007).