

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan konsentrasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) sebagai perlakuan yaitu 0,1%, 0,3%, 0,5%, 0,7% dan 1% serta aquades sebagai kontrol (0%) dengan pengulangan sebanyak 4 kali.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung, sedangkan pembuatan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung pada bulan November 2015.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah telur *A. aegypti* yang diperoleh dari Loka Penelitian dan Pengembangan (Litbang)

Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (P2B2) Ciamis, Jawa Barat, telur didapatkan dalam bentuk kering dengan menggunakan kertas saring.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan berdasarkan standarisasi WHO (2005b) mengenai larvasida yaitu untuk setiap perlakuan dipakai jumlah sampel 25 telur dengan pengulangan 4 kali sehingga didapatkan jumlah total sampel 600 telur yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah Sampel (WHO, 2005b)

| Kelompok perlakuan | Jumlah telur x jumlah pengulangan | Total |
|--------------------|--|-----------|
| Kelompok 1 : 0% | 25 telur x 4 | 100 telur |
| Kelompok 2 : 0,1% | 25 telur x 4 | 100 telur |
| Kelompok 3 : 0,3% | 25 telur x 4 | 100 telur |
| Kelompok 4 : 0,5% | 25 telur x 4 | 100 telur |
| Kelompok 5 : 0,7% | 25 telur x 4 | 100 telur |
| Kelompok 6 : 1% | 25 telur x 4 | 100 telur |
| | Jumlah telur yang dipakai dalam penelitian | 600 telur |

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Alat preparasi bahan uji.
 - Kaca pembesar untuk memisahkan telur dalam jumlah yang telah ditentukan.
 - *Hand counter* untuk menghitung jumlah telur.

b. Alat untuk pembuatan larutan uji.

- Timbangan untuk menimbang daun sirsak yang diperlukan.
- Blender untuk menghaluskan daun sirsak yang sudah kering.
- Stoples dan kain kasa untuk proses maserasi daun sirsak.
- *Rotary evaporator* untuk membuat ekstrak daun sirsak.
- Pipet tetes untuk mengambil ekstrak daun sirsak.
- Gelas ukur dan botol tertutup sebagai tempat untuk ekstrak daun sirsak.
- Gelas ukur 100 ml untuk mengukur ekstrak daun sirsak .

c. Alat untuk uji efektivitas.

- Gelas ukur 250 ml untuk mengukur jumlah air yang dibutuhkan.
- Gelas plastik ukuran 250 ml untuk tempat perlakuan telur.
- Batang pengaduk.
- Thermometer untuk menghitung suhu media.
- Ph stick untuk mengukur pH media.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah

- Daun sirsak (*Annona muricata* L) sebanyak 5 kg.
- 6 Liter Ethanol 96% sebagai pelarut saat pembuatan *stock* ekstrak.
- Aquades sebagai pengencer *stock* ekstrak untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan.
- Telur *A. aegypti* dari strain Liverpool F-48.

3.5 Prosedur Penelitian

Penelitian dibagi menjadi 2 tahap:

3.5.1 Tahap Persiapan

a. Preparasi Bahan Uji

Telur nyamuk *A. aegypti* yang dipakai pada penelitian adalah telur nyamuk *A. aegypti* F-48 strain Liverpool yang diperoleh dari ruang insektarium Loka Penelitian dan Pengembangan (Litbang) Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (P2B2) Ciamis, Pangandaran, Jawa Barat. Sedangkan daun sirsak diambil dari lingkungan sekitar peneliti.

b. Pembuatan Ekstrak Daun sirsak (*Annona muricata* L).

Pembuatan ekstrak menggunakan daun sirsak sebanyak 5 kg, lalu dibersihkan dengan air, kemudian dicacah halus atau diiris halus. Setelah diiris halus potongan daun sirsak dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 3x24 jam. Setelah kering, potongan daun sirsak ditimbang dan dihaluskan, selanjutnya simplisia daun sirsak dimaserasi selama 3x24 jam menggunakan larutan etanol 96% sebanyak 6 L, kemudian disaring dan dipatkan pada suhu 40⁰C-50⁰C dalam *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak pekat daun sirsak konsentrasi 100%.

c. Pembuatan Dosis Ekstrak Daun sirsak (*Annona muricata* L).

Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan rumus:

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

Keterangan :

V_1 = volume larutan yang akan diencerkan (ml).

M_1 = konsentrasi ekstrak daun sirsak yang tersedia (%).

V_2 = volume larutan (air + ekstrak) yang diinginkan (ml).

M_2 = konsentrasi ekstrak daun sirsak yang dibuat (%).

Jumlah volume ekstrak daun sirsak disajikan pada Tabel 3

Tabel 3. Volume Ekstrak Daun sirsak yang Dibutuhkan.

| M_1 | V_2 | M_2 | $V_1 = \frac{V_2 M_2}{M_1}$ | Jumlah aquades | Pengulangan ($V_1 \times 4$) |
|-------|--------|-------|-----------------------------|----------------|--------------------------------|
| 100 % | 200 ml | 1 % | 2 ml | 198 ml | 8 ml |
| 100 % | 200 ml | 0,7 % | 1,4 ml | 198,6 ml | 5,6 ml |
| 100 % | 200 ml | 0,5 % | 1 ml | 199,5 ml | 4 ml |
| 100% | 200 ml | 0,3 % | 0,6 ml | 199,4 ml | 2,4 ml |
| 100 % | 200 ml | 0,1 % | 0,2 ml | 199,8 ml | 0,8 ml |
| | | | | Total | 20,8 ml |

3.5.2 Tahap Penelitian

Untuk menilai dosis efektif ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) sebagai ovisida telur *A. aegypti* dilakukan dengan menilai daya tetas telur dengan menggunakan konsentrasi yaitu 0,1%, 0,3%, 0,5%, 0,7%, 1%, dan 0% sebagai kontrol negatif. Kemudian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) dimasukkan ke dalam gelas plastik dan dicampur dengan aquades (Tabel 3) sehingga jumlah volume aquades dan ekstrak adalah 200 ml dan diberikan aquades pada gelas yang sudah berisi telur sebagai kontrol negatif. Setiap perlakuan berisi 25 butir telur dengan pengulangan sebanyak 4 kali. Kemudian dilakukan pengamatan setiap 24 jam sekali sampai hari ke-3 (72 jam).

3.6 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.6.1 Identifikasi Variabel

a. Variabel Bebas

Berbagai konsentrasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) dengan 6 konsentrasi yaitu 0%, 0,1%, 0,3%, 0,5 %, 0,7% dan 1%.

b. Variabel Terikat

Banyaknya telur *A. aegypti* yang tidak menetas

3.6.2 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional (Tabel 4).

Tabel 4. Definisi Operasional Variabel Penelitian.

| Variabel | Definisi Operasional | Cara Ukur | Alat Ukur | Hasil Ukur | Skala ukur |
|--|--|--|---|---|------------|
| Variabel bebas: Berbagai konsentrasi ekstrak daun sirsak (<i>Annona muricata</i> L) | Ekstrak daun sirsak didapatkan dengan proses maserasi dengan menggunakan etanol 96 % serta dinyatakan dalam persen (%). Masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran. Pada penelitian ini dipakai konsentrasi 0,1%;0,3%;0,5%;0,7 %;1%. | Menimbang ekstrak dan menghitung dengan rumus $M_1 V_1 = M_2 V_2$ | <i>Analytical balance</i> , Gelas ukur, pipet tetes | Didapatkan konsentrasi ekstrak daun sirsak (0,1%;0,3%;0,5%;0,7%;1%) | ordinal |
| Variabel terikat: Telur <i>Aedes aegypti</i> yang tidak menetas | Telur yang tidak menetas menjadi larva setelah diletakkan di dalam media air. | Melihat, mengecek dan mencatat jumlah telur yang tidak menetas pada tiap pengulangan setiap 24 jam sekali pukul 10.00 WIB selama 3 hari pengamatan | <i>Hand counter</i> | Telur <i>Aedes aegypti</i> yang tidak menetas (0-25 telur) | Rasio |

Parameter efektivitas pada penelitian ini adalah berdasarkan penelusuran pustaka, karena belum ditemukan standar efektivitas ovisida. Oleh karena itu, parameter efektivitas hanya diinterpretasikan berdasarkan uji statistik yang dilakukan, suatu larutan dikatakan efektif jika memiliki perbedaan yang bermakna dengan kontrol (konsentrasi 0%) sebagai pembandingnya yaitu $p < 0,05$.

3.7 Analisis Data

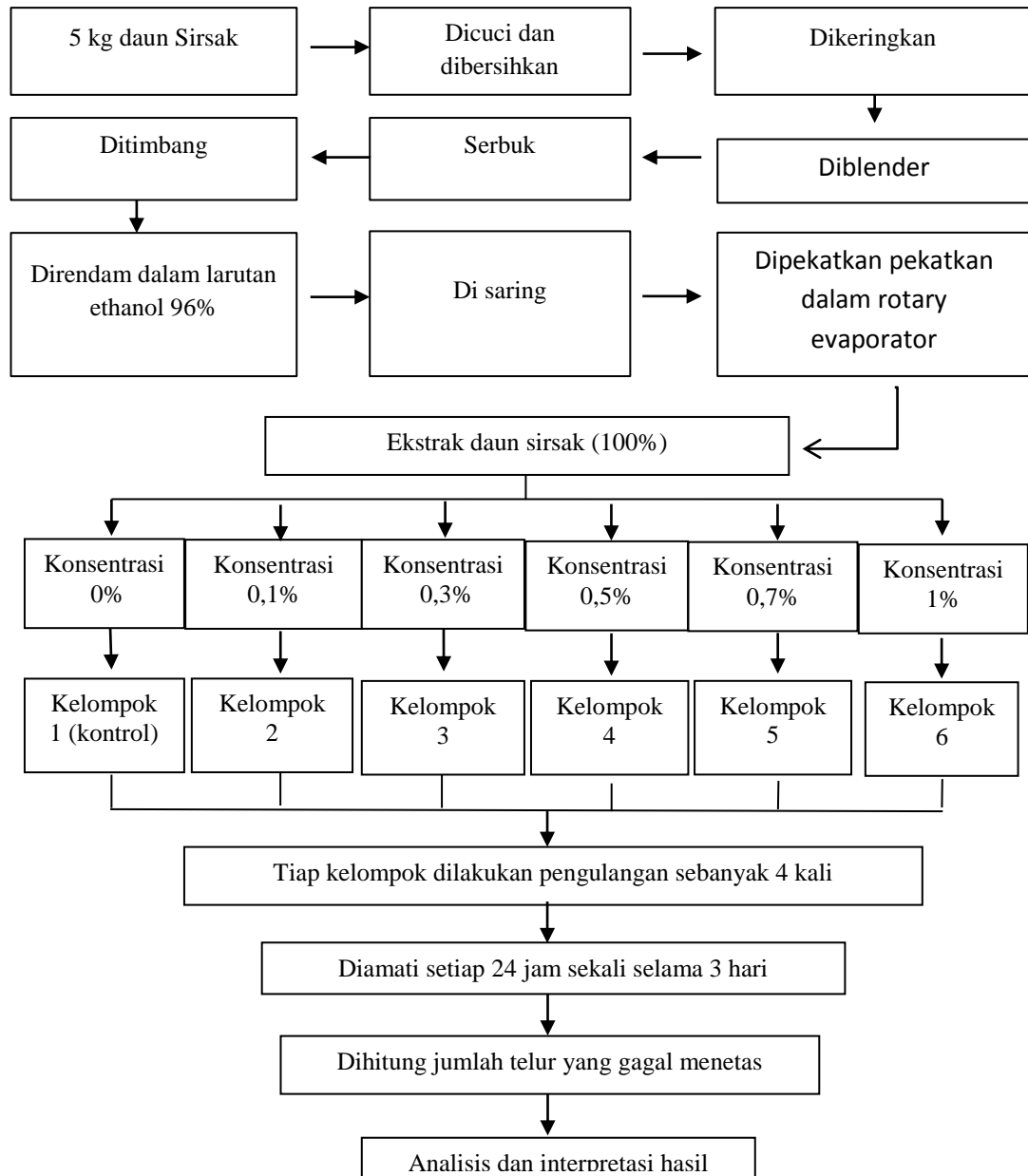
Data yang telah didapat dari hasil pengamatan akan diolah dengan menggunakan *software* statistik. Data dari hasil penelitian akan dianalisis secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk*, karena jumlah data yang dimasukkan kurang dari lima puluh. Setelah dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk*, didapatkan hasil berupa data yang berdistribusi tidak normal. Karena data berdistribusi tidak normal maka dilanjutkan dengan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*. Setelah dilakukan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* didapatkan hasil berupa nilai $p < \alpha$ ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan analisis *post hoc* pada taraf kepercayaan 0,05 (Dahlan, 2011). Pada penelitian ini juga dilakukan analisis probit untuk mengetahui kematian 50% (ED_{50}) dan 99% (ED_{99}) dari jumlah sampel.

3.8 Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan keterangan lolos kaji etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tanggal 11 Desember 2015 melalui surat nomor 2698/UN26/8/DT/2015 (Lampiran 1).

3.9 Alur Penelitian

Untuk memperjelas proses penelitian, maka disajikan diagram alur penelitian sebagai berikut:



Gambar 13. Diagram alir efektivitas ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) sebagai ovisida *Aedes aegypti*.