

## **III. MATERI DAN METODE**

### **3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya pada bulan Maret 2023.

### **3.2. Materi Penelitian**

#### **3.2.1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas plastik, pipet, *stopwatch*, gelas ukur, kertas pH, pH meter, alat penguji kematian larva (lidi atau jarum), batang pengaduk, penyaring, alat tulis, dan kertas tabel.

#### **3.2.2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu : ekstrak biji pepaya (*Carica papaya L*) dan ekstrak biji sirsak (*Annona muricata L*), larva nyamuk *Aedes aegypti* sebanyak 250 ekor, temephos (abate® 1 gr) dan aquades

#### **3.2.3. Sampel Penelitian**

Sampel larva nyamuk *Aedes aegypti* yang digunakan diperoleh dari Badan Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI), jalan Ketintang baru No. 17/14 Surabaya. Larva yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva instar atau stadium III – IV. Pemilihan larva atau Instar III-IV ini didasarkan pada ukuran tubuh larva stadium III-IV lebih besar dari ukuran tubuh larva I dan II sehingga lebih mudah diamati. Larva instar III-IV juga memiliki struktur anatomi yang lengkap dan jelas serta memiliki ketahanan fisik yang

stabil dari pengaruh luar. Maka dapat diasumsikan bahwa dosis yang mampu membunuh larva stadium III-IV juga dapat membunuh larva stadium I dan II (Siregar, 2020).

### 3.3. Metode Penelitian

#### 3.3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pada percobaan ini menggunakan perlakuan tunggal dengan tiga konsentrasi yaitu : 2%; 4%, dan 6% campuran ekstrak biji pepaya (*Carica papaya L*) dan biji sirsak (*Annona muricata L*), serta dua kontrol yaitu kontrol negatif menggunakan *aquadest* dan kontrol positif menggunakan abate®. Ulangan didapatkan menggunakan rumus federer,

$$t(n-1) \geq 15$$

Dimana t = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan

dengan t = 5 perlakuan maka,

$$t (n-1) \geq 15$$

$$5 (n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n = \frac{20}{5}$$

$$n = 4$$

Jumlah ulangan menurut rumus diatas adalah 4 ulangan.

### 3.3.2. Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel bebas : Konsentrasi campuran ekstrak biji sirsak (*Carica papaya L*) dan biji pepaya (*Annona muricata L*)
2. Variabel terikat : mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti*
3. Variabel kontrol : kepadatan larva, suhu, pH

### 3.4. Prosedur Penelitian

#### 3.4.1. Pembuatan Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*)

Pembuatan Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*) yang digunakan dalam penelitian adalah ekstrak yang dibuat di Laboratorium Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Metode yang digunakan dalam pembuatan adalah metode ekstraksi dengan etanol 96%. Prosedur pembuatan ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*) adalah sebagai berikut :

Biji sirsak dan biji pepaya yang akan digunakan dalam penelitian sebanyak 2 kg, dicuci bersih dan diangin-anginkan selama 3 hari sampai benar-benar kering, setelah kering biji pepaya dan biji sirsak diblender sampai menjadi serbuk kemudian dimasukkan pada toples kering yang berbeda dan disimpan pada suhu ruangan. Pembuatan ekstrak etanol biji pepaya dan biji sirsak dilakukan dengan cara maserasi dengan menimbang

250 gram serbuk kering dari biji pepaya dan biji sirsak dan ditempatkan pada toples yang berbeda. Masing-masing toples ditambahkan etanol 96%. Campuran etanol biji pepaya dan biji sirsak disimpan didalam toples dan ditutup dengan rapat, kemudian didiamkan selama 3 hari dan dilakukan pengadukan setiap hari. Kemudian larutan tersebut disaring menggunakan kertas saring. Sisa ampas dari biji pepaya dan biji sirsak dimaserasi lagi agar kandungan dalam biji pepaya dan biji sirsak keluar semua dan terekstrak dengan baik. Kemudian filtrak dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 50<sup>0</sup>C (Bhelo, 2021).

Setelah itu ekstrak biji pepaya dan biji sirsak yang sudah diesktrak diambil masing-masing 50% kemudian dicampurkan menjadi satu sehingga total ekstrak menjadi 90 ml. Setelah kedua ekstrak tercampur, campuran ekstrak dibagi pada setiap perlakuan dengan konsentrasi 2%, 4%, dan 6%.

#### **3.4.2. Skrining Fitokimia**

Dilakukan skrining fitokimia terhadap simplisia dan ekstrak untuk mengetahui kandungan senyawa didalamnya (Syarifah dkk., 2015). Prinsip yang dilakukan dalam skrining dan simplisia berdasarkan komposisi kandungan seyawa kimia target yang diamati atau yang di analisa dalam tumbuhan (media) tersebut (Khumaisah dkk., 2010).

a. Tes Untuk Alkaloid

Ditimbang 4 mg sampel padat dilarutkan menggunakan 3 mL methanol dan 5 mL amonia pada pH sekitar 8–9, kemudian hasil pencampuran tersebut disaring. Selanjutnya 2 mL larutan HCl 2M ditambahkan pada filtrat dan dikocok. Hasil yang didapatkan dimasukkan dalam 4 tabung reaksi masing-masing 5 tetes. Tabung 1 berisi larutan blanko, sedangkan tabung 2, 3, dan 4 akan dicampur dengan 1 tetes pereaksi Mayer, Wagner, Dragendorff pada setiap tabung. Hasil positif pada pengujian ini ditunjukkan dengan masing-masing larutan terdapat endapan putih, coklat atau jingga (Oktavia dkk., 2021).

b. Tes Untuk Flavonoid

Sejumlah 1 mg ekstrak etanol padat ditempatkan pada plat tetes, lalu dimasukkan 10 tetes metanol, diaduk menggunakan spatula sampai larut. Selanjutnya ditambahkan 6 potongan pita Mg dan HCl pekat 4 tetes ke dalam campuran. Timbulnya warna kuning, biru, jingga maupun merah menunjukkan hasil positif (Oktavia dkk., 2021).

c. Tes Untuk Fenolik

Sejumlah 1 mg sampel padat diletakkan dalam plat tetes, kemudian menambahkan 10 tetes metanol, lalu diaduk menggunakan spatula sampai larut. Selanjutnya ditambahkan 6 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  5%. Warna biru, hijau, ungu, atau kemerahan

kemerahan menandakan hasil positif pada pengujian (Oktavia dkk., 2021).

d. Tes Untuk Saponin

Sebanyak 1 mg ekstrak etanol padat diletakkan pada tabung reaksi, lalu menambahkan 5 mL aquades dan digoyang selama 1 menit. Jika terbentuk buih, ditambahkan 4 tetes larutan HCl 1M. Jika tidak ada buih, dilanjutkan pemanasan  $\pm 3$  menit. Kemudian dibiarkan dingin lalu dikocok kuat-kuat. Terbentuknya buih stabil dalam waktu  $\pm 10$  menit menandakan terdapat senyawa saponin dalam sampel (Oktavia dkk., 2021).

e. Tes Untuk Tanin

Sebanyak 1 mg sampel padat dilarutkan dalam etanol, kemudian ekstrak dididihkan dengan air dalam penangas air, selanjutnya dilakukan penyaringan. Menambahkan 3 tetes  $\text{FeCl}_3$  1% ke dalam filtrat yang diperoleh. Hasil positif dapat dilihat berdasarkan terbentuknya warna pada sampel yaitu biru tua dan hitam kehijauan.  $\text{FeCl}_3$  digunakan untuk mengidentifikasi gugus fenol, jika dalam senyawa terdapat gugus fenol, maka terdapat juga tanin, karena tanin adalah senyawa polifenol (Oktavia dkk., 2021).

### 3.4.3. Pembagian Kelompok Penelitian

Sampel larva nyamuk *Aedes aegypti* yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari Badan Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI),

jalan Ketintang baru No. 17/14 Surabaya. Setiap kelompok larva nyamuk *Aedes aegypti* yang diuji dibagi menjadi 5 perlakuan dan 4 ulangan yang terdiri dari 10 ekor larva nyamuk *Aedes aegypti* pada setiap ulangan.

P0<sub>1</sub> : Kelompok larva nyamuk *Aedes aegypti* dengan pemberian aquadest

P0<sub>2</sub> : Kelompok larva nyamuk *Aedes aegypti* dengan pemberian abate®

P1 : Kelompok larva nyamuk *Aedes aegypti* dengan pemberian campuran ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*) sebanyak 2%

P2 : Kelompok larva nyamuk *Aedes aegypti* dengan pemberian campuran ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*) sebanyak 4%

P3 : Kelompok larva nyamuk *Aedes aegypti* dengan pemberian campuran ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*) sebanyak 6%

#### **3.4.4. Pengenceran Ekstrak**

Pengenceran ekstrak dilakukan dengan tujuan untuk menghasilkan beberapa variasi konsentrasi yang akan digunakan (Klau, 2021).

## 1. Konsentrasi 2%

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100\% \times V1 = 2\% \times 100$$

$$100 \times V1 = 200$$

$$V1 = \frac{200}{100}$$

$$V1 = 2 \text{ ml}$$

## 2. Konsentrasi 4%

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100\% \times V1 = 4\% \times 100$$

$$100 \times V1 = 400$$

$$V1 = \frac{400}{100}$$

$$V1 = 4 \text{ ml}$$

## 3. Konsentrasi 6%

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100\% \times V1 = 6\% \times 100$$

$$100 \times V1 = 600$$

$$V1 = \frac{600}{100}$$

$$V1 = 6 \text{ ml}$$

Keterangan : V1 : Volume awal (ml)

M1 : Konsentrasi awal (%)

V2 : Konsentrasi yang diinginkan (%)

V1 : Volume yang diinginkan (L)

**3.4.5. Pembuatan Konsentrasi Campuran Ekstrak Biji Pepaya (*Carica Papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*)**

1. Pembuatan larutan ekstrak 2% : Pembuatan larutan ekstrak Campuran Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*), dengan konsentrasi 2% yaitu 2 ml Campuran Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*) dan aquadest sebanyak 98 ml dicampur hingga homogen, kemudian dituang ke dalam 5 gelas plastik dengan masing-masing gelas berisi 20 ml.
2. Pembuatan larutan ekstrak 4% : Pembuatan larutan ekstrak Campuran Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji 36 Sirsak (*Annona muricata L*), dengan konsentrasi 4% yaitu 4 ml Campuran Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*) dan aquadest sebanyak 96 ml dicampur hingga homogen, kemudian dituang ke dalam 5 gelas plastik dengan masing-masing gelas berisi 20 ml.
3. Pembuatan larutan ekstrak 6% : Pembuatan larutan ekstrak Campuran Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*), dengan konsentrasi 6% yaitu 6 ml Campuran Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*) dan aquadest sebanyak 94 ml dicampur hingga

homogen, kemudian dituang ke dalam 5 gelas plastik dengan masing-masing gelas berisi 20 ml.

#### **3.4.6. Observasi Larva**

Observasi larva dilakukan selama 5 jam setiap jam larva dipindah pada tabung penelitian. Larva diamati setelah diberi perlakuan, larva nyamuk *Aedes aegypti* yang mati dihitung dan ditulis di tabel.

### **3.5. Prosedur Pengumpulan Data**

#### **3.5.1. Kontrol Positif**

Abate® disiapkan lalu ditaburkan dalam air 100 ml sebanyak 1 gram kemudian dicampurkan dan dibagikan di setiap tabung sebanyak 20ml. Jumlah larva nyamuk *Aedes aegypti* pada setiap tabung plastik sebanyak 10 ekor. Larva nyamuk diamati selama 5 jam setiap jam sekali. Kriteria kematian larva adalah larva yang tidak bergerak saat disentuh dengan lidi atau jarum, tubuh larva kaku. Satuan yang digunakan adalah ekor dan skala yang digunakan adalah rasio (Putri, 2018)

#### **3.5.2. Kontrol Negatif**

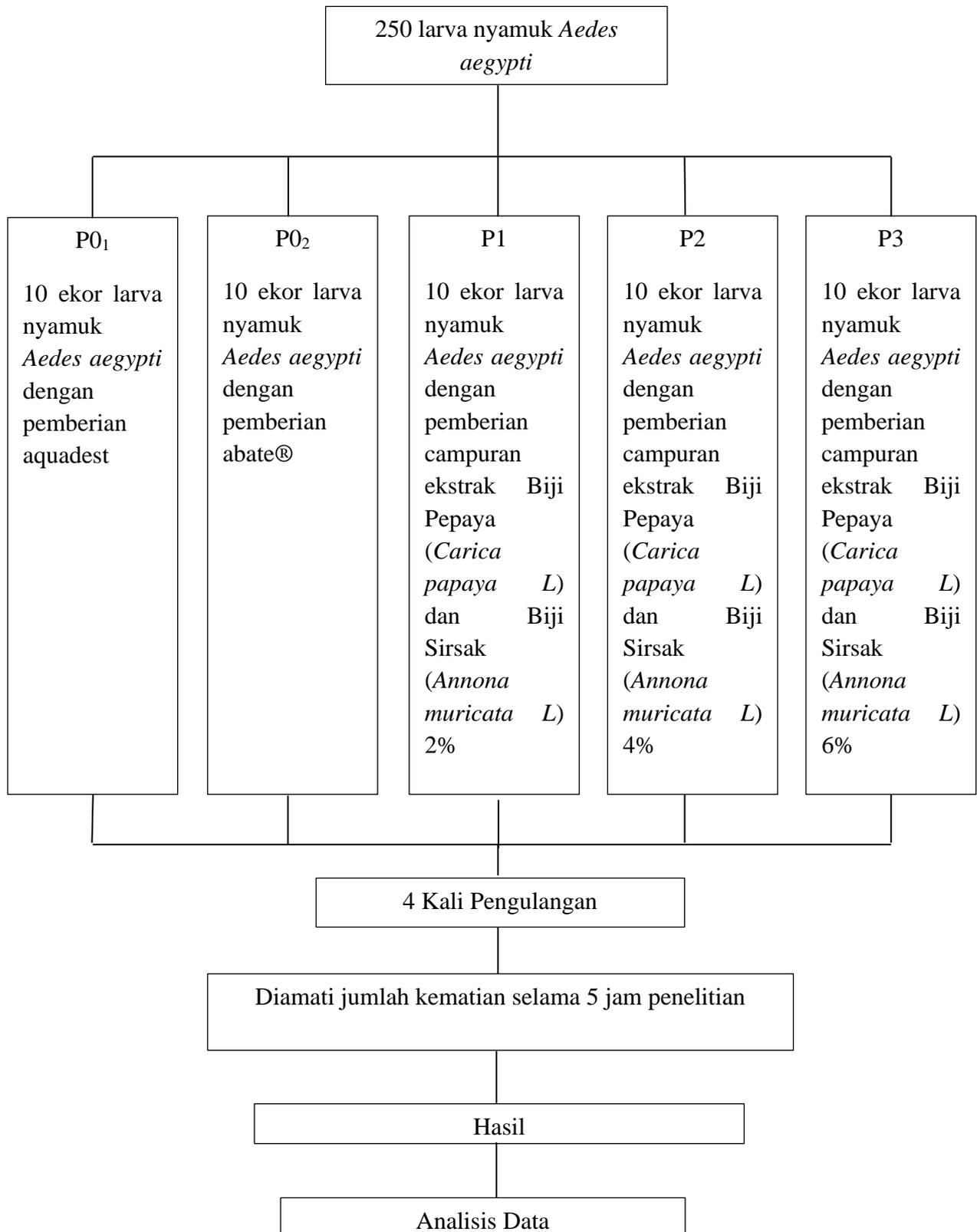
Aquades 100 ml disiapkan dan dibagikan 20 ml ke setiap tabung, lalu masukkan larva nyamuk *Aedes aegypti* sebanyak 10 ekor ke dalam tabung yang berisi air. Larva nyamuk diamati selama 5 jam setiap jam sekali. Kriteria kematian larva adalah larva yang tidak bergerak saat disentuh dengan lidi atau jarum, tubuh larva kaku. Satuan yang

digunakan adalah ekor dan skala yang digunakan adalah rasio (Putri, 2018).

### **3.5.3. Perlakuan Dengan Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*)**

10 ekor larva nyamuk *Aedes aegypti* dimasukkan ke dalam larutan yang berisi konsentrasi campuran ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*) 2% (P1), 4% (P2), 6% (P3). Larva nyamuk diamati selama 5 jam setiap jam sekali. Kriteria kematian larva adalah larva yang tidak bergerak saat disentuh dengan lidi atau jarum, tubuh larva kaku. Satuan yang digunakan adalah ekor dan skala yang digunakan adalah rasio (Putri, 2018).

### 3.6. Kerangka Penelitian



Gambar 3.1 Skema Penelitian

### **3.8. Analisis Data**

Analisis data yang digunakan untuk mengetahui perbedaan daya larvasida campuran ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata L*) terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* diuji dengan menggunakan uji *one way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji *Duncan* menggunakan aplikasi IBM SPSS.