

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif yang dilakukan secara eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui toksisitas ekstrak etanol daun sirsak gunung (*Annona montana*) dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Letahality Test* (BSLT) terhadap hewan uji *Artemia salina*. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap, yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap akhir.

Tahap pertama adalah tahapan persiapan yang meliputi persiapan alat yang akan digunakan dalam penelitian serta pengumpulan bahan hingga pembuatan simplisia. Tahap kedua adalah tahapan pelaksanaan yang meliputi pembuatan ekstrak, pembuatan larutan uji dan pengujian toksisitas ekstrak etanol daun sirsak gunung dengan dosis yang berbeda pada tiap kelompok hewan uji *Artemia salina*. Pengujian dilakukan selama 24 jam.

Tahapan akhir dalam penelitian ini adalah pengumpulan data, menganalisa data, dan membuat kesimpulan.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirsak gunung dan sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirsak gunung dengan varian konsentrasi 200 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 450 ppm, dan 500 ppm.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang pada bulan Maret 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel penelitian adalah segala sesuatu yang berbentuk apa saja yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari sehingga diperoleh informasi tentang hal tersebut, kemudian ditarik kesimpulan (Sugiyono, 2013).

Variabel dalam penelitian terdiri atas variable bebas dan terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun sirsak gunung dengan varian konsentrasi 200 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 450 ppm, dan 500 ppm. Variabel terikat pada penelitian ini adalah persentase kematian larva *Artemia salina*.

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Hasil ukur	Skala ukur
1.	Konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak gunung (<i>Annona montana</i>)	Konsentrasi ekstrak dalam ppm (1 µg/ml)	Ppm	Nominal
2.	Persentase kematian larva <i>Artemia salina</i>	Larva yang tidak bergerak ketika diberikan zat dalam waktu 24 jam.	%	Nominal (% kematian larva)

3.5 Alat dan Bahan/Instrumen Penelitian.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi neraca analitik, tabung reaksi, erlenmeyer 500 mL, gelas beaker 500 mL, rotary evaporator, corong kaca, cawan penguap, batang pengaduk, oven, kertas saring, spatula, dan seperangkat alat penetas udang.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain air laut yang diperoleh dari Banyuwili Aquamarine, aquadest, daun *Annona montana* yang kemudian dijadikan simplisia dan dibikin ekstrak, etanol 96% yang diperoleh dari Panadia Laboratory, dan telur *Artemia salina*.

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Determinasi

Determinasi tanaman sirsak gunung (*Annona montana*) dilakukan oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (*Indonesian institute of sciences*) Balai Konservasi Tumbuhan Purwodadi.

3.6.2 Pembuatan Simplisia

Diambil 14,1069 g daun sirsak, disortir, serta dibersihkan. Daun sirsak yang telah dibersihkan kemudian dikeringkan sehingga menghasilkan simplisia kering yang kemudian di blender sehingga menghasilkan serbuk simplisia halus. Serbuk simplisia disimpan pada suhu kamar (15-30°C).

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirsak Gunung

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Serbuk simplisia diekstrak sebanyak 2,8469 g menggunakan pelarut etanol selama 3 hari. Kemudian hasil rendaman kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Hal ini dilakukan untuk memisahkan filtrat dan ampasnya. Filtrat kemudian ditampung dan dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 60°C untuk memisahkan pelarut dari ekstrak sehingga menghasilkan ekstrak kental daun sirsak dengan bobot tetap.

3.6.4 Penetasan larva *Artemia salina*

Penyiapan larva dilakukan dengan mengambil telur *Artemia salina* sebanyak 1 g. Penetasan dilakukan dengan cara merendam telur tersebut dalam air laut buatan sebanyak 2 L dan diberi penerangan dengan lampu pijar 40-60 watt dengan suhu berkisar 25-30°C (Pisutthanan, 2004) serta diaerasi selama 48 jam. Air laut yang digunakan memiliki pH sekitar 8-9.

3.6.5 Penyiapan larutan uji

Dibuat larutan uji dengan konsentrasi 500 ppm. Dari larutan uji 500 ppm, selanjutnya dibuat lagi larutan dengan konsentrasi 200 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 450 ppm, dan 500 ppm dengan cara pengenceran. Untuk kontrol (0 ppm) dilakukan tanpa penambahan ekstrak (Safithri, Mega. 2015).

3.6.6 Uji toksisitas

Larva yang berumur 48 jam dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi larutan uji dan air laut dengan konsentrasi yang telah ditentukan hingga volume larutan mencapai 10 mL. Larva dikelompokkan dalam 5 perlakuan (ekstrak etanol daun sirsak gunung dengan konsentrasi 200 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 450 ppm, dan 500 ppm) dan kontrol (konsentrasi 0 ppm). Ke dalam setiap tabung reaksi dimasukkan 10 larva udang dengan replikasi 5 kali. Tingkat kematian diamati setelah 24 jam dibawah lampu pijar. Setelah itu dilakukan perhitungan LC₅₀. Perhitungan LC₅₀ dilakukan dengan cara membuat kurva hubungan antara konsentrasi ekstrak (x) terhadap % kematian (y) (Safithri, Mega. 2015).

3.7 Analisis data

Data hasil pengujian BSLT dianalisis menggunakan metode Sam (Colegate, 1993) berdasarkan perhitungan jumlah larva yang mati dan yang masih hidup. Tingkat kematian atau mortalitas (%) diperoleh dengan membandingkan antara jumlah yang mati dibagi dengan jumlah total larva. Nilai LC_{50} diperoleh melalui penentuan nilai probit, yaitu mengkonversi nilai persen kematian dengan tabel probit. Plotting data antara nilai probit dengan log konsentrasi akan diperoleh persamaan garis regresi:

$$y = aX+b$$

Keterangan:

$y = 5$ (menyatakan larva udang yang mengalami kematian sejumlah 50% setelah masa inkubasi 24 jam).

$b = \text{slope}$

$a = \text{interscp}$

$x =$ menyatakan konsentrasi larutan yang menyebabkan kematian terhadap 50% larva

Data pengujian toksisitas diperoleh dari analisis nilai LC_{50} dilakukan dengan uji probit menggunakan microsoft excel 2010.