

III. METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau *completely randomized design* yang terdiri dari 4 perlakuan dan 2 kontrol, positif dan negatif dengan pengulangan sebanyak 4 kali. Rancangan Acak Lengkap merupakan jenis rancangan percobaan yang paling sederhana. Metode ini dipilih karena satuan percobaan yang digunakan bersifat homogen atau tidak ada faktor lain yang mempengaruhi respon di luar faktor yang diteliti. Selain itu, percobaan ini dilakukan di laboratorium sehingga faktor luar yang dapat mempengaruhi percobaan dapat dikontrol.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Penelitian dilakukan pada bulan November - Desember tahun 2013.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva instar III *Aedes aegypti* yang diperoleh dari Loka Litbang P2B2 Ciamis dalam bentuk kering dengan media kertas saring.

2. Sampel

Menurut Wulandari *et al* (2006), larva pada tahap instar III dipakai sebagai bahan penelitian karena tahap ini dianggap cukup mewakili kondisi larva. Ukuran larva instar III tidak terlalu kecil sehingga mudah untuk diamati dan larva ini merupakan bentuk yang aktif mencari makan.

Untuk memudahkan dalam penentuan sampel maka dipakai kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

a. Kriteria Inklusi

- 1) Larva *Aedes aegypti* yang telah mencapai instar III
- 2) Larva bergerak aktif

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Larva yang sudah mati sebelum pengujian
- 2) Larva yang telah berubah menjadi pupa atau nyamuk dewasa
- 3) Bukan larva bebas

Menurut acuan WHO (2005), besar sampel dalam penelitian larvasida adalah 25 ekor larva *Aedes aegypti* instar III untuk masing-masing perlakuan dengan pengulangan sebanyak 4 kali untuk setiap perlakuan, sehingga pada penelitian ini diperlukan total sampel sebanyak 480 larva. Adapun rincian sampel yang digunakan adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Rincian jumlah sampel penelitian

Perlakuan	Jumlah larva x jumlah pengulangan	Total
Kontrol (-) : 0%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan I : 0,25%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan II : 0,50%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan III : 0,75%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan IV : 1%	25 larva x 4	100 larva
Kontrol (+) : Abate	25 larva x 4	100 larva
	Jumlah total larva yang dipakai dalam penelitian	600 larva

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang dipakai dalam penelitian ini adalah :

- a. Alat Untuk Preparasi Bahan Uji
 1. Nampan plastik dengan ukuran 30 x 15 cm
 2. Kain kassa
 3. Gelas plastik
 4. Sangkar nyamuk berukuran 40 cm x 40 cm x 40 cm
- b. Alat Untuk Pembuatan Larutan Uji
 1. Neraca analitik (timbangan)
 2. Blender
 3. Toples
 4. Baskom
 5. Saringan
- c. Alat Untuk Uji Efektifitas
 1. Pipet larva
 2. Pipet tetes
 3. Akar pengaduk
 4. Gelas ukur 250 ml
 5. Kontainer atau gelas plastik
 6. Kertas label

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah

- a. Daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)
- b. Larva *Aedes aegypti* instar III
- c. Larutan ethanol 96 %
- d. Temephos (abate) 1 %
- e. *Aquadest*
- f. *Fish food* untuk makanan larva

E. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

Variabel pada penelitian ini terdiri atas :

- a. Variabel Bebas

Variabel bebas atau *independent variable* penelitian ini adalah berbagai konsentrasi ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan lima taraf konsentrasi yaitu 0 %, 0,25 %, 0,5 %, 0,75 % dan 1 % dan larva *Aedes aegypti* instar III

- b. Variabel Terikat

Variabel terikat atau *dependent variable* penelitian ini adalah kematian larva *Aedes aegypti* instar III.

2. Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional sebagai berikut :

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Defnisi	Cara ukur	Hasil ukur	Skala
Variabel bebas : Berbagai konsentrasi ekstrak daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis)	Ekstrak daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis) dinyatakan dalam persen (%). Masing-masing kosentrasi dibuat dengan cara pengenceran. Pada penelitian ini dipakai konsentrasi 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1% dan kontrol 0% yang kemudian akan dicari dosis subletalnya yaitu LC ₅₀ yang akan ditentukan dengan analisis probit. Efektivitas dari ekstrak daun binahong dilihat dari jumlah larva yang mati dan disesuaikan dengan parameter efektivitas menurut WHO.	Menimbang ekstrak dan dimasukkan ke rumus : $V_1M_1 = V_2M_2$ Alat ukur : <i>Analitical balance electric, refractomete r</i> , gelas ukur, kalkulator	Didapatkan konsentrasi ekstrak daun Binahong 0,25%, 0,50%, 0,75%, dan 1%	Numerik
Variabel terikat : Larva <i>Aedes aegypti</i> yang mati	Larva yang tidak bergerak saat disentuh dengan jarum di daerah siphon atau lehernya. Tubuh larva kaku. Larva yang hampir mati juga dikategorikan kedalam larva yang mati dimana ciri-ciri larva yang hampir mati adalah larva tersebut tidak dapat meraih permukaan air atau tidak bergerak aktif ketika air digerakkan (WHO, 2005). Larva instar III berukuran 4-5 mm berumur tiga sampai empat hari setelah telur menetas, duri-duri dada mulai jelas dan corong pernapasan berwarna coklat kehitaman (Sikka, 2009).	Melihat, mengecek larva dan dicatat Parameter : Mortalitas larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i> Alat ukur : <i>Hand counter</i> , jarum <i>tectio</i> , kalkulator	Larva <i>Aedes aegypti</i> yang mati (0-25 larva)	Numerik

F. Prosedur Penelitian

Prosedur penenilaian ini terdiri dari tiga tahap, yakni tahap persiapan, tahap pelaksanaan dan tahap analisis data.

1. Tahap Persiapan

a. Sterilisasi alat

Alat dan bahan yang akan digunakan terlebih dahulu disiapkan, kemudian dibersihkan. Bahan-bahan yang akan digunakan ditimbang dengan neraca analitik terlebih dahulu sesuai dengan kebutuhan. Setelah itu, alat dan bahan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 C dengan tekanan 1,5 atm (Syulasmı *et al.*, 2005).

b. Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah telur nyamuk *Aedes aegypti* yang diperoleh dari Ruang Insektarium Loka Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang Ciamis, Pangandaran, Jawa Barat. Telur kemudian diletakkan di dalam nampan plastik yang berukuran 30 cm x 15 cm berisi air bersih \pm 1000 cc untuk pemeliharaan larva agar tidak mati. Telur akan menetas menjadi larva dalam waktu 1-2 hari. Kemudian telur yang sudah menetas menjadi larva dipisahkan dengan menggunakan kasa untuk pengkolonisasian dan diberi *fish food* sebagai makanan larva.

Dalam waktu kurang lebih 4 hari, larva akan mencapai instar III. Setelah usia larva mencapai instar III larva dipindahkan dengan menggunakan pipet larva ke dalam gelas plastik yang berisi ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).

c. Persiapan ekstrak daun binahong

Pembuatan ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) ini menggunakan daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang didapat dari lingkungan sekitar tempat tinggal peneliti. Daun binahong sebelumnya diidentifikasi terlebih dahulu di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung.

Daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) ditimbang sebanyak 20 g kemudian dicuci menggunakan air sampai bersih. Daun yang sudah bersih, dicacah terlebih dahulu kemudian dihaluskan menggunakan blender kering tanpa menggunakan air. Daun binahong ditimbang kembali setelah halus dan dikeringkan. Pengeringan tidak boleh dilakukan langsung dibawah terik matahari karena akan menghilangkan senyawa kimia yang terkandung dalam daun binahong. Daun binahong diekstraksi menggunakan metode meserasi dan menggunakan pelarut alkohol (ethanol).

Potongan halus daun binahong direndam selama 24 jam ke dalam ethanol 96 % sebanyak 25 ml. Setelah direndam selanjutnya bahan

tersebut disaring sehingga diperoleh hasil akhirnya berupa ekstrak dengan konsentrasi 100%. 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 binahong yang tersedia (%)

V_2 = Volume larutan (air + ekstrak) yang diinginkan (ml)

M_2 = Konsentrasi ekstrak daun binahong yang akan dibuat (%)

Tabel 3. Jumlah Ekstrak Daun binahong yang Dibutuhkan

M_1	V_2	M_2	$V_1 = \frac{V_2 \cdot M_2}{M_1}$	Pengulangan ($V_1 \times 4$)
100 %	200 ml	1 %	2 ml	8 ml
100 %	200 ml	0,75 %	1,5 ml	6 ml
100 %	200 ml	0,5 %	1 ml	4 ml
100 %	200 ml	0,25 %	0,5 ml	2 ml
Total				20 ml

2. Tahap Pelaksanaan

1) Pembagian kelompok

Penelitian ini dibagi menjadi 6 (enam) kelompok yang terdiri dari 4 perlakuan dan 2 kontrol dengan berbagai konsentrasi ekstrak daun binahong sebagai berikut :

a) Kelompok 1

Kontrol negatif (-): Aquades Ekstrak ethanol daun binahong dengan konsentrasi 0 %

b) Kelompok 2

Perlakuan I : Ekstrak ethanol daun binahong dengan konsentrasi 0,25 %

c) Kelompok 3

Perlakuan II : Ekstrak ethanol daun binahong dengan konsentrasi 0,50 %

d) Kelompok 4

Perlakuan III : Ekstrak ethanol daun binahong dengan konsentrasi 0,75 %

e) Kelompok 5

Perlakuan IV : Ekstrak ethanol daun binahong dengan konsentrasi 1 %

f) Kelompok 6

Kontrol positif (+) : Ekstrak ethanol daun binahong dengan penambahan temephos (abate) 1 %

2) Uji Efektivitas

Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan konsentrasi 0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, dan 1 % . Uji efektifitas ini dilakukan untuk menentukan nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50*), LT_{50} (*Lethal Time 50*) dan konsentrasi yang paling efektif sebagai larvasida larva *Aedes aegypti*. Ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan berbagai konsentrasi tersebut diletakkan dalam gelas plastik. Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan menggunakan pipet larva. Perlakuan menggunakan ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) hanya diberikan pada kelompok eksperimen sebanyak 200 ml ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) pada tiap ulangan, sedangkan pada kelompok kontrol diberikan perlakuan menggunakan air sumur dengan volume 200 ml pada tiap ulangan. Masing-masing perlakuan berisi 20 larva *Aedes aegypti* instar III dengan jumlah pengulangan sebanyak 4 kali. Jumlah sampel dan pengulangan berdasarkan kriteria WHO (2005).

Menurut WHO, pengukuran pada kelompok-kelompok sampel dilakukan dalam 3 x 24 jam dan pembagian pencatatan waktu selama perlakuan yaitu dengan interval waktu 5, 10, 20, 40, 60,

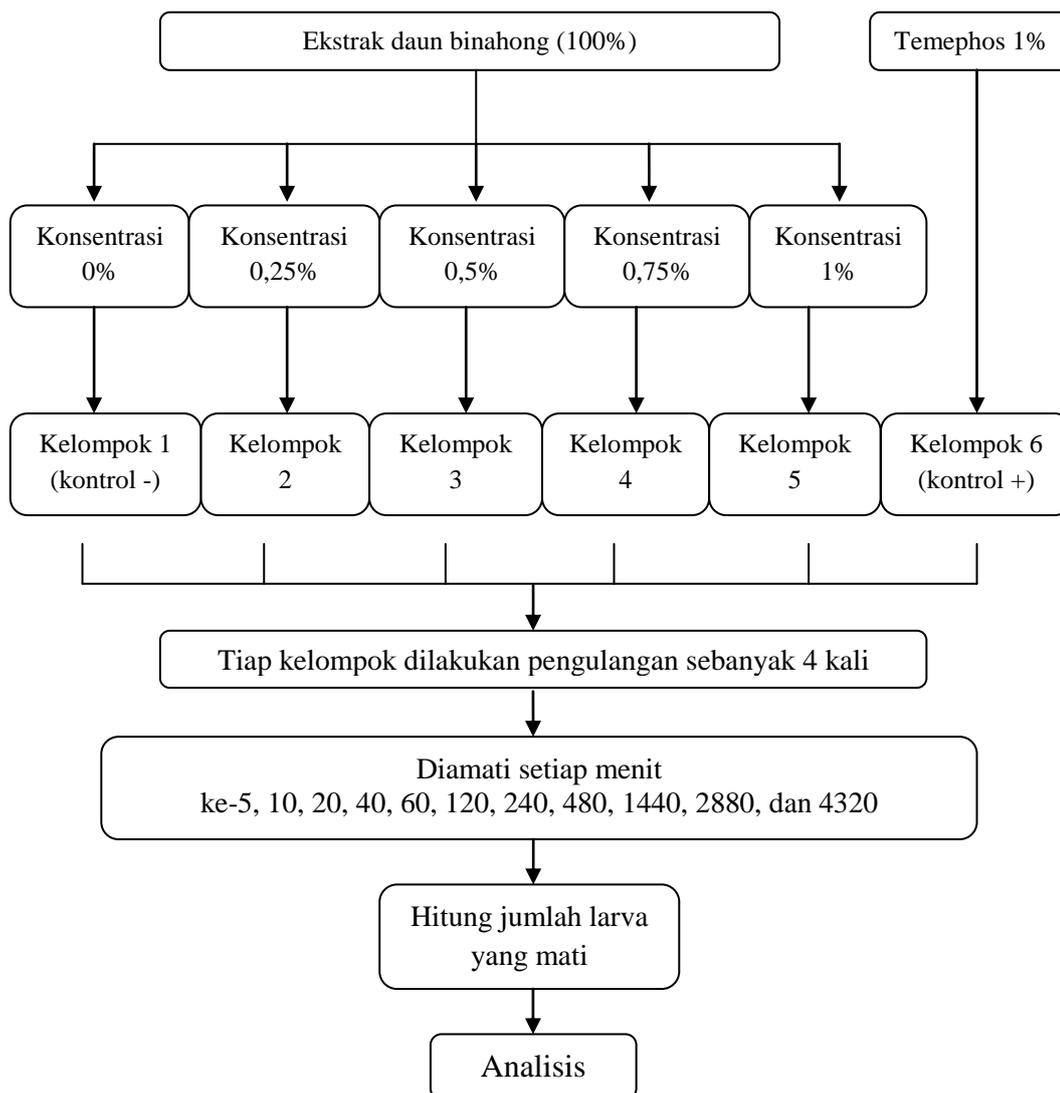
120, 240, 480, 1440, 2880, dan 4320 menit. Pengukuran berakhir pada menit ke 4320 dengan cara menghitung larva yang mati pada tiap patokan waktu.

3) Menentukan Nilai LC_{50} dan LT_{50}

Kelompok perlakuan terdiri dari 1 kontrol negatif, 4 konsentrasi ekstrak daun binahong dan 1 kontrol positif. Tiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali dan diamati pada menit ke-5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480, 1440, 2880, dan 4320. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang mati kemudian dihitung presentase rata-rata kematian larva pada tiap kelompok perlakuan. Kemudian dari rata-rata kematian masing-masing kelompok perlakuan pada tiap masing-masing waktu pengamatan dianalisis dengan menggunakan analisis Probit hingga diperoleh nilai LC_{50} dan LT_{50} .

4) Alur Penelitian

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



Gambar 11. Diagram Alir Uji Efek Ekstrak Daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) sebagai Larvasida

3. Tahap Analisis Data

1) ANOVA satu arah.

Uji varian satu arah digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rata-rata kematian nyamuk *Ae. des aegypti* pada berbagai kelompok konsentrasi ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Untuk mengetahui adanya perbedaan antara perlakuan yang diberikan maka digunakan analisis ANOVA satu arah, tetapi bila sebaran data tidak normal atau varians data tidak sama dapat dilakukan uji alternatif yaitu uji Kruskal-Wallis. Uji ini bertujuan untuk mengetahui paling tidak terdapat perbedaan antara dua kelompok perlakuan. Apabila pada uji tersebut didapatkan hasil yang signifikan (bermakna) yaitu $p \text{ value} < 0,05$ maka dilakukan analisis *post-hoc* untuk mengetahui kelompok perlakuan yang bermakna. Uji *post-hoc* untuk ANOVA satu arah adalah Bonferroni sedangkan untuk uji Kruskal-Wallis adalah Mann Whitney.

2) Uji Probit.

Untuk menilai toksisitas suatu insektisida dapat menggunakan suatu metode pengujian dengan menggunakan analisis probit. *Lethal concentration* merupakan suatu ukuran untuk mengukur daya racun dari jenis pestisida. Pada uji efektifitas ditunjukkan LC_{50} yang berarti berapa

ppm atau persen konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian 50% dari hewan percobaan. Nilai subletal ditentukan dengan analisis probit.

G. Aspek Etik Penelitian

Larva *Aedes aegypti* didapat dari intalasi insektarium P2B2 Ciamis dalam bentuk telur kering dengan media kertas saring. keadaan telur larva non-infeksius dan didapatkan tidak ada transmisi virus ke telur. telur pengujian larvasida dilakukan dengan metode standar WHO (2005). Penelitian ini telah mendapatkan Keterangan Lolos Kaji Etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan fakultas Universitas Lampung Nomor 093/UN26/DT/2014 (Lampiran).