

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental laboratorium, dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Zoologi dan Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung pada bulan Oktober-November 2013.

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi Penelitian**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva instar III *Aedes aegypti*. Telur nyamuk ini diperoleh dari Loka Penelitian dan

Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (Loka Litbang P2B2) Ciamis dalam bentuk kering dengan media kertas saring.

## 2. Sampel Penelitian

### a. Kriteria Inklusi

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

### b. Kriteria Eksklusi

- 1) Larva mati sebelum perlakuan
- 2) Larva berasal dari alam bebas.

## 3. Besar Sampel

Berdasarkan pedoman *World Health Organization* (2005), maka pada penelitian ini dibutuhkan total larva sebanyak 600 larva (Tabel 1). Rincian jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

**Tabel 1.** Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian (WHO, 2005)

Perlakuan	Jumlah Larva X Jumlah Pengulangan	Total
Kontrol (-): 0%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan I: 0,025%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan II: 0,050%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan III: 0,075%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan IV: 0,1%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan V: 0,125%	25 larva x 4	100 larva
Jumlah total larva yang digunakan		600 larva

## **D. Bahan dan Alat Penelitian**

### **1. Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. 6 Kg Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang telah dihancurkan
- b. 5 L Ethanol 96% sebagai pelarut
- c. Aquades untuk tempat berkembang larva serta untuk melakukan pengenceran ekstrak
- d. Pelet Kelinci sebagai pakan larva untuk menghindari terjadinya kekeruhan pada tempat pertumbuhan larva. Pelet diberikan sebanyak 10 mg/l (WHO, 2005).

### **2. Alat Penelitian**

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Alat untuk preparasi bahan uji, yaitu:
  - 1) Nampan plastik ukuran 30 x 15 cm untuk tempat memelihara larva
  - 2) Kain kasa untuk memisahkan larva dengan air
  - 3) Gelas plastik ukuran  $\pm$ 400 ml untuk tempat meletakkan larva uji
  - 4) Sangkar nyamuk untuk meletakkan gelas tersebut pada waktu dilakukan uji.

- b. Alat untuk pembuatan ekstrak buah Mahkota Dewa, yaitu:
- 1) Timbangan untuk menimbang buah Mahkota Dewa yang diperlukan
  - 2) Blender untuk menghaluskan buah Mahkota Dewa
  - 3) Baskom plastik sebagai tempat atau wadah ekstrak buah Mahkota Dewa
  - 4) 24 Gelas plastik untuk merendam buah Mahkota Dewa yang telah dihaluskan dengan ethanol 96%
  - 5) Alumunium foil untuk menutup gelas saat melakukan ekstraksi
  - 6) Saringan untuk memisahkan ekstrak ethanol buah Mahkota Dewa dengan ampasnya
  - 7) Pipet ukuran 1 ml untuk mengambil ekstrak buah Mahkota Dewa.

**c. Alat untuk Uji Efektivitas**

- 1) Gelas ukur 100 ml untuk mengukur jumlah air yang diperlukan
- 2) Kasa nilon untuk menutup gelas tempat pertumbuhan larva
- 3) Pipet larva untuk mengambil larva
- 4) Lidi untuk mengetahui larva yang mati
- 5) Termometer untuk mengukur suhu lingkungan.

## E. Prosedur Penelitian

Penelitian dibagi dalam 2 tahap, yaitu:

### 1. Tahap Persiapan

#### a. Preparasi Bahan Uji

Telur nyamuk *Aedes aegypti* yang dipakai pada penelitian ini diperoleh dari Ruang Insektarium Loka Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang Ciamis, Pangandaran, Jawa Barat. Buah Mahkota Dewa diperoleh dari lingkungan sekitar tempat penelitian.

#### b. *Rearing* Larva

Telur nyamuk dipindahkan ke dalam sebuah nampan yang berisi media air selama 1-2 hari sampai telur menetas dan menjadi larva. Larva akan berkembang dari stadium I sampai III yang berlangsung selama 4-5 hari. Selama masa perkembangannya larva tersebut diberi pakan berupa pelet.

#### c. Pembuatan Ekstrak Buah Mahkota Dewa

Disiapkan ekstrak buah Mahkota Dewa yang diperoleh dari lingkungan sekitar tempat penelitian. Pembuatan ekstrak buah Mahkota Dewa ini menggunakan pelarut berupa ethanol 96%. Buah Mahkota Dewa sebanyak 6 kg yang telah didapat kemudian dibersihkan dengan menggunakan air kemudian dicacah halus atau diblender (tanpa air). Setelah diblender potongan buah Mahkota Dewa ditimbang terlebih dahulu baru kemudian dikeringkan dengan cara

diangin-anginkan. Setelah kering, potongan buah Mahkota Dewa direndam selama 24 jam di dalam ethanol 96% sebanyak 5 L. Setelah direndam selanjutnya bahan tersebut disaring sehingga diperoleh hasil akhirnya berupa ekstrak buah Mahkota Dewa dengan konsentrasi 100%. Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan rumus (Tabel 2):

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

Keterangan:

V1 = volume larutan mula-mula

M1 = konsentrasi mula-mula

V2 = volume larutan sesudah diencerkan

M2 = konsentrasi sesudah diencerkan

**Tabel 2.** Jumlah Ekstrak Buah Mahkota Dewa yang Dibutuhkan pada Penelitian (WHO, 2005)

M1	V2	M2	$V_1 = \frac{V_2 \cdot M_2}{M_1}$	Pengulangan (V1 x 4)
100%	200 ml	0,025%	0,05 ml	0,2 ml
100%	200 ml	0,050%	0,10 ml	0,4 ml
100%	200 ml	0,075%	0,15 ml	0,6 ml
100%	200 ml	0,1%	0,20 ml	0,8 ml
100%	200 ml	0,125%	0,25 ml	1 ml
			Total	3 ml

## 2. Tahap Penelitian

Larutan uji merupakan ekstrak ethanol buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan konsentrasi 0% sebagai kontrol negatif dan konsentrasi 0,025%; 0,050%; 0,075%; 0,1%; 0,125% sebagai perlakuan yang ditambahkan pada masing-masing gelas uji. Kontrol negatif hanya menggunakan aquades sebanyak 200 ml dengan kedalaman 5-10 cm. Efek buah Mahkota Dewa dalam menghambat perkembangan larva menjadi

stadium dewasa dievaluasi dengan mengikuti pedoman standar pengujian *Insect Growth Regulators* (WHO, 2005).

Menurut pedoman WHO larva instar III *Aedes aegypti* yang digunakan dalam pengujian ini. Durasi pengujian yang panjang maka larva harus diberi makan pelet kelinci 10 mg/l dengan cara yang sama pada masing-masing perlakuan dengan interval pemberian selama 2 hari. Larva kontrol juga diberi makan dengan cara yang sama dengan larva perlakuan. Gelas-gelas uji dan kontrol ditutup dengan menggunakan kasa nilon agar terhindar dari kotoran dan serangga yang masuk kemudian disimpan di dalam sangkar nyamuk selama waktu uji untuk mencegah stadium dewasa terbang ke lingkungan luar. Mortalitas larva dan pupa dicatat setiap 24 jam (WHO, 2005).

Pada akhir pengamatan pengaruh buah Mahkota Dewa terhadap perkembangan larva *Aedes aegypti* dinilai sebagai persentase jumlah larva yang tidak berhasil berkembang menjadi nyamuk dewasa yang viabel (*Adult Emergence Inhibition*, IE%). Eksperimen selesai ketika semua larva atau pupa pada kontrol mati atau berubah menjadi stadium dewasa. Kemudian dilakukan analisis untuk mendapatkan nilai IE<sub>50</sub> dan IE<sub>90</sub> (WHO, 2005).

## **F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel**

### **1. Identifikasi Variabel**

#### **a. Variabel Independen**

Variabel independen adalah konsentrasi ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*).

#### **b. Variabel dependen**

Variabel dependen adalah persentase jumlah larva yang tidak berhasil menjadi stadium nyamuk dewasa (*Adult Emergence Inhibiton, IE%*).

### **2. Definisi Operasional Variabel**

Definisi operasional tercantum pada Tabel 3.



Tabel 3. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Berbagai konsentrasi ekstrak buah Mahkota Dewa ( <i>Phaleria macrocarpa</i> .)	Ekstrak buah Mahkota Dewa dinyatakan dalam persen (%). Masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran. Pada penelitian ini dipakai konsentrasi 0,025%; 0,050%; 0,075%; 0,1%; 0,125% dan kontrol 0% yang kemudian dicari dosis untuk menghambat 50% dan 90% perkembangan larva menjadi stadium dewasa atau <i>inhibition of adult emergence</i> (IE <sub>50</sub> and IE <sub>90</sub> ).	Gelas ukur 100 ml dan pipet ukur 1 ml	Dengan menggunakan pipet ukur konsentrasi larutan yang diujikan.	Cairan dalam mililiter	Kategorik
2	Persentase jumlah larva <i>Aedes aegyti</i> yang tidak berhasil menjadi stadium nyamuk dewasa ( <i>Adult Emergence Inhibiton</i> , IE%)	<i>Adult Emergence Inhibition</i> dihitung berdasarkan rumus pada pedoman WHO (2005), yaitu: IE (%) $= 100 - \left( \frac{T \times 100}{C} \right)$ Keterangan: T : persentase jumlah larva yang berhasil menjadi dewasa pada kelompok perlakuan C: persentase jumlah larva yang berhasil menjadi dewasa pada kelompok kontrol	Kaca pembesar	Dihitung secara manual kemudian dihitung dengan rumus WHO	<i>Adult Emergence Inhibition</i> , IE%	Numerik

## G. Analisis Data

Data yang diperoleh diuji analisis statistik menggunakan software statistik. Data hasil penelitian dianalisis secara statistik menggunakan:

A. Uji normalitas data yaitu uji *Saphiro-Wilk*, jika hasilnya  $> 0,05$  maka distribusi data normal maka dapat menggunakan uji parametrik anova, tapi jika distribusi data tidak normal (hasilnya  $< 0,05$ ) menggunakan uji alternatif yaitu uji Kruskal Wallis (Dahlan, 2008).

B. Analisis varians (*Analysis of Variance / ANOVA*)

Dilakukan pengujian untuk mengetahui apakah ada perbedaan nilai IE% *Aedes aegypti* antar kelompok uji. Uji ini di pilih untuk melihat perbedaan pada data variabel numerik lebih dari 2 kelompok (Dahlan, 2008).

C. *Least Significance Difference (LSD)*

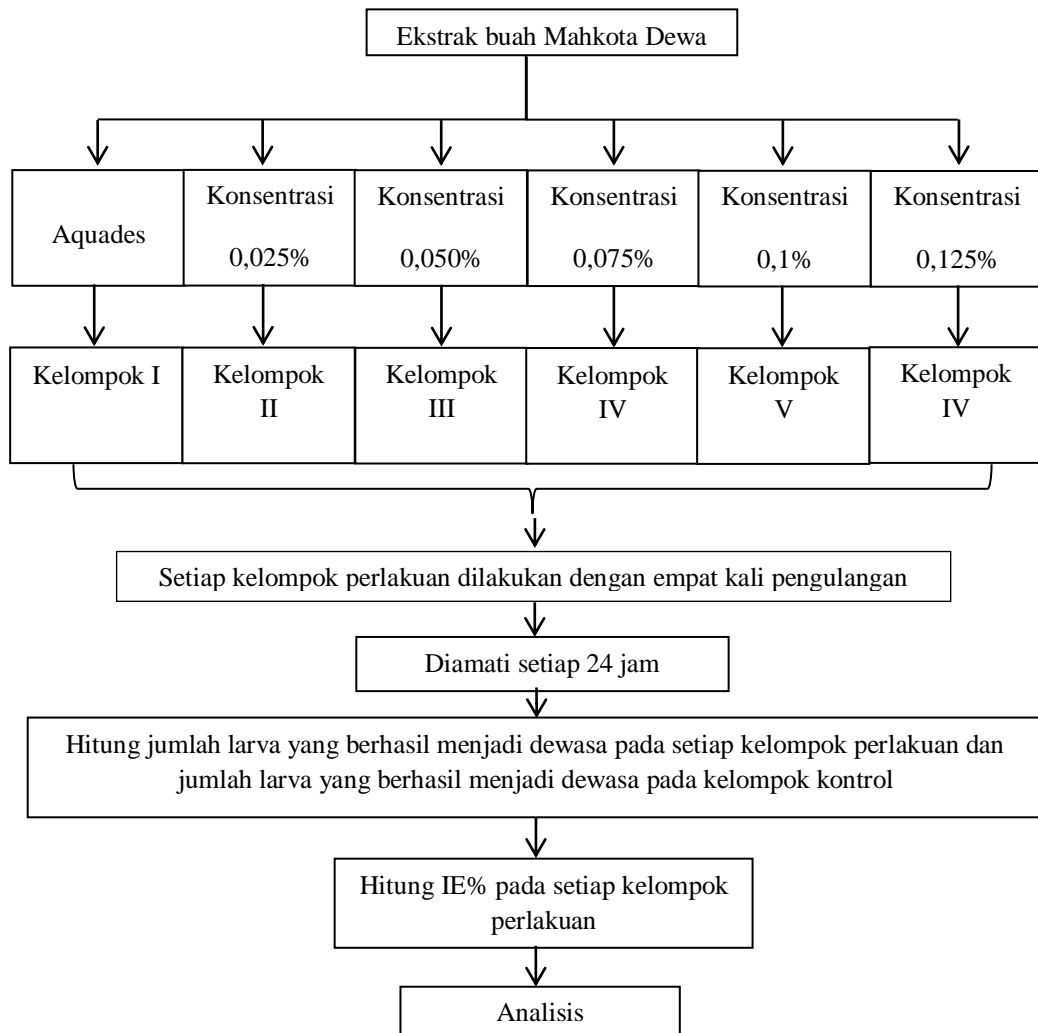
Dilanjutkan dengan pengujian LSD untuk mengetahui pasangan nilai mean yang perbedaannya signifikan. Uji ini dilakukan setelah uji anova, uji ini di maksudkan untuk mengetahui perbedaan yang bermakna pada kelompok variabel (Dahlan, 2008).

D. Analisis Probit

Dianalisis seberapa besar daya hambat ekstrak buah Mahkota Dewa terhadap perkembangan larva *Aedes aegypti* menjadi stadium dewasa yang dinyatakan dengan IE<sub>50</sub> dan IE<sub>90</sub> (WHO, 2005).

## H. Diagram Alir

Untuk memudahkan peneliti dalam melakukan proses penelitian dibuat diagram alir (Bagan 3).



**Bagan 3.** Diagram Alir Penelitian

## **I. Aspek Etik Penelitian**

Penelitian ini telah lolos kajian etik oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor 2757/UN26/8/DT/2013 (Lampiran 5).