

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

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

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Oktober 2013 di Laboratorium Zoologi dan Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva *Aedes aegypti* instar III. Telur nyamuk ini diperoleh dari Loka Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (Litbang P2B2) Ciamis dalam bentuk kering dengan media kertas saring. Untuk memudahkan dalam penentuan sampel maka dipakai kriteria inklusi dan eksklusi.

3.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Larva *Aedes aegypti* yang telah mencapai instar III

- b. Larva bergerak aktif

3.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Larva berasal dari alam bebas
b. Larva mati sebelum perlakuan

3.3.3 Besar Sampel

Berdasarkan acuan WHO (2005), pada penelitian ini dibutuhkan larva sebanyak 600 ekor (Tabel 1).

Tabel 1 : Jumlah Larva

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 Larva	600 larva

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Buah mahkota dewa sebanyak 6 kg
- Ethanol 96% sebanyak 5 L sebagai pelarut saat pembuatan stok ekstrak
- Air untuk tempat berkembang larva
- Akuades untuk melakukan pengenceran ekstrak

- e. Pelet kelinci dalam bentuk padat. Pakan berupa pelet kelinci digunakan untuk menghindari terjadinya kekeruhan pada tempat pertumbuhan larva. Pelet diberikan sebanyak 10 mg/l (WHO, 2005).

3.4.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Alat untuk preparasi bahan uji, yaitu:
 - 1) Nampan plastik ukuran 30x15 cm untuk tempat memelihara larva
 - 2) Gelas plastik ukuran ± 400 ml untuk tempat meletakkan larva 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) Toples untuk maserasi dengan ethanol 96%
 - 4) *Alumunium foil* untuk menutup toples
 - 5) Kertas saring dan labu erlenmeyer untuk memisahkan hasil maserasi dengan ampasnya
 - 6) *Rotatory Evaporator*
 - 7) Pipet ukuran 1 ml untuk mengambil ekstrak buah mahkota dewa
- c. Alat untuk Uji Efektivitas
 - 1) Gelas ukur 250 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

3.5 Identifikasi dan Definisi Operasional Variabel

3.5.1 Identifikasi Variabel

a. Variabel Bebas

Berbagai konsentrasi ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) dengan empat taraf konsentrasi yaitu 0,25%; 0,5%; 0,75%; dan 1%.

b. Variabel Terikat

Kematian larva *Aedes aegypti* instar III.

3.5.2 Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan pelaksanaan dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional (Tabel 2).

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel bebas: Berbagai konsentrasi ekstrak buah mahkota dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl)	Ekstrak buah mahkota dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl) dinyatakan dalam persen (%). Setiap konsentrasi dibuat dengan pengenceran. Pada penelitian ini dicari dosis subletalnya yaitu LC ₅₀ yang ditentukan dengan analisis probit. Efektivitas dari ekstrak buah mahkota dewa (daun yang telah dicuci, dipotong, dianginkan, diblender, dan direndam selama 1x24 jam dengan pelarut etanol 96% sehingga diperoleh suatu bentuk ekstrak) dilihat dari jumlah larva yang mati dan disesuaikan dengan parameter efektivitas menurut WHO.	Menimbang ekstrak dan menghitung dengan rumus: $V_1M_1 = V_2M_2$ Alat ukur: <i>Analytical Balance Electric, Refractometer, gelas ukur, kalkulator</i>	Didapatkan konsentrasi ekstrak buah mahkota dewa (0,25%; 0,5%; 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 ke dalam larva yang mati, dengan ciri-ciri tidak dapat meraih permukaan air atau tidak bergerak aktif ketika air digerakkan (WHO, 2005). Larva instar III berukuran 4-5 mm, berumur 3-4 hari setelah telur menetas, duri-duri dada mulai jelas, dan corong pernapasan berwarna coklat kehitaman (Aradilla, 2009).	Mengecek dan mencatat jumlah larva yang mati Parameter: Mortalitas larva <i>Aedes aegypti</i> instar III Alat ukur: <i>Hand counter, jarum tectio</i>	Larva <i>Aedes aegypti</i> yang mati (0-25 larva)	Numerik

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Preparasi bahan uji

Telur nyamuk *Aedes aegypti* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Ruang Insektarium Loka Litbang P2B2 Ciamis, Pangandaran, Jawa Barat. Telur kemudian diletakkan di dalam nampan plastik yang berukuran 30x15 cm berisi air untuk pemeliharaan larva. Telur akan menetas menjadi larva dalam waktu 1-2 hari. Telur yang sudah menetas menjadi larva dipisahkan dengan menggunakan pipet larva untuk pengolonisasian dan diberi makan pelet. Setelah usia larva mencapai instar III, larva dipindahkan dengan menggunakan pipet larva ke dalam gelas plastik yang berisi ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) dengan konsentrasi berbeda di tiap gelas.

3.6.2 Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) ini menggunakan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) yang didapat dari lingkungan sekitar tempat tinggal peneliti di daerah Rajabasa. Pelarutnya berupa etanol 96% sebanyak 5000 ml. Buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) sebanyak 6 kg yang telah didapat, dibersihkan dengan menggunakan air kemudian dicacah halus. Potongan buah mahkota dewa kemudian dikeringkan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari. Setelah kering, potongan buah mahkota dewa diblender kering (tanpa air) dan ditimbang sebanyak 1 kg kemudian direndam selama 24 jam di dalam etanol 96%. Setelah direndam, bahan tersebut disaring menggunakan kain kassa. Hasil maserasi yang disebut maserat, dipekatkan dengan suhu 40-50⁰C dalam *Rotary Evaporator*.

Penggunaan pemanas dengan suhu 40-50°C ditujukan untuk menghilangkan atau menguapkan pelarut yang masih tersisa pada ekstrak dan pada akhirnya diperoleh hasil berupa ekstrak buah mahkota dewa sebanyak 250 ml dengan konsentrasi 100%. Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan digunakan rumus $V_1M_1 = V_2M_2$ (Tabel 3).

Keterangan :

V_1 = Volume larutan yang akan diencerkan (ml)

M_1 = Konsentrasi ekstrak buah mahkota dewa yang tersedia (%)

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

M_2 = Konsentrasi ekstrak buah mahkota dewa yang akan dibuat (%)

Tabel 3. Jumlah Ekstrak Buah Mahkota Dewa 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

3.6.3 Uji Efektivitas

Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) dengan konsentrasi 0,25%; 0,50%; 0,75%; dan 1%. Uji efektivitas ini dilakukan untuk menentukan nilai LC_{50} (*Lethal Concentration* 50), LT_{50} (*Lethal Time* 50), dan konsentrasi yang paling efektif sebagai larvasida terhadap larva *Aedes aegypti* instar III. Ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria*

macrocarpa (Scheff.) Boerl) dengan berbagai konsentrasi tersebut diletakkan dalam gelas plastik.

Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) dengan menggunakan pipet larva. Perlakuan menggunakan ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) hanya diberikan pada kelompok eksperimen sebanyak 200 ml pada tiap ulangan, sedangkan pada kelompok kontrol (konsentrasi 0%) diberikan perlakuan menggunakan air sumur dengan volume 200 ml pada tiap ulangan.

Masing-masing perlakuan berisi 25 larva *Aedes aegypti* instar III dengan jumlah pengulangan sebanyak 4 kali. Jumlah pengulangan berdasarkan pada WHO *Guideline For Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides*. Menurut WHO (2005), pengukuran pada kelompok-kelompok sampel dilakukan dalam 24 jam dan peneliti membagi 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 di tiap patokan waktu.

3.6.4 Parameter Efektivitas Larvasida Buah Mahkota Dewa

Penentuan efektivitas larvasida buah mahkota dewa pada penelitian ini adalah berdasarkan WHO dan Komisi Pestisida. Menurut WHO (2005), konsentrasi dianggap memiliki efek apabila menyebabkan kematian larva uji sebesar 10-95% yang nantinya akan digunakan untuk mencari nilai *lethal concentration*.

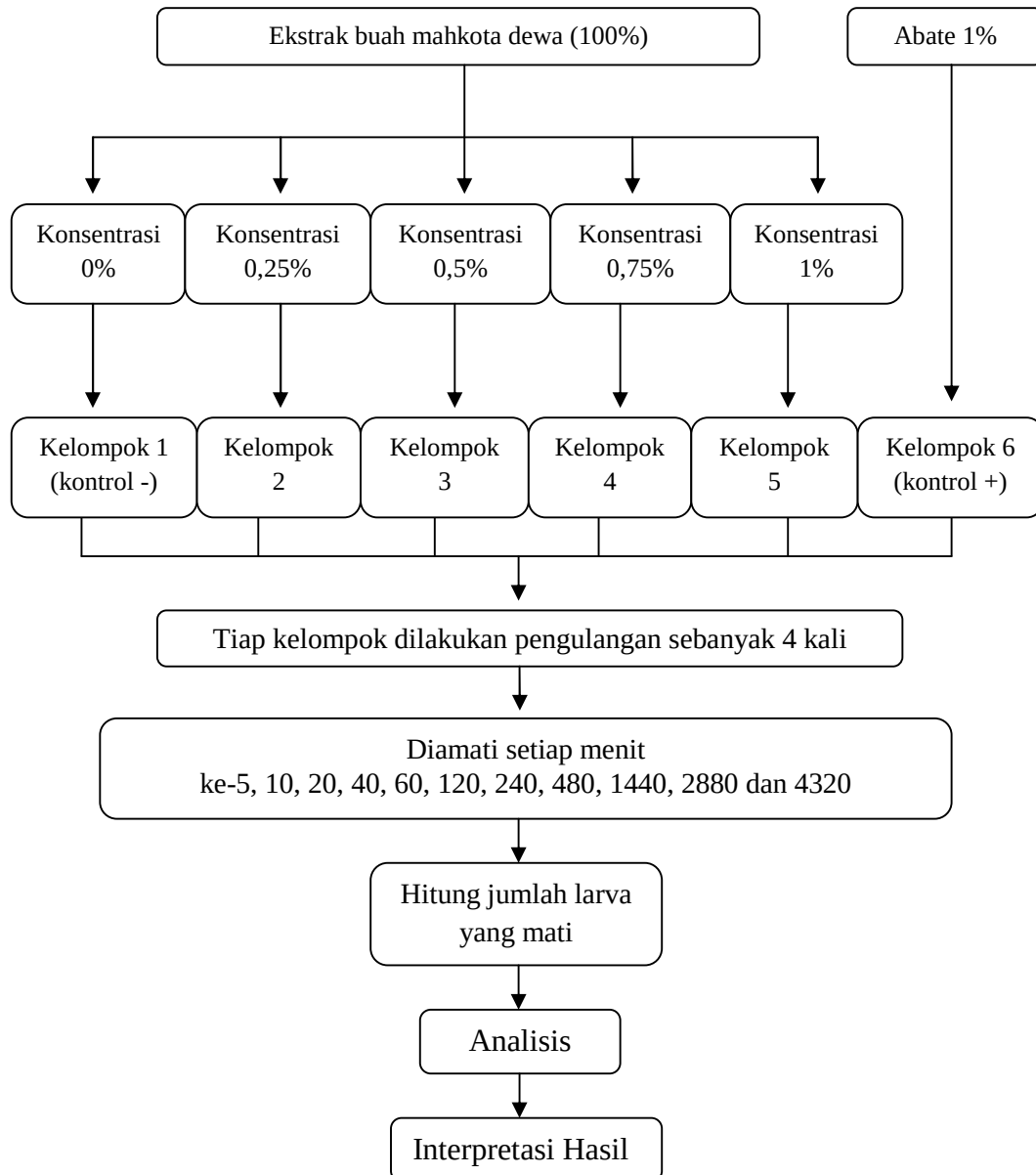
Sedangkan menurut Komisi Pestisida (1995), penggunaan larvasida dikatakan efektif apabila dapat mematikan 90-100% larva uji.

3.6.5 Menentukan Nilai LC_{50} dan LT_{50}

Kelompok perlakuan terdiri dari 1 kontrol negatif, 4 konsentrasi ekstrak buah mahkota dewa, dan 1 kontrol positif. Tiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 4 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. Setelah itu, dihitung persentase rata-rata kematian larva pada tiap kelompok perlakuan. Rata-rata kematian masing-masing kelompok perlakuan pada tiap waktu pengamatan diuji dengan menggunakan uji Probit hingga diperoleh nilai LC_{50} dan LT_{50} .

3.7 Alur Penelitian

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



Bagan 3. Diagram Alur Uji Efektivitas Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) sebagai Larvasida terhadap Larva *Aedes aegypti* Instar III

3.8 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan diuji analisis menggunakan *software* statistik. Uji yang pertama dilakukan adalah uji normalitas (*Shapiro-Wilk*). Apabila sebaran data normal, dapat dilakukan uji ANOVA satu arah untuk mengetahui adanya perbedaan antara perlakuan yang diberikan. Tetapi bila sebaran data tidak normal atau varians data tidak sama, 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 $p < 0,05$ 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*. Sedangkan, penilaian *Lethal Concentration 50 (LC₅₀)* dan *Lethal Time 50 (LT₅₀)* dilakukan dengan uji Probit.

3.9 Aspek Etik Penelitian

Telur *Aedes aegypti* didapat dari Loka Litbang P2B2 Ciamis. Pengujian larvasida dilakukan sesuai dengan metode standar uji larvasida di laboratorium yang dikeluarkan oleh WHO (2005). Pengujian ini telah mendapatkan Keterangan Lolos Kaji Etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tanggal 2 Desember 2013 melalui surat nomor 2761/UN26/8/DT/2013 (Lampiran 8).