

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 5 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 Universitas Lampung, prosedur uji efektivitas larvasida dan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, proses ekstraksi akar kecombrang (*Etlingera elatior*). Penelitian dilakukan pada bulan Oktober - November tahun 2012.

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. 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 *Aedes aegypti* instar I dan II
- 2) Larva yang sudah mati sebelum pengujian
- 3) Larva yang telah berubah menjadi pupa atau nyamuk dewasa
- 4) Bukan larva bebas

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.

Menurut acuan WHO tahun 2005, besar sampel dalam penelitian larvasida adalah 20-30 ekor larva *Aedes aegypti* instar III untuk masing-masing perlakuan dengan pengulangan sebanyak 4-5 kali untuk setiap perlakuan. Pada penelitian ini, besar sampel adalah 20 ekor larva dengan 4 kali pengulangan sehingga pada penelitian ini diperlukan total sampel sebanyak 480 larva.

Adapun rincian sampel yang digunakan adalah sebagai berikut :

Perlakuan	Jumlah larva (ekor) x jumlah pengulangan	Total (ekor)
Kontrol (-) : 0%	20 larva x 4	80 larva
Perlakuan I : 0,25%	20 larva x 4	80 larva
Perlakuan II : 0,50%	20 larva x 4	80 larva
Perlakuan III : 0,75%	20 larva x 4	80 larva
Perlakuan IV : 1%	20 larva x 4	80 larva
Kontrol (+) : Temephos	20 larva x 4	80 larva
	Jumlah total larva yang dipakai dalam penelitian	480 larva

Tabel 1. Rincian jumlah sampel penelitian

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 kasa
 3. Gelas plastik
 4. Sangkar nyamuk berukuran 40 x 40 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. akar kecombrang (*Etilingera elatior*),
- b. Larva *Aedes aegypti* instar III
- c. larutan ethanol 70 %
- 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 akar Kecombrang (*Etlingera elatior*) 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 *Lethal Concentration 50 (LC₅₀)*, *Lethal Time 50 (LT₅₀)* serta konsentrasi yang paling efektif untuk 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	Definsi	Skala
Efektivitas ekstrak Kecombrang (<i>Etlingera elatior</i>) larvasida akar	Pengaruh pemberian ekstrak Kecombrang (<i>Etlingera elatior</i>) yang dapat dilihat dari mortalitas atau jumlah kematian larva <i>Aedes aegypti</i> instar III	Kategorik

Ekstrak akar Kecombrang (<i>Etilingera elatior</i>)	Akar Kecombrang (<i>Etilingera elatior</i>) yang telah melalui prosedur pencucian dan pemotongan, dan diangin-anginkan diblender dan direndam selama 1x24 dengan pelarut ethanol sehingga diperoleh ekstrak akar Kecombrang (<i>Etilingera elatior</i>).	Kategorik
Mortalitas Larva <i>Aedes aegypti</i>	Kematian larva <i>Aedes aegypti</i> yang ditandai dengan larva yang tidak bergerak saat disentuh dengan jarum di daerah siphon atau lehernya. 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 ketika air digerakkan (WHO guideline, 2005).	Numerik
Larva instar III <i>Aedes aegypti</i>	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)	Ordinal
Berbagai konsentrasi ekstrak akar Kecombrang (<i>Etilingera elatior</i>)	Ekstrak akar Kecombrang (<i>Etilingera elatior</i>) dinyatakan dalam persen (%). Masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran. Pada penelitian ini dipakai	Ordinal

	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.	
Lethal Concentration 50 (LC ₅₀)	Merupakan konsentrasi larvasida yang dapat menyebabkan kematian pada 50 % hewan uji	Numerik
Lethal Time 50 (LT ₅₀)	Merupakan panjang waktu saat 50 % hewan uji sudah mati dan 50 % hewan uji lainnya masih hidup	Numerik
Konsentrasi efektif	Konsentrasi ekstrak akar <i>Kecombrang</i> (<i>Etlingera eltiior</i>) yang paling banyak membunuh larva <i>Aedes aegypti</i> instar III	Kategorik

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 *Ae.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 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 akar Kecombrang (*Etlintera elatior*).

c. Persiapan ekstrak akar Kecombrang

Pembuatan ekstrak akar Kecombrang (*Etlintera elatior*) ini menggunakan akar Kecombrang (*Etlintera elatior*) yang didapat dari lingkungan sekitar tempat tinggal peneliti. Akar kecombrang sebelumnya diidentifikasi terlebih dahulu di Laboratorium Kimia FMIPA Universitas Lampung.

Akar Kecombrang (*Etlintera elatior*) ditimbang sebanyak 20 g kemudian dicuci menggunakan air sampai bersih. Akar yang sudah bersih, dicacah terlebih dahulu kemudian dihaluskan menggunakan

blender kering tanpa menggunakan air. Akar kecombrang ditimbang kembali setelah halus dan dikeringkan. Pengeringan tidak boleh dilakukan langsung dibawah terik matahari karena akan menghilangkan senyawa kimia yang terkandung dalam akar kecombrang. Akar kecombrang diekstraksi menggunakan metode meserasi dan menggunakan pelarut alkohol (etanol).

Metode Maserasi adalah proses pengekstraksian simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambah pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya. (dirjen POM depkes RI, 2000)

Potongan halus akar Kecombrang direndam selama 24 jam ke dalam ethanol 70 % sebanyak 25 ml. Setelah direndam selanjutnya bahan tersebut disaring sehingga diperoleh hasil akhirnya berupa ekstrak Kecombrang dengan konsentrasi 100%. Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan digunakan rumus $V_1 M_1 = V_2 M_2$.

Keterangan :

V_1 = Volume larutan yang akan diencerkan (ml)

M_1 = Konsentrasi ekstrak akar Kecombrang yang tersedia (%)

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

M_2 = Konsentrasi ekstrak akar Kecombrang yang akan dibuat (%)

Tabel 3. Jumlah Ekstrak Akar Kecombrang 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 akar kecombrang sebagai berikut :

a) Kelompok 1

Kontrol negatif (-) : Ekstrak ethanol akar kecombrang dengan konsentrasi 0 %

b) Kelompok 2

Perlakuan I : Ekstrak ethanol akar kecombrang dengan konsentrasi 0,25 %

c) Kelompok 3

Perlakuan II : Ekstrak ethanol akar kecombrang dengan konsentrasi 0,50 %

d) Kelompok 4

Perlakuan III : Ekstrak ethanol akar kecombrang dengan konsentrasi 0,75 %

e) Kelompok 5

Perlakuan IV : Ekstrak ethanol akar kecombrang dengan konsentrasi 1 %

f) Kelompok 6

Kontrol positif (+) : Ekstrak ethanol akar kecombrang dengan penambahan temephos (abate) 1 %

2) Uji Efektivitas

Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak akar Kecombrang (*Etlintera elatior*) dengan konsentrasi 0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, dan 1 % . Uji efektifitas ini dilakukan untuk menentukan nilai LC_{50} (*Lethal Consentration 50*), LT_{50} (*Lethal Time 50*) dan konsentrasi yang paling efektif sebagai larvasida larva *Aedes aegypti*. Ekstrak akar Kecombrang (*Etlintera elatior*) dengan berbagai konsentrasi tersebut diletakkan dalam gelas plastik. Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi akar Kecombrang (*Etlintera elatior*) dengan menggunakan pipet larva. Perlakuan menggunakan ekstrak akar

Kecombrang (*Etlintera elatior*) hanya diberikan pada kelompok eksperimen sebanyak 200 ml ekstrak akar Kecombrang (*Etlintera elatior*) 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 tahun 2005.

Menurut WHO (2005) pengukuran pada kelompok-kelompok sampel dilakukan dalam 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.

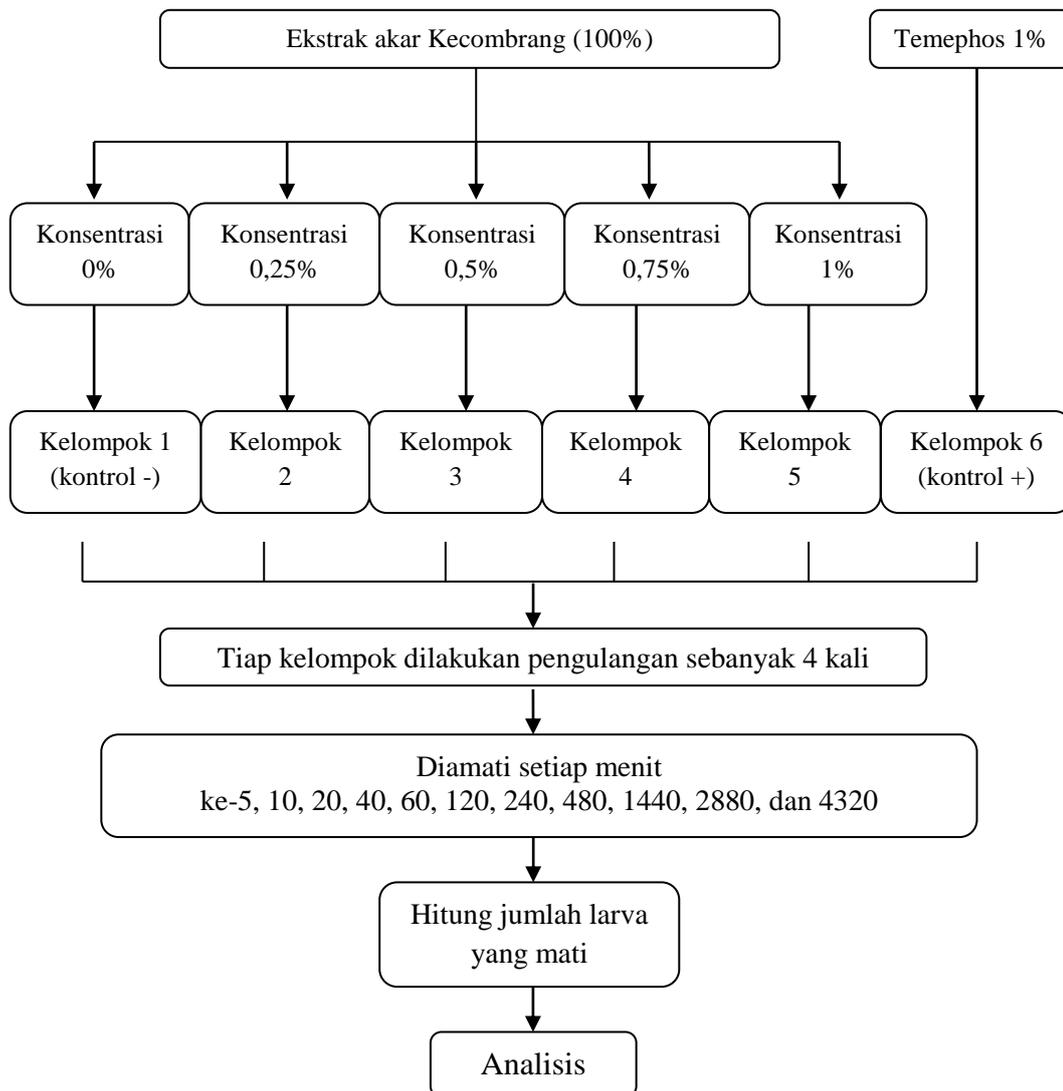
3) Menentukan Nilai LC_{50} dan LT_{50}

Kelompok perlakuan terdiri dari 1 kontrol negatif, 4 konsentrasi ekstrak akar Kecombrang 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 Akar Kecombrang (*Etlingera elatior*) sebagai Larvasid

3. Tahap Analisis Data

1) ANOVA satu arah.

Uji varian satu arah digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rata-rata kematian nyamuk *Ae. aegypti* pada berbagai kelompok konsentrasi ekstrak akar kecombrang (*Etilingera elatior*). 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. Analisis probit ini diolah dengan menggunakan program SPSS 19.0.