

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Design Penelitian**

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola *posttest only with control group design*.

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

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober-November 2014 di Laboratorium Zoologi dan Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

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

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva *Aedes aegypti*. Sampel yang digunakan pada 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.

##### **1. Kriteria Inklusi**

- a. Larva *Aedes aegypti* yang telah mencapai instar III
- b. Larva usia 4-6 hari

c. Larva bergerak aktif

## 2. Kriteria Eksklusi

Larva mati sebelum perlakuan

## 3. Besar Sampel

Berdasarkan acuan Guidline WHO (2005), disebutkan bahwa setiap seri pemeriksaan setidaknya melibatkan 4 konsentrasi, masing-masing 4 kali ulangan dari 25 larva *Aedes aegypti* instar III yang diuji, maka pada penelitian ini dibutuhkan total larva sebanyak 700 larva dengan rincian sebagai berikut:

**Tabel 1. Jumlah Total sampel**

|                        | <b>Jumlah larva x jumlah<br/>pengulangan</b>                    | <b>Total</b>     |
|------------------------|---|------------------|
| Kontrol (-) : 0%       | 25 larva x 4  | 100 larva        |
| Perlakuan I : 0,2%     | 25 larva x 4  | 100 larva        |
| Perlakuan II : 0,4%    | 25 larva x 4  | 100 larva        |
| Perlakuan III : 0,6%   | 25 larva x 4  | 100 larva        |
| Perlakuan IV : 0,8%    | 25 larva x 4  | 100 larva        |
| Perlakuan V : 1%       | 25 larva x 4  | 100 larva        |
| Kontrol (+) : Abate 1% | 25 larva x 4  | 100 larva        |
|                        | <b>Jumlah total larva yang<br/>dipakai dalam<br/>penelitian</b> | <b>700 larva</b> |

## D. Variabel Penelitian

Variabel penelitian pada penelitian ini adalah.

### 1. Variabel Bebas

Konsentrasi ekstrak ethanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*)

### 2. Variabel Terikat

Larva *Aedes aegypti* instar III yang mati

### **E. Definisi operasional**

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

Tabel 2. Definisi Operasional

| Variabel  | Definisi  | Alat Ukur                                      | Cara Ukur  | Hasil Ukur  | Skala     |
|---|---|--|--|---|-----------|
| Variabel bebas: Konsentrasi ekstrak ethanol rimpang kunyit ( <i>Curcuma domestica Val</i> ) | Ekstrak ethanol rimpang kunyit ( <i>Curcuma domestica Val</i> ) dinyatakan dalam persen (%). Setiap konsentrasi dibuat dengan pengenceran. Pada penelitian ini dicari dosis subletalnya yaitu LC <sub>50</sub> yang ditentukan dengan analisis probit. Efektivitas dari ekstrak ethanol rimpang kunyit (rimpang yang telah dipotong, dicuci, dikeringkan, diblender dan di rendam selama 1x24 jam dengan pelarut ethanol 96% sehingga diperoleh suatu bentuk ekstrak) dilihat dari jumlah larva yang mati dan disesuaikan dengan parameter efektivitas. | <i>Refractometer</i> , gelas ukur, kalkulator  | Menimbang ekstrak dan menghitung dengan rumus: $V_1M_1=V_2M_2$                                     | Konsentrasi ekstrak ethanol rimpang kunyit        | Kategorik |
| Variabel terikat: Larva <i>Aedes aegypti</i> yang mati                                      | Larva yang tidak bergerak saat disentuh dengan jarum di daerah <i>siphon</i> atau lehernya. Tubuh larva kaku. Larva yang hampir mati juga dikategorikan kedalam larva yang mati, dengan ciri-ciri tidak dapat meraih permukaan air atau tidak bergerak aktif (bergerak naik turun dari bawah ke permukaan air untuk menghirup oksigen) ketika air digerakkan (WHO, 2005). Larva instar III berukuran 4-5 mm, berumur 4-6 hari setelah telur menetas, duri-duri dada mulai jelas, dan corong pernafasan berwarna coklat kehitaman (Ditjen PP&PL, 2005)   | Alat ukur: Hand counter Jarum                  | Mencatat jumlah larva yang mati<br><br>Parameter: Mortalitas larva <i>Aedes aegypti</i> instar III | Larva <i>Aedes aegypti</i> yang mati (0-25 larva) | Numerik   |
| Efektivitas   | kemampuan untuk menghasilkan suatu efek tertentu atau menghasilkan pengaruh tertentu yang dapat diukur (Dorland, 2010).   | Parameter efektivitas WHO dan Komisi Pestisida | Membandingkan hasil perlakuan dengan parameter efektivitas   | Efektif dan tidak efektif                         | Nominal   |

## F. Alat dan Bahan Penelitian

### 1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Alat untuk preparasi bahan uji
  1. Baskom plastik dengan diameter lebih kurang 30 cm untuk tempat memelihara larva
  2. Gelas plastik ukuran 400 ml untuk tempat meletakkan larva uji
  3. Jaring nyamuk untuk menutup tempat memelihara larva
- b. Alat untuk pembuatan larutan uji
  1. Timbangan untuk menimbang rimpang kunyit yang diperlukan
  2. Blender untuk menghaluskan rimpang kunyit
  3. Botol untuk pengenceran ekstrak
  4. *Alumunium foil* untuk menutup botol
  5. Kertas saring dan *labu erlenmeyer* untuk memisahkan hasil maserasi dengan ampasnya
  6. *Rotatory evaporator*
  7. Gelas ukur untuk pengenceran larutan
  8. Pipet ukuran 1 ml untuk mengambil ekstrak rimpang kunyit
- c. Alat untuk uji efektivitas
  1. Gelas ukur 250 ml untuk mengukur jumlah air yang diperlukan
  2. Pipet larva untuk mengambil larva
  3. Lidi untuk mengetahui larva yang mati

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) sebanyak 500 gr, ethanol 96% sebanyak 970 ml sebagai pelarut saat pembuatan ekstrak, aquades sebanyak 1000 ml sebagai pengencer stock ekstrak untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan. Penelitian ini juga memerlukan pelet kelinci sebagai makanan larva.

## G. Prosedur Penelitian

### 1. Preparasi Bahan Uji

Telur nyamuk *Aedes aegypti* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Ruang Insektarium Loka Litbang P2B2 Ciamis, Pengandaran, Jawa Barat. Telur diletakkan di dalam baskom plastik yang berdiameter lebih kurang 30 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 dan diberi makan pelet. Setelah usia larva mencapai instar III (usia 4-6 hari), larva dipindahkan dengan menggunakan pipet larva ke dalam gelas plastik yang berisi ekstrak ethanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) dengan konsentrasi yang berbeda tiap gelas.

### 2. Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan ekstrak ethanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) ini menggunakan rimpang kunyit yang didapat dari lingkungan sekitar peneliti di daerah Tanjung Bintang, Kabupaten Lampung Selatan (kunyit segar yang dipanen pada usia 7-10 bulan) dengan bahan pelarut

berupa ethanol 96%. Rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) sebanyak 5 kg yang telah didapat kemudian dibersihkan dengan menggunakan air setelah itu dipotong kecil-kecil, dikeringkan dan di blender kering (tanpa air). Setelah itu, serbuk rimpang kunyit ditimbang, diambil sebanyak 500 gram untuk dibuat ekstrak. Serbuk rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) direndam selama 24 jam di dalam ethanol 96% sebanyak 1000 ml. Setelah direndam selanjutnya disaring sehingga diperoleh hasil akhir berupa ekstrak rimpang kunyit dengan konsentrasi 100%. Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan rumus  $V_1M_1=V_2M_2$ .

Keterangan :

$V_1$ = Volume larutan yang akan diencerkan (ml)

$M_1$ = Konsentrasi ekstrak ethanol rimpang kunyit yang tersedia (%)

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

$M_2$ = Konsentrasi ekstrak ethanol rimpang kunyit yang akan dibuat (%)

**Tabel 3. Jumlah Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica Val*) yang Dibutuhkan**

| <b>M1</b>    | <b>V2</b> | <b>M2</b> | <b>V1</b> | <b>Pengulangan<br/>V1 x 4</b> |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-------------------------------|
| 100%         | 200 ml    | 1%        | 2 ml      | 8 ml                          |
| 100%         | 200 ml    | 0,8%      | 1,6 ml    | 6,4 ml                        |
| 100%         | 200 ml    | 0,6%      | 1,2 ml    | 4,8 ml                        |
| 100%         | 200 ml    | 0,4%      | 0,8 ml    | 3,2 ml                        |
| 100%         | 200 ml    | 0,2%      | 0,4 ml    | 1,6 ml                        |
| <b>Total</b> |           |           |           | <b>24 MI</b>                  |

### 3. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan pada penelitian ini menggunakan larutan uji yaitu ekstrak ethanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) dengan

konsentrasi 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% dan 1%, dimana pada penelitian sebelumnya diperoleh  $LC_{50}$  dari ekstrak ethanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) sebagai larvasida terhadap larva *Aedes aegypti* instar I-IV sebesar 0,4% (Panghiyangani dkk, 2012). Uji pendahuluan ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi yang efektif yang akan digunakan dalam penelitian ini sebagai larvasida terhadap larva *Aedes aegypti*. Ekstrak ethanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) dengan berbagai konsentrasi diletakkan dalam gelas plastik. Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi ekstrak ethanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) dengan menggunakan pipet larva. Masing-masing perlakuan berisi 10 larva *Aedes aegypti* instar III (WHO, 2005), dan dilakukan tanpa pengulangan. Setelah itu dilakukan pengamatan dan dihitung jumlah larva yang mati.

Hasil uji pendahuluan menunjukkan dengan konsentrasi 0,2% sudah mampu membunuh larva sebesar 25% dan dengan konsentrasi 1% dapat membunuh larva 100%. Data ini yang akan digunakan sebagai patokan dalam menentukan konsentrasi yang akan digunakan dalam penelitian.

#### 4. Uji Efektivitas

Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak ethanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) dengan konsentrasi 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% dan 1%. Uji efektivitas ini dilakukan untuk menentukan nilai  $LC_{50}$  (*Lethal Concentration*),  $LT_{50}$  (*Lethal Time*) dan konsentrasi yang paling efektif sebagai larvasida terhadap larva *Aedes aegypti* instar III.



Larva diletakkan dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi ekstrak ethanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) dengan menggunakan pipet larva. Perlakuan menggunakan ekstrak ethanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) hanya diberikan kepada kelompok eksperimen sebanyak 200 ml pada tiap ulangan, sedangkan pada kelompok kontrol negatif (konsentrasi 0%) diberikan perlakuan menggunakan air sumur dengan volume 200 ml pada tiap ulangan dan pada kelompok kontrol positif diberikan perlakuan dengan air sumur yang diberi Abate 1% dengan volume 200 ml pada tiap ulangan.

Masing-masing perlakuan berisi 25 larva *Aedes aegypti* instar III dengan jumlah pengulangan sebanyak 4 kali. Jumlah larva uji dan jumlah pengulangan berdasarkan acuan WHO, *Guidline For Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvacides*. Menurut WHO (2005), pengukuran pada kelompok-kelompok sampel dilakukan 24 jam dan dibagi setiap interval waktu 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480 dan 1440 menit. Pengukuran berakhir pada menit ke-1440 dengan cara menghitung larva yang mati di tiap patokan waktu.

#### 5. Parameter Efektivitas Larvasida Ekstrak Ethanol Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica Val*)

WHO (2005) menyebutkan bahwa konsentrasi larvasida dianggap efektif apabila dapat menyebabkan kematian larva uji 10-95% yang nantinya akan digunakan untuk mencari nilai *lethal concentration*

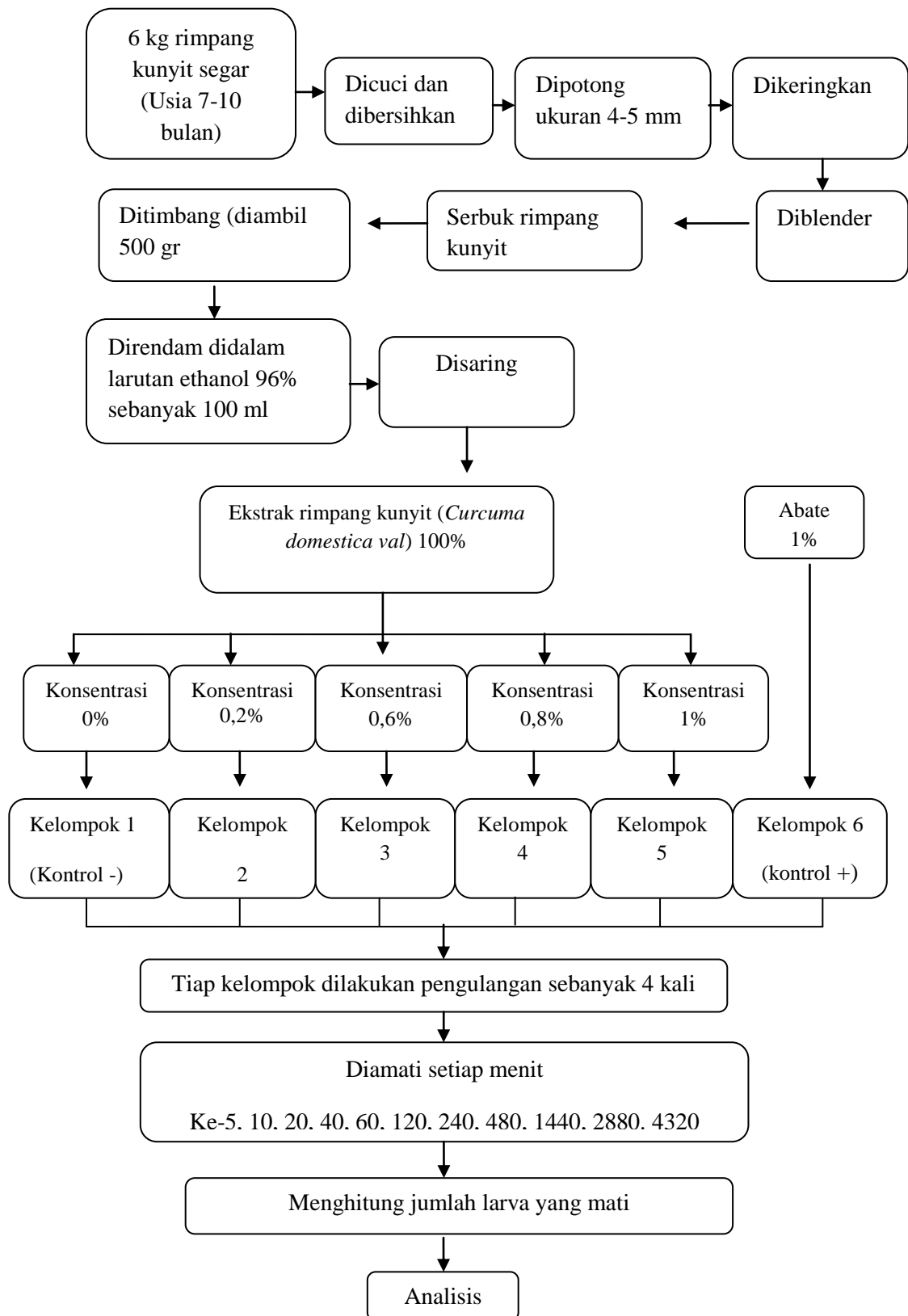
sedangkan Komisi Pesticida (1995) menyatakan bahwa penggunaan larvasida dikatakan efektif apabila dapat mematikan 90-100% larva uji.

#### 6. Menentukan Nilai $LC_{50}$ dan $LT_{50}$

Kelompok perlakuan dalam penelitian ini terdiri atas 1 kontrol negative, 4 konsentrasi ekstrak ethanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) dan 1 kontrol positif. Masing-masing 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 kemudian dihitung persentase rata-rata kematian masing-masing kelompok perlakuan pada tiap masing-masing waktu pengamatan dianalisis dengan menggunakan analisis Probit dan uji Regresi Linear Sederhana sehingga diperoleh nilai  $LC_{50}$  pada masing-masing waktu pengamatan dan total pengamatan serta  $LT_{50}$  pada masing-masing konsentrasi perlakuan dan total perlakuan..

### **H. Alur Penelitian**

Proses penelitian disajikan dalam diagram alur penelitian sebagai berikut :



**Gambar 6. Diagram alur uji ekstrak ethanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) sebagai larvasida terhadap larva *Aedes aegypti* instar III**

## I. Pengolahan dan Analisis Data

### 1. *One way* ANOVA

Uji ini dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan antara perlakuan yang diberikan maka digunakan analisis *One way* ANOVA, tetapi bila sebaran data tidak normal atau varians data tidak sama, maka dilakukan uji alternatif yaitu uji *Kruskal-Wallis*. Uji ini bertujuan untuk mengetahui paling tidak terdapat perbedaan antara dua kelompok perlakuan. Apabila dalam 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 *One way* ANOVA adalah *Bonferoni* sedangkan untuk uji *Kruskal-Wallis* adalah *Mann Whitney* (Dahlan, 2011).

### 2. Uji *Probit*

Uji ini dilakukan untuk mengetahui nilai  $LC_{50}$  pada tiap waktu pengamatan dan  $LT_{50}$  pada masing-masing konsentrasi perlakuan. *Lethal Concentration* merupakan suatu ukuran untuk mengukur daya racun dari jenis pestisida. Pada uji efektivitas ditunjukkan  $LC_{50}$  yang berarti berapa ppm atau persen konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian 50% dari hewan percobaan sedangkan *Lethal Time* atau  $LT_{50}$  adalah waktu yang diperlukan untuk membunuh 50% dari hewan percobaan. Nilai ini ditentukan dengan analisis *probit* (Dahlan, 2011). Analisis *probit* ini diolah dengan menggunakan program penghitungan komputer.

### 3. Uji Regresi Linear Sederhana

Uji ini dilakukan untuk menentukan nilai dari  $LC_{50}$  dan  $LT_{50}$  dari total perlakuan pada pengamatan berdasarkan persentase rata-rata kematian total larva yang disebabkan oleh masing-masing konsentrasi (Dahlan, 2011).

### **J. Aspek Etik Penelitian**

Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 2237/UN26/8/DT/2014. Surat lolos kaji etik terlampir.