

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan konsentrasi ekstrak ethanol daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) yaitu 0,125%, 0,25%, 0,5% dan 1% serta aquades sebagai kontrol negatif (0%) dan abate 1% sebagai kontrol positif dengan pengulangan sebanyak 4 kali.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

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

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva *Aedes aegypti* yang diperoleh dari Loka Penelitian dan Pengembangan (Litbang) Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (P2B2) Ciamis, Jawa Barat dalam bentuk kering dengan menggunakan kertas saring.

3.3.2 Sampel

a. Kriteria Inklusi

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

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Larva instar III yang mati sebelum pengamatan

c. Besar Sampel

Sampel yang digunakan berdasarkan standarisasi WHO (2005) mengenai larvasida serta Bria (2008), yaitu untuk setiap perlakuan dipakai jumlah sampel 25 larva dengan pengulangan 4 kali sehingga didapatkan jumlah total sampel 600 larva (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah Sampel (WHO, 2005; Bria, 2008)

Perlakuan	Jumlah larva x jumlah pengulangan	Total
Kontrol (-): 0%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan I : 0,125%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan II: 0,25%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan III: 0,5%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan IV: 0,1%	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 untuk penelitian ini adalah :

- a. Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.)
- b. Ethanol 96% sebanyak 5 L sebagai pelarut saat pembuatan *stock* ekstrak.
- c. Air untuk tempat berkembang larva.
- d. 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-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Alat preparasi bahan uji.
 1. Nampan plastik ukuran 30x15 cm untuk tempat memelihara larva.
 2. Gelas plastik ukuran \pm 400 ml untuk tempat meletakkan larva uji.
- b. Alat untuk pembuatan larutan uji.
 1. Timbangan untuk menimbang daun Pandan Wangi yang diperlukan.
 2. Blender untuk menghaluskan daun Pandan Wangi yang sudah kering.
 3. Stoples dan kain kasa untuk proses maserasi daun Pandan Wangi.
 4. *Rotary evaporator* untuk membuat ekstrak daun Pandan Wangi.

5. Pipet tetes untuk mengambil ekstrak daun Pandan Wangi.
 6. Gelas ukur dan botol tertutup sebagai tempat untuk ekstrak daun Pandan Wangi.
 7. Gelas ukur 100 ml untuk mengukur ekstrak daun Pandan Wangi.
- c. Alat untuk uji efektivitas.
1. Gelas ukur 250 ml untuk mengukur jumlah air yang diperlukan.
 2. Kassa 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

Konsentrasi ekstrak ethanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) dengan 4 konsentrasi yaitu 0,125%, 0,25%, 0,5% 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: Konsentrasi ekstrak ethanol daun pandan wangi (<i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb.)	Ekstrak daun pandan wangi (<i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb.) 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 daun pandan wangi (<i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb.) dicuci, dipotong, dianginkan, diblender, dan direndam selama 1x24 jam dengan pelarut ethanol 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</i> , <i>Electric</i> , <i>Refractometer</i> , gelas ukur, kalkulator	Didapatkan konsentrasi ekstrak daun pandan wangi (0,125%, 0,25%, 0,5%, dan 1%)	Ordinal
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</i> , jarum <i>tectio</i>	Larva <i>Aedes aegypti</i> yang mati (0-25 larva)	Rasio

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 ethanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) dengan konsentrasi berbeda di tiap gelas.

3.6.2 Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan ekstrak ini dilakukan sesuai dengan metode Harbone, ekstrak yang digunakan adalah daun pandan wangi yang telah dibersihkan dengan menggunakan air kemudian dicacah halus. Potongan daun pandan wangi kemudian dikeringkan dengan suhu ruangan. Setelah kering, potongan daun pandan wangi diblender kering (tanpa air) 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 40-50⁰C

ditujukan untuk menghilangkan atau menguapkan pelarut yang masih tersisa pada ekstrak *rotary* sehingga dihasilkan ekstrak pekat daun pandan wangi 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 pandan wangi yang tersedia (%)

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

M_2 = Konsentrasi ekstrak daun pandan wangi yang akan dibuat (%)

Tabel 3. Jumlah Ekstrak Daun Pandan Wangi yang Dibutuhkan

M_1	V_2	M_2	$V_1 = \frac{V_2 M_2}{M_1}$	Pengulangan ($V_1 \times 4$)
100 %	200 ml	1 %	2 ml	8 ml
100 %	200 ml	0,5 %	1 ml	4 ml
100 %	200 ml	0,25 %	0,5 ml	2 ml
100 %	200 ml	0,125 %	0,25 ml	1 ml
Total				15 ml

3.6.3. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan konsentrasi hambat optimum bahan uji yang dapat membunuh larva yang kemudian digunakan sebagai patokan pada pengujian akhir. Uji pendahuluan pada

penelitian ini menggunakan larutan uji yaitu ekstrak ethanol daun pandan wangi dengan konsentrasi 0,125%, 0,25%, 0,5% dan 1%, dimana pada penelitian sebelumnya didapatkan ekstrak cair daun pandan wangi dengan konsentrasi 0,7% dapat membunuh larva sebanyak 92%.

Ekstrak ethanol daun pandan wangi dengan berbagai konsentrasi diletakkan dalam gelas plastik. Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi ekstrak ethanol daun pandan wangi dengan menggunakan pipet larva. Masing-masing perlakuan berisi 25 larva *Aedes aegypti*, dan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali (WHO, 2005). Setelah itu dilakukan pengamatan dan dihitung jumlah larva yang mati.

3.6.4 Uji Efektivitas

Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak ethanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) dengan konsentrasi 0,125%, 0,25%, 0,5%, 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 ethanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) dengan berbagai konsentrasi tersebut diletakkan dalam gelas plastik.

Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi ekstrak ethanol daun pandan wangi (*Pandanus*

amaryllifolius Roxb.) dengan menggunakan pipet larva. Perlakuan menggunakan ekstrak ethanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) 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.

Setiap perlakuan berisi 25 larva dengan pengulangan sebanyak 4 kali. Kemudian dilakukan pengamatan setiap 6 jam sekali sampai hari ke-3 (Bria, 2008).

3.6.5 Parameter Efektivitas Larvasida Daun Pandan Wangi

Penentuan efektivitas larvasida daun pandan wangi 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.

3.6.6 Menentukan Nilai LC₅₀ dan LT₅₀

Kelompok perlakuan terdiri dari 1 kontrol negatif, 1 kontrol positif dan 5 konsentrasi ekstrak ethanol daun pandan wangi. Setiap konsentrasi dibuat sebanyak 4 perlakuan yang masing-masing berisi 25 butir telur. Kemudian dilakukan pengamatan setiap 6 jam sekali sampai hari ke-3. 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 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang telah didapat dari hasil pengamatan akan diolah dengan menggunakan *software* statistik. Data dari hasil penelitian akan dianalisis secara statistik dengan uji normalitas (*Shapiro-Wilk*). Jika distribusi data normal, dilanjutkan dengan menggunakan uji analisis *one way* ANOVA. Berikut ini adalah langkah-langkah melakukan uji analisis *one way* ANOVA:

1. Memeriksa syarat uji parametrik *one way* ANOVA untuk lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan:
 - a. Distribusi data harus normal;
 - b. Varians data harus sama;
2. Jika memenuhi syarat uji parametrik (distribusi data normal, varians sama), dipilih uji *one way* ANOVA;
3. Jika tidak memenuhi syarat, maka akan diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya distribusi menjadi normal dan varians sama. Transformasi data merupakan suatu proses untuk merubah bentuk data sehingga data siap untuk dianalisis. Banyak cara yang dapat dilakukan untuk merubah bentuk data namun yang paling sering digunakan antara lain adalah RECODE dan COMPUTE;

4. Jika variabel transformasi data memenuhi syarat (distribusi normal dan varians sama), maka dipilih uji parametrik *one way* ANOVA;
5. Jika variabel hasil transformasi tidak memenuhi syarat, maka alternatifnya dipilih uji nonparametrik Kruskal-Wallis, jika pada uji *one way* ANOVA atau Kruskal-Wallis menghasilkan nilai $p < \alpha$ ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan melakukan analisis *post Hoc* pada taraf kepercayaan 0,05 (Dahlan, 2008). Sedangkan, penilaian *Lethal Concentration 50 (LC₅₀)* dan *Lethal Time 50 (LT₅₀)* dilakukan dengan uji Probit.

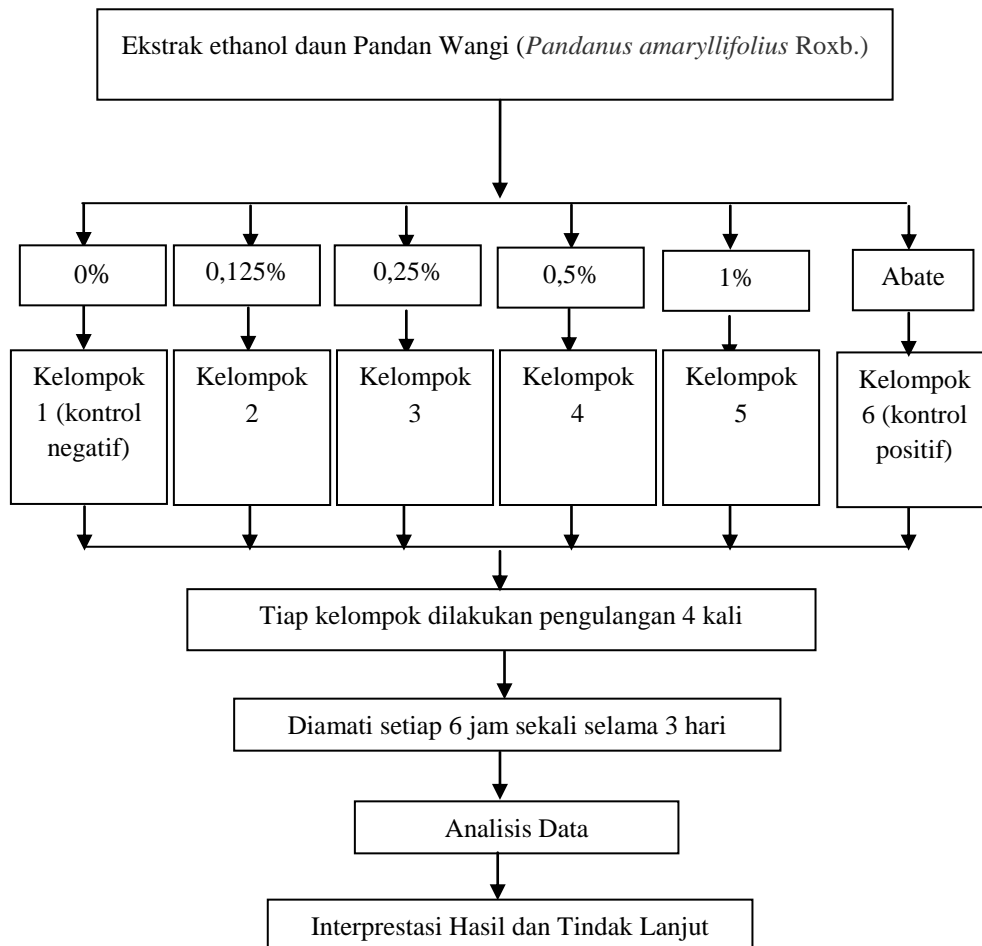
3.8 Aspek Etik Penelitian

Larva *Aedes aegypti* didapat dari Loka Litbang P2B2 Ciamis dalam bentuk telur kering dengan media kertas saring. Keadaan telur non-infeksius dan didapatkan tidak ada transmisi virus ke telur. Etika penelitian pada hewan coba menggunakan prinsip 3R, yaitu *replacement*, *reduction* dan *refinement*. *Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Sedangkan *refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Pengujian larvasida dilakukan sesuai dengan metode standar uji

larvasida di laboratorium yang dikeluarkan oleh WHO (2005). Penelitian ini telah memperoleh Keterangan Lolos Kaji Etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tanggal 3 Desember 2014 melalui surat nomor 22/7/UN26/8/DT/2014.

3.9 Alur Penelitian

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



Bagan 3. Diagram Alir Efektivitas Ekstrak Ethanol Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) sebagai Larvasida *Aedes aegypti*