

III. METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2014. Proses ekstraksi dan uji efektivitas larvasida dilaksanakan 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 *Aedes aegypti* dan sampel yang digunakan adalah larva *Aedes aegypti* Instar III. Telur nyamuk ini diperoleh dari Lokasi 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 usia 1-2 hari
2. Larva bergerak aktif

b. Kriteria Eksklusi

Larva instar III yang mati sebelum diberi perlakuan

c. Besar Sampel

Berdasarkan acuan *Guideline* 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 600 larva dengan rincian sebagai berikut :

Tabel 4. Jumlah Total Sampel

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: 0,5%	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 total larva yang dipakai dalam penelitian	600 larva

D. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat-alat yang dipakai dalam penelitian ini adalah :

a. Alat Untuk Preparasi Bahan Uji

1. Nampan plastik dengan ukuran 30x15 cm
2. Gelas plastik \pm 400 ml

b. Alat Untuk Pembuatan Larutan Uji

1. Timbangan
2. Blender
3. Toples
4. Baskom
5. Saringan
6. Gelas ukur
7. *Rotary Evaporator*

c. Alat Untuk Uji Efektivitas

1. Pipet larva
2. Pipet tetes
3. Batang pengaduk
4. Gelas ukur 250 ml
5. Kontainer atau gelas plastik
6. Kertas label

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun Pepaya (*Carica papaya L.*) sebanyak 5 Kg, ethanol 96% sebagai pelarut asat pembuatan stock ekstrak dan aquades sebanyak 200 ml sebagai pengencer stock ekstrak untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan. Penelitian ini juga memerlukan pelet kelinci sebagai makanan larva.

E. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

a. Variabel bebas

Konsentrasi ekstrak daun Pepaya (*Carica papaya L.*) dengan lima taraf konsentrasi.

b. Variabel Terikat

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 5. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara ukur	Hasil ukur	Skala
Variabel bebas: Konsentrasi ekstrak daun Pepaya (<i>Carica papaya L.</i>)	Ekstrak daun Pepaya (<i>Carica papaya L.</i>) dinyatakan dalam persen (%). Masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran. Efektivitas dari jumlah ekstrak daun pepaya dilihat dari jumlah larva yang mati dan disesuaikan dengan parameter efektivitas menurut WHO.	Menimbang ekstrak dan dimasukkan ke rumus: $V1M1=V2M2$	Didapat konsentrasi ekstrak daun pepaya 0,25%, 0,5%, 0,75% dan 1%.	Katagori
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 kedalam larva yang mati dimana ciri-ciri larva yang hampir mati adalah larva tersebut tidak dapat meraih permukaan air atau tidak bergerak aktif ketika air digerakkan (WHO, 2005).	Melihat mengecek larva dan dicatat	Larva <i>Aedes aegypti</i> yang mati (0-25 larva)	Numerik

F. Prosedur Penelitian

1. Preparasi Bahan Uji

Telur nyamuk *Aedes aegypti* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Ruang inektarium Loka Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang Ciamis, Pengandaran, Jawa Barat. Telur kemudian diletakkan di dalam nampan plastik yang berukuran 30 x 15 cm berisi air untuk pemeliharaan larva. Telur akan menetas menjadi larva dalam waktu 1-2 hari. Kemudian telur yang sudah menetas menjadi larva dipisahkan untuk pengkolonisasian dan diberi makan pelet. Setelah usia larva mencapai instar III, larva dipindahkan dengan menggunakan pipet larva ke dalam gelas plastik yang berisi ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) dengan konsentrasi berbeda pada setiap gelas.

2. Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan ekstrak ini menggunakan daun Pepaya (*Carica papaya L.*) yang didapat dari lingkungan sekitar Bandar Lampung. Pelarutan berupa ethanol 96%. Daun Pepaya (*Carica papaya L.*) sebanyak 5 Kg yang telah didapat kemudian dibersihkan dengan menggunakan air kemudian keringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah dikeringkan, dipisahkan dari tulang daunnya lalu dihaluskan atau diblender kering (tanpa air). Setelah diblender daun pepaya ditimbang kembali untuk mengetahui berat total dalam bentuk serbuk. Kemudian direndam selama 24 jam di dalam ethanol 96 %. Setelah direndam selanjutnya bahan tersebut disaring

sehingga diperoleh hasil akhirnya berupa ekstrak daun pepaya dengan 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 pepaya yang tersedia (%)

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

M_2 = Konsentrasi daun pepaya yang akan dibuat (%)

Tabel 6. Jumlah ekstrak daun pepaya yang dibutuhkan

M1	V2	M2	V1	Pengulangan V1 x 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. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan kisaran konsentrasi bahan uji yang dapat membunuh larva yang kemudian digunakan sebagai patokan dalam pengujian akhir. Pada penelitian ini dibuat 11 konsentrasi, yaitu 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% dan 1%. Masing-masing perlakuan berisi 10 larva *Aedes aegypti* dan dilakukan 2 kali pengulangan (WHO, 2005) setelah itu dilakukan pengamatan dan dihitung jumlah larva yang mati.

Hasil uji pendahuluan menunjukkan dengan konsentrasi 0,1% sudah mampu membunuh larva sebesar 5% dan dengan konsentrasi 1% dapat membunuh larva 100%. Data ini kemudian dianalisis dengan probit dan didapatkan LC_{50} pada konsentrasi 0,4%. Data ini kemudian dijadikan patokan untuk pemilihan konsentrasi pada uji akhir.

4. Uji Efektivitas

Uji efektifitas ini dilakukan untuk menentukan nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50*) dan LT_{50} (*Lethal Time 50*). Ekstrak daun Pepaya (*Carica papaya L.*) dengan berbagai konsentrasi tersebut dilakukan dalam gelas plastik. Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi daun pepaya (*Carica papaya L.*) dengan menggunakan pipet larva. Perlakuan menggunakan ekstrak daun Pepaya (*Carica papaya L.*) hanya diberikan pada kelompok eksperimen sebanyak 200 ml ekstrak daun Pepaya (*Carica papaya L.*) pada tiap ulangan, sedangkan pada kelompok kontrol diberikan perlakuan menggunakan air sumur dengan volume 200 ml dengan konsentrasi 0% pada tiap ulangan. Pada kelompok kontrol diberikan perlakuan menggunakan 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 pengulangan berdasarkan pada WHO *Guideline For Laboratory and Field Testing For Larvacide*.

Menurut WHO (2005) pengukuran pada kelompok-kelompok sampel dilakukan dalam 24 jam dan peneliti membagi pencatatan waktu selama

perlakuan yaitu dengan interval 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.

5. Parameter Efektivitas Larvasida Daun Pepaya

Efektivitas merupakan kemampuan untuk menghasilkan suatu efek tertentu atau menghasilkan pengaruh tertentu yang dapat diukur (Dorland, 2007). Suatu zat dikatakan memiliki efektivitas apabila zat tersebut mampu memberikan efek positif ataupun negatif pada zat lain setelah dilakukan intervensi (Winarsih, 2009).

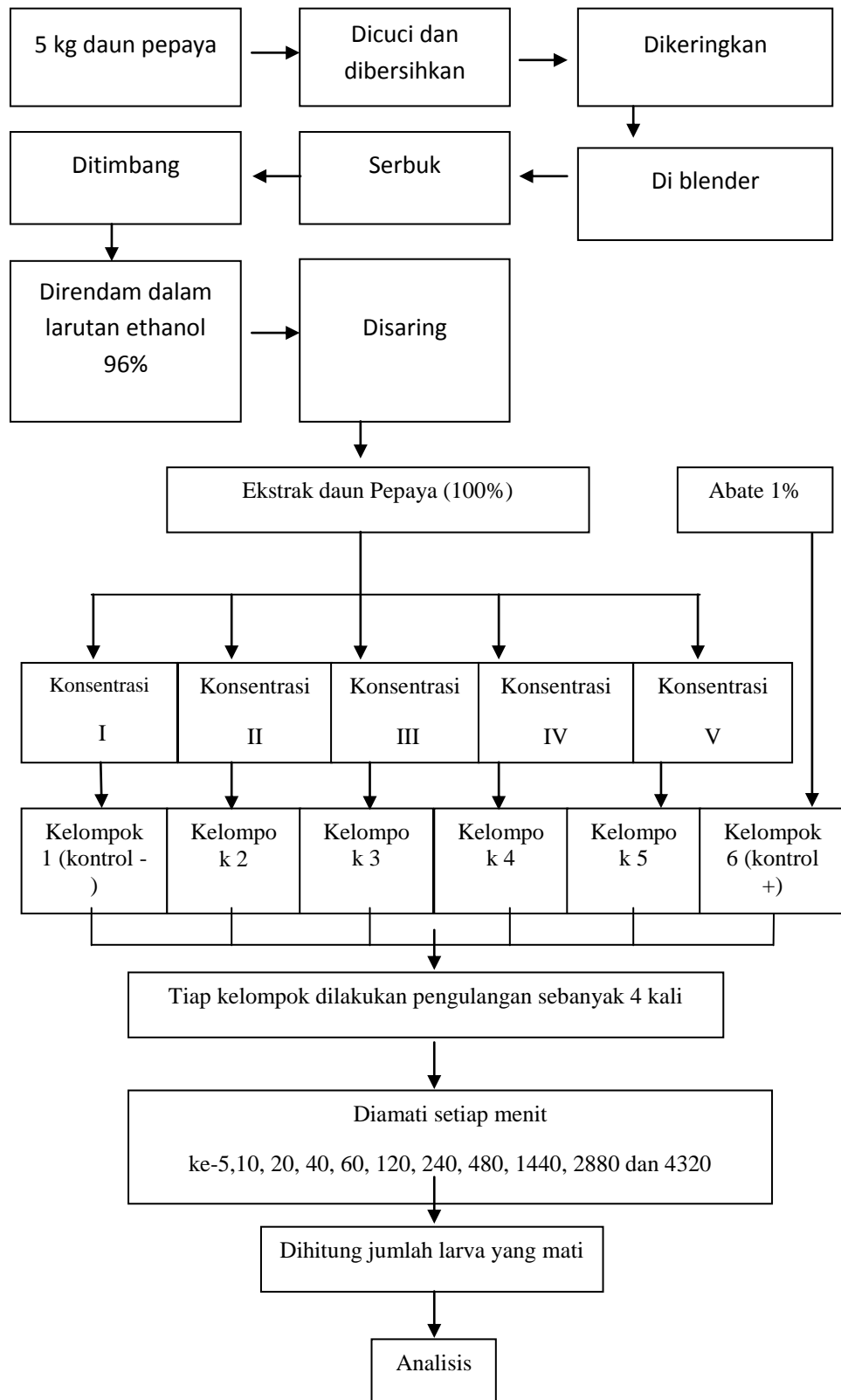
Penentuan efektivitas larvasida daun Pepaya berdasarkan WHO dan Komisi Pestisida. Menurut WHO (2005) menyebutkan bahwa konsentrasi larvasida dianggap efektivitas apabila dapat menyebabkan kematian larva uji antara 10-95% yang nantinya digunakan untuk mencari nilai *lethal concentration*. Sedangkan menurut Komisi Pestisida (1995), penggunaan larvasida dikatakan efektif apabila dapat mematikan 90-100% larva uji.

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

Pada uji akhir, kelompok perlakuan terdiri dari 1 kontrol negatif, 4 konsentrasi ekstrak daun pepaya dan 1 kontrol positif. 4 konsentrasi daun pepaya diambil berdasarkan hasil uji pendahuluan. 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 kemudian dihitung presentase rata-rata kematian larva pada tiap kelompok perlakuan. Kemudian dari rerata kematian masing-masing kelompok perlakuan pada tiap masing-masing waktu pengamatan dianalisis dengan menggunakan analisis Probit hingga diperoleh nilai LC_{50} dan LT_{50} .

G. Alur Penelitian



Gambar 8. Alur Penelitian

H. Pengolahan dan Analisis Data

Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan, kemudian dilakukan uji analisis dengan menggunakan metode *One Way ANOVA* yang kemudian dilanjutkan dengan uji probit untuk menilai keefektifan ekstrak daun Pepaya (*Carica papaya L.*)

1. One Way ANOVA

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 dapat dilakukan uji alternative yaitu *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 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 berupa ppm atau persen konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian 50% dari hewan percobaan. Nilai subletal ditentukan dengan

analisis probit, analisis probit ini diolah dengan menggunakan pengolahan data statistik.

I. Etika penelitian

Penelitian ini telah memperoleh keterangan Lolos Kaji Etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tanggal 18 November 2014 Nomor: 1957/UN26/8/DT/2014.