

III. METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Desain Penelitian pada penelitian ini adalah eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan pola *post test only control group design*.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September–Oktober 2014 di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran dan Pembuatan Ekstrak dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III. Dengan bibit telur nyamuk didapatkan dari Loka Litbang P2B2 Ciamis. Sampel pada penelitian ini dipilih berdasarkan kriteria inklusi, kriteria eksklusi dan besar sampel.

3.3.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dalam penelitian ini yaitu larva *Aedes aegypti* yang mencapai instar III dan larva bergerak aktif.

3.3.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dalam penelitian ini yaitu bukan larva bebas, larva yang bergerak pasif dan larva mati sebelum penelitian

3.3.3 Besar Sampel

Berdasarkan acuan WHO tahun 2005, jumlah sampel larva 25 dengan empat kali pengulangan. Sehingga pada penelitian ini membutuhkan total sebanyak 600 larva dengan rincian sebagai seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah total sampel

Perlakuan	Dosis	Jumlah Larva x Pengulangan	Total
Kontrol negative	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 positif	Abate	25 larva x 4	100 larva
Total			600 Larva

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian terdiri dari dua jenis, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) dengan konsentrasi 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1% dan kontrol 0%. Sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya alat-alat yang digunakan untuk preparasi bahan uji yaitu dua buah baskom dengan diameter 25 cm, kain kasa dan gelas plastik. Alat yang digunakan untuk

pembuatan larutan uji yaitu timbangan, blender, toples, baskom, saringan dan evaporator. Alat untuk uji efektifitas yaitu pipet larva, pipet tetes, batang pengaduk, gelas ukur 250 ml dan gelas plastik sebanyak 24 gelas.

3.6 Definisi Operasional

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar ruang lingkup penelitian tidak terlalu luas maka dibuat definisi operasional sebagai seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas : Berbagai konsentrasi ekstrak etanol bunga krisan (<i>Chrysanthemum morifolium</i>)	Ekstrak etanol bunga krisan (<i>Chrysanthemum morifolium</i>) didapatkan dengan proses maserasi dengan etanol dan dinyatakan dalam persen (%) dimana masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran.	Menimbang ekstrak dan menghitung dengan rumus $M1V1=M2V2$	<i>Analytical balance electric, Refractometer,</i> gelas ukur, kalkulator	Didapatkan ekstrak etanol bunga krisan dengan konsentrasi 0%, 0,25%, 0,50%, 0,75%, dan 1%	Kategorik
Variable Terikat: Larva <i>Aedes aegypti</i> instar III	Larva yang tidak bergerak saat disentuh dengan jarum di daerah <i>siphon</i> atau lehernya. Tubuh larva kaku dan larva yang hampir mati juga dikategorikan dalam larva mati. Ciri-ciri larva yang hampir mati adalah larva tersebut tidak dapat meraih permukaan air atau tidak bergerak aktif ketika air digerakan (WHO, 2005).	Mengamati pergerakan larva dan dicatat. Parameter: mortalitas larva <i>Aedes aegypti</i> instar III	<i>Hand counter,</i> jarum <i>lectio,</i> kalkulator	Larva <i>Aedes aegypti</i> instar III yang mati	Numerik
Efektivitas : Ekstrak etanol bunga Krisan (<i>Chrysanthemum morifolium</i>)	Efektif apabila dapat mematikan 90-10% larva uji (Komisi Pestisida, 1995). <i>Lethal concentration</i> 50 (LC_{50}) merupakan konsentrasi yang mampu membunuh 50% dari total jumlah larva uji. <i>Lethal Time</i> 50 (LT_{50}) merupakan waktu yang dibutuhkan untuk membunuh 50% larva uji pada konsentrasi tertentu	Analisis data dengan Uji Probit	<i>Software</i> penghitungan statistik	Mematikan 90-10% larva uji (Komisi Pestisida, 1995).	Numerik

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) ini menggunakan bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) yang didapat dari salah satu toko bunga yang terdapat di Bandar Lampung. Pelarutnya berupa etanol 96 %. Bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) sebanyak 1 kg yang telah didapat dipotong dari tangkainya kemudian dibersihkan dengan menggunakan air kemudian dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari lalu diblender kering (tanpa air). Setelah diblender serbuk bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) ditimbang terlebih dahulu. Bunga krisan yang telah diblender dan ditimbang direndam selama 24 jam didalam etanol 96 % sebanyak 100 ml. Setelah direndam selanjutnya bahan tersebut dievaporasi dalam suhu 40°C untuk memisahkan pelarut dari zat-zat yang terlarut, kemudian disaring sehingga diperoleh hasil akhirnya berupa ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) dengan konsentrasi 100%. Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan digunakan rumus sebagai berikut:

$$V_1 M_1 = V_2 M_2.$$

Keterangan :

V_1 = Volume larutan yang akan diencerkan (ml)

M_1 = Konsentrasi ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) yang tersedia (%)

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

M_2 = Konsentrasi ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) yang akan dibuat (%)

Tabel 4. Jumlah ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) 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

3.7.2 Uji Efektivitas

Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) dengan konsentrasi 0,25 %, 0,5 %, 0,75 %, dan 1 %. Uji efektifitas ini dilakukan untuk menentukan nilai LC_{50} , LT_{50} dan konsentrasi yang paling efektif sebagai larvasida terhadap larva *Aedes aegypti*. Ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) dengan berbagai konsentrasi tersebut diletakkan dalam gelas plastik. Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) dengan menggunakan pipet larva. Masing-masing perlakuan berisi 25 larva *Aedes aegypti* instar III dengan jumlah pengulangan sebanyak 4 kali.

Menurut WHO (2005) pengamatan pada setiap kelompok sampel dilakukan dalam 4320 menit dan peneliti membagi pencatatan waktu

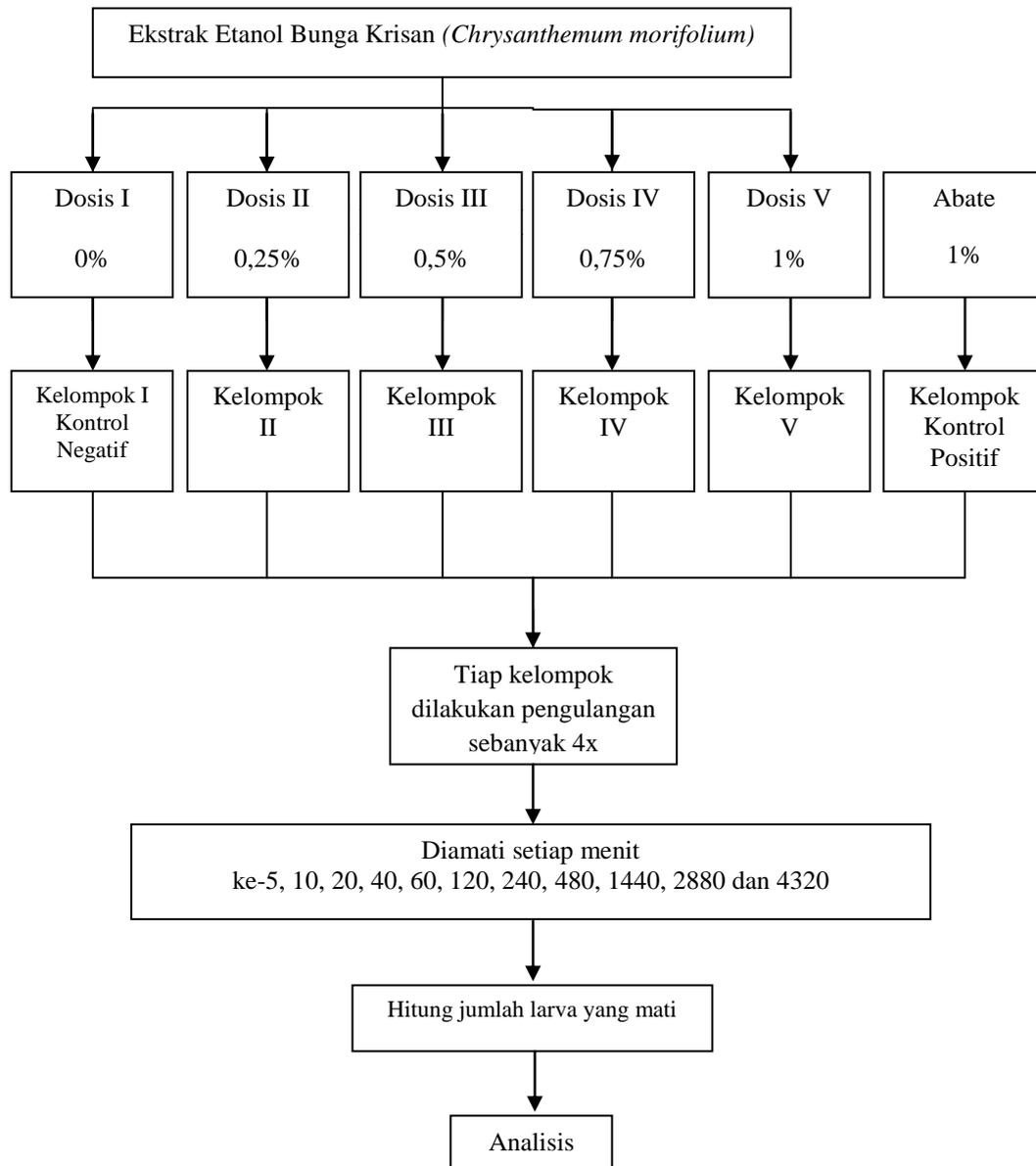
selama perlakuan yaitu dengan interval waktu 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480, 1440, 2880 dan 4320. Pengukuran berakhir pada menit ke 4320 dengan cara menghitung larva yang mati disetiap waktu pengamatan.

3.7.3 Menentukan Nilai LC₅₀ dan LT₅₀

Kelompok perlakuan terdiri dari satu kontrol negatif, empat konsentrasi ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) dan satu kontrol positif. Jumlah total larva adalah 600 larva yang dibagi menjadi 25 larva disetiap konsentrasi pada satu kali pengulangan. Penentuan nilai LC₅₀ dan LT₅₀ dengan analisis probit menggunakan *software* statistik pada komputer. Nilai LC₅₀ diperoleh dengan menghitung jumlah larva yang mati disetiap waktu pengamatan, sedangkan nilai LT₅₀ diperoleh dengan menghitung kematian larva disetiap kelompok konsentrasi.

3.8 Alur Penelitian

Ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) diencerkan dalam berbagai konsentrasi yaitu konsentrasi 0%, 0,25%, 0,5%, 0,75% dan 1 % yang kemudian diujikan pada larva *Aedes aegypti* yang telah dikelompokkan dimana setiap kelompok terdiri dari 25 larva *Aedes aegypti* instar III dan dilakukan pengulangan sebanyak empat kali, dengan alur penelitian seperti pada Gambar 15.



Gambar 15. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

3.9.1 Uji Normalitas Data

Pada data yang diperoleh dilakukan uji normalitas data yaitu dengan *Shapiro Wilk*. Uji normalitas data ini dilakukan pada data dengan sampel kurang dari 50.

3.9.2 Analisis Bivariat

Untuk mengetahui adanya perbedaan antara perlakuan yang diberikan maka digunakan analisis bivariat *One Way Anova*, tetapi bila sebaran data tidak normal atau varian 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 $p < 0.05$ maka dilakukan analisis *Post Hoc* untuk mengetahui kelompok perlakuan yang bermakna. Uji *Post Hoc* untuk *One Way Anova* adalah *Bonferroni* sedangkan untuk *Kruskal Wallis* adalah *Mann Whitney*.

3.9.3 Uji probit

Untuk menilai toksisitas suatu insektisida dapat menggunakan suatu metode pengujian dengan analisis probit. *Lethal Concentration* merupakan suatu ukuran untuk mengukur daya racun dari jenis pestisida terhadap serangga uji. Pada uji efektifitas ditunjukkan LC_{50} yang berarti berapa persen konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian 50% dari hewan percobaan. LT_{50} merupakan waktu yang

dibutuhkan untuk mematikan 50% larva uji. Nilai subletal ditentukan dengan analisis Probit. Analisis ini diolah dengan *software* penghitungan statistik pada komputer.

3.10 Etik Penelitian

Penelitian uji efektifitas ekstrak etanol bunga krisan (*Chrysanthemum morifolium*) sebagai larvasida larva *Aedes aegypti* instar III telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 1938/UN26/DT/2014. Surat lolos kaji etik terlampir.