

III. METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental laboratorium, dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan melihat pengaruh konsentrasi 50% dan 90% *inhibition of adult emergence* (IE₅₀ dan IE₉₀) dari ekstrak bawang putih (*Allium sativum L.*) dalam menghambat perkembangan larva *Aedes aegypti* menjadi stadium nyamuk dewasa.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2014 di :

1. Laboratrium Kimia dasar, jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung untuk pembuatan ekstraksi.
2. Laboratorium Zoologi, jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung untuk pengembangbiakan dan uji efektifitas.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva instar III *Aedes aegypti*. Telur nyamuk ini diperoleh dari Loka Litbang P2B2 (Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang) Ciamis dalam bentuk kering dengan media kertas saring.

2. Sampel Penelitian

a. Kriteria Inklusi

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

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Larva mati sebelum perlakuan
- 2) Larva berasal dari alam bebas

3. Besar Sampel

Berdasarkan pedoman WHO (2005), penelitian mengenai uji larvasida menggunakan 20 larva sampai 30 larva pada setiap kelompok uji. Peneliti menggunakan 25 larva pada setiap kelompok uji. Pada penelitian ini terdapat 6 kelompok uji dengan 4 kali pengulangan pada setiap kelompok uji, maka pada penelitian ini dibutuhkan total larva sebanyak 600 larva. Rincian jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Jumlah Sampel yang Digunakan dalam Penelitian

Perlakuan	Jumlah Larva X Jumlah	
	Pengulangan	Total
Kontrol (-): 0%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan I: 0,025%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan II: 0,050%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan III: 0,075%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan IV: 0,1%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan V: 0,125%	25 larva x 4	100 larva
	Jumlah total larva yang dipakai dalam penelitian	600 larva

D. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bawang putih (*Allium sativum L.*) yang telah dihancurkan sebanyak 3 g, ethanol 96% sebanyak 3 ml sebagai pelarut dan aquades untuk tempat berkembang larva serta untuk melakukan pengenceran ekstrak. Waktu penelitian yang cukup panjang sehingga penelitian ini juga memerlukan pelet kelinci dalam bentuk padat sebagai makanan larva. Pakan berupa pelet kelinci digunakan untuk menghindari terjadinya kekeruhan pada tempat pertumbuhan larva. Pelet diberikan sebanyak 10 mg/l (WHO, 2005).

2. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

a. Alat untuk preparasi bahan uji, yaitu:

- 1) Nampan plastik ukuran 30 x 15 cm untuk tempat memelihara larva.

- 2) Kain kasa untuk memisahkan larva dengan air.
 - 3) Gelas plastik ukuran ± 400 ml untuk tempat meletakkan larva uji.
 - 4) Sangkar nyamuk untuk meletakkan gelas tersebut pada waktu dilakukan uji.
- b. Alat untuk pembuatan ekstrak bawang putih, yaitu:
- 1) Timbangan untuk menimbang bawang putih yang diperlukan.
 - 2) Blender untuk menghaluskan bawang putih.
 - 3) Baskom plastik sebagai tempat atau wadah ekstrak.
 - 4) Gelas plastik untuk merendam bawang putih yang telah dihaluskan dengan ethanol 96%.
 - 5) Alumunium foil untuk menutup gelas saat melakukan ekstraksi.
 - 6) Saringan untuk memisahkan ekstrak ethanol bawang putih dengan ampasnya.
 - 7) Pipet ukuran 1 ml untuk mengambil ekstrak bawang putih.
- c. Alat untuk Uji Efektivitas
- 1) Gelas ukur untuk mengukur jumlah air yang diperlukan.
 - 2) Kasa 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.

E. Prosedur Penelitian

Penelitian dibagi dalam 2 tahap, yaitu:

1. Tahap Persiapan

a. Preparasi Bahan Uji

Telur nyamuk *Aedes aegypti* yang dipakai pada penelitian ini diperoleh dari Ruang Insektarium Loka Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang Ciamis, Pangandaran, Jawa Barat. Bawang putih diperoleh dari kota Bandar Lampung.

b. Rearing Larva

Telur nyamuk dipindahkan ke dalam sebuah nampan yang berisi media air selama 1-2 hari sampai telur menetas dan menjadi larva. Larva akan berkembang dari stadium I sampai III yang berlangsung selama 4-5 hari. Selama masa perkembangannya larva tersebut diberi pakan berupa pelet.

c. Pembuatan Ekstrak Bawang Putih

Disiapkan ekstrak bawang putih yang diperoleh dari kota Bandar Lampung. Pembuatan ekstrak bawang putih ini menggunakan pelarut berupa ethanol 96%. Bawang putih sebanyak 3 g yang telah didapat kemudian dibersihkan dengan menggunakan air kemudian dicacah halus atau diblender (tanpa air). Setelah diblender potongan bawang putih ditimbang terlebih dahulu baru kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, potongan bawang putih direndam selama 24 jam di dalam *ethanol* 96% sebanyak 3 ml. Setelah direndam selanjutnya bahan tersebut disaring sehingga

diperoleh hasil akhirnya berupa ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 100%. Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan rumus:

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

Keterangan:

V1 = volume larutan mula-mula

M1 = konsentrasi mula-mula

V2 = volume larutan sesudah diencerkan

M2 = konsentrasi sesudah diencerkan

Tabel 2. Jumlah Ekstrak Bawang Putih yang Dibutuhkan pada Penelitian

X1	V2	X2	$V_1 = \frac{V_2 \cdot X_2}{X_1}$	Pengulangan (V1 x 4)
100%	200 ml	0,025%	0,05 ml	0,2 ml
100%	200 ml	0,050%	0,10 ml	0,4 ml
100%	200 ml	0,075%	0,15 ml	0,6 ml
100%	200 ml	0,1%	0,20 ml	0,8 ml
100%	200 ml	0,125%	0,25 ml	1 ml
			Total	3 ml

- d. Disiapkan aquades ±4800 ml sebagai media dalam penelitian ini.
- e. Disiapkan 24 buah gelas plastik ukuran ±400 ml sebagai wadah media dalam penelitian ini.
- f. Disiapkan gelas ukur dengan ukuran 100 ml untuk mengukur media.

- g. Disiapkan pipet ukur dengan ukuran 1 ml untuk mengukur ekstrak bawang putih
- h. Disiapkan 6 buah lidi yang digunakan untuk menyentuh larva agar diketahui ada respon gerakan atau tidak.

2. Tahap Penelitian

Larutan uji merupakan ekstrak ethanol bawang putih (*Allium sativum L.*) dengan konsentrasi 0% sebagai kontrol negatif dan konsentrasi 0,025%; 0,050%; 0,075%; 0,1%; 0,125% sebagai perlakuan yang ditambahkan pada masing-masing gelas uji. Kontrol negatif hanya menggunakan aquades sebanyak 200 ml dengan kedalaman 5-10 cm. Efek bawang putih dalam menghambat perkembangan larva menjadi stadium dewasa dievaluasi dengan mengikuti pedoman standar pengujian *Insect Growth Regulators* (WHO, 2005).

Menurut pedoman WHO (2005) larva instar III *Aedes aegypti* yang digunakan dalam pengujian ini. Durasi pengujian yang panjang maka larva harus diberi makan (pelet kelinci) 10 mg/l dengan cara yang sama pada masing-masing perlakuan dengan interval pemberian selama 2 hari. Larva kontrol juga diberi makan dengan cara yang sama dengan larva perlakuan. Gelas-gelas uji dan kontrol ditutup dengan menggunakan kasa nilon agar terhindar dari kotoran dan serangga yang masuk kemudian disimpan di dalam sangkar nyamuk selama waktu uji untuk mencegah

stadium dewasa terbang ke lingkungan luar. Mortalitas larva dan pupa dicatat setiap 24 jam (WHO, 2005).

Pada akhir pengamatan pengaruh bawang putih terhadap perkembangan larva *Aedes aegypti* dinilai sebagai persentase jumlah larva yang tidak berhasil berkembang menjadi nyamuk dewasa yang viabel (*Adult Emergence Inhibition*, IE%). Eksperimen selesai ketika semua larva atau pupa pada kontrol mati atau berubah menjadi stadium dewasa. Kemudian dilakukan analisis untuk mendapatkan nilai IE₅₀ dan IE₉₀.

F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

a. Variabel Independen

Variabel independen adalah konsentrasi ekstrak bawang putih (*Allium sativum L.*).

b. Variabel Dependen

Variabel dependen adalah persentase jumlah larva yang tidak berhasil menjadi stadium nyamuk dewasa (*Adult Emergence Inhibition*, IE%).

2. Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Ekstrak bawang putih (<i>Allium sativum L.</i>)	bawang putih (<i>Allium sativum L.</i>) yang telah dicuci dan dipotong-potong, diangin-anginkan,	Gelas ukur 100 ml dan timbang-	Ditimbang bawang	Kadar (%)	Numerik

	<i>sativum L.</i>)	diblender dan direndam selama 24 jam dengan ethanol 96% kemudian disaring dan diperoleh konsentrasi sebesar 100%.	an.	putih /ml pelarut.		
2	Berbagai konsentrasi ekstrak bawang putih (<i>Allium sativum L.</i>)	Ekstrak bawang putih dinyatakan dalam persen (%). Masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran. Pada penelitian ini dipakai konsentrasi 0,025%; 0,050%; 0,075%; 0,1%; 0,125% dan kontrol 0% yang kemudian dicari dosis untuk menghambat 50% and 90% perkembangan larva menjadi stadium dewasa atau <i>inhibition of adult emergence</i> (IE ₅₀ and IE ₉₀).	Gelas ukur 100 ml dan pipet ukur 1 ml	Dengan menggunakan pipet ukur ambil konsentrasi larutan yang diujikan	Cairan dalam mililiter	Numerik
3	Larva <i>Aedes aegypti</i>	Pada penelitian ini digunakan larva <i>Aedes aegypti</i> yang telah mencapai instar III (WHO, 2005), dengan ciri larva <i>Aedes aegypti</i> berukuran 4-5 mm berumur tiga sampai empat hari setelah telur menetas, duri-duri dada mulai jelas dan corong pernapasan berwarna coklat kehitaman.	Kaca pembesar	-	-	-

4	Persentase jumlah larva <i>Aedes aegyti</i> yang tidak berhasil menjadi stadium nyamuk dewasa (<i>Adult Emergence Inhibition</i> , IE%)	<i>Adult Emergence Inhibition</i> dihitung berdasarkan rumus pada pedoman WHO (2005), yaitu: $IE (\%) = 100 - \left(\frac{T \times 100}{C} \right)$ Keterangan: T : persentase jumlah larva yang berhasil menjadi dewasa pada kelompok perlakuan C: persentase jumlah larva yang berhasil menjadi dewasa pada kelompok kontrol	Kaca pembesar	Dihitung secara manual kemudian dihitung dengan rumus IE% WHO	<i>Adult Emergence Inhibition</i> , IE%	Numerik
5	Jumlah larva <i>Aedes aegyti</i> yang tidak berhasil menjadi nyamuk stadium dewasa	Jumlah larva dan pupa yang mati dan hampir mati, serta jumlah nyamuk dewasa yang tidak sempurna terpisah dari <i>pupal case</i> (WHO, 2005). Keterangan: Larva atau pupa yang mati dan hampir mati yaitu larva atau pupa yang tidak bergerak saat disentuh dengan jarum atau larva atau pupa tidak dapat meraih permukaan air dan tidak bergerak ketika air digerakkan (WHO, 2005).	Kaca pembesar	Dihitung secara manual	Jumlah larva yang tidak berhasil mencapai stadium dewasa	Numerik
6	Jumlah larva <i>Aedes aegyti</i>	Jumlah larva yang berhasil menjadi stadium dewasa dihitung dari jumlah <i>pupal case</i> yang kosong (WHO,	Kaca pembesar	Dihitung secara manual	Jumlah <i>pupal case</i> yang	Numerik

yang 2005).
berhasil
menjadi
stadium
nyamuk
dewasa

G. Analisis Data

Data yang diperoleh di uji analisis statistik menggunakan program software statistik. Data hasil penelitian dianalisis secara statistik menggunakan:

1. Uji normalitas data yaitu uji Saphiro-Wilk, jika hasilnya $> 0,05$ maka distribusi data normal maka dapat menggunakan uji parametrik anova, tapi jika distribusi data tidak normal (hasilnya $< 0,05$) menggunakan uji alternatif yaitu uji Kruskal Wallis.

2. Analisis varians (*Analysis of Variance* / ANOVA)

Dilakukan pengujian untuk mengetahui apakah ada perbedaan nilai IE% *Aedes aegypti* antar kelompok uji. Uji ini di pilih untuk melihat perbedaan pada data variabel numerik lebih dari 2 kelompok (Dahlan, 2008).

3. *Least Significance Difference* (LSD)

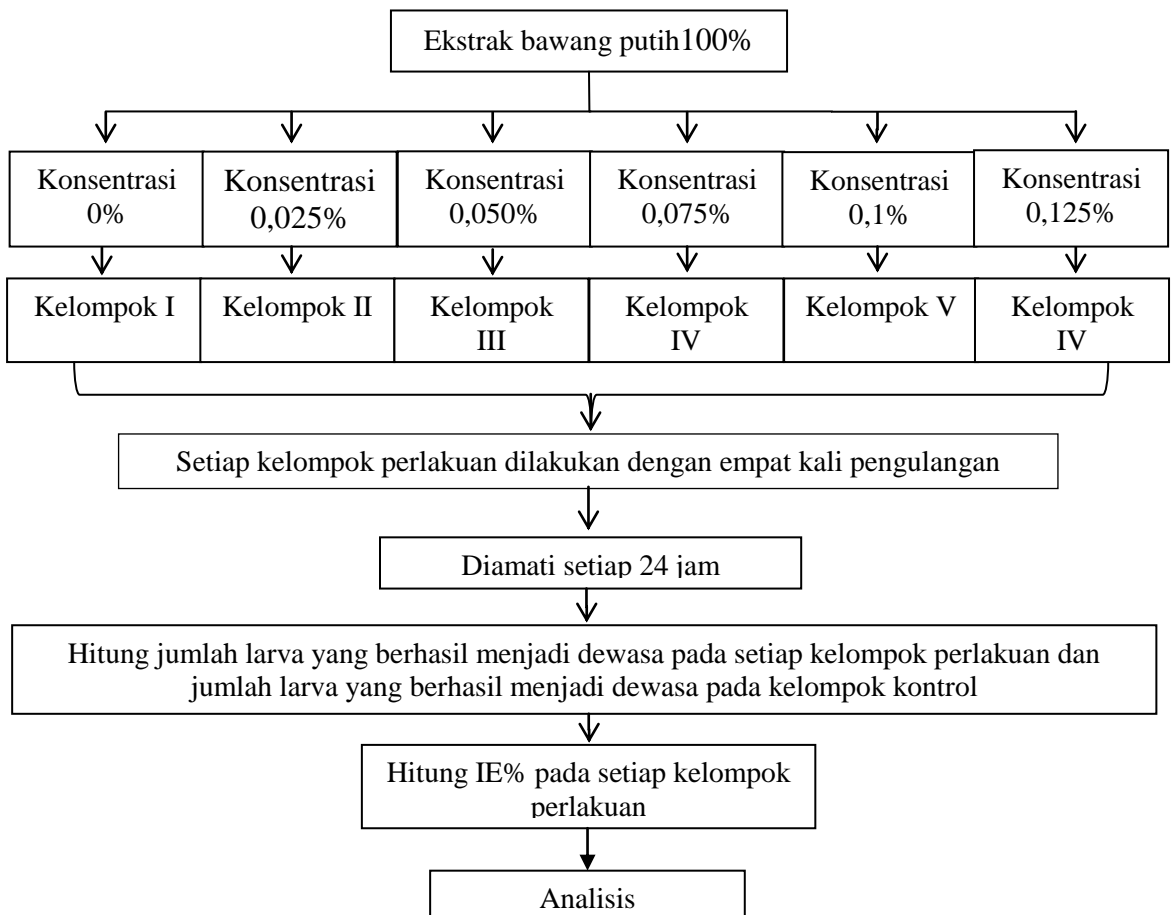
Dilanjutkan dengan pengujian LSD untuk mengetahui pasangan nilai mean yang perbedaannya signifikan. Uji ini dilakukan setelah uji anova, uji ini di maksudkan untuk mengetahui perbedaan yang bermakna pada kelompok variabel (Dahlan, 2008).

4. Analisis Probit

Dianalisis seberapa besar daya hambat ekstrak bawang putih terhadap perkembangan larva *Aedes aegypti* menjadi stadium dewasa yang dinyatakan dengan IE_{50} dan IE_{90} .

H. Diagram Alir

Untuk memudahkan peneliti dalam melakukan proses penelitian dibuat diagram alir seperti dibawah ini:



Gambar 11. Diagram Alir Penelitian