

### **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 di dua tempat berbeda. Proses ekstraksi dan fraksinasi laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung dan uji efektivitas larvasida dilakukan di Laboratrium Parasitologi Fakultas Kedokteran, pada bulan Maret-April 2012.

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

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva instar III *Aedes aegypti*. Telur nyamuk ini diperoleh dari Loka 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
- 2) Larva bergerak aktif

**b. Kriteria Eksklusi**

- 1) Bukan larva bebas

**c. Besar Sampel**

Berdasarkan acuan WHO (2005), maka pada penelitian ini dibutuhkan total larva sebanyak 480 larva dengan rincian sebagai berikut :

**Tabel 1** : Jumlah Total Sampel

<b>Perlakuan</b>	<b>Jumlah larva x jumlah pengulangan</b>	<b>Total</b>
Kontrol (-) : 0%	20 larva x 4	80 larva
Perlakuan I : 0,25%	20 larva x 4	80 larva
Perlakuan II : 0,50%	20 larva x 4	80 larva
Perlakuan III : 0,75%	20 larva x 4	80 larva
Perlakuan IV : 1%	20 larva x 4	80 larva
Kontrol (+) : Abate	20 larva x 4	80 larva
	Jumlah total larva yang dipakai dalam penelitian	480 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 30 x 15 cm

2. Kain kasa
  3. Gelas plastik
  4. Sangkar nyamuk berukuran 40 x 40 x 40 cm
- b. Alat Untuk Pembuatan Larutan Uji
- Ekstraksi
1. Timbangan
  2. Blender
  3. Toples
- Fraksinasi
1. Alat penguap vakum putar/ *rotary evaporator* (Buchi)
  2. Erlenmeyer
- c. Alat Untuk Uji Efektifitas
1. Pipet larva
  2. Pipet tetes
  3. Batang pengaduk
  4. Gelas ukur 250 ml
  5. Kontainer atau gelas plastik

## **2. Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah

- a. batang kecombrang (*Etilingera elatior*),
- b. ethanol 96 %
- c. aquades

d. Larutan n-heksana

e. Pelet kelinci.

## E. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

### 1. Identifikasi Variabel

Variabel pada penelitian ini terdiri atas :

#### a. Variabel Bebas

Berbagai konsentrasi fraksi n-heksana ekstrak batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) dengan lima taraf konsentrasi yaitu 0 %, 0,25 %, 0,5 %, 0,75 % dan 1 %.

#### b. Variabel Terikat

Kematian larva *Aedes aegypti* instar III.

### 2. Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian lebih spesifik maka dibuat definisi operasional sebagai berikut :

**Tabel 2.** Definisi Operasional

Variabel	Definsi
Efektivitas larvasida fraksi n-heksana ekstrak batang Kecombrang ( <i>Etlintera elatior</i> )	Efek fraksi n-heksana ekstrak batang Kecombrang ( <i>Etlintera elatior</i> ) yang dapat dilihat dari jumlah larva yang mati
Ekstrak batang Kecombrang ( <i>Etlintera elatior</i> )	Batang Kecombrang ( <i>Etlintera elatior</i> ) yang telah dicuci dan dipotong-potong, dan diangin-anginkan diblender dan direndam selama 1x24 dengan pelarut ethanol sehingga diperoleh ekstrak batang Kecombrang ( <i>Etlintera elatior</i> )
fraksi n-heksana ekstrak batang Kecombrang ( <i>Etlintera elatior</i> )	Fraksi yang didapat dari ekstrak batang kecombrang kental yang

	dilarutkan dalam pelarut n-heksana
Larva <i>Aedes aegypti</i> yang mati	Larva yang tidak bergerak saat disentuh dengan jarum di daerah siphon atau lehernya. 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 ketika air digerakkan (WHO guideline, 2005).
Larva instar III <i>Aedes aegypti</i>	Larva instar III berukuran 4-5 mm berumur tiga sampai empat hari setelah telur menetas, duri-duri dada mulai jelas dan corong pernapasan berwarna coklat kehitaman (Sikka, 2009)
Berbagai konsentrasi ekstrak batang Kecombrang ( <i>Etingera elatior</i> )	Ekstrak batang Kecombrang ( <i>Etingera elatior</i> ) dinyatakan dalam persen (%). Masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran. Pada penelitian ini dipakai konsentrasi 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1% dan kontrol 0% yang kemudian akan dicari dosis subletalnya yaitu LC <sub>50</sub> yang akan ditentukan dengan analisis probit.

## F. Prosedur Penelitian

### 1. Preparasi bahan uji

Telur nyamuk *Ae.aegypti* yang akan digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Ruang Insektarium Loka Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang Ciamis, Pangandaran, 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 dengan menggunakan kasa untuk

pengkolonisasi dan diberi makan pelet. Setelah usia larva mencapai instar III larva dipindahkan dengan menggunakan pipet larva ke dalam gelas plastik yang berisi ekstrak batang Kecombrang (*Etlintera elatior*).

## 2. Pembuatan Larutan Uji

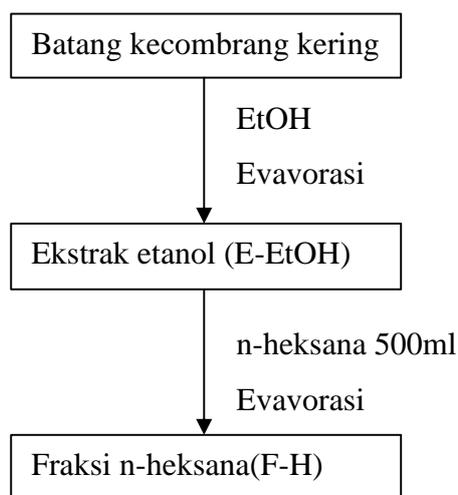
### a. Pembuatan Ekstak Batang Kecombrang

Pembuatan ekstrak batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) ini menggunakan batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) yang didapat dari lingkungan sekitar tempat tinggal peneliti. Pelarutnya berupa ethanol 96 %. Batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) sebanyak 20 g yang telah didapat kemudian dibersihkan dengan menggunakan air kemudian dicacah halus atau diblender kering (tanpa air). Setelah diblender potongan batang Kecombrang ditimbang terlebih dahulu baru kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, potongan batang Kecombrang direndam selama 24 jam di dalam ethanol 96 % sebanyak 20 ml. Setelah direndam selanjutnya bahan tersebut disaring sehingga diperoleh hasil akhirnya berupa ekstrak Kecombrang dengan konsentrasi 100%.

### b. Pembuatan Fraksi n-heksana Ekstak Batang Kecombrang

Hasil yang didapat dari proses ekstraksi dilanjutkan untuk memisahkan senyawa nonpolar menggunakan pelarut n-heksan. Sebanyak 20 g ekstrak etanol dilarutkan dalam 500 mL pelarut etanol, lalu dimasukkan ke dalam gelas separasi. Kedalam larutan tersebut ditambahkan pelarut n-heksan sebanyak 500 mL. Setelah itu,

campuran larutan tersebut dikocok hingga tercampur sempurna, lalu didiamkan beberapa menit sampai terjadi pemisahan antara kedua larutan yaitu larutan n-heksan pada bagian atas dan larutan etanol pada bagian bawah. Kedua larutan tersebut dikeluarkan dan ditempatkan pada gelas erlenmeyer yang berbeda. Pencampuran dan pengocokan dilakukan berulang hingga larutan yang menggunakan pelarut n-heksan tampak jernih. Filtrat yang didapat merupakan larutan ekstrak etanol yang telah bebas senyawa nonpolarnya dan larutan fraksi heksan. Kedua larutan yang diperoleh kemudian dievaporasi sehingga diperoleh fraksi etanol yang telah bebas dari senyawa nonpolarnya dan fraksi heksan dalam bentuk kental.



**Gambar 9.** Diagram Alir Prosedur fraksinasi n-heksana ekstrak batang kecombrang

### 3. Penentuan Konsentrasi Larutan Uji

Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan digunakan rumus  $V_1 M_1 = V_2 M_2$ .

Keterangan :

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

$M_1$  = Konsentrasi fraksi n-heksan ekstrak batang Kecombrang yang tersedia (%)

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

$M_2$  = Konsentrasi fraksi n-heksan ekstrak batang Kecombrang yang akan dibuat (%)

**Tabel 3.** Dosis Fraksi n-heksan Ekstrak Batang Kecombrang

$M_1$	$V_2$	$M_2$	$V_1 = \frac{V_2 \cdot M_2}{M_1}$	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

#### 4. Uji Efektivitas

Larutan uji yang digunakan adalah fraksi n-heksan ekstrak batang Kecombrang (*Etilingera elatior*) dengan konsentrasi 0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, dan 1 % . Uji efektifitas ini dilakukan untuk menentukan nilai  $LC_{50}$  (*Lethal Concentration 50*),  $LT_{50}$  (*Lethal Time 50*) dan konsentrasi yang paling efektif sebaga larvasida larva *Aedes aegypti*. Fraksi n-heksan Ekstrak batang Kecombrang (*Etilingera elatior*) dengan berbagai konsentrasi tersebut diletakkan dalam gelas plastik. Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsetrasi fraksi n-heksan ekstrak

batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) dengan menggunakan pipet larva. Perlakuan menggunakan fraksi n-heksan ekstrak batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) hanya diberikan pada kelompok eksperimen sebanyak 250 ml pada tiap ulangan, sedangkan pada kelompok kontrol diberikan perlakuan menggunakan air sumur dengan volume 250 ml pada tiap ulangan.

Masing-masing perlakuan berisi 20 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 waktu 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480, 1440 menit. Pengukuran berakhir pada menit ke 1440 dengan cara menghitung larva yang mati.

##### **5. Menentukan Nilai LC<sub>50</sub> dan LT<sub>50</sub>**

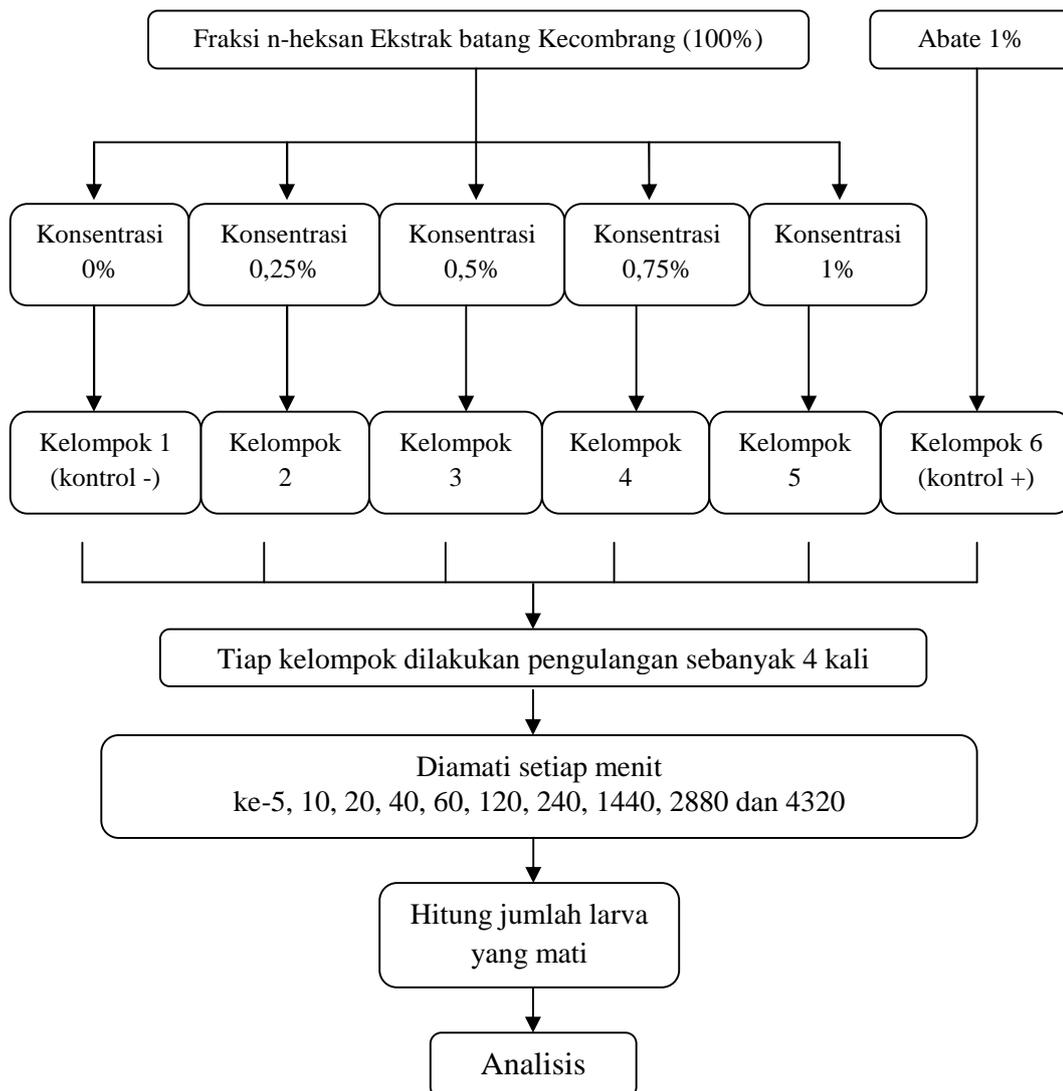
Kelompok perlakuan terdiri dari 1 kontrol negatif, 4 konsentrasi ekstrak batang Kecombrang dan 1 kontrol positif. Tiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali dan diamati pada menit ke-5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480, 1440, 2880 dan 4320. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang mati kemudian dihitung persentase rata-rata kematian larva pada tiap kelompok perlakuan. Kemudian dari rata-rata 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

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

### 1. Uji Efektifitas



**Gambar 10.** Diagram Alir Uji Efek Fraksi n-heksana Ekstrak Batang Kecombrang (*Etilingera elatior*) sebagai Larvasida

## H. Pengolahan dan Analisis Data

### 1. ANOVA satu arah.

Untuk mengetahui adanya perbedaan antara perlakuan yang diberikan maka digunakan analisis ANOVA satu arah, tetapi bila sebaran data tidak normal atau varians 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  $p\text{ value} < 0,05$  maka dilakukan analisis *post-hoc* untuk mengetahui kelompok perlakuan yang bermakna. Uji *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 berapa ppm atau persen konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian 50% dari hewan percobaan. Nilai subletal ditentukan dengan analisis probit. Analisis probit ini diolah dengan menggunakan program SPSS 17.0.