

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan yang terdiri dari 6 konsentrasi (0% ; 0,25% ; 0,5% ; 0,75% ; 1% ; dan abate 1%) dengan 4 kali pengulangan.

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

Waktu penelitian ini dilaksanakan pada bulan November - Desember 2012 dan tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Unila . Pembuatan ekstrak daun Legundi dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar, jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

#### **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) Larva instar III yang mati sebelum pengamatan

**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 1** : Jumlah Total Sampel

<b>Perlakuan</b>	<b>Jumlah larva x jumlah pengulangan</b>	<b>Total</b>
Kontrol (-) : 0%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan I : 0,25%	25 larva x 4	100 larva
Perlakuan II : 0,50%	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 30 x 15 cm
2. Kain kasa
3. Gelas plastik

#### b. Alat Untuk Pembuatan Larutan Uji

1. Timbangan
2. Blender
3. Toples
4. Baskom
5. Saringan

#### 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 daun legundi (*Vitex trifolia*) sebanyak 360 gr, ethanol 96 % sebanyak 2000 ml sebagai pelarut saat pembuatan *stock* ekstrak, aquades sebanyak 200 ml

sebagai pengencer *stock* ekstrak untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan. Penelitian ini juga memerlukan pelet ikan sebagai makanan larva.

## **E. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel**

### 1. Identifikasi Variabel

Variabel pada penelitian ini terdiri atas :

#### a. Variabel Bebas

Berbagai konsentrasi ekstrak daun Legundi (*Vitex trifolia*) dengan lima taraf konsentrasi yaitu 0 % ; 0,25 % ; 0,5 % ; 0,75 % dan 1 %.

#### b. Variabel Terikat

Kematian larva *Aedes aegypti*.

#### c. Variabel Perancu

Kotoran yang masuk ke dalam air

### 2. Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional sebagai berikut :

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definsi	Cara ukur	Hasil ukur	Skala
<b>Variabel bebas :</b> Berbagai konsentrasi ekstrak daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> )	Ekstrak daun legundi ( <i>Vitex trifolia</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. Efektivitas dari ekstrak daun legundi (daun yang telah dicuci dan dipotong serta diangin-anginkan, lalu diblender dan direndam selama 1x24 jam dengan pelarut etanol sehingga diperoleh suatu bentuk ekstrak) dapat dilihat dari jumlah larva yang mati dan disesuaikan dengan parameter efektivitas menurut <i>guideline</i> WHO.	Menimbang ekstrak dan dimasukkan ke rumus : V1C1= V2C2  Alat ukur : <i>Analitical balance electric, refractometer, gelas ukur, kalkulator</i>	Didapatkan konsentrasi ekstrak daun Legundi 0,25%, 0,50%, 0,75%, dan 1%	Nominal
<b>Variabel terikat :</b> 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 <i>guideline</i> , 2005). 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).	Melihat, mengecek larva dan dicatat  Parameter : Mortalitas larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i>  Alat ukur : <i>Hand counter, jarum tectio, kalkulator</i>	Larva <i>Aedes aegypti</i> yang mati (0-20 larva)	Numerik (rasio)

## **F. Prosedur Penelitian**

### **1. Preparasi Bahan Uji**

Telur nyamuk *Aedes aegypti* yang 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 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 Legundi (*Vitex trifolia*) dengan konsentrasi berbeda di tiap gelas.

### **2. Pembuatan Larutan Uji**

Pembuatan ekstrak daun legundi (*Vitex trifolia*) ini menggunakan daun legundi (*Vitex trifolia*) dengan pelarutnya berupa etanol 96 %. Daun legundi (*Vitex trifolia*) yang telah dibersihkan dan dikeringkan kemudian dipotong kecil-kecil lalu diblender dan dicampur ke dalam etanol 96%. Setelah halus dan tercampur larutan tersebut disaring menggunakan kain kasa. Tahap maserasi ini dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Hasil maserasi yang disebut maserat, dipekatkan dengan suhu 40-50°C dalam

*Rotary Evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak pekat etanol. Penggunaan pemanas di suhu 40-50°C untuk menghilangkan/menguapkan pelarut yang masih tersisa pada ekstrak pekat yang pada akhirnya diperoleh hasil berupa stok ekstrak daun legundi 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 legundi yang tersedia (%)

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

$M_2$  = Konsentrasi ekstrak daun Legundi yang akan dibuat (%)

**Tabel 3.** Jumlah Ekstrak Daun Legundi 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. Uji Efektivitas Ekstrak Daun Legundi

Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak daun legundi (*Vitex trifolia*) dengan konsentrasi 0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, dan 1 %. Uji efektifitas ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi yang paling efektif sebagai larvasida *Aedes aegypti*, nilai LC<sub>50</sub> (*Lethal Concentration 50*), dan nilai LT<sub>50</sub> (*Lethal Time 50*). Ekstrak daun legundi (*Vitex trifolia*) dengan berbagai konsentrasi tersebut diletakkan dalam gelas plastik. Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi daun Legundi (*Vitex trifolia*) dengan menggunakan pipet larva atau saringan. Perlakuan menggunakan ekstrak daun legundi (*Vitex trifolia*) hanya diberikan pada kelompok eksperimen sebanyak 200 ml air yang mengandung ekstrak daun legundi (*Vitex trifolia*) dengan berbagai konsentrasi pada tiap ulangan, sedangkan pada kelompok kontrol negatif diberikan perlakuan menggunakan air sumur 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 waktu 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 di tiap patokan waktu.



#### **4. Parameter Efektivitas Larvasida Daun Legundi**

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

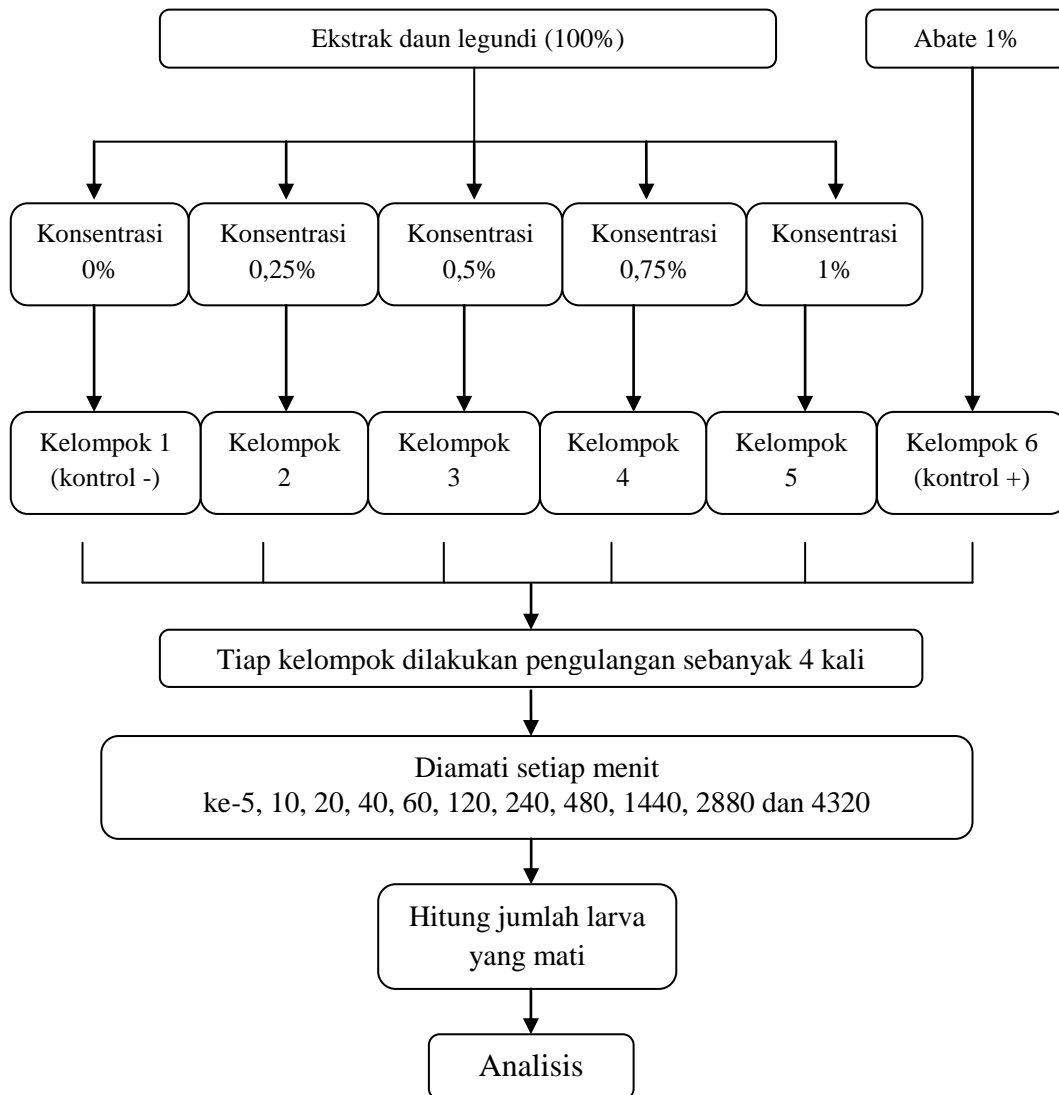
#### **5. Menentukan Nilai $LC_{50}$ dan $LT_{50}$**

Kelompok perlakuan terdiri dari 1 kontrol negatif, 4 konsentrasi ekstrak daun Legundi 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  $LT_{50}$ . Nilai  $LC_{50}$  dan  $LT_{50}$  bermanfaat untuk mengetahui kerentanan dan memantau resistensi suatu insektisida.

## G. Alur Penelitian

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

### 1. Uji Efektifitas



**Gambar 9. Diagram Alir Uji Efek Ekstrak Daun Legundi (*Vitex trifolia*) sebagai Larvasida**

## H. Pengolahan dan Analisis Data

### 1. ANOVA satu arah

Untuk mengetahui adanya perbedaan rata-rata kematian nyamuk pada berbagai konsentrasi 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 analisis data.