

III. METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

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

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian efek fraksi kloroform batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) sebagai larvasida terhadap larva *Aedes aegypti* instar III dilaksanakan pada bulan Mei 2012. Pembuatan fraksi kloroform dilaksanakan di Laboratorium MIPA Kimia Universitas Lampung, dan pelaksanaan uji efektivitas dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

C. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Alat untuk Preparasi Bahan Uji

- 1) Nampan plastik ukuran 30 x 15 cm untuk tempat memelihara larva
 - 2) Kain kasa untuk memisahkan larva dengan air
 - 3) Gelas plastik ukuran \pm 400 ml untuk tempat meletakkan larva uji
 - 4) Sangkar nyamuk untuk meletakkan gelas tersebut pada waktu dilakukan uji
- b. Alat untuk Pembuatan Ekstraksi batang Kecombrang
- 1) Timbangan untuk menimbang batang Kecombrang yang diperlukan
 - 2) Blender untuk menghaluskan batang Kecombrang
 - 3) Baskom plastik sebagai tempat atau wadah ekstrak batang Kecombrang
 - 4) Saringan untuk memisahkan ekstrak batang Kecombrang dengan ampasnya
 - 5) Pipet tetes untuk mengambil ekstrak batang Kecombrang
- c. Alat untuk Pembuatan larutan Fraksi Kloroform Batang Kecombrang
- 1). Alat kromatografi cair vakum (KCV)
 - 2). Alat penguap vakum putar/ *rotary evaporator* (Buchi)
 - 3). Autoklaf
 - 4). Cawan penguap dan cawan petri (pyrex)
 - 5). Erlenmeyer
 - 6). Lampu UV 254 dan 366 nm (Camag UV-Betrachter)
 - 7). Timbangan analitik (Mettler Toledo)
- d. Alat untuk Uji Efektifitas
- 1) Gelas ukur 250ml untuk mengukur jumlah air yang diperlukan
 - 2) Batang pengaduk untuk mengetahui jumlah larva yang mati

- 3) Pipet larva untuk mengambil larva
- 4) Pipet tetes untuk mengambil larutan fraksi kloroform batang kecombrang
- 5) Kasa nilon untuk menutup gelas pertumbuhan larva
- 6) Gelas plastik atau kontainer untuk larutan fraksi kloroform batang kecombrang

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) yang telah dihaluskan sebanyak 20 g, ethanol 96% sebagai pelarut saat pembuatan *stock* ekstrak, aquades 20 ml sebagai pengencer *stock* ekstrak untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan, kloroform untuk sebagai pelarut saat pembuatan fraksi kloroform. 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.

D. Populasi dan Sampel

1. Populasi

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.

2. Sampel

a. Kriteria Inklusi

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

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Larva bukan berasal dari alam 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 sampel yang digunakan pada penelitian

Perlakuan	Jumlah larva x jumlah pengulangan	Total
Kontrol (-) : 0%	20 larva x 4	80 larva
Perlakuan I : 0,25%	20 larva x 4	80 larva
Perlakuan II : 0,5%	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

E. Prosedur Penelitian

1. Preparasi bahan uji

Telur *Aedes aegypti* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Ruang Insektarium Loka Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan

Penyakit Bersumber Binatang Ciamis, Pangandaran, Jawa Barat. Telur *Aedes aegypti* kemudian diletakkan di dalam nampan plastik yang berisi air untuk pemeliharaan larva. Telur akan menetas menjadi larva dalam waktu 1-2 hari. Larva akan berkembang dari stadium I sampai stadium III selama 4–5 hari. Dalam masa perkembangannya larva diberi makan berupa pelet. Pada saat larva sudah mencapai instar III, larva tersebut dipindahkan ke dalam gelas plastik yang berisi fraksi kloroform batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) dengan menggunakan pipet larva.

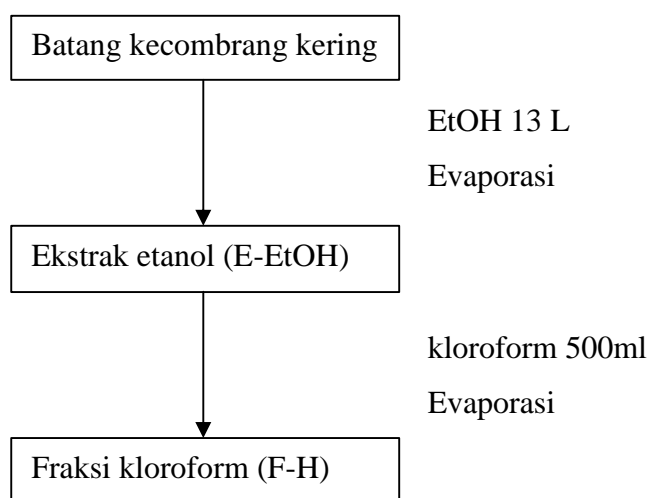
2. Pembuatan Larutan Uji

a. Ekstraksi

Pembuatan larutan uji yang berupa ekstrak batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) ini menggunakan batang Kecombrang (*Etlintera elatior*). Pelarut dalam pembuatan larutan uji ini berupa etanol 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 (*Etlintera elatior*) ditimbang terlebih dahulu baru kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, potongan batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) direndam selama 24 jam di dalam etanol 96% sebanyak 20 ml. Setelah direndam selanjutnya bahan tersebut disaring sehingga diperoleh hasil akhirnya berupa ekstrak Kecombrang dengan konsentrasi 100%.

b. Fraksinasi

Ekstraksi dilanjutkan untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya dengan menggunakan pelarut kloroform. Sebanyak 20 gram ekstrak etanol dilarutkan dalam 500 mL pelarut etanol, lalu dimasukkan ke dalam gelas separasi. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan pelarut kloroform sebanyak 500 mL. Setelah itu, campuran larutan tersebut dikocok hingga tercampur sempurna, lalu didiamkan beberapa menit sampai terjadi pemisahan antara kedua larutan yaitu larutan kloroform 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 kloroform tampak jernih. Filtrat yang didapat merupakan larutan ekstrak etanol yang telah bebas senyawa nonpolarnya dan larutan fraksi kloroform. Kedua larutan yang diperoleh kemudian dievaporasi sehingga diperoleh fraksi etanol yang telah bebas dari senyawa nonpolarnya dan fraksi kloroform dalam bentuk kental.



Gambar 10. Diagram Alir Prosedur fraksinasi batang kecombrang

3. Penentuan Dosis Ekstrak batang Kecombrang (*Etilingera elatior*)

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 fraksi kloroform batang Kecombrang yang tersedia (%)

V_2 = Volume larutan (air + fraksi kloroform batang kecombrang) yang diinginkan (ml)

M_2 = Konsentrasi fraksi kloroform batang Kecombrang yang akan dibuat (%)

Tabel 2. Jumlah fraksi kloroform Batang Kecombrang 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

4. Uji Efektivitas fraksi kloroform batang kecombrang (*Etilingera elatior*)

Larutan uji berupa fraksi kloroform batang Kecombrang (*Etilingera elatior*) dengan konsentrasi 0% (kontrol negatif), abate 1% (kontrol positif), 0,25%, 0,50%, 0,75%, dan 1% sebagai perlakuan yang

ditambahkan pada masing-masing gelas uji berisi *larva Aedes aegypti* instar III. Pada penelitian ini kontrol negatif yang digunakan adalah aquades, untuk pemberian makan larva digunakan pelet dalam jumlah tertentu.

Larutan fraksi kloroform Batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) yang sudah ditempatkan didalam gelas plastik tersebut dibagi berdasarkan konsentrasinya masing-masing. Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi larutan fraksi kloroform batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) dengan menggunakan pipet larva, kemudian gelas plastik tersebut diberi tutupan kain nilon agar terhindar dari kotoran.

Perlakuan fraksi kloroform batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) hanya diberikan pada kelompok eksperimen sebanyak 250 ml aquades yang berisi konsentrasi dari larutan fraksi kloroform batang Kecombrang (*Etlintera elatior*) pada tiap ulangan, sedangkan pada kelompok kontrol diberikan perlakuan menggunakan air sumur dengan volume 250 ml pada tiap ulangan. Pada masing-masing perlakuan berisi 20 larva *Aedes aegypti* instar III, berdasarkan WHO *Guidline For Laboratory and Field Testing For Larvacide* jumlah pengulangan sebanyak 4 kali.

Pengukuran pada kelompok-kelompok sampel dilakukan dalam 24 jam menurut WHO (2005) dan peneliti membagi pencatatan waktu selama perlakuan yaitu dengan interval waktu 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480,

1440, 2880 menit. Pengukuran berakhir pada menit ke 2880 dengan cara menghitung larva yang mati.

5. Menentukan Nilai LC₅₀ dan LT₅₀

Kelompok perlakuan terdiri dari 1 kontrol negatif, 4 konsentrasi batang Kecombrang (*Etilingera elatior*) 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 dan 2880. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang mati kemudian dicatat dan dihitung hingga diperoleh nilai LC₅₀ dan LT₅₀.

F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi Variabel

Variabel pada penelitian ini terdiri atas:

a. Variabel Terikat

Larva *Aedes aegypti* instar III yang mati.

b. Variabel Bebas

Berbagai konsentrasi larutan fraksi kloroform batang Kecombrang (*Etilingera elatior*) dengan lima taraf konsentrasi yaitu 0%, 0,25%, 0,5%, 0,75% dan 1%.

2. Definisi Operasional Variabel

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

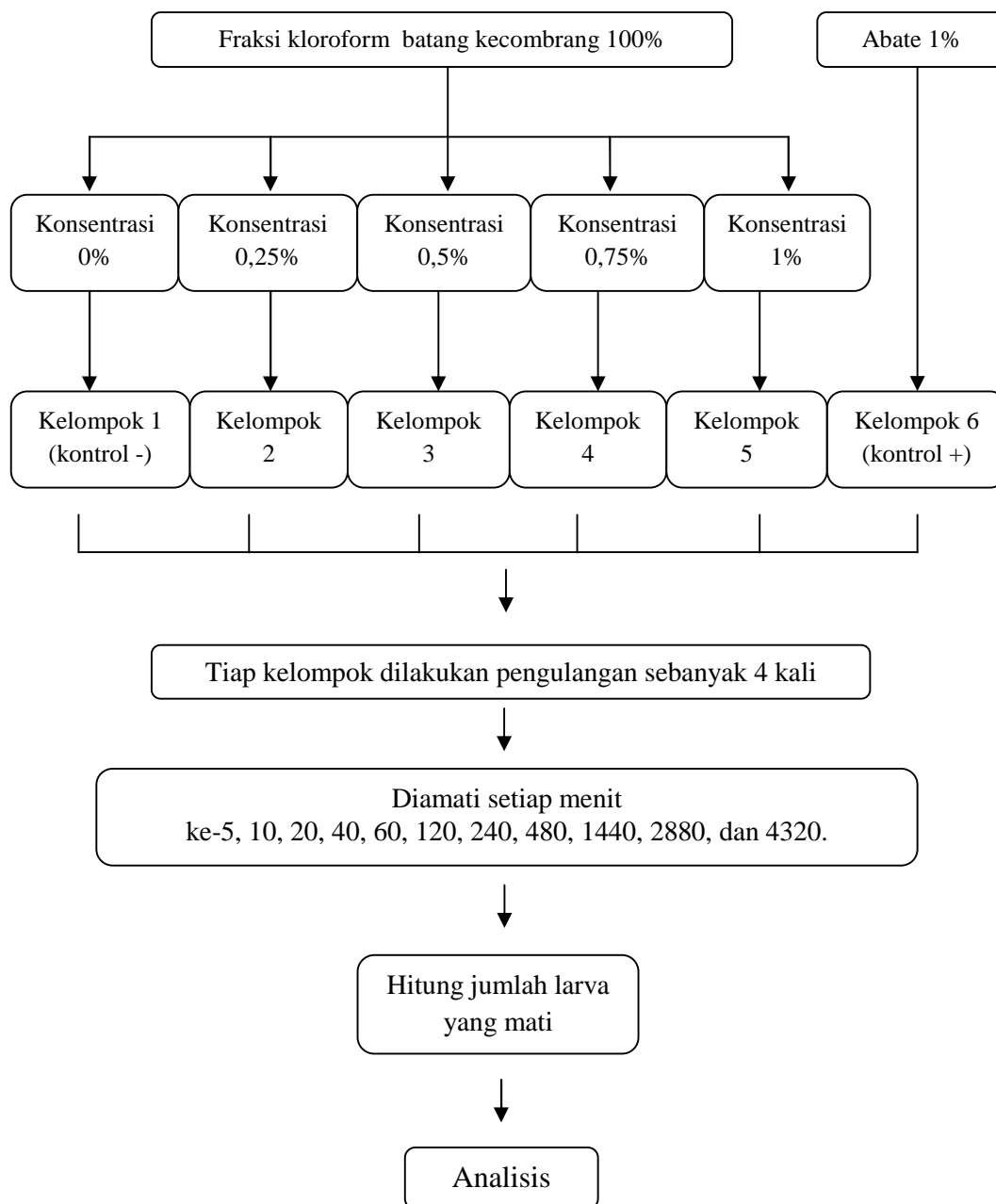
Tabel 3. Definisi Operasional

Variabel	Definsi
Fraksi kloroform batang Kecombrang (<i>Etlingera elatior</i>)	Batang Kecombrang (<i>Etlingera elatior</i>) yang telah dicuci dan dipotong kecil-kecil, lalu diangin-anginkan diblender dan direndam selama 1x24 dengan pelarut ethanol 96% sehingga diperoleh 100% batang Kecombrang (<i>Etlingera elatior</i>), kemudian dilakukan fraksinasi dengan menggunakan larutan kloroform.
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

	<p>hari setelah telur menetas, duri-duri dada mulai jelas dan corong pernapasan berwarna coklat kehitaman (Sikka, 2009)</p>
<p>Berbagai konsentrasi larutan fraksi kloroform batang Kecombrang (<i>Etligeria elatior</i>)</p>	<p>Batang Kecombrang (<i>Etligeria elatior</i>) dinyatakan dalam persen (%). Pada penelitian ini dipakai konsentrasi 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1% dan kontrol 0% yang kemudian akan dicari dosis subletalnya yaitu LC₅₀ yang akan dihitung dengan analisis probit.</p>

G. Diagram Alir

Untuk memudahkan peneliti dalam melakukan proses penelitian, maka dibuat diagram alir seperti di bawah ini:



Gambar 11. Diagram Alir Uji Efek Fraksi Kloroform batang Kecombrang (*Etilingera elaitor*) sebagai Larvasida

H. Pengolahan dan analisis data

1. *One Way Anova*

Untuk menghitung data yang diperoleh dari penelitian ini menggunakan analisis *one way anova* karena data yang dihasilkan merupakan data komparatif numerik tidak berpasangan > 2 kelompok, apabila sebaran data normal dan varians data sama. Namun, apabila sebaran data tidak normal atau varians tidak sama, uji yang digunakan adalah uji *Kruskal-Wallis*. Bila pada uji *One Way Anova* atau uji *Kruskal-Wallis* diperoleh hasil yang bermakna, maka setelah itu dilakukan analisis *post-hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang bermakna. Analisis *post-hoc* untuk mengetahui *one way anova* adalah *Bonferroni* sedangkan untuk uji *Kruskal-Wallis* adalah *Mann Whitney*.

2. Analisis Probit

Untuk menilai toksisitas suatu pestisida dapat digunakan analisis probit. *Lethal concentration* merupakan suatu ukuran untuk mengukur daya racun dari jenis pestisida sedangkan *lethal time* merupakan waktu yang dibutuhkan suatu zat untuk menimbulkan 50% kematian pada jumlah populasi. Pada uji efektifitas ditunjukkan LC_{50} atau persen konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian 50% dari hewan percobaan dan LT_{50} atau menunjukkan berapa waktu konsentrasi suatu zat untuk membunuh 50% dari hewan percobaan. Nilai subletal ditentukan dengan analisis probit. Analisis probit ini diolah dengan menggunakan program SPSS 17.