

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan pola *post test-only control group design*.

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

Penelitian dilakukan di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk pelaksanaan uji efektivitas, sedangkan untuk pembuatan ekstrak kulit buah manggis dilaksanakan di laboratorium MIPA Kimia Universitas Lampung. Waktu penelitian direncanakan akan dilaksanakan selama 2 bulan dari November-Desember 2012.

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

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva instar III *Aedes aegypti*. Telur nyamuk ini diperoleh dari Loka Litbang Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (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 mati sebelum perlakuan

c. Besar Sampel

Berdasarkan acuan WHO (2005), maka pada penelitian ini dibutuhkan total larva sebanyak 600 larva dengan rincian sebagai berikut :

**Tabel 2:** Jumlah Total Sampel

Perlakuan	Jumlah larva x jumlah pengulangan	Total
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. Bahan dan Alat Penelitian

### 1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit buah manggis (*Garcinia mangostana Linn*) sebanyak 20 g, ethanol 96 % sebanyak 20 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.

## **2. Alat Penelitian**

### **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**

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

## **E. 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 pengkolonisasi dan diberi makan pelet. Setelah usia larva mencapai instar III larva dipindahkan dengan menggunakan pipet larva ke dalam gelas plastik yang berisi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana Linn*).

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

Pembuatan ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana Linn*) ini menggunakan kulit buah manggis yang didapat dari pasar tradisional di Bandar Lampung. Pelarutnya berupa etanol 96 %. Kulit buah manggis sebanyak 20 g yang telah didapat kemudian dibersihkan dengan menggunakan air kemudian dicacah halus atau diblender kering (tanpa air). Setelah diblender potongan kulit buah manggis ditimbang terlebih dahulu baru kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, potongan kulit buah manggis direndam selama 24 jam di dalam

ethanol 96 % sebanyak 20 ml. Setelah direndam selanjutnya bahan tersebut disaring kemudian dipekatkan dalam rotary evaporator mendapatkan konsentrasi ekstrak kulit buah manggis dengan konsentrasi 100%. Setelah itu diencerkan oleh suatu pelarut dalam volume dan konsentrasi tertentu. 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 ekstrak kulit buah manggis yang tersedia (%)

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

$M_2$  = Konsentrasi ekstrak kulit buah manggis yang akan dibuat (%)

**Tabel 3.** Jumlah ekstrak kulit buah manggis 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

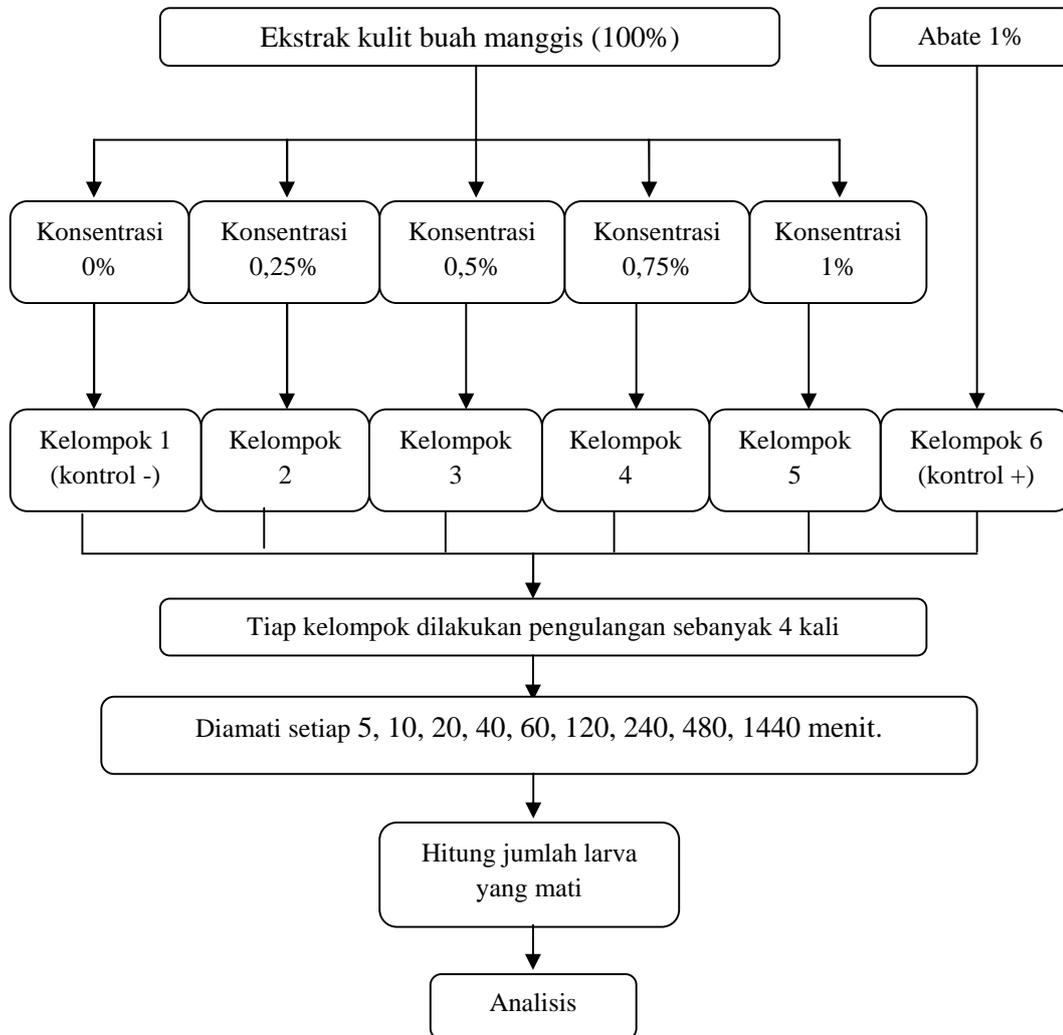
Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana Linn*) dengan konsentrasi 0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, dan 1 %.

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*. Ekstrak kulit buah manggis

(*Garcinia mangostana* Linn) dengan berbagai konsentrasi tersebut diletakkan dalam gelas plastik. Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn) dengan menggunakan pipet larva. Perlakuan menggunakan ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn) hanya diberikan pada kelompok eksperimen sebanyak 200 ml ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn) pada tiap ulangan, sedangkan pada kelompok kontrol 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*. 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 menit. Pengukuran berakhir pada menit ke 1440 dengan cara menghitung larva yang mati.

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



**Gambar 6.** Diagram alur penelitian

#### 4. Menentukan Nilai $LC_{50}$ dan $LT_{50}$

Kelompok perlakuan terdiri dari 4 konsentrasi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana Linn*). Konsentrasi ekstrak yang digunakan 0,25 %, 0,5 %, 0,75 % dan 1 %. Tiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan

sebanyak 4 kali dan diamati pada menit ke-5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480, 1440 menit. Kelompok kontrol terdiri dari 1 kontrol negatif dan 1 kontrol positif. Kontrol negatif menggunakan 200 ml air sumur dan kontrol positif menggunakan 200 ml air sumur yang diberi abate 1%. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang mati kemudian dihitung pesentase 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  $LT_{50}$ .

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

### **1. Identifikasi Variabel**

Variabel pada penelitian ini terdiri atas :

#### **a. Variabel Bebas**

Berbagai konsentrasi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana Linn*) ekstrak 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 tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional sebagai berikut:

**Tabel 4.** Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala ukur
<b>Ekstrak kulit buah manggis (<i>Garcinia mangostana</i> Linn)</b>	Kulit buah manggis yang dicuci, dikeringkan dengan dianginkan 1-3 hari, selanjutnya dimaserasi dengan etanol 1-3 hari dan kemudian dipekatkan dalam rotary evaporator, setelah itu diencerkan oleh suatu pelarut dalam volume dan konsentrasi tertentu untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak yang diinginkan	Menggunakan rumus $m_1v_1=m_2v_2$ Dimana: $m_1$ =kosentrasi ekstrak yang didapat (100%); $v_1$ =volume ekstrak yang didapat; $m_2$ =kosentrasi yang diinginkan $v_2$ = volume ekstrak yang diinginkan (WHO <i>guideline</i> , 2005).	Gelas ukur, pipet tetes	a. 0,25 % b. 0,50 % c. 0,75 % d. 1%	Numerik k
<b>Kematian larva <i>Aedes aegypti</i> instar III</b>	Larva yang mati adalah 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 <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).	Hitung jumlah Larva yang mati dan larva yang hampir mati juga dikategorikan kedalam larva yang mati (WHO <i>guideline</i> , 2005).	Jarum	0-25 larva yang mati	Numerik rasio

## G. 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.