

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan (*true experimental-postest only control group design*), yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama penyimpanan daun pandan wangi (*pandanus amaryllifolius*) pada berbagai waktu terhadap efektivitasnya dalam membunuh larva nyamuk *Aedes sp.*

4.2 Sampel dan Estimasi Besar Sampel

Sampel penelitian ini adalah larva nyamuk *Aedes sp* yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak termasuk kriteria eksklusi.

Kriteria inklusi penelitian ini adalah:

- Larva *Aedes sp* yang hidup
- Larva *Aedes sp* yang aktif bergerak
- Larva *Aedes sp* yang berada pada stadium III dan IV

Kriteria eksklusi penelitian ini adalah:

- Larva *Aedes sp* yang berubah menjadi pupa

Sampel yang digunakan pada penelitian ini didapat dari hasil pengembangbiakan di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sampel yang diambil adalah sejumlah *Aedes sp* yang memenuhi kriteria inklusi dan telah diseleksi dari tempat pembiakan larva. Jumlah larva dalam tiap konsentrasi adalah 35 larva.

Adapun perlakuan yang diberikan adalah membagi sampel dalam kelompok perlakuan dimana:

Perlakuan I : Pemberian ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) segera setelah proses pembuatan larutan stok selesai (hari ke-1) dengan konsentrasi 200 ppm, 300 ppm dan 500 ppm (kontrol).

Perlakuan II : Pemberian ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) hari ke-3 dari pembuatan larutan stok dengan konsentrasi 200 ppm, 300 ppm dan 500 ppm.

Perlakuan III : Pemberian ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) pada hari ke-7 dari pembuatan larutan stok dengan konsentrasi 200 ppm, 300 ppm dan 500 ppm.

Perlakuan IV : Pemberian ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) pada hari ke-15 dari pembuatan larutan stok dengan konsentrasi 200 ppm, 300 ppm dan 500 ppm.

Perlakuan V : Pemberian ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) yang digunakan pada hari ke-30 dari pembuatan larutan stok dengan konsentrasi 200 ppm, 300 ppm dan 500 ppm.

Estimasi besar pengulangan yang dilakukan berdasarkan perhitungan rumus:

$$p(n-1) \geq 16$$

$$5(n-1) \geq 16$$

$$5n - 5 \geq 16$$

$$n \geq 4,2 \sim 4$$

Keterangan:

P = jumlah perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Jadi, berdasarkan rumus diatas pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini minimal adalah 4 kali.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Agustus – Oktober 2015.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini terdiri dari:

- a. Variabel bebas: Lama penyimpanan larutan stok (skala numerik)
- b. Variabel tergantung : Jumlah larva *Aedes sp* yang mati (skala numerik)

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

4.5.1.1 Bahan – bahan pembuatan ekstrak

- Daun pandan wangi
- *Ethanol* sebagai pelarut ekstrak
- *Aquades*
- Kertas saring



4.5.1.2 Bahan - Bahan Uji Efektivitas Larvasida

- Ekstrak ethanol daun pandan wangi
- Larva *Aedes sp*
- Aquades

4.5.2 Instrumen Penelitian

4.5.2.1 Instrumen Pembuatan Ekstrak

- Alat penggerus / blender
- Tabung untuk merendam bubuk kering daun pandan wangi yang sudah digerus
- Satu set alat evaporasi
- Klem statis
- Selang plastik
- Waterbath
- Waterpump
- Bak penampung aquades
- Botol penampung hasil ekstraksi
- Oven
- Timbangan
- Freezer

4.5.2.2 Instrumen Uji Aktivitas Larvasida

- Beaker glass
- Pipet

4.6 Definisi Operasional

1. Larva *Aedes* hidup: Larva yang bergerak aktif dengan ataupun tanpa sentuhan, larva yang dipakai dalam penelitian ini adalah larva *Aedes sp* stadium III dan IV sehingga

kemungkinan terdapatnya bias dalam hasil penelitian dapat diperkecil.

2. Larva *Aedes* mati : Bila dilakukan sentuhan pada bagian *siphon* ataupun bagian tubuh yang lain pada larva tidak terjadi pergerakan.
3. Lama penyimpanan : merupakan renteng waktu yang dimulai dari larutan stok selesai dibuat sampai dengan larutan stok tersebut digunakan dalam perlakuan. Definisi tersebut didasarkan pada literatur yang menyebutkan bahwa masa simpan (*Shelf life*) suatu produk merupakan rentang waktu antara produksi dengan saat terakhir produk tersebut dapat digunakan.
4. Kontrol Positif adalah Ekstrak Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) konsentrasi berdasarkan hasil penelitian pendahuluan
5. Kelompok perlakuan adalah Perlakuan dilakukan dengan penyimpanan larutan stok dengan variasi waktu: perlakuan 1 : 0 hari (kontrol), perlakuan 2 : 3 hari, perlakuan 3 : 7 hari, perlakuan 4 : 15 hari, perlakuan 5 : 30 hari

4.7 Cara Kerja dan Pengumpulan Data

4.7.1 Persiapan Penelitian

Persiapan penelitian meliputi proses ekstraksi dan evaporasi daun pandan wangi yang hasil ekstraksi dan evaporasinya akan digunakan dalam proses penelitian.

Proses ekstraksi:

- Daun pandan wangi yang digunakan sebanyak 1.000 gram. Daun pandan wangi dipisahkan dari tangkainya dan dikeringkan dengan sinar matahari secara tidak langsung atau diangin-anginkan kemudian dimasukkan oven agar daun pandan wangi tersebut menjadi kering secara sempurna dengan suhu oven 60-80°C.
- Setelah kering, daun pandan wangi diblender sehingga didapatkan serbuk kering dan ditimbang menggunakan neraca analitik, diperoleh hasil 500 gram.

- Serbuk pandan wangi dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam tabung untuk direndam dengan 2 liter ethanol.
- Pelarut ethanol dimasukkan ke dalam tabung tersebut sampai serbuk yang ada di dalam kertas saring terendam dalam pelarut ethanol selama kurang lebih 5-7 hari.

Hasil ini selanjutnya akan dievaporasi (untuk memisahkan ekstrak daun pandan wangi dengan pelarut ethanol).

Proses Evaporasi:

- Evaporator dipasang pada tiang pemanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30°-40° terhadap meja percobaan.
- Hasil rendaman ethanol dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi
- Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah evaporator, pendingin spiral dihubungkan pada bagian atas evaporator. Pendingin spiral dihubungkan dengan vakum melalui selang plastik dan dihubungkan pula dengan *waterpump* juga melalui selang plastik.
- *Waterpump* diletakkan dalam bak yang berisi aquades, kemudian dihubungkan dengan sumber listrik sehingga aquades akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan rata).
- Evaporator diletakkan sedemikian rupa sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *waterbath*.
- Vakum dan *waterbath* dihubungkan dengan sumber listrik dan suhu *waterbath* dinaikkan sekitar 35-40°C (sesuai titik didih ethanol)
- Sirkulasi dibiarkan berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama kurang lebih 2-3 jam.
- Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 50-60°C selama 1-2 hari.

- Hasil akhir diperoleh ekstrak daun pandan wangi sebanyak 17 gram, berupa cairan berwarna hijau tua dengan konsistensi seperti pasta. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam percobaan.

Pembuatan larutan stok :

- Ekstrak daun pandan wangi 1 gram dicampur dengan aseton 1% yang berfungsi sebagai emulgator dan 100 ml aquades sehingga didapatkan larutan stok dengan konsentrasi 1.000 ppm.

4.7.2 Penelitian Pendahuluan

Sebelum penelitian utama dilakukan penelitian pendahuluan bertujuan untuk mengkonfirmasi pengaruh lama penyimpanan ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) mempengaruhi efektivitasnya sebagai larvasida terhadap larva nyamuk *Aedes sp*, dimana konsentrasi terendah yang efektif sebagai larvasida terhadap larva nyamuk *Aedes sp* adalah 300ppm. Penelitian pendahuluan ini menggunakan tiga konsentrasi yaitu 200ppm, 300ppm, dan 500ppm, dan dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali.

4.7.3 Uji Aktivitas Larvasida

1. Stok larutan uji disiapkan untuk dibuat dalam berbagai konsentrasi yang telah ditentukan yaitu 200 ppm 300 ppm, 500 ppm.
2. Larutan uji yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam *beaker glass* (kecuali perlakuan kontrol) yang berisi larva dengan menggunakan pipet sedikit demi sedikit.
3. Kemudian ditambahkan aquades pada masing-masing *beaker glass* sampai 100 ml sehingga dicapai konsentrasi yang telah ditentukan dari ekstrak daun pandan wangi dan dilakukan pengukuran temperatur larutan uji.
4. Setiap *beaker glass* yang telah di label diisi larva sebanyak 10 larva untuk masing-masing *beaker glass*.

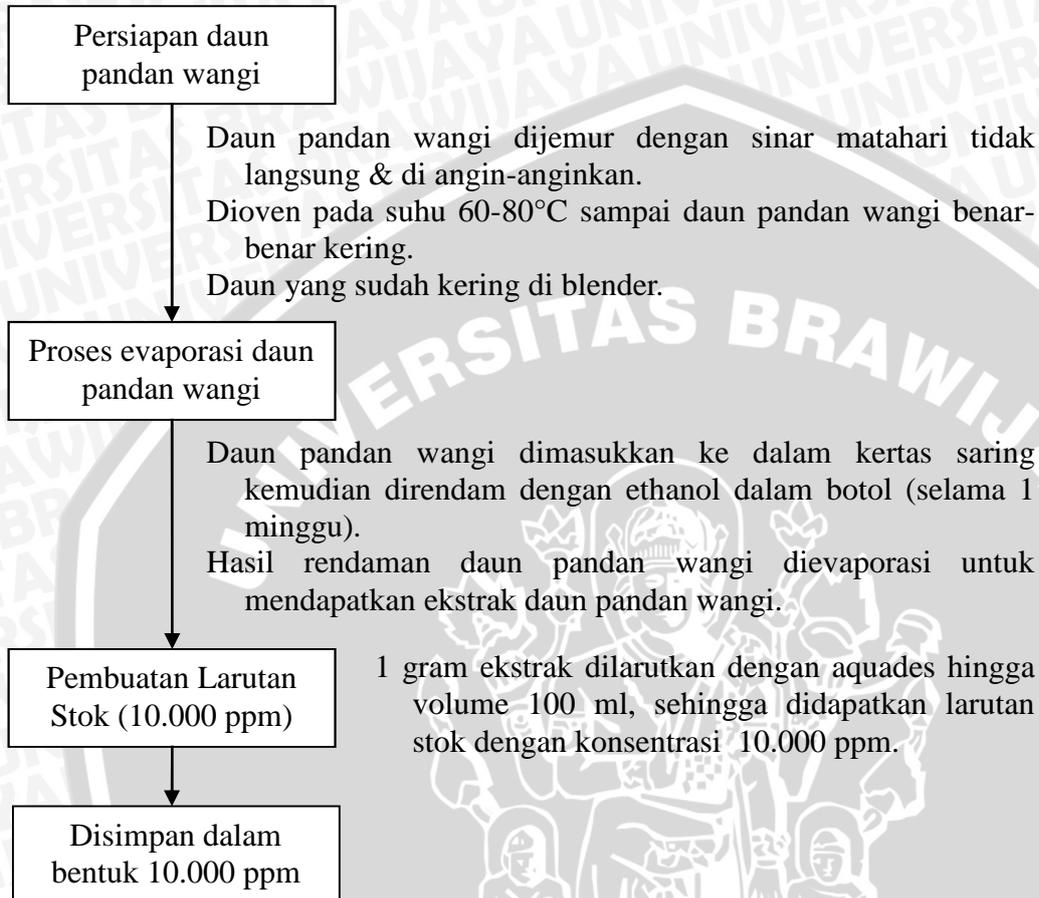
5. Pengamatan terhadap perlakuan dilaksanakan setelah 24 jam dan dihitung jumlah larva yang mati.
6. Pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali untuk masing-masing konsentrasi.



4.7.4 Penelitian Utama

Ada empat tahap alur kerja penelitian, yaitu:

Tahap 1 : Pembuatan Larutan Stok



Tahap 2 : Perlakuan

Perlakuan dilakukan dengan penyimpanan larutan stok dengan variasi waktu:

Perlakuan 1 : 0 hari (kontrol)

Perlakuan 2 : 3 hari

Perlakuan 3 : 7 hari

Perlakuan 4 : 15 hari

Perlakuan 5 : 30 hari.

Dan disimpan dengan menggunakan *freezer* dengan satu pintu dengan suhu 15°C.

Tahap 3 : Pembuatan larutan Uji Larvasida

Dari larutan ekstrak daun pandan wangi 10.000 ppm setelah dilakukan penyimpanan

sesuai dengan perlakuan, dengan menggunakan rumus $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$, dibuat masing-masing konsentrasi larutan ekstrak:

Larutan I (200 ppm) : 2 mL larutan stok + 98 mL aquades

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$10.000 \cdot 1 = 200 \cdot V_2$$

$$V_2 = \frac{10.000}{200} = 50 \text{ mL}$$

Larutan II (300 ppm) : 3 mL larutan stok + 97 mL aquades

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$10.000 \cdot 1 = 300 \cdot V_2$$

$$V_2 = \frac{10.000}{300} = 33,3 \text{ mL}$$

Larutan III (500 ppm) : 5 mL larutan stok + 95 mL aquades

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$10.000 \cdot 1 = 500 \cdot V_2$$

$$V_2 = \frac{10.000}{500} = 20 \text{ mL}$$

Tahap 4 : Uji Larvasida

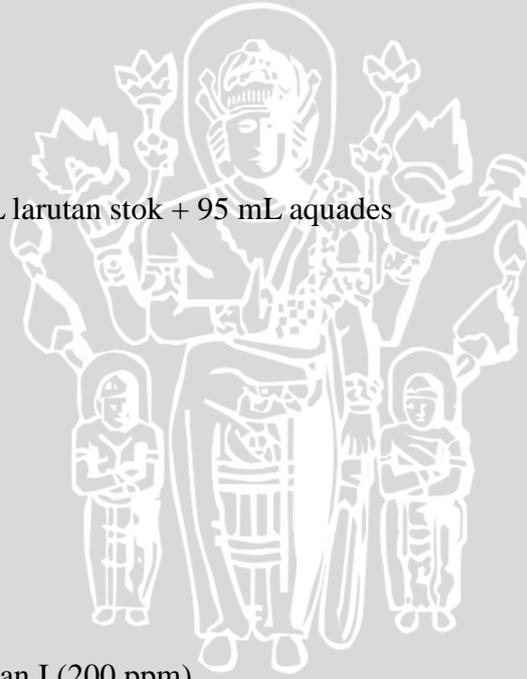
Gelas 1 : Larva *Aedes* + larutan I (200 ppm)

Gelas 2 : Larva *Aedes* + larutan II (300 ppm)

Gelas 3 : Larva *Aedes* + larutan III (500 ppm)

Keterangan :

- Jumlah masing-masing larva *Aedes* pada setiap perlakuan adalah 10 larva.
- Setelah dilakukan pengamatan selama 24 jam, dihitung jumlah larva yang mati kemudian ditabulasi dan kemudian dilakukan analisis data.



- Dilakukan 4 kali pengulangan.

4.7.5 Prosedur Penelitian

4.7.5.1 Penelitian Pendahuluan

Sebelum di lakukan penelitian utama akan di lakukan penelitian pendahuluan yang bertujuan untuk mengkonfirmasi efektifitas konsentrasi ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) mempengaruhi efektivitasnya sebagai larvasida terhadap larva nyamuk *Aedes sp.* adalah 300ppm. Penelitian pendahuluan ini menggunakan tiga konsentrasi yaitu 200ppm,300ppm dan 500ppm , dan di lakukan pengulangan sebanyak 4 kali pengulangan .

4.8 Pengumpulan data

Data hasil yang telah diperoleh dari penelitian di masukan kedalam tabel dan diklasifikasikan menurut jumlah larva nyamuk *Aedes sp* yang mati, pengulangan, waktu lama penyimpanan. dan hasil tersebut , hasilnya akan dilakukan uji statistik.

4.9 Tabulasi data

Persentasi kemampuan konsentrasi ekstrak daun pandan wangi sebagai insektisida dihitung menggunakan formula Abbot dengan rumus dibawah ini:

$$A_1 = \frac{A B}{100 - B} \times 100\%$$

Keterangan :

A1: persentase kematian larva nyamuk *Aedes sp* setelah koreksi.

A : persentase kematian larva nyamuk *Aedes sp* uji.

B : persentase kematian larva nyamuk *Aedes sp* kontrol positif.

4.10 Diagram Alur Kerja Penelitian



