

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni menggunakan metode *post test only-control group design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas larvasida ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dalam mempengaruhi kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III dan efeknya terhadap kerusakan *perispiracular lobe*. Pada kelompok perlakuan kontrol negatif (-) menggunakan air sumur dan perlakuan kontrol positif (+) menggunakan abate.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva nyamuk *Aedes aegypti*.

4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* yang didapat dari Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

1. Larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III.
2. Ukuran larva 4-5 mm.

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Ukuran larva lebih atau kurang dari 4-5 mm (Depkes, 2007).

4.2.3 Jumlah Sampel

Sampel penelitian ini adalah larva nyamuk *Aedes aegypti*. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol positif (air sumur diberi abate), 1 kelompok kontrol negatif (air sumur tanpa diberi ekstrak), dan 3 kelompok diberi ekstrak. Masing-masing kelompok perlakuan mewakili dosis/konsentrasi dengan jumlah anggota yang sama. Jumlah larva dalam tiap kelompok berdasarkan pedoman WHO yaitu menggunakan 25 larva (WHO, 2005).

Penentuan pengulangan eksperimen berdasarkan rumus (Solimun, 2001):

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

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

$$pn-p \geq 16$$

$$5n-5 \geq 16$$

$$5n \geq 16+5$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 21:5$$

$$n \geq 4,2$$

Keterangan:

n: pengulangan

p: kelompok perlakuan

Berdasarkan rumus di atas, maka pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini minimal 4 kali untuk setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Jumlah larva yang dibutuhkan adalah:

25 ekor setiap perlakuan x 5 kelompok x 4 pengulangan = 500 ekor
larva nyamuk *Aedes aegypti*.

4.3 Perlakuan

Terdapat 5 kelompok perlakuan dalam penelitian ini, yaitu:

1. Perlakuan 1:
Direndam ekstrak etanol kulit jeruk nipis dengan konsentrasi 0,25%.
2. Perlakuan 2:
Direndam ekstrak etanol kulit jeruk nipis dengan konsentrasi 0,5%.
3. Perlakuan 3:
Direndam ekstrak etanol kulit jeruk nipis dengan konsentrasi 1%.
4. Perlakuan 4:
Direndam larutan abate dengan konsentrasi 0,01% sebagai kontrol positif.
5. Perlakuan 5:
Direndam air sumur sebagai kontrol negatif.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan menggunakan *range* yang ditentukan melalui uji eksplorasi. Didapatkan konsentrasi 0,25%, 0,5%,

dan 1% sebagai konsentrasi ekstrak yang akan digunakan dalam penelitian ini.

4.4.2 Variabel Antara

Variabel antara dalam penelitian ini adalah kerusakan *perispiracular lobe* larva *Aedes aegypti* instar III.

4.4.3 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah larva yang mati oleh pemberian ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) pada konsentrasi tertentu dalam waktu yang ditentukan.

4.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan September-November 2016.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terbagi dalam 2 kelompok yaitu bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis dan bahan uji potensi ekstrak kulit jeruk nipis sebagai larvasida.

- a) Bahan pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) antara lain kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang telah dikeringkan, aquades, pelarut ekstrak (etanol 96%), dan aseton.

- b) Bahan uji potensi larvasida kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yaitu ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), larva *Aedes aegypti* 25 ekor setiap perlakuan, air sumur, dan abate.

4.6.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terbagi dalam 2 kelompok yaitu alat-alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) serta alat-alat yang digunakan untuk uji potensi ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai larvasida *Aedes aegypti*.

- a) Alat untuk pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yaitu alat penggerus/blender, tabung untuk merendam serbuk kering kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang sudah diblender, saringan, kertas saring, botol penampung hasil ekstraksi, timbangan analitik, klem statis, oven, freezer/lemari es, dan seperangkat alat evaporasi vakum. Seperangkat alat evaporasi terdiri dari *rotary evaporator*, pompa vakum, tabung pendingin dan alat pompa sirkulasi air dingin, bak penampung air dingin, labu penampung hasil evaporasi, labu penampung etanol, batu didih, cawan penguap, alat pemanas aquades (*water bath*), dan pipa plastik.
- b) Alat untuk uji potensi ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), yaitu gelas (bekas air mineral 250 ml), pipet tetes, tabung ukur, gelas beker, spiuit 3 cc, *object glass*, mikroskop, dan kertas saring.

4.7 Definisi Operasional Penelitian

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah:

1. Larva *Aedes aegypti* yang dipilih adalah larva yang hidup dan dalam stadium III yang diambil dari Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur.
2. Larva *Aedes aegypti* Instar III adalah berukuran 4-5 mm dan *siphon* sudah berwarna coklat.
3. Kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang didapatkan dari Materia Medica Batu.
4. Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) adalah 2,5 kilogram kulit jeruk nipis yang dikeringkan sehingga didapatkan 700 gram kulit jeruk nipis kering yang kemudian diekstraksi dengan pelarut etanol 96% dan didapatkan 42 gram pasta.
5. Kontrol positif pada penelitian ini adalah dengan menggunakan abate dengan konsentrasi 0,01%.
6. Kontrol negatif pada penelitian ini adalah dengan menggunakan air sumur.
7. Pengamatan jam ke-12, 24, dan 48 sesuai dengan panduan WHO.
8. Larva *Aedes aegypti* yang mati: bila dilakukan sentuhan pada bagian tubuh pada larva tidak terjadi pergerakan.
9. Larvasida: suatu zat yang digunakan untuk membunuh larva nyamuk (WHO, 2002).
10. *Larvicidal activity* dihitung menggunakan rumus persentase mortalitas.

$$\text{Percentage Mortality (\%)} = \frac{\text{Number of dead larvae}}{\text{Number of larvae introduced}} \times 100$$

11. *Siphon* adalah saluran pernapasan larva yang terdapat pada segmen

ke-8 abdomen.

12. *Perispiracular lobe* adalah suatu struktur penting yang berada di ujung *siphon* dan berfungsi melindungi saluran pernapasan larva (*terminal spiracle*).

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Ekstraksi Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Proses ekstraksi kulit jeruk nipis dilakukan dengan cara maserasi yaitu dengan pelarut etanol 96%. Prosesnya adalah sebagai berikut.

1. Kulit jeruk nipis dijemur sampai kering, setelah itu kulit jeruk nipis yang kering dihaluskan dengan blender sehingga diperoleh bentuk serbuk.
2. Serbuk kulit jeruk nipis sebanyak 150 gram dimasukkan dalam tabung untuk direndam dengan etanol.
3. Pelarut etanol sebanyak 1 liter dimasukkan ke dalam tabung tersebut sampai serbuk yang ada di dalam kertas saring terendam dalam pelarut etanol. Biarkan sampai rendaman berwarna coklat tua selama kurang lebih 2 hari.
4. Hasil rendaman etanol ditampung di botol lain dan ekstraksi dilakukan beberapa kali penggantian etanol.
5. Ekstraksi dihentikan jika etanol di tempat penampung serbuk kulit jeruk nipis sudah jernih.
6. Hasil ini selanjutnya akan dievaporasi (untuk memisahkan ekstrak kulit jeruk nipis dengan pelarut etanol, didapat bahan semacam pasta yang mempunyai konsentrasi 100%).

4.8.2 Evaporasi Hasil Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

1. Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30 hingga 40 derajat terhadap meja percobaan.
2. Hasil rendaman etanol dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi.
3. Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah evaporator, pendinginan spiral dihubungkan pada dengan vakum melalui selang plastik, dan dihubungkan pula dengan *waterpump* juga melalui selang plastik.
4. *Waterpump* ditempatkan dalam bak yang berisi aquades, kemudian dihubungkan dengan sumber listrik sehingga aquades akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan rata).
5. Evaporator diletakkan sedemikian rupa, sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *waterbath*.
6. Vakum dan *waterbath* dihubungkan dengan sumber listrik dan suhu *waterbath* dinaikkan sesuai titik didih etanol yaitu 78 derajat.
7. Pada titik didih etanol terjadi penguapan antara etanol dengan zat aktifnya ekstrak kulit jeruk nipis.
8. Biarkan sirkulasi (pemisahan etanol dengan ekstrak kulit jeruk nipis) berjalan sampai etanol berhenti mengalir pada labu pemisah selama kurang lebih 2-3 jam dan volume ekstrak berkurang dan menjadi kental.
9. Setelah itu, ekstrak yang tertinggal pada labu evaporator dipindahkan pada cawan penguap dan dilanjutkan dengan pemanasan dalam

oven dengan suhu 50-60 derajat selama 1-2 menit untuk menguapkan pelarut yang tersisa.

10. Hasil akhir diperoleh ekstrak kulit jeruk nipis berupa pasta yang berwarna kekuningan. Hasil inilah yang akan digunakan dalam percobaan.
11. Setelah didapatkan hasil ekstraksi, ekstrak yang berupa pasta ditimbang dengan neraca analitik.
12. Dibuat larutan stok ekstrak etanol kulit jeruk nipis 10% dengan cara 10 gram ekstrak kulit jeruk nipis dilarutkan dengan air sumur hingga volumenya 100 ml.

4.8.3 Pembuatan Larutan Ekstrak dengan Berbagai Konsentrasi

Larutan stok ekstrak etanol kulit jeruk nipis 10% yang tersimpan dalam lemari es dibiarkan di udara kamar selama 30 menit agar sesuai dengan suhu kamar. Untuk membuat ekstrak etanol kulit jeruk nipis 1%, 0,5%, dan 0,25% digunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

- Dengan
- M1 = konsentrasi larutan stok
 - M2 = konsentrasi larutan yang diinginkan
 - V1 = volume larutan stok yang harus dilarutkan
 - V2 = volume larutan ekstrak yang diinginkan

Setelah diperoleh 100 mL larutan ekstrak daun cengkeh dengan konsentrasi 1%, selanjutnya dibuat larutan dengan konsentrasi 0,5% dan 0,25% dengan cara pengenceran.

1. 50 ml ekstrak kulit jeruk nipis 1% ditambahkan 50 ml air sumur. Diperoleh 100 ml ekstrak kulit jeruk nipis dengan konsentrasi 0,5%.
2. 50 ml ekstrak kulit jeruk nipis 0,5% ditambahkan 50 ml air sumur. Diperoleh 100 ml ekstrak kulit jeruk nipis dengan konsentrasi dengan konsentrasi 0,25%.

4.8.4. Metode Uji Fitokimia

Uji fitokimia digunakan mengetahui ada atau tidaknya suatu zat aktif pada ekstrak etanol kulit jeruk nipis. Pada penelitian ini dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan flavonoid dan limonoid pada ekstrak etanol kulit jeruk nipis.

4.8.4.1 Uji Flavonoid

Cara mengidentifikasi flavonoid yaitu dengan mengambil 1 gram ekstrak pekat ditambah 1 ml kloroform dan 1 ml aquades ke dalam tabung reaksi kemudian digoyang. Lalu didiamkan sejenak dan diambil lapisan air (lapisan atas) kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium (Mg) dan 5 tetes HCl pekat. Reaksi positif apabila terbentuknya warna jingga/orange (Sangi, 2008).

4.8.4.2 Uji Limonoid

Pengujian ini dilakukan dengan mengambil 0,5 gram ekstrak pekat ke dalam tabung reaksi. Kemudian, dilarutkan ke dalam 0,5 ml kloroform, ditambah 0,5 ml asam asetat anhidrat, dan ditambah 2 ml

H₂SO₄ pekat dengan cara diteteskan melalui dinding tabung. Reaksi positif apabila terbentuknya warna hijau-biru (Sangi, 2008).

4.8.5 Cara Kerja Penelitian

1. Ekstrak kulit jeruk nipis dimasukkan ke dalam gelas plastik disesuaikan dengan konsentrasi yang diinginkan sesuai kelompok perlakuan.
2. Kelompok kontrol negatif diberi air sumur pada gelas plastik. Dan kelompok kontrol positif diberi abate sesuai konsentrasi yang diinginkan.
3. Kemudian dimasukkan larva *Aedes aegypti* pada masing – masing kelompok perlakuan.
4. Masing-masing perlakuan berisi 25 ekor larva *Aedes aegypti* dengan pengulangan 4 kali.
5. Kemudian dilakukan pengamatan tiap 12 jam selama 2 hari (48 jam).

Larva yang mati akan dicatat dan dihitung menggunakan rumus Abbot, yaitu :

$$\text{Percentage Mortality (\%)} = \frac{\text{Number of dead larvae}}{\text{Number of larvae introduced}} \times 100$$

(Rajasekaran dan Duraikannan, 2012)

4.8.6 Pemeriksaan Mikroskop

a. Mikroskop Cahaya

Dilakukan pengamatan terhadap segmen terminal larva *Aedes aegypti* instar III yang difokuskan pada *perispiracular lobe*

yang berada pada ujung *siphon*. Diamati 1 ekor larva dari tiap kelompok perlakuan.

1. Diletakkan mikroskop cahaya pada permukaan yang stabil dan rata serta hindari dari sinar matahari secara langsung.
2. Atur letak meja dan kursi dengan enak dan nyaman mungkin, sehingga lensa okuler mikroskop terletak tepat setinggi mata.
3. Periksa kebersihan dari kaca mikroskop, lensa obyektif dan lensa okuler.
4. Mikroskop dihubungkan ke sumber arus/cahaya, dan dinyalakan dengan menekan tombol ON.
5. Atur posisi kondensor sehingga sesuai dengan sumber cahaya, agar sinar yang dibutuhkan masuk ke lensa sesuai.
6. Atur sinar yang masuk ke lapangan pandang maksimal dan terfokus.
7. Diletakkan 5 larva dari masing-masing kelompok perlakuan di atas *object glass* dengan posisi sejajar dan diberi jarak sesuai label yang sudah diberikan.
8. *Object glass* yang akan diperiksa diletakkan pada meja preparat.
9. Mula-mula digunakan lensa objektif dengan pembesaran kecil.
10. Sediaan difokuskan, mula-mula dengan makrometer dan kemudian diperjelas dengan mengatur dengan mikrometer sehingga terlihat segmen terminal larva, terutama *siphon*

dan *perispiracular lobe*.

11. Sesudah didapatkan area yang akan diamati, lensa objektif pembesaran kecil diganti dengan lensa objektif yang sesuai.
12. Setelah memakai mikroskop, lensa objektif yang digunakan dibersihkan dengan kertas lensa (Lab. Anatomi-Histologi FKUB, 2012).

b. Mikroskop Elektron

Dilakukan pengamatan terhadap segmen terminal larva *Aedes aegypti* instar III yang difokuskan pada *perispiracular lobe* yang berada pada ujung *siphon*. Diamati 1 ekor larva dari tiap kelompok perlakuan.

1. Sambung alat dengan sumber listrik.
2. Nyalakan saklar yang berada disamping alat (SEM) dan dibiarkan selama 30 menit untuk pemanasan alat.
3. Set spesimen pada spesimen *holder*.
4. Tekan tombol EVAC/AIR untuk memasukkan udara pada ruang spesimen. Lampu LED AIR (yang berkedip dan berwarna kuning). Untuk menunjukkan bahwa udara sudah masuk pada *chamber* spesimen maka lampu LED AIR akan menyala konstan dan tidak berkedip lagi.
5. Ditarik *handle* pada tempat sampel dan sampel diletakkan pada tempat *holder* yang tersedia. Tutup kembali bagian tersebut dan tekan tombol EVAC/AIR untuk proses pemvacuman dan tunggu sampai lampu LED AIR berwarna

biru dan tidak berkedip lagi.

6. Diklik ikon *software* SEM pada laptop.
7. Diklik ikon *start* untuk memulai proses observasi pada sampel.
8. Disimpan hasil observasi dan analisisnya.
9. Diklik stop untuk menghentikan proses observasi sampel.
10. Tekan tombol EVAC/AIR untuk memasukkan udara pada ruang spesimen. Lampu LED AIR (yang berkedip dan berwarna kuning) untuk mengakhiri proses vacum sampel.
11. Ditarik *handle* pada tempat sampel dan sampel dikeluarkan dari *chamber*.
12. Matikan SEM dengan menekan tombol on/off.
13. Dicabut kabel SEM dari sumber listrik (Biosains UB, 2012).

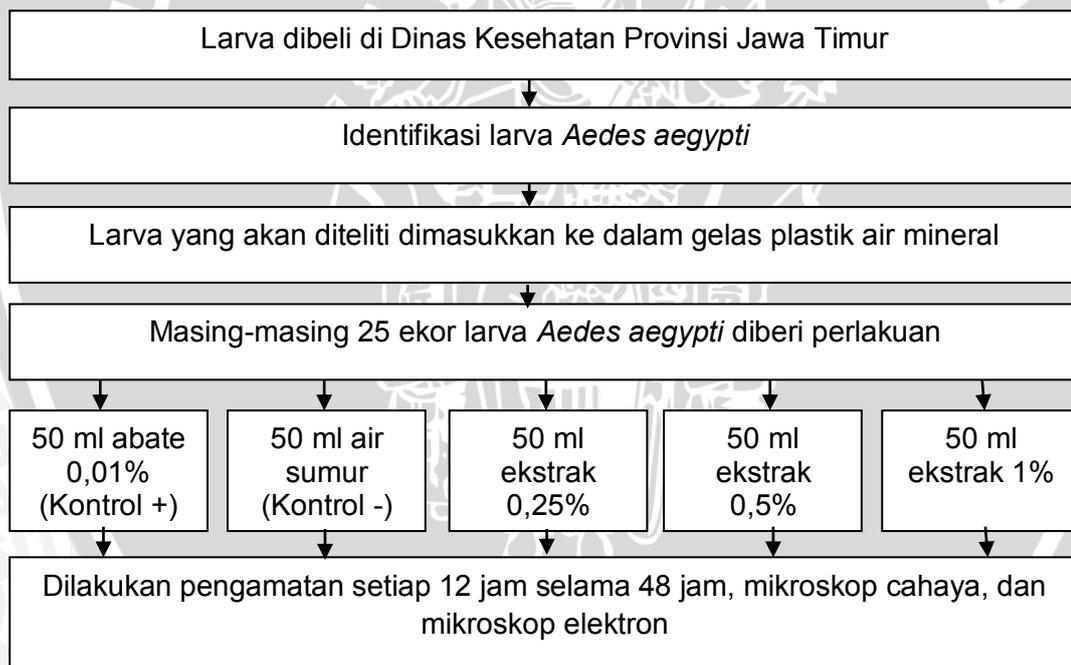
4.9 Analisis Data

Setelah didapatkan semua data dari jumlah larva *Aedes aegypti* Instar III yang mati, selanjutnya dilakukan pengolahan dan analisis data. Data potensi larvasida diuji secara statistik dengan menggunakan program SPSS 22. Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah *Kruskal Wallis*. Uji *Kruskal Wallis* merupakan uji nonparametrik yang ditujukan untuk mengetahui perbedaan antarperlakuan dengan rata-rata jumlah kumulatif kematian larva. Kriteria pengujian ini adalah apabila nilai $p < 0,05$ maka terdapat perbedaan yang signifikan dan apabila nilai $p > 0,05$ maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Namun, sebelum menentukan jenis analisis yang akan digunakan dalam menggunakan data statistik tersebut, data ini harus melalui beberapa uji terlebih dahulu, yaitu analisis kehomogenannya dengan menggunakan *levene*

test untuk mengetahui apakah data yang digunakan homogen atau tidak dan uji normalitas menggunakan metode *One-Sample Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat apakah data yang digunakan memiliki distribusi yang normal atau tidak.

Kemudian dilakukan *Mann-Whitney test* dengan tujuan mengetahui adanya perbedaan signifikan antardua kelompok perlakuan. Kriteria uji ini yaitu apabila nilai $p > 0,05$ maka tidak didapatkan perbedaan signifikan antardua kelompok perlakuan dan apabila nilai $p < 0,05$ maka didapatkan perbedaan signifikan antardua kelompok perlakuan.

4.10 Alur Kerja Penelitian



4.11 Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	Bulan									
		7	8	9	10	11	12	1	2	3	4
	Pembuatan dan Revisi Proposal	■	■								
	Pemilihan sample, pengumpulan data dan Analisis data				■	■	■				
	Penyusunan Laporan							■	■	■	■
	Seminar Hasil										■

