

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *true experimental-post test only control group design*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

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

4.2.2 Sampel

Menurut Wulandari *et al* (2006), larva pada tahap instar III dipakai sebagai bahan penelitian karena tahap ini dianggap cukup mewakili kondisi larva. Ukuran larva instar III tidak terlalu kecil sehingga mudah diamati dan larva ini merupakan bentuk yang aktif mencari makan. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III yang didapatkan 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. Larva nyamuk *Aedes aegypti* instar I,II,IV.
2. Ukuran larva lebih atau kurang dari 4-5 mm.

4.2.3 Jumlah Sampel

Sampel penelitian ini adalah larva nyamuk *Aedes aegypti*. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol positif (diberi abate), 1 kelompok kontrol negatif (tanpa diberi ekstrak), dan 3 kelompok diberi perlakuan. 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). Rumus untuk estimasi jumlah pengulangan (Solimun, 2001) :

$$p(n-1) \geq 15$$

Dengan n = Jumlah pengulangan tiap perlakuan

p = Jumlah perlakuan/kelompok coba

maka,

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq 4 = 4$$

Berdasarkan rumus diatas, 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 perlakuan x 4 pengulangan = 500 ekor
larva nyamuk *Aedes aegypti*.

4.3 Perlakuan

Sebelum melakukan penelitian, dilakukan penelitian pendahuluan untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana* L) yang efektif (larutan dengan konsentrasi minimum dan daya bunuh maksimum) yaitu dengan merendam larva *Aedes aegypti* instar III dengan konsentrasi 0,25%,1%, dan 2%. Namun pada konsentrasi tersebut tidak terjadi kematian pada semua larva jadi perlu untuk dilakukan peningkatan konsentrasi untuk menemukan daya bunuh yang efektif. Dan didapatkan konsentrasi yang efektif untuk membunuh yaitu 1%,2% dan 4%. Pada penelitian ini, terdapat 5 kelompok perlakuan, yaitu:

1. Perlakuan I: Direndam dengan air sumur sebagai kontrol negatif
2. Perlakuan II: Direndam ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 1%
3. Perlakuan III: Direndam ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 2%
4. Perlakuan IV: Direndam ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 4%
5. Perlakuan V: Direndam abate dengan konsentrasi 10% sebagai kontrol positif

4.4 Identifikasi Variabel

4.4.1 Variabel Dependen (tergantung)

Variabel dependen (tergantung) adalah jumlah larva *Aedes aegypti* yang tidak berhasil metamorfosis.

4.4.2 Variabel Independen (bebas)

Variabel independen (bebas) adalah jumlah konsentrasi ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana* L) pada setiap kelompok perlakuan.

4.5 Definisi Operasional

1. Kulit manggis (*Garcinia mangostana* L) yang dipakai ini adalah kulit dari buah manggis (*Garcinia mangostana* L) yang sudah tua yang didapatkan dari Materi Medika Batu. Penelitian ini menggunakan kulit manggis yang tua karena jumlah kandungan bioaktif (flavonoid, saponin dan tanin) daripada kulit manggis yang muda. (Pothitirat *et al.*, 2009)
2. Biolarvasida yang digunakan terbuat dari hasil evaporasi ekstraksi kulit manggis yang telah dikeringkan dengan menggunakan etanol yang dilakukan di Polinema Malang. Pada penelitian ini, ekstrak kulit manggis menggunakan pelarut etanol yang dapat menarik senyawa kimia seperti flavonoid, saponin dan tanin karena etanol adalah pelarut polar yang dapat memunculkan zat aktif yang terkandung dalam kulit manggis (Hasan *et al.*, 2016).
3. Pada penelitian ini, larva *Aedes aegypti* instar III yang diperoleh dari Dinas Kesehatan Surabaya direndam pada media gelas plastik yang berisi ekstrak kulit manggis. Bentuk larva *Aedes aegypti* instar III yaitu ukurannya lebih besar sedikit dari larva instar II (2,5-3,8 mm).
4. Larva *Aedes aegypti* yang dianggap mati adalah larva yang sudah tidak bisa bergerak dan tidak menjadi pupa.

5. Media yang digunakan untuk merendam larva merupakan gelas plastik berukuran 250 ml berisi ekstrak kulit manggis dengan masing masing konsentrasi.
6. *Larvicidal activity* adalah kemampuan senyawa untuk membunuh larva dan penelitian ini diamati selama 48 jam.
7. Untuk setiap konsentrasi yang berbeda, operasional diulang sebanyak 4 kali.

4.6 Lokasi dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan September 2016 sampai Desember 2016.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat-alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terbagi dalam 2 kelompok yaitu alat-alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kulit manggis serta alat-alat yang digunakan untuk uji potensi ekstrak kulit manggis sebagai larvasida larva *Aedes aegypti* :

- a). Alat Pembuatan Ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L) : blender, tabung untuk merendam kulit manggis yang sudah diblender, saringan, kertas saring, gelas ekstraksi (botol), neraca analitik, klem statis, oven, timbangan, seperangkat alat evaporasi vakum (*rotary evaporator*, pompa vakum, tabung pendingin, 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*), pipa plastik

- b). Alat – alat untuk uji potensi ekstrak kulit manggis: gelas plastik 250 ml (6 buah), *hand counter*, pipet tetes, kertas saring, termometer, *pH stick*, *stopwatch*.

4.7.2 Bahan – bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terbagi dalam 2 kelompok yaitu bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kulit manggis dan bahan uji potensi ekstrak kulit manggis sebagai larvasida:

- a). Bahan Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit manggis (*Garcinia mangostana* L): Kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L) yang telah dikeringkan: aquades, etanol 96% sebagai pelarut, aseton
- b). Bahan-bahan untuk uji potensi: larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III, air sumur, ekstrak kulit manggis, abate

4.8 Persiapan Penelitian

4.8.1 Ekstraksi Kulit Manggis

1. Bubuk manggis yang sebanyak 0,5 kg dimasukkan dalam tabung untuk direndam dengan etanol sebanyak 1000 ml.
2. Pelarut etanol dimasukkan ke dalam tabung tersebut sampai serbuk yang ada di dalam kertas saring terendam dalam pelarut etanol selama kurang lebih 1 minggu.

4.8.2 Evaporasi Hasil Ekstrak Kulit Manggis (Polinema Malang)

1. Hasil ini selanjutnya akan dievaporasi (untuk memisahkan ekstrak kulit manggis dengan pelarut etanol, didapat bahan berupa pasta sebanyak 100 gram).
2. Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30 hingga 40 derajat terhadap meja percobaan.
3. Hasil rendaman etanol dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi.
4. 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.
5. *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)
6. Evaporator diletakkan sedemikian rupa, sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *waterbath*.
7. Vakum dan *waterbath* dihubungkan dengan sumber listrik dan suhu *waterbath* dinaikkan sesuai titik didih etanol yaitu 78 derajat.
8. Pada titik didih etanol terjadi penguapan antara etanol dengan zat aktifnya ekstrak kulit manggis.

9. Biarkan sirkulasi (pemisahan etanol dengan ekstrak kulit manggis) berjalan sampai etanol berhenti mengalir pada labu pemisah selama kurang lebih 2-3 jam.
10. Setelah ini ekstrak yang tertinggal pada labu evaporator dipindahkan pada cawan penguap dan dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 50-60 derajat selama 2-3 jam.
11. Hasil akhir diperoleh ekstrak kulit manggis berupa pasta yang berwarna merah kecoklatan. Hasil inilah yang akan digunakan dalam percobaan.
12. Setelah didapatkan hasil ekstraksi, selanjutnya dibuat larutan stok ekstrak kulit manggis dengan cara 10 g ekstrak kulit manggis dilarutkan dengan aquades hingga volumenya 100 mL.

4.8.3 Pembuatan Larutan Ekstrak dengan Berbagai Konsentrasi

Larutan stok ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L) 10% yang tersimpan dalam lemari es dibiarkan di udara kamar selama 15 menit agar menjadi sesuai dengan suhu kamar. Untuk membuat ekstrak kulit manggis 4% digunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

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

Dengan $M1$ = konsentrasi larutan stok (10%)

$M2$ = konsentrasi larutan yang diinginkan (4%)

$V1$ = volume larutan stok yang harus dilarutkan

V2 = volume larutan ekstrak 4% yang diinginkan (100 mL)

Setelah diperoleh 100 mL larutan ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 4%, selanjutnya dibuat larutan dengan konsentrasi 2% dan 1% dengan cara pengenceran, yaitu:

1. 50 mL ekstrak kulit manggis 4% ditambahkan 50 mL air sumur. Diperoleh 100 mL ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 2%.
2. 50 mL ekstrak kulit manggis 2% ditambahkan 50 mL air sumur. Diperoleh 100 mL ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 1%.

4.9 Metode Uji Fitokimia

Uji fitokimia digunakan untuk mengetahui keberadaan zat aktif pada ekstrak etanol kulit manggis. Pada penelitian ini dilakukan uji fitokimia untuk menguji kandungan flavonoid, saponin dan tanin pada ekstrak etanol kulit manggis.

4.9.1 Uji Flavonoid

Untuk melakukan uji flavonoid dapat dilakukan dengan menaruh ekstrak buah manggis ke dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan logam Mg dan 4–5 tetes HCl pekat. Uji positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid. (Indrayani, L., Soetjipto, H. and Sihasale, L., 2006)

4.9.2 Uji Saponin

Uji bahan aktif saponin dilakukan dengan memanaskan larutan ekstrak dalam tabung reaksi. Kemudian dikocok kuat-kuat secara vertikal selama sepuluh detik. Uji positif ditunjukkan jika terbentuk busa yang tidak hilang selama 30 detik. (Artini, 2013)

4.9.3 Uji Tanin

Uji dilakukan dengan cara memberi larutan ekstrak uji sebanyak 1 ml direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%, jika terjadi warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin. (Windarini, 2013)

4.10 Cara Kerja Penelitian

1. Ekstrak kulit manggis 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* instar III pada masing-masing kelompok perlakuan.
4. Masing-masing perlakuan berisi 25 larva *Aedes aegypti* instar III dengan pengulangan 4 kali.
5. Kemudian dilakukan pengamatan tiap 12 jam selama 48 jam.

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

$$\text{Persentase Mortalitas: } \frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{Jumlah larva yang dimasukkan}} \times 100$$

4.11 Analisa Data

Data potensi larvasida diuji secara statistik dengan menggunakan program SPSS 23.0. Untuk menentukan jenis analisis yang akan digunakan dalam menggunakan data statistik, maka data ini harus melalui beberapa uji terlebih

dahulu untuk bisa menentukan metode statistik yang sesuai. Sebelum dilakukan analisis dengan menggunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA), data yang diperoleh dari setiap perlakuan dianalisis kehomogennannya dengan menggunakan uji *homogeneity of variance* (levene test). Untuk mengetahui apakah data yang digunakan memiliki ragam yang sama (Dahlan, 2009).

4.12 Alur Kerja Penelitian

