

2.4 Hipotesis

Adapun hipotesis yang dapat dibuat dari penelitian ini sebagai berikut :

1. Larutan senyawa sitral memiliki efek toksik yang ditunjukkan dengan mortalitas larva *Ae. aegypti*.
2. Larutan senyawa sitral mempunyai nilai LC_{50} dan nilai LC_{90} tertentu dalam membunuh larva instar III *Ae. aegypti*.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan metode eksperimental murni dengan rancangan *post test only with control group design* dimana penghitungan dilakukan di akhir intervensi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 10 minggu di beberapa tempat, yaitu :

1. Pusat studi minyak atsiri FMIPA UII untuk memperoleh senyawa sitral.
2. Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia untuk memperoleh larva instar III *Ae. aegypti*, uji pendahuluan dan uji utama.

3.3 Populasi dan Subyek Penelitian

Populasi penelitian yang digunakan adalah larva instar III *Ae. Aegypti* yang diperoleh dari laboratorium parasitologi FK UII. Besar sampel yang digunakan untuk masing-masing kelompok adalah 25 ekor. Subyek penelitian terbagi dalam dua kelompok besar yaitu :

1. Kelompok perlakuan

Kelompok perlakuan adalah kelompok subyek yang mendapatkan intervensi berupa senyawa sitral sintetik yang sudah dilarutkan dengan *tween* 80. Kelompok perlakuan terdiri dari 5 kelompok dengan variasi konsentrasi yaitu 0,004 %; 0,0045 %; 0,005 %; 0,0055 % dan 0,006 %

2. Kelompok kontrol

Kelompok kontrol dibagi dalam 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol positif dan kontrol negatif. Kelompok kontrol negatif adalah kelompok yang hanya diberikan pelarut dan air sementara kelompok kontrol positif adalah kelompok kontrol yang diberikan temesfos 0.02 ppm.

3.3.1 KriteriaSubyek Penelitian

Kriteria inklusi penelitian ini adalah larva dari jenis *Ae. aegypti* yang telah mencapai stadium instar III dan bergerak aktif.

3.3.2 Besar Sampel

Besar sample yang digunakan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer. Berikut adalah perhitungan jumlah subyek penelitian dan total replikasi yang digunakan :

$$\begin{aligned}
 (t-1)(r-1) &\geq 15 \\
 (7-1)(t-1) &\geq 15 \\
 6r-6 &\geq 15 \\
 6r &\geq 15 + 6 \\
 6r &\geq 21 \\
 r &\geq 3.5 \text{ (dibulatkan menjadi 4)}
 \end{aligned}$$

Keterangan:

t : Jumlah perlakuan

r : Jumlah replikasi

Pada penelitian ini, jumlah total replikasi yang digunakan sebanyak 4 kali sehingga total keseluruhan jumlah larva yang digunakan adalah $25 \times 7 \times 4 = 700$ ekor.

3.4 Identifikasi Variabel

Adapun variabel-variabel yang terdapat dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel Bebas : Variasi konsentrasi larutan senyawa sitral sintetik
2. Variabel Terikat : Persentase data larva instar III *Ae. aegypti* yang mati.
3. Variabel Pengganggu : Stadium larva, kualitas air, kepadatan larva, volume air, kelembaban dan suhu lingkungan.

3.5 Definisi Operasional

Berdasarkan variabel-variabel yang terdapat dalam penelitian, berikut ini adalah definisi operasional dari masing-masing variabel tersebut :

1. Konsentrasi larutan senyawa sitral adalah senyawa sitral yang telah dilarutkan dengan *tween* 80 dan variasi konsentrasi dibuat dalam satuan % .
2. Mortalitas larva adalah presentase kematian larva uji setelah diberi perlakuan selama 24 jam.
3. LC₅₀ adalah konsentrasi yang mampu untuk membunuh 50 % dari total jumlah populasi larva *Ae. aegypti* dalam satu kelompok (25 ekor) setelah pemberian intervensi.
4. LC₉₀ adalah konsentrasi yang mampu untuk membunuh 90% dari total jumlah populasi larva *Ae. aegypti* dalam satu kelompok (25 ekor) larva *Ae. aegypti* setelah pemberian intervensi.
5. Stadium larva adalah instar III yang diketahui dari panjang badannya yang berkisar 4 - 5 mm atau usia larva berkisar 5 - 6 hari.
6. Air uji adalah air yang memiliki pH 7-7,5 yang diukur dengan pH meter dan memiliki volume 100 ml pada setiap kelompok uji.
7. Kepadatan larva adalah banyaknya jumlah larva yang dikendalikan dengan memberikan jumlah yang sama pada tiap kelompok uji yaitu 25 ekor larva.
8. Suhu adalah temperatur ruang uji berkisar 22-28°C yang diukur dengan termometer ruangan.

3.6 Instrumen Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : cawan plastik, *beaker glass*, pengaduk, labu *Erlenmayer*, *timer*, dan alat tulis. Sementara bahan-bahan yang

digunakan dalam penelitian ini antara lain : larva instar III *Ae. aegypti*, akuades, pelarut, hati ayam, dan senyawa sitral sintetik.

3.7 Tahapan Penelitian

3.7.1 Penyediaan Senyawa Sitral

Senyawa sitral yang digunakan sebagai variabel dalam penelitian ini didapatkan dari Pusat Studi Minyak Atsiri (*Center Essential Oil Study*) FMIPA UII yang diproduksi oleh PT. Aldrich.

3.7.2 Proses Pembuatan Larutan Senyawa Sitral

Senyawa sitral sintetik yang digunakan dalam penelitian ini bersifat sukar larut dalam air sehingga senyawa sitral lebih dulu dicampurkan dengan pelarut dan akuades dalam labu *Erlenmeyer*. Kemudian, hasil dari larutan tersebut dituangkan ke dalam tempat pengujian.

3.7.3 Tahap Pemeliharaan Larva

Telur – telur nyamuk *Ae. aegypti* yang didapatkan dari Laboratorium Parasitologi FK UII diletakkan dalam cawan plastik yang berisi air agar telur dapat berkembang biak dan menetas menjadi larva. Larva-larva hasil penetasan tersebut kemudian dipindahkan ke dalam beberapa cawan plastik. Larva-larva tersebut diberikan hati ayam sebagai makanan hingga larva-larva tersebut memasuki stadium instar III.

3.7.4 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan yang dilakukan adalah uji pelarut dan uji variasi konsentrasi. Uji pelarut bertujuan untuk melihat pelarut mana yang memberikan efek homogenitas yang paling baik terhadap senyawa sitral sintetik dan tidak menimbulkan kematian larva instar III *Ae. aegypti*. Pelarut yang digunakan untuk uji pelarut adalah *tween80*, DMSO dan akuades. Adapun cara kerja dalam uji pelarut untuk melihat pelarut yang memiliki efek homogenitas yang baik dalam melarutkan senyawa sitral sintetik adalah sebagai berikut :

1. Larutan senyawa sitral diteteskan secukupnya ke dalam 3 kolom plat tetes.
2. Larutan *tween* 80 diteteskan pada kolom pertama plat tetes, DMSO pada kolom kedua plat tetes dan akuades pada kolom ketiga plat tetes.
3. Masing-masing kolom plat tetes diaduk dengan lidi pengaduk kemudian diamati larutan yang memiliki kelarutan paling homogen.

Selain untuk melihat keefektifitasan daya homogenitas pelarut, uji pelarut juga melihat konsentrasi pelarut yang tidak menimbulkan kematian pada larva instar III. Adapun cara kerja untuk melihat toksisitas *tween* 80 yang digunakan antara lain :

1. Label diberikan pada besar konsentrasi yang diujikan.
2. Larva *Ae. aegypti* disiapkan sebanyak 25 ekor dalam 25 ml air dalam *beaker* lain.
3. *Tween* 80 sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam *beaker* dan ditambahkan air sampai volume mencapai volume 75 ml.
4. Larva *Ae. aegypti* yang telah disiapkan selanjutnya disaring dan dimasukkan ke dalam *beaker* yang telah terisi *tween* 80.

Uji variasi konsentrasi bertujuan untuk menentukan variasi konsentrasi yang digunakan pada uji utama. Variasi konsentrasi yang digunakan pada uji pendahuluan yaitu 0,003%; 0,004%; 0,005%; 0,1%; 0,2%; 0,025%. Seluruh uji pendahuluan inidilaksanakan di Laboratorium Parasitologi FK UII. Adapun cara kerja untuk membuat konsentrasi (0.025%) larutan senyawa sitral adalah sebagai berikut :

1. Larutan senyawa sitral konsentrasi 100 % dibuat dengan rumus perbandingan 1:1.
2. Senyawa sitral sintetik diambil sebanyak 0,025 % ml kemudian dicampurkan dengan 0,025 % ml *tween* 80 ke dalam *beaker*.
3. Air ditambahkan ke dalam *beaker* sehingga volume menjadi 100 ml.
4. Larva instar III *Ae. aegypti* sebanyak 25 ekor yang telah disaring dimasukkan ke dalam *beaker* yang berisi larutan senyawa sitral 1%.

5. Kelompok kontrol positif dan kontrol negatif disiapkan sebagai pembanding.
6. Jumlah larva yang mati diamati setelah 24 jam.

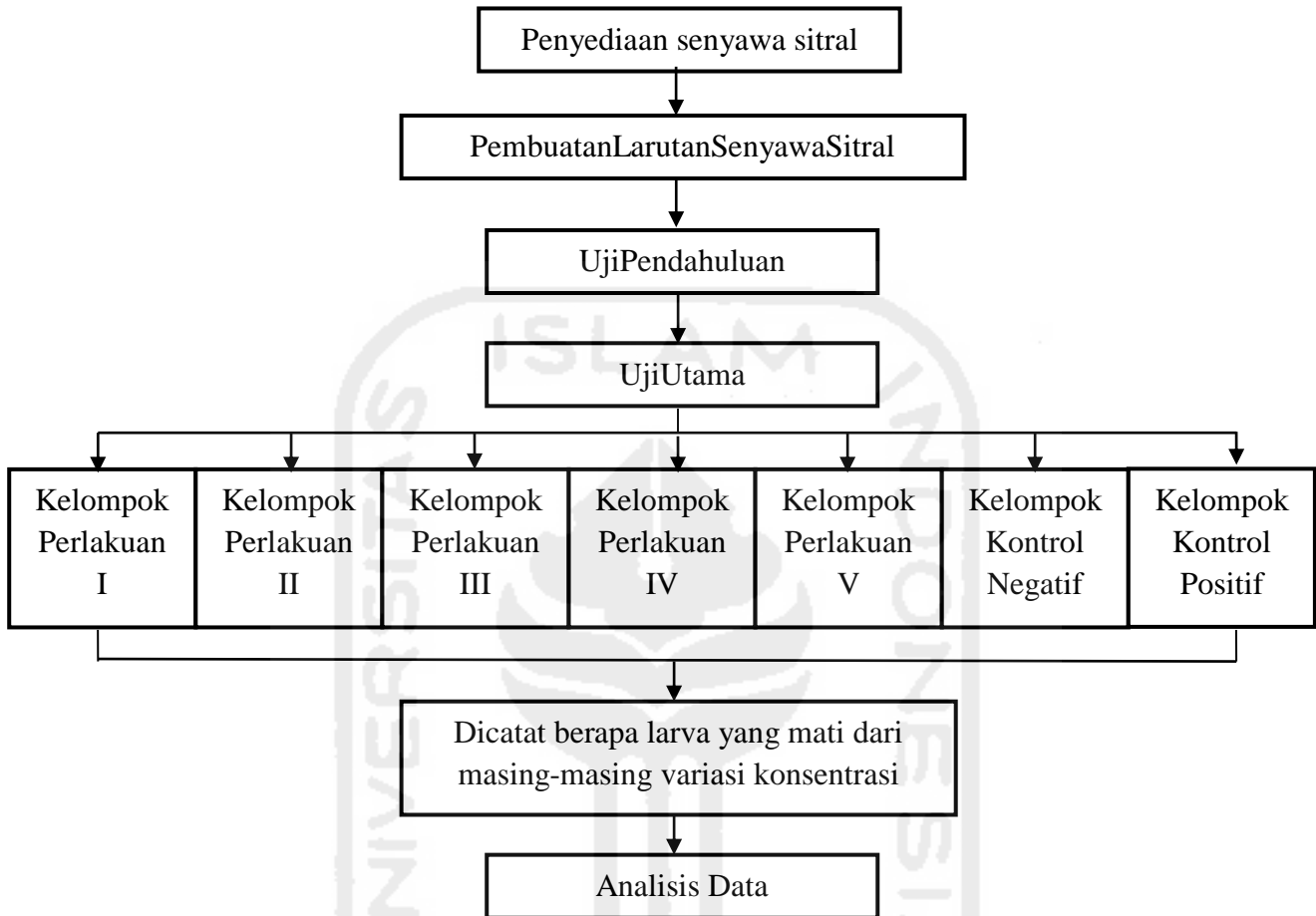
Kelompok kontrol yang digunakan adalah kelompok kontrol negatif dan kontrol positif. Kelompok kontrol negatif hanya terbuat dari pelarut dan air sementara kontrol positif dibuat menggunakan temefos. Dosis temefos yang digunakan untuk pada penelitian ini adalah 0,02 ppm. Adapun cara kerja untuk membuat temefos 0,02 ppm adalah sebagai berikut :

1. Temefos sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 5 ml etanol 70%
2. Konsentrasi temefos didapatkan sebesar 200 ppm.
3. Temefos dengan konsentrasi 200 ppm diambil 100 mikroliter menggunakan mikropipet dan dilarutkan dalam 10 ml etanol 70%.
4. Konsentrasi temefos didapatkan 2 ppm.
5. Temefos dengan konsentrasi 2 ppm diambil sebanyak 1 ml dan dilarutkan dalam 100 ml air.
6. Diaduk hingga homogen.
7. Konsentrasi temefos didapatkan 0,02 ppm.
8. Larva instar III *Ae. aegypti* dimasukkan sebanyak 25 ekor yang telah disaring ke dalam *beaker* yang berisi temefos 0,02 ppm.
9. Kematian larva diamati setelah 24 jam.

3.7.5 Uji Utama

Uji utama ini dilakukan dengan menggunakan *beaker glass*. Konsentrasi yang digunakan dalam uji utama adalah 0,004 %; 0,0045 %; 0,005 %; 0,0055 % dan 0,006 %. Langkah kerja yang dilakukan pada uji utama sama dengan langkah kerja pada uji pendahuluan dengan menggunakan 5 variasi konsentrasi dan 2 kelompok kontrol.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 13. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Jumlah larva yang mati dinyatakan dalam persen yang dihitung sebagai berikut :

$$\frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{Jumlah larva total dalam beaker glass}} \times 100\%$$

Data yang telah diperoleh selanjutnya diinput untuk diolah dengan menggunakan *software* berbasis statistik. Uji statistik yang dilakukan meliputi uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test*. Kemudian dilakukan analisis variabel dengan menggunakan *Kruskal-Wallis test* selanjutnya dilakukan analisis *Mann-*

Whitney. Untuk menentukan konsentrasi yang efektif LC₅₀ dan LC₉₀, dihitung dengan menggunakan analisis Probit.

3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini dilakukan setelah mendapatkan kelayakan uji dari Komite Etik FK UII. Hewan diperlakukan dengan sebaik mungkin.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 2. Jadwal Penelitian

No	Jenis Kegiatan	12/15	1/16	2/16	3/16	4/16	5/16	6/16	7/16	8/16	9/16	10/16	11/16	12/16	01/17	02/17	3/17
1	Penyusunan Proposal																
2	Pengajuan dan Seminar Proposal																
3	Pengajuan Etik																
4	Uji Pendahuluan																
5	Uji Utama																
6	Pengolahan Data dan Penyusunan Hasil																
8	Pengajuan dan Seminar Hasil																