

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan Kontrol (+) abate 1%, dan Kontrol (-) *aquadest* 100%. Variabel bebas adalah ekstrak etanol kulit buah Kakao (*Theobroma cacao* L) dan variabel terikat adalah kematian larva instar III nyamuk *Aedes aegypti*.

B. Lokasi Dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Penelitian dan penetasan telur hingga menjadi larva instar III nyamuk *Aedes aegypti* dilakukan di Laboratorium Parasitologi Poltekkes Kemenkes Tanjung Karang Jurusan Teknologi Laboratorium Medis. Pembuatan ekstrak dan Determinasi dilakukan di Laboratorium Fakultas MIPA Jurusan Biologi Universitas Lampung.

2. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari – April 2024.

C. Subjek Penelitian

Subjek dari penelitian ini adalah kulit buah Kakao (*Theobroma cacao* L) yang sudah siap dipanen dengan ciri-ciri adanya perubahan warna kulit dan biji yang terlepas dari kulit bagian dalam, kemudian dibuat ekstrak lalu diencerkan dengan konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, 10%., Kontrol (+) abate 1%, dan Kontrol (-) *aquadest* 100%. Larva instar III *Aedes aegypti* yang digunakan adalah hasil penetasan telur yang diperoleh dari Balai Litbang Kesehatan Baturaja.

Besar sampel pada penelitian ini adalah 25 ekor disetiap konsentrasi dengan 4 kali pengulangan berdasarkan rumus Federer, yaitu :

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

Keterangan :

t : Perlakuan

n : Pengulangan

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

$$(7-1)(n-1) \geq 15$$

$$(6) (n-1) \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 21/6$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \geq 4$$

D. Variabel dan Devinisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Devinisi Operasional

No	Variabel	Devinisi	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
1	a. Variabel bebas : ekstrak kulit buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L)	kulit buah kakao (<i>Theobroma cacao</i> L) yang sudah matang lalu diekstrak menggunakan pelarut etanol dan diencerkan dengan konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, 10%. Kontrol (-), <i>Aquadest</i> , kontrol (+) Abate (<i>Themepos</i>)	Pengenceran	Labu ukur, batang pengaduk	Persen (2%, 4%, 6%, 8%, 10%) Kontrol (-) <i>aquadest</i> 100% Kontrol (+) abate 1%	Rasio
	b. Variabel bebas : waktu kontak bahan aktif ekstrak kulit buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L)dengan larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	Waktu kontak antara bahan aktif ekstrak kulit buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L) dengan larva <i>Aedes aegypti</i> sehingga menimbulkan kematian dengan rentang waktu pengamatan 1-12 jam	Observasi	Visual dan stopwatch	Jam 1 2 3 4 5 6 7 8 9 12 11 12	Rasio
2	Variabel terikat : jumlah kematian larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	Jumlah larva yang mati atau tidak bergerak lagi dan mengapung ke permukaan air bila disentuh dengan menggunakan spatula (Kurniati, 2017)	Observasi	Visual	Jumlah (ekor)	Nominal

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Prosedur penelitian

- a. Pembuatan surat izin penelitian dari Potekkes Kemenkes Tanjung Karang. Pembuatan surat izin pemesanan telur di Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Baturaja, Sumatera Selatan dari Poltekkes Kemenkes Tanjung Karang.
- b. Pembuatan simplisia dengan menyiapkan kulit buah Kakao (*Theobroma cacao* L) yang sudah matang, kemudian kulit buah kakao dicuci lalu dijemur dibawah sinar matahari secara tidak langsung atau di tutup dan di angin-anginkan hingga kering. Hasil pengeringan ini disebut simplisia.
- c. Pembuatan ekstrak etanol kulit buah Kakao dan determinasi dilakukan di Laboratorium Fakultas MIPA Jurusan Biologi Universitas Lampung dengan proses ekstraksi simplisia kulit buah Kakao dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol.
- d. Pembuatan Konsentrasi uji ekstrak etanol kulit buah Kakao pada konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, 10% dengan menggunakan rumus pengenceran $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$.
- e. Penyediaan sampel larva adalah dengan melakukan penetasan telur nyamuk *Aedes aegypti* menjadi larva kemudian ditunggu hingga berkembang menjadi larva instar III dengan ciri-ciri memiliki ukuran 5mm, duri-duri (*spinae*) pada dada mulai jelas, corong pernafasan berwarna coklat kehitaman, memiliki sifon yang gemuk, gigi sisir pada segmen kedelapan dan mengalami pergantian kulit.
- f. Pengujian toksisitas ekstrak etanol kulit buah Kakao dengan cara memasukkan larva ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi. Data yang dikumpulkan adalah dengan menghitung jumlah larva nyamuk yang mati di setiap wadahnya. Perhitungan larva yang mati dilakukan setiap 1 jam sekali selama 12 jam pada masing-masing konsentrasi. Kontrol negatif adalah *aquadest* 100 ml dan Kontrol positif berupa abate 1% (Chusniasih, 2021).

2. Cara kerja

a. Persiapan alat dan bahan

- 1) Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu ukur, *beaker glass*, kertas saring, *objek glass*, toples kaca, *evaporator*, mikroskop, gelas plastik, gelas ukur, sendok plastik, blender, pipet volume, *stopwatch*, nampan plastik, batang pengaduk, corong, timbangan analitik, botol gelap, dan kertas label.
- 2) Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol, bubuk abate, kulit buah Kakao, dan larva instar III nyamuk *Aedes aegypti*.

b. Pembuatan simplisia

Simplisia yang digunakan adalah kulit bagian luar yang masih segar dan sudah matang, kulit buah Kakao yang sudah diambil kemudian dicuci sampai bersih pada air mengalir lalu dilakukan perajangan. Kulit buah Kakao dipotong kecil-kecil setelah itu dikeringkan dengan cara di jemur dan diangin-anginkan, kulit buah yang sudah kering lalu dihaluskan sampai menjadi serbuk dengan menggunakan mesin penggiling atau blender sehingga didapatkan simplisia kering sebanyak 5kg. Setelah itu kulit buah Kakao disimpan pada wadah yang kering dan siap di ekstrak (Chusniasih, 2021).

c. Pembuatan Ekstrak ethanol kulit buah Kakao

Ekstrak kulit buah Kakao ini dibuat dengan menggunakan pendekatan metode yang telah dilakukan oleh (Chusniasih, 2021)

- 1) Simplisia kulit buah Kakao (*Theobroma cacao l*) ditimbang sebanyak 1000 gram lalu dimasukkan kedalam Beaker glass.
- 2) Kemudian direndam dengan pelarut etanol sebanyak 5 L sampai serbuk terendam sempurna.
- 3) Simplisia direndam selama 3x24 jam dan sesekali di aduk.
- 4) Setelah 3 hari marerasi, kemudian disaring hingga didapatkan maserat atau ekstrak.
- 5) Ekstrak yang sudah didapatkan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan kecepatan 60 rpm, dan suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.

- 6) Ekstrak kemudian disimpan pada wadah berbahan gelas yang steril, bersih, dan kering lalu diletakkan didalam kulkas dengan suhu 2-8°C.
- d. Pembuatan konsentrasi uji
- 1) Ekstrak kulit buah Kakao yang sudah dikentalkan dengan *evaporator* lalu akan di encerkan dengan konsentrasi yang sudah di tetapkan.
 - 2) Pipet ekstrak sebanyak 2ml, 4ml, 6ml, 8ml, dan 10ml lalu di masukkan kedalam labu ukur 100ml.
 - 3) Setelah itu diencerkan dengan cara di tambahkan *aquadest* sampai dengan batas garis atas atau sampai volume 100ml.
 - 4) Lalu ekstrak dengan yang sudah di encerkan di masukkan kedalam masing-masing gelas berbeda sesuai dengan konsentrasi yang akan di buat (Fitriya, 2018).

Ekstrak diencerkan dengan varian konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, 10%. Menggunakan *aquadest* steril dengan rumus pengenceran : (Nurhaifah, 2015)

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

Keterangan :

V1 = Volume larutan yang akan dipipet

M1 = Konsentrasi larutan uji

V2 = Volume larutan uji yang akan dibuat dengan *aquadest* steril

M2 = Konsentrasi yang akan dibuat

Perhitungan pengenceran konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, 10% ekstrak etanol kulit buah kakao dapat dilihat pada lampiran 3.

- e. Pengadaan larva *Aedes aegypti*

Telur nyamuk *Aedes aegypti* yang diperoleh dari Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Baturaja Sumatera Selatan. Lalu telur dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang telah berisi air keran. Bagian luar *beaker glass* ditutup kertas sampul agar terhindar dari sinar matahari lalu didiamkan. Telur akan menetas menjadi larva instar I

setelah 24 jam dan diberikan makanan ekstrak hati Ayam. Larva instar I menjadi larva instar II setelah 2 hari dan Larva II akan menjadi larva instar III terlihat dari ciri khas duri pada *thorax* yang sudah menjadi hitam.

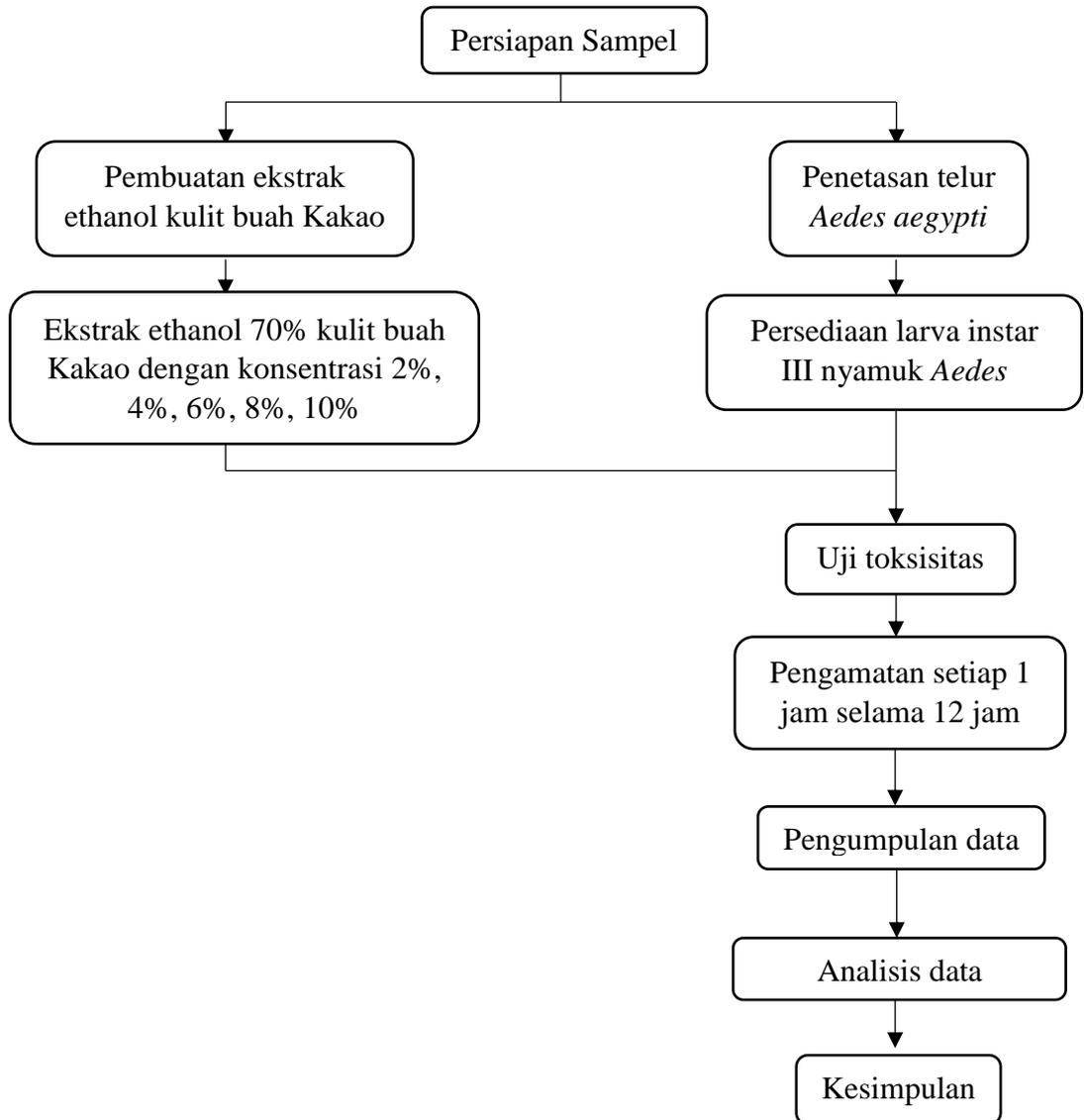
Setelah digunakan diperiksa kembali secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop :

- 1) Larva diletakkan di *objek glass* lalu ditutup *deck glass* dan diperiksa dibawah mikroskop perbesaran 4 x 100.
- 2) Ciri-ciri larva instar III nyamuk *Aedes aegypti* : duri *thorax* yang mulai terlihat jelas dengan duri-duri dada mulai jelas dan corong pernapasan berwarna coklat kehitaman. Pada instar III ini memiliki sifon yang gemuk dan larva instar III juga adalah larva yang paling aktif bergerak, setelah itu larva ini siap digunakan.

f. Uji toksisitas konsentrasi dan uji waktu optimum

- 1) Siapkan 7 gelas plastik yang masing-masing telah diisi 100 ml ekstrak etanol kulit buah Kakao dengan konsentrasi yang sudah ditetapkan.
- 2) Membuat kontrol negatif dengan mengisi satu gelas plastik menggunakan 100 ml aquadest.
- 3) Membuat kontrol positif dengan mengisi satu gelas plastik menggunakan 1 gram bubuk abate dalam 100 ml *aquadest*.
- 4) Masukkan larva nyamuk *Aedes aegypti* sebanyak 25 ekor menggunakan spatula kayu/sendok plastik ke dalam masing-masing gelas plastik yang sudah berisi ekstrak kulit buah Kakao yang sudah diencerkan.
- 5) Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali pada setiap perlakuan dengan waktu pengamatan setiap 1 jam selama 12 jam (Chusniasih, 2021).

3. Alur Penelitian



F. Pengolahan data dan Analisis Data

Data kematian larva nyamuk yang diperoleh kemudian dihitung untuk mencari rerata persentase kematian larva nyamuk pada masing-masing perlakuan konsentrasi dan pada waktu kontak dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kematian \%} = \frac{X}{N} \times 100\% \text{ (Yuniarty, 2016)}$$

kemudian data di analisis dengan *Analysis of Variances* (ANOVA) untuk mencari perbedaan jumlah kematian larva yang bermakna dan juga uji regresi untuk melihat ada atau tidaknya pengaruh antara konsentrasi dan waktu kontak terhadap kematian larva nyamuk *Aedes aegypti*, apabila pada uji *One Way Anova* terdapat perbedaan yang bermakna selanjutnya dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc LSD*.

G. Ethical Clearance

Penelitian yang dilakukan atas izin komite etik, penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dari proses penelitian ini dikumpulkan dan dimasukkan dalam penanganan limbah. Limbah larutan konsentrasi ekstrak etanol kulit buah Kakao dari aqua gelas langsung dibuang ke saluran pembuangan karena tidak membahayakan lingkungan. Sedangkan limbah aqua gelas bekas dikumpulkan dan langsung dibuang kedalam limbah sampah bahan anorganik. Sementara, untuk sisa telur dan larva dari nyamuk *Aedes aegypti* langsung dikuburkan ke dalam tanah.