

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

Populasi pada penelitian ini merupakan umbi tanaman rumput teki (*Cyperus rotundus* Linn) yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi dari tumbuhan rumput teki (*Cyperus rotundus* Linn) yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Januari yang mempunyai kondisi fisik yang masih segar normal dan tidak terkena penyakit (bebas dari serangan hama) dan tidak cacat.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama adalah umbi rumput teki (*Cyperus rotundus* Linn) didestilasi uap air supaya mendapatkan minyak atsiri. Variabel utama kedua adalah aktivitas larvasida nyamuk *Anopheles aconitus*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sengaja diubah-ubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini yang dimaksud adalah minyak atsiri dari tumbuhan umbi rumput teki dalam berbagai konsentrasi.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung selain variabel bebas. Variabel terkontrol dalam penelitian ini yang dimaksud adalah batas waktu pengamatan yang dilakukan selama 24 jam, larva nyamuk *Anopheles aconitus*.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini yang dimaksud adalah jumlah kematian larva nyamuk *Anopheles aconitus* yang dinyatakan dengan nilai LC_{50} dan LC_{90} .

3. Definisi operasional variabel utama

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode ekperimental kualitatif di laboratorium.

Pertama, umbi rumput teki adalah umbi yang berasal dari rumput teki yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Januari 2019.

Kedua, simplisia yang digunakan adalah umbi rumput teki yang masih segar, tidak rusak dan tidak terserang hama.

Ketiga, minyak atsiri umbi rumput teki adalah hasil minyak dari umbi rumput teki dengan menggunakan metode destilasi uap air dan pelarut aquedestila.

Keempat, Identifikasi dilakukan dengan kromatografi dan pendekatan struktur dilakukan dengan metode spektrometri. Spektrometri yang digunakan merupakan gabungan dari kromatografi gas dan spectrometer massa (GC-MS).

Kelima, Larva yang digunakan untuk pengujian berasal dari larva nyamuk *Anopheles aconitus*.

Keenam. Larvasida merupakan insektisida yang membunuh serangga yang belum dewasa atau sebagai pembunuh larva.

Ketujuh, uji aktivitas larvasida adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui efektifitas dari larutan uji untuk membunuh larva nyamuk *Anopheles aconitus*.

Kedelapan, LC_{50} adalah konsentrasi dari minyak atsiri umbi rumput teki yang dapat memberikan efek kematian 50% dari jumlah larva nyamuk *Anopheles aconitus*. LC_{90} adalah konsentrasi dari minyak atsiri umbi rumput teki yang dapat memberikan efek kematian 90% dari jumlah larva nyamuk *Anopheles aconitus*.

Kesembilan, tingkat kematian larva nyamuk adalah banyaknya larva nyamuk *Anopheles aconitus* yang mati dari 25 larva nyamuk dalam minyak atsiri.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain neraca analitik, pipet tetes, tabung reaksi, beaker glass, gelas ukur, corong pisah, kertas label, kertas saring, pisau, corong kaca, batang pengaduk, wadah plastik, *waterbath*, bejana, KLT, refraktometri, batang pengaduk, spatula, plat KLT GF₂₅₄, spektrofotometer GC-MS (SHIMADZU QP-5000), *handscoon*, tisu, thermometer, pH stick, pipet larva.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi rumput teki (yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah). Bahan kimia yang digunakan adalah minyak atsiri, aquadestilata, etil asetat, toluene, asam sulfat pekat, Na₂SO₄, 7H₂O, etanol. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva nyamuk *Anopheles aconitus* diperoleh dari Balai Besar Litbang Vector Dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) Salatiga.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi umbi rumput teki

Determinasi umbi rumput teki yang dilakukan ini bertujuan menetapkan kebenaran sampel dari umbi rumput teki yang akan di uji dengan mencocokkan ciri morfologi terhadap umbi rumput teki (*Cyperus rotundus* Linn) dibuktikan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengambilan bahan

Umbi rumput teki diambil dalam keadaan segar dan bebas hama dengan pengambilan dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Umbi rumput teki dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran dan debu yang menempel.

3. Isolasi minyak atsiri umbi rumput teki

Isolasi minyak atsiri umbi rumput teki dilakukan dengan menggunakan metode destilasi uap air. Umbi rumput teki yang masih segar dipotong kecil-kecil kemudian dimasukkan kedalam dandang alat destilasi yang sebelumnya sudah berisi air. Penyulingan dilakukan di atas api sampai air mendidih. Minyak atsiri akan terbawa oleh uap air pada pipa menuju kondensor dan mengalami kondensasi, bersama dengan uap air tersebut terbawa minyak atsiri. Proses destilasi dilakukan secara kontinyu selama 6 jam. Pemanasan dihentikan ketika sudah tidak ada lagi penambahan destilat.

Hasil dari destilasi uap air, minyak atsiri yang diperoleh terpisah dari air, namun minyak atsiri perlu dibebaskan lagi dari sisa-sisa air. Destilat yang diperoleh masih terdapat campuran antara minyak atsiri dengan air sehingga perlu ditambahkan Natrium Sulfat Anhidrat untuk pemisahan sempurna kemudian dipisahkan dengan corong pisah. Minyak atsiri yang dihasilkan disimpan dalam botol tertutup yang telah disterilisasi dan disimpan dalam keadaan sejuk (Depkes RI 2008).

4. Analisis minyak atsiri

4.1 Pengamatan organoleptik. Pengamatan organoleptik minyak atsiri dilakukan dengan mengamati warna, aroma, bentuk, dan rasa. Pada keadaan murni, minyak atsiri mudah menguap pada suhu kamar sehingga apabila ditetaskan pada selembar kertas maka akan segera menguap dan tidak meninggalkan noda pada kertas tersebut, pengamatan juga dilakukan dengan meneteskan pada permukaan air, pada keadaan murni minyak atsiri akan menyebar tanpa meninggalkan keruh pada permukaan air (Badan Standardisasi Nasional 2006).

4.2 Penetapan indeks bias minyak atsiri. Indeks bias minyak atsiri ditetapkan menggunakan refraktometer yang dilakukan sebanyak 3 kali. Badan prisma dibuka dan kemudian dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi alkohol. Refraktometer diatur sehingga garis dan skala tampak jelas, mencatat suhu ruangan tempat kerja kemudian meneteskan cairan yang diukur pada prisma dan kemudian ditutup kembali. Pemutar sebelah kanan diatur sehingga batas gelap

dan terang pada garis, kemudian catat skala indeks biasanya (Badan Standardisasi Nasional 2006).

4.3 Penetapan kelarutan dalam alkohol. Uji kelarutan minyak atsiri dapat dilakukan dengan cara memasukkan 1 ml minyak atsiri ke dalam gelas ukur 10 ml, kemudian ditambah alkohol 70% secara bertahap. Setiap penambahan alkohol dikocok dan diamati kejernihannya (Badan Standardisasi Nasional 2006).

5. Kromatografi lapis tipis (KLT)

Identifikasi secara kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui isi kandungan kimia dan menetapkan kebenaran yang terdapat pada minyak atsiri umbi rumput teki. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan ditotolkan pada pelat berpa bercak. Setelah pelat ditotolkan, ditaruh kedalam bejana kromatografi tertutup. Plat KLT yang mengandung silika gel GF₂₅₄ (pengikat dan indikator berflouresensi) sebagai fase diam dengan ukuran 3 X 7 cm disiapkan, kemudian sampel yang telah diencerkan dengan etanol (1 : 5) ditotolkan 0,5 cm dari ujung plat dengan menggunakan pipet kapiler. Plat KLT dibiarkan sesaat, kemudian dimasukkan ke dalam bejana KLT yang sudah jenuh dengan uap pelarut. Menggunakan pelarut sebagai fase gerak toluen : etil asetat (93: 7 v/v). Plat KLT kemudian disemprot dengan vanilin asam sulfat. Plat KLT selanjutnya diamati noda-noda yang timbul setelah dipanaskan dalam oven pada suhu 110 °C selama 3 menit. Harga R_f yang telah dihitung dan warna noda dibandingkan dengan data sekunder dari literatur (Wagner H 1984).

6. Uji GC-MS

Uji GC-MS dilakukan untuk mengisolasi komponen minyak atsiri sampel umbi teki dan mengidentifikasi komponen tersebut, uji dilakukan di laboratorium FMIPA UGM. Kondisi alat GC-MS sebagai berikut:

Jenis pengion	: EI (Elektron Impack)
Jenis kolom	: CP-Sil 5 CB
Panjang kolom	: 25 meter
Diameter kolom	: 0.25 milimeter
Suhu kolom	: 60 - 300 °C
Suhu injektor	: 300 °C

Suhu detector : 300 °C
 Kecepatan kenaikan suhu : 10 °C/menit
 Gas pembawa : He 14 Kpa

7. Pembuatan konsentrasi minyak atsiri umbi rumput teki

Pembuatan minyak atsiri diawali dengan umbi rumput teki yang didestilasi air mengalir kemudian minyak atsiri dipisahkan dari kandungan air dengan corong pisah dibantu dengan penambahan natrium sulfat anhidrat untuk membantu pemisahan minyak atsiri dengan air.

Konsentrasi awal minyak atsiri dianggap 100 %. Kemudian pembuatan variasi konsentrasi minyak atsiri yang diperlukan untuk pengujian larvasida yaitu konsentrasi (5; 10; 20; 40 dan 60 ppm) dari minyak atsiri.

8. Pengambilan sampel larva nyamuk

Sampel yang digunakan menggunakan larva nyamuk instar III merupakan tingkat larva tahap menengah dan mempunyai kekebalan yang tinggi, jumlah sampel yang dipakai sampel 25 larva dan pengulangan yang dilakukan sebanyak 3 kali (Kempraj dan K Bhat 2008). Kontrol positif menggunakan abate dan kontrol negatif dengan tween 80 ditambah aquadest sampai 100ml. Akhirnya didapatkan jumlah total sampel 525 larva dengan rincian pada tabel berikut.

Tabel 1. Pengambilan larva nyamuk *Anopheles aconitus*.

Perlakuan	Konsentrasi	Jumlah Larva X Jumlah Pengulangan	Total
Kontrol(+)Abate	100 ppm	25 larva x 3	75
Kontrol(-) tween 80	1000 ppm	25 larva x 3	75
Perlakuan I	5 ppm	25 larva x 3	75
Perlakuan II	10 ppm	25 larva x 3	75
Perlakuan III	20 ppm	25 larva x 3	75
Perlakuan IV	40 ppm	25 larva x 3	75
Perlakuan V	60 ppm	25 larva x 3	75
Jumlah total larva yang dipakai dalam penelitian			525 larva

9. Pengujian larvasida

Pengujian larvasida bertujuan untuk mencari dosis efektif minyak atsiri umbi rumput teki (*Cyperus rotundus* Linn) sebagai larvasida nyamuk *Anopheles aconitus* dilakukan dengan mencari daya kematian larva. Dengan konsentrasi (5; 10; 20; 40 dan 60 ppm) dari minyak atsiri. Kemudian minyak atsiri umbi rumput

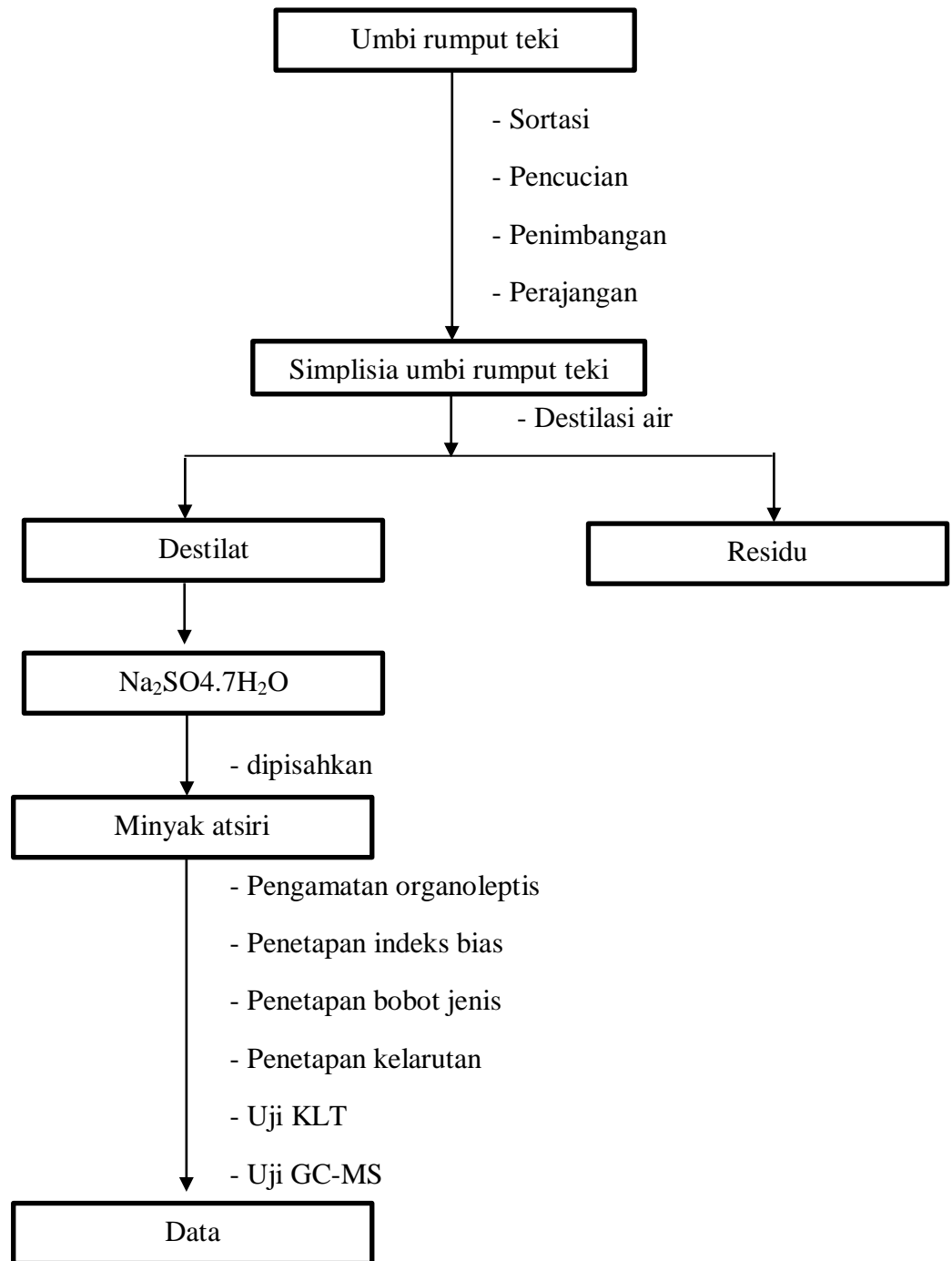
teki dengan berbagai konsentrasi tersebut diencerkan menggunakan aquadest dengan volume yang dihasilkan masing-masing 100 ml, digunakan juga tween 80 untuk membantu melarutkan minyak atsiri dengan aquadest. Abate (100 ppm) digunakan sebagai kontrol positif dan tween 80 digunakan sebagai kontrol negatif. Setiap perlakuan berisi 25 ekor larva nyamuk *Anopheles aconitus*. dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Pengamatan dilakukan 24 jam, posisi larva berada diatas menandakan masih hidup sedangkan berada di bawah menandakan larva mati, serta dilakukan pengukuran suhu media dengan termometer dan pH media menggunakan pH stick pada masing-masing gelas yang berisi larva nyamuk dengan berbagai konsentrasi minyak atsiri umbi rumput teki. Dihitung dan ditentukan persen mortalitas larva kemudian dicari nilai probit untuk menghitung nilai LC_{50} dan LC_{90} . Dengan rumus $\%kematian = \frac{A-B}{C} \times 100\%$. Keterangan A = Jumlah larva *Anopheles aconitus* yang mati pada larutan uji. B = Jumlah larva *Anopheles aconitus* yang mati pada larutan kontrol. C = Jumlah larva mula-mula. Kemudian dilakukan pembuatan kurva baku dicari garis regresi linearnya dengan menggunakan rumus: $Y = a + bX$, dimana nilai Y = nilai presentasi kematian sedangkan X = konsentrasi minyak atsiri. Apabila sudah ditemukan persamaan regresi liniernya dengan nilai r mendekati 1 maka tinggal memasukkan nilai 5 pada nilai Y maka didapatkan konsentrasi X (LC_{50}) sedangkan untuk mendapatkan konsentrasi X (LC_{90}) memasukan nilai 6,28 pada nilai Y. (Kempraj dan K Bhat 2008)

10. Teknik pengumpulan dan analisis data

Data yang diperoleh dari hasil pengujian larvasida uji dianalisis dengan metode analisis probit untuk mendapatkan jumlah kematian larva nyamuk. Data yang telah diperoleh dari hasil pengamatan diolah dengan menggunakan *software statistic* (SPSS 20 for windows). Data dari hasil penelitian akan dianalisis secara statistik dengan uji *Kolmogorov smirnov*. Jika memenuhi syarat uji parametrik (distribusi data normal, varians sama) dipilih uji *one way ANOVA*. Data yang didapatkan berupa data berdistribusi tidak normal, sehingga dilakukan dengan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*. Setelah dilakukan uji nonparametrik *Kruskal-*

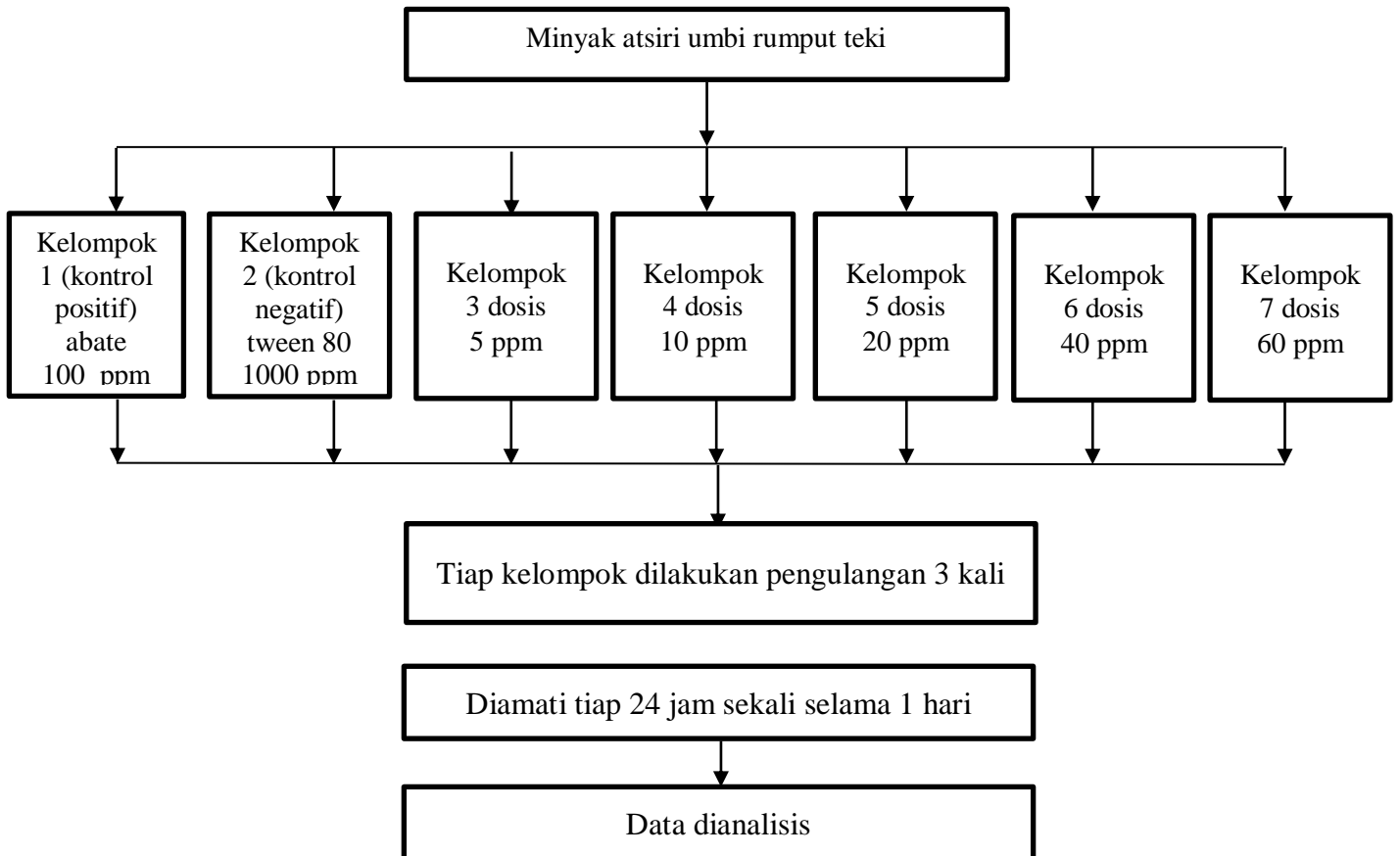
wallis didapatkan hasil berupa nilai $p < \alpha$ ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan analisis post hoc untuk mengetahui kebenarannya.

E. Skema Pembuatan Minyak Atsiri



Gambar 4. Skema alur pembuatan minyak atsiri

F. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur penelitian