

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan semua objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi dari tanaman rumput teki (*Cyperus rotundus* Linn) yang diperoleh pada bulan Januari 2019 dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah bagian dari populasi yang diteliti, yang ciri-ciri dan keberadaannya diharapkan mampu mewakili atau menggambarkan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi dari tanaman rumput teki yang mempunyai kondisi fisik yang tidak cacat atau berlubang, tidak terdapat penyakit (tidak terserang hama).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama adalah umbi rumput teki yang di isolasi dengan menggunakan destilasi uap dan air untuk memperoleh minyak atsiri. Variabel utama kedua adalah aktivitas ovisida 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 variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini yang dimaksud adalah berbagai konsentrasi minyak atsiri dengan tujuh taraf konsentrasi yaitu 5, 10, 50, 100, 150 pm, serta kontrol mati dan kontrol hidup.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung selain variabel bebas. Variabel terkontrol dalam penelitian ini yang dimaksud adalah banyaknya telur nyamuk

Anopheles aconitus yang tidak menetas dengan pengamatan yang dilakukan selama 48 jam.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah titik pusat permasalahan yang merupakan kriteria dalam penelitian ini dan memberikan respon jika dihubungkan dengan variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini yang dimaksud adalah jumlah kematian telur nyamuk *Anopheles aconitus* yang dinyatakan dengan nilai LC_{50} dan LC_{90} .

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode eksperimental kualitatif di laboratorium.

Pertama, umbi rumput teki adalah umbi dari tanaman rumput teki yang segar, tidak cacat, tidak rusak dan tidak terserang hama yang diperoleh Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Januari.

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

Ketiga, minyak atsiri yang digunakan dalam penelitian ini adalah cairan hasil dari penarikan minyak atsiri umbi rumput teki dengan menggunakan metode destilasi uap dan air dengan pelarut aqudestila.

Keempat, identifikasi minyak atisiri umbi rumput teki dilakukan dengan kromatografi dan pendekatan struktur dilakukan dengan metode spektrometri. Spektrometer yang digunakan merupakan gabungan dari kromatografi gas dan spektrometer massa (GC-MS) serta digunakan juga kromatografi lapis tipis (KLT).

Kelima, telur nyamuk adalah berasal dari telur dari nyamuk *Anopheles aconitus*.

Keenam, ovisida adalah suatu pestisida dari golongan insektisida yang digunakan untuk membunuh serangga pada stadium telur.

Ketujuh, uji aktivitas ovisida adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui aktivitas dari larutan uji untuk membunuh serangga pada tingkat telur.

Kedelapan, LC_{50} (*Lethal Concentration*) adalah nilai konsentrasi dari minyak atsiri umbi rumput teki yang dapat memberikan efek kematian sebanyak 50% dari jumlah telur nyamuk *Anopheles aconitus*.

Kesembilan, LC_{90} (*Lethal Concentration*) adalah nilai konsentrasi dari minyak atsiri umbi rumput teki yang dapat memberikan efek kematian sebanyak 90% dari jumlah telur nyamuk *Anopheles aconitus*.

Kesepuluh, tingkat kematian telur nyamuk adalah banyaknya jumlah telur nyamuk *Anopheles aconitus* yang mati dari total 25 telur nyamuk dalam konsentrasi minyak atsiri.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain neraca analitik, pipet tetes, penggilingan, tabung reaksi, beaker glass, gelas ukur, corong pisah, kertas label, kertas saring, pisau, corong kaca, batang pengaduk, wadah lastik, cawan porselin, waterbath, bejana, KLT, Alat sterling bidwell, cawan penguap, batang pengaduk, spatula, plat KLT GF254, spektrofotometer GC-MS (SHIMADZU QP-5000), *handscoon*, tissu, thermometer, dan kertas pH.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi rumput teki yang didapatkan dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Januari. Bahan kimia yang digunakan adalah tween 80, eugenol, aquades, etil asetat, toluene, natrium asam sulfat anhidrat ($Na_2SO_4 \cdot 7H_2O$), vanilin asam sulfat, etanol 96%. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah telur nyamuk *Anopheles aconitus* diperoleh dari Balai Besar Litbang Vector Dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) Salatiga, Jawa Tengah.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Umbi Rumput Teki

Determinasi rumput teki yang dilakukan ini bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel dari umbi rumput teki yang akan diuji dengan mencocokkan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis, serta morfologi yang ada pada umbi rumput teki (*Cyperus rotundus* Linn) terhadap pustaka yang dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengambilan Bahan

Umbi rumput teki diambil dalam keadaan segar, tidak cacat dan bebas hama dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Umbi rumput teki kemudian dibersihkan dengan menggunakan 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 dan air. Umbi rumput teki yang masih segar dipotong kecil-kecil kemudian dimasukkan ke dalam labu alat destilasi yang sebelumnya sudah berisi air. Penyulingan dilakukan di atas api sampai air mendidih. Minyak atsiri akan terbawa oleh uap air menuju kondensor. Proses destilasi dilakukan secara kontinyu selama 6 jam. Pemanasan dihentikan ketika sudah tidak ada lagi penambahan destilat.

Hasil dari destilasi uap dan 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.

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 diteteskan 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.

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.

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 96% secara bertahap. Setiap penambahan alkohol dikocok dan diamati kejernihannya.

5. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi secara kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui isi kandungan kimia dan menetapkan kebenaran yang terdapat pada minyak esensial umbi rumput teki. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan ditotolkan pada pelat bercak. Setelah pelat ditotolkan, dimasukkan ke dalam bejana kromatografi tertutup. Plat KLT yang mengandung silika gel GF254 dengan ukuran 3 X 8 cm disiapkan, kemudian sampel ditotolkan 1 cm dari ujung plat dengan menggunakan pipet kapiler. Plat KLT dibiarkan sesaat, kemudian dimasukkan ke dalam bejana KLT yang sudah jenuh dengan uap pelarut. Pelarut yang digunakan adalah 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 (Wagner H 1984)

6. Pengujian GC-MS

Uji GC-MS dilakukan untuk mengisolasi komponen minyak atsiri sampel umbi teki dan mengidentifikasi komponen tersebut. 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
Laju alir kolom	: 0,7 mL/menit
Laju alir gas Helium	: 40 mL/menit
Laju alir nitrogen	: 50 mL/menit
Laju udara pengoksidasi	: 450 mL/menit
Gas pembawa	: He 14 Kpa

7. Pengambilan Sampel Telur Nyamuk

Sampel yang digunakan berdasarkan acuan WHO (2005), yaitu untuk setiap perlakuan dipakai jumlah sampel 25 telur dan pengulangan yang dilakukan sebanyak 4 kali. Akhirnya, didapatkan jumlah total sampel 600 telur dengan rincian pada tabel berikut.

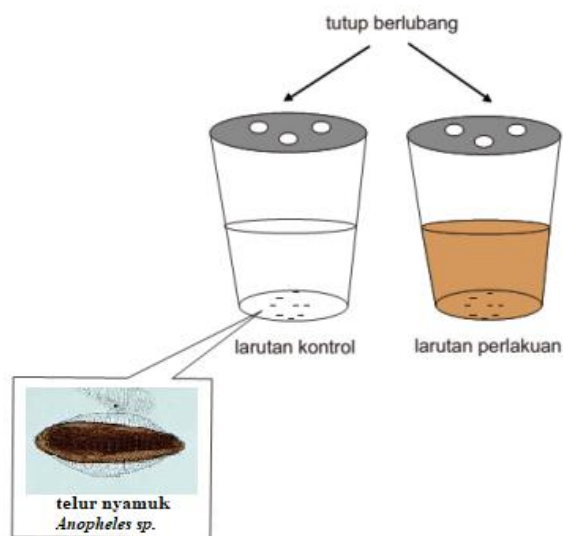
Tabel 1. Pengambilan telur nyamuk *Anopheles aconitus*

Kelompok Perlakuan	Konsentrasi (ppm)	Jumlah Telur X Jumlah Pengulangan	Total
I	5	25 telur x 4	100
II	10	25 telur x 4	100
III	50	25 telur x 4	100
IV	100	25 telur x 4	100
V	150	25 telur x 4	100
Kontrol (-)	100	25 telur x 4	100
Kontrol (+)	-	25 telur x 4	100
Jumlah total telur yang dipakai dalam penelitian			700 telur

Keterangan : kontrol (+) abate
: kontrol (-) aquadestila + tween 80

8. Pengujian Ovisida

Aktivitas minyak atsiri umbi rumput teki sebagai ovisida telur *Anopheles aconitus* dilakukan dengan menilai daya tetas telur dengan menggunakan variasi konsentrasi yaitu 5, 10, 50, 100, dan 150 ppm dari minyak atsiri yang dilarutkan dalam aquades, digunakan juga tween 80 untuk membantu melarutkan minyak atsiri dengan aquades. Aquadestila ditambah dengan tween 80 digunakan sebagai kontrol negatif (hidup) sedangkan untuk kontrol positif digunakan *abate* yang mengandung themephos 0,1% dengan konsentrasi 100 ppm. Telur nyamuk *Anopheles aconitus* dimasukkan dalam gelas yang telah berisi 25 ml larutan uji pada masing-masing konsentrasi. Setiap perlakuan berisi 25 butir telur nyamuk *Anopheles aconitus* dengan pengulangan sebanyak 4 kali. Pengujian dilakukan selama 2 hari dengan pengamatan setiap 24 jam menggunakan mikroskop (lensa objektif 30-40x dan lensa okuler 5-10x) serta dilakuan pengukuran suhu media $\pm 30^{\circ}\text{C}$ dengan termometer dan pH media dengan menggunakan kertas pH 7-7,9 yang merupakan kondisi ideal nyamuk untuk berkembang biak pada masing-masing gelas yang berisi telur nyamuk dengan berbagai konsentrasi minyak atsiri umbi rumput teki. Viabilitas telur ditentukan dengan menentukan rasio jumlah larva yang muncul dari telur setelah 48 jam pengamatan dalam larutan uji dengan jumlah telur yang dikenakan perlakuan. Pada akhir pengujian setelah 1 hari dalam larutan uji, telur yang tidak menetas dibuka secara manual menggunakan jarum dan diamati dibawah mikroskop (lensa objektif 30-40x dan lensa okuler 5-10x) untuk memverifikasi status individu didalamnya (Vivek Kempraj dan Sumangala 2008).



Gambar 7. Pengujian Ovisida

9. Penetapan LC_{50} dan LC_{90}

LC_{50} (*Lethal Concentration 50*) merupakan konsentrasi suatu senyawa atau zat yang dapat menyebabkan kematian sebanyak 50% dari hewan uji yang dapat diestimasi dengan perhitungan nilai probit dalam waktu tertentu. LC_{90} (*Lethal Concentration 90*) merupakan konsentrasi suatu senyawa atau zat yang dapat menyebabkan kematian sebanyak 90% dari hewan uji yang dapat diestimasi dengan grafik dan perhitungan nilai probit. Hewan uji dimasukkan dalam gelas masing-masing yang berisi variasi konsentrasi minyak atsiri. LC_{50} dan LC_{90} masing-masing konsentrasi ditetapkan dengan menggunakan metode analisa probit. Jumlah telur yang mati setelah perlakuan uji ditentukan persen kematiannya menggunakan rumus abbot :

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah telur yang mati/rusak}}{\text{jumlah total populasi telur uji}} \times 100\%$$

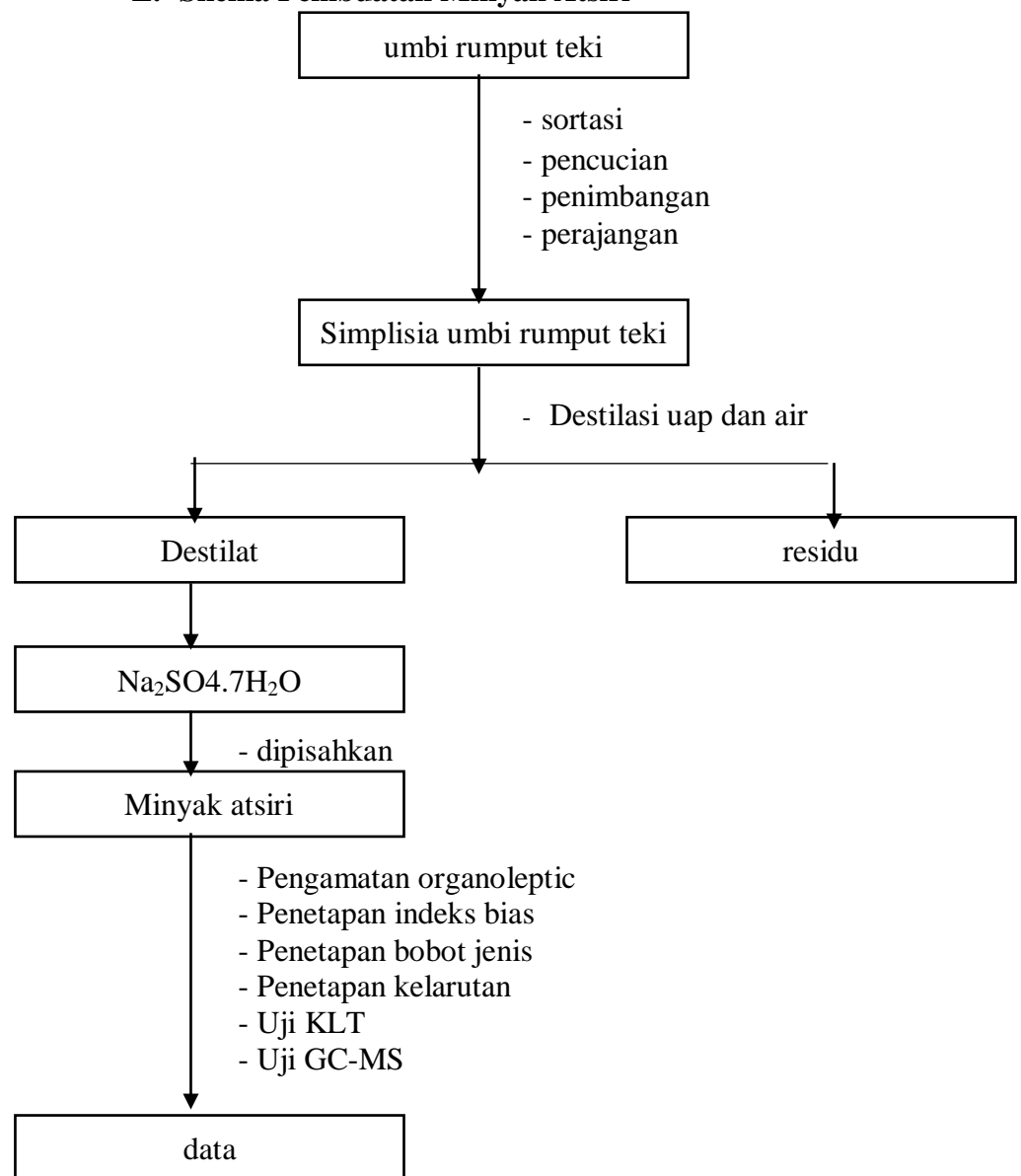
Persen kematian telur tersebut kemudian dicari nilai probitnya menggunakan tabel konversi, setelah diketahui nilai probitnya menggunakan tabel konversi untuk tiap konsentrasi, kemudian dibuat kurva hubungan antara log konsentrasi (x) dan nilai probitnya (y) yang merupakan hubungan linier dengan persamaan garis lurus $y = a+bx$ dengan memasukkan nilai probitnya 5 dari 50% kematian hewan uji sebagai y, maka akan didapatkan antilog x sebagai nilai LC_{50} .

Sedangkan nilai probitnya 6,28 dari 90% kematian hewan uji sebagai y , maka akan mendapatkan antilog x sebagai nilai LC_{90} .

10. Teknik Pengumpulan dan Analisis Data

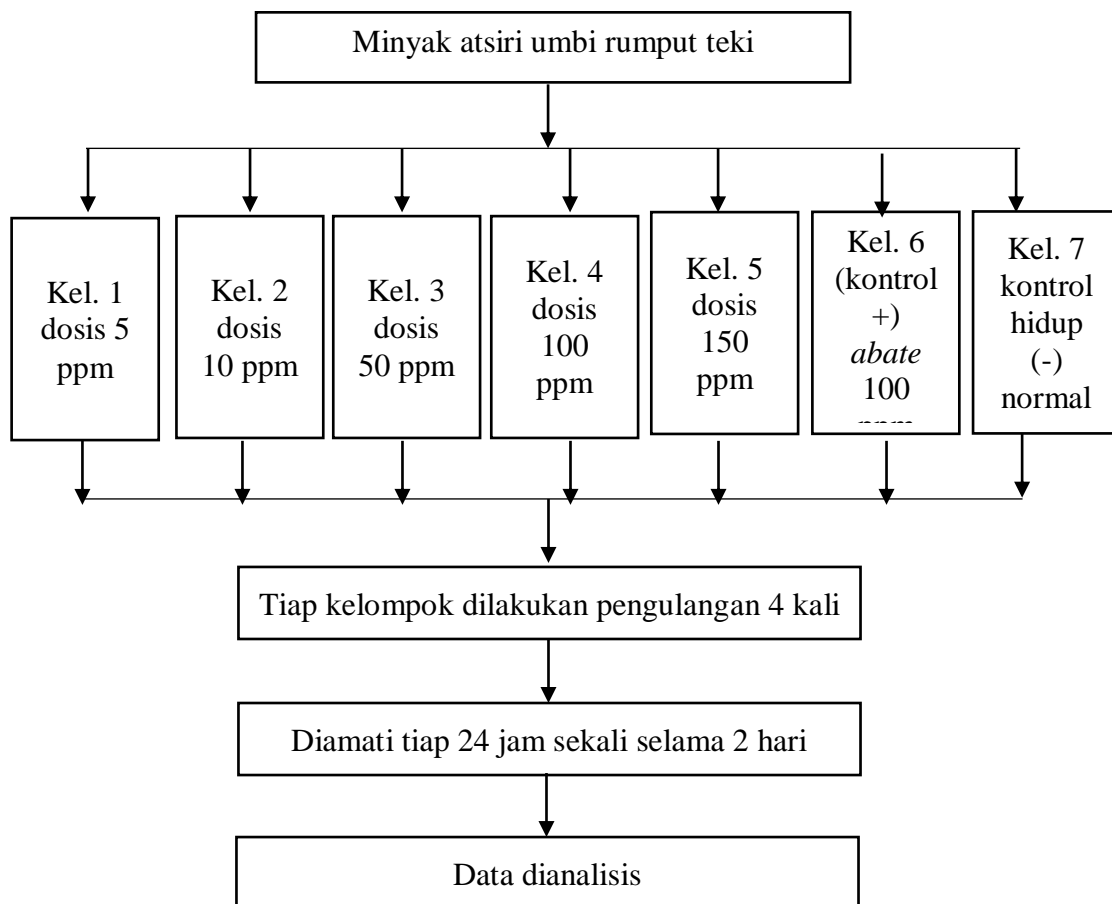
Data yang diperoleh dari hasil pengujian ovisida uji dianalisis dengan metode analisa probit untuk mendapatkan nilai LC_{50} . Data yang telah diperoleh dari hasil pengamatan diolah dengan menggunakan *software* statistic (SPSS 20 for windows). Data dari hasil penelitian akan dianalisis secara statistik dengan uji *Shapiro-Wilk* 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 (*Man Whitney*) untuk mengetahui kebermaknaanya.

E. Skema Pembuatan Minyak Atsiri



Gambar 8. Skema alur pembuatan minyak atsiri

F. Skema Penelitian



Gambar 9. Skema penelitian