

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental murni (*True Experimental*). Desain ini digunakan untuk membandingkan hasil perlakuan (ekstrak kulit pisang raja) terhadap kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol setelah perlakuan diberikan (Sugiyono, 2016). Dalam penelitian ini, peneliti akan mengamati tingkat mortalitas dan perubahan morfologi larva nyamuk *Aedes aegypti*.

3.2 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di dua lokasi berbeda sesuai dengan tahapan kegiatan yang dilakukan. Proses preparasi sampel yang meliputi tahap maserasi dan evaporasi dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Warmadewa. Sementara itu, tahap intervensi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi STIKES Wira Medika Bali. Seluruh rangkaian penelitian ini dijadwalkan berlangsung selama tiga bulan, terhitung mulai 10 Februari hingga 01 April 2026.

3.3 Populasi Dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi adalah suatu wilayah generalisasi yang terdiri dari objek atau subjek yang mempunyai kuantitas dan karakteristik tertentu yang ditentukan oleh

peneliti untuk dipelajari dan kemudian diambil kesimpulannya (Sugiyono, 2019). Populasi pada penelitian ini adalah larva steril nyamuk *aedes aegypti* instar III dan IV.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel merupakan fraksi atau subset dari populasi tersebut yang diambil untuk digunakan sebagai representasi karakteristik total populasi. Sampel dalam penelitian ini adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III, dan IV yang berada dalam kondisi sehat, aktif bergerak, dan tidak mengalami cacat fisik. Pemilihan kedua instar larva ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan tingkat sensitivitas antar stadium terhadap paparan ekstrak kulit pisang raja (*Musa Paradisiaca* var. *Raja*). Setiap instar memiliki karakteristik fisiologis dan morfologis yang berbeda, seperti ukuran tubuh, serta tingkat aktivitas metabolik yang dapat memengaruhi respon terhadap bahan toksik. Dengan demikian, penggunaan dua instar larva diharapkan dapat memberikan gambaran menyeluruh mengenai efektivitas ekstrak terhadap perkembangan larva *Aedes aegypti* dari fase awal hingga menjelang pupa (Sugiono 2013).

Dalam penelitian ini, setiap instar larva dibagi ke dalam 7 kelompok perlakuan, yaitu kontrol negatif (tanpa ekstrak), kontrol positif (larvasida standar/abate), serta kelompok perlakuan dengan konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%, di mana masing-masing kelompok berisi 25 ekor larva. Penelitian menggunakan dua instar larva, yaitu instar III dan IV dengan perlakuan 2 kali pengulangan larva sehingga total keseluruhan sampel yang digunakan adalah 350 larva instar III dan 350 larva instar IV. Jumlah 25 larva per kelompok telah sesuai

dengan pedoman Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) untuk uji bioassay larvasida yang merekomendasikan 20–25 larva per wadah. Selain itu, setiap perlakuan dan kontrol dilakukan pengulangan sebanyak dua kali sesuai pedoman WHO dan rumus Federer untuk menjamin validitas dan keandalan data. Jumlah tersebut dinilai memadai untuk menggambarkan efektivitas perlakuan serta memungkinkan dilakukan replikasi dan analisis perbandingan antarstadium larva. (WHO, 1997)

3.4 Variabel Dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel independen adalah variabel yang tidak bergantung pada variabel lain baik keberadaan maupun signifikansinya Sugiyono (2011). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit pisang raja (*Musa Paradisiaca* var. *Raja*) dengan konsentrasi 1%, 2 %, 3%, 4%, dan 5%.

3.4.2 Variabel Terikat (*Dependent*)

Salah satu definisi variabel terikat atau dependen adalah variabel yang dipengaruhi oleh, atau akibat dari, kehadiran variabel lain Sugiyono (2011). Variabel terikat dalam penelitian yaitu larva *Aedes aegypti* vektor Demam Berdarah Dengue.

3.4.3 Definisi Operasional

Tabel 3.1 *Definisi Operasional*

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
1.	Ekstrak kulit pisang raja (<i>Musa Paradisiaca</i> var. <i>Raja</i>)	Kulit pisang raja yang sudah melakukan proses ekstraksi dan dilarutkan dengan pelarut etanol 96% dengan perlakuan konsentrasi 1%, 2%,3%,4%, dan 5% untuk membunuh larva nyamuk	Timbangan analitik, gelas ukur, pipet, pelarut etanol. air	Nominal	Konsentrasi ekstrak 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%
2.	Mortalitas larva <i>Aedes aegypti</i>	Jumlah larva yang mati setelah 24 dan 48 jam paparan terhadap ekstrak kulit pisang raja dengan 2X pengulangan. dengan ciri-ciri : 1. Tidak bergerak 2. Larva mengapung ke permukaan air.	Pengamatan langsung	Rasio	Jumlah larva yang mati 0 - 25
3.	Perubahan morfologi larva <i>Aedes aegypti</i>	Penyusutan tubuh, atau kerusakan kepala, toraks, abdomen dan siphon akibat paparan ekstrak kulit pisang raja (<i>Musa Paradisiaca</i> var. <i>Raja</i>)	Pengamatan mikroskopis dengan dokumentasi foto	Nominal	Ada atau tidaknya perubahan morfologi (kerusakan kepala, penyusutan toraks, kerusakan Abdomen, dan kerusakan Siphon.

3.5 Jenis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini terdiri dari data primer dan data sekunder. Data primer diperoleh langsung melalui hasil pengamatan dan percobaan di laboratorium terhadap larva *Aedes aegypti* setelah diberi perlakuan menggunakan ekstrak kulit pisang raja (*Musa Paradisiaca* var. *Raja*) dengan berbagai konsentrasi. Data utama yang diamati meliputi jumlah larva yang mati pada setiap perlakuan serta perubahan morfologi yang terjadi pada tubuh larva selama waktu pengamatan.

Data sekunder adalah data yang sudah ada dan dikumpulkan oleh pihak lain sebelumnya. Data ini dapat diperoleh dari laporan penelitian terdahulu, data statistik, arsip, buku, atau publikasi resmi dari lembaga pemerintah dan non-pemerintah. Keuntungan menggunakan data sekunder adalah efisiensi waktu dan biaya, meskipun validitas dan relevansi data harus dipertimbangkan.

Pengumpulan data pada penelitian ini dilakukan melalui serangkaian tahapan yang disusun secara sistematis, meliputi persiapan larva, proses pembuatan ekstrak, serta pemberian perlakuan. Larva *Aedes aegypti* yang digunakan diperoleh dari hasil pemijahan dan pemeliharaan bagian Entomologi Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur. Larva yang aktif dan tidak cacat dipilih untuk dijadikan sampel penelitian. Ekstrak kulit pisang raja (*Musa Paradisiaca* var. *Raja*) dibuat melalui proses maserasi menggunakan etanol 96%, kemudian diuapkan hingga menjadi ekstrak kental. Larva dibagi menjadi kelompok kontrol dan perlakuan dengan konsentrasi 1%, 2 %, 3%, 4%, dan 5%, masing-masing berisi 25 ekor dalam 100 mL larutan uji.

Data dikumpulkan melalui pengamatan terhadap jumlah larva *Aedes aegypti* yang mengalami mortalitas setelah 24 dan 48 jam paparan ekstrak kulit pisang raja. Hasil pengamatan tersebut dicatat dan didokumentasikan secara fotografis sebagai data pendukung. Berdasarkan data yang diperoleh, dilakukan perhitungan tingkat mortalitas larva untuk memberikan efektivitas ekstrak kulit pisang raja pada masing-masing konsentrasi. Selanjutnya, dilakukan pengamatan terhadap perubahan morfologi larva pada konsentrasi tersebut untuk menggambarkan adanya efek toksik ekstrak terhadap struktur tubuh larva, yang meliputi perubahan pada kepala, toraks, abdomen, dan siphon.

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi toples steril sebagai wadah penyimpanan dan perlakuan sampel, oven untuk proses pengeringan kulit pisang raja, blender untuk menghaluskan bahan, kertas saring atau kain flanel untuk proses penyaringan ekstrak, serta alat evaporasi untuk menguapkan pelarut. Selain itu, digunakan labu ukur untuk pengukuran volume larutan, wadah uji untuk menempatkan larva pada setiap perlakuan, mikroskop untuk pengamatan perubahan morfologi larva, timbangan analitik untuk menimbang bahan dengan ketelitian tinggi, serta batang pengaduk untuk mencampur larutan.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kulit pisang raja sebagai bahan utama ekstraksi, etanol 96% sebagai pelarut, aquadest sebagai pelarut tambahan, larva *Aedes aegypti* instar III sebanyak 500 ekor dan instar IV sebanyak

500 ekor sebagai objek uji, serta larvasida abate yang digunakan sebagai kontrol pembanding.

3.6.2 Pra Analitik

1. Proses Ekstraksi

1. Kulit pisang raja (*Musa Paradisiaca* var. *Raja*) dikumpulkan sebanyak 5kg dan dibersihkan dicuci dengan air
2. Kulit pisang di keringkan dengan cara dijemur selama 3 hari kemudian di oven pada suhu 50°C selama ± 1 jam
3. Setelah kering, kemudian diblender halus sehingga membentuk partikel yang lebih kecil (serbuk simplisia)
4. Selanjutnya, serbuk simplisia sebanyak 500 gram ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam toples yang telah disterilkan, lalu serbuk tersebut direndam dalam 5 liter etanol 96% dengan rasio 1:10 (berat : volume). Larutan ini dimaserasi (dibiarkan merendam) selama 2 x 24 jam dalam kondisi toples ditutup dan sambil sesekali diaduk.
5. Setelah maserasi, larutan dipisahkan antara filtrat (cairan ekstrak) dan ampasnya menggunakan kertas saring atau kain flanel. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan.
6. Filtrat dikumpulkan dan dilakukan proses evaporasi. Proses dilakukan semua pelarut menguap dan diperoleh ekstrak setengah padat (kental)

2. Pembuatan Stok Induk Larutan 100%

1. Stok ekstrak kulit pisang raja yang dibuat adalah 100%
 2. Timbang 10 gram ekstrak kulit pisang raja, dan masukan kedalam labu ukur
 3. Tambahkan aquades sampai volumenya menjadi 100 mL pada labu ukur
 4. Homogenkan dan ekstrak stok induk larutan siap dipakai untuk pembuatan konsentrasi
3. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak
1. Menyiapkan stok larutan yang telah dibuat.
 2. Melakukan perhitungan konsentrasi dengan menggunakan rumus $M_1V_1 = M_2V_2$.

Keterangan :

M_1 = Konsentrasi ekstrak kulit pisang raja yang tersedia (Stok Induk 100%)

V_1 = Volume larutan M_1 yang akan diencerkan (ml)

M_2 = Konsentrasi ekstrak kulit pisang raja yang akan dibuat (Target 1 dan 2 %).

V_2 = Volume larutan yang diinginkan 100 mL

Penelitian ini menggunakan konsentrasi perlakuan: 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%, yang dilarutkan hingga volume akhir 100 mL dengan pelarut aquades.

- Konsentrasi 1 %

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$$(100\%) V_1 = (1\%) (100 \text{ mL})$$

$$V_1 = \frac{(1\%) \cdot (100 \text{ mL})}{100\%}$$

$$V_1 = \frac{100 \text{ mL}}{100}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL (stok larutan induk)}$$

Prosedur: Diperlukan 1 mL Stok larutan induk 100%. Volume pelarut aquades yang ditambahkan adalah $100 \text{ mL} - 1 \text{ mL} = 99 \text{ mL}$ aquades

- Konsentrasi 2 %

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$(100\%) V_1 = (2\%) (100 \text{ mL})$$

$$V_1 = \frac{(2\%) \cdot (100 \text{ mL})}{100\%}$$

$$V_1 = \frac{200 \text{ mL}}{100}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

Prosedur: Diperlukan 2 mL Stok larutan induk 100%. Volume pelarut aquades yang ditambahkan adalah $100 \text{ mL} - 2 \text{ mL} = 98 \text{ mL}$ aquades

- Konsentrasi 3 %

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$(100\%) V_1 = (3\%) (100 \text{ mL})$$

$$V_1 = (3 \times 100 \text{ mL}) / 100$$

$$V_1 = 300 / 100$$

$$V_1 = 3 \text{ mL}$$

Prosedur: Diperlukan 3 mL stok larutan induk 100%. Volume pelarut aquades yang ditambahkan adalah $100 \text{ mL} - 3 \text{ mL} = 97 \text{ mL}$ aquades.

- Konsentrasi 4 %

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$(100\%) V_1 = (4\%) (100 \text{ mL})$$

$$V_1 = (4 \times 100 \text{ mL}) / 100$$

$$V_1 = 400 / 100$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

Prosedur: Diperlukan 4 mL stok larutan induk 100%. Volume pelarut aquades yang ditambahkan adalah $100 \text{ mL} - 4 \text{ mL} = 96 \text{ mL}$ aquades.

- Konsentrasi 5 %

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$(100\%) V_1 = (5\%) (100 \text{ mL})$$

$$V_1 = (5 \times 100 \text{ mL}) / 100$$

$$V_1 = 500 / 100$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

Prosedur: Diperlukan 5 mL stok larutan induk 100%. Volume pelarut aquades yang ditambahkan adalah $100 \text{ mL} - 5 \text{ mL} = 95 \text{ mL}$ aquades.

3.6.3 Analitik

1. Menyiapkan larva nyamuk *Aedes aegypti* sebanyak 25 ekor tiap wadah dan dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali.

Tabel 3.2 Rencana Pengerjaan Sampel

Perlakuan	Konsentrasi	Waktu	Jumlah Larva	Pengulangan
Kontrol Negatif	-	24 dan 48 jam	25	2 Kali
Kontrol Positif	Larvasida Standar (abate)	24 dan 48 jam	25	2 Kali
Perlakuan I	1 %	24 dan 48 jam	25	2 Kali
Perlakuan II	2 %	24 dan 48 jam	25	2 Kali
Perlakuan III	3 %	24 dan 48 jam	25	2 Kali
Perlakuan IV	4 %	24 dan 48 jam	25	2 Kali
Perlakuan V	5 %	24 dan 48 jam	25	2 Kali

2. Menyiapkan konsentrasi ekstrak kulit pisang raja dimasukkan kedalam wadah.
3. Siapkan wadah dan tambahkan ekstrak beserta pelarut masukkan 25 ekor larva *Aedes aegypti* instar III dan IV ke dalam masing-masing wadah perlakuan dan kontrol.
4. Larva tidak diberi makan selama masa pengujian.
5. Wadah diletakkan pada lingkungan yang stabil (suhu ruangan, cahaya) selama periode pengamatan 24 jam dan 48 jam.
6. Pengamatan tingkat mortalitas dilakukan pada hari pertama 24 jam dan hari kedua 48 jam

a. Pengamatan Mortalitas

1. Hitung dan catat jumlah larva yang mati pada waktu 24 jam dan 48 jam untuk setiap wadah.
2. Larva dianggap mati (letal) jika tidak bergerak atau tidak menunjukkan respons (tidak ada gerakan berenang atau peristaltik) ketika wadah digoyangkan lembut atau disentuh dengan jarum ose.
3. Larva yang berubah menjadi pupa dihitung sebagai larva yang tidak mati.

b. Pengamatan Perubahan Morfologi

1. Amati dan catat semua perubahan fisik (morfologi) yang terjadi pada larva di bawah mikroskop atau secara visual pada interval waktu yang sama (24 jam dan 48 jam).
2. Perubahan yang dicatat meliputi:
 - Perubahan warna: perubahan warna tubuh larva.
 - Bentuk tubuh: pengerutan, pembengkakan, atau kerusakan pada bagian tubuh (seperti, siphon atau segmen tubuh).

3.6.7 Pasca Analitik

1. Melakukan perhitungan presentase kematian pada larva.
2. Melakukan dokumentasi pada morfologi larva setiap perlakuan.

3.7 Analisa Data

Analisis data dalam penelitian ini dilakukan secara univariat, yaitu dengan mendeskripsikan jumlah larva *Aedes aegypti* yang mengalami mortalitas setelah 24 dan 48 jam paparan ekstrak kulit pisang raja pada konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%. Data mortalitas disajikan dalam bentuk tabel jumlah larva yang mati pada

masing-masing konsentrasi untuk memberikan gambaran tingkat kematian larva. Selain itu, dilakukan analisis deskriptif terhadap perubahan morfologi larva berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis guna menggambarkan efek toksik ekstrak kulit pisang raja terhadap struktur tubuh larva *Aedes aegypti*.

3.8 Etika Profesi

3.8.1 Pengertian Etika

Etika didefinisikan sebagai seperangkat nilai yang menekankan hak dan kewajiban moral, berfungsi sebagai pedoman fundamental bagi eksistensi manusia. Konsep etika melampaui sekadar mengukur baik atau buruk; ia justru berakar pada kebiasaan positif yang tertanam dan kesepakatan bersama yang ditetapkan berdasarkan konsensus mengenai apa yang dianggap benar dan baik. Oleh karena itu, dapat ditarik kesimpulan bahwa etika penelitian mencakup perilaku seorang peneliti dalam berinteraksi dengan subjek penelitian, serta tanggung jawab atas produk atau temuan yang dihasilkan bagi kepentingan masyarakat (Putra *et al.*, 2021).

3.8.2 Prinsip-Prinsip Dasar Dalam Etika Penelitian

Dalam memanfaatkan hewan percobaan untuk penelitian kesehatan digunakan prinsip 3R, yaitu: Replacement, Reduction, dan Refinement (Hume and Russel, 1957):

1. Replacement, Ada dua alternatif untuk replacement, yaitu:
 - a. Replacement relatif, yaitu tetap melaksanakan hewan percobaan sebagai donor organ, jaringan, atau sel
 - b. Replacement absolut, yaitu tidak memerlukan bahan dari hewan,

melainkan memanfaatkan galur sel (cell lines) atau program komputer.

2. Reduction, mengurangi pemanfaatan jumlah hewan percobaan sehingga sesedikit mungkin dengan bantuan ilmu statistik, program komputer, dan teknik-teknik biokimia serta tidak mengurangi penelitian dengan hewan percobaan apabila tidak perlu.
3. Refinement. mengurangi ketidaknyamanan yang diderita oleh hewan percobaan sebelum, selama, dan setelah penelitian, misalnya dengan pemberian analgetik.

Peneliti yang baik adalah peneliti yang selalu menerapkan etika dalam penelitian ilmiahnya, sehingga dapat dipertanggungjawabkan. Adapun etika seorang peneliti antara lain meliputi: kejujuran, objektivitas, integritas, ketelitian, ketepatan, verifikasi, penghargaan, tanggung jawab sosial, kompetensi, dan legalitas (Putra *et al.*, 2021).

1. Kejujuran

Kejujuran merupakan prinsip yang harus diterapkan dalam seluruh tahapan penelitian, mulai dari pengumpulan referensi, pengumpulan data, pelaksanaan metode dan prosedur penelitian, hingga publikasi hasil. Peneliti juga harus bersikap terbuka terhadap keterbatasan maupun kegagalan metode yang digunakan. Tidak boleh membuat, memalsukan atau merubah data, tidak dibenarkan menipu rekan kerja, sponsor penelitian, atau masyarakat umum.

2. Objektivitas

Objektivitas merupakan upaya untuk meminimalkan kesalahan dan bias

selama proses penelitian. Penelitian harus bersifat objektif, baik dari segi karakteristik maupun prosedur yang digunakan. Objektivitas diwujudkan melalui sikap terbuka, bebas dari subjektivitas, serta penggunaan teknik pengumpulan dan analisis data yang menghasilkan interpretasi yang dapat dipertanggungjawabkan. Peneliti perlu menghindari bias dalam analisis maupun penafsiran data, serta mengungkapkan setiap kepentingan pribadi atau finansial yang berpotensi memengaruhi hasil penelitian.

3. Integritas

Integritas adalah komitmen untuk menjaga keselarasan antara pemikiran dan tindakan selama proses penelitian. Prinsip ini diwujudkan dengan menepati janji dan kesepakatan, bertindak secara tulus, serta mempertahankan konsistensi dalam setiap tindakan dan keputusan yang diambil selama penelitian berlangsung.

4. Ketepatan

Ketepatan, menunjukkan bahwa penelitian harus dilaksanakan dengan tingkat akurasi yang memadai. Instrumen pengumpulan data harus memenuhi aspek validitas dan reliabilitas, sedangkan desain penelitian, teknik pengambilan sampel, serta metode analisis data harus dipilih secara tepat. Hindari kesalahan dan kelalaian yang ceroboh, hati-hati dan kritis memeriksa pekerjaan anda sendiri dan pekerjaan rekan-rekan anda, buat catatan kegiatan penelitian yang bagus, seperti pengumpulan data, desain penelitian, dan korespondensi dengan agensi atau jurnal.

5. Tanggung jawab sosial

Tanggung jawab sosial, Tanggung jawab sosial merupakan komitmen agar hasil penelitian memberikan manfaat bagi masyarakat, seperti meningkatkan kualitas hidup, mempermudah aktivitas, dan membantu mengurangi berbagai permasalahan yang dihadapi masyarakat. Selain itu, peneliti memiliki tanggung jawab untuk memberikan pendampingan kepada masyarakat yang ingin menerapkan hasil penelitiannya. Penelitian juga diharapkan mampu mendorong terciptanya manfaat sosial serta mencegah atau meminimalkan dampak negatif melalui penelitian, edukasi kepada masyarakat, dan kegiatan

6. Kompetensi

Kompetensi, berarti bahwa penelitian harus dilakukan oleh individu yang memiliki pengetahuan dan keterampilan sesuai dengan bidang keilmuannya. Peneliti juga perlu mempertahankan serta meningkatkan kemampuan profesional melalui pendidikan dan pembelajaran sepanjang hayat, sekaligus berkontribusi dalam pengembangan kompetensi di bidang ilmu pengetahuan.

7. Legalitas

Legalitas, merupakan prinsip yang mengharuskan peneliti memahami dan mematuhi seluruh peraturan institusi maupun kebijakan pemerintah yang berkaitan dengan penelitian yang dilaksanakan. Peneliti juga harus menaati ketentuan hukum dan kebijakan yang berlaku serta menjelaskan tujuan

penelitian secara terbuka, termasuk dalam proses pengambilan data dari responden sebagai bentuk transparansi penelitian