

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan konsentrasi ekstrak daun jambu biji merah (*Psidium guajava Linn.*) berdasarkan prosedur dari *World Health Organization Pesticides Evaluation Scheme* (WHOPES) dapat ditentukan yaitu 12,5%, 25%, dan 50%, serta alkohol 70% sebagai kontrol negatif yang dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali.

### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Pembuatan ekstrak daun jambu biji merah (*Psidium guajava Linn.*) dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung dan pengamatan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Zoologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung pada bulan Oktober–November 2014.

### **3.3 Populasi dan Sampel**

#### **3.3.1 Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk dewasa betina *Aedes aegypti* yang diperoleh dari Loka Penelitian dan Pengembangan Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (Loka Litbang P2B2) Ciamis, Jawa Barat, dalam bentuk kering dengan media kertas saring.

#### **3.3.2 Sampel**

a. Kriteria Inklusi

- 1) Nyamuk dewasa betina *Aedes aegypti* berumur 5–7 hari.
- 2) Nyamuk bergerak aktif.
- 3) Nyamuk sudah dipuasakan selama 24 jam.

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Nyamuk mati sebelum perlakuan.

#### **3.3.3 Besar Sampel**

Berdasarkan pedoman WHOPES (2009), pedoman standar uji *repellent* penelitian ini dibutuhkan total sebanyak 150 nyamuk dewasa betina (Tabel 1). Rincian jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

**Tabel 1.** Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian (WHOPES, 2009).

<b>Perlakuan</b>	<b>Jumlah Nyamuk</b>
Ulangan I	50 nyamuk
Ulangan II	50 nyamuk
Ulangan III	50 nyamuk
Jumlah total nyamuk yang digunakan	150 nyamuk

### 3.3.4 Relawan

Penelitian ini membutuhkan seorang relawan untuk dilakukan pengujian. Relawan akan dioleskan ekstrak *repellent* pada lengan bawah tangan kiri dan kanan kemudian dilakukan uji secara langsung terhadap kontak dengan nyamuk. Menurut WHOPEs dan *Environmental Protection Agency* (EPA), tes *repellent* ini dikondisikan sebagaimana lingkungan asli. Relawan memiliki syarat tertentu yang harus dipenuhi, yaitu:

1. Usia 18–55 tahun
2. Tidak sensitif atau tidak memiliki alergi terhadap gigitan nyamuk
3. Tidak memakai wewangian 12 jam sebelum pengujian serta selama pengujian dan atau tidak memiliki bau yang khas yang dapat mengganggu pengujian
4. Bukan wanita hamil atau menyusui
5. Dianjurkan bukan perokok atau tidak merokok atau terkena paparan rokok 12 jam sebelum pengujian serta selama pengujian
6. Telah menandatangani lembar persetujuan

Relawan menandatangani lembar *informed consent* setelah diberikan penjelasan oleh peneliti mengenai penelitian (WHOPES, 2009; EPA, 2010).

### **3.4 Bahan dan Alat Penelitian**

#### **3.4.1 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. 6 Kg Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* Linn.).
- b. 5 L Ethanol 96% sebagai pelarut.
- c. Alkohol 70%.
- d. Aquades untuk tempat berkembang nyamuk serta untuk melakukan pengenceran ekstrak.
- e. Larutan gula.
- f. Pelet makanan larva.
- g. Telur *Aedes aegypti* dari strain Liverpool F-48.

#### **3.4.2 Alat Penelitian**

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Aspirator untuk menangkap dan memindahkan nyamuk.
- b. Kurungan nyamuk untuk meletakkan nyamuk pada saat melakukan uji daya tolak dan untuk *rearing* nyamuk.
- c. Stopwatch untuk mengukur waktu pada saat menghitung jumlah nyamuk *Aedes aegypti* yang hinggap.

- d. Neraca analitik untuk menimbang daun jambu biji merah yang dihaluskan.
- e. Gelas ukur 100 ml, untuk mengukur jumlah air.
- f. Gelas ukur 5 ml, untuk mengukur pengenceran ekstrak.
- g. Sarung tangan, untuk membatasi daerah lengan yang akan diuji.
- h. Gelas plastik 16 Os, untuk *rearing* nyamuk yaitu meletakkan stadium telur hingga pupa.
- i. Saringan, untuk menyaring ekstrak daun jambu biji merah.
- j. Pipet larva, untuk memindahkan telur, larva, dan pupa.
- k. Blender, untuk menghaluskan daun jambu biji merah.
- l. Mangkuk, untuk meletakkan pupa nyamuk dan kemudian dimasukkan ke dalam kurungan nyamuk.
- m. Penggaris, untuk mengukur lengan relawan.
- n. S spuit.

### 3.5 Prosedur Penelitian

Penelitian dibagi dalam 2 tahap, yaitu:

#### 3.5.1 Tahap Persiapan

##### a. Preparasi Bahan Uji

Telur nyamuk *Aedes aegypti* yang dipakai pada penelitian adalah telur nyamuk *Aedes aegypti* F-48 strain Liverpool yang diperoleh dari Ruang Insektarium Loka Penelitian dan Pengembangan (Litbang) Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang (P2B2) Ciamis, Pangandaran, Jawa Barat. Sedangkan daun jambu biji diperoleh dari lingkungan sekitar tempat penelitian.

##### b. *Rearing* Stadium Dewasa

Telur nyamuk dipindahkan ke dalam sebuah nampan yang berisi media air selama 1–2 hari sampai telur menetas dan menjadi larva. Larva akan berkembang dari stadium I sampai IV yang berlangsung sekitar 5 hari. Selanjutnya, larva akan berubah menjadi pupa, pupa dipindahkan ke dalam gelas 500 cc yang telah dimodifikasi berisi media air sebagai tempat perubahan menjadi nyamuk. Pupa akan menjadi nyamuk dewasa sekitar 1–2 hari. Selama masa perkembangannya nyamuk dewasa tersebut diberi pakan berupa larutan gula sampai 24 jam sebelum percobaan dilakukan.

##### c. Pembuatan Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* Linn.)

Pembuatan ekstrak daun jambu biji menggunakan pelarut berupa etanol 96%. Daun Jambu Biji Merah sebanyak 6 kg yang telah didapat kemudian dibersihkan dengan menggunakan air dan dipotong kecil, setelah itu potongan dijemur dibawah sinar matahari. Daun Jambu Biji Merah kering selanjutnya

diblender tanpa air. Hasil blender daun jambu biji kering direndam selama 24 jam di dalam etanol 96% sebanyak 5 L (maserasi) lalu disaring. Proses selanjutnya dilakukan evaporasi pada ekstrak untuk menghilangkan kandungan etanol sehingga diperoleh hasil akhirnya berupa *repellent* ekstrak pekat daun jambu biji merah konsentrasi 100% (Tabel 2) dalam bentuk setengah padat (kental).

d. Pembuatan Dosis Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* Linn.)

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Medikanto (2012) tentang ekstrak daun legundi sebagai *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti*, untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan rumus:

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

Dimana :

$V_1$  = volume larutan yang akan diencerkan (ml).

$M_1$  = konsentrasi ekstrak daun jambu biji yang tersedia (%).

$V_2$  = volume larutan (air + eksudat) yang diinginkan (ml).

$M_2$  = konsentrasi ekstrak daun jambu biji yang dibuat (%).

Jumlah volume ekstrak daun jambu biji disajikan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Volume Ekstrak Daun Jambu Biji yang Dibutuhkan pada Penelitian.

$M_1$	$V_2$	$M_2$	$V_1 = \frac{V_2 \cdot M_2}{M_1}$	Pengulangan ( $V_1 \times 3$ )
100%	1 ml	12,5%	0,125 ml	0,375 ml
100%	1 ml	25%	0,25 ml	0,75 ml
100%	1 ml	50%	0,5 ml	1,5 ml
Total				2,625 ml

- e. Pembuatan sediaan *repellent* dengan kandungan ekstrak daun Jambu Biji (*Psidium guajava Linn.*)

Perlakuan dilakukan dengan mengoleskan pada tangan yang telah dipasangkan sarung tangan tebal yang dimasukkan dalam tempat pengujian. Perlakuan mengoleskan dilakukan pada lengan bawah, daerah antara lingkaran pergelangan tangan dan lingkaran siku, dimana volume 1 mL ekstrak sebanding dengan 600 cm<sup>2</sup> luas daerah uji. Kemudian dilakukan pencucian tangan dengan sabun dan air sebelum dimasukkan ke dalam tempat pengujian.

### 3.5.2 Tahap Penelitian

Untuk menilai dosis yang memiliki daya proteksi ekstrak daun Jambu Biji (*Psidium guajava Linn.*) sebagai *repellent* terhadap nyamuk dewasa betina dilakukan dengan menilai aktivitas nyamuk dewasa betina dengan menggunakan konsentrasi 12,5%, 25% dan 50%. Kemudian ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava Linn.*) dalam sediaan *repellent*, dioleskan pada lengan relawan dan dimasukkan ke dalam ruang pengujian yang telah berisi nyamuk dewasa betina *Aedes aegypti*, lalu diamati (WHOPES, 2009) .

Pengujian *repellent* dilakukan berdasarkan rekomendasi WHOPEP (2009). Ekstrak daun biji jambu akan diaplikasikan pada lengan bawah relawan. Sebelum dan setelah percobaan setiap area tes (lengan bawah) dicuci dengan sabun dan dibilas dengan air, kemudian dikeringkan. Bagian tangan ditutupi oleh sarung tangan. Pertama lengan kiri sebagai kontrol dioleskan dengan 1 ml alkohol 70%



kemudian dimasukkan ke dalam kandang nyamuk dan mengamati serta mencatat jumlah nyamuk yang hinggap dalam periode waktu 30 detik. Dalam 30 detik ini akan dipastikan bahwa nyamuk yang hinggap  $\geq 10$  untuk memulai pengujian. Setelah 30 detik lengan tersebut dikeluarkan dengan hati-hati dari kandang nyamuk. Kemudian lengan yang sama diolesi dengan dosis paling rendah yaitu 10% ekstrak daun biji jambu. Kemudian dimasukkan kembali ke dalam kandang untuk diamati selama 30 detik. Selama pengujian, lengan uji diusahakan untuk tidak bergerak.

Prosedur ini diulang pada lengan yang sama untuk setiap kenaikan dosis. Uji dilakukan berurutan dan harus dilaksanakan satu dengan lainnya tanpa penundaan dan dosis *repellent* pada setiap tes dihitung sebagai penjumlahan dosis untuk mendapatkan dosis kumulatif pada setiap tes. Pada akhir pengujian dosis, 1 ml alkohol diolesi pada lengan kanan kemudian dikeringkan kurang lebih 1 menit. Lengan kanan relawan dimasukkan ke dalam kandang yang sama untuk memastikan bahwa jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan tersebut  $\geq 10$  nyamuk dalam periode waktu 30 detik.

WHOPES (2009) merekomendasikan uji dilakukan minimal dengan 3 kali pengulangan. Pengujian kedua dan ketiga dilakukan pada hari yang berbeda, yaitu hari berikutnya dengan waktu uji yang sama. Nyamuk yang digunakan pada setiap ulangan merupakan sampel yang berbeda dari sampel nyamuk yang digunakan pada pengujian sebelumnya.

Pada akhir pengujian persentase daya proteksi dinilai sebagai proporsi jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan perlakuan dengan jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan kontrol, dihitung dengan formula berikut:

$$\text{Persentase Daya Proteksi (\%)} = \frac{\Sigma C - \Sigma T}{\Sigma C} \times 100\%$$

Keterangan:

C= jumlah nyamuk kontak pada lengan kontrol

T= jumlah nyamuk kontak pada lengan perlakuan

Setelah didapatkan persentase daya proteksi pada masing-masing konsentrasi dinilai konsentrasi yang efektif untuk memperoleh persentase daya proteksi 50% dan 99%.

### **3.6 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel**

#### **3.6.1 Identifikasi Variabel**

##### a. Variabel Independen

Berbagai konsentrasi ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) dengan 4 konsentrasi 12,5%, 25% dan 50% serta alkohol 70% sebagai *repellent*.

##### b. Variabel Dependen

Persentase daya proteksi terhadap kontak nyamuk *Aedes aegypti* pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun jambu biji merah.

### 3.6.2 Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional (Tabel 3).

**Tabel 3.** Definisi Operasional Variabel Penelitian.

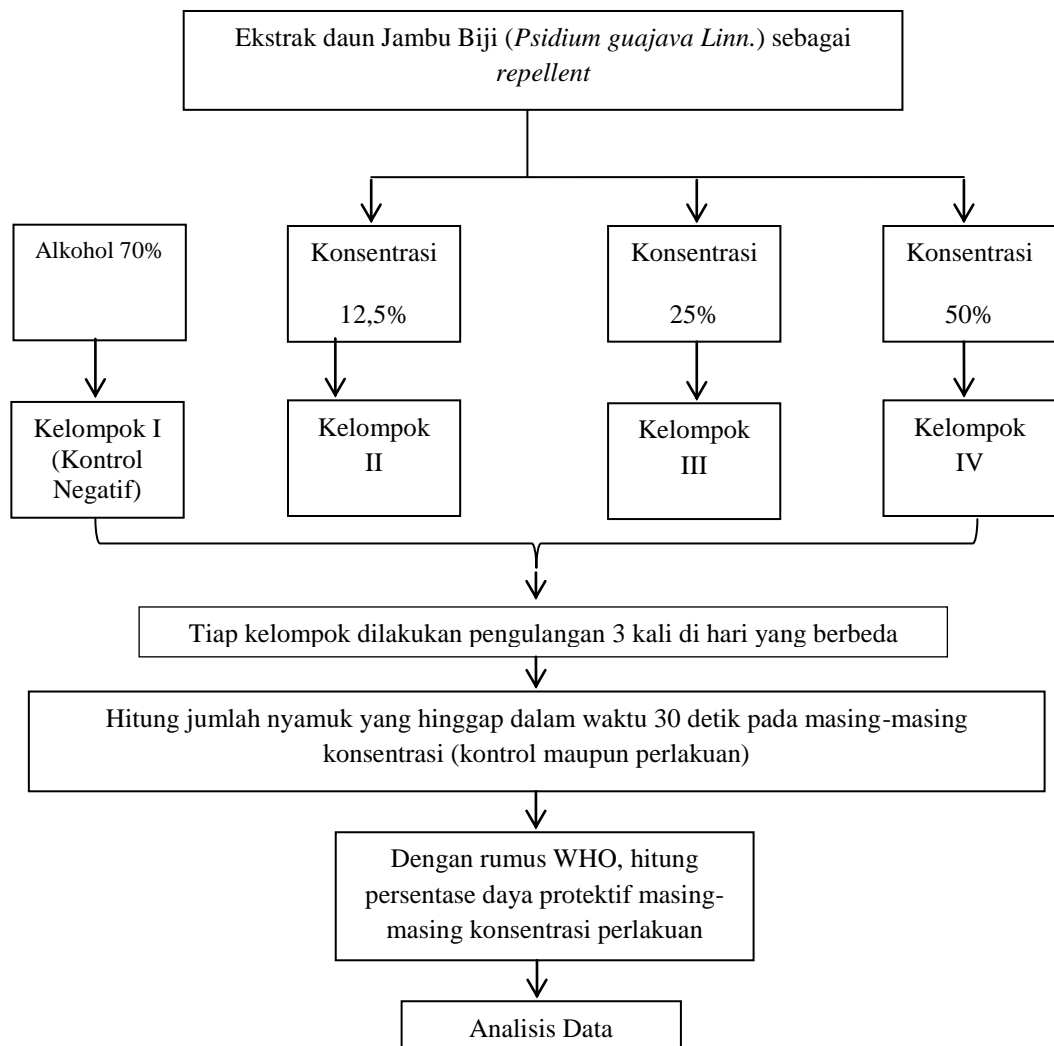
No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	<b>Variabel Independen :</b> Berbagai konsentrasi ekstrak daun jambu biji ( <i>Psidium guajava</i> Linn.) dalam sediaan repellent	Ekstrak daun Jambu Biji didapatkan dengan proses maserasi dengan menggunakan etanol 96% serta dinyatakan dalam persen (%). Masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran dan dibentuk sediaan cair. Pada penelitian ini dipakai konsentrasi 12,5%; 25%; 50%; kontrol(-) yang kemudian dicari dosis untuk menghambat 50% dan 99% aktivitas nyamuk dewasa.	<i>Analytical balance</i> , Gelas ukur, dan pipet tetes	Menimbang ekstrak dan menghitung rumus $M_1V_1 = M_2V_2$	Didapatkan konsentrasi ekstrak daun jambu biji (12,5%, 25%, dan 50%)	Kategoris
2	<b>Variabel Dependen :</b> Persentase daya proteksi	Persentase proporsi jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan perlakuan dengan jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan kontrol berdasarkan rumus pada pedoman WHO (2009), yaitu: $= \left( \frac{\Sigma C - \Sigma T}{\Sigma C} \right) \times 100\%$ Keterangan: C = nyamuk kontak pada lengan kontrol T = nyamuk kontak pada lengan perlakuan	Kaca pembebas	Dihitung secara manual kemudian dihitung dengan rumus daya proteksi WHO	Persentase daya proteksi (%)	Numerik

Daya proteksi  
dihitung untuk  
masing-masing  
konsentrasi,  
kemudian dihitung  
untuk mencari  
persentase daya  
proteksi 50% dan  
99% terhadap  
nyamuk *Aedes*  
*aegypti*.

---

### 3.7 Alur Penelitian

Untuk memperjelas proses penelitian, maka disajikan diagram alur penelitian sebagai berikut (Gambar 9).



**Gambar 9.** Diagram Alur Uji Daya Proteksi Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava Linn.*) Sebagai *Repellent* Terhadap Nyamuk Dewasa Betina *Aedes aegypti*.

### 3.8 Analisis Data

Data yang telah didapat dari hasil pengamatan akan diolah dengan menggunakan *software* statistik. Data dari hasil penelitian akan dianalisis secara statistik dengan uji normalitas (*Shapiro–Wilk*). Jika distribusi data normal, dilanjutkan dengan menggunakan uji analisis *one way* ANOVA. Berikut ini adalah langkah–langkah melakukan uji analisis *one way* ANOVA:

1. Memeriksa syarat uji parametrik *one way* ANOVA untuk lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan :
  - a. Distribusi data harus normal;
  - b. Varians data harus sama;
2. Jika memenuhi syarat uji parametrik (distribusi data normal, varians sama), dipilih uji *one way* ANOVA;
3. Jika tidak memenuhi syarat, dapat diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya distribusi menjadi normal dan varians sama;
4. Jika variabel transformasi data memenuhi syarat, maka dipilih uji parametrik *one way* ANOVA;
5. Jika variabel hasil transformasi tidak memenuhi syarat, maka alternatifnya dipilih uji nonparametrik *Kruskal–Wallis*, jika pada uji *one way* ANOVA atau *Kruskal–Wallis* menghasilkan nilai  $p < 0,05$  dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc* pada taraf kepercayaan 0,05 (Dahlan, 2011).

#### 6. Analisis Probit

Dianalisis seberapa besar daya hambat ekstrak daun jambu biji terhadap aktivitas nyamuk dewasa betina *Aedes aegypti* yang dinyatakan dengan ED<sub>50</sub> dan ED<sub>99</sub> (WHOPES, 2009).

### 3.9 Aspek Etik Penelitian

Nyamuk dewasa betina *Aedes aegypti* didapat dengan pemeliharaan telur yang didapatkan dari Instalasi Insektarium P2B2 Ciamis dengan keadaan telur yang non–infeksius dan didapatkan tidak adanya transmisi virus ke telur. Pengujian *repellent* terhadap nyamuk dewasa dilakukan dengan metode standar dari WHOPES (WHOPES, 2009). Penelitian ini telah mendapatkan Keterangan Lolos Kaji Etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tanggal 18 November 2014 melalui surat nomor 1964/UN26/8/DT/2014.