

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Konsentrasi ekstrak daun jambu biji merah (*Psidium guajava L*) yang digunakan yaitu, 22,5 %, 45 %, 90 %, dan aquades (0%) sebagai kontrol negatif, serta anti nyamuk yang mengandung *transflutrin* sebagai kontrol positif dengan pengulangan sebanyak 3 kali.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Zoologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung dan pembuatan ekstrak daun jambu biji merah (*Psidium guajava L*) dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung pada bulan Oktober - Desember 2014.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi Penelitian

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

3.3.2 Sampel Penelitian

3.3.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah

- a. Nyamuk dewasa betina *Aedes aegypti* berumur 2-5 hari
- b. Nyamuk bergerak aktif.

3.3.2.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah

- a. Nyamuk mati sebelum perlakuan
- b. Nyamuk berasal dari alam bebas.

3.3.3 Besar Sampel

Berdasarkan *Guidelines for Efficacy Testing of Household Insecticide Products* (WHO, 2009) untuk penelitian menggunakan insektisida dalam sediaan *aerosol* menggunakan 50 nyamuk pada setiap perlakuan dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Dosis yang digunakan sebanyak 5 dosis dengan rentang 10 % - 90 %. Namun

peneliti juga beracuan pada penelitian lain (Santi, 2011) tentang efektivitas ekstrak kulit durian dalam media semprot yang menggunakan empat macam konsentrasi yaitu 0 %, 25 %, 50 %, dan 75 %. Dalam penelitian ini peneliti menggunakan empat macam konsentrasi yaitu, 0 %, 22,5 %, 45 %, dan 90 %, serta satu perlakuan dengan kontrol positif. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dibutuhkan 750 nyamuk betina dewasa (Tabel 3.3.3). Rincian jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

Tabel 3.3.3. Jumlah Sampel yang Digunakan dalam Penelitian

Perlakuan	Jumlah Nyamuk X Jumlah Pengulangan	Total
Kontrol (-) : 0 %	50 nyamuk x 3	150 nyamuk
Perlakuan I : 22,5 %	50 nyamuk x 3	150 nyamuk
Perlakuan II : 45 %	50 nyamuk x 3	150 nyamuk
Perlakuan III : 90 %	50 nyamuk x 3	150 nyamuk
Kontrol (+)	50 nyamuk x 3	150 nyamuk
Jumlah total nyamuk yang digunakan		750 nyamuk

3.4 Bahan dan Alat Penelitian

3.4.1 Bahan Penelitian

3.4.1.1 Bahan pembuatan ekstrak

Bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah

- a. 1,31 kg daun jambu biji merah (240 gram daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) yang telah dihancurkan)
- b. 6 liter ethanol 96%
- c. Aquades.

3.4.1.2 Bahan pembuatan konsentrasi

Bahan yang digunakan dalam pembuatan konsentrasi adalah

- a. 33,075 gram ekstrak daun jambu biji 100 %
- b. Aseton 60 ml
- c. Aquades 50,925 ml.

3.4.1.3 Bahan pemeliharaan nyamuk

Bahan yang digunakan dalam pemeliharaan nyamuk adalah

- a. Telur *Aedes aegypti* dari strain Liverpool F-48
- b. Aquadest untuk penetasan telur
- c. Pelet untuk pemeliharaan larva
- d. Kapas
- e. Larutan madu 10 % untuk nyamuk dewasa.

3.4.2 Alat Penelitian

3.4.2.1 Alat pembuatan ekstrak

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak adalah

- a. Wadah bahan ekstrak
- b. Timbangan untuk menimbang jumlah ekstrak
- c. Penumbuk untuk menghaluskan bahan ekstrak
- d. Teko
- e. Kertas saring
- f. Beaker glass
- g. *Rotary evaporator* untuk membuat ekstrak.

3.4.2.2 Alat pembuatan konsentrasi ekstrak

Alat yang digunakan dalam pembuatan konsentrasi ekstrak adalah

- a. Beaker glass
- b. Gelas Ukur
- c. Pipet tetes.

3.4.2.3 Alat pemeliharaan nyamuk

Alat yang digunakan untuk pemeliharaan nyamuk adalah

- a. Termometer
- b. Gelas tempat penetasan telur
- c. Aspirator
- d. Kotak pengamatan 30 cm x 30 cm x 30 cm
- e. Alat penyemprot
- f. Jam
- g. *Hand counter*.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Persiapan

3.5.1.1 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.

3.5.1.2 Rearing Stadium Dewasa

Telur nyamuk dipindahkan ke dalam wadah 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 selama sekitar 2 hari sebelum akhirnya menjadi nyamuk dewasa. Ketika menjadi pupa, pupa dipindahkan ke dalam cup. Setiap cup berisi 30 pupa, kemudian cup di pindahkan ke dalam kandang perlakuan. Setiap kandang perlakuan berisi 2 cup. Selama masa perkembangannya pupa yang sudah menjadi nyamuk dewasa diberi pakan berupa larutan gula atau madu 10 %.

3.5.1.3 Pembuatan Ekstrak Daun Jambu Biji Merah (*Psidium guajava* Linn)

Pembuatan ekstrak ini dilakukan sesuai dengan metode Harbone, daun jambu biji merah dikeringkan terlebih dahulu dengan cara dianginkan atau dikeringkan tanpa terkena sinar matahari secara langsung. Kemudian daun jambu biji merah yang telah kering dihaluskan. Sebanyak 250 gram daun jambu biji merah yang telah dihaluskan digunakan dalam pembuatan ekstrak. Selanjutnya daun jambu biji merah yang telah ditimbang dimaserasi selama 2 x 24 jam menggunakan larutan etanol 96% sebanyak 6 liter, kemudian hasil maserasi

disaring. Setelah disaring hasil maserasi dipekatkan pada suhu 40⁰C-50⁰C dalam *rotary evaporator* selama 150 menit sehingga dihasilkan ekstrak pekat daun jambu biji merah konsentrasi 100% .

3.5.1.4 Penentuan Dosis

Penelitian ini akan menggunakan 3 konsentrasi dengan konsentrasi acuan 10% - 90%. Oleh karena itu, peneliti menentukan konsentrasi penelitian berturut-turut 22,5%, 45% dan 90%. Selain itu, peneliti menggunakan kontrol negatif dan kontrol positif.

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

Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan rumus

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

Keterangan :

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

3.5.1.5.a.

Berdasarkan *Guidelines for Efficacy Testing of Household Insecticide Products* (WHO, 2009) ekstrak yang digunakan sebanyak $0,65 \pm 0,1$ gr (yang digunakan dalam penelitian 0,7 gr) yang dilarutkan dalam aseton 0,5 ml yang digunakan dalam penyemprotan setiap konsentrasinya. Peneliti membuat kelipatan 10 x agar ekstrak yang digunakan mampu disemprotkan selama 3-5 detik. Sehingga peneliti menggunakan V_2 sebanyak 7 gram atau setara dengan 7 ml. Jumlah aseton yang digunakan 60 ml (Tabel 3.5.1.5.b) dan aquades yang digunakan (Tabel 3.5.1.5.c) disesuaikan dengan V_1 dan V_2 .

Tabel 3.5.1.5.a. 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%	7 ml	22,5%	1,575 ml	4,725 ml
100%	7 ml	45%	3,15 ml	9,45 ml
100%	7 ml	90%	6,3 ml	18,9 ml
Total				33,075 ml

Jumlah aseton yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 5 ml setiap konsentrasi yang digunakan dengan pengulangan sebanyak 3x.

Keterangan :

Dosis = Konsentrasi masing-masing perlakuan yang dinyatakan dalam %

V = Volume aseton yang digunakan.

Tabel 3.5.1.5.b. Volume aseton yang Dibutuhkan pada Penelitian

Dosis	V	Pengulangan (V x 3)
0 %	5 ml	15 ml
22,5 %	5 ml	15 ml
45 %	5 ml	15 ml
90 %	5 ml	15 ml
	Total	60 ml

Aquades yang digunakan dalam penelitian tergantung dari V_1 dan V_2 . Aquades yang dibutuhkan merupakan larutan untuk pengenceran agar didapatkan volume larutan yang diinginkan sesuai dengan konsentrasi yang telah ditetapkan.

Keterangan :

V_1 = volume larutan yang akan diencerkan (ml)

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

V_{aquades} = volume aquades (ml).

Tabel 3.5.1.5.c. Volume Aquades yang Dibutuhkan pada Penelitian

V_1	V_2	$V_{\text{aquades}} = V_2 - V_1$	Pengulangan ($V_{\text{aquades}} \times 3$)
0 ml	7 ml	7 ml	21 ml
1,575 ml	7 ml	5,425 ml	16,275 ml
3,15 ml	7 ml	3,85 ml	11,55 ml
6,3 ml	7 ml	0,7 ml	2,1 ml
		Total	50,925 ml

Berdasarkan penelitian (Fachry dkk., 2012), cara mengekstrak daun jambu biji yang paling baik adalah dengan mengekstrak 10 gram simplisia yang dimaserasi dalam 250 ml etanol 96 % pada suhu 50°C selama 150 menit yang akan

menghasilkan 1,4235 gram ekstrak 100%. Pada penelitian ini membutuhkan 33,075 gram ekstrak 100%, maka berdasarkan perbandingan ekstrak didapatkan jumlah simplisia dan etanol yang dibutuhkan sebanyak 24 kali lipat ($33,075:1,4235 = \sim 24$). Dengan demikian, jumlah simplisia yang dibutuhkan sebanyak 240 gram ($10 \text{ gram} \times 24$) dan etanol sebanyak 6 liter ($250 \text{ ml} \times 24$).

3.5.1.6 Pembuatan Sediaan *Aerosol* dengan Kandungan Ekstrak Daun Jambu Biji Merah (*Psidium guajava* Linn)

Pembuatan sediaan *aerosol* dilakukan dengan melarutkan ekstrak daun jambu biji merah dan air dalam aseton sesuai dengan masing-masing dosis yang akan dibuat. Kemudian sediaan yang telah dibuat dimasukkan dalam alat penyemprot.

3.5.2 Tahap Penelitian

Untuk menilai dosis efektif ekstrak daun jambu biji merah (*Psidium guajava* Linn) sebagai insektisida nyamuk dewasa betina *Aedes aegypti* dalam sediaan *aerosol* dilakukan dengan menilai aktivitas nyamuk dewasa betina dengan menggunakan konsentrasi 22,5%, 45%, 90% dan 0% sebagai kontrol negatif serta anti nyamuk x (*transflutrin*) sebagai kontrol (+). Kemudian dilakukan penyemprotan sesuai dengan konsentrasi ekstrak daun jambu biji merah (*Psidium guajava* Linn) dan obat nyamuk x dalam sediaan *aerosol* dengan jarak 30 cm dari masing-masing kotak perlakuan selama 3-5 detik.

Amati dan catat nyamuk dewasa betina *Aedes aegypti* yang mati setiap 10 menit selama 60 menit untuk masing-masing perlakuan. Nyamuk yang diberi perlakuan sebagai kontrol setelah diamati selama 60 menit juga diamati setelah 24 jam perlakuan dengan tetap memberi pakan larutan madu 10 %. Jika jumlah nyamuk kontrol yang mati antara 5 % - 20 %, maka penelitian dapat diterima. Untuk kotak perlakuan dan kotak kontrol dilakukan pencucian dengan sabun dan dijemur setiap akan dilakukan pengulangan.

Pada akhir pengamatan didapatkan efektivitas ekstrak daun jambu biji merah terhadap nyamuk dewasa betina *Aedes aegypti* yang dinilai sebagai konsentrasi (*Lethal Concentration*, LC) dan waktu (*Knock-down times*, KT) pada kematian sampel. Eksperimen selesai ketika semua nyamuk dewasa betina pada kontrol mati. Kemudian dilakukan analisis untuk mendapatkan nilai LC_{50} , LC_{90} , KT_{50} , dan KT_{95} .

3.6 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.6.1 Identifikasi Variabel

3.6.1.1 Variabel Independen

Berbagai konsentrasi ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn) dengan 4 konsentrasi 0%, 22,5, 45% dan 90% serta anti nyamuk x (*transflutrin*) sebagai kontrol (+) dalam sediaan *aerosol*.

3.6.1.2 Variabel Dependen

Banyaknya nyamuk dewasa betina *Aedes aegypti* yang mati menggunakan LC dan KT.

3.6.2 Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional (Tabel 3.6.2).

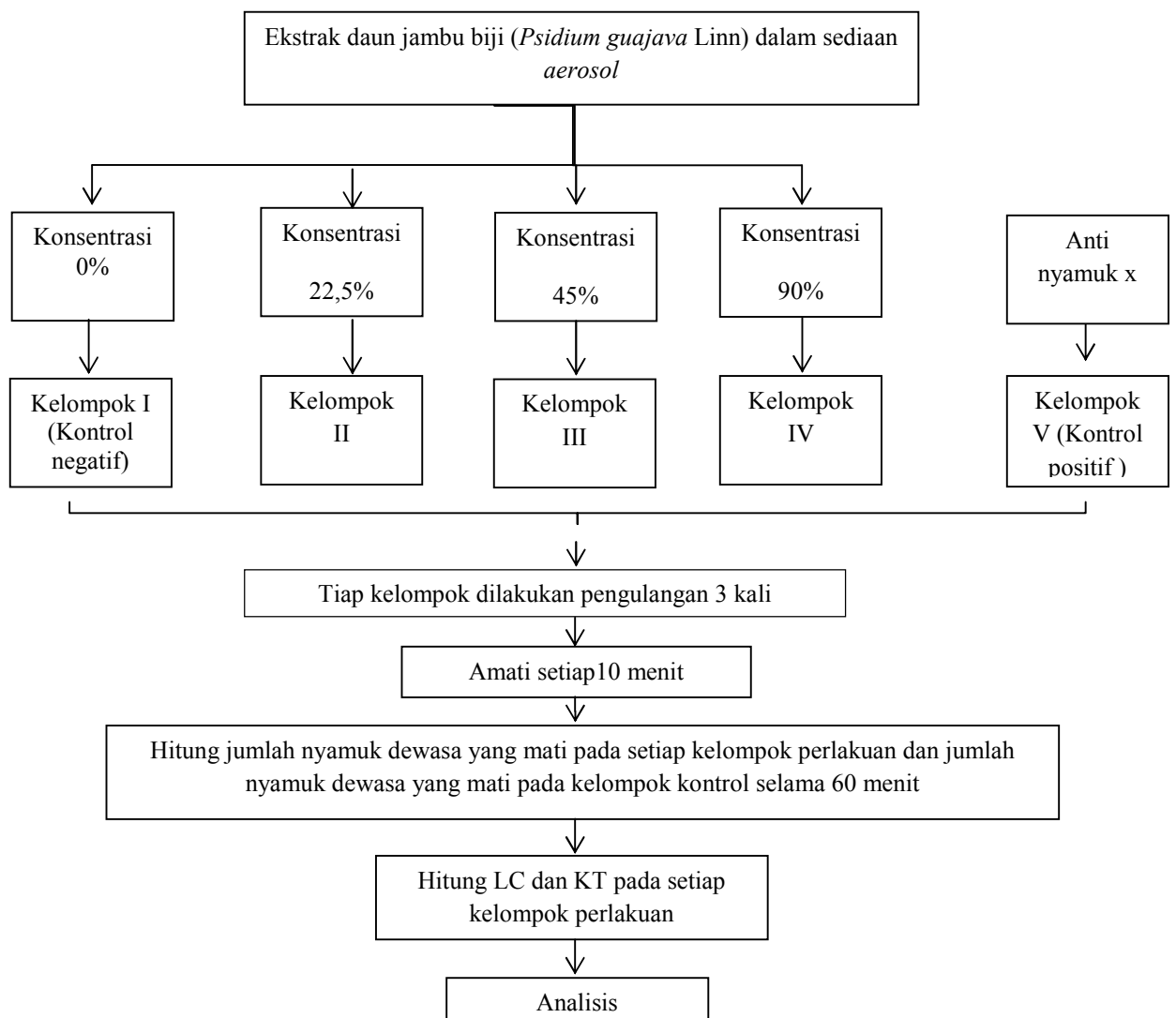
Tabel 3.6.2. Definisi Operasional Variabel Penelitian

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Variabel Independen : Berbagai konsentrasi ekstrak daun Jambu Biji (<i>Psidium guajava</i> Linn) dalam sediaan <i>aerosol</i>	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 <i>aerosol</i> . Pada penelitian ini dipakai konsentrasi 22,5 %, 45 %, 90 % dan kontrol negatif 0%.	<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 merah (22,5 %, 45 % dan 90 %)	Kategorik
2	Variabel Dependen : Jumlah nyamuk <i>Aedes aegypti</i> dewasa betina yang lumpuh dan mati.	Jumlah nyamuk <i>Aedes aegypti</i> dewasa betina yang lumpuh dan mati pada perlakuan. Kemudian dicari persentase kematian dan kelumpuhan nyamuk, <i>Lethal Concentration</i> (LC ₅₀ and LC ₉₀) dan <i>Knock-down times</i> (KT ₅₀ and KT ₉₅).	<i>Hand counter</i>	Dihitung secara manual kemudian dihitung dengan rumus persentase kelumpuhan dan kematian nyamuk.	Persentase kelumpuhan dan kematian nyamuk, LC (<i>Lethal Concentration</i>) dan KT (<i>Knock-down times</i>)	Numerik

Parameter efektivitas pada penelitian ini adalah persentase kelumpuhan dan kematian nyamuk yang tinggi, konsentrasi (LC_{50}) ekstrak daun jambu biji merah (*Psidium guajava* Linn) paling rendah dan waktu (KT_{50}) paling singkat yang dapat membunuh *Aedes aegypti* sebanyak 50 % sampel.

3.7 Alur Penelitian

Untuk memperjelas proses penelitian, maka disajikan diagram alur penelitian sebagai berikut (Bagan 3.7).



Bagan 3.7. Diagram Alur

3.8 Analisis Data

Data yang telah didapat dari hasil pengamatan diolah dengan menggunakan *software* statistik. Data dari hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan uji normalitas (*Kolmogorov-Smirnov*). 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, maka akan 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 LC_{50} , LC_{90} , KT_{50} , dan KT_{95} (WHO, 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 insektisida terhadap nyamuk dewasa dalam sediaan *aerosol* dilakukan dengan metode dari P2B2 dan metode standar (WHO, 2009). Penelitian ini telah memperoleh Keterangan Lolos Kaji Etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada tanggal 17 Desember 2014 melalui surat nomor 2406 (Terlampir).