

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental labolatoris dengan rancangan *true eksperimental-post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) sebagai insektisida terhadap nyamuk *Culex* sp. dengan metode semprot.

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Cara Pemilihan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk *Culex* sp. dewasa yang masih hidup (aktif bergerak dan bisa terbang) yang diperoleh dengan cara menangkapnya di lingkungan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

##### 4.2.2 Estimasi Besar Sampel

Nyamuk dimasukkan dalam sebanyak 25 ekor per kandang (BioAssay, 2010) dengan menggunakan kriteria nyamuk dewasa betina *Culex* sp. yang hidup. Penelitian ini menggunakan 7 kelompok perlakuan yang terdiri dari :

1. Kelompok yang disemprot menggunakan larutan *malathion* 0,28% (kontrol positif)
2. Kelompok yang disemprot menggunakan *aquadest* (kontrol negatif)
3. Kelompok yang disemprot menggunakan ekstrak biji buah alpukat dengan konsentrasi a%
4. Kelompok yang disemprot menggunakan ekstrak biji buah alpukat dengan konsentrasi b%

5. Kelompok yang disemprot menggunakan ekstrak biji buah alpukat dengan konsentrasi c%
6. Kelompok yang disemprot menggunakan ekstrak biji buah alpukat dengan konsentrasi d%
7. Kelompok yang disemprot menggunakan ekstrak biji buah alpukat dengan konsentrasi e%

Pada penelitian ini dilakukan 4 kali pengulangan. Banyaknya pengulangan tersebut dihitung dengan menggunakan rumus  $[p(n-1) \geq 16]$  (Tjokronegoro, 2001).

$$\begin{aligned} p(n-1) &\geq 16 \\ 5(n-1) &\geq 16 \\ 5n-5 &\geq 16 \\ 5n &\geq 21 \\ n &\geq 4,2 \sim 4 \end{aligned}$$

**Keterangan :**

**p : Jumlah Perlakuan**

**n : Jumlah Pengulangan**

Percobaan ini membutuhkan 500 ekor nyamuk yang dihitung dengan cara seperti dibawah ini :

$$25 \text{ nyamuk} \times 7 \text{ kelompok coba} \times 4 \text{ kali pengulangan} = 700 \text{ ekor}$$

#### 4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan September 2014.

#### 4.4 Definisi Operasional

- *True experimental-post test only control group design* merupakan rancangan penelitian yang dilakukan randomisasi pada sampel sehingga

kelompok kontrol dan eksperimen dianggap sama sebelum diberi perlakuan dan tidak diadakan *pre-test*.

- Ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) adalah ekstrak etanol yang didapatkan sebagai hasil dari rangkaian proses ekstraksi dan destilasi biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.), sedangkan larutan ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) adalah ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) yang dicampur dengan aseton 1% dalam *aquadest.* Biji buah alpukat yang digunakan diambil dari pedagang es campur yang berjualan di depan perumahan Griya Santa Grand Eksekutif Malang. Dipilih biji yang masih bagus dan tidak busuk.
- Nyamuk *Culex* sp. yang digunakan diperoleh dari hasil penangkapan di lingkungan kampus Universitas Brawijaya dan diidentifikasi sebagai berikut : bentuk sayapnya simetris, berkembang biak di air yang kotor atau rawa-rawa, warna tubuhnya coklat, *palpus* lebih pendek dari *proboscis* (Piranto, 2002).
- Kontrol positif yang digunakan adalah *malathion* 0,28%. Yaitu dengan cara menyemprotkan *malathion* tersebut pada satu kandang.
- Kontrol negatif yang digunakan adalah *aquadest.* Yaitu dengan cara menyemprotkan *aquades* tersebut pada satu kandang.
- Deteksi nyamuk *Culex* sp. yang mati dengan cara menyentuh nyamuk dengan lidi yang dimasukkan ke dalam kandang, jika tidak bergerak berarti nyamuk tersebut sudah mati.
- Potensi insektisida adalah kemampuan ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) yang dapat menyebabkan kematian pada nyamuk *Culex* sp. dan kemudian diolah dengan menggunakan metode Abbott.

- Metode semprot yang digunakan dalam penelitian dilakukan dengan menyemprotkan ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) sebanyak 3.5 ml yang dimasukkan dalam botol *sprayer* pada dinding-dinding kandang nyamuk *Culex* sp. dari jarak 25 cm yaitu pada lubang untuk tempat tangan masuk ke kandang tersebut.

#### 4.5 Variabel Penelitian

##### 4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan 5 konsentrasi yaitu a%, b%, c%, d% dan e%.

##### 4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung penelitian ini adalah jumlah nyamuk *Culex* sp. yang mati setelah dimasukkan dalam kandang yang telah disemprot dengan pemberian insektisida ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan konsentrasi berbeda. Nyamuk *Culex* sp. mati adalah nyamuk yang tidak aktif bergerak dengan pemberian rangsang sentuhan.

#### 4.6 Bahan dan Instrumen Penelitian

##### 4.6.1 Bahan Penelitian

NO	Bahan Penelitian	Fungsi	Keterangan
1	Nyamuk <i>Culex</i> sp.	Variabel tergantung	25 ekor per kandang
2	Larutan glukosa	Digunakan untuk makanan nyamuk selama penelitian	10%

3	Larutan ekstrak biji buah alpukat ( <i>Persea americana</i> Mill.)	Variabel bebas	5 konsentrasi berbeda
4	Aquadest steril	Kontrol negatif	
5	Larutan <i>malathion</i>	Kontrol positif	0,28%

#### 4.6.2 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 3 kelompok :

1. Alat-alat untuk ekstraksi dan evaporasi ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) yaitu :

NO	Bahan Penelitian	Fungsi	Keterangan
1	Blender/Parutan	Menghancurkan dan menghaluskan biji buah alpukat	
2	<i>Beaker glass</i> / <i>Erlenmayer flask</i>	Merendam bubuk ekstrak biji buah alpukat ( <i>Persea americana</i> Mill.)	1 Liter
3	Timbangan	Untuk menimbang	Satuan gram
4	Kertas Saring	Memisahkan bubuk biji dan pelarut	Saringan whatman no 40
5	1 set alat evaporasi	Menghilangkan sisa pelarut	
6	Oven	Menghilangkan sisa pelarut	40 <sup>o</sup> C – 50 <sup>o</sup> C

2. Alat-alat untuk persiapan nyamuk *Culex* sp.

NO	Bahan Penelitian	Fungsi	Keterangan
1	Sangkar Kaca	Tempat melakukan penelitian	25cm x 25cm x 25cm
1	Jaring Serangga	Jalan masuk serangga	

3. Alat-alat untuk uji insektisida dari ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.)

NO	Bahan Penelitian	Fungsi	Keterangan
1	Sangkar Kaca	Tempat melakukan penelitian	25cm x 25cm x 25cm
2	Sprayer	Menyemprotkan ekstrak ke kandang	Semprotan parfun ukuran 10ml
3	Timer	Menghitung waktu penelitian	Jam Tangan
4	Gelas Ukur	Membuat campuran ekstrak dan aseton	25 ml
5	Spuit	Mengambil bahan	1ml, 3ml, 5ml

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Ekstraksi dan Evaporasi

Ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) didapatkan dari Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang, proses dilakukan dengan maserasi yaitu dengan pelarut etanol 96% karena pelarut etanol tidak larut dalam air.

Adapun prosesnya adalah sebagai berikut :

1. Mencuci biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan air bersih yang mengalir.

2. Memarut dan mengeringkan dengan sinar matahari selama 4 hari agar biji buah alpukat tersebut menjadi kering sempurna.
3. Memasukkan serbuk biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) ke dalam *Erlenmayer flask* 1 L untuk direndam dengan etanol selama 1 hari.
4. Mengevaporasi hasilnya (untuk memisahkan pelarut dengan etanol).

Proses evaporasi bertujuan untuk memisahkan hasil ekstrak yang telah didapat dengan pelarut etanol. Adapun prosesnya sebagai berikut :

1. Memasang evaporator pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan  $30^{\circ}$  -  $40^{\circ}$  terhadap meja percobaan.
2. Memindahkan hasil rendaman etanol yang berupa larutan ke labu pemisah ekstraksi.
3. Menghubungkan labu pemisah ekstraksi pada bagian bawah evaporator, menghubungkan pendingin spiral dengan *vakum* dengan selang plastik, menghubungkan pendingin spiral dengan *water pump* dengan selang plastik yang dialiri air dingin.
4. Menempatkan *water pump* dalam bak yang berisi *aquadest*, menghubungkan *water pump* dengan sumber listrik sehingga *aquades* akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan rata).
5. Meletakkan satu set evaporasi sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam *aquadest* pada *water bath*.
6. Menghubungkan vakum dan *water bath* dengan sumber listrik dan menaikkan suhu pada *water bath* sekitar  $70^{\circ}\text{C}$  (sesuai dengan titik didih etanol).
7. Membiarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama kurang lebih 2-3 jam.

8. Melanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 40<sup>o</sup>C-50<sup>o</sup>C selama 1-2 hari.
9. Menghasilkan pasta dari biji buah alpukat yang akhirnya akan digunakan dalam percobaan ini.

Hasil ekstrak ini kemudian disimpan dalam lemari es untuk memperlambat kerusakan

#### 4.7.2 Persiapan Nyamuk *Culex* sp.

Nyamuk *Culex* sp. yang ditangkap diberi makan berupa larutan gula 10% sebagai nutrisi nyamuk agar nyamuk tetap bertahan hidup.

#### 4.7.3 Pembuatan Konsentrasi Larutan untuk Penelitian

Penelitian ini terdapat 2 kelompok yakni kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, untuk kelompok kontrol digunakan *malathion* 0,28% sebagai kontrol positif dan *aquadest* steril sebagai kontrol negatif.

Sebelum melakukan pengenceran, dilakukan pencampuran untuk mendapatkan *aseton* 1% di dalam *aquadest*. Untuk mendapatkan campuran yang diinginkan dapat digunakan rumus :

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

Keterangan :

$M_1$  : Konsentrasi *aseton* (90%)

$V_1$  : Volume *aseton*

$M_2$  : Konsentrasi *aseton* yang diinginkan (1%)

$V_2$  : Volume campuran *aseton*

$$90\% \times V_1 = 1\% \times 15 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0.16 \text{ ml}$$

Untuk mendapatkan campuran 1% aseton dalam 15 ml *aquadest* diperlukan aseton sebanyak 0.16 ml ditambahkan dengan 14,84 ml *aquadest*. Kemudian campuran larutan ini digunakan untuk bahan pengenceran ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.).

Sedangkan untuk kelompok perlakuan terdapat 5 macam perlakuan dengan dosis yang berbeda-beda. Dosis yang akan dipergunakan adalah a%, b%, c%, d% dan e%. Untuk mendapatkan dosis yang diinginkan tersebut digunakan rumus pengenceran sebagai berikut :

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

Keterangan :

$M_1$  : Konsentrasi ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.)

$V_1$  : Volume ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.)

$M_2$  : Konsentrasi ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) yang diinginkan

$V_2$  : Volume campuran ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.)

$$100\% \times V_1 = (a,b,c,d,e)\% \times 4 \text{ ml}$$

$$V_1 = \dots \text{ ml}$$

$V_1$  adalah volume ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) yang didapatkan. Tambahkan beberapa mililiter *aquadest* sehingga didapatkan  $V_2$  sebanyak 4 ml. Volume yang nantinya akan digunakan untuk penyemprotan

hanya sebesar 3.5 ml tetapi untuk memudahkan pengambilan dengan menggunakan spuit maka diperlukan volume 4 ml.

#### 4.7.4 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan bersifat *trial and eror* yang bertujuan untuk memperoleh LD<sub>100</sub> yaitu konsentrasi minimal yang dapat membunuh dalam jumlah maksimal. Setelah melakukan proses eksplorasi, pemilihan konsentrasi yang digunakan untuk dasar penelitian adalah konsentrasi biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) minimal yang dapat membunuh nyamuk *Culex* sp. dengan jumlah maksimal.

#### 4.7.5 Prosedur Penelitian

1. Menyiapkan kandang kaca dan insektisida
2. Memasukkan larutan gula 10% sebagai nutrisi nyamuk
3. Memasukkan nyamuk *Culex* sp. sebanyak 25 ekor ke dalam masing-masing kandang
4. Menyiapkan larutan ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan konsentrasi a%, b%, c%, d% dan e%
5. Menyiapkan larutan kontrol positif (*malathion* 0,28%) dan larutan kontrol negatif (*aquadest*)
6. Memasukkan masing-masing larutan ke dalam botol semprotan, kemudian menyemprotkan ke dalam kandang sampai isi larutan habis.

Berikut rinciannya :

7. Menyemprot kandang 1 dengan menggunakan larutan *malathion* 0,28% sebanyak 3,5 ml (kontrol positif)
8. Menyemprot kandang 2 dengan menggunakan larutan *aquadest* sebanyak 3,5 ml (kontrol negatif)

9. Menyemprot kandang 3 dengan menggunakan larutan ekstrak biji buah alpukat a% sebanyak 3,5 ml
10. Menyemprot kandang 4 dengan menggunakan larutan ekstrak biji buah alpukat b% sebanyak 3,5 ml
11. Menyemprot kandang 5 dengan menggunakan larutan ekstrak biji buah alpukat c% sebanyak 3,5 ml
12. Menyemprot kandang 6 dengan menggunakan larutan ekstrak biji buah alpukat d% sebanyak 3,5 ml
13. Menyemprot kandang 7 dengan menggunakan larutan ekstrak biji buah alpukat e% sebanyak 3,5 ml
14. Melakukan pengamatan setiap jam ke-1, 2, 3, 4, 5, dan jam ke-24. Hitung jumlah nyamuk *Culex* sp. yang mati
15. Melakukan penelitian pengulangan sebanyak 4 kali untuk setiap perlakuan

#### 4.7.6 Pengamatan

Data jumlah nyamuk *Culex* sp. pada berbagai perlakuan dan pengulangan dianalisis untuk mengetahui potensi ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap nyamuk *Culex* sp. yang mati, menggunakan metode Abbott dengan rumus :

$$A_1 = \frac{A-B}{100-B} \times 100\%$$

Keterangan

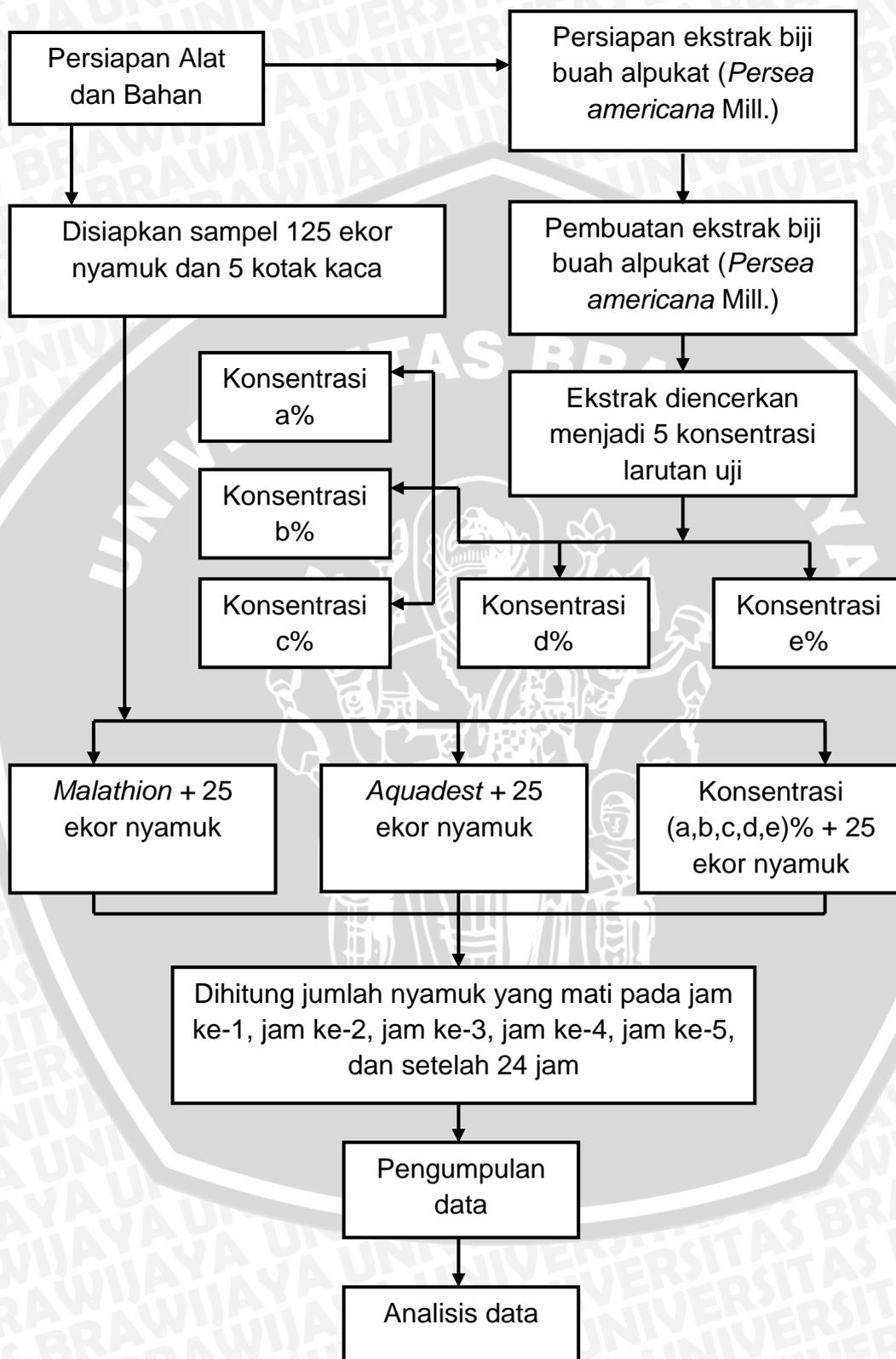
$A_1$  : Presentase kematian nyamuk setelah dikoreksi

A : Presentase kematian nyamuk uji

B : Presentase kematian nyamuk kontrol

(Boesri *dkk.*, 2001)

4.7.7 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian