

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true eksperimental-post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama penyimpanan ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill.) pada berbagai waktu terhadap potensinya sebagai insektisida nyamuk *Culex* sp.

#### 4.2 Subjek dan Sampel Penelitian

Subjek penelitian adalah nyamuk *Culex* sp. yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi penelitian ini adalah nyamuk *Culex* sp. yang aktif bergerak. Sedangkan yang termasuk kriteria eksklusi penelitian ini adalah nyamuk *Culex* sp. yang mati sebelum percobaan dilakukan dan tidak termasuk kriteria inklusi. Sampel adalah bagian dari subjek penelitian yang akan diteliti. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sejumlah nyamuk yang memenuhi kriteria inklusi dan telah diseleksi. Jumlah sampel nyamuk yang digunakan adalah 25 ekor untuk setiap jenis perlakuan. Sampel penelitian ini adalah nyamuk *Culex* sp. baik jantan maupun betina dewasa. Jumlah sampel dalam penelitian ini disesuaikan dengan jumlah sampel dari penelitian tentang efektifitas ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) yang dilakukan oleh Wijaya (2015)

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Wijaya (2015) disebutkan bahwa pada ekstrak biji alpukat konsentrasi 20% merupakan konsentrasi terendah yang efektif sebagai insektisida untuk nyamuk *Culex* sp.

Konsentrasi ekstrak biji alpukat baru yang disimpan dan terbukti paling efektif terhadap nyamuk *Culex* sp. adalah 20%.

Perlakuan yang diberikan pada sampel adalah dengan membagi menjadi delapan perlakuan, yang terdiri dari:

1. Kontrol negatif, yaitu pemberian *aquadest*
2. Perlakuan 1, yaitu pemberian ekstrak biji alpukat dengan konsentrasi 20% pada hari ke-1 dari pembuatan ekstrak (kontrol positif)
3. Perlakuan 2, yaitu pemberian ekstrak biji alpukat dengan konsentrasi 20% pada hari ke-2 dari pembuatan ekstrak
4. Perlakuan 3, yaitu pemberian ekstrak biji alpukat dengan konsentrasi 20% pada hari ke-3 dari pembuatan ekstrak
5. Perlakuan 4, yaitu pemberian ekstrak biji alpukat dengan konsentrasi 20% pada hari ke-4 dari pembuatan ekstrak
6. Perlakuan 5, yaitu pemberian ekstrak biji alpukat dengan konsentrasi 20% pada hari ke-5 dari pembuatan ekstrak
7. Perlakuan 6, yaitu pemberian ekstrak biji alpukat dengan konsentrasi 20% pada hari ke-6 dari pembuatan ekstrak
8. Perlakuan 7, yaitu pemberian ekstrak biji alpukat dengan konsentrasi 20% pada hari ke-7 dari pembuatan ekstrak

Jumlah pengulangan eksperimen yang dilakukan berdasarkan penghitungan rumus:

$$P(n-1) \geq 16$$

Keterangan :

P : Banyak kelompok perlakuan

n : Jumlah replikasi (pengulangan)

Berdasarkan rumus diatas perhitungan untuk pengulangan perlakuan adalah:

$$P(n-1) \geq 16$$

$$7(n-1) \geq 16$$

$$7n - 7 \geq 16$$

$$7n \geq 23$$

$$n \geq 3 \text{ (Tjokronegoro, 2004)}$$

Jadi berdasarkan rumus di atas, pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini minimal adalah 3 kali untuk setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Di dalam penelitian ini digunakan 4 tabung kaca yang masing-masing berisi 25 ekor nyamuk *Culex* sp. Sehingga jumlah total nyamuk *Culex* sp. yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah :

25 ekor nyamuk *Culex* sp. x 7 kelompok perlakuan x (3 kali pengulangan + 1 kontrol negatif) = 700 ekor nyamuk *Culex* sp.

Dalam setiap pengulangan membutuhkan 100 ekor nyamuk kemudian dicatat pengaruhnya sebelum dan setelah disimpan pada hari ke 1 maupun sampai hari ke-7.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Ada beberapa variabel dalam penelitian ini, yaitu :

1. Variabel Independen (variabel bebas)
  - Lama penyimpanan ekstrak biji alpukat (dalam hari)
2. Variabel Dependen (variabel tergantung)
  - Potensi sebagai insektisida yang diketahui dari jumlah nyamuk *Culex* sp. yang mati (sesuai dengan metode penelitian Wijaya (2015))

#### 4.4 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

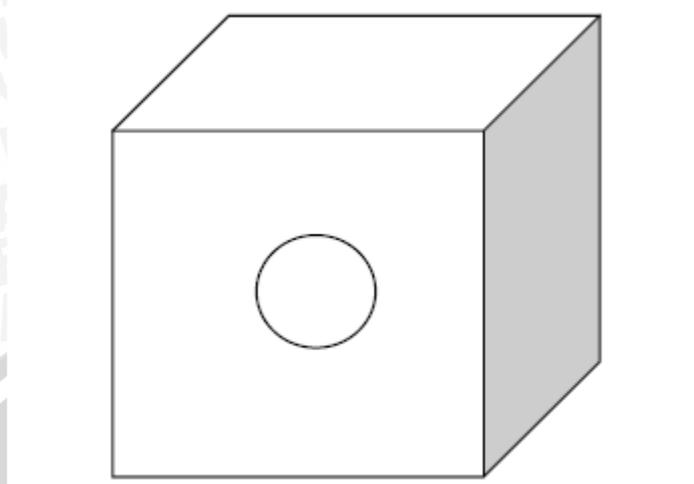
Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juni-Juli 2015.

#### 4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah:

- *True experiment-post test only control group design* merupakan rancangan penelitian randomisasi pada sampel sehingga kelompok kontrol dan kelompok eksperimen dianggap sama sebelum diberi perlakuan, tidak diadakan *pre-test*, tetapi setelah perlakuan diadakan pengukuran terhadap efek perlakuan tersebut.
- Variabel independen (variabel bebas) adalah variabel yang dapat memberikan perubahan pada variabel dependen (variabel tergantung) bila variabel ini diubah, sedangkan variabel dependen (variabel tergantung) adalah variabel yang dapat berubah akibat perubahan variabel bebas.

- Ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) adalah ekstrak etanol yang didapatkan sebagai hasil rangkaian proses ekstraksi dan destilasi biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan hasil ekstrak dianggap memiliki konsentrasi 100%, sedangkan larutan ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) adalah ekstrak biji alpukat yang telah dicampur dengan aseton 1% dalam *aquadest*. Biji alpukat yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji yang masih bagus dan tidak busuk.
- Nyamuk *Culex* sp. yang digunakan adalah nyamuk *Culex* sp. yang dikembang biakkan di Dinas Kesehatan Surabaya.
- Kontrol positif pada penelitian ini adalah ekstrak biji alpukat konsentrasi 20% (sesuai hasil penelitian pendahuluan) yang langsung diteliti tanpa melalui proses penyimpanan.
- Kontrol negatif yang digunakan adalah *aquadest*, yaitu dengan cara menyemprotkan *aquadest* tersebut pada satu kandang.
- Penyimpanan dilakukan selama 7 hari pada suhu ruang (20°C - 25°C) dan dilihat pengaruhnya setiap 24 jam.
- Kotak sangkar kaca adalah kotak berukuran 25 cm x 25 cm x 25 cm yang dibuat dengan memodifikasi sangkar dan menempelkan kaca pada semua sisi. Pada satu sisi dibuat lubang dengan jaring-jaring untuk tempat tangan masuk dan menghindari nyamuk keluar dari kotak tersebut (WHO, 2006).



**Gambar 4.1** Kandang tempat nyamuk *Culex sp.* berukuran 25 cm x 25 cm x 25 cm

- Kriteria nyamuk mati: bila dilakukan sentuhan atau gangguan pada bagian abdomen atau bagian tubuh yang lainnya pada nyamuk dan tidak didapatkan pergerakan nyamuk *Culex sp.*
- Metode semprot yang digunakan dalam penelitian dilakukan dengan menyemprotkan ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mil.) sebanyak 3,5 ml yang dimasukkan dalam botol *sprayer* pada dinding-dinding kandang nyamuk *Culex sp.* dari jarak 25 cm yaitu pada lubang untuk tangan masuk ke kandang tersebut (Wijaya, 2015).

#### 4.6 Instrumen Penelitian

##### 4.6.1 Alat-alat Penelitian

Penelitian ini menggunakan tiga kelompok alat. Kelompok pertama adalah alat-alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak biji alpukat, kelompok kedua adalah alat-alat yang digunakan untuk persiapan nyamuk *Culex sp.* dan

kelompok terakhir adalah alat-alat yang digunakan untuk uji potensi ekstrak biji alpukat terhadap nyamuk *Culex* sp. dilihat dari lama penyimpanannya.

1. Alat-alat ekstraksi biji alpukat

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°C – 50°C
7	Lemari pendingin	Menyimpan ekstrak biji alpukat	

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

NO	Bahan Penelitian	Fungsi	Keterangan
1	Sangkar Kaca	Tempat meletakkan nyamuk selama penelitian	25 cm x 25 cm x 25 cm
2	Jaring Serangga	Jalan masuk tangan dan mencegah keluarnya serangga	

3. Alat-alat untuk uji ekstraksi biji alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap nyamuk *Culex* sp.

NO	Bahan Penelitian	Fungsi	Keterangan
1	Sangkar Kaca	Tempat meletakkan nyamuk selama penelitian	25 cm x 25 cm x 25 cm
2	<i>Sprayer</i>	Menyemprotkan ekstrak ke kandang	
3	Gelas Ukur	Membuat campuran ekstrak dan aseton	25 ml
4	<i>Spuit</i>	Mengambil bahan	1ml, 3ml, 5ml

## 4.6.2 Bahan-bahan Penelitian

Penelitian ini juga menggunakan tiga kelompok bahan. Kelompok pertama merupakan bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak biji alpukat, kelompok kedua adalah bahan-bahan yang digunakan untuk persiapan nyamuk *Culex* sp. dan kelompok yang ketiga adalah bahan-bahan yang digunakan untuk menguji potensi ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.)

sebagai insektisida terhadap nyamuk *Culex* sp. dilihat dari lama penyimpanannya.

1. Bahan-bahan ekstraksi biji alpukat
  - Biji alpukat
  - Etanol 96% sebagai pelarut ekstrak
2. Bahan-bahan untuk persiapan nyamuk *Culex* sp.
  - Larutan glukosa 10%
3. Bahan-bahan untuk uji ekstrak biji alpukat terhadap nyamuk *Culex* sp. dilihat dari lama penyimpanannya
  - Ekstrak etanol biji alpukat
  - Nyamuk *Culex* sp.
  - *Aquadest*

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Ekstraksi dan Evaporasi Biji Alpukat

Ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) didapatkan dari Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang, proses dilakukan dengan maserasi yaitu dengan pelarut etanol 96%. Adapun prosesnya adalah sebagai berikut :

1. Cuci biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) yang akan digunakan dengan air bersih yang mengalir.
2. Parut dan keringkan dengan sinar matahari selama 4 hari agar biji buah alpukat tersebut menjadi kering sempurna.
3. Masukkan serbuk biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.) ke dalam *Erlenmayer flask* 1 L untuk direndam dengan etanol lalu dikocok selama

30-60 menit dan dibiarkan selama 1 hari. Proses ini diulangi minimal sebanyak 3 kali sehingga dibutuhkan 3 hari.

4. Evaporasi hasilnya (untuk memisahkan pelarut dengan etanol).

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

1. Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan  $30^{\circ}$ - $40^{\circ}$  terhadap meja percobaan.
2. Pindahkan hasil rendaman etanol yang berupa larutan ke labu pemisah ekstraksi.
3. Hubungkan labu pemisah ekstraksi pada bagian bawah evaporator, hubungkan pendingin spiral dengan *vakum* dengan selang plastik, hubungkan pendingin spiral dengan *water pump* dengan selang plastik yang dialiri air dingin.
4. Tempatkan *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. Letakkan satu set evaporasi sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam *aquadest* pada *water bath*.
6. Hubungkan vakum dan *water bath* dengan sumber listrik dan naikan suhu pada *water bath* sekitar  $70^{\circ}\text{C}$  (sesuai dengan titik didih etanol).
7. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama kurang lebih 2-3 jam.
8. Lanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu  $40^{\circ}\text{C}$ - $50^{\circ}\text{C}$  selama 1-2 hari.

9. Hasil akhir yang berupa pasta dari biji buah alpukat inilah yang akan digunakan dalam percobaan ini.

#### 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

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.).

Selanjutnya, ekstrak pekat biji alpukat yang dianggap berkonsentrasi 100% diencerkan dengan larutan aseton 1% sehingga didapatkan dosis yang diinginkan dengan menggunakan rumus pengenceran:

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

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.)

$$100\% \times V_1 = X\% \times 4 \text{ ml}$$

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

$V_1$  adalah volume ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill.) yang didapatkan. Tambahkan beberapa milliliter *aquadest* sehingga didapatkan  $V_2$  sebanyak 4 ml. volume yang nantinya akan digunakan untuk penyemprotan hanya sebesar 3.5 ml tetapi untuk memudahkan pengambilan menggunakan spuit maka diperlukan volume 4 ml.

#### 4.7.4 Penelitian Pendahuluan

Sebelum dilakukan penelitian utama akan dilakukan penelitian pendahuluan yang bertujuan untuk mengkonfirmasi efektifitas konsentrasi

ekstrak biji alpukat berdasarkan penelitian sebelumnya (Wijaya, 2015), dimana konsentrasi terendah yang efektif sebagai insektisida untuk nyamuk *Culex sp.* adalah 20%. Penelitian pendahuluan ini menggunakan tiga konsentrasi yaitu 15%, 20%, dan 25%, dan dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali.

#### 4.7.5 Penelitian Utama

Berdasarkan penelitian pendahuluan, maka dilakukan penelitian utama:

1. Siapkan 4 sangkar kaca untuk uji insektisida.
2. Masukkan nyamuk *Culex sp* sebanyak 25 ekor kedalam masing-masing sangkar kaca yang akan diteliti.
3. Siapkan alat-alat yang akan digunakan untuk membuat larutan pengujian antara lain: gelas ukur dan sprayer.
4. Siapkan stok larutan uji disiapkan dalam konsentrasi 20% serta kontrol negatif (*aquadest*).
5. Memasukkan masing-masing larutan ke dalam botol *sprayer*, kemudian menyemprotkan ke dalam kandang sampai isi larutan habis. Berikut rinciannya:
6. Menyemprotkan kandang 1 dengan menggunakan larutan *aquadest* sebanyak 3,5 ml (kontrol negatif)
7. Menyemprotkan kandang 2 dengan menggunakan larutan ekstrak etanol biji alpukat 20% sebanyak 3,5 ml (pengulangan 1)
8. Menyemprotkan kandang 3 dengan menggunakan larutan ekstrak etanol biji alpukat 20% sebanyak 3,5 ml (pengulangan 2)
9. Menyemprotkan kandang 3 dengan menggunakan larutan ekstrak etanol biji alpukat 20% sebanyak 3,5 ml (pengulangan 3)

10. Melakukan pengamatan terhadap jumlah nyamuk *Culex* sp. yang mati pada setiap 24 jam setelah penyemprotan selama 7 hari.
11. Melakukan pengulangan sebanyak 3 kali pada masing-masing perlakuan.

#### 4.8 Pengumpulan Data

Data hasil yang telah diperoleh dari penelitian dimasukkan kedalam tabel dan diklasifikasikan menurut jumlah nyamuk yang mati, pengulangan, dan waktu lama penyimpanan. Selanjutnya, dari hasil tersebut akan dilakukan uji statistik.

#### 4.9 Tabulasi Data

Persentasi kemampuan ekstrak biji alpukat sebagai insektisida dihitung menggunakan formula Abbot dengan rumus :

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

Keterangan :

A<sub>1</sub> : Persentase kematian nyamuk setelah koreksi.

A : Persentase kematian nyamuk uji.

B : Persentase kematian nyamuk kontrol positif (Boesri dkk, 2005)

#### 4.10 Analisis Data

Data-data yang telah dikelompokkan dan ditabulasi kemudian dilakukan analisis statistik dengan menggunakan fasilitas SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) 20.0 for *Windows* dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

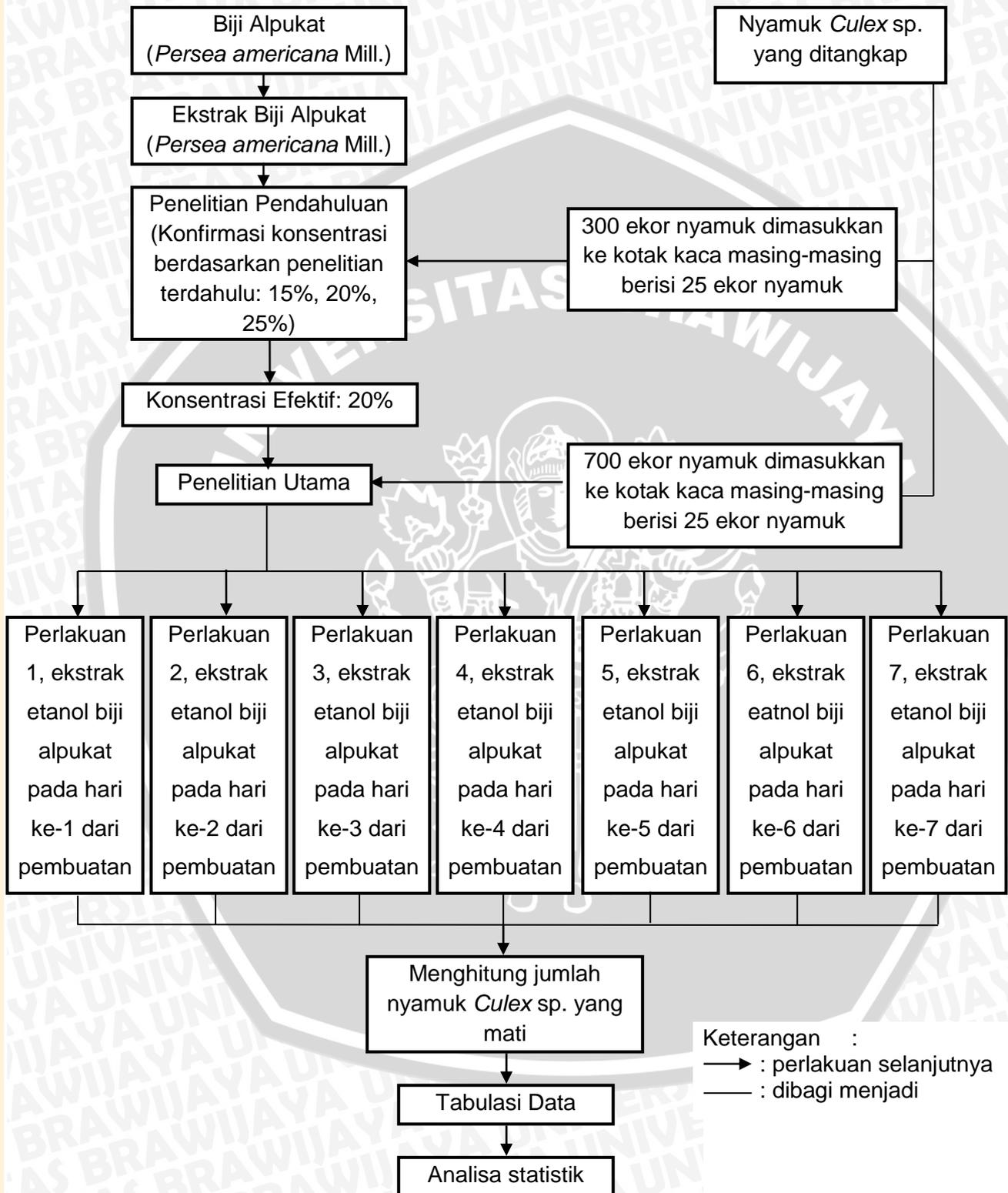
Untuk mengetahui apakah terdapat keragaman antar perlakuan dilakukan uji hipotesis komparatif. Metode yang dapat digunakan yaitu uji *One-way* ANOVA. Metode *One-way* ANOVA (*Analysis of Variance*) digunakan karena data telah memenuhi syarat-syarat sebagai berikut (Dahlan, 2004),

1. Terdapat lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan.
2. Distribusi data normal, yang dapat diketahui dari uji normalitas. Uji normalitas data menggunakan tes Kolmogorov-Smirnov karena jumlah sampel yang lebih dari 50.
3. Varians data sama atau homogen, yang dapat diketahui dari uji homogenitas.

Pada uji *One-way* ANOVA didapatkan nilai  $p < 0,05$ , maka dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh perbedaan hari penyimpanan dan terhadap potensi insektisida. Kemudian untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda dilakukan *post-hoc test* dengan uji Tukey HSD sebagai lanjutan data yang menggunakan uji *One-way* ANOVA (Dahlan, 2004).

Kemudian untuk mengetahui apakah korelasi antara perbedaan lama waktu paparan ekstrak biji alpukat dengan besarnya potensi ekstrak biji alpukat dilakukan uji korelasi Pearson atau Spearman. Terakhir, dilakukan uji regresi untuk mengetahui besarnya pengaruh lama penyimpanan terhadap potensi insektisida ekstrak etanol biji alpukat pada nyamuk *Culex* sp. (Dahlan, 2004).

4.11 Diagram Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.2 Diagram Alur Kerja Penelitian