

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian adalah eksperimental dengan desain Rancangan Acak Kelompok (RAK). Variabel bebas adalah ekstrak air daun kopi Arabika dan variabel terikat adalah mortalitas larva instar III nyamuk *Aedes aegypti*.

B. Lokasi Dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Penelitian ini sudah dilakukan di Laboratorium Parasitologi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang Jurusan Teknologi Laboratorium Medis. Pembuatan ekstrak sudah dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Jurusan Farmasi Poltekkes Tanjungkarang.

2. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Maret-Mei 2023.

C. Subjek Penelitian

Subjek dari penelitian ini adalah daun tengah kopi Arabika (*Coffe arabica*) dengan usia tanam 5-10 tahun yang memiliki ciri-ciri warna daun hijau mengkilap dan daun harus terbebas dari hama, kemudian dibuat ekstrak lalu diencerkan dalam konsentrasi 5%, 7,5%, 10%, 12,5% dan 15%. Larva *Aedes aegypti* yang digunakan adalah hasil penetasan telur yang diperoleh dari Balai Litbang Kesehatan Baturaja.

Besar sampel pada penelitian ini adalah 25 ekor disetiap konsentrasi dengan 5 kali pengulangan berdasarkan rumus Federer, yaitu :

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

t : Perlakuan

n : Pengulangan

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4) (n-1) \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No	Variable	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
1	Variabel bebas : ekstrak daun kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>)	Daun TNG (daun tengah) kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>) dengan usia tanam 5-10 tahun yang diekstrak menggunakan pelarut air dan diencerkan dengan konsentrasi 5%, 7,5%, 10%, 12,5% dan 15%	Pengenceran	Labu ukur, batang pengaduk	Persen (%)	Rasio
2	Variabel bebas : waktu kontak bahan aktif ekstrak daun kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>) dengan larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	Waktu kontak antara bahan aktif ekstrak daun kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>) dengan larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i> hingga menimbulkan mortalitas dengan rentang waktu pengamatan 1 sampai 12 jam	Observasi	Visual dan stopwatch	Ekor/jam	Rasio
3	Variabel bebas : bubuk abate (<i>temephos</i>)	Larvasida nyamuk <i>Aedes aegypti</i> yang digunakan dengan konsentrasi 0,01%	Ditimbang	Neraca	Persen (%)	Rasio
4	Variabel terikat: jumlah mortalitas larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	Jumlah larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i> yang tidak menunjukkan pergerakan atau mati	Observasi	Visual	Jumlah (ekor)	Rasio

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Prosedur penelitian

- a. Pembuatan surat izin penelitian dari Poltekkes Tanjungkarang
Pembuatan surat izin pemesanan telur di Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Baturaja, Sumatera Selatan dari Poltekkes Tanjungkarang.
- b. Pembuatan simplisia dengan menyiapkan daun TNG (daun tengah) kopi Arabika (*Coffe arabica*) dengan usia tanam 5-10 tahun, kemudian daun kopi Arabika dicuci lalu dijemur dibawah sinar matahari secara tidak langsung atau ditutup dengan kain hitam hingga kering. Hasil pengeringan ini disebut simplisia.
- c. Pembuatan ekstrak air daun kopi Arabika di Laboratorium Kimia Farmasi Jurusan Farmasi Poltekkes Tanjungkarang dengan proses pengekstraksian simplisia daun kopi Arabika dengan metode maserasi menggunakan pelarut air.
 - 1) Simplisia kering daun kopi Arabika diblender hingga halus.
 - 2) Dimasukkan 700 gram simplisia yang telah halus ke dalam botol berwarna hitam, ditambahkan larutan air sebanyak 2,45 liter hingga simplisia terendam air.
 - 3) Simplisia dimaserasi selama 3 hari.
 - 4) Setelah dimaserasi, kemudian disaring hingga didapatkan maserat.
 - 5) Maserat yang didapat kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator selama 4 jam dengan kecepatan 60 rpm, suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak agak kental.
- d. Pembuatan konsentrasi bahan uji
 - 1) Larutan ekstrak 100% yang sudah dipanaskan lalu diencerkan menjadi konsentrasi 5%, 7,5%, 10%, 12,5% dan 15%
 - 2) Rumus pengenceran ekstrak air daun kopi Arabika yang digunakan adalah $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$.

- e. Penyediaan sampel larva dengan melakukan penetasan telur nyamuk *Aedes aegypti* menjadi larva kemudian ditunggu hingga berkembang menjadi larva instar III.
- f. Uji efektivitas ekstrak air daun kopi Arabika dengan konsentrasi 5%, 7,5%, 10%, 12,5% dan 15%. Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi daun kopi Arabika. Data yang dikumpulkan adalah dengan menghitung jumlah larva instar III *Aedes aegypti* yang mati di setiap wadah. Perhitungan larva yang mati dilakukan setiap 1 jam selama 12 jam pada masing-masing konsentrasi ekstrak air daun kopi Arabika. Kontrol negatif aquadest 100 ml dan kontrol positif berupa abate 0.01% (Yobi Kurniawan, 2018).

2. Cara kerja

- a. Persiapan alat dan bahan
 - 1) Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu ukur, beaker glass, kertas saring, objek glass, toples kaca, evaporator, mikroskop, gelas plastik, gelas ukur, dan sendok plastik.
 - 2) Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, bubuk abate, daun kopi Arabika, dan larva instar III nyamuk *Aedes aegypti*.

b. Pembuatan Simplisia

Daun kopi dicuci hingga bersih dan dikeringkan menggunakan tisuue dan dipotong kecil kecil. Selanjutnya ditimbang sebanyak 6,5 kg lalu daun kopi dikeringkan dengan cara ditutup kain hitam dan dijemur dibawah sinar matahari secara tidak langsung. Daun kopi yang telah kering lalu dihaluskan menggunakan *blender* serta diayak sehingga menjadi bentuk serbuk dan disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup (Lady Yunita Handoyo dan Pranoto, 2020)

c. Pembuatan Ekstrak air daun kopi Arabika

Pembutan ekstrak ini menggunakan pendekatan metode yang telah dilakukan oleh Yobi Kurniawan (2018)

- 1) Siapkan 5 Beaker Glass 1000 ml.
- 2) Simplisia daun kopi Arabika (*Coffea arabica*) ditimbang sebanyak 140 gram lalu dimasukkan kedalam masing masing Beaker Glass.
- 3) Kemudian direndam dengan pelarut air sebanyak 980 ml sampai serbuk terendam sempurna.
- 4) Simplisia dimaserasi selama 3 hari.
- 5) Setelah dimaserasi, kemudian disaring hingga didapatkan maserat.
- 6) Maserat yang didapat kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator selama 4 jam dengan kecepatan 60 rpm, suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak agak kental.
- 7) Ekstrak kemudian disimpan pada wadah berbahan gelas yang steril, bersih, dan kering.
- 8) Ekstrak diencerkan dengan varian konsentrasi 5%, 7,5%, 10%, 12,5% dan 15% menggunakan aquadest steril dengan rumus pengenceran :

(Manu, 2013)

$$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$$

Keterangan :

V1 = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

%1 = Konsentrasi larutan uji (100%)

V2 = Volume larutan uji yang akan dibuat dengan aquadest steril

%2 = Konsentrasi yang akan dibuat (%)

d. Penyediaan larva *Aedes aegypti*

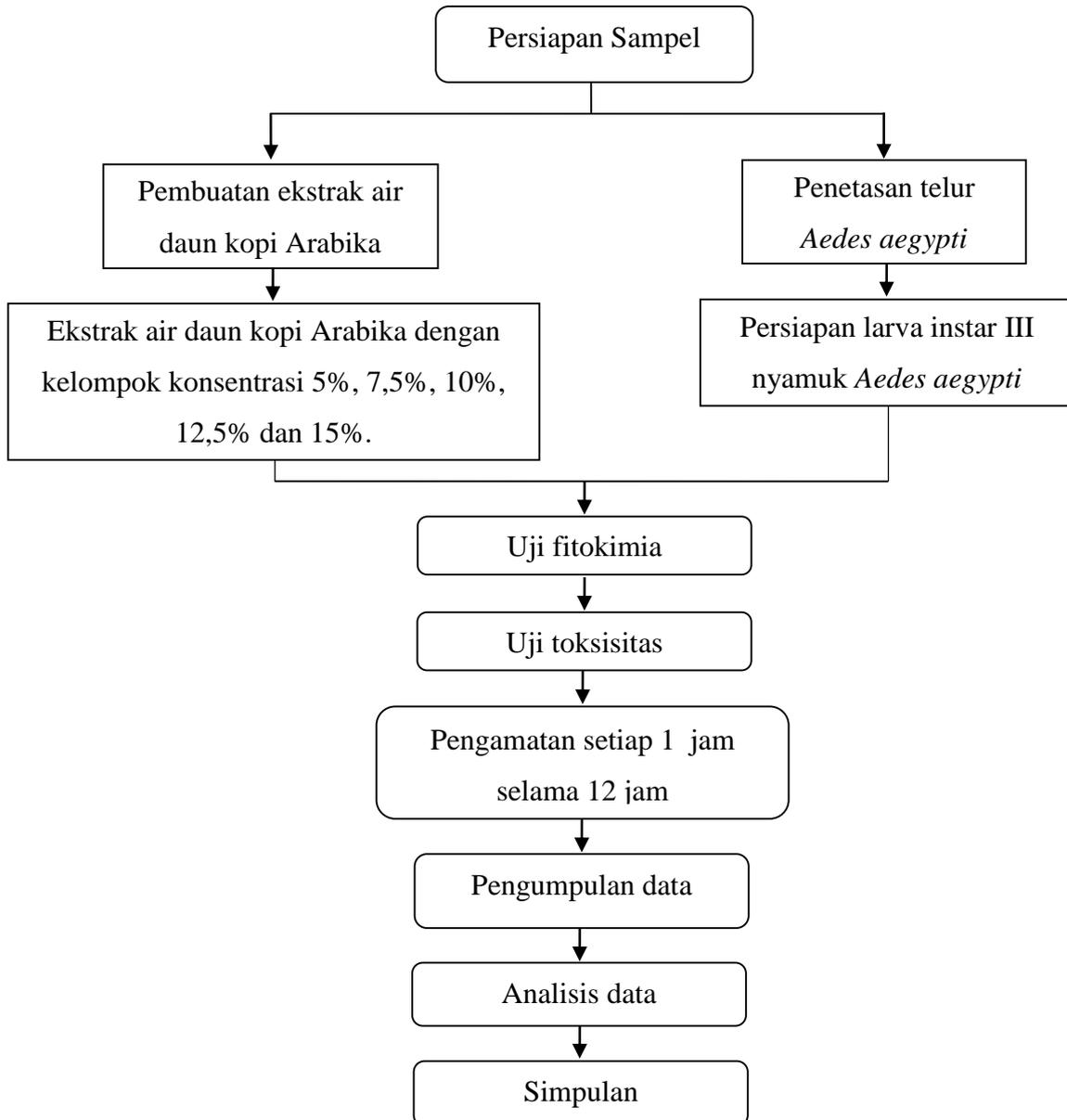
Telur nyamuk *Aedes aegypti* diperoleh dari Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Baturaja, Sumatera Selatan. Telur diletakkan dalam wadah nampan plastik yang berisi air bersih. Telur menetas menjadi larva, dan diberi pellet sebagai makanannya, dalam 2 hari menjadi larva instar 1, kemudian larva instar I berubah menjadi larva instar II setelah 3 hari, dan menjadi larva instar III setelah 2 hari.

Sebelum digunakan diperiksa kembali salah satu larva secara mikroskopis dengan cara :

- 1) Larva diletakkan di objek glass, lalu ditutup deck glass dan diperiksa di bawah mikroskop perbesaran 4 x 10.
 - 2) Ciri-ciri larva instar III nyamuk *Aedes aegypti* : duri thorax yang mulai terlihat jelas dengan warna siphon coklat kehitaman dan pergerakan sangat aktif pada media air, larva instar III siap digunakan.
- e. Uji fitokimia
- 1) Dilakukan proses ekstraksi daun kopi arabika.
 - 2) Selanjutnya uji fitokimia akan dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- f. Uji efektivitas konsentrasi dan uji waktu optimum
- 1) Menyiapkan 7 gelas plastik, masing-masing gelas plastik diisi 100ml ekstrak air daun kopi Arabika dengan konsentrasi yang berbeda-beda.
 - 2) Membuat kontrol negatif dengan mengisi satu gelas plastik menggunakan 100 ml aquades.
 - 3) Membuat kontrol positif dengan mengisi satu gelas plastik menggunakan 0,01 gram bubuk abate dalam 100 ml aquades.
 - 4) Mengambil sebanyak 25 ekor larva nyamuk *Aedes aegypti* dan dipindahkan kemasing-masing gelas plastik yang berisi ekstrak air daun kopi Arabika yang telah diencerkan pada setiap konsentrasi.
 - 5) Semua perlakuan diatas diulangi sebanyak 5 kali dengan waktu pengamatan setiap 1 jam selama 12 jam (Manu, 2013).
- g. Analisis Data
- 1) Data mortalitas larva yang diperoleh dianalisis dengan Analysis of Variances (ANOVA) untuk mencari tingkat perbedaan jumlah mortalitas larva yang bermakna dan data dianalisis dengan uji regresi untuk melihat pengaruh konsentrasi dan waktu pajanan terhadap mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti*.

- 2) Bila ada perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji BNT (Uji Nyata Terkecil), uji dilakukan dengan menggunakan aplikasi Statistical Program for Social Science (SPSS).

3. Alur Penelitian



F. Pengolahan Data dan Analisis Data

Data berupa mortalitas yang diperoleh dianalisis dengan Analysis of Variance (ANOVA) untuk mencari tingkat perbedaan jumlah mortalitas larva yang bermakna dan juga dianalisis dengan uji Regresi untuk melihat adanya pengaruh antara konsentrasi dan waktu pajanan terhadap mortalitas larva *Aedes aegypti*, bila pada uji One Way Anova terdapat perbedaan yang bermakna

maka dilanjutkan dengan uji BNT (Uji Nyata Terkecil), uji dilakukan dengan menggunakan aplikasi Statistical Program for Social Science (SPSS).

G. Ethical Clearance

Penelitian yang dilakukan atas izin komisi etik, penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dari proses penelitian ini akan dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah larutan konsentrasi ekstrak air daun kopi Arabika dari aqua gelas akan langsung dibuang ke saluran pembuangan karena tidak membahayakan lingkungan. Sedangkan limbah aqua gelas bekas di kumpulkan dan akan langsung dibuang kedalam limbah sampah bahan anorganik. Sementara, untuk sisa telur dan larva dari nyamuk *Aedes aegypti* sudah dikubur ke dalam tanah.