

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas adalah ekstrak daun kopi Robusta 5%, 6%, 7%, 8% dengan dua kontrol yaitu kontrol positif (abate konsentrasi 0,01%) dan kontrol negatif (aquades) dan variabel terikat adalah kematian larva instar III nyamuk *Aedes aegypti*. Dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan berdasarkan rumus Federer, dapat dilihat pada lampiran 1.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **1. Lokasi**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang Jurusan Teknologi Laboratorium Medis. Pembuatan ekstrak dan determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

##### **2. Waktu**

Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2024.

#### **C. Subjek Penelitian**

Subjek dari penelitian ini adalah daun kopi Robusta (*Coffe canephora* Pierre ex A. Froehner) yang dipetik langsung dari pohonnya 5-8 daun dari pangkal bawah yang memiliki ciri-ciri warna daun hijau segar dan daun harus terbebas dari hama (Marcellia, 2021), kemudian dibuat ekstrak lalu diencerkan dalam konsentrasi 5%, 6%, 7%, dan 8%. Larva Instar III *Aedes aegypti* yang digunakan adalah hasil penetasan telur yang diperoleh dari Balai Litbang Kesehatan Baturaja. Filial larva kecil hingga besar ukuran 1-150. Besar sampel pada penelitian ini adalah 25 ekor disetiap konsentrasi.

#### D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
1	Variabel bebas : a) ekstrak daun kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner) yang dipetik langsung dari pohonnya 5-8 daun dari pangkal bawah dengan keadaan daun berwarna hijau segar dan daun harus terbebas dari hama, yang diekstrak menggunakan pelarut etanol absolut dan diencerkan dengan konsentrasi 5%, 6%, 7%, dan 8%	Daun kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner) yang dipetik langsung dari pohonnya 5-8 daun dari pangkal bawah dengan keadaan daun berwarna hijau segar dan daun harus terbebas dari hama, yang diekstrak menggunakan pelarut etanol absolut dan diencerkan dengan konsentrasi 5%, 6%, 7%, dan 8%	Pengenceran	Labu ukur, batang pengaduk	Konsentrasi 5%, 6%, 7%, 8%, kontrol + (abate), kontrol – (aquades)	Rasio
	b) waktu kontak bahan aktif ekstrak daun kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner) dengan larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i> hingga nyamuk <i>Aedes aegypti</i> menimbulkan kematian dengan rentang waktu pengamatan 1 sampai 12 jam	Waktu kontak antara bahan aktif ekstrak daun kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> Pierre ex A. Froehner) dengan larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i> hingga menimbulkan kematian dengan rentang waktu pengamatan 1 sampai 12 jam	Observasi	Visual dan stopwatch	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	Rasio
2	Variabel terikat: jumlah kematian larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	Jumlah larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i> yang tidak menunjukkan pergerakan atau mati	Observasi	Visual	Jumlah (ekor)	Nominal

#### E. Teknik Pengumpulan Data

##### 1. Prosedur penelitian

- a. Pembuatan surat dan izin penelitian dari Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang. Pembuatan surat izin pemesanan telur di Balai Litbang Kesehatan Baturaja dari Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
- b. Determinasi bahan uji daun kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- c. Pembuatan simplisia dengan menyiapkan daun kopi Robusta (*Coffea*

*canephora* Pierre ex A. Froehner) kemudian daun kopi Robusta dicuci hingga bersih, lalu dijemur dibawah sinar matahari secara tidak langsung atau ditutup dengan kain hitam hingga kering. Hasil pengeringan ini disebut simplisia (Lady Yunita Handoyo dan Pranoto, 2020).

- d. Pembuatan ekstrak daun kopi Robusta di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung dengan proses pengekstraksian simplisia daun kopi Robusta dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol absolut.
- e. Uji Fitokimia  
Uji fitokimia dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung untuk mengkonfirmasi keberadaan senyawa metabolit sekunder ekstrak daun kopi robusta yang mengandung flavonoid, terpenoid, polipenol, saponin, tanin, fenolik, dan alkaloid (Kurniawan, 2018).
- f. Pembuatan konsentrasi bahan uji
  - 1) Larutan ekstrak 100% yang sudah dipanaskan lalu diencerkan menjadi konsentrasi 5%, 6%, 7%, dan 8%
  - 2) Rumus pengenceran ekstrak daun kopi Robusta yang digunakan adalah  $V_1 \times \%1 = V_2 \times \%2$ .
- g. Penyediaan sampel larva dengan melakukan penetasan telur nyamuk *Aedes aegypti* menjadi larva kemudian ditunggu hingga berkembang menjadi larva instar III.
- h. Uji pengaruh ekstrak daun kopi Robusta dengan konsentrasi 5%, 6%, 7%, dan 8%. Larva diletakkan ke dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi daun kopi Robusta. 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 daun kopi Robusta. Kontrol negatif aquadest 100 ml dan kontrol positif berupa abate 0.01% (Kurniawan, 2018).

## 2. Cara kerja

### a. Persiapan alat dan bahan

- 1) Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu ukur, beaker glass, cover glass, pipet tetes 5 ml, pipet ukur, objek glass, kertas saring, blender, stopwatch, toples kaca, *rotary evaporator*, mikroskop, gelas plastik, gelas ukur, spatula, nampan plastik, batang pengaduk, dan sendok plastik.
- 2) Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, bubuk abate, daun kopi robusta, etanol absolut, dan larva instar III nyamuk *Aedes aegypti*.

### b. Pembuatan Simplisia

Simplisia yang digunakan adalah daun kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) yang dipetik langsung dari pohonnya 5-8 daun dari pangkal bawah yang memiliki ciri-ciri warna daun hijau segar dan daun harus terbebas dari hama (Marcelia, 2021). Kemudian daun kopi Robusta dicuci dengan air mengalir hingga bersih untuk menghilangkan tanah atau pengotor lain yang melekat pada bahan simplisia. Selanjutnya ditimbang sebanyak 6 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 sebanyak 500 gram dan disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup (Lady Yunita Handoyo dan Pranoto, 2020).

### c. Pembuatan Ekstrak daun kopi Robusta

- 1) Siapkan Beaker Glass 1000 ml.
- 2) Simplisia daun kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) ditimbang sebanyak 500 gram lalu dimasukkan kedalam Beaker Glass.
- 3) Kemudian direndam dengan pelarut etanol absolut sebanyak 2000 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 menggunakan *rotary*

*evaporator* selama 4 jam dengan kecepatan 60 rpm, suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak agak kental (Manu, 2013).

- 7) Ekstrak kemudian disimpan pada wadah berbahan gelas yang steril, bersih, dan kering (Lady Yunita Handoyo dan Pranoto, 2020).
- 8) Ekstrak diencerkan dengan varian konsentrasi 5%, 6%, 7%, dan 8% 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*

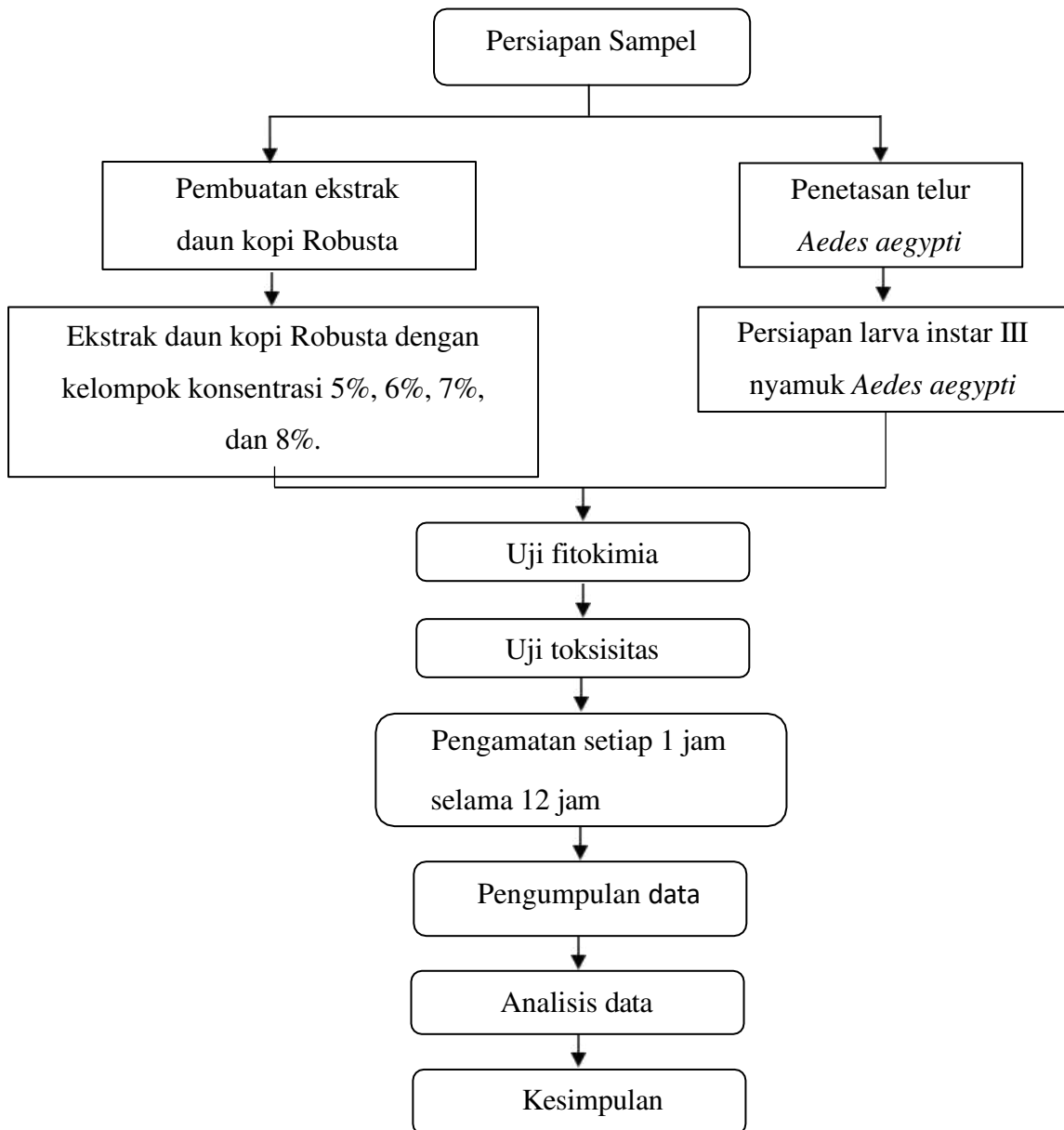
Telur nyamuk *Aedes aegypti* diperoleh dari Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Baturaja, Sumatera Selatan. Telur ditetaskan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratrium Medis Poltekkes Kemenkes TanjungKarang yang dimasukkan dalam wadah nampan plastik yang berisi air bersih. Telur menetas menjadi larva, dan diberi hati ayam sebagai makanannya, dalam 2 hari menjadi larva instar 1, kemudian larva instar I berubah menjadi larva instar II setelah 2 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 pengaruh konsentrasi dan uji waktu optimum
- 1) Menyiapkan 4 gelas plastik, masing-masing gelas plastik diisi 100 ml ekstrak daun kopi Robusta 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 ke masing-masing gelas plastik yang berisi ekstrak daun kopi Robusta yang telah diencerkan pada setiap konsentrasi.
  - 5) Semua perlakuan diatas diulangi sebanyak 4 kali dengan waktu pengamatan setiap 1 jam selama 12 jam (Manu, 2013).

### 3. Alur Penelitian



#### F. Pengolahan Data dan Analisis Data

Data kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* yang diperoleh kemudian akan dihitung untuk mencari rata-rata persentase kematian larva nyamuk pada masing-masing perlakuan konsentrasi dan pada waktu kontak dengan menggunakan rumus rata-rata :

$$\text{Kematian (\%)} : \frac{X}{N} \times 100\% \text{ (Yuniarty, 2016)}$$

kemudian data kematian akan dianalisis dengan menggunakan Analysis of Variance (ANOVA) untuk mendeteksi perbedaan nyata jumlah kematian larva dan dianalisis juga dengan uji Regresi untuk mengetahui hubungan pengaruh

konsentrasi dan waktu pemaparan terhadap kematian larva *Aedes aegypti*, apabila pada uji One Way Anova terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc* LSD, uji dilakukan dengan menggunakan aplikasi Statistical Program for Social Science (SPSS). Dan untuk menentukan konsentrasi yang paling efektif menggunakan LC<sub>90</sub> dan waktu yang paling efektif menggunakan LT<sub>90</sub> dihitung dengan menggunakan Analisa Probit.

#### G. *Ethical Clearance*

Penelitian dilakukan dengan persetujuan izin komisi etik, Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang No.376/KEPK-TJK/IV/2024, pada tanggal : 05 April 2024. Penelitian ini tidak menimbulkan bahaya apapun terhadap lingkungan, limbah yang dihasilkan dari proses penelitian ini akan dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah larutan konsentrasi ekstrak daun kopi Robusta dari aqua gelas dibuang langsung 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 nyamuk *Aedes aegypti* sudah dikubur ke dalam tanah.