

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini merupakan studi eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Variabel bebas yang diuji adalah ekstrak daun alpukat muda (*Persea americana*) dengan variasi konsentrasi sebesar 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, dan 2,5%. Sebagai kontrol positif digunakan abate, sedangkan kontrol negatif terdiri dari *aquadest*. Variabel terikat yang dianalisis dalam penelitian ini adalah angka kematian larva *Aedes aegypti*. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan sesuai dengan perhitungan rumus Federer.

#### **B. Lokasi Dan Waktu Penelitian**

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

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang Jurusan Teknologi Laboratorium Medis. Sementara itu, di Laboratorium Botani Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung dilakukan pembuatan ekstraksi daun alpukat muda.

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

Penelitian dilaksanakan pada Bulan Maret - Mei 2025.

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

Subjek penelitian ini adalah simplisia daun alpukat muda ini diperoleh dari Unit Konservasi Budidaya Biofarmaka (UKBB) Pusat Studi Biofarmaka Tropika LRI-PGK IPB. Lalu diekstraksi dan dipilih ekstrak etanol 96%, kemudian diencerkan dalam konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2% dan 2,5%.

##### **1. Kriteria Daun Alpukat**

Kriteria daun alpukat yang digunakan adalah daun pada posisi tangkai 2 sampai 4 dari pucuk yang berwarna hijau muda, segar, secara fisik terlihat baik bebas dari kotoran atau serangga, utuh dan sudah dibersihkan (Diputra et al., 2023)

## 2. Kriteria Larva Instar III Nyamuk *Aedes aegypti*

Kriteria Larva *Aedes aegypti* instar III yang digunakan adalah hasil penetasan telur yang didapat dari Balai Laboratorium Entomologi SKHB Institut Pertanian Bogor (IPB) yang berjumlah 630 ekor larva instar III yang memiliki ciri-ciri dengan ukuran 4-5 mm, terlihat duri dada dan corong pernafasannya berwarna hitam kecoklatan. Instar ini mempunyai sifon yang besar, adanya gigi sisir di segmen abdomen kedelapan terjadi pergantian kulit selama 3-4 hari.

Jumlah sampel dalam penelitian ini terdiri dari 25 ekor untuk setiap konsentrasi, dengan pengulangan sebanyak 3 kali berdasarkan rumus Federer, yaitu:

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

### Keterangan :

t = Jumlah Perlakuan

n = Jumlah Pengulangan

Diketahui: t = Kontrol (+), kontrol (-), dan ekstrak daun alpukat muda (*Persea americana*) perlakuan 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%

n = ?

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

$$(7-1)(n-1) \geq 15$$

$$(6)(n-1) \geq 15$$

$$6n \geq 15$$

$$n \geq 15/6$$

$$n \geq 2,5 \text{ (3 kali pengulangan)}$$

## D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Metode	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1.	Variabel independent : Ekstrak daun alpukat muda ( <i>Persea americana</i> )	Kriteria daun alpukat yang digunakan adalah daun yang berwarna hijau muda, segar, bebas dari kontaminasi, dan sudah dibersihkan yang diekstraksi dengan etanol kemudian diencerkan dengan	Ekstraksi	Erlenmeyer, corong pisah, corong gelas, kertas saring, dan	Persen (0,5%, 1%, 1,5%, 2% dan 2,5%)	Rasio

		konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2% dan 2,5%		botol reagen			
			Observasi	Probit	Lethal Concentration (LC50)	Rasio	
2.	Variabel dependent : Konsentrasi yang paling efektif dalam membunuh larva <i>Aedes aegypti</i>	Untuk mengetahui konsentrasi yang paling efektif dalam membunuh larva <i>Aedes aegypti</i> dengan perhitungan LC50					
3.	Variabel dependent : waktu yang paling efektif dalam membunuh larva <i>Aedes aegypti</i>	Untuk mengetahui waktu yang paling efektif dalam membunuh larva <i>Aedes aegypti</i> adalah dengan perhitungan LT50	Observasi	Probit	Lethal Time (LT50)	Rasio	
4.	Variabel dependent: Perubahan morfologi larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	Terdapat adanya perubahan morfologi seperti warna tubuh serta kerusakan pada thoraks, kepala, abdomen dan corong pernafasan.	Observasi	Makroskopis dan Mikroskopis	Ada atau tidak ada perubahan	Rasio	

## E. Teknik Pengumpulan Data

1. Prosedur Penelitian
  - a) Mengajukan surat persetujuan kepada ketua jurusan Teknologi Laboratorium Medis Program Sarjana Terapan Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang bagian Laboratorium Parasitologi, dan surat izin pembuatan ekstrak daun alpukat muda (*Persea americana*) di Laboratorium Botani FMIPA Unila dari Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
  - b) Melakukan pengujian determinasi pada daun alpukat muda (*Persea americana*). Pengujian ini bertujuan untuk memverifikasi keabsahan identitas spesies dan memastikan kesesuaian identifikasi. Dan uji ini dilakukan di unit Konservasi Budidaya Biofarmaka (UKBB) Pusat Studi Biofarmaka Tropika LRI-PGK IPB.
  - c) Proses pemesanan simplisia daun alpukat muda di unit Konservasi Budidaya Biofarmaka (UKBB) Pusat Studi Biofarmaka Tropika LRI-PGK IPB.

- d) Pembuatan ekstrak daun alpukat muda dilakukan di Laboratorium Botani FMIPA Unila, dengan memproduksi simplisia dari 500 gr daun alpukat muda melalui proses maserasi menggunakan pelarut etanol. Pembuatan konsentrasi bahan uji
1. Larutan ekstrak daun alpukat 100% yang sudah dipekatkan lalu difraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair, yaitu proses memisahkan sejumlah bahan dari sebuah benda padat ataupun cair dengan pelarut cair sebagai agen pemisah.
  2. Rumus pengenceran ekstrak etanol daun alpukat yaitu:  $VI \times \%1 = V2 \times \%2$ . (Lampiran 11)
- e) Menyediakan sampel larva melalui telur nyamuk *Aedes aegypti* yang menetas jadi larva.
- f) Uji efektivitas ekstrak etanol 96% dari daun alpukat muda terhadap larva *Aedes aegypti* pada berbagai konsentrasi. Konsentrasi yang digunakan dalam eksperimen ini meliputi 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, dan 2,5%. Larva *Aedes aegypti* ditempatkan dalam gelas plastik yang berisi ekstrak dengan konsentrasi yang berbeda. Pengumpulan data dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang mati pada setiap konsentrasi setiap 2 jam selama 12 jam. Sebagai kontrol, digunakan abate sebagai kontrol positif dan 100 ml akuades sebagai kontrol negatif.
2. Cara Kerja
    - a. Persiapan alat dan bahan
      1. Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Objek glass, beaker glass 1000 ml dan 100 ml, evaporator, kertas saring, toples kaca, gelas plastic, gelas ukur 1000 ml dan 100 ml, labu ukur, corong pisah, cawan penguap, sendok plastic, penangas air, batang pengaduk, dan mikroskop.
      2. Bahan yang diperlukan dalam penelitian adalah sebagai berikut: daun alpukat muda, abate, etanol 96%, aquadest dan larva instar III nyamuk *Aedes aegypti*.

- b. Pembuatan Ekstrak Daun Alpukat (*Persea americana*).
1. Ditimbang sebanyak 500 gr simplisia daun alpukat ke dalam botol yang berwarna gelap. Tambahkan larutan etanol 96% sebanyak 2500 ml dan biarkan campuran tersebut selama tiga hari (3 x 24 jam) untuk proses maserasi.
  2. Setelah itu, saringlah campuran tersebut untuk mendapatkan Maserat 1.
  3. Tinggalkan endapan yang dihasilkan dan rendam kembali dalam etanol 96% sebanyak 2500 ml, lalu saring dengan kertas saring untuk memperoleh Maserat 2.
  4. Selanjutnya gabungkan kedua Maserat dan konsentrat menggunakan evaporator putar yang diatur kecepatan 60 rpm dan dengan suhu 50 °C selama empat jam.
  5. Setelah selesai, simpan ekstrak dalam wadah kaca yang steril, bersih, dan kering. Kemudian dibuat ekstrak daun alpukat pekat 100% dengan rumus sebagai berikut :

$$\%b/v = \frac{\text{Massa} \times 100\%}{\text{Volume}}$$

Keterangan :

Massa : Berat yang ditimbang

Volume : Volume *aquadest*

Diketahui: Volume = *Aquadest* 80 ml

Massa = ?

$$\text{Massa} = \frac{\% \times \text{Volume}}{100}$$

$$\text{Massa} = \frac{100 \times 80}{100} = 80 \text{ gr}$$

6. Selanjutnya lakukan diencerkan dengan variasi konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, dan 2,5% sesuai dengan rumus pengenceran yang telah ditetapkan.

$$V1 \times \% 1 = V2 \times \% 2$$

Keterangan :

**V1** = Volume larutan yang akan dipipet (ml)

%1 = Konsentrasi larutan uji (100%)

V2 = Volume larutan uji yang akan dibuat dengan *aquadest* steril (ml)

%2 = Konsentrasi yang akan dibuat (%)

c. Penyediaan Larva Nyamuk *Aedes aegypti*

Telur nyamuk *Aedes aegypti* didapat dari Balai Laboratorium Entomologi SKHB Institut Pertanian Bogor (IPB). Selanjutnya proses penetasan telur dilakukan dilaboratorium parasit poltekkes kemenkes tanjung karang, dengan cara dimasukkan dalam nampak plastik yang sudah diisi dengan air bersih. Proses penetasan dan munculnya larva berlangsung selama 2 hari , yang kemudian diberi pakan berupa hati ayam yang sudah direbus dan dihaluskan. Dalam waktu 2 hari telur berkembang menjadi larva instar satu yang kemudian berkembang menjadi instar dua dalam 2 hari, dan akhirnya menjadi larva instar tiga pada hari ke 8. Sebelum digunakan, salah satu larva akan diperiksa secara mikroskopis dengan cara:

1. Larva diletakkan pada objek glass, kemudian tutup dengan deck glass, dan diperiksa di bawah mikroskop pada pembesaran 4 x 10.

Ciri-ciri berikut menggambarkan larva nyamuk *Aedes aegypti* pada stadium III: Pada tahap ini, larva berukuran kira-kira 4-5 mm, dan duri di bagian dadanya mulai terlihat. Larva memiliki saluran pernapasan hitam kecoklatan. Sifon dan gigi sisir yang lebih besar pada segmen perut kedelapan menunjukkan pergantian kulit, adalah karakteristik stadium III. Larva ini siap digunakan pada tahap ini, dan mereka dapat bertahan hidup selama tiga hingga empat hari.

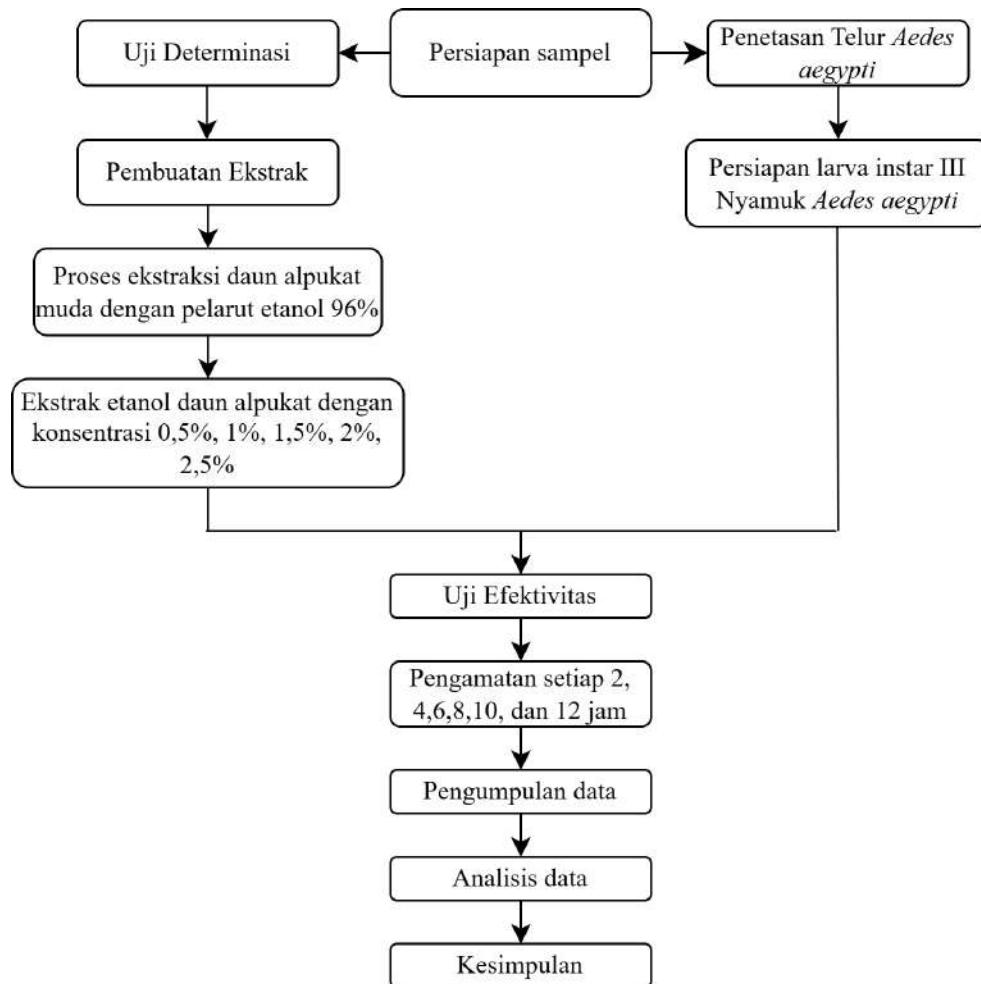
d. Uji Efektivitas

1. Siapkan 21 gelas plastik kosong yang sudah diberi label, lalu isi masing-masing dengan ekstrak etanol 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, dan 2,5% dari daun alpukat muda.
2. Gunakan 100 ml *aquadest* untuk membuat kontrol negatif.
3. Buat kontrol positif dengan mencampurkan 100 mililiter aquadest dengan 0,1 gram bubuk abate.

4. Isi setiap gelas plastik dengan larutan ekstrak etanol daun alpukat yang sudah disiapkan, lalu ambil 25 larva *Aedes aegypti* stadium III dan masukkan ke dalamnya.
  5. Lakukan pengamatan dari pukul 08.00 – 20.00 WIB dan hitung kematian yang terjadi setiap 2 jam.
- e. Pengamatan Morfologi Larva *Aedes aegypti*

Larva yang mengalami kematian dari masing-masing perlakuan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x dan 40x untuk mengetahui terdapatnya perubahan morfologi berupa perubahan warna tubuh serta kerusakan pada kepala, thoraks, abdomen, dan corong pernafasan (Andani et al, 2023).

### 3. Alur Penelitian



## F. Pengolahan Data dan Analisis Data

Setelah pengumpulan data mengenai jumlah larva *Aedes aegypti* stadium III yang telah mati, perangkat lunak digunakan untuk mengolah dan mengevaluasi data. Beberapa uji statistik digunakan dalam analisis, antara lain:

1. Jumlah kematian larva *Aedes aegypti* di antara perlakuan dianalisis menggunakan ANOVA satu arah untuk melihat apakah ada pengaruh yang signifikan antara ekstrak daun alpukat dengan kematian larva.
2. Untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan pada setiap perlakuan konsentrasi, lakukan tes *Post Hoc LSD (Least Significance Difference)*.
3. Untuk menentukan waktu dan konsentrasi yang paling efektif dari bahan uji, gunakan analisis probit. Waktu yang paling efektif dihitung menggunakan LT50 (waktu mematikan), sedangkan konsentrasi efektif diturunkan menggunakan LC50 (konsentrasi mematikan).

## G. Ethical clearance

Penelitian dilakukan setelah mendapat surat keterangan layak etik dari komisi etik dengan No.309/KEPK-TJK/V/2025 yang terbit pada tanggal 12 Mei 2025. Limbah yang dihasilkan dari penelitian ini dikumpulkan dan dibuang sesuai prosedur pengelolaan sampah yang tepat. Dengan melakukan tindakan ini, lingkungan tidak akan dirugikan oleh penelitian ini. Karena limbah dari konsentrasi daun alpukat muda dalam cawan petri uji dianggap tidak berbahaya, maka segera dibuang ke saluran pembuangan. Untuk menjamin penanganan yang aman dan bertanggung jawab secara ekologis, sisa larva nyamuk *Aedes aegypti* ditimbun dan dikubur di dalam tanah.