

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *true experimental-post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak etanol dan ekstrak air daun Zodia (*Evodia suaveolens*) sebagai insektisida terhadap nyamuk *Aedes sp.* dengan menggunakan metode semprot.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan nyamuk *Aedes sp.* yang dikembangkan di Laboratorium Parasitologi Universitas Brawijaya Malang. Nyamuk yang digunakan sebagai sampel sebanyak 25 ekor untuk setiap perlakuan (WHO CTD, 1996) selanjutnya nyamuk-nyamuk tersebut ditempatkan pada kandang nyamuk.

Pada penelitian ini menggunakan 6 perlakuan dengan konsentrasi ekstrak etanol dan ekstrak air daun Zodia (*Evodia suaveolens*) yang berbeda, 1 kontrol positif (Malathion) dan 1 kontrol negatif (Aquadess). Rumus untuk estimasi pengulangan yang dilakukan berdasarkan perhitungan rumus (Lukito, 1998):

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

$$5(n-1) \geq 16$$

$$5n - 5 \geq 16$$

$$n \geq 4,2 - 4$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Jadi, berdasarkan rumus diatas pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 4 kali. Di dalam penelitian ini digunakan 8 kandang (3 kandang ekstrak etanol daun Zodia (*Evodia suaveolens*)), 3 kandang ekstrak air daun Zodia (*Evodia suaveolens*)), 1 kandang kontrol positif, dan 1 kandang kontrol negatif) masing-masing kandang berisi 25 nyamuk (WHO CDT, 1996). Jumlah total nyamuk yang di butuhkan dalam penelitian ini adalah:

$$25 \text{ nyamuk} \times 8 \text{ kandang} \times 4 \text{ kali pengulangan} = 800 \text{ nyamuk}$$

4.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini terdiri dari:

- a. Variabel Bebas : Ekstrak etanol dan ekstrak air daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dengan berbagai macam konsentrasi.
- b. Variabel Tergantung : Jumlah nyamuk *Aedes sp.* yang mati.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan November 2015.

4.5 Bahan Uji dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

4.5.1.1 Bahan - Bahan Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Zodia (*Evodia suaveolens*)

- Daun Zodia segar
- Etanol 96%
- Kertas saring

4.5.1.2 Bahan- Bahan Pembuatan Ekstrak Air Daun Zodia (*Evodia suaveolens*)

- Daun Zodia segar
- Aquades
- Kain Penyaring

4.5.1.3 Bahan - Bahan Uji Potensi Ekstrak Etanol Daun Zodia (*Evodia suaveolens*)

- Ekstrak etanol daun Zodia (*Evodia suaveolens*)
- Nyamuk *Aedes sp.*
- Aquades
- *Malathion*

4.5.1.4 Bahan – Bahan Uji Potensi Ekstrak Air Daun Zodia (*Evodia suaveolens*)

- Ekstrak Air daun Zodia (*Evodia suaveolens*)
- Nyamuk *Aedes sp.*
- Aquades
- *Malathion*

4.5.1.5 Bahan – Bahan Pengembangbiakan Nyamuk *Aedes Sp*

- Air yang sudah lama tergenang (air jernih)
- Madu untuk nutrisi untuk pupa

4.5.2 Instrumen Penelitian

4.5.2.1 Instrumen Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Zodia (*Evodia suaveolens*)

- Neraca analitik
- Toples bertutup
- *Beaker glass*
- *Rotary evaporator*
- Corong gelas
- Gelas Ukur
- Botol
- Erlenmeyer
- *Shaker digital*
- *Water bath*

4.5.2.2 Instrumen Pembuatan Ekstrak Air Daun Zodia (*Evodia suaveolens*)

- Pisau
- Gelas Ukur
- Erlenmeyer
- Kompor
- Kain penyaring
- Neraca analitik
- Alumunium Foil

4.5.2.3 Instrumen Uji Potensi Ekstrak Etanol dan Ekstrak Air Daun zodia (*Evodia suaeveolens*)

- Sprayer
- Gelas ukur
- Kandang ukuran 25cm x 25cm x 25cm
- Spuit 3 ml/ cc
- Timer
- Lidi

4.5.2.4 Instrumen Pengembangbiakan Nyamuk *Aedes sp.*

- Wadah berbentuk kubus ukuran 40cm x 40cm x 40cm

4.6 Definisi Operasional

1. Daun Zodia diperoleh dari UPT Materia Medika Batu yang kemudian dilakukan proses ekstraksi untuk mendapatkan ekstrak daun Zodia yang diinginkan.
2. Sampel nyamuk *Aedes sp.* adalah nyamuk *Aedes sp.* baik yang jantan maupun betina yang berumur sama yang dikembangbiakkan di Laboratorium Parasitologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan telah dilakukan identifikasi sesuai morfologinya.
3. *Aedes sp.* yang mati adalah bila dilakukan sentuhan atau gangguan pada bagian abdomen atau bagian tubuh yang lainnya pada nyamuk dan tidak didapatkan pergerakan nyamuk *Aedes sp.* dewasa (WHO, 2006).
4. Potensi insektisida adalah di saat nyamuk jatuh ke dasar kandang dan tidak aktif atau tidak bergerak pada saat diberikan rangsangan sentuh yang telah diolah dengan menggunakan formula *Abbot*.
5. Lama paparan adalah waktu dimana nyamuk *Aedes sp.* terpapar dengan ekstrak etanol dan ekstrak air daun Zodia (*Evodia suaveolens*) yang dihitung pada menit 10, menit 20, menit 30, menit 40, menit 50, menit 60, dan pada 24 jam.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Zodia (*Evodia suaveolens*)

1. Timbang daun zodia segar sebanyak 490 gram
2. Lakukan pembasahan serbuk dengan pelarut etanol 96% secukupnya
3. Masukkan daun Zodia segar yang telah dibasahi dengan pelarut kedalam toples, diratakan dan sambil ditambahkan pelarut etanol 96% sampai serbuk terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat serbuk atau lebih), jadi total yang digunakan sebanyak 1.1000 mL. Tutup toples dengan rapat selama 24 jam. Dan dishaker di atas shaker digital 50.
4. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam Erlenmeyer.
5. Lakukan remaserasi pada ampas sebanyak dua kali dengan cara dimasukkan kembali ke dalam toples dan ditambahkan dengan pelarut sampai terendam (minimal 5 cm di atas permukaan serbuk). Kemudian dibiarkan semalam di atas shaker. Masing-masing remaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1.100 mL.
6. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* besar. Diperlukan waktu 4 jam untuk evaporasi.
7. Ekstrak cair yang dihasilkan kemudian dievaporasi/ diuapkan kembali di atas *water bath* selama 1 jam.

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Air Daun Zodia (*Evodia suaveolens*)

1. Daun Zodia (*Evodia suaveolens*) yang telah dicuci bersih, potong kecil - kecil.
2. Hasil potongan kecil – kecil daun Zodia (*Evodia suaveolens*) tersebut ditimbang sebanyak 100gr dengan neraca analitik, kemudian dipindahkan didalam labu Erlenmeyer yang telah diisi dengan 100ml aquades steril.
3. Labu Erlenmeyer kemudian ditutup dengan alumunium foil dan harus rapat serta menutupi seluruh bibir Erlenmryer.
4. Labu Elenmeyer selanjutnya dimasukkan ke dalam air yang mendidih 100°C selama ± 15 menit.
5. Setelah 15 menit maka labu Elenmeyer dikeluarkan dan didinginkan di udara terbuka hingga suhu mencapai kira –kira 40°C.
6. Hasil rebusan kemudian disaring dan diperas hingga yang diambil adalah air hasil rebusan dan sari – sari hasil rebusan.

4.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol dan Ekstrak Air Daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dalam Konsentrasi

Hasil dari pembuatan ekstrak etanol dan ekstrak air Daun Zodia (*Evodia suaveolens*) diatas dianggap memiliki konsentrasi 100%. Untuk mendapatkan berbagai nilai konsentrasi yang diinginkan, dilakukan pengenceran menggunakan aquades. Cara pengenceran sesuai rumus berikut :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan:

M_1 : Konsentrasi awal (100%)

M_2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan

V_1 : Volume ekstrak yang harus dilarutkan

V_2 : Volume larutan perlakuan yang besarnya 2ml

4.8 Pelaksanaan Penelitian

4.8.1 Cara Kerja Pembuatan Ekstrak Etanol Dan Ekstrak Air Daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dalam berbagai konsentasi

Pengenceran pertama kali pada larutan ekstrak daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dan ekstrak air daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dengan menggunakan aquades. Cara pembuatan dosis larutan pada perlakuan yang diinginkan dengan rumus yang tertera adalah sebagai berikut:

1. Konsentrasi 12,5% ekstrak daun Zodia (*Evodia suaveolens*) : Ekstrak etanol 100% sebanyak 0.25ml dilarutkan dengan 1.75 ml aquades sehingga didapatkan volume total sebanyak 2ml.
2. Konsentrasi 25% ekstrak daun Zodia (*Evodia suaveolens*) : Ekstrak etanol 100% sebanyak 0.5ml dilarutkan dengan 1.5 ml aquades sehingga didapatkan volume total sebanyak 2ml.
3. Konsentrasi 50% ekstrak daun Zodia (*Evodia suaveolens*) : Ekstrak etanol 100% sebanyak 1ml dilarutkan dengan 1 ml aquades sehingga didapatkan volume total sebanyak 2ml.

4. Konsentrasi 25% ekstrak air Zodia (*Evodia suaveolens*) : Ekstrak air 100% sebanyak 0.5ml dilarutkan dengan 1.5 ml aquades sehingga didapatkan volume total sebanyak 2ml.
5. Konsentrasi 50% ekstrak air Zodia (*Evodia suaveolens*) : Ekstrak air 100% sebanyak 1ml dilarutkan dengan 1ml aquades sehingga didapatkan volume total sebanyak 2ml.
6. Konsentrasi 75% ekstrak air Zodia (*Evodia suaveolens*) : Ekstrak air 100% sebanyak 1.5ml dilarutkan dengan 0.5 ml aquades sehingga didapatkan volume total sebanyak 2ml.

4.8.2 Penelitian Pendahuluan

Sebelum dilakukan penelitian yang sesungguhnya, terlebih dahulu dilakukan penelitian pendahuluan. Percobaan pendahuluan ini meliputi 10 perlakuan dan penentuan konsentrasi berdasarkan penelitian ekstrak etanol daun Zodia sebagai larvasida *Aedes sp.* oleh Juniastuti dan Kusnoto (2007) yaitu :

- Perlakuan I : Kandang yang disemprot ekstrak etanol daun Zodia 3,125%
- Perlakuan II : Kandang yang disemprot ekstrak etanol daun Zodia 6,25%
- Perlakuan III : Kandang yang disemprot ekstrak etanol daun Zodia 12,5%
- Perlakuan IV : Kandang yang disemprot ekstrak etanol daun Zodia 25%
- Perlakuan V : Kandang yang disemprot ekstrak etanol daun Zodia 50%
- Perlakuan VI : Kandang yang disemprot ekstrak air daun Zodia 3,125%

- Perlakuan VII : Kandang yang disemprot ekstrak air daun Zodia 6,25%
- Perlakuan VIII : Kandang yang disemprot ekstrak air daun Zodia 12,5%
- Perlakuan IX : Kandang yang disemprot ekstrak air daun Zodia 25%
- Perlakuan X : Kandang yang disemprot ekstrak air daun Zodia 50%

Setelah melakukan percobaan pendahuluan mendapatkan hasil konsentrasi 12,5%,25%, dan 50% untuk ekstrak etanol dan konsentrasi ekstrak air 25% dan 50% dengan pengaruh waktu menit 10, menit 20, menit 30, menit 40, menit 50, menit 60, dan 24 jam

4.8.3 Uji Ekstrak Etanol Dan Ekstrak Air Daun Zodia (*Evodia suaveolens*) sebagai Insektida Nyamuk *Aedes sp.*

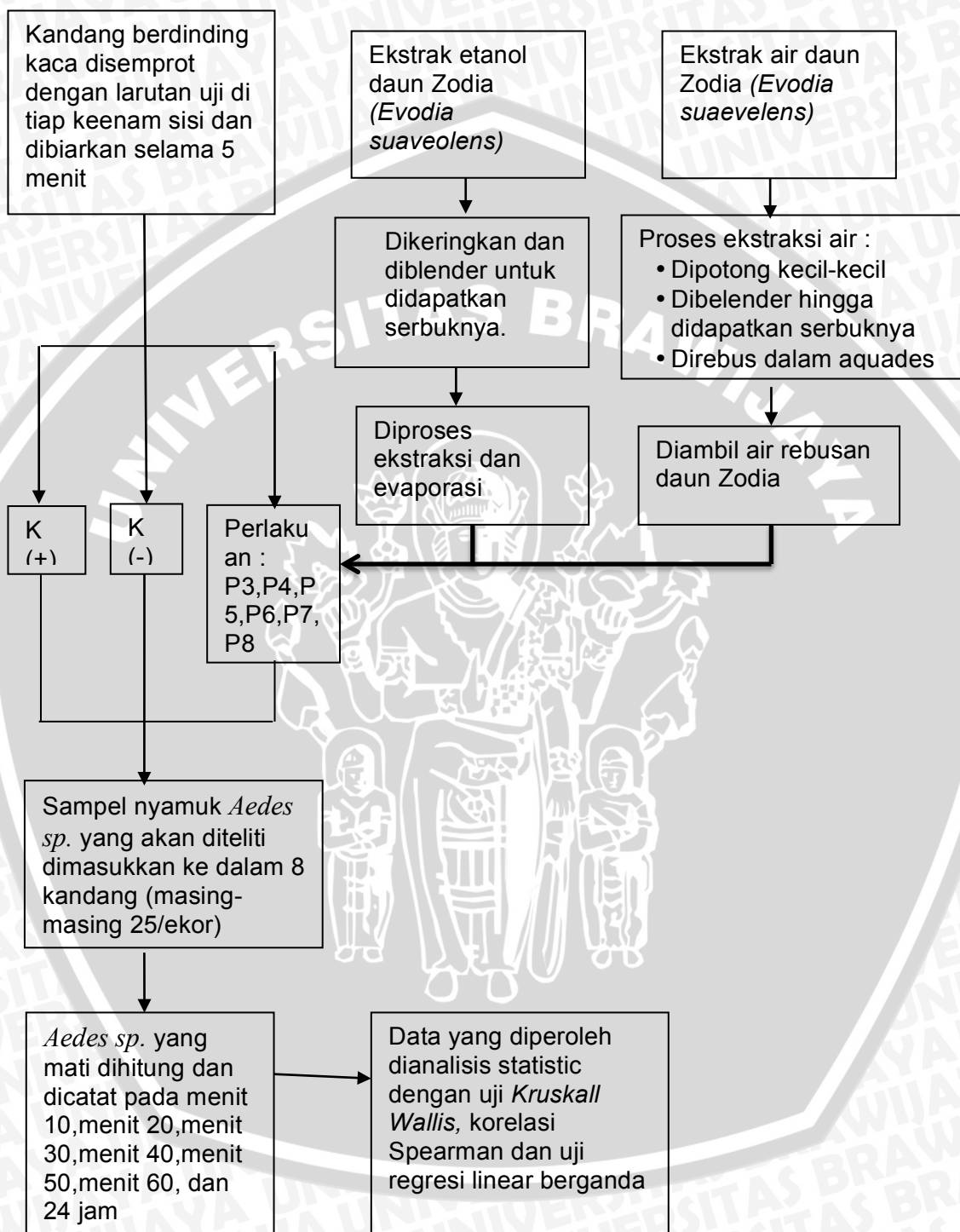
1. Percobaan dilakukan dengan menggunakan 8 buah kandang berdinding kaca dan berbentuk kubus berukuran 25 cm x 25 cm x 25 cm dan diletakkan di dalam ruang dengan suhu kamar sekitar 27°C dan tingkat kelembapan antara 60-70%.
2. Ekstrak etanol daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dengan dosis 12,5%,25%,dan 50% dipersiapkan dan dimasukkan ke dalam *sprayer*.
3. Ekstrak etanol air Zodia (*Evodia suaveolens*) dengan dosis 25%,50%, dan 75% dipersiapkan dan dimasukkan ke dalam *sprayer*
4. Ekstrak etanol dan ekstrak air daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dengan konsentrasi yang telah ditetapkan di semprotkan ke masing-masing kandang pada keenam sisi dinding kaca sampai habis. Setiap kandang akan disemprot dengan:

- a) Kandang 1 disemprot dengan menggunakan larutan akuades sebanyak 2ml sebagai kontrol negatif.
 - b) Kandang 2 disemprot dengan menggunakan malathion 0,28 % sebanyak 2ml sebagai kontrol positif.
 - c) Kandang 3 disemprot dengan menggunakan ekstrak etanol daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dengan dosis 12,5% sebanyak 2ml.
 - d) Kandang 4 disemprot dengan menggunakan ekstrak etanol daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dengan dosis 25% sebanyak 2ml..
 - e) Kandang 5 disemprot dengan menggunakan ekstrak etanol daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dengan dosis 50% sebanyak 2ml.
 - f) Kandang 6 disemprot dengan menggunakan ekstrak air daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dengan dosis 25% sebanyak 2ml.
 - g) Kandang 7 disemprot dengan menggunakan ekstrak air daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dengan dosis 50% sebanyak 2ml.
 - h) Kandang 8 disemprot dengan menggunakan ekstrak air daun Zodia (*Evodia suaveolens*) dengan dosis 75% sebanyak 2ml.
5. Setelah disemprot biarkan kandang selama 5 menit sehingga larutan yang disemprot merata pada seluruh kandang.
 6. Siapkan nutrisi untuk nyamuk *Aedes aegypti* sp. berupa air gula yang diletakkan di kapas dan plastik, kemudian dimasukkan kedalam kandang setelah kandang disemprot.
 7. Setelah 5 menit, masukan nyamuk *Aedes aegypti* sp. sebanyak 25 ekor kedalam masing-masing kandang yang akan dieliti

8. Jumlah nyamuk yang mati pada setiap perlakuan dihitung setelah penyemrotan, yaitu pada menit 10, menit 20, menit 30, menit 40, menit 50, menit 60, dan 24 jam setelah penyimpanan di laboratorium
9. Tes ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali untuk setiap perlakuan
10. Data jumlah nyamuk uji yang mati pada berbagai konsentrasi dan berbagai interval waktu pengamatan dianalisis untuk mengetahui besarnya potensi insektisida pada setiap konsentrasi yang berupa persentase kematian nyamuk uji setelah dikoreksi dan dihitung menurut formula Abbot (Abbot, 1925).



4.8.4 Diagram Alur Kerja



Keterangan :

P3 = Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Zodia 12,5 %

P4= Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Zodia 25 %

P5= Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Zodia 50 %

P6= Konsentrasi Ekstrak Air Daun Zodia 25 %

P7= Konsentrasi Ekstrak Air Daun Zodia 50 %

P8= Konsentrasi Ekstrak Air Daun Zodia 75 %

4.9 Pengumpulan Data

Data hasil yang telah diperoleh dan penelitian dimasukkan kedalam label dan diklasifikasikan menurut jumlah nyamuk yang mati, pengulangan, dan konsentrasi. Dari tabel tersebut, hasilnya akan dianalisis dan dimasukkan dalam perhitungan statistik.

4.10 Pengolahan dan Analisis Data

Pengolahan dan analisa data yang dilakukan merupakan hasil perhitungan jumlah nyamuk *Aedes sp.* yang mati untuk tiap konsentrasi larutan uji ekstrak etanol dan ekstrak air daun Zodia (*Evodia suaveolens*) setelah pengamatan pada menit 10, menit 20, menit 30, menit 40, menit 50, menit 60, dan 24 jam.

Analisa data dilakukan dengan uji *Kruskal Wallis*, Korelasi *Pearson* dan Regresi Linier Berganda.