

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 perbedaan efek knock down ekstrak etanol daun Zodia (*Evodia sauveolens*) dengan dekok daun Zodia (*Evodia sauveolens*) terhadap nyamuk *Culex sp.* dengan menggunakan metode semprot.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

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

Pada penelitian ini menggunakan 6 perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun Zodia (*Evodia sauveolens*) dan dekok daun Zodia (*Evodia sauveolens*) 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 sauveolens*), 3 kandang dekok daun Zodia, 1 kandang kontrol positif, dan 1 kandang kontrol negative) 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:

- Variabel Bebas : Ekstrak etanol dan dekok daun Zodia dengan berbagai macam konsentrasi.
- Variabel Tergantung : Jumlah nyamuk *Culex sp.* yang lumpuh.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Januari 2016.

4.5 Bahan Uji dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

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

- Daun Zodia segar
- Etanol 96%
- Kertas saring

4.5.1.2 Bahan-Bahan Pembuatan Dekok Daun Zodia (*Evodia sauveolens*)

- Daun Zodia segar
- Aquades

4.5.1.3 Bahan – Bahan Uji Potensi Ekstrak Etanol Daun Zodia (*Evodia sauveolens*)

- Ekstrak etanol daun Zodia (*Evodia sauveolens*)
- Nyamuk *Culex Sp.*
- Aquades
- Malathion

4.5.1.4 Bahan – Bahan Uji Potensi Dekok Daun Zodia (*Evodia sauveolens*)

- Dekok daun Zodia (*Evodia sauveolens*)
- Nyamuk *Culex sp.*
- Aquades

- Malathion

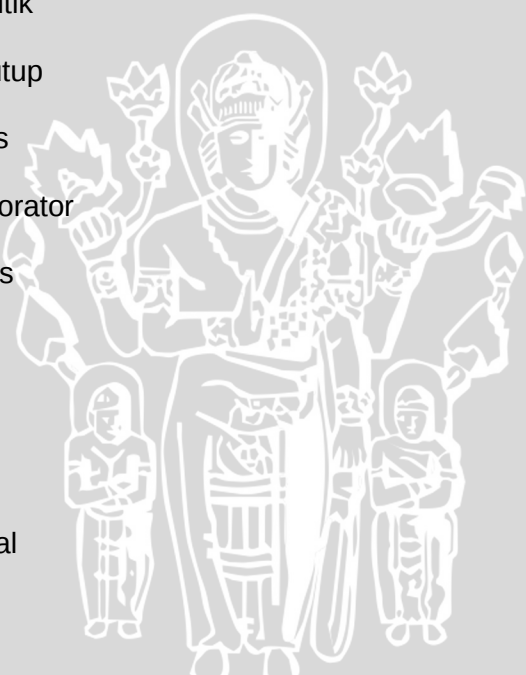
4.5.1.5 Bahan – Bahan Pengembangbiakan Nyamuk *Culex sp.*

- 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 sauveolens*)

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



4.5.2.2 Instrumen Pembuatan Dekok Daun Zodia (*Evodia sauveolens*)

- Pisau
- Gelas Ukur
- Erlenmeyer
- Kompor
- Kain penyaring

- Neraca analitik
- Aluminium Foil

4.5.2.3 Instrumen Uji Potensi Ekstrak Etanol dan Dekok Daun Zodia (*Evodia saueveolens*)

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

4.5.2.4 Instrumen Pengembang biakan Nyamuk *Culex Sp*

- Wadah berbentuk kubus ukuran 20cm x 15cm x 10cm

4.6 Definisi Operasional

1. Daun Zodia diperoleh dari Pasar Bunga Splendid Malang yang kemudian dilakukan proses ekstraksi untuk mendapatkan ekstrak daun Zodia yang diinginkan.
2. Sampel nyamuk *Culex sp.* adalah nyamuk *Culex sp.* baik yang jantan maupun betina yang berukuran sama besar yang dikembangbiakkan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan telah dilakukan identifikasi sesuai morfologinya.
3. Efek knock down adalah prosentase 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*.

4. Lama paparan adalah waktu dimana nyamuk *Culex sp.* terpapar dengan ekstrak etanol dan dekok daun Zodia (*Evodia sauveolens*) yang dihitung pada menit 10, menit 20, menit 30, menit 40, menit 50, menit 60.

4.7 Prosedur Penelitian

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

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 Dekok Daun Zodia (*Evodia sauveolens*)

1. Daun Zodia (*Evodia sauveolens*) yang telah dicuci bersih, potong kecil - kecil
2. Hasil potongan kecil – kecil daun Zodia (*Evodia sauveolens*) 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 Erlenmeyer.
4. Labu Erlenmeyer 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 Dekok Daun Zodia (*Evodia sauveolens*) dalam Konsentrasi

Hasil dari pembuatan ekstrak etanol dan dekok Daun Zodia (*Evodia sauveolens*) 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 Dekok Daun Zodia (*Evodia sauveolens*) dalam berbagai konsentasi

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

1. Konsentrasi 30% ekstrak daun Zodia (*Evodia sauveolens*) : Ekstrak etanol 100% sebanyak 0.6ml dilarutkan dengan 1.4 ml aquades sehingga didapatkan volume total sebanyak 2ml.
2. Konsentrasi 40% ekstrak daun Zodia (*Evodia sauveolens*) : Ekstrak etanol 100% sebanyak 0.8ml dilarutkan dengan 1.2 ml aquades sehingga didapatkan volume total sebanyak 2ml.
3. Konsentrasi 50% ekstrak daun Zodia (*Evodia sauveolens*) : Ekstrak etanol 100% sebanyak 1ml dilarutkan dengan 1 ml aquades sehingga didapatkan volume total sebanyak 2ml.

4. Konsentrasi 30% dekok Zodia (*Evodia sauveolens*) : Ekstrak air 100% sebanyak 0.6ml dilarutkan dengan 1.4 ml aquades sehingga didapatkan volume total sebanyak 2ml.
5. Konsentrasi 40% dekok Zodia (*Evodia sauveolens*) : Ekstrak air 100% sebanyak 0,8ml dilarutkan dengan 1ml aquades sehingga didapatkan volume total sebanyak 1,2ml.
6. Konsentrasi 50% dekok Zodia (*Evodia sauveolens*) : dekok 100% sebanyak 1ml dilarutkan dengan 1 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 bersifat *trial and error* (coba-coba) yaitu :

- Perlakuan I : Kandang yang disemprot ekstrak etanol daun Zodia 10%
- Perlakuan II : Kandang yang disemprot ekstrak etanol daun Zodia 20%
- Perlakuan III : Kandang yang disemprot ekstrak etanol daun Zodia 30%
- Perlakuan IV : Kandang yang disemprot ekstrak etanol daun Zodia 40%
- Perlakuan V : Kandang yang disemprot ekstrak etanol daun Zodia 50%
- Perlakuan VI : Kandang yang disemprot dekok daun Zodia 10%
- Perlakuan VII : Kandang yang disemprot dekok daun Zodia 20%

- Perlakuan VIII : Kandang yang disemprot dekok daun Zodia 30%
- Perlakuan IX : Kandang yang disemprot dekok daun Zodia 40%
- Perlakuan X : Kandang yang disemprot dekok daun Zodia 50%

Setelah melakukan percobaan pendahuluan mendapatkan hasil konsentrasi 30%, 40%, dan 50% untuk ekstrak etanol dan konsentrasi dekok 30%, 40% dan 50% dengan pengaruh waktu menit 10, menit 20, menit 30, menit 40, menit 50, menit 60.

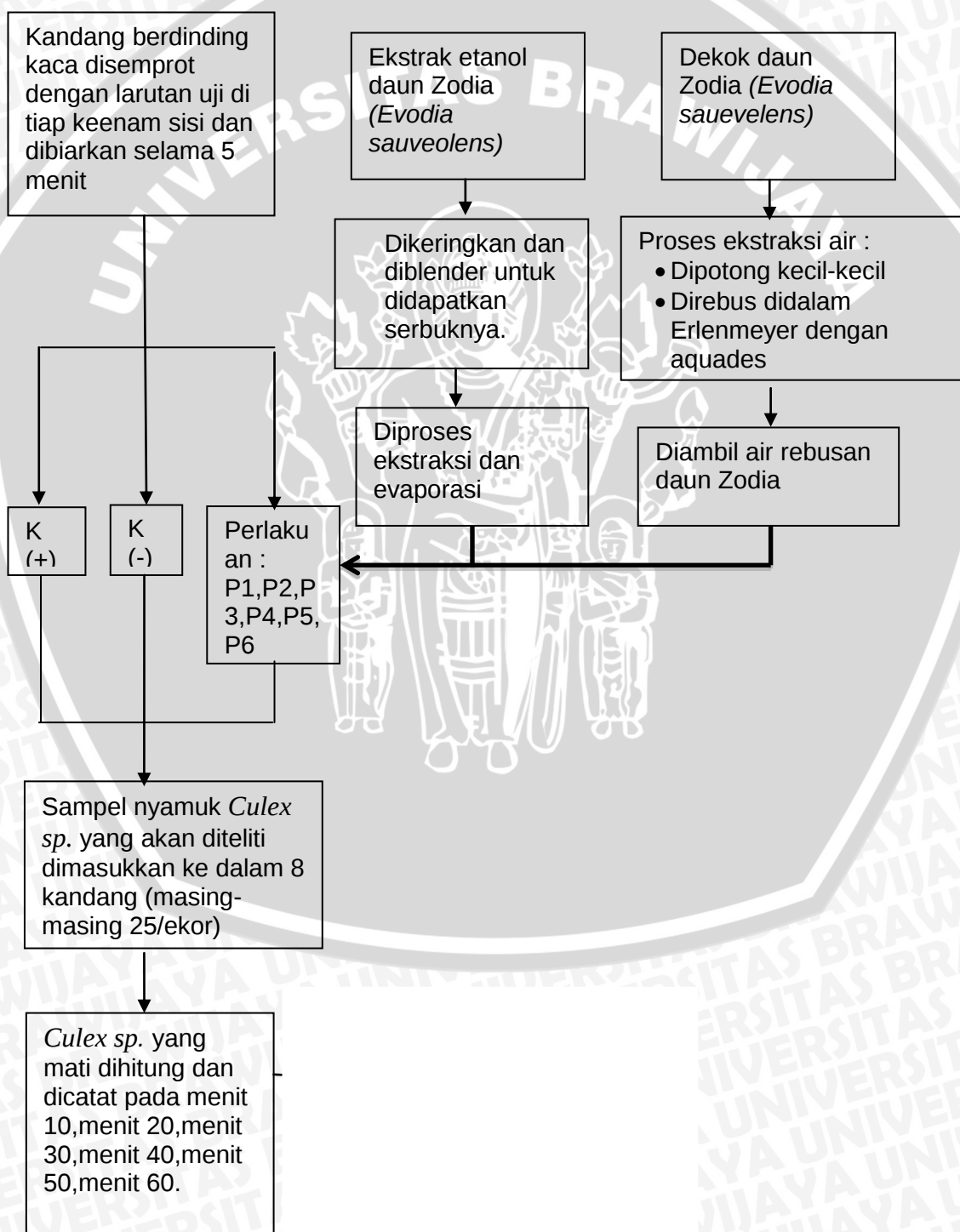
4.8.3 Uji Beda Potensi Efek Knock Down Ekstrak Etanol Dan Dekok Daun Zodia (*Evodia sauveolens*) Terhadap Nyamuk *Culex sp.*

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 sauveolens*) dengan dosis 30%, 40%, dan 50% dipersiapkan dan dimasukkan ke dalam *sprayer*.
3. Dekok daun Zodia (*Evodia sauveolens*) dengan dosis 30%, 40%, dan 50% dipersiapkan dan dimasukkan ke dalam *sprayer*
4. Ekstrak etanol dan dekok daun Zodia (*Evodia sauveolens*) 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 aquades 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 sauveolens*) dengan dosis 30% sebanyak 2ml.
 - d) Kandang 4 disemprot dengan menggunakan ekstrak etanol daun Zodia (*Evodia sauveolens*) dengan dosis 40% sebanyak 2ml..
 - e) Kandang 5 disemprot dengan menggunakan ekstrak etanol daun Zodia (*Evodia sauveolens*) dengan dosis 50% sebanyak 2ml.
 - f) Kandang 6 disemprot dengan menggunakan dekok daun Zodia (*Evodia sauveolens*) dengan dosis 30% sebanyak 2ml.
 - g) Kandang 7 disemprot dengan menggunakan dekok daun Zodia (*Evodia sauveolens*) dengan dosis 40% sebanyak 2ml.
 - h) Kandang 8 disemprot dengan menggunakan dekok daun Zodia (*Evodia sauveolens*) dengan dosis 50% sebanyak 2ml.
5. Setelah disemprot biarkan kandang selama 5 menit sehingga larutan yang disemprot merata pada seluruh kandang.
 6. Setelah 5 menit, masukan nyamuk *Culex sp.* sebanyak 25 ekor kedalam masing-masing kandang yang akan diteilti
 7. Jumlah nyamuk yang lumpuh pada setiap perlakuan dihitung setelah penyemprotan, yaitu pada menit 10, menit 20, menit 30, menit 40, menit 50, menit 60 menit setelah penyimpanan di laboratorium
 8. Tes ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali untuk setiap perlakuan
 9. Data jumlah nyamuk uji yang lumpuh pada berbagai konsentrasi dan berbagai interval waktu pengamatan dianalisis untuk mengetahui

besarnya perbedaan potensi efek knock down pada setiap konsentrasi yang berupa persentase kelumpuhan nyamuk uji setelah dikoreksi dan dihitung menurut formula *Abbot*.

4.8.4 Diagram Alur Kerja



4.9 Pengumpulan Data

Data hasil yang telah diperoleh dari penelitian dimasukkan kedalam label dan diklasifikasikan menurut jumlah nyamuk yang lumpuh, 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 *Culex sp.* yang lumpuh untuk tiap konsentrasi larutan uji ekstrak etanol dan dekok daun Zodia (*Evodia sauveolens*) setelah pengamatan pada menit 10, menit 20, menit 30, menit 40, menit 50, menit 60.

Data-data yang telah dikelompokkan dan ditabulasi kemudian dilakukan analisis statistik dengan menggunakan fasilitas SPSS (*Scientific Package for the Social Science*) 22 untuk Windows dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p = 0,05$) atau taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Pengolahan dan analisis data dibuat berdasarkan perhitungan jumlah nyamuk yang lumpuh untuk tiap-tiap konsentrasi larutan uji ekstrak etanol daun Zodia dan dekok daun Zodia dihitung menggunakan rumus *Abbot*.

Langkah-langkah pengujian data hasil penelitian ini antara lain:

1. Uji normalitas data dengan menguji *One-Sample Kolmogorof-Smirnov*.
2. Uji homogenitas data dengan menggunakan uji homogenitas Levene.
3. Analisis data dilakukan dengan uji *One-Way Anova*. Syarat-syarat analisis ANOVA : (1) kelompok lebih dan tiga kelompok, (2) distribusi skor setiap perlakuan adalah normal dan (3) varian tiap perlakuan adalah homogen.
4. Jika data tidak berdistribusi normal dan/atau varians data tidak homogen, maka dilanjutkan untuk mentransformasikan data.
5. Jika data tetap tidak berdistribusi normal dan/atau varians data tidak homogen, maka dilanjutkan dengan metode statistik non parametrik *Kruskal Wallis*
6. Uji *Kruskal Wallis* untuk menegetahui apakah ada perbedaan antara kelompok perlakuan.
7. Analisis *Post Hoc* untuk *Kruskal Wallis* adalah uji *Mann-Whitney*, ini untuk mengetahui perlakuan mana yang memiliki perbedaan signifikansi yang tinggi pada setiap kelompok perlakuan.
8. Analisis Uji korelasi menggunakan *Pearson* jika data berdistribusi normal, namun menggunakan *Spearman* jika data tidak berdistribusi normal.
9. Uji korelasi *Spearman* digunakan untuk mengetahui apakah hubungan antara dosis dengan jumlah nyamuk uji yang lumpuh memiliki hubungan atau korelasi yang nyata.
10. Uji Regresi Linier Berganda dilakukan untuk mencari pada dosis mana dan pada menit berapa efek knock down ekstrak etnaol dan dekok daun zodia (*Evodia sauveolens*) berpontensi secara maksimal terhadap nyamuk *Culex sp.*