

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris menggunakan rancangan *true experimental-post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan efek ekstrak etanol kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) dengan dekok kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) sebagai insektisida terhadap Nyamuk *Aedes* menggunakan metode semprot.

### 4.2 Lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Proses ekstraksi dan evaporasi kulit kayu dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya. Penelitian dilakukan selama dua bulan pada bulan Desember sampai dengan Januari 2016.

### 4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

#### 4.3.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah nyamuk *Aedes* sp. dewasa yang dikembang biakan di Laboratorium Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.3.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan nyamuk *Aedes* sp. yang memenuhi kriteria inklusi maupun kriteria eksklusif. Kriteria inklusi yaitu semua nyamuk *aedes aegypti* yang hidup dan aktif bergerak. Sedangkan kriteria eksklusif yaitu nyamuk yang belum dewasa.

Pada penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dengan konsentrasi ekstrak kulit kayu durian dan dekok kulit kayu durian yang berbeda, 1 kontrol positif (malathion 0,28 %), dan 1 kontrol negatif (aquades). Rumus untuk estimasi pengulangan yang dilakukan berdasarkan perhitungan rumus (Lukito, 1998):

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

$$8(n-1) \geq 16$$

$$8n - 8 \geq 16$$

$$n \geq 3$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Jadi, berdasarkan rumus diatas pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 3 kali. Di dalam penelitian ini digunakan 8 kandang (3 kandang ekstrak kulit kayu durian, 3 kandang dekok kulit kayu durian, 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:

$$25 \text{ nyamuk} \times 8 \text{ kandang} \times 3 \text{ kali pengulangan} = 800 \text{ nyamuk}$$

#### 4.4. Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel *independent* (variabel bebas) yaitu konsentrsi ekstrak etanol kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) dan dekok kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr).

##### 4.4.2 Variabel Tergantung (*Dependent*)

Variabel tergantung penelitian ini adalah jumah nyamuk *Aedes aegypti* sp. yang mati.

#### 4.5 Alat dan Bahan Uji Potensi Ekstrak Kulit Kayu Durian

##### 4.5.1 Alat-Alat Penelitian

1. Alat untuk mendapatkan ekstrak kulit durian

Alat untuk mendapatkan ekstrak kulit durian adalah alat penggerus/*blender*, tabung untuk merendam serbuk kulit kayu durian yang sudah digerus, satu set alat evaporasi, selang plastik, *waterbath*,

*water pump*, bak penampung akuades, botol penampung hasil ekstraksi, klem statis, oven, timbangan analitik, serta *freezer*/lemari es.

2. Alat untuk uji potensi insektisida ekstrak kulit kayu durian  
Alat penyemprot sebanyak 10 (lima) buah, kandang larva, lidi, spuit, *stop watch*, dan gelas ukur.
3. Alat untuk persiapan dan perlakuan Nyamuk *Aedes aegypti*.  
Kandang berukuran 25cm x 25cm x 25cm sebanyak 10 buah dan lidi.

#### 4.5.2 Bahan Penelitian

1. Bahan pembuatan ekstrak etanol kulit kayu durian  
Kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr), akuades, pelarut ekstrak (*Etanol* 96%), dan kertas saring.
2. Bahan uji potensi insektisida kulit kayu durian  
Ekstrak etanol dan dekok kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr.), *Aquades*, 25 ekor *Aedes aegypti sp* untuk setiap perlakuan, cairan Malathion 0,28%.

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Nyamuk *Aedes sp* diperoleh dengan cara dikembang biakan di Laboratorium Parasitologi Universitas Brawijaya.
2. Kulit Kayu Durian  
Adalah Kulit batang buah durian yang diperoleh dengan cara diambil kulit batang kayu sekitar 5cm dengan menggunakan pisau atau celurit.
3. Ekstrak Kulit Kayu Durian  
Adalah Ekstrak serbuk kering kulit kayu durian direndam dalam pelarut etanol 96% dan dilakukan evaporasi (dihilangkan pelarut etanolnya).
4. Dekok Kulit Kayu Durian  
Adalah ekstrak air yang diperoleh dari air rebusan kulit kayu durian.
5. Potensi Insektisida  
Adalah Kernampuan ekstrak etanol kulit kayu durian membunuh Nyamuk *Aedes aegypti sp*. dihitung berdasarkan rumus potensi insektisida Abbott:

$$A_1 = \frac{A - B}{100 - B} \times 100\%$$

(Pavela, 2007)

6. Uji Potensi  
Adalah Kemampuan ekstrak etanol kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) dan ekstrak air dekok kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) mematikan Nyamuk *Aedes aegypti sp.* dalam waktu 24 jam.
7. Kontrol Positif  
Adalah bahan pembanding yang telah terbukti memiliki potensi insektisida. Kontrol positif menurut WHO adalah larutan Malathion 028% (WHO, 2006)
8. Kontrol Negatif  
Adalah larutan yang tidak memberikan pengaruh pada hasil penelitian. Pada penelitian ini digunakan kontrol negative akuades (WHO, 2006).
9. Nyamuk mati  
Adalah nyamuk *Aedes aegypti sp.* yang distimulasi dengan ujung lidi, tidak menunjukkan respon sama sekali.
10. *Lethal concentration*  
LC 50 dan LC 100 didapatkan dari hasil uji Regresi Linier Berganda.

#### 4.7 Cara Kerja Penelitian

##### 4.7.1 Ekstraksi dan Evaporasi Ekstrak Kulit Kayu Durian

Bahan uji yang digunakan dalam peneitilan ini adalah kulit kayu durian yang didapatkan dari daerah Kasembon, Kabupaten Malang. Ekstraksi menggunakan etanol sebagai pelarut dikarenakan lebih selektif, bakteri sukar tumbuh dalam etanol diatas 20%, tidak beracun, netral serta berapsorbsi baik. Etanol dapat melarutkan alkaloid biasa, dapat menguapkan minyak, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakinson, steroid, flavonoid, tanin dan saponin (Widyawati, 2008).

Persiapan penetian meliputi proses ekstraksi kulit kayu durian untuk mengambil bahan aktifnya dan kemudian hasilnya akan digunakan dalam proses penielitian selanjutnya, yaitu uji efek ekstrak etanol kulit kayu durian sebagai insektisida. Proses ekstraksi kulit kayu durian dilakukan

berdasarkan tatacara pelaksanaan ekstraksi "*Technique of Simple Extraction*" yang terdapat dalam buku eksperimen kimia organik "*An introduction to Modern Experimental Organic chemistry*" dengan etanol 96% sebagai pelarutnya.

#### 4.7.1.1 Proses Pengeringan

Dalam proses ekstraksi, kulit kayu durian dengan berat kering 1.5 kg dicuci pada air bersih yang mengalir. Setelah dicuci kulit kayu durian diiris tipis dan dikeringkan dengan sinar matahari kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu oven 60-80° C agar kulit kayu tersebut menjadi kering sempurna (bebas kandungan air)

#### 4.7.1.2 Proses Ekstraksi

Setelah kering kulit kayu durian tersebut dihaluskan dengan blender sehingga didapatkan serbuk dan ditimbang hasilnya. Serbuk kulit kayu durian dengan berat kering 500 g dimasukkan ke dalam beker gelas dan di tuangkan pelarut dengan perbandingan (1: 3) 1 kg bahan dalam 3 liter pelarut. Rendam bahan dan diamkan pada suhu kamar selama minimal 2 x 24 jam dengan sesekali diaduk (proses ekstrak dapat dipercepat dengan ultrasonic). Setelah 2 x 24 jam. saring bahan dengan menggunakan kertas saring *whatman* nomor 40 dan pelarut yang diperoleh (yang mengandung bahan aktif) di evaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut.

#### 4.7.1.3 Proses Evaporasi

Proses evaporasi bertujuan untuk memisahkan hasil ekstrak yang telah didapat dengan pelarut etanol. Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja percobaan. Hasil rendaman etanol yang berupa larutan dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi. Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah evaporator, pendingin spiral dihubungkan pada bagian atas evaporator, pendingin spiral dihubungkan dengan vakum dengan selang plastic, pendingin spiral dihubungkan dengan *wafer pump* melalui selang plastik *water pump* ditempatkan dalam bak yang berisi akuades, *water pump*

dihubungkan dengan sumber listrik sehingga akuades akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan rata). Satu set evaporasi diletakkan, sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam akuades pada *water bath*. Vakum dan *water bath* duhubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhu pada *water bath* sekitar 70° C (sesuai dengan titik didih etanol).

Sirkulasi dibiarkan berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama kurang lebih 2-3 jam. Setelah itu, hasil evaporasi dipanaskan dalam oven dengan suhu 50-60° C selama 1-2 hari, untuk menguapkan pelarut yang tersisa, sehingga didapatkan hasil akhir ekstraksi kulit kayu durian 100%. Hasil akhir yang berupa pasta kemudian ditimbang dengan neraca analitik dan disimpan dilemari es untuk memperlambat kerusakan (Widyawati, 2008).

#### **4.7.2 Alat, Bahan, dan Cara Pembuatan Dekok Kulit Kayu Durian**

##### **4.7.2.1 Peralatan Pembuatan Kulit kayu Durian**

Alat – alat untuk mengambil bahan alami kulit kayu durian (dengan cara dekok) adalah:

Pisau, oven, gelas ukur, labu elenmeyer, kompor pemanas, kain penyaring, neraca analitik, kapas

##### **4.7.2.2 Bahan Uji Dekok kulit Kayu Durian**

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 3 kelompok:

1. Bahan – bahan yang digunakan untuk pengambilan bahan alami kulit kayu durian yaitu, Kulit kayu durian dan aquades
2. Bahan untuk persiapan nyamuk dewasa *Aedes aegypti sp.* ialah, larutan glukosa 10 %
3. Bahan untuk uji potensi insektisida dekok kulit kayu durian terhadap nyamuk *Aedes aegypti sp.* :

Larutan dekok kulit kayu durian dengan konsentrasi 15%, 30%, dan 45% sebanyak 5ml, nyamuk dewasa *Aedes aegypti sp.*, aquades steril, air gula (Gukosa 10%), larutan melathoin 0,28%

#### 4.7.2.3 Cara Pembuatan Dekok Kulit Kayu Durian

- Kulit kayu durian yang telah dicuci bersih, potong kecil – kecil (Rajang halus) kemudian dikeringkan selama kurang lebih 1 minggu hingga kering ( hindari dari sinar matahari), apabila tidak memungkinkan bisa dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu tertentu ( 30 – 40 °C).
- Kulit kayu durian yang telah siap pakai diblender, sehingga didapatkan gerusan kulit kayu durian.
- Hasil gerusan tersebut ditimbang sebanyak 50gr dengan neraca analitik, kemudian dipindahkan didalam labu Erlenmeyer yang telah diisi dengan 100ml aquades steril.
- Labu Erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas.
- Selanjutnya memasukkan ke dalam air yang mendidih 100°C selama  $\pm$  15 menit.
- Setelah 15 menit maka labu Elenmeyer dikeluarkan dan didinginkan di udara terbuka hingga suhu mencapai kira – kira 40°C.
- Hasil dekok kemudian disaring hingga yang diambil adalah air hasil rebusan.

#### 4.7.3 Cara Pembuatan Larutan Stok

Ekstrak kulit kayu durian yang didapatkan dari hasil ekstraksi dan evaporasi adalah sebagai larutan stok awal dengan konsentrasi 100%. Kemudian, dari sediaan konsentrasi 100% dibuat beberapa sediaan larutan stok dengan konsentrasi sesuai dengan perlakuan dalam penelitian. Pembuatan larutan stok ini digunakan dengan cara mengencerkan stok awal dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan:

M1 : Konsentrasi larutan stok (100%)

M2 Konsentrasi larutan yang diinginkan

V1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan

V2 : Volume larutan perlakuan yang besarnya 2 ml

Sediaan untuk masing-masing konsentrasi dilarutkan dalam akuades hingga 25 ml. Volume ini menyesuaikan dengan kebutuhan larutan untuk 3 kali pengulangan. Untuk kelompok kontrol negatif digunakan 2 ml akuades dan untuk kontrol positif menggunakan 2 ml Malathion 0,28%. Sedangkan untuk setiap kelompok perlakuan digunakan 6 dosis (M2) yang akan ditentukan setelah penelitian pendahuluan. Semua kelompok dilarutkan dalam akuades hingga didapatkan volume akhir konsentrasi ekstrak 5%, 10%, 15% dan dekok 15%, 30%, 45% ditentukan melalui proses studi pendahuluan.

#### 4.7.4 Cara Persiapan Sampel

Nyamuk dewasa *Aedes aegypti* sp. yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Parasitologi. Nyamuk dewasa yang telah diidentifikasi sebelumnya diletakkan dalam sangkar kaca yang telah disediakan untuk kemudian digunakan sebagai bahan penelitian.

### 4.8 Pelaksanaan Penelitian

#### 4.8.1 Penghitungan Larutan Stok

Akuades ditambahkan untuk pengenceran pertama kali pada larutan stok ekstrak kulit kayu durian konsentrasi 100% (Wang Shu Tong, 2001). Pembuatan dosis dengan cara pengenceran dan larutan stok 100% adalah dengan menggunakan rumus molaritas :

1. Konsentrasi 5% : didapatkan dengan melarutkan stok 100% sebanyak 0,175 ml kedalam 3.325 ml akuades.

2. Konsentrasi 10% : didapatkan dengan melarutkan stok 100% sebanyak 0.35 ml kedalam 3.15 ml akuades.
3. Konsentrasi 15% : didapatkan dengan melarutkan stok 100% sebanyak 0.525 ml kedalam 2.975 ml akuades.
4. Konsentrasi 30% : didapatkan dengan melarutkan stok 100% sebanyak 1.05 ml kedalam 2.45 ml akuades.
5. Konsentrasi 45% : didapatkan dengan melarutkan stok 100% sebanyak 1.575 ml kedalam 1.925 ml akuades.

#### 4.8.2 Penelitian Pendahuluan

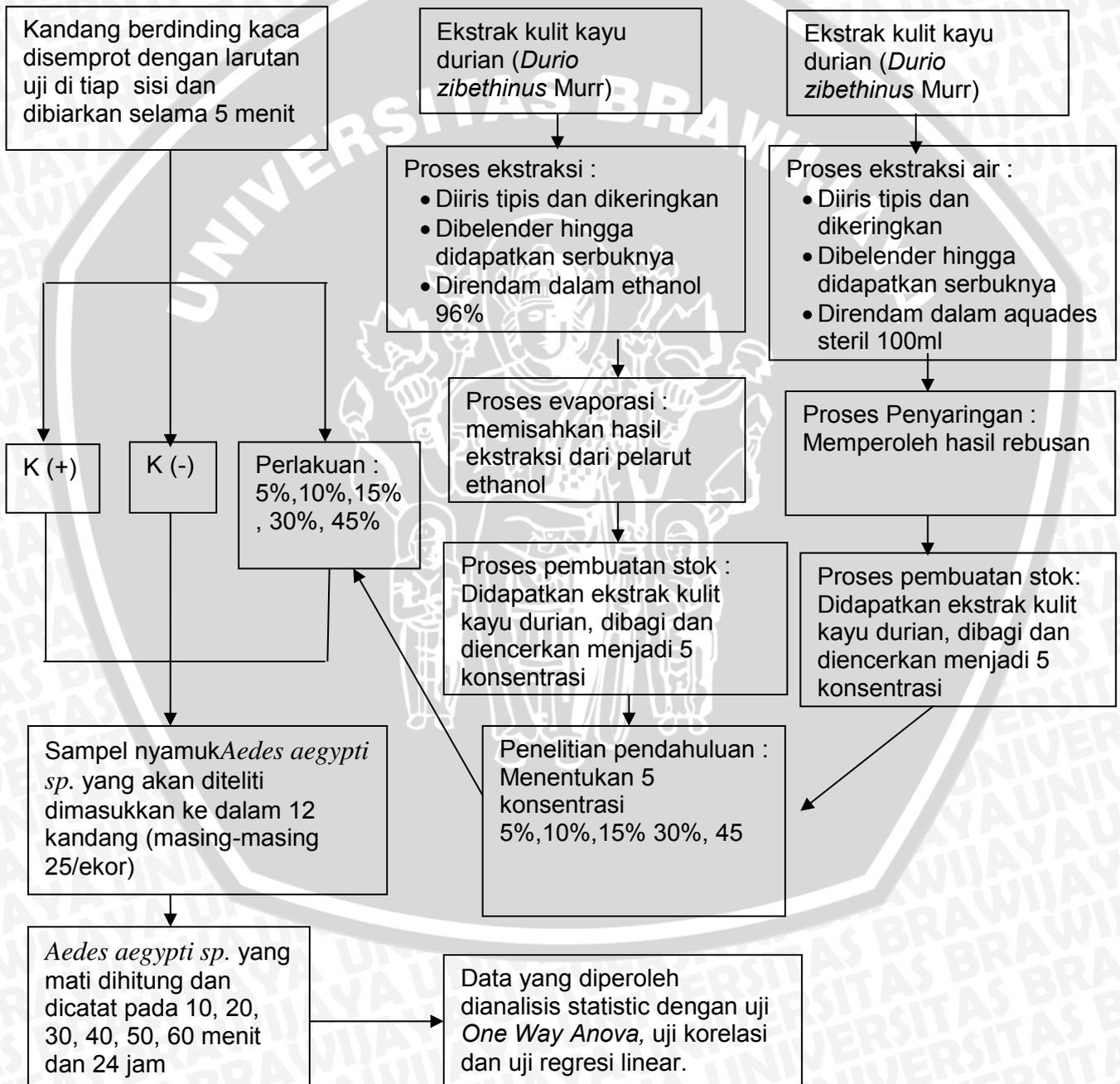
Studi pendahuluan dilakukan untuk mencari dosis atau konsentrasi perlakuan yang sesuai untuk uji coba di dalam eksperimen. Dasar penentuan dosis atau konsentrasi pada studi pendahuluan adalah *trial* dan *error*. Dosis atau konsentrasi yang diuji coba hanya akan dilakukan pengulangan sebanyak 1 kali. Sampel akan dibagi menjadi 12 kelompok, kelompok 1 dan 2 adalah control positif dan control negatif yaitu hanya diberikan akuades dan Malathion 0,28, 10 kelompok perlakuan dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 30% dan 45%. Jumlah nyamuk ditetapkan 25 ekor per kelompok. LD<sub>100</sub> ditentukan dengan melihat seberapa besar dosis atau konsentrasi minimal yang diperlukan untuk membunuh 100% sampel nyamuk dalam jangka waktu 24 jam.

#### 4.8.3 Perlakuan

- 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%.
- Ekstrak kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) dan dekok kulit kayu durian dengan dosis 5%,10%,15%,30%,45% di persiapkan dan dimasukkan ke dalam *sprayer*.
- Ekstrak kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) 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 2 ml sebagai kontrol negatif.
  - b) Kandang 2 disemprot dengan menggunakan malathion 0,28 % sebanyak 2 ml sebagai kontrol positif.
  - c) Kandang 3 dan 6 disemprot dengan menggunakan ekstrak kulit kayu durian dan dekok kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr,) dengan dosis 5% dan 15% sebanyak 2 ml.
  - d) Kandang 4 dan 7 disemprot dengan menggunakan ekstrak kulit kayu durian dan dekok kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) dengan dosis 10% dan 30% sebanyak 2 ml.
  - e) Kandang 5 dan 8 disemprot dengan menggunakan ekstrak kulit kayu durian dan dekok kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr,) dengan dosis 15% dan 45% sebanyak 2 ml.
- Setelah disemprot biarkan kandang selama 5 menit sehingga larutan yang disemprot merata pada seluruh kandang.
  - Siapkan nutrisi untuk nyamuk *Aedes aegypti* sp. berupa air gula yang diletakkan di kapas dan plastik, kemudian dimasukkan kedalam kandang setelah kandang disemprot.
  - Setelah 5 menit, masukan nyamuk *Aedes aegypti* sp. sebanyak 25 ekor kedalam masing-masing kandang yang akan diteliti
  - Jumlah nyamuk yang mati pada setiap perlakuan dihitung setelah penyemrotan, yaitu pada setiap menit selama 60 menit pertama dan 24 jam setelah penyimpanan di laboratorium
  - Tes ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali untuk setiap perlakuan

#### 4.8.4 Alur Kerja Penelitian



Gambar 8. Diagram Alur Kerja Penelitian

Keterangan:

K (+) : Perlakuan dengan Malathion 0,28% (kontrol positif)

K (-) : Perlakuan dengan larutan Akuades (kontrol negatif)

#### 4.9 Pengumpulan Data

Data hasil yang telah diperoleh dan penelitian dimasukkan kedalam label dan diklasifikasikan menurut jumlah nyamuk yang mati, pengulangan, dan konsentrasi. Pengumpulan data dilakukan pada setiap menit pada 60 menit pertama dan 24 jam setelah penelitian, dan dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan.

#### 4.10 Pengolahan dan Analisis Data

Data-data yang telah dikeompokkan dan ditabulasi kemudian dilakukan analisis statistik dengan menggunakan fasilitas program computer yang dipakai untuk statistika 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 mati untuk tiap-tiap konsentrasi larutan uji ekstrak kulit kayu durian dihitung menggunakan rumus Abbot dan dinyatakan sebagai potensi insektisida.

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 mengetahui apakah ada perbedaan antara kelompok perlakuan.

7. Analisis *Post Hoc* untuk *Kruskal Wallis* adalah *Mann Withney*, ini untuk mengetahui perlakuan mana yang memiliki perbedaan signifikan 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 mati memiliki hubungan atau korelasi yang nyata.
10. Analisis regresi linear dilakukan untuk mencari pada dosis mana dan menit berapa ekstrak etanol dan dekok kulit kayu durian sebagai insektisida nyamuk *Aedes aegypti* sp.

