

BAB 4

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 daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) sebagai insektisida terhadap nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp*.

4.2 Populasi dan sampel penelitian**4.2.1 Populasi**

Populasi penelitian adalah nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp*.

4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* yang memenuhi kriteria inklusi.

- Kriteria inklusi penelitian ini adalah :
 - Nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* yang hidup.
 - Nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* yang aktif bergerak

4.2.3 Besar sampel

Jumlah sampel nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* yang digunakan adalah 25 ekor untuk setiap jenis perlakuan. Sampel penelitian ini adalah nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* baik jantan maupun betina dewasa. Jumlah sampel dalam penelitian ini disesuaikan dengan jumlah sampel dari penelitian terhadap nyamuk *Culex sp* yang dilakukan oleh Naifah (2011).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Sharmila (2012) menyebutkan bahwa ekstrak pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) dengan konsentrasi 15% merupakan konsentrasi yang paling efektif sebagai insektisida untuk nyamuk *Culex sp.* Hasil penelitian tersebut menjadi dasar penelitian pendahuluan untuk menentukan apakah konsentrasi tersebut apakah efektif untuk ekstrak daun pandan wangi. Penelitian pendahuluan dilakukan dengan menguji beberapa konsentrasi yaitu 10 %,12.5%,15%, 17.5% dan 20.0 %. Hasil penelitian pendahuluan adalah adalah penentuan konsentrasi ekstrak yang paling efektif sebagai insektisida terhadap nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp.*

4.2.4 Perlakuan

Adapun perlakuan yang digunakan adalah dengan membagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari :

1. Kontrol positif :
Larutan Malathion 0.28 % (WHO 2006).
2. Kontrol negatif :
Aquades (WHO , 2006).
3. Perlakuan I:
Larutan ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) 5%.
4. Perlakuan II:
Larutan ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) 7.5%.
5. Perlakuan III:
Larutan ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) 15 %

4.2.5 Pengulangan

Estimasi besar pengulangan yang dilakukan berdasarkan perhitungan rumus

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4 \text{ (Lukito, 1998)}$$

keterangan:

p = jumlah perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Berdasarkan rumus di atas, pengulangan yang diperlukan pada penelitian ini minimal adalah 4 kali untuk setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Dependent (terikat)

Variabel dependent (variabel terikat) penelitian ini adalah jumlah nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* yang mati dan waktu.

4.3.2 Variabel Independent (bebas)

Variabel independent (variabel bebas) adalah konsentrasi ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) (dalam %)

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dimulai pada tahun 2016 sehingga selesai penelitian.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

- ❖ Alat Pembuatan ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*)
 1. Blender
 2. Tabung untuk merendam serbuk daun pandan wangi yang sudah diblender.
 3. Saringan
 4. Kertas saring
 5. Gelas ekstraksi (botol)
 6. Neraca analitik
 7. Klem statis
 8. Oven
 9. Timbangan
 10. Seperangkat alat evaporasi vakum
 - Rotary evaporator
 - Pompa vakum
 - Tabung pendingin dan alat pompa sirkulasi air dingin
 - Bak penampung air dingin
 - Labu penampung hasil evaporasi
 - Labu penampung etanol
 - Batu didih
- ❖ Alat Untuk Uji *Insektisida* nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp.*
 - Kandang berukuran 25 cm x 25 cm x 25cm
 - *Spray* / botol semprot volume 5 ml

- Pinset
- Masker
- Glove

4.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terbagi dalam 2 kelompok yaitu

- a) bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun pandan wangi (*pandanus amaryllifolius*)
- b) Bahan untuk digunakan untuk memperoleh nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp*

4.5.2.1 Bahan Pembuatan ekstrak daun pandan wangi (*pandanus amaryllifolius*)

- Daun pandan wangi (*pandanus amaryllifolius*)
- Aquades
- Etanol 80%

4.5.2.2 Bahan uji kemampuan zat insektisida.

- Ekstrak daun pandan wangi
- Aquades
- Nyamuk *Culex sp* dan nyamuk *Aedes sp*
- Larutan malathion

4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak daun pandan wangi yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dengan metode maserasi. Daun pandan wangi, diiris,

dikeringkan dan dijadikan serbuk. Serbuk pandan wangi direndam dengan ethanol 80%. Setelah direndam, hasilnya dievaporasi untuk mengambil ekstrak dari ethanol. Setelah dievaporasi, hasilnya menjadi kental.

2. Nyamuk *Culex* dan *Aedes* diambil dari habitat nyamuk di Lab Entomologi Dinas Kesehatan Surabaya.
3. Kriteria yang menentukan nyamuk mati adalah apabila badan dan kaki nyamuk tidak bergerak setelah digerakkan menggunakan lidi.
4. Potensi insektisida ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) dapat diukur dari mortalitas atau jumlah kematian nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* setelah disemprot dengan ekstrak daun pandan wangi dan dimasukkan ke dalam formula Abbot :

$$A1 = \frac{A-B}{100-B} \times 100\%$$

A1= Persentasi potensi insektisida

A = Persentase jumlah nyamuk yang mati pada ekstrak daun pandan wangi

B = Persentase jumlah nyamuk mati pada kontrol negatif

4.7 Cara Kerja Penelitian

4.7.1 Persiapan Penelitian

4.7.1.1 Ekstraksi Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*)

Proses ekstraksi Daun pandan wangi (*pandanus amaryllifolius*) dilakukan dengan metode maserasi

- Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) dicuci, diiris kemudian dikeringkan di bawah matahari dan diletakkan di oven sehingga kering, setelah itu daun pandan wangi yang kering dihaluskan dengan blender sehingga akan diperoleh bentuk serbuk.
- 500 gram serbuk daun pandan wangi dimasukkan ke dalam botol lalu direndam dengan etanol.
- Pelarut etanol 80 % sebanyak 1 liter dimasukkan ke dalam botol sehingga serbuk yang terbungkus kertas saring terendam dalam pelarut etanol.
- Hasil rendaman etanol kemudian ditampung di botol lain.
- Ekstraksi dilakukan dengan beberapa kali penggantian etanol.
- Semua hasil rendaman ditempatkan di dalam satu botol.

4.7.1.2 Evaporasi Hasil Ekstraksi Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*)

- Alat evaporasi dirangkai sehingga membentuk sudut 30-40°, dan bawah ke atas yaitu alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator*, dan tabung pendingin. Tabung pendingin dihubungkan dengan alat pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak air dingin melalui pipa plastik. Selain itu, tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan labu penampung hasil penguapan.
- Labu penampung hasil evaporasi diisi dengan hasil ekstraksi, kemudian dirangkai kembali, *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum semua dinyalakan. Pemanas

aquades dinyalakan juga sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi ikut mendidih dan pelarut etanol mulai menguap.

- Re-ekstraksi dengan pelarut ethanol untuk digunakan untuk memperoleh ekstrak pandan wangi. Pelarut ethanol terpisah semua dalam 4 jam.
- Hasil penguapan etanol akan dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap yang lain disedot dengan alat pompa vakum.
- Proses ini ditunggu hingga hasil ekstraksi yang dievaporasi volumenya berkurang dan menjadi kental, ditandai dengan batu pengaduk yang ikut berputar, maka proses dapat dihentikan dan hasil evaporasi diambil.
- Hasil evaporasi kemudian ditampung dalam cawan penguap kemudian dioven pada suhu 50-60°C selama 1-2 menit, untuk menguapkan pelarut yang tersisa, sehingga didapat hasil ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) yang berupa pasta kemudian ditimbang dengan neraca analitik.
- Selanjutnya ekstrak dimasukkan dalam botol gelas berwarna gelap untuk mencegah terjadinya oksidasi dan disimpan di ruang dingin.

4.7.1.3 Persiapan Nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp*

Nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Lab Entomologi Dinas Kesehatan Surabaya. Nyamuk yang telah

ditangkap dan diletakkan kedalam kandang yang telah disediakan untuk kemudian digunakan sampel penelitian.

4.7.1.4 Penyiapan sampel

.Larutan uji yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam sprayer yang telah diberi label dan dilanjutkan dengan menyemprot larutan uji tersebut ke dalam kandang yang tersedia. Kelompok kontrol negatif, yaitu penyemprotan aquades sejumlah 4 ml pada nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* coba dengan tujuan untuk mengetahui efek yang mungkin timbul dari aquades. Sedangkan kelompok kontrol positif, yaitu penyemprotan Malathion 0,28% sejumlah 4 ml pada nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* coba dengan tujuan untuk mengetahui efek yang mungkin timbul dari Malathion 0,28%.

4.7.2 Pelaksanaan Penelitian

4.7.2.1 Penyiapan konsentrasi larutan

Larutan stok ekstrak daun pandan wangi diencerkan dengan aquades hingga didapatkan dosis yang diinginkan dengan menggunakan rumus:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan:

M1 : Konsentrasi larutan stok ekstrak daun pandan wangi

M2 :Konsentrasi larutan ekstrak daun pandan wangi yang diinginkan

V1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan

V2 : Volume larutan perlakuan yang diperlukan

Volume akhir larutan perlakuan yang diperlukan untuk setiap konsentrasi adalah 4 ml. Jadi setelah diambil dari larutan stok kemudian ditambahkan dengan aquades sampai mencapai volume 4 ml (WHO, 2006).

Cara pembuatan dosis larutan pada perlakuan yang diinginkan adalah sebagai berikut :

- Untuk membuat larutan 15 % sebanyak 4 ml, dibutuhkan larutan stok sebanyak

$$100\% \times V1 = 15\% \times 4 \text{ ml}$$

$$V1 = 0.6 \text{ ml}$$

Larutan stok 0.6 ml kemudian dilarutkan dengan 3.4 ml pelarut sehingga sehingga didapatkan jumlah volume sebanyak 4 ml.

4.7.2.2 Metode Penyemprotan

Metode penyemprotan menggunakan *spray*/ botol semprot lebih cepat daripada aplikasi dengan metode lain. *Spray* lebih efektif digunakan pada permukaan rata dan lebar, tetapi dapat juga diaplikasikan pada permukaan benda dengan bentuk yang tidak beraturan.

4.7.3 Alur Kerja Penelitian Racun Kontak Menurut WHO

4.7.3.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan atas dasar trial and error, digunakan untuk mendapatkan perkiraan konsentrasi efektif sebagai insektisida dengan menggunakan konsentrasi 10 %, 12.5%,15 %,17.5 dan 20%. Pemilihan

konsentrasi pada penelitian pendahuluan berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Naifah(2011)

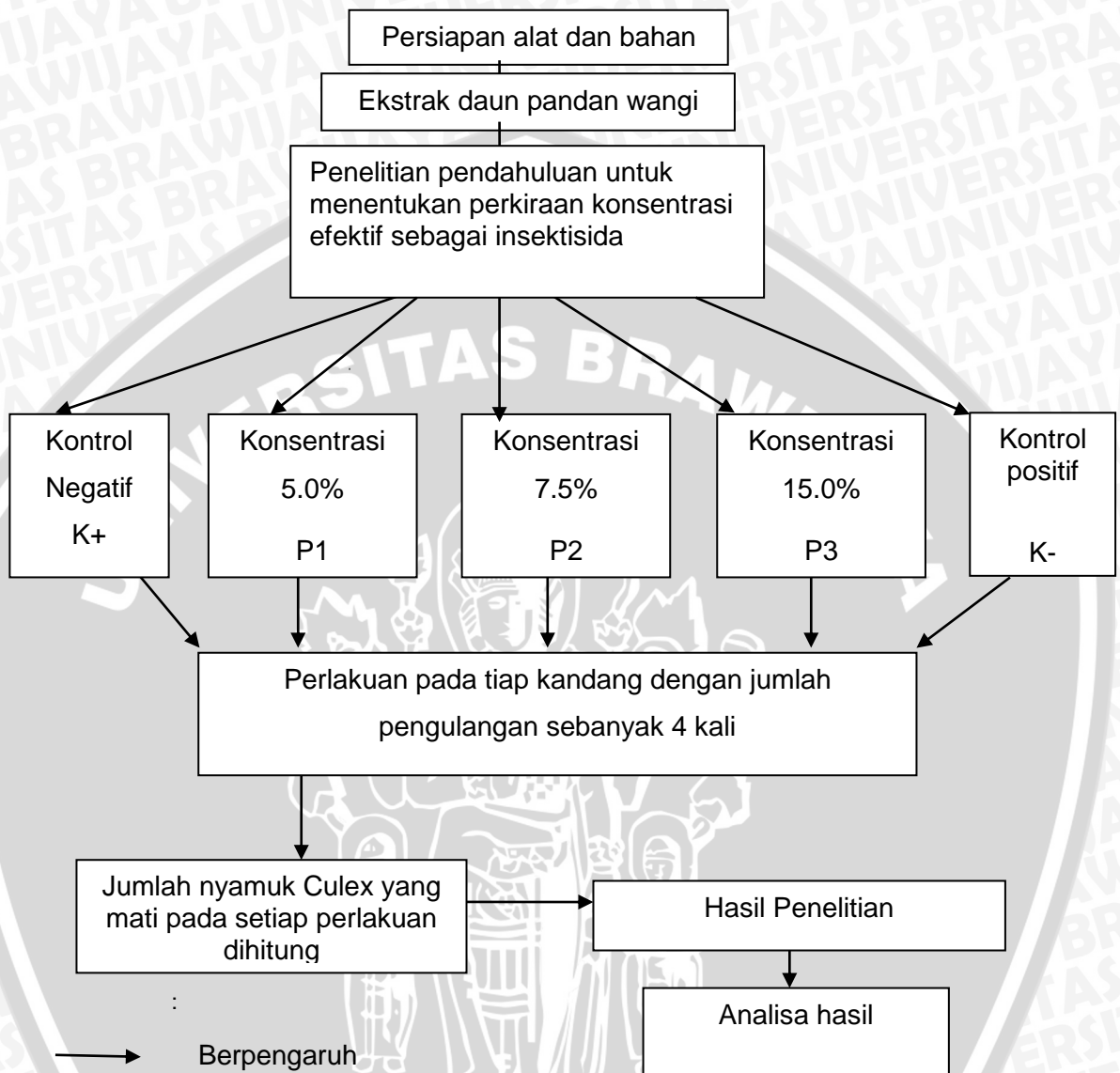
4.7.3.2 Penelitian Utama

Atas dasar hasil penelitian pendahuluan dilakukan penelitian utama untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun pandan wangi yang lebih tepat sebagai insektisida. Pada penelitian utama digunakan konsentrasi 5%, 7.5% dan 15% yang besarnya terletak antara konsentrasi efektif hasil penelitian pendahuluan dengan konsentrasi satu level di bawahnya. Untuk penelitian utama digunakan 5 buah kandang berbentuk bujur sangkar berukuran 25x25x25 cm³diletakkan dalam ruang dalam suhu kamar.

- a) 25 ekor nyamuk *Culex sp* dewasa dan nyamuk *Aedes sp* dimasukkan ke dalam kandang pada setiap kelompok perlakuan dan kontrol. (Naifah,2011)
- b) Ekstrak daun pandan wangi dengan konsentrasi tertentu dipersiapkan.
- c) Pada saat akan digunakan, ambil secukupnya (untuk masing-masing konsentrasi, kontrol positif, kontrol negatif) untuk dimasukkan ke dalam masing-masing botol sprayer.
- d) Ekstrak pandan wangi yang telah disediakan disemprot ke dalam kandang 5-10 menit sebelum nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* dimasukkan supaya ekstraknya dapat mencakupi semua bagian di kandang tersebut.
- e) Isi sprayer disemprotkan ke dalam masing – masing kandang sampai habis.

- f) Kandang 1 disemprot dengan menggunakan larutan akuades sejumlah 4 ml (sebagai kontrol negatif).
- g) Kandang 2 disemprot dengan menggunakan Malathion 0,28% sebanyak 4 ml (sebagai kontrol positif).
- h) Kandang 3 disemprot dengan menggunakan ekstrak daun pandan wangi 5 % sebanyak 4 ml.
- i) Kandang 4 disemprot dengan menggunakan ekstrak daun pandan wangi 7.5 % sebanyak 4 ml.
- j) Kandang 5 disemprot dengan menggunakan ekstrak daun pandan wangi 15 % sebanyak 4 ml.
- k) Jumlah nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* yang mati pada setiap perlakuan dihitung setiap menit 10,20,30,40,50,60, kemudian setiap jam sampai dengan 6 jam dan selanjutnya pada jam ke 24.
- l) Tes ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali untuk setiap perlakuan

4.7.3.3 Diagram Alur penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alur kerja Penelitian

Keterangan:

- K+ : Perlakuan dengan penyemprotan 4 ml Malathion 0,28% (kontrol positif)
- P1 : Perlakuan dengan penyemprotan 4 ml larutan dengan konsentrasi 5.0 %
- P2 : Perlakuan dengan penyemprotan 4 ml larutan dengan konsentrasi 7.5 %
- P3 : Perlakuan dengan penyemprotan 4 ml larutan dengan konsentrasi 15%
- K- : Perlakuan dengan penyemprotan 4 ml aquades (kontrol negatif)

4.8 Pengumpulan Data

Data hasil yang telah diperoleh dari pengamatan dimasukkan dalam tabel dan diklasifikasikan menurut jumlah persentase kematian nyamuk *Culex sp* dewasa dan nyamuk *Aedes sp* setelah 24 jam, pengulangan dan konsentrasi.

4.9 Metode Pengukuran Potensi Insektisida

Persentase potensi insektisida ekstrak daun pandan wangi dihitung menggunakan formula Abbot dengan rumus:

$$A1 = (A - B / 100 - B) \times 100 \%$$

Keterangan:

- A1 : Persentase kematian nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* setelah koreksi
A : Persentase kematian nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* uji
B : Persentase kematian nyamuk *Culex sp* dan *Aedes sp* kontrol negatif

4.10 Analisis Data Penelitian

Statistik yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan beberapa criteria :

1. Skala pengukuran variable :
 - Konsentrasi daun pandan wangi : ordinal (konsentrasi meningkat secara gradual)
 - Jumlah kematian nyamuk : numerik
2. Tidak perpasangan : karena tidak memenuhi kriteria "variable yang sama diambil dari subjek yang sama
3. Jumlah kelompok lebih dari 2 karena konsentrasi ekstraknya berbeda.

4. Secara statistik, uji Varian (*Levene's test*) dilakukan untuk mengetahui dua atau lebih kelompok mempunyai varian yang sama . Jika varian menghasilkan nilai $p > 0.05$, maka varian sama.
5. Jika varian sama dan distribusi data normal, kita menggunakan Uji One way ANOVA dengan *post Hoc Tukey*. *Post Hoc Tukey* ini hanya dijalankan jika terdapat perbedaan bermakna setelah dilakukan Uji One Way Anova yang mendapat perbedaan antara hasil eksperimen yang signifikan.

Metode yang dapat digunakan dalam penelitian ini adalah uji One Way Anova dengan alternatifnya yaitu Kruskal Wallis. Metode One way ANOVA dapat digunakan jika memenuhi syarat-syarat sebagai berikut :

1. Terdapat lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan
2. Distribusi data normal yang dapat diketahui dari uji normalitas(Kolmogorov-smimov)
3. Uji Varian (*Levene's test*) dilakukan untuk mengetahui dua atau lebih kelompok mempunyai varian yang sama . Jika varian menghasilkan nilai $p > 0.05$, maka varian sama.

Data hasil yang telah dikelompokkan dan dimasukkan tabel, diuji kemaknaannya dengan menggunakan *One-way ANOVA*. *Anova* ini untuk menganalisis apakah ada perbedaan persentase kematian nyamuk *Culex sp* dewasa dan nyamuk *Aedes sp* antara lebih dari dua kelompok. Apabila didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok, maka dilanjutkan analisis dengan uji *post hoc TUKEY* untuk menguji kelompok mana saja yang memiliki perbedaan nyata. Kemudian dilanjutkan dengan analisis korelasi

Spearman, dimana analisis untuk melihat kekuatan hubungan antara 2 variabel, yaitu konsentrasi larutan ekstrak daun pandan wangi dengan jumlah kematian nyamuk *Culex sp* dan nyamuk *Aedes sp*. Untuk uji analisis *One – way ANOVA*, uji analisis *post hoc*, uji korelasi *Spearman* menggunakan fasilitas SPSS 15 untuk Windows.

