

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true eksperimental-post test control group design* yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perubahan kadar flavonoid pada penyimpanan ekstrak etanol serai wangi (*Cymbogopon nardus*) terhadap potensinya sebagai insektisida alami terhadap nyamuk *Culex sp* dengan metode semprot.

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah nyamuk *Culex sp*. Sampel adalah bagian dari populasi yang akan diteliti. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk *Culex sp* yang memenuhi kriteria.

- Kriteria penelitian ini adalah nyamuk *Culex sp* jantan dan betina yang hidup (aktif bergerak) sampai dengan saat diberi perlakuan.

Jumlah sampel nyamuk yang digunakan adalah 30 ekor untuk setiap jenis perlakuan. Sampel penelitian ini adalah nyamuk *Culex sp* baik jantan maupun betina dewasa.

Berdasarkan hasil penelitian Hayakawa (2013) menunjukkan bahwa potensi terbesar serai wangi (*Cymbogopon nardus*) sebagai insektisida berada pada kadar 5%. Sehingga pada penelitian pendahuluan dilakukan dengan menguji beberapa konsentrasi, yakni 2,5%, 5%, dan 7,5%. Hasil penelitian pendahuluan adalah penentuan konsentrasi ekstrak yang paling efektif sebagai insektisida terhadap nyamuk *Culex sp.*

Konsentrasi efektif hasil penelitian pendahuluan akan digunakan dalam penelitian utama. Perlakuan yang diberikan pada sampel adalah dengan membagi menjadi enam perlakuan, yang terdiri dari:

1. Kontrol positif, yaitu pemberian ekstrak serai wangi dengan konsentrasi a% segera setelah proses pembuatan ekstrak selesai (hari ke-1)
2. Kontrol Negatif, yaitu pemberian aquades 5 ml pada kandang setiap pengamatan
3. Perlakuan A, yaitu pemberian ekstrak serai wangi dengan konsentrasi a% pada hari ke-2 dari pembuatan ekstrak
4. Perlakuan B, yaitu pemberian ekstrak serai wangi dengan konsentrasi a% pada hari ke-3 dari pembuatan ekstrak
5. Perlakuan C, yaitu pemberian ekstrak serai wangi dengan konsentrasi a% pada hari ke-4 dari pembuatan ekstrak
6. Perlakuan D, yaitu pemberian ekstrak serai wangi dengan konsentrasi a% pada hari ke-5 dari pembuatan ekstrak

Jumlah pengulangan eksperimen yang dilakukan berdasarkan penghitungan rumus (Tjokronegoro, 2004):

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

Keterangan :

P : Banyak kelompok perlakuan

n : Jumlah replikasi (pengulangan)

Perhitungan untuk pengulangan perlakuan adalah:

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan rumus di atas, pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini minimal adalah 4 kali untuk setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Penelitian ini menggunakan 5 tabung kaca yang masing-masing berisi 30 ekor nyamuk *Culex sp.* Sehingga jumlah total nyamuk yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah:

30 ekor nyamuk x 5 kelompok perlakuan x (4 kali pengulangan) = 750 ekor nyamuk *Culex sp.*

Setiap pengulangan membutuhkan 30 ekor nyamuk *Culex sp.* Setelah nyamuk diberi perlakuan, dilakukan pencatatan pengaruh ekstrak sebelum dan setelah disimpan mulai hari ke-1 sampai dengan hari ke-5 terhadap kematian nyamuk.

4.3. Variabel Penelitian

Ada beberapa variabel dalam penelitian ini, yaitu :

1. Variabel Independen (variabel bebas)
 - Kadar kandungan flavonoid pada lama penyimpanan ekstrak etanol serai wangi (satuan hari)
2. Variabel Dependen (variabel tergantung)
 - Jumlah nyamuk *Culex sp* yang mati.

4.4. Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

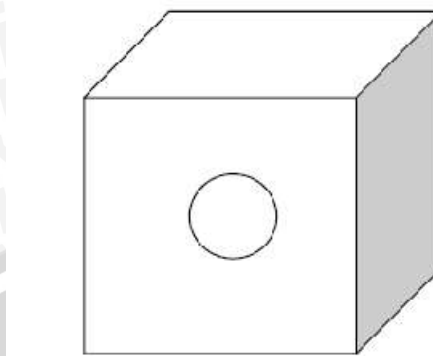
Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dimulai pada bulan April-Juni 2016.

4.5. Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah:

- Tanaman serai wangi (*Cymbogopon nardus*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari daerah Malang, Jawa Timur. Ekstrak etanol serai wangi adalah serai wangi yang sudah dikeringkan yang kemudian diekstraksi dengan pelarut etanol dan dianggap memiliki kandungan ekstrak 100%.
- Kontrol positif pada penelitian ini adalah ekstrak serai wangi dengan konsentrasi a% yang langsung diteliti tanpa melalui proses penyimpanan.

- Kelompok perlakuan pada penelitian ini adalah nyamuk *Culex sp* yang telah memenuhi kriteria inklusi.
- Penyimpanan ekstrak serai wangi (*Cymbogopon nardus*) dilakukan pada suhu ruang di dalam ruangan yang berada di Laboratorium Parasitologi.
- Kadar flavonoid dalam ekstrak etanol serai wangi (*Cymbogopon nardus*) yang telah melalui proses penyimpanan, direpresentasikan sebagai kadar quercetin.
- Nyamuk *Culex sp* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari bagian Entomologi Departemen Kesehatan Jawa Timur, Surabaya dan diidentifikasi sebagai berikut: tubuh berwarna kehitaman. Nyamuk yang dipilih adalah nyamuk dengan ukuran sedang yaitu antara 4-10 mm agar tidak terjadi bias karena kemungkinan perbedaan usia. Nyamuk diberi makan dan dibiarkan dalam kandang. Nyamuk yang tetap hidup dan bergerak aktif akan digunakan sebagai sampel.
- Kotak sangkar kaca adalah kotak berukuran 25 cm x 25 cm x 25 cm yang dibuat dengan memodifikasi sangkar dan menempelkan kaca pada semua sisi. Pada satu sisi dibuat lubang untuk tempat tangan masuk untuk menghindari nyamuk keluar dari kotak tersebut (Brown, 1964).



Gambar 4.1 Kandang tempat nyamuk berukuran 25x25x25 cm

- Efektivitas insektisida diukur dengan melihat adakah penurunan jumlah nyamuk yang hidup setelah disemprot menggunakan ekstrak etanol serai wangi
- Kriteria nyamuk mati: Diperiksa setelah 24 jam berada dalam kandang yang sudah disemprot dengan ekstrak serai wangi. bila dilakukan sentuhan atau gangguan pada bagian abdomen maupun bagian tubuh yang lain pada nyamuk dan tidak didapatkan pergerakan nyamuk tersebut.
- Metode semprot adalah metode pemberian insektisida menggunakan *sprayer* yang nantinya ekstrak di dalam *sprayer* tersebut akan disemprotkan ke dalam kandang untuk membasmi insekta yang ada.

4.6. Instrumen Penelitian

4.6.1. Alat-alat Penelitian

Penelitian ini menggunakan tiga kelompok alat. Kelompok pertama adalah alat-alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak serai wangi (*Cymbogopon Nardus*), Kelompok kedua adalah alat-alat yang digunakan untuk memperoleh nyamuk *Culex sp* dan kelompok terakhir adalah alat-alat

yang digunakan untuk uji perubahan kadar flavonoid pada ekstrak etanolserai wangi (*Cymbogopon nardus*) terhadap potensinya sebagai insektisida alami terhadap nyamuk *Culex* sp dilihat dari lama penyimpanannya.

4.6.1.1. Alat-alat Ekstraksi Serai Wangi (*Cymbogopon nardus*)

No.	Bahan Penelitian	Fungsi	Keterangan
1	Blender	Menghaluskan serai wangi	
2	Beker glass / Erlenmeyer flask	Merendam bubuk ekstrak serai wangi	1 Liter
3	Timbangan	Untuk menimbang	Satuan gram
4	Kertas Saring	Memisahkan bubuk ekstrak dan pelarut	Saringan whatman no 40
5	1 set alat evaporasi	Menghilangkan sisa pelarut	
6	Oven	Menghilangkan sisa pelarut	40°C – 50°C
7	Lemari pendingin	Untuk menyimpan ekstrak serai wangi	4°C

4.6.1.2. Alat-alat Untuk Persiapan Nyamuk *Culex* sp

No.	Bahan Penelitian	Fungsi	Keterangan
1	Sangkar Kaca	Tempat melakukan penelitian	25cm x 25cm x 25cm

2	Jaring Serangga	Jalan masuk serangga	
---	-----------------	----------------------	--

4.6.1.3. Alat-alat Untuk Uji Ekstraksi Serai Wangi terhadap Nyamuk *Culex sp*

No.	Bahan Penelitian	Fungsi	Keterangan
1	Sangkar Kaca	Tempat melakukan penelitian	25cm x 25cm x 25cm
2	<i>Sprayer</i>	Menyemprotkan ekstrak ke kandang	Semprotan parfum ukuran 10ml
3	<i>Timer</i>	Menghitung waktu penelitian	Jam Tangan/HP
4	Gelas Ukur	Wadah ekstrak	25 ml
5	<i>Spuir</i>	Mengambil bahan	

4.6.1.4. Alat-alat Untuk Uji Kadar Flavonoid

No.	Bahan Penelitian	Fungsi	Keterangan
1	Tabung falcon	Wadah untuk mencampurkan bahan	Ukuran 15 ml dan 50 ml
2	Timbangan	Menimbang bahan	
3	Sendok/ alat pengaduk	Mengambil dan mengaduk bahan	
4	<i>Spuir</i>	Mengambil bahan	3 cc dan 10 cc
5	Pipet	Mengambil bahan	
6	Tabung Reaksi	Wadah untuk mencampurkan bahan	

7	Rak	Meletakkan tabung falcon dan reaksi	
8	Spektrofotometer UV-Vis	Mengukur kadar quercetin	panjang gelombang 510 mm

4.6.2. Bahan-bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan tiga kelompok bahan, yakni:

- Kelompok pertama merupakan bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak serai wangi (*Cymbogopon nardus*).
- Kelompok kedua adalah bahan-bahan yang digunakan untuk memperoleh nyamuk *Culex sp.*
- Kelompok ketiga adalah bahan-bahan yang digunakan untuk menguji perubahan kadar flavonoid pada penyimpanan ekstrak etanol serai wangi (*Cymbogopon nardus*) terhadap potensinya sebagai insektisida alami terhadap nyamuk *Culex sp* dengan metode semprot

4.6.2.1. Bahan-bahan ekstraksi tanaman serai wangi

- Tanaman serai wangi diperoleh di kota Malang
- Etanol sebagai pelarut ekstrak

4.6.2.2. Bahan-bahan untuk persiapan nyamuk *Culex sp*

- Larutan glukosa 10%

4.6.2.3. Bahan-bahan untuk uji ekstrak serai wangi terhadap nyamuk

Culex sp dilihat dari lama penyimpanannya

- Ekstrak etanolserai wangi (*Cymbogopon nardus*)
- Nyamuk *Culex sp*
- Aquadest

4.6.2.4. Bahan-bahan untuk uji flavonoid (quercetin)

- Ekstrak etanolserai wangi (*Cymbogopon nardus*)
- Aquadest
- Quercetin
- NaNO_2
- NaOH
- AlCl_3

4.7. Cara Kerja Penelitian

4.7.1. Persiapan Peneitian

4.7.1.1. Ekstraksi dan Evaporasi Serai Wangi

A. Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi serai wangi (*Cymbogopon nardus*) dilakukan di Politeknik Negeri Malang dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol dikarenakan pelarut etanol larut dalam air. Metode ini merupakan salah satu cara untuk memisahkan campuran padat-cair. Prinsip yang dilakukan adalah pemanasan (penguapan), kondensasi, dan proses pengekstrakan. Adapun prosesnya sebagai berikut:

1. Serai wangi yang digunakan dicuci dengan air bersih yang mengalir.
2. Serai wangi yang sudah dicuci kemudian diiris tipis dan dikeringkan di bawah sinar matahari lalu dimasukkan ke dalam oven agar serai wangi tersebut menjadi kering sempurna dengan suhu oven 70°C.
3. Serai wangi dihaluskan menggunakan blender sehingga didapatkan serbuk dan ditimbang hasilnya 100gram.
4. Serbuk serai wangi dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer flask* 1L untuk direndam dengan etanol selama satu minggu.
5. Hasil ini selanjutnya akan dievaporasi untuk memisahkan serai wangi dengan pelarut etanol

B. Proses Evaporasi

Proses evaporasi bertujuan memisahkan hasil ekstrak yang telah didapat dengan pelarut etanolnya. Prosesnya adalah sebagai berikut:

1. Ambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terambil.
2. Masukkan ke dalam labu evaporator 1 liter dan isi *water bath* dengan air sampai penuh.
3. Alat evaporasi seperti alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator*, dan tabung pendingin dirangkai sehingga membentuk sudut 30°-40° dari bawah ke atas. Tabung pendingin dihubungkan dengan alat pompa sirkulasi air dingin

yang terhubung dengan bak air dingin melalui pipa plastik dan pompa vakum serta labu hasil penguapan.

4. Setelah terhubung, lalu semua alat dinyalakan. Atur *water bath* sampai 90° C agar larutan etanol menguap.
5. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
6. Hasil penguapan etanol akan dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap yang lain disedot dengan alat pompa vakum.
7. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm$ 1,5 sampai 2 jam untuk satu labu).
8. Hasil evaporasi kemudian ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven pada suhu 50-60° C selama 1-2 jam, untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstrak serai wangi 100%.
9. Hasil yang diperoleh kira-kira 1/3 dari bahan alam kering (Martono, 2002).

C. Uji Kadar Flavonoid melalui kandungan Quersetin pada Flavonoid

Pengujian kadar dan pengaruh flavonoid terhadap jumlah kematian nyamuk *Culex sp* dilakukan di laboratorium parasitologi FKUB. Untuk menguji adanya kadar flavonoid, penentuan kurva kalibrasi Quersetin

pada flavonoid, dan penentuan flavonoid total dilakukan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Masukkan sedikit ekstrak etanol serai wangi kedalam tabung reaksi
2. tambahkan sedikit bubuk logam Mg serta beberapa tetes asam klorida (HCl) pekat. Jika menunjukkan hasil reaksi positif maka akan terbentuk warna kuning-orange.
3. Buat larutan Quersetin (dalam metanol) dalam konsentrasi 700, 800, 900, 1000, dan 1100 mg/L.
4. Reaksikan 0,5 mL larutan dari berbagai konsentrasi dengan 2 mL akuades dan 0.15 mL NaNO_2 5% kemudian diamkan selama 6 menit.
5. Tambahkan 0.15 mL AlCl_3 10% kedalam larutan, kemudian diamkan kembali selama 6 menit.
6. Reaksikan larutan dengan 2 mL NaOH 4%, kemudian encerkan hingga volume total mencapai 5 mL dan didiamkan kembali selama 15 menit.
7. Absorbansi dari larutan standar diukur dengan gelombang 510 mm menggunakan *spektrofotometer UV-Vis*. Kurva standar dihasilkan dari hubungan konsentrasi quersetin (mg/L) dengan absorbansi.
8. Reaksikan 0.5 mL dari masing-masing larutan ekstrak dengan 2 mL akuades dan 0,15 mL NaNO_2 . Kemudian diamkan selama 6 menit.
9. Tambahkan 0,15 mL AlCl_3 10% ke dalam larutan, diamkan kembali selama 6 menit.

10. Reaksikan larutan dengan 2 mL NaOH 4% kemudian diencerkan hingga volume total mencapai 5 mL dan didiamkan selama 15 menit.
11. Ukur absorbansi dari larutan ekstrak pada panjang gelombang 510 nm menggunakan *spektrofotometer UV-Vis*. Pengukuran juga dilakukan terhadap blanko berupa akuades. Kandungan flavonoid total dinyatakan sebagai jumlah x kuarsetin ekuivalen tiap x ekstrak.

4.7.1.2. Persiapan Nyamuk *Culex sp*

Nyamuk *Culex sp* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari bagian entomologi dinas kesehatan Jawa Timur, Surabaya. Nyamuk *Culex sp* yang telah diidentifikasi sebelumnya diletakkan dalam sangkar kaca yang telah disediakan untuk kemudian digunakan sebagai sampel penelitian.

4.7.2. Pelaksanaan Penelitian

4.7.2.1. Pembuatan Konsentrasi Larutan

Ekstrak etanol serai wangi yang tersimpan di lemari pendingin disesuaikan suhunya dengan suhu ruangan dengan cara membiarkan di suhu ruangan selama 15 menit dan dianggap memiliki konsentrasi 100%. Larutan stok ekstrak serai wangi kemudian diencerkan dengan larutan *aquadest* sehingga didapatkan dosis yang diinginkan dengan menggunakan rumus pengenceran:

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

Keterangan:

M1 : Konsentrasi larutan stok yang besarnya 100%

M2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan

V1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan

V2 : Volume larutan perlakuan

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

Untuk membuat Larutan 7,5% sebanyak 4 ml, dibutuhkan larutan stok sebanyak :

$$100\% \times V1 = 7,5\% \times 4\text{ml}$$

$$V1 = 0,3\text{ml}$$

Larutan stok 0,3ml kemudian dilarutkan dengan 3,7 ml pelarut sehingga didapatkan jumlah volume total sebanyak 4 ml.

4.7.2.2. Penelitian Pendahuluan

Sebelum dilakukan penelitian utama akan dilakukan penelitian pendahuluan yang bertujuan untuk menentukan konsentrasi optimalekstrak serai wangi (*Cymbogopon nardus*) berdasarkan penelitian sebelumnya senyawa yang menunjukkan bahwa konsentrasi terendah yang efektif sebagai insektisida untuk nyamuk *Culex sp* adalah 5%. Penelitian pendahuluan ini akan menggunakan tiga konsentrasi yaitu 2.5%, 5%, dan 7.5%, dan dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali. Hasil pengamatan yang menunjukkan konsentrasi yang memiliki potensi efektif sebagai insektisida terhadap nyamuk *Culex sp* digunakan sebagai konsentrasi pada penelitian utama.

4.7.2.3. Prosedur Penelitian Utama

1. Siapkan empat sangkar kaca untuk uji insektisida.
2. Masukkan nyamuk *Culex sp* sebanyak 30 ekor ke dalam masing-masing sangkar kaca yang akan diteliti.
3. Siapkan alat-alat yang akan digunakan untuk membuat larutan pengujian antara lain: gelas ukur dan *sprayer*.
4. Siapkan stok larutan uji disiapkan dalam konsentrasi a% serta kontrol negatif.
5. Larutan uji yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam gelas ukur 5 ml.
6. Dengan menggunakan *sprayer*, larutan dengan konsentrasi tersebut serta kontrol negatif kemudian disemprotkan ke dalam sangkar nyamuk sebanyak 5 ml.
7. Pengamatan terhadap perlakuan dilakukan 24 jam setelah waktu penyemprotan selesai dan diamati pada hari ke-2, 3, 4, dan 5 serta dihitung jumlah nyamuk yang mati.
8. Pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali pada masing-masing perlakuan.

4.8. Pengumpulan Data

Data hasil yang telah diperoleh dari penelitian dimasukkan kedalam tabel dan diklasifikasikan menurut jumlah nyamuk *Culex sp* yang mati, pengulangan, dan waktu lama penyimpanan. Hasil tersebut akan diuji dengan uji statistik.

4.9. Tabulasi Data

Persentasi kemampuan ekstrak serai wangi sebagai insektisida dihitung menggunakan formula Abbot dengan rumus (Boesri dkk, 2005):

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

Keterangan:

A₁: Persentase kematian nyamuk setelah koreksi.

A : Persentase kematian nyamukuji.

B: Persentase kematian nyamukkontrol positif.

4.10. Analisis Data

Data-data yang telah dikelompokkan dan ditabulasi kemudian dilakukan analisis statistic dengan menggunakan fasilitas SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) 16.0 for *Windows* dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

Untuk mengetahui apakah terdapat keragaman antar perlakuan dilakukan uji hipotesis komparatif. Metode yang dapat digunakan yaitu uji *One-way ANOVA* dengan alternatifnya yaitu uji *Kruskal-Wallis*. Metode *One-way ANOVA* (*Analysis of Variance*) dapat digunakan jika data memenuhi syarat-syarat sebagai berikut (Dahlan, 2004),

1. Terdapat lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan.
2. Distribusi data normal, yang dapat diketahui dari uji normalitas (*Kolmogorov-Smirnov*). Jika distribusi data tidak normal, maka

diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya distribusi data menjadi normal.

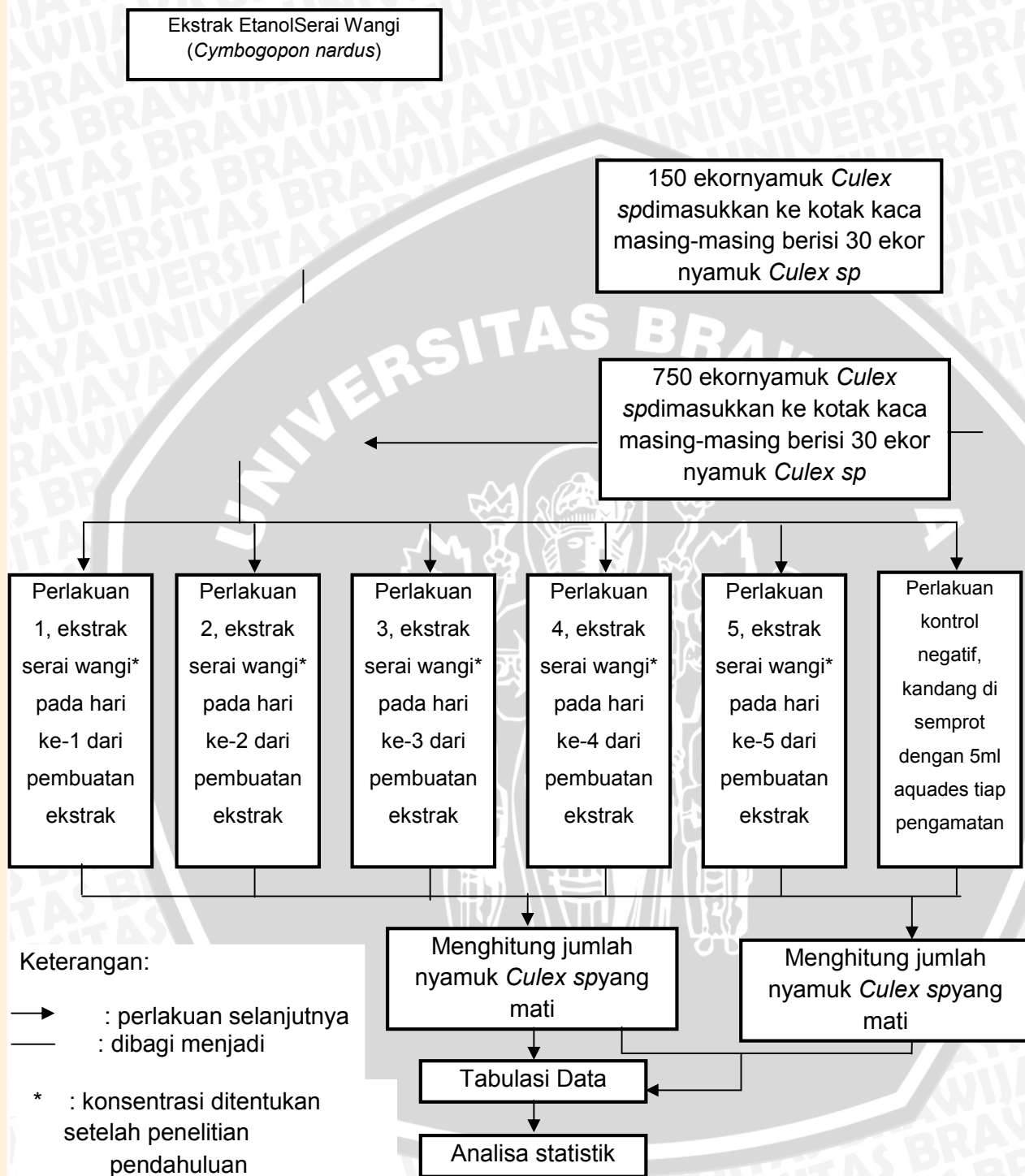
3. Varians data sama atau homogen, yang dapat diketahui dari uji homogenitas. Jika varians data tidak sama atau homogen, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya varians data menjadi sama atau homogen.
4. Jika data hasil transformasi tidak berdistribusi normal atau varians tetap tidak sama, maka alternatifnya dipilih uji *Kruskal-Wallis*.

Jika pada uji *One-way ANOVA* atau *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai $p < 0,05$, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh perbedaan hari penyimpanan terhadap potensi insektisida. Kemudian untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda dilakukan *post-hoc test* dengan uji *Tukey HSD* untuk data yang menggunakan uji *One-way ANOVA* dan uji *Mann-Whitney* untuk data yang menggunakan uji *Kruskal-Wallis* (Dahlan, 2004). Kemudian untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh pada perubahan kadar flavonoid penyimpanan ekstrak etanol serai wangi sebagai insektisida alami terhadap nyamuk *Culex sp* maka dilakukan uji korelasi *Pearson* atau *Spearman* (Dahlan, 2004).

Untuk menguji besarnya pengaruh faktor lama waktu penyimpanan dengan penurunan kadar flavonoid dan masing-masing faktor tersebut terhadap jumlah nyamuk yang mati dilakukan dengan uji regresi linier.

4.11 Diagram Alur Kerja Penelitian





Gambar 4.2 Diagram Alur Kerja Penelitian