

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan “*true experimental design-post test-only control group design*” yaitu rancangan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan efek beberapa konsentrasi ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) sebagai insektisida terhadap nyamuk dewasa *Aedes aegypti*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk dewasa *Aedes aegypti*, yang memenuhi kriteria inklusi. Nyamuk dewasa didapatkan dari Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur Divisi Entomologi di Kota Surabaya. Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah semua nyamuk *Aedes aegypti*, dewasa yang masih hidup dan aktif bergerak. Kriteria *ekslusi* : tidak bergerak dan nyamuk yang terkena insektisida (WHO, 2006).

4.2.2 Sampel

4.2.2.1 Estimasi Besar Sampel

Populasi penelitian ini adalah nyamuk *Aedes aegypti* dewasa yang diperoleh dengan metode “*human bite*” (kimowardoyo S, et al, 1993). Pada percobaan ini akan digunakan 25 ekor nyamuk per kandang (WHO, 1996). Perkiraan jumlah pengulangan yang akan dilakukan berdasarkan rumus di bawah ini (Solimun, 2001):

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

Dengan n = Jumlah pengulangan tiap perlakuan
 p = Jumlah perlakuan/kelompok coba (5)

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

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

$$5n - 5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4$$

Jadi berdasarkan rumus di atas, penelitian ini digunakan 5 kandang, masing-masing kandang berisi 25 nyamuk (Saleh, 1996; WHO, 1996). Pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah minimal 4 kali. Maka besar sampel yang digunakan pada setiap sesi adalah 125 *aedes Aegypti* dan jumlah sampel yang dipakai adalah 500 ekor nyamuk dewasa *Aedes aegypti*.

Jumlah sampel nyamuk dewasa yang digunakan adalah 25 ekor untuk setiap kelompok perlakuan (WHO, 2006). Kemudian nyamuk-nyamuk tersebut dimasukkan ke dalam kandang khusus yang telah disiapkan untuk penelitian ini.

Terdapat lima kelompok perlakuan dalam penelitian ini, yaitu :

- a. Kelompok kontrol positif : kelompok nyamuk dewasa *Aedes aegypti* yang disemprot dengan *malathion* 0,28%
- b. Kelompok kontrol negatif : kelompok nyamuk dewasa *Aedes aegypti* yang disemprot dengan larutan aseton 1%
- c. Kelompok perlakuan I : kelompok nyamuk dewasa *Aedes aegypti* yang disemprot dengan larutan ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dengan konsentrasi X
- d. Kelompok perlakuan II : kelompok nyamuk dewasa *Aedes aegypti* yang disemprot dengan larutan ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dengan konsentrasi Y
- e. Kelompok perlakuan III : kelompok nyamuk dewasa *Aedes aegypti* yang disemprot dengan larutan ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dengan konsentrasi Z

4.2.2.2 Karakteristik Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah :

- a. Nyamuk dewasa *Aedes aegypti* yang hidup
- b. Nyamuk yang sehat (dapat dilihat dari keaktifan bergerak)

4.3 Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1 Variabel

4.3.1.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dalam (%) dan lama waktu paparan ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dengan nyamuk dewasa *Aedes aegypti*

4.3.1.2 Variabel Tergantung (*Dependent*)

Variabel tergantung penelitian ini adalah jumlah nyamuk *Aedes aegypti* yang mati setelah disemprot dengan ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*).

4.3.2 Definisi Operasional

1. Ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) : diperoleh dari hasil akhir proses evaporasi. Proses ekstraksi daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dilakukan berdasarkan tata cara pelaksanaan ekstraksi yang menggunakan *etanol* 70% sebagai pelarutnya. Proses ekstraksi daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Nyamuk *Aedes aegypti* yang dipakai dalam penelitian ini adalah nyamuk dewasa *Aedes aegypti*. Nyamuk *Aedes aegypti* dinyatakan mati jika nyamuk tersebut jatuh di dasar kotak nyamuk dan tidak mampu bergerak secara aktif, dan tidak dapat bergerak meski diberi rangsang berupa sentuhan (pratama,2016).

3. Metode semprot adalah suatu metode untuk mengeluarkan insektisida cair melalui berbagai macam alat penyemprot sehingga terbentuk *droplet* berukuran kecil yang melayang di udara atau menetap pada permukaan objek yang mengadakan kontak dengan serangga (Department of Entomology Iowa State University, 2005).

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

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

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan

- a. Bahan-bahan untuk proses ekstraksi daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) adalah :
 1. Daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) yang telah dikeringkan
 2. Pelarut ekstrak (*etanol* 70%)
 3. Aquades steril
 4. Kertas saring
- b. Bahan-bahan uji potensi insektisida daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) adalah :
 1. Ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*).
 2. Cairan *aseton* .
 3. Aquades steril .
 4. Nyamuk dewasa genus *Aedes aegypti*
 5. *Malathion* 0,28% .

4.5.2 Instrumen Penelitian

a. Alat-alat untuk proses ekstraksi daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*), yaitu :

1. Alat penggerus/*blender*.
2. Tabung yag dipakai untuk merendam daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) yang sudah digerus.
3. Satu set alat evaporasi .
4. Klem statis .
5. Selang plastic.
6. *Waterbath* .
7. *Waterpump*.
8. Bak penampung hasil ekstraksi.
9. Botol penampung hasil ekstraksi.
10. *Oven*.
11. Timbangan analitik.
12. *Freezer*/lemari es .

b. Alat-alat untuk persiapan nyamuk dewasa *Aedes aegypti* :

1. Kotak nyamuk.

c. Alat-alat uji potensi insektisida daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) adalah :

1. Kandang nyamuk (tempat pemeliharaan nyamuk) ukuran 25cm x 25cm x 25cm (5buah).
2. 5 buah *Sprayer* .

3. Gelas ukur.
4. Jarum.
5. *Sputit*.
6. *Stopwatch*.

4.6 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.6.1 Pembuatan Ekstrak Daun Gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*)

Proses ekstraksi daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) meliputi proses sebagai berikut :

1. Daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) basah dikeringkan dengan sinar matahari secara tidak langsung atau diangin-anginkan sampai kering sempurna.
2. Setelah kering, daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) diblender kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik.
3. Serbuk daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dimasukkan ke dalam kertas saring, lalu dimasukkan ke dalam tabung untuk direndam dengan *etanol* 70% sampai serbuk yang ada di dalam kertas saring terendam dalam pelarut *etanol* selama kurang lebih 1 minggu.
4. Hasil selanjutnya akan dievaporasi (untuk memisahkan ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dengan pelarut *etanol*).

4.6.2 Evaporasi Hasil Ekstrak Daun Gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*)

Proses evaporasi meliputi :

1. Alat evaporasi dirangkai sehingga membentuk sudut 30°-40°.
2. Hasil rendaman *etanol* dipindahkan ke labu pemisah/labu evaporasi.

3. Labu pemisah evaporasi dihubungkan pada bagian evaporator, pendingin spiral dihubungkan dengan *vakum* oleh selang plastik, pendingin spiral dihubungkan dengan *water pump* oleh selang plastik.
4. Hasil penguapan *etanol* akan dialirkan menuju labu penampung *etanol* sehingga terpisah dengan hasil evaporasi, sedangkan uap yang lain disedot dengan alat pompa *vakum*.
5. *Water pump* ditempatkan dalam bak yang berisi aquades, kemudian dihubungkan dengan sumber listrik sehingga aquades akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan rata).
6. Satu set alat evaporasi diletakkan, sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *water bath*.
7. *Vakum* dan *water bath* dihubungkan dengan sumber listrik dan pada *water bath* suhu dinaikkan 70-80°C (sesuai dengan titik didih *etanol*).
8. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi, kemudian dioven pada suhu 50-60°C selama 3 jam, untuk menguapkan pelarut yang tersisa.
9. Hasil evaporasi kemudian ditimbang dengan timbangan analitik. Hasil ini yang akan digunakan dalam percobaan.

4.6.3 Uji Kandungan Larutan

4.6.3.1 Saponin

1. Siapkan larutan ekstrak daun kirinyu.
2. Larutkan ekstrak daun kirinyu ke dalam 10 ml air panas, dinginkan dan kocok selama 10 detik dan akan membentuk busa

3. Tambahkan HCl 2ml, kemudian kocok lagi dan masih membentuk busa.
4. Tambahkan 3 tetes minyak zaitun.
5. Hasil positif bila ada terbentuknya emulsi.

4.6.3.2 Tanin

1. Siapkan larutan ekstrak daun kirinyu
2. Larutkan dalam 10 ml aquades kemudian saring
3. Tambahkan 3 tetes FeCl
- 4 Hasil positif bila terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau

4.6.4 Penyiapan Larutan Stok

Larutan *stok* adalah larutan ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dengan konsentrasi 95%. Cairan pelarut ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) yang digunakan adalah larutan aseton 1%. Untuk membuat larutan aseton 1% sebanyak 100ml diperlukan campuran aseton 1ml ditambah dengan aquades 99ml.

4.6.5 Penyiapan Larutan Uji

Larutan *stok* ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) akan diencerkan dengan larutan aseton 1% sehingga didapatkan dosis yang diinginkan dengan menggunakan rumus pengenceran :

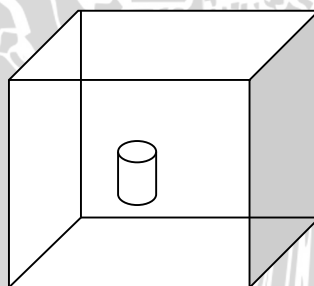
$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan :

- M1 : Konsentrasi larutan stok ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) yang besarnya sesuai dengan konsentrasi tertinggi.
- M2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan
- V1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan
- V2 : Volume larutan perlakuan yang diperlukan

4.6.6 Penyiapan Sampel

Nyamuk-nyamuk *Aedes aegypti* yang telah didapatkan dari Dinas Kesehatan Surabaya dan dapat bergerak aktif. Setelah itu, nyamuk-nyamuk tersebut diletakkan dalam kotak kaca yang telah disediakan untuk kemudian digunakan sebagai penelitian.



Gambar 4.1 Kandang Nyamuk Ukuran 25x25x25 cm

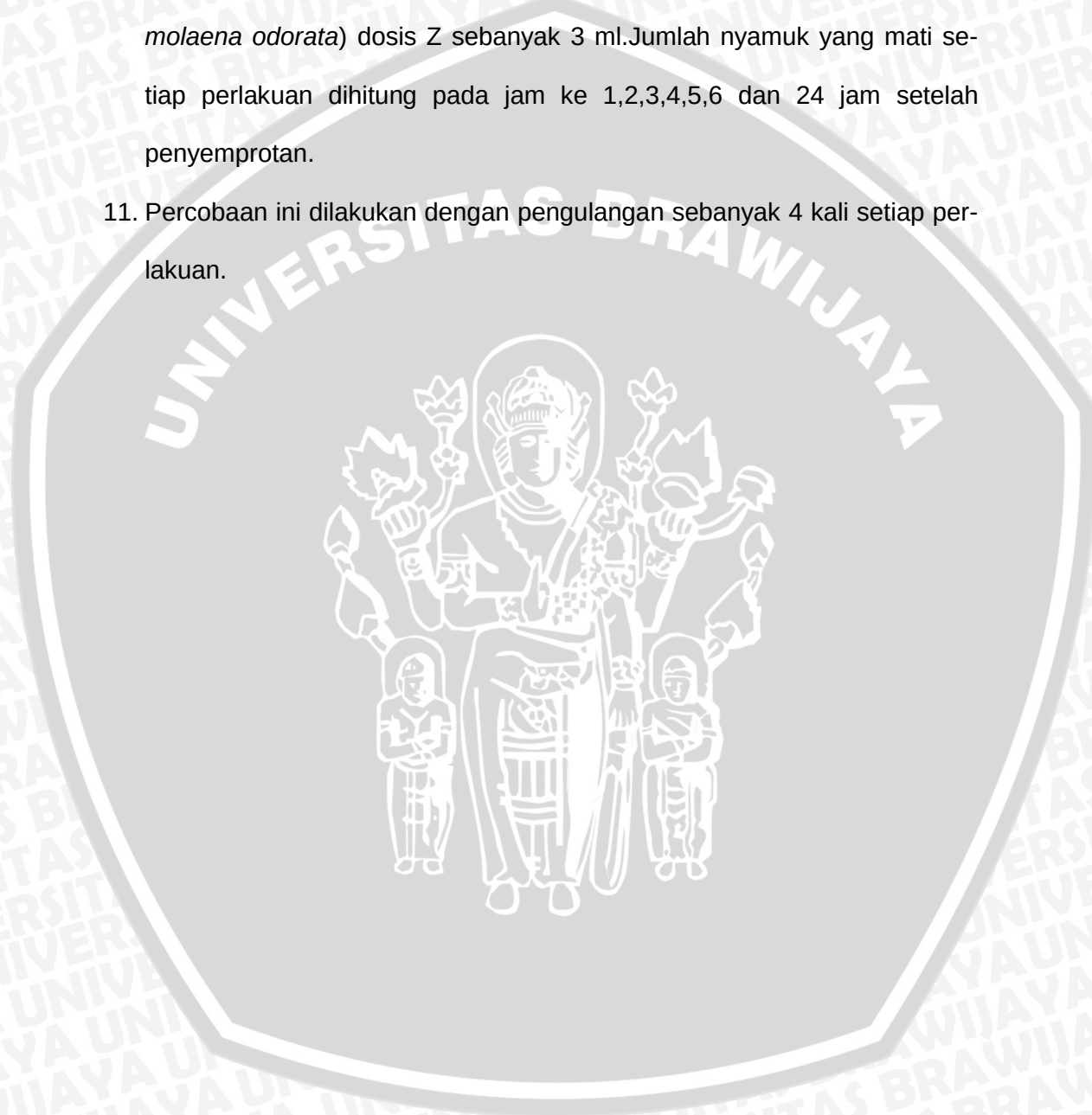
4.6.7 Uji Potensi Insektisida

1. Sebelum dilakukan penelitian, dilakukan terlebih dahulu penelitian pendahuluan untuk mendapatkan konsentrasi daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) yang efektif (larutan dengan konsentrasi minimum dan daya bunuh maksimum) yaitu dengan cara menyemprotkan ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dengan konsentrasi

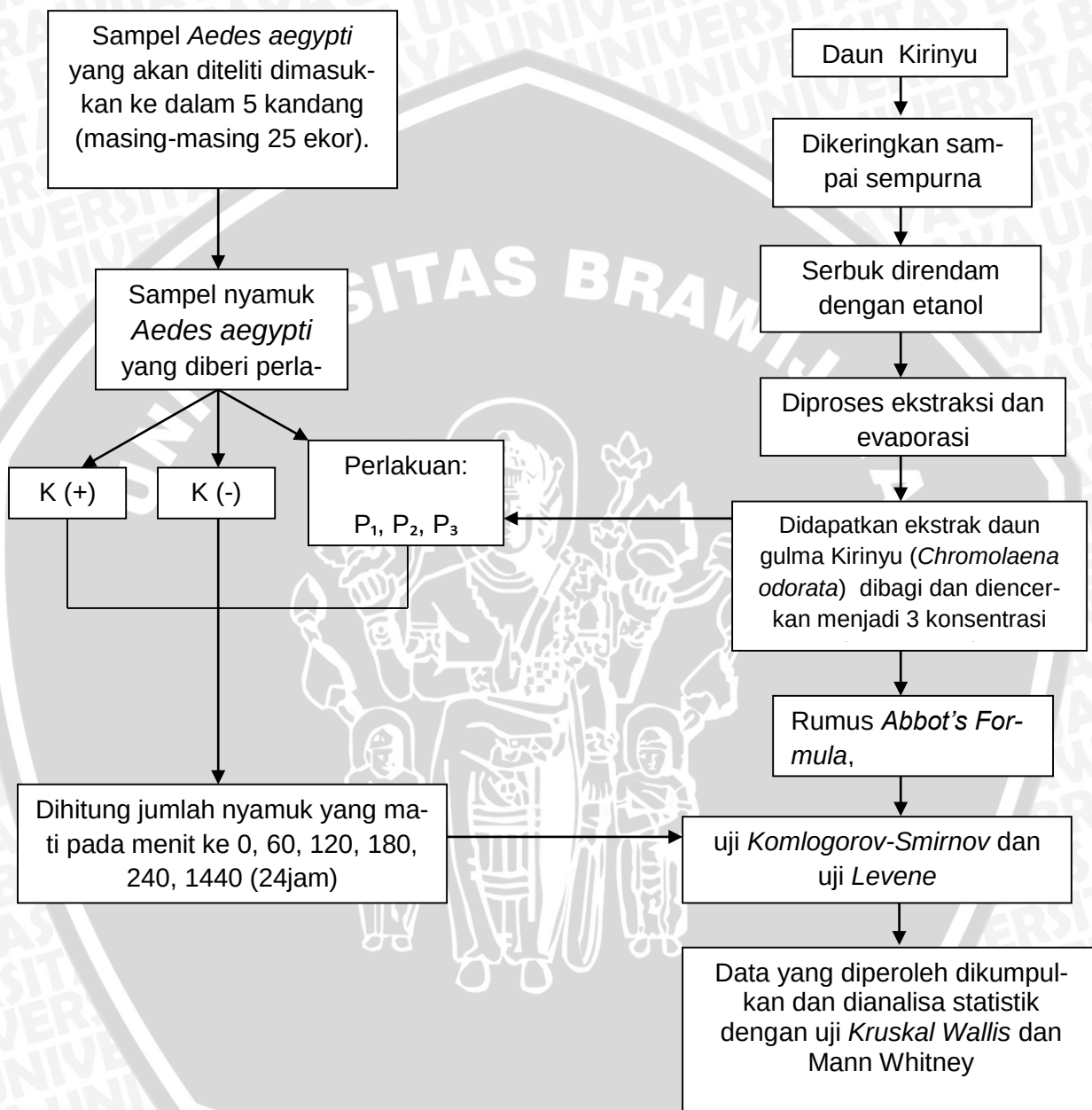
10%,20%,30%,40% dan 50%. Setelah didapatkan konsentrasi ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) yang efektif, kemudian dilakukan step up dan step down dari konsentrasi tersebut untuk kemudian digunakan dalam penelitian.

2. Penelitian dilakukan dengan menggunakan 5 buah kotak berbentuk bujur sangkar berukuran 25 x 25 x 25 cm³ diletakkan dalam ruang dengan suhu 27 ± 2 °C (suhu kamar) dan tingkat kelembaban antara 60-70%. Masukkan nyamuk *Aedes aegypti* dewasa sebanyak 25 ekor kedalam masing-masing sangkar yang akan diteliti.
3. Larutan ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dengan konsentrasi X%, Y%, dan Z% dipersiapkan.
4. Pada saat akan digunakan, ambil ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) secukupnya (untuk masing-masing konsentrasi), insektisida *malathion* 0,28% sebagai kontrol positif, dan *aseton* 1% sebagai kontrol negatif untuk dimasukkan ke dalam masing-masing *sprayer* (Satriono, 2006).
5. Isi *sprayer* disemprotkan ke dalam masing-masing kandang sampai habis.
6. Kandang I disemprot dengan menggunakan *malathion* 0,28% sebanyak 3 ml (sebagai kontrol positif).
7. Kandang II disemprot dengan menggunakan *aseton* 1% sebanyak 3 ml (sebagai kontrol negatif).
8. Kandang III disemprot dengan menggunakan daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dosis X sebanyak 3 ml.

9. Kandang IV disemprot dengan menggunakan ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dosis Y sebanyak 3 ml.
10. Kandang V disemprot dengan menggunakan daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dosis Z sebanyak 3 ml. Jumlah nyamuk yang mati setiap perlakuan dihitung pada jam ke 1,2,3,4,5,6 dan 24 jam setelah penyemprotan.
11. Percobaan ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali setiap perlakuan.



4.6.8 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.2 Diagram Alur Penelitian

Keterangan Gambar 4.2:

K (+): Kontrol positif: *Malathion* 0,28%

K (-): Kontrol negatif: *Aseton* 1%

P₁: Konsentrasi X%

P₂: Konsentrasi Y%

P₃: Konsentrasi Z%

4.6.9 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada 0 menit, 60 menit, 120 menit, 180 menit, 240 menit, dan 1440 menit (24jam) (Suwarsono, 2001). Jumlah nyamuk yang mati dihitung dan dicatat. Keadaan semua kelompok perlakuan diamati untuk mencari perubahan jumlah nyamuk yang mati. Jumlah nyamuk yang mati dihitung dalam tabel.

4.6.10 Metode Pengukuran Potensi Insektisida

Persentase potensi insektisida ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dihitung dengan menggunakan rumus *Abbott* (WHO, 2006)

$$\text{: Mortality} = A1 = (A - B / 100 - B) \times 100\%$$

Keterangan :

- A1 = persentase kematian setelah koreksi
- A = persentase kematian pada kelompok perlakuan
- B = persentase kematian pada kontrol negatif

4.7 Analisis Data

Pengolahan dan analisis data dibuat berdasarkan perhitungan jumlah nyamuk *Aedes aegypti* yang mati untuk tiap-tiap konsentrasi larutan uji (ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*)) setelah pengamatan sesuai dengan waktu yang telah ditentukan.

Untuk memperoleh hasil, hubungan statistik dengan analisis masing-masing data yang diperoleh, maka dilakukan analisis data dengan menggunakan Data-data yang telah dikelompokkan dan ditabulasi kemudian analisis statistic dengan menggunakan fasilitas SPSS (*Statistical Package for the Social Scienc-*

es) 15.0 for Windows dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,01 ($p = 0,01$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,01$).

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 (*Kolmogorv-Smimov*). 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*.
5. Hipotesis ANNOVA :

H_0 : Rata-rata hasil penelitian menunjukkan bahwa 5 macam perlakuan tidak menunjukkan adanya pengaruh perlakuan yang berbeda secara signifikan terhadap kematian nyamuk *Aedes aegypti*.

H_1 : Terdapat pengaruh perlakuan di antara variasi konsentrasi dengan ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dan kontrol yang diuji terhadap kematian nyamuk *Aedes aegypti*.

Jika pada uji *One-way ANOVA* didapatkan nilai $p < 0,01$, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi dan perbedaan waktu 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*. Kemudian untuk mengetahui apakah terdapat korelasi antara perbedaan konsentrasi ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dengan jumlah nyamuk yang mati dan perbedaan lama waktu kontak antara insektisida ekstrak ekstrak daun gulma Kirinyu (*Chromolaena odorata*) dan nyamuk terhadap jumlah nyamuk yang mati, dilakukan uji korelasi *Pearson* (Dahlan, 2004).

