

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris (*true experimental-post test only control group design*), untuk mengetahui potensi insektisida ekstrak daun Seledri (*Apium graveolens L.*) terhadap nyamuk *Culex sp.* dengan metode elektrik.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah nyamuk dewasa *Culex sp.* yang dibiakkan mulai dari larva di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Sampel

Sampel penelitian yang diambil adalah nyamuk *Culex sp.* yang dibiakkan mulai dari larva di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

- Inklusi :
- Nyamuk *Culex sp.* yang masih aktif
 - Nyamuk *Culex sp.* yang memiliki anggota tubuh lengkap
- Eksklusi:
- Nyamuk *Culex sp.* yang kurang aktif
 - Nyamuk *Culex sp.* yang tidak memiliki anggota tubuh lengkap

4.2.3 Estimasi Besar Sampel

Sebelum dilakukan penelitian yang sesungguhnya, terlebih dahulu dilakukan penelitian pendahuluan, dengan kriteria rentang konsentrasi yang akan digunakan :

- Konsentrasi terkecil adalah dosis yang menghasilkan jumlah nyamuk yang mati sebanyak kurang dari 100% dari jumlah total nyamuk dalam satu kelompok.
- Konsentrasi terbesar adalah konsentrasi yang menghasilkan jumlah nyamuk yang mati sebanyak 100% dari jumlah total nyamuk dalam satu kelompok

Percobaan pendahuluan ini meliputi 5 perlakuan dengan pengulangan minimal 4 kali dan penentuan konsentrasi bersifat *trial and error* (coba-coba) yaitu :

- Kontrol (-) : Larutan akuades steril
- Kontrol (+) : Malathion 0,28 %
- Perlakuan I : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 10 %
- Perlakuan II : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 20 %
- Perlakuan III : Gabus yang diisiekstrak daun seledri 30 %
- Perlakuan IV : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 40%
- Perlakuan V : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 50%

Dari hasil penelitian pendahuluan, ditentukan *range* konsentrasi yang digunakan pada penelitian kedua, diatas konsentrasi ekstrak daun seledri tentang konsentrasi terendah yang menyebabkan kematian nyamuk *Culex sp*, dari konsentrasi terendah yang mempunyai efek minimal dalam kematian nyamuk.

Setelah itu, dilakukan penelitian sesungguhnya, untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak daun seledri yang merupakan potensi awal dan potensi maksimal untuk kematian nyamuk *Culex sp.* Misal, hasil penelitian pendahuluan awal kematian nyamuk pada konsentrasi r, maka pada penelitian utama tentang konsentrasi terendah yang menyebabkan awal kematian nyamuk dilakukan pada 3 konsentrasi dibawah konsentrasi (p,q,r,s). Berdasarkan hasil penelitian juga dilakukan penentuan *range* konsentrasi penelitian utama tentang potensi maksimal sebagai insektisida dari ekstrak daun seledri, dengan melakukan pengamatan terhadap 3 konsentrasi dibawah konsentrasi minimal yang menyebabkan kematian 100% nyamuk pada penelitian pendahuluan (misal, konsentrasi z). Maka penelitian utama menggunakan konsentrasi x,y,z. Penelitian ini meliputi 3 perlakuan dengan 1 kontrol (-) dan 1 kontrol (+) yaitu (misal) :

Untuk penentuan konsentrasi yang terendah yang mempunyai awal kematian nyamuk

- Kontrol (-) : Larutan akuades steril
- Kontrol (+) : Malathion 0,28 %
- p : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 5 %
- q : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 6,25 %
- r : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 7,5 %
- s : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 10 %

Untuk menentukan konsentrasi ekstrak yang mempunyai potensi kematian nyamuk *Culex* 100%

- x : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 30 %

- y : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 40 %
- z : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 50 %

Untuk menentukan *knockdown effect* dilakukan penelitian pada konsentrasi dari hasil penelitian pendahuluan yang 100% nyamuk dengan batasan waktu maksimal 1 jam.

- a : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 70 %
- b : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 80 %
- c : Gabus yang diisi ekstrak daun seledri 90 %

4.3 Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Identifikasi Variabel

4.4.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nyamuk dewasa *Culex sp.* yang mati oleh pemberian ekstrak daun seledripada konsentrasi tertentu.

4.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun seledri dengan berbagai kosentrasi dan waktu, misalnya jam ke-1, jam ke-2, jam ke 3, dsb.

4.5 Definisi Operasional

- 4.5.1 Daun seledri yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Sentra Tanaman Obat UPT Materia Medika Dinas Kesehatan Lahor-Batu Malang.

- 4.5.2 Ekstrak daun seledri didapatkan dengan cara daun seledri digerus kemudian diperas untuk diambil sarinya, kemudian diekstrak dengan menggunakan etanol 95%.
- 4.5.3 Nyamuk *Culex sp.* adalah nyamuk yang dibiakkan mulai dari larva di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan cara pembiakan.
- 4.5.4 Gabus steril adalah gabus hit yang sudah disterilkan dengan cara dipakai selama 1 hari kemudian di rendam dengan alkohol 90% dan kemudian di rendam dengan akuades steril.
- 4.5.5 Kandang yang digunakan berukuran 100x100x60 cm³ yang pada ketiga sisinya tertutup kaca dan pada sisi depan tertutup plastik dengan sebuah pintu kecil yang terbuat dari kasa (untuk meletakkan alat elektrik).
- 4.5.6 Dinyatakan nyamuk telah mati apabila saat dilakukan sentuhan pada bagian *abdomen* atau bagian tubuh yang lainnya pada nyamuk *Culex sp.* dewasa tidak didapatkan pergerakan nyamuk (WHO, 2006).
- 4.5.7 Untuk menentukan *Knock Down Effect*, dinyatakan nyamuk telah lemah, jika nyamuk telah jatuh dan tidak mampu terbang lagi, meskipun masih bisa bergerak, dalam waktu paparan yang singkat (Natadisastra dan Agoes, 2009)

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah

Alat untuk ekstraksi dan evaporasi ekstrak daun seledri:

- Alat penggerus / blender

- Corong gelas
- Gelas ukur
- Labu erlemeyer atau *beaker glass* (dengan volume 1 liter) untuk merendang, bubuk ekstrak daun seledri.
- 1 set alat evaporasi : labu penampung, pendingin spiral, labu rotasi ekstraksi, *waterbath* dan vakum, klem statis, selang plastik, waterpump, bak penampung akuades, tabung penampung hasil ekstraksi.
- Oven
- Neraca analitik

Alat-alat untuk uji potensi:

- Alat injeksi 6ml
- Bak penampung akuades
- Gelas penampung hasil perasan
- Timbangan analistik
- *Freezer* / lemari es
- Pisau
- Botol akua bekas
- Sangkar plastik (100 cm x 100 cm x 60 cm)
- Alat pemanas obat nyamuk elektrik
- Gabus obat nyamuk elektrik
- *Timer*
- Gelas Ukur

4.6.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Daun seledri
- Etanol 95 % sebagai pelarut ekstrak
- Akuades
- Kertas saring
- Ekstrak daun seledri
- Nyamuk dewasa *Culex sp.*
- Gabus obat nyamuk elektrik yang di rendam alkohol 96% selama 24 jam, lalu di rendam air
- Gabus obat nyamuk elektrik yang berisi malathion 0,28g/l

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Daun seledri (*Apium graveolens L.*)

Proses ekstraksi daun seledri 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 95% sebagai pelarut. Adapun prosesnya sebagai berikut :

- Daun seledri yang akan digunakan dicuci dengan air bersih yang mengalir.
- Daun seledri tersebut setelah dicuci diiris tipis dan dikeringkan dengan sinaran matahari kemudian dimasukkan kedalam oven agar daun seledri tersebut menjadi kering sempurna dengan suhu oven 70°C.
- Setelah itu daun seledri tersebut dihaluskan dengan blender sehingga didapatkan serbuk dan ditimbang hasilnya 100 gram.
- Serbuk daun seledri tersebut dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer flask* 1 L untuk direndam dengan etanol selama 1 (satu) minggu.

- Hasil ini selanjutnya akan dievaporasi (untuk memisahkan daun seledri dengan pelarut etanol).

Proses evaporasi bertujuan untuk memisahkan hasil ekstrak yang telah didapatkan dengan pelarut etanol. Adapun prosesnya sebagai berikut :

- Evaporator dipasang pada tiang *permanent* agar dapat tergantung dengan kemiringan 30°-40°C 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 *water pump* melalui selang plastik untuk aliran air dingin.
- *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 pump*.
- *Vacuum sucker* dan *water bath* dihubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhu pada *water bath* sekitar 70°C (sesuai dengan titik didih etanol).
- Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama kurang lebih 2-3 jam.
- Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 50-60°C selama 1-2 hari.

- Hasil akhir yang berupa pasta dari daun seledri inilah yang akan digunakan dalam percobaan ini.
- Hasil ekstrak ini ditimbang dengan timbangan analitik dan akan disimpan dalam lemari es untuk memperlambat kerusakan.

4.7 Cara Kerja Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Penyiapan Larutan

Cairan pelarut ekstrak daun seledri yang digunakan adalah larutan akuades. Larutan stok ekstrak daun seledri dibuat untuk mempermudah proses penyiapan larutan uji .

4.7.2 Penyiapan Larutan Uji

Ekstrak pekat daun seledri yang tersimpan di lemari es disesuaikan suhunya dengan suhu kamar dengan cara membiarkan di udara kamar selama 15 menit dan dianggap konsentrasi 100%. Selanjutnya untuk mendapatkan 100 ml larutan stok 50% dilakukan pengenceran dengan cara 50 ml ekstrak daun seledri 100% ditambah dengan 50 ml pelarut (49,5ml akuades dan 0,5 ml aseton). Aseton digunakan sebagai emulgator.

Pembuatan larutan untuk perlakuan dibuat dengan mengencerkan larutan stok tadi kepada konsentrasi yang diinginkan dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

M_1 : Konsentrasi larutan stok yang besarnya 100%

M_2 : Konsentrasi larutan stok yang diinginkan

V_1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan

V_2 : Volume larutan perlakuan yang diperlukan

Volume akhir larutan perlakuan yang diperlukan untuk setiap konsentrasi adalah 30 ml. Jadi, setelah diambil dari larutan stok kemudian ditambahkan dengan akuades sampai mencapai volume 30 ml (Hayakawa, 2012)

4.7.3 Persiapan Nyamuk *Culex sp*

Nyamuk dewasa *Culex sp.* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari laboratorium Parasitologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Nyamuk dewasa yang telah diidentifikasi sebelumnya diletakkan dalam sangkar kaca yang telah disediakan. Dan diberikan makanan larutan air gula, hingga waktunya digunakan sebagai bahan penelitian.

4.7.4 Penelitian Pendahuluan

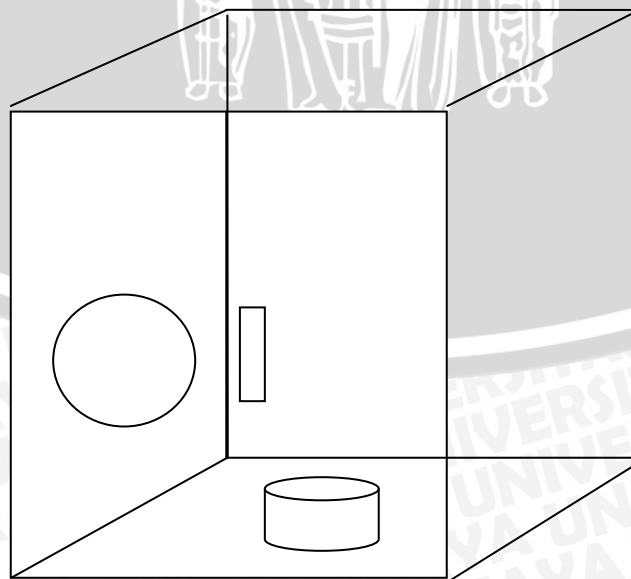
Pada penelitian pendahuluan, digunakan konsentrasi 10 %, 20 %, 30%, 40 %, dan 50 %. Konsentrasi yang berhasil membunuh 100% nyamuk hanya konsentrasi 50% pada waktu pengamatan 24 jam. Pada waktu pengamatan 24 jam, Konsentrasi 10% membunuh 36 %, konsentrasi 20% membunuh 52%, konsentrasi 30% membunuh 60% dan konsentrasi 40% membunuh 72%.

Sehingga, ditentukan konsentrasi penelitian pada penentuan awal konsentrasi terendah yang mempunyai awal kematian nyamuk (p,q,r,s) adalah 5%, 6,25%, 7,5% dan 10%. Konsentrasi penelitian pada penelitian untuk menentukan potensi 100%, adalah pada 30%, 40% dan 50%. Dan penelitian untuk mengetahui *knockdown effect*, digunakan konsentrasi 70%, 80%, dan 90%.

4.7.5 Uji Potensi Insektisida

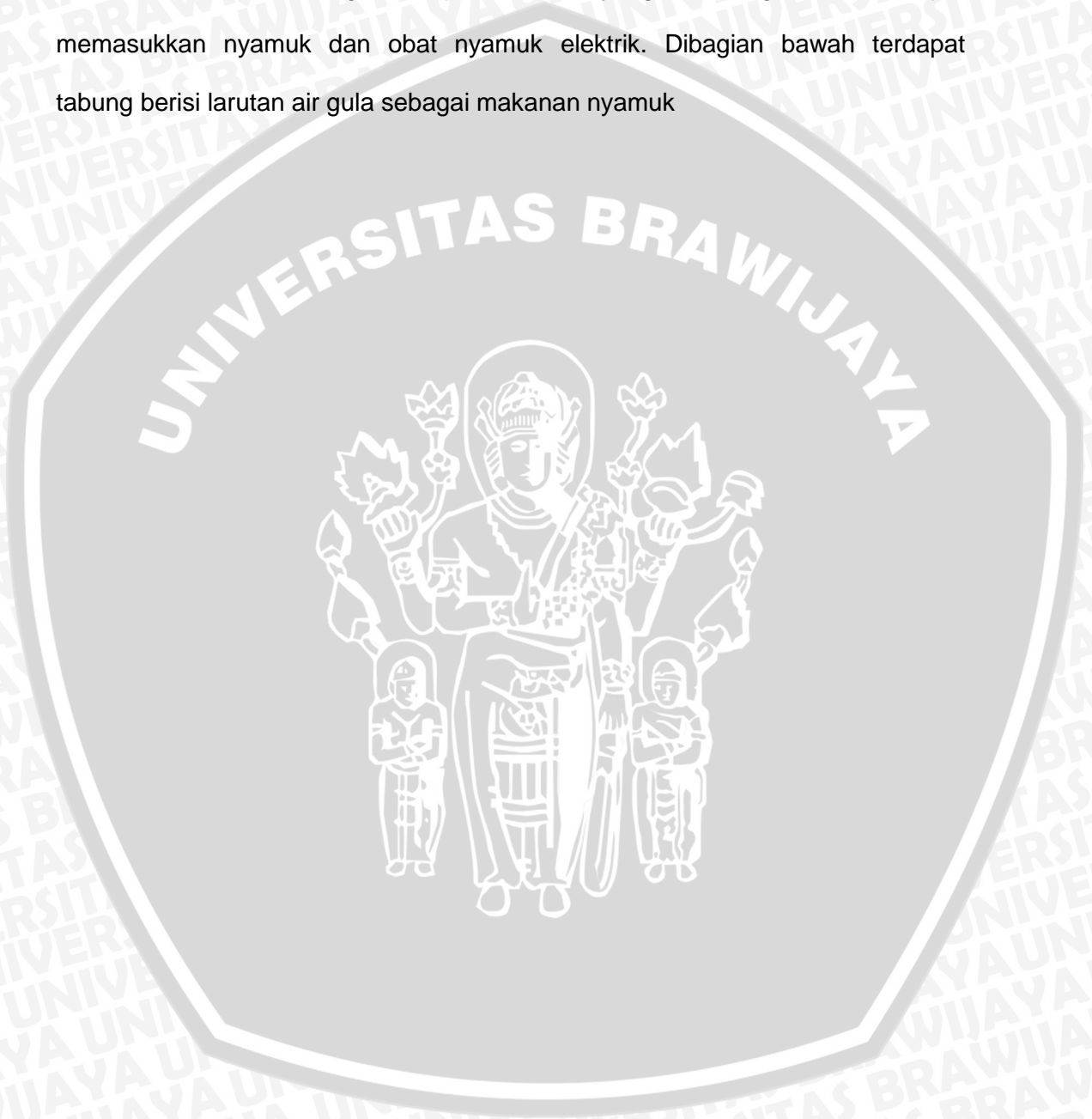
Percobaan dilakukan dengan menggunakan 5 buah kotak plastik berbentuk bujur sangkar berukuran 100x100x60 cm³ yang diletakkan diruang penelitian laboratorium parasitologi lantai 1. Pertama menyiapkan ekstrak daun

seledri dengan konsentrasi 5%; 6,25%; 7,5%; 10%, rendam gabus obat nyamuk elektrik yang sudah steril ke setiap ekstrak. Lalu menyiapkan gabus kontrol positif (malathion 0,28 %) dan gabus kontrol negatif (akuades) dan gabus yang telah di rendam larutan ekstrak daun seledri. Masing-masing gabus dimasukan ke dalam obat nyamuk elektrik, kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing kandang lalu dihubungkan dengan aliran listrik 220V sehingga indikator akan menyala tanda perlindungan terhadap gangguan nyamuk telah bekerja. Kandang 1 menggunakan gabus berisi larutan dan malathion 0,28g/l (kontrol positif), kandang 2 menggunakan akuades sebanyak 3 ml (kontrol negatif), kandang 3 menggunakan gabus berisi ekstrak daun seledri 5%, kandang 4 menggunakan gabus berisi ekstrak daun seledri 7,5%, kandang 5 menggunakan gabus berisi ekstrak daun seledri 10%. Jumlah nyamuk yang mati pada setiap perlakuan dihitung setelah pengaktifan elektrik pada Jam ke-1, jam ke-2, jam ke-3, jam ke-4, jam ke-5, jam ke-6, jam ke-24. Kemudian diulangi untuk konsentrasi 30%;40%;50%;70%;80%;dan 90% untuk menentukan konsentrasi yang memiliki *knockdown effect*. Dan dilakukan pengamatan pada konsentrasi 70%

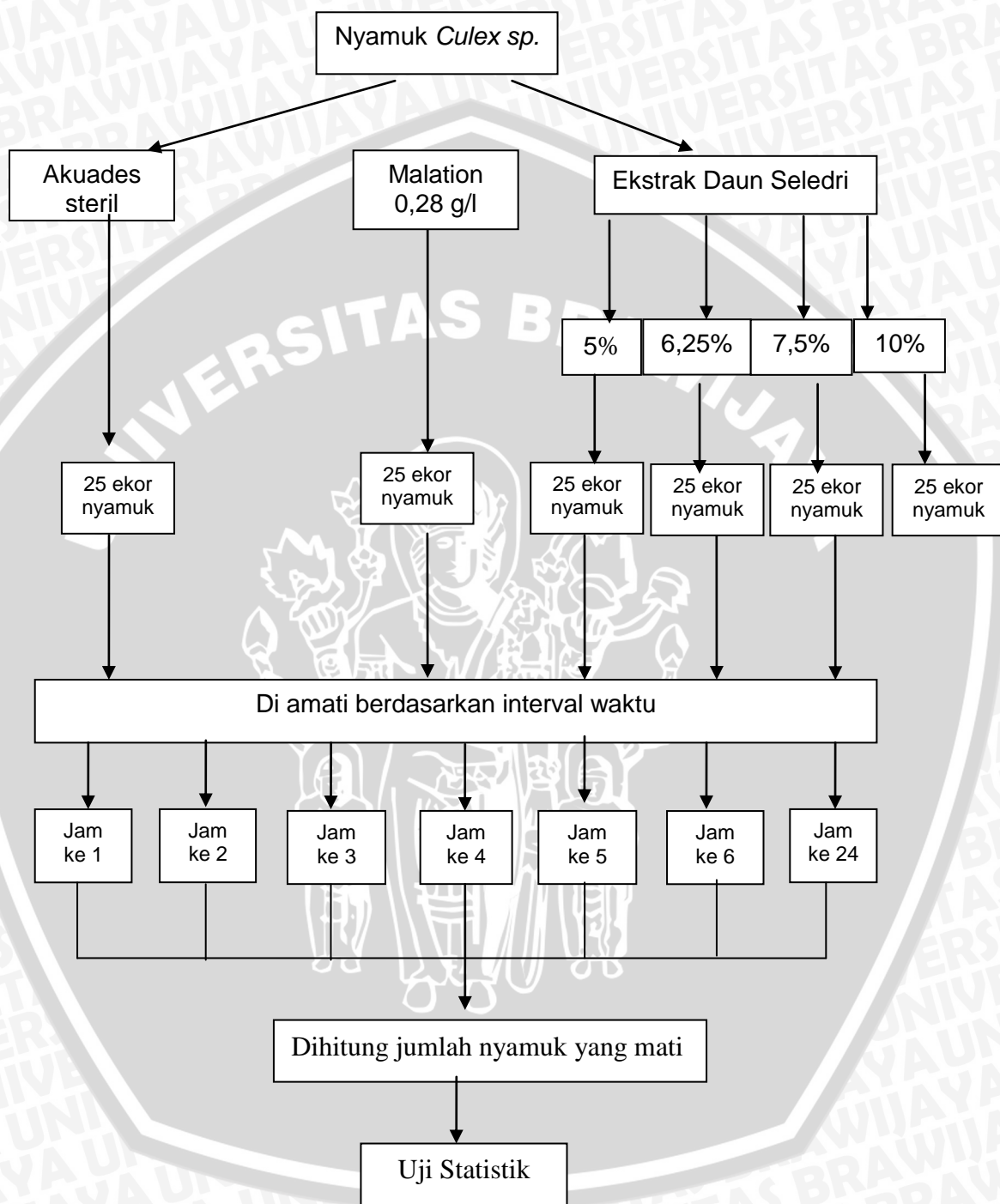


Keterangan :

Kotak berukuran 100 cm x 100 cm x 60 cm yang tertutup kaca pada semua sisi kecuali bagian depan kanan yang dilubangi untuk tempat memasukkan nyamuk dan obat nyamuk elektrik. Dibagian bawah terdapat tabung berisi larutan air gula sebagai makanan nyamuk



Skema Alur Kerja Penelitian



Keterangan :

Akuades steril : sebagai kontrol negatif

Malathion 0,28 % : sebagai kontrol positif



4.7.6 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada jam ke-1, jam ke-2, jam ke-3, jam ke-4, jam ke-5, jam ke-6, jam ke-24. Keadaan semua kelompok perlakuan diamati untuk mencari perubahan jumlah nyamuk yang hidup. Jumlah nyamuk yang mati dihitung dan dimasukkan dalam tabel.

4.7.7 Pengumpulan Data

Data hasil yang telah diperoleh dari pengamatan dimasukkan dalam tabel dan diklasifikasikan menurut perlakuan, jumlah nyamuk yang mati, dan waktu pengulangan. Dari tabel tersebut, hasilnya akan dianalisis dan dimasukkan dalam perhitungan statistik.

4.7.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan adalah jumlah nyamuk yang mati untuk setiap perlakuan setelah pengamatan jam. Analisis data yang digunakan adalah uji asumsi data (normalitas dan homogenitas), uji beda (ANOVA) dan uji lanjutan Post Hoc Tuckey dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product Service Solution*)