

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

2.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian experimental laboratoris dengan rancangan *True Experimental / post-test only control group design*, yang bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak daun mimba (*Azadirachta Indica*) sebagai Insektisida pada nyamuk *Aedes aegypti*.

2.2. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah nyamuk dewasa *Aedes aegypti* yang dikolonisasi di Laboratorium *Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga Surabaya dalam bentuk larva berjumlah kurang lebih 1200 larva dengan umur larva pada instar III atau umur 5-6 hari. Larva *Aedes aegypti* yang disediakan oleh Laboratorium Tropical Disease Center Universitas Airlangga Surabaya ini kemudian dirawat sampai mencapai stadium nyamuk dewasa di Laboratorium Parasitologi Universitas Brawijaya. Besar sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 500 nyamuk *Aedes aegypti* sehingga untuk setiap kali perlakuan masing masing 25 nyamuk *Aedes aegypti* pada tiap jumlah konsentrasi dan kontrol. Cara pengambilan sampel menggunakan metode acak sederhana (*simple random sampling*) yaitu setiap anggota atau unit dari populasi mempunyai kesempatan yang sama untuk diseleksi sebagai sampel.

2.3. Jumlah Pengulangan

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok coba dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 3%, 4%, dan 5% serta Malathion 0,28% sebagai kontrol positif dan Aseton 1% sebagai kontrol negatif.

Estimasi jumlah pengulangan pada setiap kelompok perlakuan dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut :

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

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

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

$$n-1 \leq 16/5$$

$$n-1 \leq 3.2$$

$$n \leq 4,2 \sim 4$$

Keterangan : p : jumlah perlakuan yang dilakukan
n : jumlah pengulangan

Dari hasil perhitungan di atas didapatkan bahwa pengulangan yang akan dilakukan dalam penelitian ini minimal adalah 4 kali. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian adalah sebanyak : $4 \times 5 \times 25 = 500$ ekor nyamuk dewasa *Aedes aegypti*.

Kriteria Inklusi yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Nyamuk *Aedes aegypti* yang hidup.

Kriteria Eksklusi yang termasuk dalam penelitian ini adalah :

- Nyamuk *Aedes aegypti* yang telah mati sebelum percobaan dilakukan
- Nyamuk *Aedes aegypti* yang tidak aktif bergerak

2.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang bulan Juni sampai Juli 2013.

2.5. Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel Bebas : Konsentrasi ekstrak daun mimba (skala numerik)

Variabel Terikat : Jumlah nyamuk *Aedes aegypti* yang mati (skala numerik)

2.6. Alat dan Bahan Penelitian

2.6.1. Alat Penelitian

Terdapat 2 alat yang digunakan dalam penelitian ini, pertama adalah alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun mimba, yang kedua adalah alat yang digunakan untuk uji ekstrak daun mimba terhadap nyamuk dewasa *Aedes aegypti*.

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun mimba :

1. Blender / Alat penggerus
2. Gelas ukur
3. Alat evaporasi
4. Klem statis
5. Neraca analitik
6. Kain penyaring
7. Kapas
8. *Water Bath*
9. *Water Pump*
10. Botol
11. Oven
12. Lemari es / *Freezer*

Alat yang digunakan uji ekstrak daun mimba terhadap nyamuk dewasa *Aedes aegypti* :

1. Kandang (25 cm x 25 cm x 25 cm)
2. *Sprayer*
3. Gelas ukur
4. *Timer*
5. Lidi

Alat-alat untuk persiapan nyamuk *Aedes aegypti*

1. Botol plastik 1 liter
2. Kotak nyamuk

2.6.2. Bahan Penelitian

Terdapat 2 kelompok bahan yang digunakan dalam penelitian ini, kelompok pertama adalah bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak, kelompok kedua adalah bahan yang digunakan untuk uji ekstrak daun mimba terhadap nyamuk *Aedes aegypti*.

1. Bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun mimba :
 - a. Daun mimba
 - b. Etanol sebagai pelarut ekstrak
 - c. Kertas saring
2. Bahan yang digunakan untuk uji ekstrak daun mimba :
 - a. Ekstrak daun mimba
 - b. Nyamuk dewasa *Aedes aegypti*
 - c. Malathion sebagai kontrol positif
 - d. Aseton sebagai kontrol negatif

2.7. Definisi Operasional

- a. *True experimental-post test only control group design* : merupakan rancangan penelitian yang dilakukan randomisasi pada sampel sehingga kelompok kontrol dan eksperimen dianggap sama sebelum diberi perlakuan dan tidak diadakan *pre-test*.
- b. Variabel bebas adalah variabel yang dapat memberikan perubahan pada variabel dependen bila variabel ini diubah, sedangkan variabel dependen adalah variabel yang dapat berubah akibat perubahan variabel bebas.
- c. Daun mimba yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dengan membeli di pasar bebas di Surabaya.
- d. Kontrol positif dalam penelitian ini adalah larutan malathion 0,28 %, sedangkan kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah Aseton 1 %.
- e. Potensi insektisida adalah data kematian nyamuk yang telah diolah dengan menggunakan formula *Abbot*.

$$A^1 = \frac{A - B}{100 - B} \times 100 \%$$

Keterangan :

A¹ : persentase kematian setelah koreksi

A : persentase kematian nyamuk uji

B : persentase kematian nyamuk kontrol negatif

- f. Ekstrak daun mimba : Hasil ekstrak tersebut berupa ekstrak cair diperoleh dari akhir proses evaporasi (setelah pelarut etanolnya dihilangkan).
- g. Efek insektisida : Diperoleh dengan cara menganalisis semua kelompok.
- h. Perlakuan 24 jam : Didasarkan atas studi pendahuluan.
- i. Nyamuk dewasa *Aedes aegypti* : Nyamuk dewasa yang memiliki ukuran sesuai dengan stadium dewasa.
- j. Nyamuk dewasa dinyatakan mati bila dilakukan sentuhan bagian pada tubuh tidak didapatkan pergerakan .
- k. Uji One-Way ANOVA : Uji untuk mengetahui apakah ada perbedaan efek antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.
- l. Uji Korelasi : Uji untuk mengetahui kekuatan hubungan antara 2 variabel.
- m. Uji Regresi : Uji untuk memperkirakan jumlah nyamuk *Aedes aegypti* mati akibat pemberian ekstrak daun mimba.

2.8. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Daun Mimba
 - a. Daun mimba yang telah dilayukan digerus / diblender.
 - b. Hasil blenderan ditimbang menggunakan neraca analitik.
 - c. Setelah ditimbang, serbuk hasil blenderan di masukkan kedalam kertas saring, kemudian di rendam dengan etanol sampai terendam dalam pelarut etanol selama kurang lebih 1 minggu.
 - d. Hasilnya kemudian di evaporasi untuk menghilangkan etanol.
 - Evaporasi Hasil Ekstraksi Daun Mimba

Proses evaporasi meliputi :

- a. Alat evaporasi dirangkai sehingga membentuk sudut 300-400.
- b. Hasil rendaman etanol dipindahkan ke labu pemisah / labu evaporasi.

- c. Labu pemisah evaporasi dihubungkan pada bagian evaporator, pendingin spiral dihubungkan dengan vakum oleh selang plastik, pendingin spiral dihubungkan dengan water pump oleh selang plastik.
- d. Hasil penguapan etanol akan di alirkan menuju labu penampung etanol sehingga terpisah dengan hasil evaporasi, sedangkan uap yang lain disedot dengan alat pompa vakum.
- e. Water Pump di tempatkan dalam bak yang berisi aquades, kemudian dihubungkan dengan sumber listrik sehingga aquades akan mengalir menuju pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan rata).
- f. Satu set alat evaporasi diletakkan, sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada water bath.
- g. Vakum dan water bath dihubungkan dengan sumber listrik dan pada water bath suhu dinaikkan 700-800^oC (sesuai dengan titik didih etanol).
- h. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi terpisah dalam labu pemisah ekstraksi, kemudian dioven dalam suhu 500-600^oC selama 3 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa.
- i. Hasil evaporasi kemudian ditimbang dengan timbangan analitik. Hasil ini yang akan digunakan dalam percobaan.

2. Pembuatan Larutan Stok

Untuk membuat larutan stok dengan konsentrasi 100 % adalah hasil langsung dari pembuatan ekstrak daun mimba di atas.

3. Penelitian pendahuluan

Sebelum dilakukan penelitian, dilakukan terlebih dahulu penelitian pendahuluan untuk mendapatkan konsentrasi larutan daun mimba yang efektif. Penelitian pendahuluan ini bersifat trial dan error untuk mendapatkan konsentrasi efektif. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2,5%; 3%; 4%; 5%; 6%; 7,5%. Dari hasil penelitian pendahuluan ini didapatkan bahwa konsentrasi efektifnya adalah 5%, karena merupakan konsentrasi minimal yang dapat membunuh semua nyamuk dalam 24 jam. Konsentrasi efektif ini akan dijadikan dasar dalam menetapkan 3 variasi konsentrasi dalam penelitian

4. Pembuatan Konsentrasi Larutan Perlakuan

Dalam penelitian ini terdapat 2 kelompok yakni kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, untuk kelompok negatif digunakan aseton 1% sebagai perlakuan, kontrol positif yang digunakan adalah malathion 0,28% sebagai pembanding. Sedangkan untuk kelompok perlakuan terdapat 3 macam perlakuan dengan konsentrasi yang berbeda-beda.

Untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan tersebut digunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

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

Keterangan :

M1 : Konsentrasi larutan stok yang besarnya 100%

M2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan

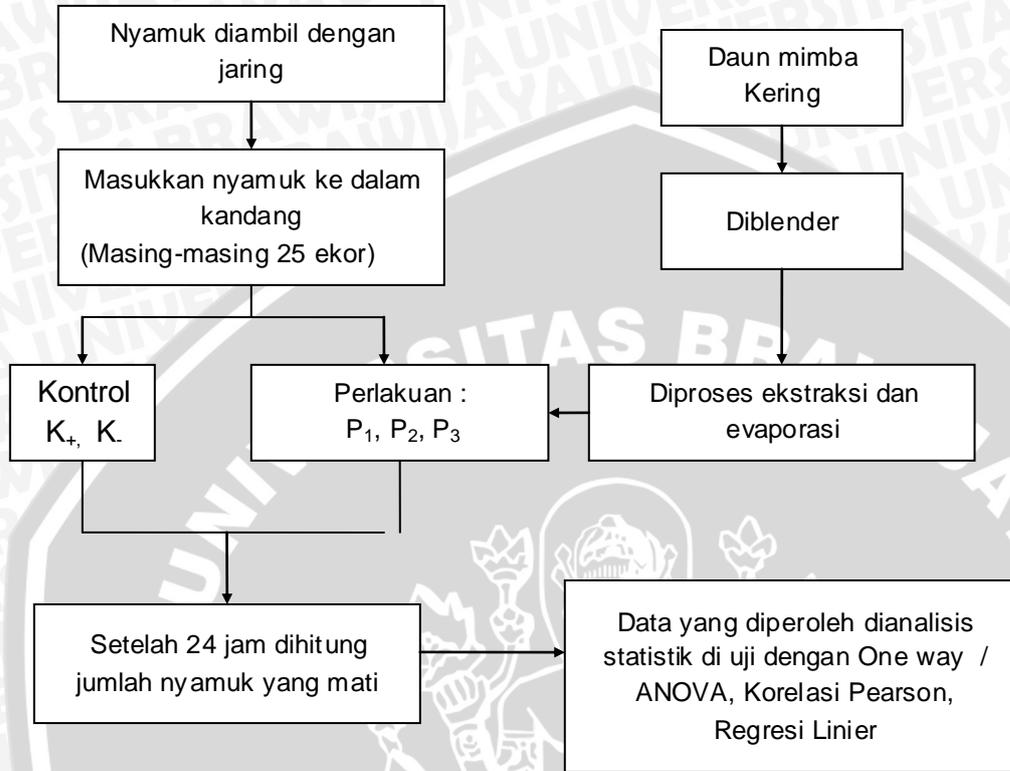
V1 : Volume larutan stok yang harus diencerkan

V2 : Volume larutan perlakuan sebesar 10 ml

2.9. Cara Kerja Penelitian

- Menyiapkan 5 kandang untuk uji insektisida.
- Menyiapkan alat-alat yang akan digunakan untuk membuat larutan penguji.
- Menyiapkan larutan uji dengan konsentrasi 3%, 4%, 5%, kontrol positif dan kontrol negatif pada sprayer.
- Menyemprotkan masing-masing larutan kedalam kandang nyamuk yang terpisah sebanyak 3 ml.
- Memasukkan nyamuk *Aedes aegypti* dewasa sebanyak 25 ekor ke dalam masing-masing kandang yang akan diteliti.
- Mengamati jumlah nyamuk yang mati pada setiap perlakuan dihitung setelah memasukkan nyamuk pada jam ke-1, ke-2, ke-3, ke-4, ke-5, ke-6, dan jam ke-24.
- Percobaan ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak masing-masing 4 kali pada setiap perlakuan.

2.10. Diagram Alur Penelitian



- K- : Pemberian aseton 1% pada nyamuk dewasa
- K+ : Pemberian malathion pada nyamuk dewasa
- P₁ : Pemberian ekstrak daun mimba dengan konsentrasi 3%
- P₂ : Pemberian ekstrak daun mimba dengan konsentrasi 4%
- P₃ : Pemberian ekstrak daun mimba dengan konsentrasi 5%

2.11. Pengolahan dan Analisis Data

Data yang dikumpulkan diolah dalam bentuk tabulasi, frekuensi dalam bentuk angka mutlak untuk selanjutnya dianalisis dengan menggunakan uji korelasi Pearson untuk mengetahui adanya korelasi tiap dosis ekstrak daun mimba dan dalam mematikan nyamuk *Aedes aegypti*, uji One Way ANOVA untuk mengetahui perbedaan konsentrasi ekstrak daun mimba. Data kematian nyamuk akan diolah dengan menggunakan formula Abbot menjadi data potensi insektisida yang disajikan dengan bentuk tabel. Analisis data dengan tersebut didapatkan dengan menggunakan program SPSS versi 20

Uji Anova digunakan untuk :



1. Menguji apakah rata-rata lebih dari dua sampel berbeda secara signifikan (nyata) atau tidak.
2. Menguji apakah dua buah sampel mempunyai varians (keragaman) populasi yang sama atau tidak

Syarat yang harus dipenuhi dalam menggunakan uji Anova adalah sebagai berikut

:

1. Skala pengukuran variabel harus variabel numerik
2. Sebaran data : sebaran data harus normal
3. Varians data :
 - a. Kesamaan varians tidak menjadi syarat untuk uji kelompok yang berpasangan.
 - b. Kesamaan varians adalah syarat mutlak untuk 2 kelompok tidak berpasangan artinya, varians tidak boleh sama boleh juga berbeda.
 - c. Kesamaan varians adalah syarat mutlak untuk lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan artinya, varians data harus wajib sama (Dahlan, 2006).

Hipotesis ditentukan berdasarkan nilai signifikansi yang diperoleh. Jika nilai signifikansi $> 0,05$ H_0 diterima dan H_1 ditolak, tetapi bila nilai signifikansi $< 0,05$ berarti H_0 ditolak dan H_1 diterima. Jika H_1 diterima maka langkah selanjutnya adalah dengan melakukan uji perbandingan berganda atau Post Hoc test dengan cara turkey, yaitu untuk mengetahui secara lebih rinci pasangan kelompok perlakuan pada setiap waktu pengamatan yang saling berbeda secara signifikan dan yang tidak berbeda secara signifikan.

Analisa selanjutnya adalah analisis korelasi Pearson. Uji statistik ini untuk menunjukkan keeratan hubungan (korelasi) antara konsentrasi ekstrak dengan potensi insektisida pada setiap waktu pengamatan. Kemudian melakukan uji Regresi Linier, yaitu Uji yang berguna untuk mengetahui pengaruh dan model persamaan sebagai estimasi dalam memperkirakan potensi insektisida pada tiap konsentrasi dan tiap waktu pengamatan dan apakah hubungannya dapat dijadikan sebuah persamaan linier.