

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true eksperimental-post test only controlling group design* yang bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan potensi beberapa konsentrasi ekstrak daun Ceremai (*Phyllanthus acidus*).

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Populasi

Sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk dewasa *Culex sp.* yang memenuhi kriteria *inklusi*. Kriteria *inklusi* dalam penelitian ini adalah semua nyamuk *Culex sp.* dewasa yang masih hidup dan aktif bergerak. Sedangkan kriteria *eksklusi* dalam penelitian ini adalah nyamuk *Aedes aegypti*, *Anopheles*, *Mansonia*.

##### 4.2.2 Sampel

###### 4.2.2.1 Estimasi Besar Sampel

Populasi penelitian ini adalah nyamuk *Culex sp.* dewasa yang diperoleh dari laboratorium parasitologi. Pada percobaan ini akan digunakan 25 ekor nyamuk per kandang (WHO,1996). Penelitian ini menggunakan 3 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda, serta 1 kontrol positif yang mana diberikan malathion 0,28 % dan 1 kontrol negatif yang mana diberi aquades, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini

dihitung dengan rumus  $P(n-1) \geq 15$ . Berdasarkan rumus tersebut hubungannya jumlah pengulangan adalah sebagai berikut (Lukito, 1998):

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

$n$  = jumlah pengulangan

$p$  = jumlah perlakuan (konsentrasi ekstrak daun ceremai)

Berdasarkan rumus diatas jadi jumlah pengulangan yang dilakukan adalah 4 kali. Jumlah sampel nyamuk dewasa yang digunakan adalah 25 ekor untuk setiap kelompok perlakuan (WHO,2006). Sehingga pada penelitian ini dibutuhkan 500 ekor nyamuk. Kemudian nyamuk-nyamuk tersebut dimasukan ke dalam kandang khusus yang telah disiapkan untuk penelitian ini. Terdapat lima kelompok perlakuan dalam penelitian ini meliputi 3 perlakuan dan 2 kontrol, yaitu :

- Kontrol negatif : Disemprot dengan *aquades*.
- Kontrol positif : Disemprot dengan komponen *malathion* 0,28%
- Perlakuan 1 : Disemprot dengan ekstrak daun Ceremai konsentrasi 15%
- Perlakuan 2 : Disemprot dengan ekstrak daun Ceremai konsentrasi 20%

- Perlakuan 3 : Disemprot dengan ekstrak daun Ceremai konsentrasi 25%

#### 4.2.2.2 Karakteristik Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah:

- a. Nyamuk dewasa *Culex sp.* 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 penelitian ini adalah ekstrak daun ceremai dengan 3 konsentrasi yaitu 15%, 20%, 25%.

##### 4.3.1.2 Variabel Tergantung (*Dependent*)

Variabel tergantung penelitian ini adalah jumlah nyamuk *Culex sp.* yang mati setelah dimasukkan dalam kandang yang telah disemprot dengan pemberian insektisida ekstrak daun ceremai dengan konsentrasi yang berbeda. Nyamuk *Culex sp.* mati adalah nyamuk yang tidak aktif bergerak dengan pemberian rangsang sentuhan.

#### 1.3.2 Definisi Operasional

1. Ekstrak daun ceremai adalah hasil ekstraksi berupa cairan kental yang diperoleh dari akhir proses evaporasi (setelah pelarut etanolnya dihilangkan).

2. Nyamuk *Culex sp.* yang dipakai dalam penelitian ini adalah nyamuk dewasa *Culex sp.* yang ditangkap dengan menggunakan botol plastik pada malam hari dan dengan kunci identifikasi dengan melihat cara hinggapnya (sejajar dengan bidang hinggapnya), warnanya coklat atau hitam dan ukurannya besar.
3. Metode semprot yang digunakan dalam penelitian dilakukan dengan menyemprotkan ekstrak daun ceremai berbagai konsentrasi yang dimasukkan dalam botol *sprayer* pada dinding-dinding kandang nyamuk *Culex sp.* dari jarak 25 cm yaitu pada lubang untuk tempat tangan masuk ke kandang tersebut.
4. Potensi insektisida adalah di saat nyamuk jatuh ke dasar kandang dan tidak aktif atau tidak bergerak pada saat diberikan rangsangan sentuh yang selanjutnya diolah dengan menggunakan formula *Abbot*.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada tanggal 7 sampai 16 Juli 2014.

#### 4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

##### 4.5.1 Bahan Penelitian

##### 4.5.1.1 Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus*)

- Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus*) yang telah dikeringkan
- Pelarut ekstrak (etanol 96%)
- Aquades
- Kertas saring

#### 4.5.1.2 Bahan untuk Persiapan Nyamuk *Culex sp.*

- Larutan glukosa digunakan untuk makanan nyamuk *Culex sp.* selama penelitian

#### 4.5.1.3 Bahan untuk Uji Potensi Ekstrak Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus*) terhadap Nyamuk *Culex sp.*

- Larutan ekstrak daun ceremai dengan konsentrasi 15%, 20%, dan 25% sebanyak 4 ml.
- Nyamuk *Culex sp.*
- Aquades
- Larutan malathion 0,28%

#### 4.5.2 Instrumen Penelitian

##### 4.5.2.1 Instrumen Pembuatan Ekstrak Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus*)

- Botol hasil ekstrak
- Oven
- Blender untuk menghaluskan daun ceremai
- Timbangan
- Gelas Erlenmeyer
- Corong gelas
- Labu evaporator
- Labu penampung etanol
- Evaporator
- *Rotatory evaporator*
- Selang *water pump*

- *Water pump*
- *Water bath*
- *Vacuum pump*

#### 4.5.2.2 Instrumen untuk Persiapan Nyamuk Dewasa *Culex sp.*

- Sangkar kaca (25 cm x 25 cm x 25 cm)
- Jaring seranga

#### 4.5.2.3 Instrumen Uji Potensi Insektisida Ekstrak Daun Ceremai

##### Terhadap Nyamuk *Culex sp.*

- Sangkar kaca (25 cm x 25 cm x 25 cm)
- 5 buah *Sprayer*
- Gelas ukur
- *Sput*
- *Stopwatch*

#### 4.6 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

##### 4.6.1 Pembuatan Ekstrak Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus*)

Pada penelitian ini, bahan uji yang digunakan adalah ekstrak daun ceremai. Pada ekstraksi daun ceremai, digunakan etanol 96%, pemelihan pelarut dengan konsentrasi 96% karena pada konsentrasi tersebut etanol sudah hampir seluruhnya melarutkan senyawa aktif yang terkandung di dalam daun ceremai. Metode Ekstraksi yang digunakan adalah Maserasi.

(Ansel, 1989)

### Proses Pengeringan

1. Mencuci bersih daun ceremai yang sudah disediakan dari Materia Medica sebanyak 5 kg (sampel basah)
2. Daun ceremai dipotong kecil-kecil
3. Daun ceremai yang telah dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan (bebas kandungan air)

### Proses Ekstraksi

1. Setelah kering, sampel dihaluskan dengan blender.
2. Bubuk daun ceremai ditimbang dengan menggunakan timbangan sebanyak 1 kg kemudian dimasukkan dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter.
3. Kemudian direndam di dalam larutan etanol 96% sampai volume 900 ml dan dikocok sampai benar-benar tercampur ( $\pm$  30 menit)
4. Didiamkan selama 1 malam sampai mengendap.

### Proses Evaporasi

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

1. Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan  $30^{\circ}$ - $40^{\circ}$  terhadap meja percobaan.
2. Hasil rendaman etanol yang berupa larutan dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi.
3. Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah evaporator, pendingin spiral dihubungkan dengan vakum dengan selang plastik, pendingin spiral dihubungkan dengan *water pump* dengan selang plastik yang dialiri air dingin.

4. *Water pump* ditempatkan dalam bak yang berisi aquades, *water pump* dihubungkan dengan sumber listrik sehingga aquades akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan rata).
5. Satu set evaporasi diletakkan sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *water bath*.
6. Vakum dan *water bath* dihubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhu pada *water bath* sekitar 70°C (sesuai dengan titik didih etanol).
7. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama kurang lebih 2-3 jam.
8. Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 50-60°C selama 1-2 hari.
9. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam percobaan.
10. Hasil ekstrak ini ditimbang dengan timbangan analitik dan disimpan dalam lemari es untuk memperlambat kerusakan.

#### 1.6.2 Persiapan Larutan Uji

Sebelum melakukan pengenceran, dilakukan pencampuran untuk mendapatkan aseton 1% di dalam aquades. Kegunaan aseton adalah untuk membantu melarutkan ekstrak daun ceremai di dalam aquades. Kemudian, untuk mendapatkan campuran aseton dan aquades yang diinginkan dapat digunakan rumus

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

Keterangan :

$M_1$  : Konsentrasi aseton (90%)

$V_1$  : Volume aseton

$M_2$  : Konsentrasi aseton yang diinginkan (1%)

$V_2$  : Volume campuran aseton

Cara menghitung pengenceran aseton 90 % menjadi 1 % sebagai berikut:

$$90 \times V_1 = 1 \times 40 \text{ ml (sesuai kebutuhan)}$$

$$V_1 = 40/90$$

$$V_1 = 0,4 \text{ ml aseton}$$

$$\text{Aquades} = 40 \text{ ml} - 0,4 \text{ ml}$$

$$= 39,6 \text{ ml}$$

Sehingga aseton 0,4 ml volume aquades yang dibutuhkan untuk pengenceran 39,6 ml

Sedangkan untuk kelompok perlakuan terdapat 3 macam perlakuan dengan dosis yang berbeda-beda. Dosis yang akan dipergunakan adalah 15%, 20%, dan 25%. Untuk mendapatkan dosis yang diinginkan tersebut digunakan rumus pengenceran sebagai berikut :

$$\mathbf{M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2}$$

Keterangan :

$M_1$  : Konsentrasi ekstrak daun ceremai

$V_1$  : Volume ekstrak daun ceremai

$M_2$  : Konsentrasi ekstrak daun ceremai yang diinginkan

$V_2$  : Volume campuran ekstrak daun ceremai

Cara perhitungan pengenceran larutan uji adalah sebagai berikut:

Konsentrasi 25%

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

$$100 \times V1 = 25 \times 4$$

$$V1 = 100/100$$

$$V1 = 1 \text{ ml (ekstrak daun ceremai)}$$

Sehingga larutan aseton yang dibutuhkan adalah  $4 \text{ ml} - 1 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$

Konsentrasi 20%

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

$$100 \times V1 = 20 \times 4$$

$$V1 = 80/100$$

$$V1 = 0,8 \text{ ml (ekstrak daun ceremai)}$$

Sehingga larutan aseton yang dibutuhkan adalah  $4 \text{ ml} - 0,8 \text{ ml} = 3,2 \text{ ml}$

Konsentrasi 15%

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

$$100 \times V1 = 15 \times 4$$

$$V1 = 60/100$$

$$V1 = 0,6 \text{ ml (ekstrak daun ceremai)}$$

Sehingga larutan aseton yang dibutuhkan adalah  $4 \text{ ml} - 0,6 \text{ ml} = 3,4 \text{ ml}$

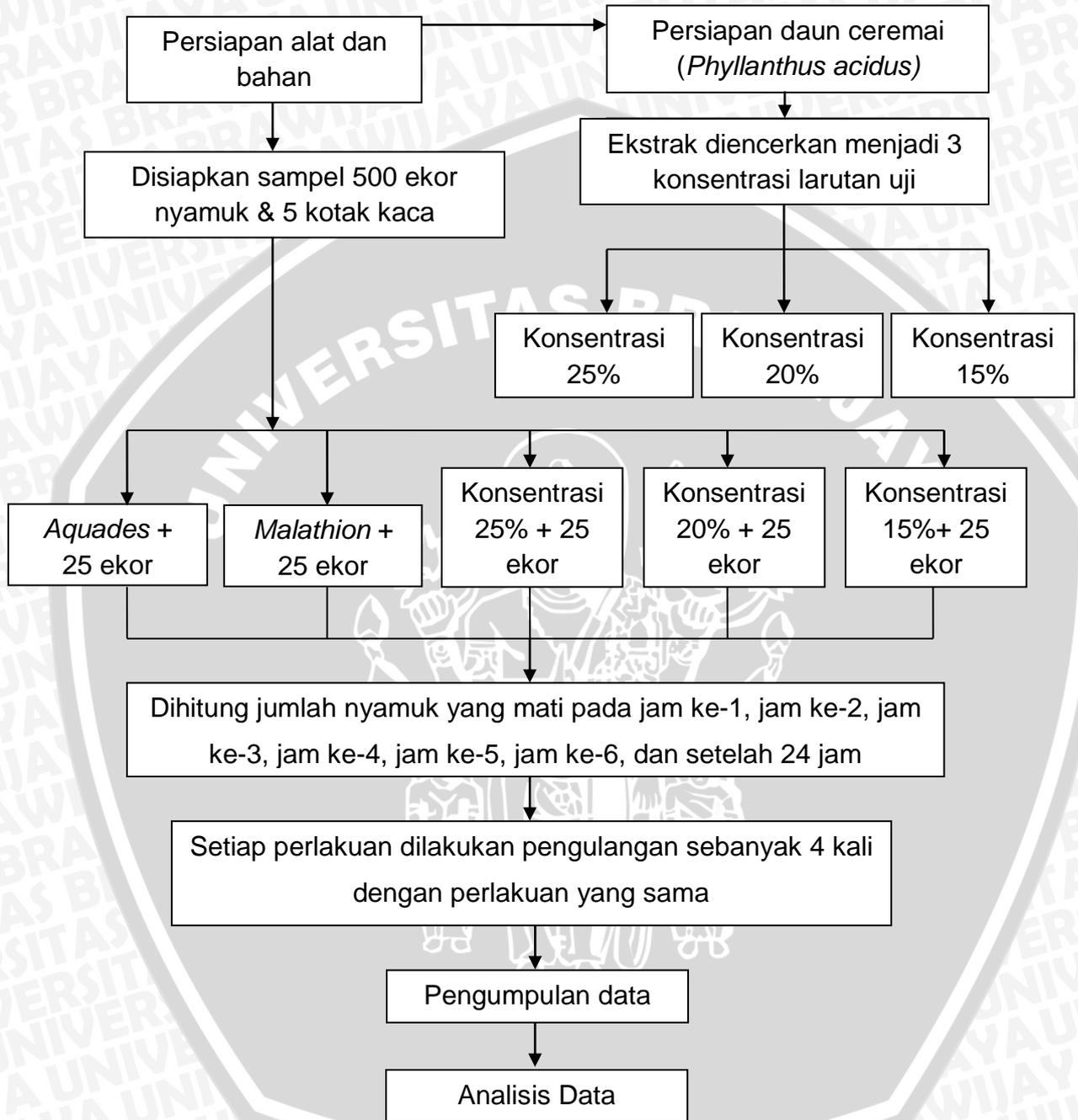
#### 4.6.4 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan bersifat *trial and error* yang bertujuan untuk memperoleh konsentrasi minimal ekstrak daun ceremai yang dapat membunuh nyamuk *Culex sp.* dalam jumlah maksimal. Setelah melakukan proses eksplorasi, pemilihan konsentrasi ekstrak daun ceremai yang digunakan yaitu 15%, 20%, 25%.

#### 4.6.5 Pelaksanaan Penelitian

1. Mempersiapkan kandang untuk tempat perindukan nyamuk *Culex* sp. berukuran 25x25x25 cm.
2. Siapkan larutan dengan konsentrasi 15%, 20%, 25% serta kontrol positif dan kontrol negatif.
3. Kandang 1 disemprot dengan *aquades* sebagai kontrol negatif.
4. Dilanjutkan kandang 2 dilakukan penyemprotan *malathion* 0,28% sebagai kontrol positif.
5. Penyemprotan kandang 3 dengan ekstrak daun ceremai konsentrasi 15%
6. Penyemprotan kandang 4 dengan ekstrak daun ceremai konsentrasi 20%
7. Penyemprotan kandang 5 dengan ekstrak daun ceremai konsentrasi 25%
8. Siapkan nutrisi untuk nyamuk *Culex* sp. berupa air gula yang diletakkan di kapas dan plastik, kemudian dimasukkan ke dalam kandang setelah kandang di semprot.
9. Lakukan pengamatan setiap jam ke-1, 2, 3, 4, 5, 6, dan jam ke-24. Hitung jumlah nyamuk *Culex* sp. yang mati.
10. Penelitian ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali untuk setiap perlakuan.

4.6.6 Diagram Alur Penelitian



Gambar 2.7 Diagram Alur Penelitian

#### 4.6.7 Pengumpulan Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan adalah jumlah nyamuk yang mati untuk setiap perlakuan setelah pengamatan waktu. Data kematian nyamuk *Culex sp.* akan diolah dengan menggunakan formula *Abbot* menjadi data potensi insektisida yang disajikan dalam bentuk tabel.

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

#### 4.8 Metode Analisis Data

Hasil penelitian ini dianalisis menggunakan analisis statistik SPSS versi 18 untuk windows. Sebelum dianalisis dalam *One-way ANOVA* dilakukan beberapa test sebagai syarat agar data dapat dianalisis dengan *One-way ANOVA* yaitu *test of homogeneity of variance* menunjukkan data memiliki varian yang homogen dan pada uji statistik *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan data memiliki distribusi yang normal, jika kedua syarat terpenuhi maka *One-way ANOVA* dapat digunakan untuk menganalisa data. Setelah mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan maka dapat dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey HSD* untuk mengetahui perbandingan berbeda nyata atau tidak antara masing-masing komponen lama waktu dan konsentrasi. Jika salah satu syarat atau kedua syarat tidak terpenuhi maka *One-way ANOVA* tidak dapat digunakan dan selanjutnya data dianalisis

menggunakan uji beda non parametrik *Kruskal Wallis*. Maka akan diketahui perbedaan potensi diantara berbagai perlakuan. Dalam penelitian ini, besar interval kepercayaan yang dipakai adalah 95% untuk tingkat signifikansi ( $\alpha$ ) = 0.05. Uji statistik korelasi bertujuan untuk menentukan kekuatan dan arah hubungan antara ekstrak daun ceremai (*Phyllanthus acidus*) terhadap jumlah kematian nyamuk *Culex sp.* (Notoatmodjo, 2010; Nursalam, 2003).

