

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratoris dengan rancangan *true experimental-post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui potensi insektisida daun sirih (*Piper betle*) terhadap nyamuk *Culex* sp. dengan metode elektrik.

## 4.2. Populasi dan Sampel

## 4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah nyamuk *Culex* sp. di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

## 4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk *Culex* sp. yang ditangkap di lingkungan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Nyamuk *Culex* sp. yang digunakan harus diseleksi sesuai dengan kriteria inklusi seperti dibawah ini :

- Semua nyamuk *Culex* sp. yang hidup
- Mampu bergerak secara aktif

Nyamuk yang digunakan sebagai sampel sebanyak 25 ekor untuk setiap perlakuan (WHO,2006). Selanjutnya nyamuk tersebut di tempatkan pada kandang.

#### 4.2.3 Estimasi Besar Sampel

Pada percobaan ini menggunakan 3 perlakuan, 1 kontrol positif, dan 1 kontrol negative. Rumus untuk estimasi pengulangan (Tjokronegoro, 2001) yaitu:

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

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

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

$$5n - 5 \leq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2 \sim 4$$

Keterangan : p: jumlah yang dilakukan

n: jumlah pengulangan

Jadi dari hasil perhitungan didapatkan bahwa pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini minimal adalah 4 kali. Tiap perlakuan menggunakan 25 ekor nyamuk *Culex sp* (WHO,2006).

Sebelum dilakukan penelitian yang sesungguhnya, terlebih dahulu dilakukan penelitian pendahuluan. Percobaan penelitian ini meliputi 4 perlakuan dengan penentuan konsentrasi bersifat trial and error (coba-coba) yaitu dengan perlakuan konsentrasi 10%, 20%, 30%, dan 40%.

Setelah melakukan penelitian pendahuluan dan mendapatkan hasil konsentrasi 10%, 20%, 30% dan ditambah perlakuan kontrol negatif (aquades) dan kontrol positif (d-alettrin 45 mg). Diamati selama jam ke-1, ke-2,ke-3,ke-4,ke-5,ke-6, dan ke-24.

- Kontrol (-) : Tanpa pemberian ekstrak daun sirih (gabus berisi aquades steril).

- Kontrol (+) : Tanpa pemberian ekstrak daun sirih (gabus berisi d-alettrin 45 mg/mat)
- Perlakuan I : Pemberian ekstrak daun sirih 10%
- Perlakuan II : Pemberian ekstrak daun sirih 20%
- Perlakuan III : Pemberian ekstrak daun sirih 30%

#### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juni - Juli 2014.

#### 4.4 Variabel Penelitian

Ada beberapa variable dalam penelitian ini, yaitu :

- Variabel independen (variabel bebas) adalah konsentrasi ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle*) dan waktu paparan.
- Variabel dependen (variable tergantung) dari penelitian ini adalah jumlah nyamuk *Culex sp.* yang mati setelah pemberian insektisida ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle*) dengan konsentrasi yang tertentu.

#### 4.5 Definisi Operasional

- Daun sirih sebesar 450 gr yang digunakan adalah daun sirih (*Piper betle*) yang dibeli di Balai Medika Batu, Malang.
- Ekstrak daun sirih diperoleh dengan cara merendam serbuk daun sirih dengan menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dievaporasi untuk memisahkan hasil ekstrak dengan pelarut etanolnya. Hasil ekstrak

tersebut berupa minyak kental yang diperoleh dari akhir evaporasi.

Pembuatan ekstrak daun sirih dilakukan di Poilinema Negeri Malang

- Gabus mat elektrik dengan ukuran 3,5 cm x 2 cm yang telah disterilkan dengan alkohol 70% direndam ke dalam larutan ekstrak daun sirih yang telah disiapkan untuk dilakukan penelitian. Gabus mat elektrik dapat menyerap 6 ml larutan ekstrak daun sirih.
- Nyamuk *Culex sp.* dewasa yang digunakan adalah nyamuk yang sesuai kriteria inklusi yaitu nyamuk hidup yang mampu bergerak aktif.
- Nyamuk *Culex sp* mati adalah jika dilakukan sentuhan atau gangguan pada bagian abdomen atau bagian tubuh yang lainnya pada nyamuk dan tidak didapatkan pergerakan nyamuk (WHO, 2006).
- Potensi insektisida adalah kemampuan ekstrak etanol daun sirih yang dapat menyebabkan kematian nyamuk *Culex sp.* Dalam penelitian ini, kemampuan ekstrak etanol daun sirih dalam mematikan nyamuk *Culex sp* diukur dari waktu 24 jam. Dimulai dari saat nyamuk jatuh ke dasar kandang dan tidak aktif atau tidak bergerak pada saat diberikan rangsangan sentuh. Kemudian jumlah nyamuk yang mati diolah dengan menggunakan formula *Abbot* (Komisi Pestisida Deptan, 1995).

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

Keterangan :

- $A_1$  : Presentase kematian nyamuk setelah dikoreksi / potensi  
A : Presentase kematian nyamuk dengan berbagai konsentrasi  
C : Presentase kematian nyamuk dengan kontrol negatif

#### 4.6 Bahan dan Alat Penelitian

- Bahan Penelitian

1. Bahan untuk proses ekstraksi daun sirih, yaitu :

- ✓ Daun sirih yang telah dikeringkan (500 gr)
- ✓ Pelarut ekstrak (etanol)
- ✓ Acetone
- ✓ Aquades

2. Bahan untuk persiapan nyamuk dewasa *Culex sp.* :

- ✓ Air selokan
- ✓ Botol Aqua

3. Bahan untuk uji efek insektisida ekstrak daun sirih terhadap nyamuk

*Culex sp.* :

- ✓ Ekstrak etanol daun sirih
- ✓ Nyamuk dewasa *Culex sp.*
- ✓ Obat nyamuk elektrik
- ✓ Gabus obat nyamuk elektrik steril
- ✓ Aquades steril

- Alat Penelitian

1. Alat untuk proses ekstraksi dan sirih, yaitu :

- ✓ Alat penggerus / blender
- ✓ Tabung untuk merendam daun sirih yang sudah digerus
- ✓ Satu set alat evaporasi
- ✓ Klem statis
- ✓ Selang plastic

- ✓ Waterbath
  - ✓ Waterpump
  - ✓ Bak penampung aquades
  - ✓ Botol penampung hasil ekstraksi
  - ✓ Oven
  - ✓ Timbangan analitik
  - ✓ Freezer / lemari es
2. Alat untuk persiapan nyamuk dewasa *Culex sp.*
- ✓ Sangkar plastik (100 cm x 100 cm x 60 cm)
  - ✓ Jaring serangga
3. Alat untuk uji efek ekstrak daun sirih terhadap nyamuk dewasa *Culex sp.* :
- ✓ Sangkar plastik (100 cm x 100 cm x 60 cm)
  - ✓ Alat pemanas obat nyamuk elektrik
  - ✓ Timer
  - ✓ Gelas Ukur
  - ✓ Spet 6 ml/cc

#### 4.7 Metode Pengumpulan Data

##### 4.7.1. Pembuatan Ekstrak Daun Sirih

Daun sirih (*Piper betle*) yang digunakan dipilih yang tidak cacat daunnya dan terlihat bagus. Daun sirih diiris tipis – tipis dan dioven selama  $\pm 8$  jam. Setelah itu dikeringkan dengan sinar matahari. Setelah kering, daun sirih dihaluskan dengan diblender sehingga didapatkan serbuk, serbuk ditimbang lalu diambil. Serbuk daun sirih tersebut dimasukkan kedalam botol untuk direndam

dengan etanol selama  $\pm 1$  minggu. Hasil ini selanjutnya akan dievaporasi (untuk memisahkan larutan daun sirih dengan pelarut etanol).

Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja percobaan. Hasil rendaman etanol dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi. Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah evaporator, pendingin spiral dihubungkan pada bagian atas evaporator; pendingin spiral dihubungkan pada bagian atas evaporator; pendingin spiral dihubungkan dengan vakum dengan selang plastik. *Water pump* ditempatkan dalam bak yang berisi aquabidest, *water pump* dihubungkan dengan sumber listrik sehingga aquabidest akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan merata). Satu set alat evaporasi diletakkan, sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquabidest pada *water bath*. Vakum dan *water bath* dihubungkan dengan sumber listrik dan suhu pada *water bath* dinaikkan sekitar 0° - 90°C (sesuai dengan titik didih etanol). Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah selama  $\pm 2 - 3$  jam dan dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 50° - 60°C selama 1 – 2 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa, sehingga didapatkan hasil ekstrak daun sirih 100%. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam penelitian. Ekstrak yang berupa pasta kemudian ditimbang dengan neraca analitik.

#### 4.7.2 Persiapan Gabus Obat Nyamuk Steril

Gabus obat nyamuk yang mengandung d-alettrin 45 mg/mat dipanaskan dengan pemanas obat nyamuk elektrik hingga warna gabus berubah menjadi putih. Proses ini membutuhkan waktu sekitar 24 jam. Kemudian gabus

direndam dengan alkohol 70% selama 2 x 24 jam. Setelah proses sterilisasi menggunakan alkohol 70% selesai, dilakukan perendaman dengan air suling selama 12 jam. Proses terakhir adalah pengeringan menggunakan inkubator selama 30 menit untuk memastikan tidak ada air suling yang tersisa dalam gabus steril. Gabus kemudian direndam pada larutan ekstrak sesuai konsentrasi yang telah ditentukan dan ditunggu sampai ekstrak terserap kedalam gabus kurang lebih 3 menit. Gabus yang sudah mengandung ekstrak siap digunakan.

#### 4.7.3 Persiapan Larutan untuk Perlakuan

Larutan stok ekstrak daun sirih (*Piper betle*) pada perlakuan yang diinginkan dengan rumus pengenceran yang tertera adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

- M1 : konsentrasi larutan ekstrak etanol daun sirih (100%)
- V1 : volume larutan ekstrak etanol daun sirih
- M2 : konsentrasi larutan uji yang diinginkan
- V2 : volume larutan perlakuan yang diperlukan

Penelitian ini akan menggunakan 3 konsentrasi, yaitu 10%, 20%, dan 30%. Setelah ketiga konsentrasi tersebut didapat , maka selanjutnya akan diencerkan dengan menggunakan campuran aseton 1%.

#### 4.7.4 Persiapan Nyamuk *Culex sp.*

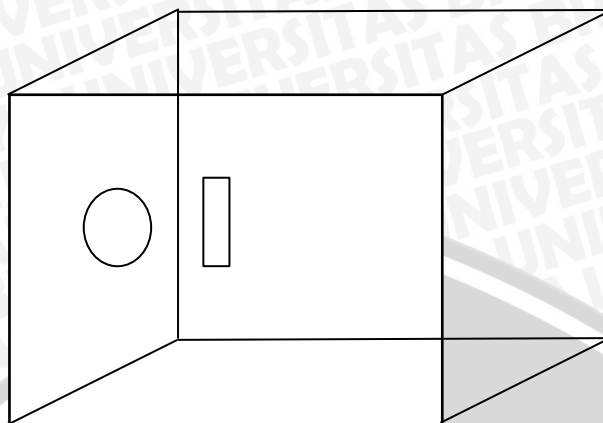
Nyamuk dewasa *Culex sp.* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari lingkungan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Nyamuk dewasa yang telah diidentifikasi dan disiapkan diletakkan dalam sangkar plastik yang berukuran 100 cm x 100 cm x 60 cm untuk kemudian digunakan sebagai sampel.

#### 4.7.5 Uji Potensi Insektisida

Percobaan dilakukan dengan menggunakan 5 buah sangkar plastik berbentuk bujur sangkar berukuran 100x100x60 cm<sup>3</sup> yang diletakkan di ruang penelitian laboratorium parasitologi lantai 1. Pertama, siapkan larutan ekstrak etanol daun sirih dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30%. Rendam gabus obat nyamuk elektrik yang sudah steril ke setiap larutan. Lalu siapkan gabus kontrol positif (d-alettrin 45 mg/mat) dan gabus kontrol negatif (aquades) dan 3 gabus yang masing – masing telah direndam dalam 3 konsentrasi ekstrak etanol daun sirih. Masing – masing gabus dimasukkan ke dalam obat nyamuk elektrik, kemudian dimasukkan kedalam masing – masing sangkar lalu dihubungkan dengan aliran listrik 220 V sehingga indikator akan menyala tanda perlindungan terhadap gangguan nyamuk telah bekerja. Sangkar 1 menggunakan gabus berisi larutan d-alettrin 45 mg/mat (kontrol positif), sangkar 2 menggunakan aquades (kontrol negatif), sangkar 3 menggunakan gabus berisi larutan ekstrak etanol daun sirih 10%. Sangkar 4 menggunakan gabus berisi larutan ekstrak etanol daun sirih 20%. Sangkar 5 menggunakan gabus berisi larutan ekstrak etanol daun sirih 30%. Jumlah nyamuk yang mati pada setiap perlakuan dihitung setelah indikator obat nyamuk elektrik menyala pada jam ke-1, ke-2, ke-3, ke-4, ke-5, ke-6, ke-24.

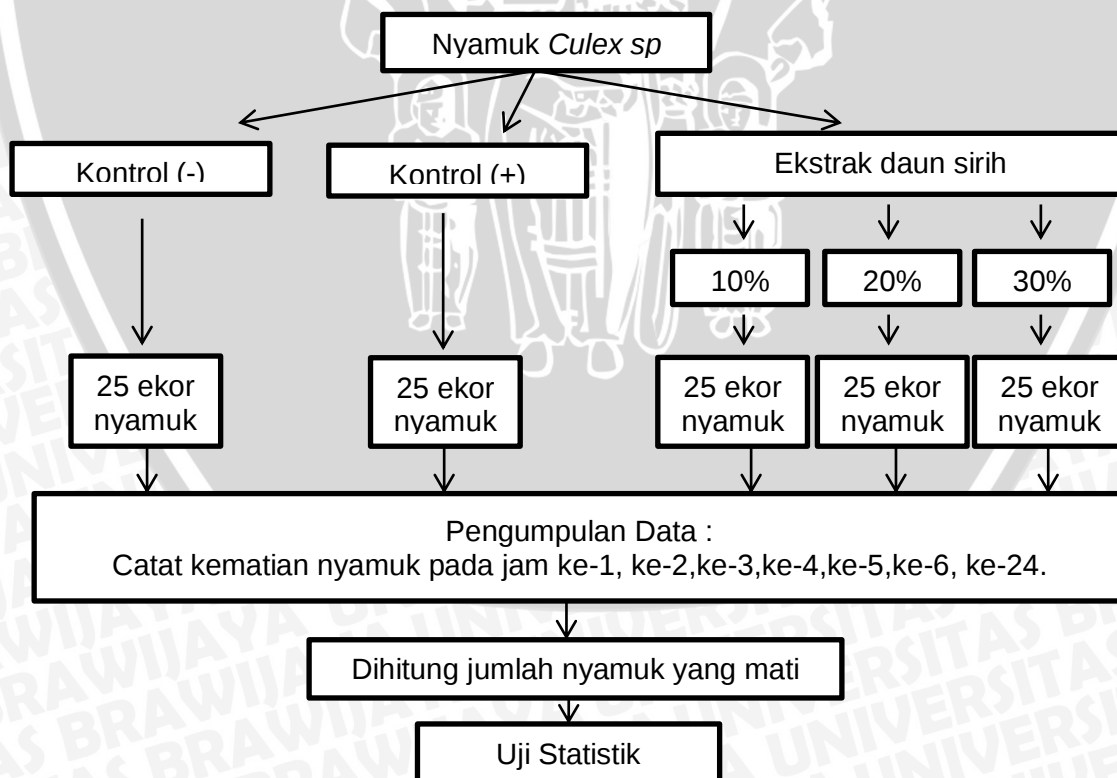
Penelitian ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali untuk tiap perlakuan.



Keterangan :

Kotak berukuran 100 cm x 100 cm x 60 cm yang dibuat dengan memodifikasi sangkar dan menempelkan plastik pada semua sisi kecuali bagian depan kanan yang dilubangi untuk tempat memasukkan nyamuk dan obat nyamuk elektrik.

#### 4.7.6 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Kerja Penelitian

#### 4.7.7 Pengamatan

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

#### 4.7.8 Pengumpulan Data

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

### 4.8 Pengolahan Data

#### 4.8.1 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan adalah jumlah nyamuk yang mati untuk setiap perlakuan setelah pengamatan jam. Data kematian nyamuk akan diolah dengan menggunakan formula *Abbot* menjadi data potensi insektisida yang disajikan dalam bentuk tabel. Analisis data yang digunakan adalah uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan menggunakan SPSS (*Statistical Product Service Solution*) edisi 12. Syarat yang harus dipenuhi dalam menggunakan uji anova adalah sebagai berikut :

1. Skala pengukuran variabel : 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 yang tidak mutlak untuk 2 kelompok tidak berpasangan artinya, varians data 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, 2004)

Jika salah satu syarat tidak terpenuhi maka *One Way ANOVA* dapat digantikan dengan uji *Kruskal Wallis*. Dari uji ANOVA tersebut, inteprestasi yang didapat adalah :

H0 : Rata- rata hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi perlakuan (kontrol (+), dosis 10%, 20%, 30%) dan variasi waktu (jam ke-1, jam ke-2, jam ke-3, jam ke-4, jam ke-5, jam ke-6, dan jam ke-24) tidak menunjukkan adanya pengaruh potensi insektisida yang berbeda secara signifikan terhadap kematian nyamuk.

H1 : terdapat pengaruh perlakuan (potensi insektisida) yang menunjukkan perbedaan di antara variasi perlakuan ekstrak etanol daun sirih dan kontrol yang diuji terhadap kematian nyamuk

H0 diterima apabila nilai signifikansi yang diperoleh dari uji ANOVA berada diatas alpha 0,05 ( $p > 0,05$ ). Sedangkan H1 diterima apa bila nilai signifikansi yang diperoleh dari uji ANOVA berada dibawah alpha 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Apabila H1 diterima, untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan maka dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* dilanjutkan dengan mencari dan mengetahui kekuatan hubungan antar variabel dengan uji korelasi Pearson.

Untuk mengetahui adanya pengaruh dari pemberian ekstrak etanol daun sirih (dalam beberapa variasi dosis) terhadap efek potensi insektisida pada nyamuk *Culex sp.* digunakan regresi linear (Dahlan, 2004).

