

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true experimental-post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui potensi insektisida ekstrak buah mahkota dewa sebagai insektisida terhadap *Culex* sp. yang diberikan dengan metode *elektrik*.

4.2 Subjek Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah nyamuk dewasa *Culex* sp. yang memenuhi syarat seperti dibawah ini :

- Kriteria Inklusi

1. Nyamuk *Culex* dewasa (masih hidup)
2. Masih bergerak secara aktif dan terbang

- Kriteria Ekslusi

1. Nyamuk *Culex* dewasa tidak bergerak aktif

4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk *Culex* sp. dewasa, yang di dapat dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Telur nyamuk sebelumnya diidentifikasi dan dikembangbiakkan menjadi nyamuk dewasa.

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

- Kontrol (-) : Tanpa pemberian ekstrak buah mahkota dewa (gabus berisi aquades steril)
- Kontrol (+) : Tanpa pemberian ekstrak mahkota dewa (gabus berisi d-aletin 78 mg/mat)
- Perlakuan I : Pemberian ekstrak buah mahkota dewa 25%
- Perlakuan II : Pemberian ekstrak buah mahkota dewa 30%
- Perlakuan III : Pemberian ekstrak buah mahkota dewa 35%

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

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

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

$$5n - 5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2 \sim 4 \text{ (Tjokronegoro, 2001).}$$

Keterangan: p: jumlah perlakuan yang dilakukan

n: jumlah pengulangan tiap perlakuan

Jadi dari hasil perhitungan didapatkan bahwa pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini minimal adalah 4 kali. Tiap perlakuan menggunakan 20 ekor nyamuk *Culex* sp. dewasa. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak: $4 \times 5 \times 20 = 400$ ekor nyamuk *Culex*.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan November 2014.

4.4 Variabel Penelitian

Ada beberapa variabel dalam penelitian ini, yaitu:

- ◆ Variabel *independen* (variabel bebas) adalah konsentrasi ekstrak buah mahkota dewa (dalam %). Akan digunakan tiga macam konsentrasi dalam penelitian ini. Konsentrasi ditentukan melalui penelitian pendahuluan.
- ◆ Variabel *dependen* penelitian ini adalah jumlah nyamuk *Culex* sp. yang mati.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

1. Bahan-bahan untuk proses ekstraksi mahkota dewa, yaitu:
 - Mahkota dewa yang telah dikeringkan
 - Pelarut ekstrak (etanol)
 - Acetone
 - Aquades
2. Bahan untuk persiapan nyamuk dewasa *Culex* sp. :
 - Air selokan
 - Botol aqua
3. Bahan untuk uji efek insektisida ekstrak mahkota dewa terhadap nyamuk

Culex sp:

- Ekstrak mahkota dewa
- Nyamuk dewasa *Culex* sp.
- Obat nyamuk elektrik

- Gabus obat nyamuk elektrik steril
- Aquades steril

4.5.2 Alat-alat Penelitian

1. Alat-alat untuk proses ekstraksi mahkota dewa, yaitu :

- Alat penggerus / blender
- Tabung untuk merendam mahkota dewa yang sudah digerus
- Satu set alat evaporasi
- Klem statis
- Selang plastik
- Waterbath
- Waterpump
- Bak penampung aquades
- Botol penampung hasil ekstraksi
- Oven
- Timbangan analitik
- Freezer / lemari es

2. Alat-alat untuk persiapan nyamuk dewasa *Culex* sp :

- Sangkar kaca (100 cm x 100 cm x 60 cm)
- Jaring serangga

3. Alat-alat untuk uji efek ekstrak mahkota dewa terhadap nyamuk dewasa

Culex sp:

- Sangkar kaca (100 cm x 100 cm x 60 cm)
- Alat pemanas obat nyamuk elektrik
- Timer
- Gelas Ukur

- Spet 6 ml /cc

4.6 Definisi Operasional

1. Serbuk buah mahkota dewa diperoleh dari laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang, ditimbang dan didapatkan berat kering 300 gram yang telah dikeringkan dengan menjemurnya dibawah sinar matahari selama 7 hari yang kemudian diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi yang hasil akhirnya berupa larutan ekstrak mahkota dewa.
2. Nyamuk *Culex* sp. dewasa adalah nyamuk yang memiliki morfologi dan sifat seperti nyamuk *Culex* sp. dewasa, dengan kriteria inklusi yaitu nyamuk hidup dan masih bergerak secara aktif, dan dengan kriteria eksklusi yaitu nyamuk sudah tidak bergerak aktif.
3. Potensi insektisida adalah rerata jumlah kematian nyamuk yang dihitung berdasarkan rumus presentase insektisida abbott (Komisi Pestisida Deptan, 1995)

$$A1 = \frac{A-B}{100-B} \times 100\%$$

Keterangan:

A1 = Prosentase kematian nyamuk setelah koreksi

A = Prosentase jumlah nyamuk yang mati setelah perlakuan ekstrak mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)

B = Persentase jumlah nyamuk yang mati pada kontrol negatif

4. Digunakan pembanding sebagai kontrol negatif adalah air, kontrol positif adalah d-alettrin 78 mg/mat.
5. Kotak nyamuk yang digunakan berukuran 100x100x60 cm^3 dimana pada

ketiga sisinya ditutup oleh kaca dan pada sisi depan tertutup plastik hanya saja terdapat sebuah pintu kecil yang terbuat dari kasa (untuk meletakkan alat elektrik).

6. Nyamuk mati: Bila dilakukan sentuhan / gangguan pada bagian *abdomen* atau bagian tubuh yang lainnya pada nyamuk dan tidak didapatkan pergerakan nyamuk *Culex* sp. v dewasa (WHO, 2006).
7. Cara pemberian obat nyamuk elektrik: alat dinyalakan kemudian dimasukkan kedalam kandang terlebih dahulu. Setelah 15 menit, nyamuk dimasukkan ke dalam kandang. Perhitungan waktu dimulai saat nyamuk dimasukkan ke dalam kandang. Pemilihan interval waktu yaitu menit ke 60,120, 180, 240, 300, 360, dan 1440.

4.7 Cara Kerja dan Pengumpulan Data

4.7.1 Mengestrak Mahkota dewa

Proses ekstraksi serbuk mahkota dewa dilakukan dengan cara maserasi dengan pelarut etanol 96%. Adapun prosesnya sebagai berikut:

- Mencuci bersih, mengeringkan, dan memotong kecil-kecil bah mahkota dewa.
- Menjemur buah mahkota dewa yang telah dipotong kecil-kecil.
- Menghaluskan buah mahkota dewa sedikit demi sedikit.
- Menimbang Serbuk kering mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dan mendapatkan berat kering 300 gram.
- Serbuk mahkota dewa yang telah kering kemudian memasukkan ke dalam beaker glass ukuran 1 liter untuk direndam dalam etanol

- Memasukan pelarut etanol ke dalam tabung tersebut sampai serbuk terendam pelarut etanol, didiamkan selama kurang lebih 1 minggu. Sebelumnya dikocok terlebih dahulu.
- Melakukan evaporasi.

Proses selanjutnya adalah proses evaporasi yang bertujuan memisahkan hasil ekstrak yang didapat dengan pelarut etanolnya. Adapun prosesnya adalah sebagai berikut:

- Memasang evaporator pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan $30 - 40^\circ$, terhadap meja percobaan
- Memindahkan hasil rendaman etanol ke labu pemisah ekstraksi
- Menghubungkan labu pemisah ekstraksi pada bagian bawah evaporator, menghubungkan pendingin spiral pada bagian atas evaporator, menghubungkan pendingin spiral dengan vakum melalui selang plastik, dan menghubungkan pula dengan *waterpump* melalui selang plastik.
- Menempatkan *waterpump* dalam bak yang berisi aquades, kemudian menghubungkan *waterpump* dengan sumber listrik sehingga aquades akan mengalir memenuhi pendingin spiral (menunggu hingga air mengalir rata).
- Meletakkan satu set alat evaporasi sedemikian rupa, sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *waterbath*.
- Menghubungkan vakum dan *waterbath* dengan sumber listrik dan suhu *waterbath* menaikkan sekitar $0-10^\circ\text{C}$ (sesuai dengan titik didih etanol).
- Membiarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama kurang lebih 2 – 3 jam

- Melanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 37°C selama 1 – 2 hari
- Menimbang hasil ekstrak dengan timbangan analitik dan menyimpan di dalam lemari es untuk memperlambat kerusakan.

4.7.2 Aklimatisasi

Aklimatisasi nyamuk dewasa selama 2 – 3 hari dengan kondisi laboratorium.

4.7.3 Pembuatan Konsentrasi Larutan Ekstrak

Satu persen adalah dosis dimana terdapat 1 ml zat terlarut dalam 99 ml larutan. Cairan pelarut ekstrak mahkota dewa yang digunakan adalah larutan aquades 1%. Larutan stok ekstrak mahkota dewa dibuat untuk mempermudah proses penyiapan larutan uji.

Larutan stok ekstrak mahkota dewa akan diencerkan dengan aquades sehingga didapatkan dosis yang diinginkan dengan menggunakan rumus pengenceran:

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

Keterangan:

M1 : Konsentrasi larutan stok ekstrak mahkota dewa

M2 : Konsentrasi larutan ekstrak mahkota dewa yang diinginkan

V1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan

V2 : Volume larutan perlakuan yang diperlukan

Volume akhir larutan perlakuan yang diperlukan untuk setiap konsentrasi adalah 6 ml. Jadi, setelah diambil dari larutan stok kemudian ditambahkan dengan larutan aquades 1 % sampai mencapai volume 6 ml.

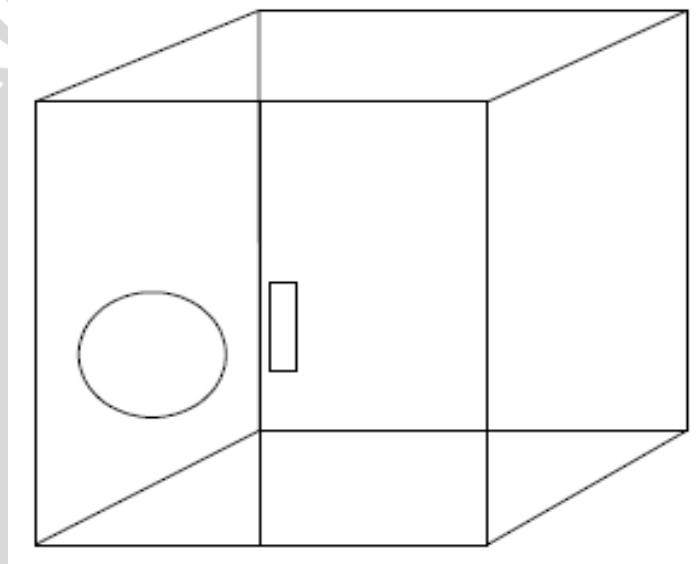
4.7.4 Persiapan Nyamuk *Culex* sp.

Nyamuk dewasa *Culex* sp. dewasa, di kembangbiakkan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Nyamuk yang telah disiapkan diletakkan dalam sangkar yang berukuran 100 cm x 100 cm x 60 cm. Nyamuk dewasa yang telah diidentifikasi sebelumnya diletakkan dalam sangkar kaca yang telah disediakan untuk kemudian digunakan sebagai sampel.

4.7.5 Prosedur Penelitian

1. Percobaan dilakukan dengan menggunakan 5 buah kotak plastik berbentuk bujur sangkar berukuran 100x100x60 cm³ yang diletakkan di ruang penelitian laboratorium parasitologi lantai 1.
2. Menyiapkan larutan ekstrak mahkota dewa dengan konsentrasi 25%; 30%; 35%, merendam gabus obat nyamuk elektrik yang sudah steril dalam setiap larutan.
3. Menyiapkan gabus yang direndam aquades sebagai kontrol negatif dan gabus yang berisi d-alettrin 78 mg/mat sebagai kontrol positif.
4. Memasukkan masing-masing gabus ke dalam obat nyamuk elektrik, kemudian memasukkan ke dalam masing-masing kandang lalu menghubungkan dengan aliran listrik 220V sehingga indikator akan menyala tanda bahwa alat telah aktif.
 - Kandang 1 menggunakan gabus berisi aquades (kontrol negatif)
 - Kandang 2 menggunakan gabus berisi d-alettrin (kontrol positif)
 - Kandang 3 menggunakan gabus berisi ekstrak mahkota dewa 25%
 - Kandang 4 menggunakan gabus berisi ekstrak mahkota dewa 30%
 - Kandang 5 menggunakan gabus berisi ekstrak mahkota dewa 35%

5. Menghitung jumlah nyamuk yang mati pada setiap perlakuan setelah menit ke-60, menit ke-120, menit ke-180, menit ke-240, menit ke-300, menit ke-360 dan menit ke-1440.
6. Menentukan waktu pengamatan tiap satu jam sekali sampai jam ke 24 karena pada penelitian pendahuluan diketahui bahwa potensi insektisida mencapai daya bunuh maksimal setelah 24 jam.
7. Melakukan penelitian ini dengan pengulangan sebanyak 4 kali untuk tiap perlakuan.

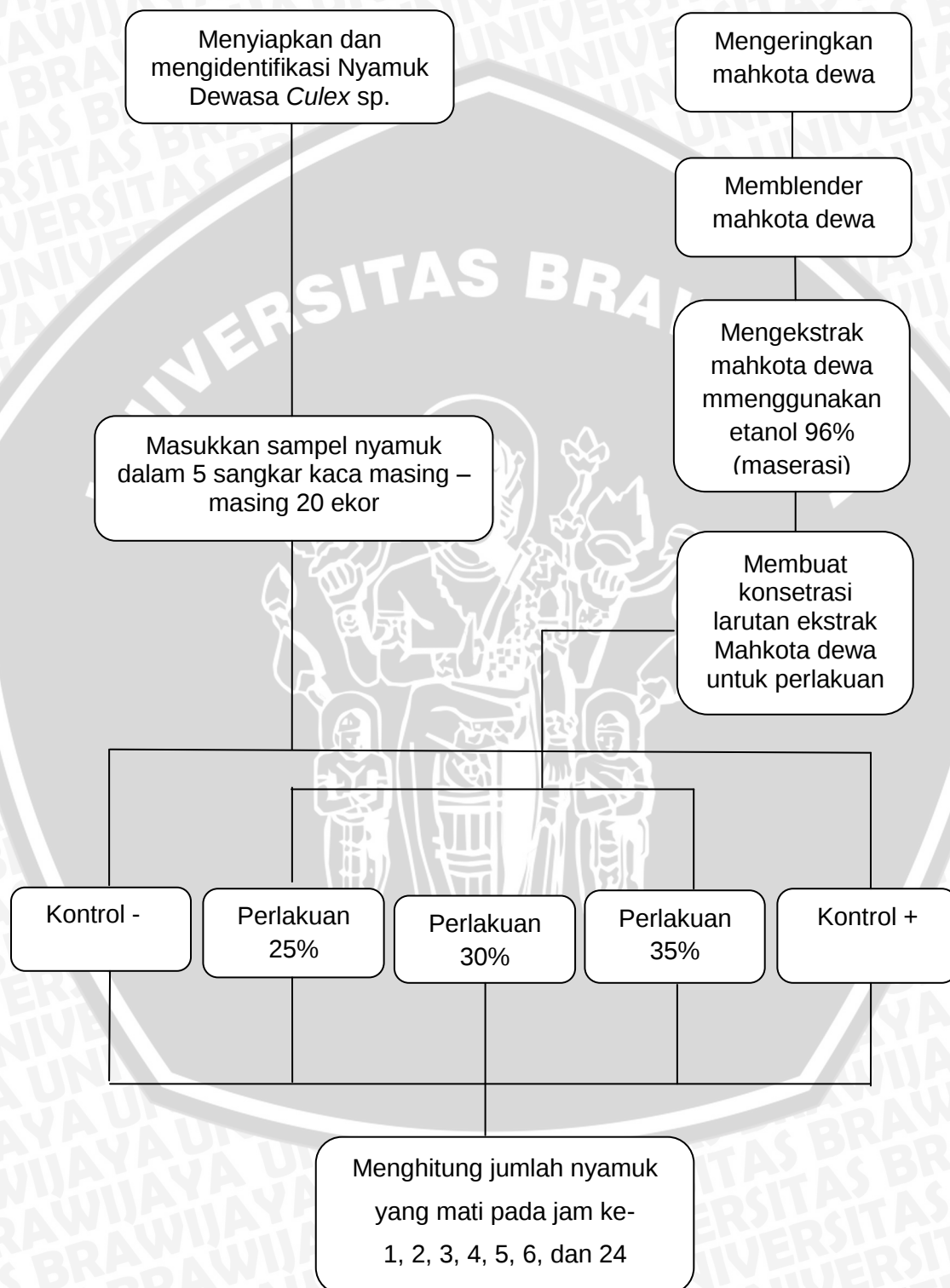


Gambar 4.1 Kotak Nyamuk

Keterangan :

Kotak berukuran 100 cm x 100 cm x 60 cm yang dibuat dengan rangka dari kayu dan dinding yang terbuat dari kasa. Bagian depan kanan diberi lubang yang bertutup kasa untuk tempat memasukkan nyamuk dan obat nyamuk elektrik.

4.7.6 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

4.7.7 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada menit ke-60, menit ke-120, menit ke-180, menit ke-240, menit ke-300, menit ke-360 dan menit ke-1440. Keadaan semua kelompok perlakuan diamati untuk mencari perubahan jumlah nyamuk yang mati. Jumlah nyamuk yang mati dihitung dan dimasukkan dalam tabel.

4.8 Pengumpulan dan Analisa 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.

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 dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product Service Solution*) Edisi 13. 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. 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 tidak mutlak untuk 2 kelompok tidak berpasangan artinya, varians data boleh sama boleh juga berbeda

Jika salah satu syarat tidak terpenuhi maka One Way ANOVA tidak dapat digunakan dan selanjutnya data dianalisis menggunakan uji beda non parametrik *Kruskal Wallis*. Dalam penelitian ini, besar interval kepercayaan yang dipakai adalah 95% atau pada tingkat signifikansi (α) = 0,05. Uji statistik korelasi bertujuan untuk menentukan kekuatan dan arah hubungan antara konsentrasi ekstrak mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap jumlah kematian nyamuk *Culex* sp.

