

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium, dengan rancangan *true experimental-post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak daun salam sebagai penolak nyamuk (*Repellent*) terhadap *Aedes aegypti*.

## 4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2016.

## 4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk dewasa betina *Aedes aegypti*, yang memenuhi kriteria inklusi. Kriteria inklusi penelitian ini adalah :

- Nyamuk *Aedes aegypti* dewasa yang hidup
- Nyamuk *Aedes aegypti* dewasa yang aktif bergerak
- Telah berada dalam starvasi minimal 4 jam

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sejumlah nyamuk *Aedes aegypti* dewasa betina yang memenuhi kriteria inklusi dan sudah diseleksi. Nyamuk ini didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Digunakan 100 ekor nyamuk pada masing masing kandang (WHO, 2003). Jumlah kandang adalah 5 buah, sehingga jumlah sampel nyamuk *Aedes aegypti* dewasa betina yang dibutuhkan adalah 500 ekor.

## 4.4 Estimasi Besar Sampel

Pada penelitian tentang ekstrak daun salam sebagai *Repellent/* penolak nyamuk *Aedes aegypti* dewasa dilakukan 5 perlakuan yaitu :

1. Perlakuan I (kontrol negatif) : cawan berisi kapas dan 2,5 cc glukosa 20 % + 2,5 cc aquades.
2. Perlakuan II (kontrol + Autan) : cawan berisi kapas dan 2,5 cc glukosa 20% + 2,5 cc DEET(Autan mengandung DEET 12%).
3. Perlakuan III (Ekstrak daun salam 5 %) : cawan berisi kapas dan 2,5 cc glukosa 20% + 2,5 cc ekstrak daun salam 5%
4. Perlakuan IV (Ekstrak daun salam 10 %) : cawan berisi kapas dan 2,5 cc glukosa 20% + 2,5 cc ekstrak daun salam 10%
5. Perlakuan V (Ekstrak daun salam 15 %) : cawan berisi kapas dan 2,5 cc glukosa 20% + 2,5 cc ekstrak daun salam 15%

Jumlah pengulangan eksperimen yang dilakukan berdasarkan penghitungan

rumus:

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

(Tjokronegoro, 2004)

Keterangan :

p = jumlah perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Berdasarkan rumus diatas perhitungan untuk pengulangan perlakuan adalah

:

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

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

$$5n-5 \geq 16$$

$$n \geq 4,2$$

Jadi berdasarkan rumus diatas, pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini minimal 4 kali.

#### 4.5 Variabel Penelitian

- Variable bebas/ *independent* adalah dosis ekstrak daun salam dan DEET.
- Variabel tergantung / *dependent* adalah jumlah nyamuk *Culex sp.* betina yang hinggap pada masing masing cawan.

#### 4.6 Bahan dan Instrumen Pembuatan Ekstrak Daun Salam

##### 4.6.1 Bahan Penelitian

###### 4.6.2.1 Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Salam

- Daun salam yang sudah dikeringkan
- Pelarut ekstrak (Ethanol 96 %)
- Aquades
- Aseton

###### 4.6.2.2 Bahan uji Efektifitas Penolak Nyamuk

- Nyamuk *Aedes aegypti* dewasa betina
- Larutan gula 20%
- Ekstrak daun salam dengan 3 konsentrasi (5%, 10%, 15%)
- Kapas
- Aquades
- DEET (Autan 12,5%)

##### 4.6.2 Instrumen Penelitian

###### 4.6.2.1 Alat-alat Pembuatan Ekstrak Daun Salam

- Alat penggerus/ blender
- Tabung untuk merendam daun salam yang sudah digerus
- Satu set alat evaporasi
- Klem stasis
- Selang plastic
- Waterbath
- Water pump
- Bak penampung aquades

- Botol penampung hasil ekstraksi
- Oven
- Timbangan analitik
- Freezer/ lemari es

#### 4.6.2.2 Instrument Uji *Repellent* Nyamuk *Aedes aegypti*

- Cawan
- Kotak nyamuk
- Alat pengukur waktu
- Senter

#### 4.7 Definisi Operasional

- Nyamuk yang dipakai dalam penelitian ini adalah nyamuk *Aedes aegypti* dewasa betina yang didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Jumlah hinggapan nyamuk adalah jumlah nyamuk yang hinggap pada perlakuan selama 5 menit, dengan ketentuan seekor nyamuk dapat dihitung lebih dari satu kali hinggap.
- Larutan gula 20% adalah campuran 20 gr gula yang dilarutkan dengan 100 cc air yang berfungsi sebagai antraktan nyamuk.
- Pemilihan interval waktu (jam ke-0, 1, 2, 4, 6) adalah untuk membandingkan potensi tiap jamnya yang diperkirakan makin lama potensinya akan menurun. Digunakan waktu selama 6 jam karena siklus tidur manusia adalah  $\pm$  selama 6 jam (WHO).

#### 4.8 Posedur Penelitian

##### 4.8.1 Persiapan Penelitian

#### 4.8.1.1 Pembuatan Ekstrak Daun Salam

Persiapan penelitian meliputi proses ekstraksi daun salam untuk mengambil minyak atsirinya dan kemudian hasilnya akan digunakan dalam proses selanjutnya, yaitu menguji potensi daun salam ini sebagai *repellent*.

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

1. Daun salam kering yang akan diekstrak disediakan sebanyak 0,5 kg atau 500 g dibungkus kertas sering, kemudian dimasukkan ke dalam botol untuk direndam dengan etanol.
2. Pelarut etanol dimasukkan ke dalam botol tersebut sampai daun yang terbungkus kertas saring tersebut terendam dalam pelarut etanol selama kurang lebih 1 minggu.
3. Hasil ini selanjutnya dievaporasi, yang bertujuan untuk memisahkan hasil ekstrak daun yang didapat dari pelarut etanolnya.

Proses evaporasi :

- *Evaporator* dipasang pada klem statis agar dapat tergantung dengan kemiringan  $30^{\circ}$ - $40^{\circ}$  terhadap meja percobaan.
- Hasil rendaman ethanol dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi.
- Labu pemisah ekstraksi dihubungkan dengan *evaporator*.
- Pendingin spiral dihubungkan pada bagian atas evaporator dan pada pompa vakum melalui selang plastik.
- *Waterpump* ditempatkan dalam bak sehingga yang berisi aquadesan dihubungkan dengan sumber listrik sehingga

aquades akan mengalir memenuhi pendingin spiral secara merata.

- Satu set *rotary evaporator* diletakkan sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *waterbath*.
- Vakum dan *waterbath* dihubungkan dengan sumber listrik dan suhu *waterbath* dinaikkan sekitar 0<sup>0</sup>-10<sup>0</sup> (sesuai titik didih ethanol).
- Sirkulasi dibiarkan berjalan sehingga hasil *evaporasi* tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama 2-3 jam.
- Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 50<sup>0</sup>- 60<sup>0</sup>C selama 1-2 hari.
- Hasil akhir ekstrak berupa minyak daun salam.
- Didapatkan ekstrak dengan konsentrasi 100% (konsentrasi induk).
- Hasil akhir ekstrak ini ditimbang dengan timbangan analitik dan disimpan di dalam lemari es untuk memperlambat kerusakan.
- Ekstrak ini yang digunakan dalam percobaan.

#### 4.8.1.2 Penyiapan Larutan Uji

Larutan stok yang digunakan merupakan ekstrak daun salam konsentrasi 100%. Selanjutnya ekstrak daun salam ini akan diencerkan menggunakan pelarut aquades untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak daun salam sebesar X, Y, Z.

Larutan ekstrak daun salam 100% akan diencerkan dengan aquades sehingga didapatkan dosis yang diinginkan dengan menggunakan rumus pengemceran :

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

Keterangan :

M1 : Konsentrasi larutan stok, yaitu sebesar 100%

M2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan

V1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan

V2 : Volume larutan stok yang diperlukan (5 ml)

#### 4.8.1.3 Persiapan Sampel dan Kandang Penelitian

Dalam penelitian ini, dibutuhkan nyamuk *Aedes aegypti* dewasa betina sebanyak 100 ekor perkandang (WHO, 2003). Nyamuk *Aedes aegypti* tersebut dimasukan kedalam kandang yang khusus dirancang untuk penelitian ini. Sebelum penelitian, nyamuk harus dalam starvasi minimal 4 jam.

#### 4.8.1.4 Uji Potensi *Repellent*

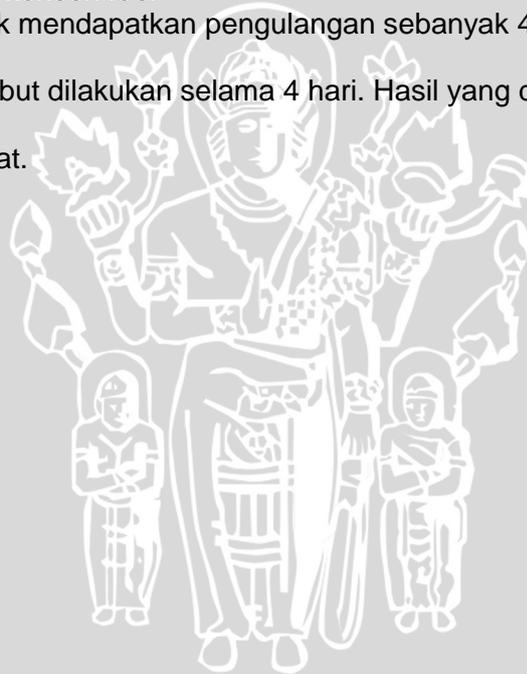
- a. Percobaan dilakukan dengan menggunakan kotak yang diletakan pada ruangan dengan suhu  $27 \pm 2$  °C. dengan tingkat kelembapan 60-70%.
- b. Hasil ekstrak daun salam dipersiapkan.
- c. Kotak nyamuk *Aedes aegypti* dewasa betina 100 ekor dan dalam starvasi minimal 4 jam.
- d. Siapkan 5 Cawan yang berisi kaps yang telah dibasahi dengan 2,5 cc larutan gula 20% + aquades 2,5 cc (kontrol negatif), Cawan 2 berisi *repellent* yang sudah diketahui/DEET (kontrol positif), Cawan 3,4,5 diberi kapas yang telah dibasahi dengan 2,5 cc larutan gula 20% + ekstrak daun salam dengan konsentrasi yang berbeda.
- e. Semua cawan dimasukan ke dalam kotak selama 5 menit dan dihitung jumlah nyamuk pada jam ke- 0, 1, 2, 4, 6. Pada tiap interval waktu antar jam perlakuan, cawan dikeluarkan dari kotak.

- f. Jumlah nyamuk yang hinggap pada tiap cawan selama 5 menit dicatat.
- g. Presentase kemampuan ekstrak daun salam sebagai penolak/*repellent* dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

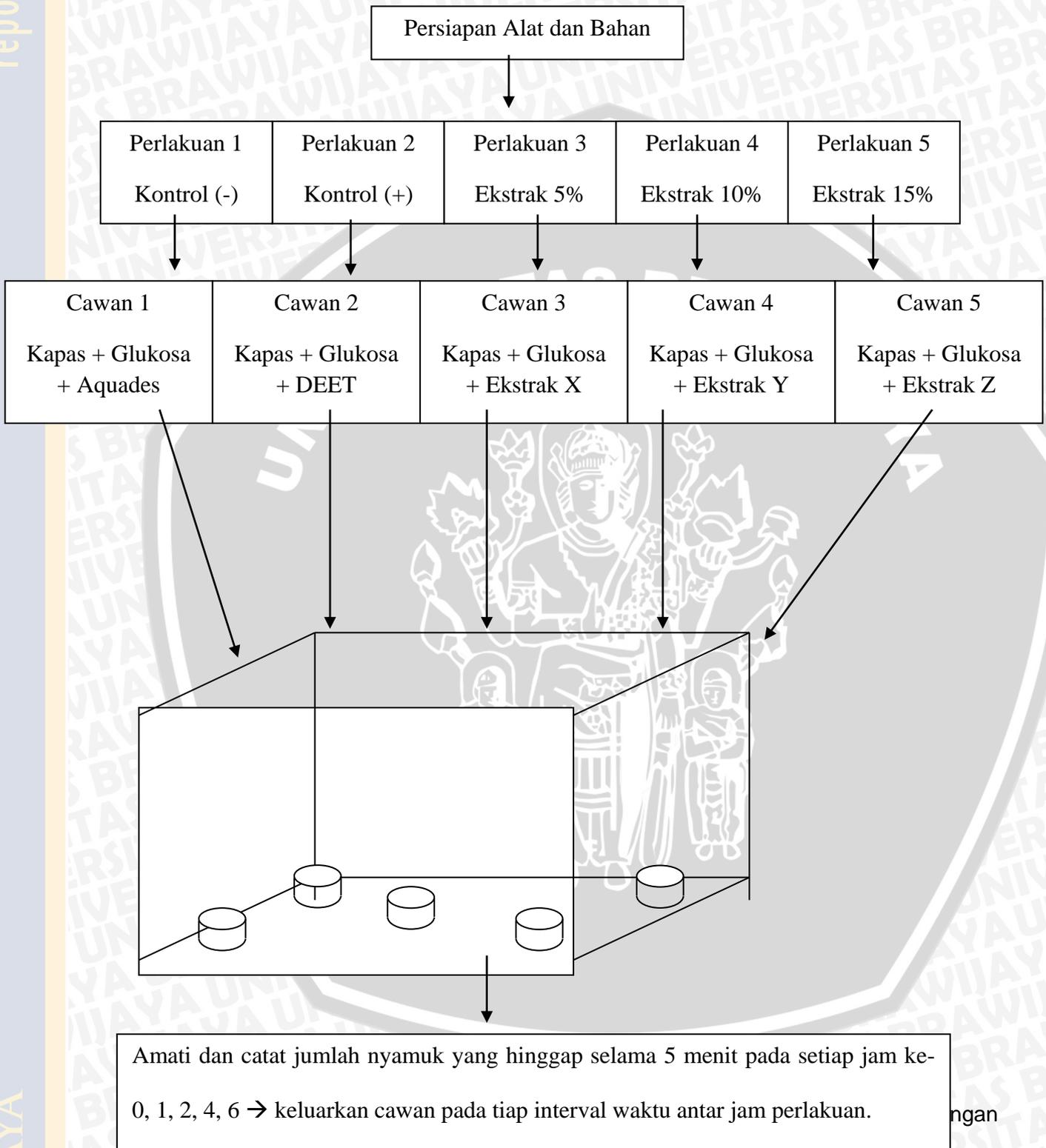
$$\frac{nc - r}{nc} \times 100\%$$

Keterangan :

- $nc$  : jumlah nyamuk yang hinggap pada kontrol negatif
  - $r$  : jumlah nyamuk yang hinggap pada kapas yang dicelup air gula dan ekstrak daun yang diekstrak pada masing-masing konsentrasi
- h. Untuk mendapatkan pengulangan sebanyak 4 kali, maka proses tersebut dilakukan selama 4 hari. Hasil yang didapat kemudian dicatat.



4.8.2 Alur Penelitian



jumlah nyamuk *Aedes aegypti* yang hinggap untuk masing-masing



konsentrasi pada ekstrak daun salam setelah pengamatan selama 6 jam.

Analisis data yang digunakan adalah uji *Two Way ANOVA* (One- way Analysis of Variance) dengan menggunakan program SPSS. Uji *one way ANOVA* bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan jumlah nyamuk *Aedes aegypti* yang hinggap dari dua kelompok atau lebih. Syarat yang harus dipenuhi dalam menggunakan ANOVA, yaitu :

1. Syarat anova untuk lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan harus terpenuhi yaitu sebaran data normal, varian data homogen.
2. Jika tidak memenuhi syarat, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya sebaran menjadi normal dan varian menjadi identik.
3. Jika variabel hasil transformasi tidak berdistribusi normal atau varians tetap tidak identik, maka alternatif dipilih uji nonparametrik *Kruskal-Walls*.
4. Jika pada uji ANOVA atau *Kruskal-Walls* menghasilkan nilai  $p < 0,05$ , maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *post hoc* yaitu dengan uji *Turkey HSD* (untuk anova) atau uji *Mann-Whitney* (untuk *Kruskal-Walls*) (Budiarto,2006). Uji *Kruskal-Walls* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan potensi antar kelompok perlakuan, sedangkan *Mann-whitney* digunakan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan potensi.
5. Uji korelasi *Pearson* atau *Spearman* digunakan untuk mengetahui hubungan antara besarnya potensi *repellent* dari masing-masing konsentrasi ekstrak daun salam dengan lama perlakuan (Dahlan, 2004).

