

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 *etanol* daun Cincau (*Mesona palustris Bl.*) sebagai repelan terhadap nyamuk *Culex sp.*

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah nyamuk *Culex sp.* yang memenuhi kriteria inklusi. Pada penelitian ini menggunakan nyamuk *Culex sp.* yang memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut :

- Semua nyamuk *Culex sp.* yang hidup
- Semua nyamuk *Culex sp.* yang aktif bergerak
- Telah berada dalam starvasi minimal 4 jam.

Sampel adalah bagian dari populasi yang akan diteliti. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sejumlah nyamuk yang memenuhi kriteria inklusi dan telah diseleksi. Jumlah sampel nyamuk yang digunakan adalah 50 ekor untuk setiap jenis perlakuan. Sampel penelitian ini adalah nyamuk *Culex sp.* baik jantan maupun betina.



Perlakuan yang diberikan pada sampel adalah dengan membagi menjadi lima perlakuan, yang terdiri dari:

1. Perlakuan pertama, media kapas diolesi aquades sebagai kontrol negatif.
2. Perlakuan kedua, media kapas diolesi DEET 13% sebagai pembanding.
3. Perlakuan ketiga, media kapas diolesi ekstrak cincau konsentrasi 10 %.
4. Perlakuan keempat, media kapas diolesi ekstrak cincau konsentrasi 20%.
5. Perlakuan kelima, media kapas diolesi ekstrak cincau konsentrasi 30 %.

Jumlah pengulangan eksperimen yang dilakukan berdasarkan penghitungan rumus:

(Tjokronegoro, 2004)

Keterangan :

P : Banyak kelompok perlakuan

n : Jumlah replikasi (pengulangan)

Berdasarkan rumus diatas perhitungan untuk pengulangan perlakuan adalah:

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

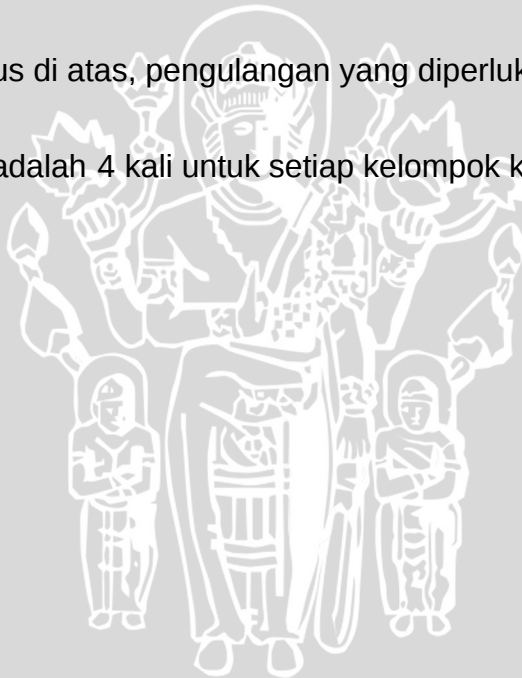
$$6(n-1) \geq 16$$

$$6n - 6 \geq 16$$

$$6n \geq 22$$

$$n \geq 3,7-4$$

Jadi berdasarkan rumus di atas, pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini minimal adalah 4 kali untuk setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.



Di dalam penelitian ini digunakan 6 kandang nyamuk yang masing-masing berisi 50 ekor nyamuk *Culex sp.* Sehingga jumlah total nyamuk yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah :

50 ekor nyamuk *Culex sp.* x 6 kelompok perlakuan x 4 kali pengulangan = 300 ekor nyamuk *Culex sp.*

4.3 Variabel Penelitian

Ada beberapa variabel dalam penelitian ini, yaitu :

1. Variabel Independen (variabel bebas)

- Dosis dan lamanya paparan repelan dari konsentrasi ekstrak daun Cincau dan DEET

- Dosis dan lamanya paparan repelan dari DEET

2. Variabel Dependen (variabel tergantung)

- Jumlah nyamuk yang hinggap pada masing-masing cawan yang

sudah diberikan ekstrak daun Cincau dengan konsentrasi yang sudah ditentukan. (10 %,20%, dan 30%)

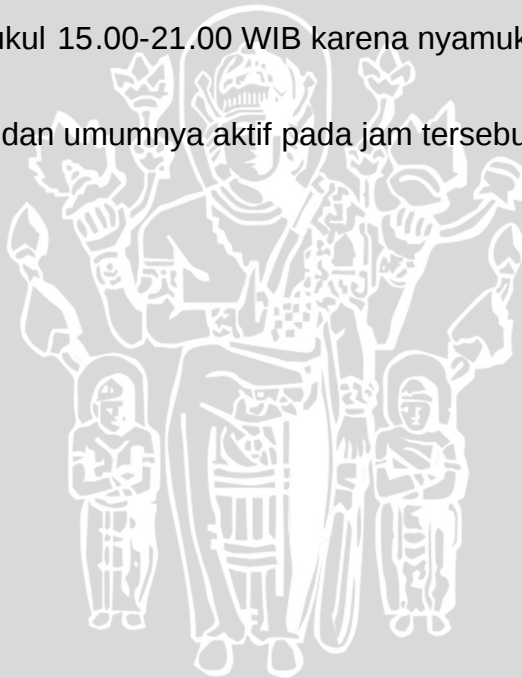
4.4 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya Malang dimulai pada bulan April 2016. Dan uji potensi

akan dimulai antara pukul 15.00-21.00 WIB karena nyamuk *Culex sp.* memiliki

i kebiasaan menggigit dan umumnya aktif pada jam tersebut.



4.5 Definisi Operasional

- Potensi : Jumlah hinggapan nyamuk yang dikonversikan ke rumus
- Cincau hitam (*Mesona palustris*) adalah tanaman cincau yang dibeli di toko tanaman, kemudian daunnya dikeringkan untuk diambil ekstraknya.
- Ekstrak daun Cincau (*Mesona palustris Bl.*) adalah daun Cincau yang mudah dikeringkan kemudian diekstraksi secara dingin dengan pelarut etanol yang hasilnya berupa minyak yang sifatnya tidak larut air. Ekstrak daun Cincau (*Mesona palustris Bl.*) yang didapat dianggap mempunyai kandungan ekstrak sebesar 100%.
- Potensi *repellent* : Kemampuan daya halau hinggapan nyamuk
- *Repellent* : bahan yang digunakan untuk menolak hinggapan nyamuk.
- Nyamuk *Culex sp.*: nyamuk genus *Culex sp.* dewasa yang ditangkap pagi atau saat senja sejumlah 50 ekor perkandang, dan telah dibuat starvasi selama minimal 4 jam.
 - Kotak nyamuk : sebuah kotak berbentuk kubus dengan ukuran $40 \times 40 \times 40\text{cm}^3$ yang ditutup papan pada dasarnya, kain kelambu pada seluruh permukaan 5 sisinya, dan pada salah satu sisi kotak dibuat lubang untuk tempat tangan masuk ke kotak tersebut yang ditutupi selembar kain untuk mengindarkan nyamuk keluar keluar dari kotak itu.

- Jumlah hinggapan nyamuk: jumlah hinggapan nyamuk pada media kapas yang telah diberi larutan glukosa fermentasi, dihitung pada pengamatan selama 5 menit, sehingga ada kemungkinan satu nyamuk terhitung 2 kali hinggapan.

dengan 100cc air di wadah cawan kecil berukuran luas lingkaran 201cm³.

4.6 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

4.6.1.1 Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Cincau

- Daun Cincau yang sudah dikeringkan
- Pelarut ekstrak (etanol) 96%
- Aquades
- Aseton

4.6.1.2 Bahan Uji Efektifitas Penolak Nyamuk

- Nyamuk *Culex sp.* sebanyak 300 ekor
- Larutan gula 20%
- DEET / Autan

- Ekstrak daun Cincau dengan 3 konsentrasi (25%, 50% dan 75%)

- Kapas

- Aquades

- DEET



4.6.2 Instrumen Penelitian

4.6.2.1 Alat-alat pembuatan ekstrak etanol daun Cincau (*Mesona palustris*) dengan metode maserasi

- I. Oven
- II. *Blender*
- III. Kertas Saring
- IV. Botol/tabung untuk merendam bubuk kering cincau yang sudah digerus
- V. Neraca Analitik
- VI. *Freezer*
- VII. Seperangkat alat evaporasi vakum
 - Rotary Evaporator
 - Pompa Vacuum
 - Tabung pendingin dan alat pompa sirkulasi air dingin
 - Bak penampung air dingin
 - Labu penampung hasil evaporasi
 - Labu penampung etanol
 - Batu didih
 - Cawan penguap
 - Alat pemanas aquades (*water bath*)
 - Pipa plastik
 - Klem statis

4.6.2.2 Instrumen Uji Repelan *Culex sp.*

- Cawan
- Kotak nyamuk

- Alat pengukur waktu

- Senter

4.6.2.2 Persiapan untuk memperoleh Nyamuk *Culex sp*

Segala bentuk persiapan dibantu oleh bapak Huda, selaku staff Lab.

Entomology dari Dinas Kesehatan Surabaya.

4.6.2.3 Alat untuk Persiapan Media Kapas

Alat yang digunakan untuk mempersiapkan media kapas adalah :

- I. sarung tangan
- II. gunting
- III. penggaris

Alat yang digunakan untuk membuat sirup gula

- I. 1 cangkir gula (50 gram)
 - A. 100 cc air panas

4.7 Prosedur Penelitian

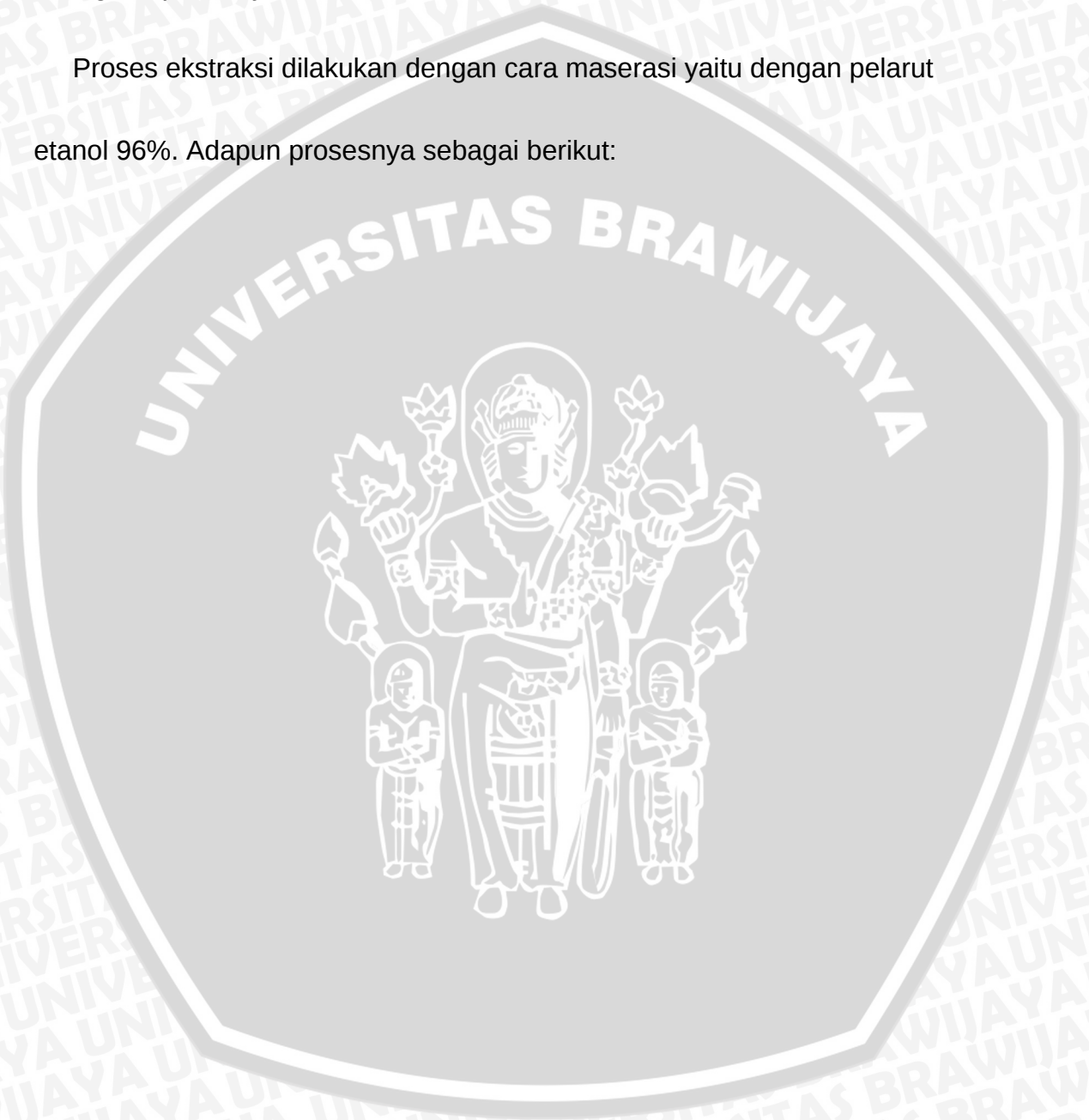
4.7.1 Persiapan Penelitian

4.7.1.1 Pembuatan Ekstrak Daun Cincau

Persiapan penelitian meliputi proses ekstraksi daun Cincau untuk mengambil minyak atsirinya dan kemudian hasilnya akan digunakan dalam

proses selanjutnya, yaitu menguji potensi daun Cincau ini dalam aktivitasnya sebagai repelan nyamuk.

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



1. Daun yang akan diekstrak disediakan sebanyak 1 kg atau 1000 g dibungkus kertas saring, 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 30-40 terhadap meja percobaan.
- Hasil rendaman etanol 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 aquades dan 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 0-10 (sesuai titik didih etanol).
- Sirkulasi dibiarkan berjalan sehingga hasil *evaporasi* tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama 2-3 jam.

- Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 50-60C selama 1-2 hari, sehingga didapatkan hasil akhir ekstrak 100%
- Hasil akhir ekstrak berupa minyak atsiri dari Cincau
- Didapatkan ekstrak dengan konsentrasi 100% (konsentrasi induk).
- Hasil akhir ekstrak ini ditimbang dengan timbangan analitik dan didapatkan hasil akhir sebanyak 40ml disimpan di dalam lemari es untuk memperlambat kerusakan.
- Ekstrak ini yang digunakan dalam percobaan.

4.7.1.2 Penyiapan Larutan Stok

Larutan stok yang digunakan merupakan ekstrak daun Cincau dengan konsentrasi 100%. Selanjutnya ekstrak daun Cincau ini akan diencerkan dengan menggunakan pelarut aquades untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak Daun Cincau dengan konsentrasi 10%, 20%, 30% dan 40%.

4.7.1.3 Penyiapan Larutan Uji

Larutan ekstrak daun cincau akan diencerkan dengan aquades sehingga didapatkan dosis yang diinginkan dengan menggunakan rumus pengenceran

:

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)

Kelompok perlakuan digunakan 3 dosis, yaitu 10% , 20% dan 30%. Cara pembuatan larutan uji adalah sebagai berikut :

- Ekstrak Daun Cincau 30% : 1,5 cc ekstrak daun Cincau + 3,5 cc Aquades
- Ekstrak Daun Cincau 20%: 1 cc ekstrak daun Cincau + 4 cc Aquades
- Ekstrak Daun Cincau 10% : 0,5 cc ekstrak daun Cincau + 4,5 cc Aquades

Volume akhir larutan perlakuan yang diperlukan untuk setiap konsentrasi adalah 5ml. Jadi, setelah diambil dari larutan stok kemudian ditambahkan dengan aquades hingga mencapai volume 5 ml.

4.7.1.4 Persiapan Sampel & Kandang Penelitian

Dalam penelitian ini dibutuhkan nyamuk *Culex sp.* sebanyak 300 ekor.

Nyamuk *Culex sp.* tersebut dimasukan ke dalam kandang yang khusus dirancang untuk penelitian ini.

4.7.2 Penelitian Pendahuluan



Sebelum dilakukan pengumpulan data untuk uji potensi ekstrak cincau kon

sentrasi 10%, 20%, 30% dan 40% sebagai *repellent* terhadap nyamuk *Culex*

sp. pada media kapas, peneliti melakukan penelitian pendahuluan untuk

mencari konsentrasi minimal ekstrak cincau yang mempunyai efek *repellent*.

Ada 2 macam eksplorasi, eksplorasi pertama menggunakan atraktan berupa kapas yang dicelup ke air gula (*sugar-soaked cotton*) 20% sebanyak 2,5cc ditambah 2,5cc ekstrak cincau dengan berbagai konsentrasi. Eksplorasi kedua menggunakan atraktan berupa kapas yang dicelup ke air gula 20% yang ditambah ekstrak cincau dengan berbagai konsentrasi.

Prosedur eksplorasi pertama dilakukan berdasarkan protokol dari MPC India Organization (ICMR<2005), yaitu sebagai berikut.

1. Percobaan dilakukan dengan menggunakan 1 buah kotak nyamuk yang diisi dengan nyamuk *Culex sp.* sebanyak 50 ekor.
2. Disiapkan 5 buah cawan yang masing-masing diisi kapas dan diberi perlakuan :
 - Perlakuan I: 2,5cc air gula 20% + 2,5cc aquades sebagai kontrol(-)
 - Perlakuan II: 2,5cc air gula 20% + 2,5cc ekstrak cincau 10%
 - Perlakuan III: 2,5cc air gula 20% + 2,5cc ekstrak cincau 20%
 - Perlakuan IV: 2,5cc air gula 20% + 2,5cc ekstrak cincau 30%
 - Perlakuan V: 2,5cc air gula 20% + 2,5cc ekstrak cincau 40%
3. Kemudian kelima cawan tersebut dimasukkan ke dalam kotak nyamuk dihitug jumlah hinggapn nyamuk selama 5 menit pada jam ke-0,1,2,4, dan 6.

Saat tidak diamati, cawan dikeluarkan dari kotak nyamuk.

Cara kerja eksplorasi kedua atau eksplorasi lanjutan :

1. Disiapkan 5 buah kotak nyamuk, masing-masing berisi 50 ekor nyamuk *Culex sp.* dewasa.
2. Disiapkan kapas yang diberi larutan gula yang diberi wadah dengan wadah cawan kecil berukuran luas lingkaran 154cm², kemudian diberi perlakuan sebagai berikut:
 - Kapas I diolesi dengan aquades
 - Kapas II diolesi dengan ekstrak Cincau 10%
 - Kapas III diolesi dengan ekstrak Cincau 20%
 - Kapas IV diolesi dengan ekstrak Cincau 30%
 - Kapas V diolesi dengan ekstrak Cincau 40%
3. Tiap kapas dimasukkan ke dalam 5 kotak nyamuk yang berbeda dengan menggunakan sarung tangan yang berbeda pula.
4. Dilakukan pengamatan dan dihitung jumlah hinggapan dihitung jumlah hinggapan nyamuk selama 5 menit pada jam ke-0 ,1 , 2, 4, 6. Saat tidak diamati, cawan dikeluarkan dari kotak nyamuk.

Dari hasil eksplorasi didapatkan bahwa hanya pada kapas yang diolesi cincau konsentrasi 40% tidak terdapat hinggapan nyamuk. Hasil dari eksplorasi lanjutan ini menjadi dasar penentuan konsentrasi pada uji potensi Cincau (*Melastoma palustris*) dengan konsentrasi ,10%, 20%, dan 30% sebagai *repellent* terhadap nyamuk *Culex sp.* pada kapas.

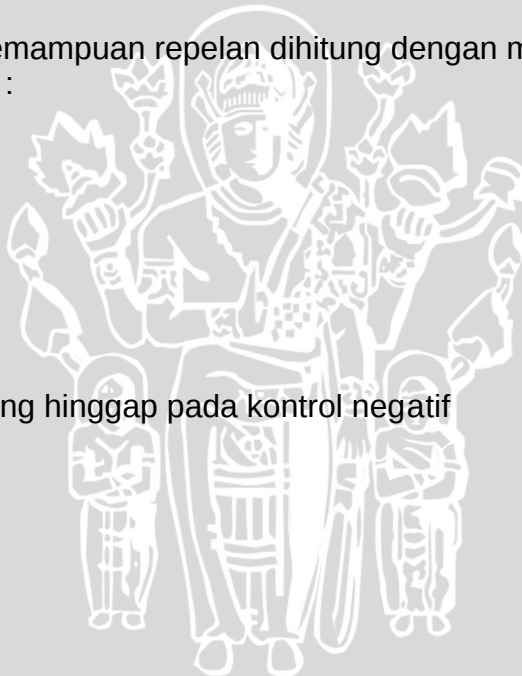
4.7.1.5 Uji Potensi Repelan

- Penelitian dilakukan di dalam ruangan penelitian *arthropoda* Laboratorium Parasitologi lantai 1.

- Percobaan dilakukan dengan menggunakan kotak yang diletakkan pada ruangan bersuhu kurang lebih 27 °C. dengan tingkat kelembapan 60-70%.
- Dipersiapkan nyamuk *Culex sp.* dewasa 50 ekor di dalam tiap kotak berbentuk bujur sangkar dengan ukuran 40x40x40 cm³ yang ditutup mika pada kedua sisinya dan ditutup kain/kelambu pada 4 sisinya. Percobaan memakai 5 kotak.
- Hasil ekstrak daun Cincau dipersiapkan terlebih dahulu
- Cawan 1 berisi kapas yang telah dibasahi dengan 2,5 cc larutan gula 20% + aquades 2,5 cc (kontrol -) , cawan 2 berisi DEET (kontrol +) , cawan 3, 4 dan 5 diberi kapas yang telah dibasahi dengan 2,5 cc larutan gula 20% + ekstrak daun cincau dengan konsentrasi yang berbeda, (10%,20% dan 30%)
- Dilakukan pengamatan dan penghitungan jumlah nyamuk yang hinggap pada tiap kapas selama 5 menit, pada jam ke 0, 1, 2 ,4 ,6. Saat tidak diamati, kapas dikeluarkan dari kotak nyamuk.
- Tes ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali untuk setiap perlakuan.
- Presentase kemampuan repelan dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

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

- Untuk mendapatkan pengulangan sebanyak 4 kali, maka proses tersebut dilakukan selama 6 hari. Hasil yang didapat kemudian dicatat.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



4.7.1.6 Alur Penelitian

Perlakuan I	Perlakuan II	Perlakuan III	Perlakuan IV	Perlakuan V
Kontrol -	Kontrol +	Ekstrak 10%	Ekstrak 20%	Ekstrak 30%
		Daun Cincau	Daun Cincau	Daun Cincau

Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3	Cawan 4	Cawan 5
Kapas + Glukosa 20% + Aquades	Kapas + Glukosa 20% + DEET	Kapas + Glukosa 20% + Ekstrak Cin cau 10%	Kapas + Glukosa 20% + Ekstrak Cin cau 20%	Kapas + Glukosa 20% + Ekstrak Cin cau 30%

4.8 Pengumpulan Data

Data hasil yang telah diperoleh dari pengamatan dimasukkan dalam tabel

dan diklasifikasikan menurut perlakuan ,jumlah nyamuk yang menghindari

objek dan waktu pengulangan. Dari tabel hasilnya akan dianalisis dan

dimasukkan.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



4.9 Analisis Data

Pengolahan dan analisis data dibuat berdasarkan perhitungan jumlah nyamuk *Culex sp.* yang mendarat untuk masing-masing konsentrasi pada ekstrak daun Cincau setelah pengamatan 6 jam.

Analisis data yang digunakan adalah uji ANOVA dengan menggunakan program SPSS. Syarat yang harus dipenuhi dalam menggunakan ANOVA, yaitu :

1. Penelitian menggunakan metode statistik non parametrik Kruskal-

Walls karena menghasilkan nilai $p < 0,05$ pada uji normalitas, maka

dilanjutkan dengan melakukan analisis *post hoc* yaitu dengan uji *Mann-Whitney* (untuk *Kruskal-Wallis*) (Budiarto,2006).

2. Uji *Kruskal-Wallis* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan potensi antar kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan potensi. Uji korelasi *Spearman* digunakan untuk mengetahui hubungan antara besarnya konsentrasi ekstrak etanol Cincau (*Mesona palustris*) dengan potensi *repellent* serta hubungan antara lamanya waktu perlakuan dengan potensi *repellent*.