

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian eksperimental dengan rancangan *true experimental* dengan rancangan *true experimental-post test only control group* yang bertujuan untuk mengukur knockdown time ekstrak Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) dengan metode semprot terhadap nyamuk *Culex sp.*

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah nyamuk dewasa *Culex sp.* yang dibeli di Dinas Kesehatan Surabaya.

4.2.2 Sampel

Sampel menggunakan nyamuk dewasa *Culex sp.* yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi penelitian ini adalah:

1. Nyamuk dewasa *Culex sp.* yang hidup
2. Nyamuk yang aktif bergerak

Sedangkan kriteria eksklusi penelitian ini adalah nyamuk dewasa yang mati sebelum dilakukan percobaan dan tidak termasuk dalam kriteria inklusi.

4.2.3 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel

Sampel yang diambil adalah sejumlah nyamuk *Culex sp.* dewasa yang memenuhi kriteria inklusi dan telah diseleksi.

4.2.4 Besaran Sampel

Jumlah Sampel nyamuk *Culex sp.* dewasa yang digunakan adalah 15 ekor untuk setiap perlakuan. Adapun perlakuan yang dilakukan pada sampel dengan membagi menjadi lima perlakuan sebagai berikut :

- Kontrol negatif: larutan aquades
- Kontrol positif : larutan malathion 0,28%
- Perlakuan 1 : larutan ekstrak daun pandan sebesar 10 %
- Perlakuan 2 : larutan ekstrak daun pandan sebesar 20 %
- Perlakuan 3 : larutan ekstrak daun pandan sebesar 30 %
- Perlakuan 4 : larutan ekstrak daun pandan sebesar 40 %

Pengulangan eksperimen berdasarkan rumus: (Tjokronegoro, 2001)

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

Keterangan :

P = banyak kelompok perlakuan

n = jumlah replikasi (pengulangan)

Perhitungan :

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

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

$$6n - 6 \geq 16$$

$$6n \geq 22$$

$$n \geq 3,7$$

Berdasarkan rumus diatas, pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini minimal 4 kali.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung penelitian ini adalah *knockdown time* (dalam menit) terhadap nyamuk *Culex sp.*

4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun pandan wangi dalam persen (%) terhadap nyamuk *Culex sp.*

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Di laksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 4-8 Juni 2017.

4.5 Bahan/Materi dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

4.5.1.1 Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Pandan Wangi

Bahan yang digunakan adalah :

1. Serbuk Daun Pandan Wangi
2. Aquades
3. Etanol 96 % sebagai pelarut

4.5.2 Peralatan Penelitian

4.5.2.1 Peralatan Pembuatan Ekstrak Daun Pandan Wangi

1. Toples bertutup
2. Corong gelas

3. Timbangan analitik
4. Gelas ukur
5. Botol
6. Waterbath
7. Erlenmeyer
8. Rotary evaporator
9. Beaker glass
10. Alkoholmeter
11. Shaker digital

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

1. Kotak kaca (25 cm x 25 cm x 25 cm)
2. Jaring Serangga

4.5.2.1.2 Peralatan Uji Ekstrak Daun Pandan

1. Kotak Nyamuk
2. Cawan
3. Kain Kelambu
4. Alkohol
5. Aquades
6. Alat penyemprot (tempat parfum)
7. Sput

4.6 Definisi Operasional

- *True experiment-post test only control group design*: merupakan rancangan penelitian yang dilakukan randomisasi pada sampel sehingga

kelompok kontrol dan eksperimen dianggap sama sebelum diberi perlakuan dan tidak diadakan *pre-test*.

- Nyamuk *Culex sp.* yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk *Culex sp.* betina dewasa yang dibeli dari Dinas Kesehatan Surabaya.
- Kontrol negatif yang digunakan adalah larutan aquades steril.
- Larutan gula 10% : campuran 10 gram gula yang dilarutkan dalam 100cc air, berfungsi sebagai makanan nyamuk.
- Kotak nyamuk : sebuah kotak berbentuk kubus 25x25x25cm dibuat dengan memodifikasi sangkar dan menempelkan kaca pada semua sisi kecuali tempat memasukkan nyamuk dan penyemprotan.
- Ekstrak daun pandan wangi diperoleh dari hasil akhir proses evaporasi. Proses ekstraksi daun pandan diperoleh berdasarkan tata cara pelaksanaan ekstraksi yang menggunakan etanol 96% sebagai pelarutnya. Proses ekstraksi dilakukan di Materia Medika Malang.
- Potensi insektisida adalah data kematian nyamuk yang telah diolah dengan menggunakan formula *Abbot*.
- *Knockdown Time* adalah data nyamuk yang jatuh perinterval waktu yang telah diolah dengan menggunakan formula *Abbot*. Formula *Abbot* digunakan sesuai dengan standart penelitian insektisida oleh WHO. *KT50 (Median Knockdown)* adalah waktu yang dibutuhkan untuk menjatuhkan setengah dari jumlah populasi (50%) hewan coba (nyamuk).
- Variabel independen (variabel bebas) adalah variabel yang dapat memberikan perubahan pada variabel dependen (variabel tergantung) bila variabel ini dirubah, sedangkan variabel dependen (variabel tergantung) adalah variable yang dapat berubah akibat perubahan variabel bebas.

4.7 Cara Kerja dan Pengumpulan Data

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Pandan Wangi

Daun Pandan Wangi diolah di Materia Medika, Batu untuk mendapatkan hasil berupa larutan ekstrak. Selanjutnya hasil yang telah diperoleh digunakan untuk proses selanjutnya.

Prosesnya sebagai berikut ;

1. Timbang serbuk daun pandan wangi sebanyak 470 gram.
2. Lakukan pembasahan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 500 ml.
3. Masukkan serbuk yang telah dibasahi dengan pelarut ke dalam toples, diratakan dan sambil ditambahkan pelarut etanol 96% sampai terendam (pelarut yang digunakan minimal dua kali berat atau lebih). Pelarut yang ditambahkan sebanyak 2 L. Tutup toples dengan rapat selama 24 jam. Dan di shaker diatas shaker digital kecepatan 50 rpm.
4. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam Erlenmeyer.
5. Ampas dimasukkan lagi dalam toples dan ditambahkan pelarut sampai terendam (minimal pelarut 5cm diatas permukaan), dalam hal ini digunakan 2 L.
6. Biarkan semalam atau selama 24 jam diatas shaker digital kecepatan 50 rpm.
7. Remaserasi dilakukan sampai filtrate/ekstrak lebih jernih, menggunakan 1,5 L pelarut.
8. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir, dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator. Diperlukan waktu lima jam untuk evaporasi.
9. Ekstrak yang dihasilkan, kemudian diuapkan kembali diatas water bath selama dua jam.

4.7.2 Penyiapan Sampel

Nyamuk *Culex sp.* dewasa yang digunakan sebagai sampel didapatkan dari membeli di Dinas Kesehatan Surabaya dan dimasukkan ke dalam kandang nyamuk.

4.7.3 Penyiapan Larutan Uji

Larutan stok ekstrak daun pandan wangi 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 daun pandan wangi
M2 : konsentrasi larutan stok ekstrak daun pandan wangi yang diinginkan
V1 : volume larutan stok ekstrak daun pandan wangi yang harus dilarutkan
V2 : volume larutan ekstrak daun pandan wangi perlakuan yang diperlukan

4.7.4 Pembuatan Konsentrasi Dosis Larutan Uji

- Larutan 10 % : larutan stok 10 ml ditambah dengan 90 ml aquades steril, sehingga didapatkan jumlah total sebanyak 100 ml.
- Larutan 20 % : larutan stok 20 ml ditambah dengan 80 ml aquades steril, sehingga didapatkan jumlah total sebanyak 100 ml.
- Larutan 30 % : larutan stok 30 ml ditambah dengan 70 ml aquades steril, sehingga didapatkan jumlah total sebanyak 100 ml.
- Larutan 40 % : larutan stok 40 ml ditambah dengan 60 ml aquades steril, sehingga didapatkan jumlah total sebanyak 100 ml.

4.7.5 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan bersifat *trial and error* yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi minimal larutan ekstrak daun pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) yang mempunyai *quick knockdown effect* terhadap nyamuk *Culex sp.* Konsentrasi yang ditemukan digunakan sebagai dasar untuk menetapkan konsentrasi pada penelitian ini.

4.7.7 Uji Pengukuran Knockdown Time

1. Percobaan dilakukan dengan menggunakan 4 buah kotak kaca berukuran 25x25x25 cm.
2. Masukkan nyamuk *Culex sp.* dewasa sebanyak 15 ekor ke dalam masing-masing kotak kaca yang akan diteliti.
3. Siapkan larutan ekstrak daun pandan dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, dan 40% lalu masing-masing masukkan dalam sprayer.
4. Siapkan larutan ekstrak kontrol negatif aquades.
5. Masing-masing larutan ekstrak dimasukkan ke dalam botol sprayer, kemudian disemprotkan ke dalam masing-masing kandang sampai isi larutan di dalam botol habis.

Rinciannya sebagai berikut :

- a) Kandang 1 kontrol negatif disemprot menggunakan aquades 3ml
- b) Kandang 2 disemprot menggunakan larutan ekstrak daun pandan konsentrasi 10% sebanyak 3 ml
- c) Kandang 3 disemprot menggunakan larutan ekstrak daun pandan konsentrasi 20% sebanyak 3 ml

d) Kandang 4 disemprot menggunakan larutan ekstrak daun pandan konsentrasi 30% sebanyak 3 ml

e) Kandang 5 disemprot menggunakan larutan ekstrak daun pandan konsentrasi 40% sebanyak 3 ml

Jumlah nyamuk yang jatuh pada setiap perlakuan diamati dan dihitung setelah penyemprotan pada menit ke-0, menit ke-5, menit ke-10, menit ke-15, menit ke-20, menit ke-25, menit ke-30, menit ke-35, menit ke 40, menit ke-45, menit ke-50, menit ke-55, dan menit ke-60. Penelitian ini diulangi sebanyak 4 kali untuk setiap perlakuan.

4.7.8 Jadwal Waktu Pelaksanaan Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada menit ke-0, menit ke-5, menit ke-10, menit ke-15, menit ke-20, menit ke-25, menit ke-30, menit ke-35, menit ke 40, menit ke-45, menit ke-50, menit ke-55, dan menit ke-60. Keadaan semua kelompok perlakuan diamati untuk mengetahui perubahan jumlah nyamuk yang jatuh setelah disemprot larutan. Jumlah nyamuk yang jatuh diamati dan dihitung lalu dicatat dalam tabel.

Data jumlah nyamuk *Culex sp.* pada semua perlakuan dan pengulangan dianalisis untuk mengetahui *knockdown time* nyamuk yang jatuh dengan menggunakan formula *Abbot* dengan rumus :

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

Keterangan :

A1 : persentase knockdown nyamuk setelah koreksi

A : persentase knockdown nyamuk uji

B : persentase knockdown nyamuk kontrol

4.8 Analisis Data

Untuk memperkirakan waktu jatuh nyamuk atau *Knockdown Time* 50% dan 90% (KT – 50 dan KT – 90) digunakan Analisis Regresi Linear SPSS v.11.0. KT-50 atau *Knockdown Time* 50 adalah waktu yang di perlukan untuk menjatuhkan 50% populasi nyamuk pada konsentrasi tertentu. Sedangkan KT-90 adalah waktu yang diperlukan untuk menjatuhkan 90% populasi nyamuk pada konsentrasi tertentu.

Untuk membedakan sampel pada kelompok-kelompok apakah sama atau tidak maka digunakan uji One way Anova dengan pertimbangan penelitian ini menggunakan variabel numerik lebih dari dua kelompok variabel yang tidak berpasangan. Kelompok tersebut antara lain larutan ekstrak daun pandan dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, dan 40%, larutan aquades sebagai kontrol negative, dan larutan malathion 0,28% sebagai control positif dibandingkan dengan kelompok kedua waktu sub jenis interval (0 – 60 menit dengan rentang 5 menit). Jenis uji statistik One way Anova dipilih karena kompleksitas data dan memenuhi kaidah statistik baku.

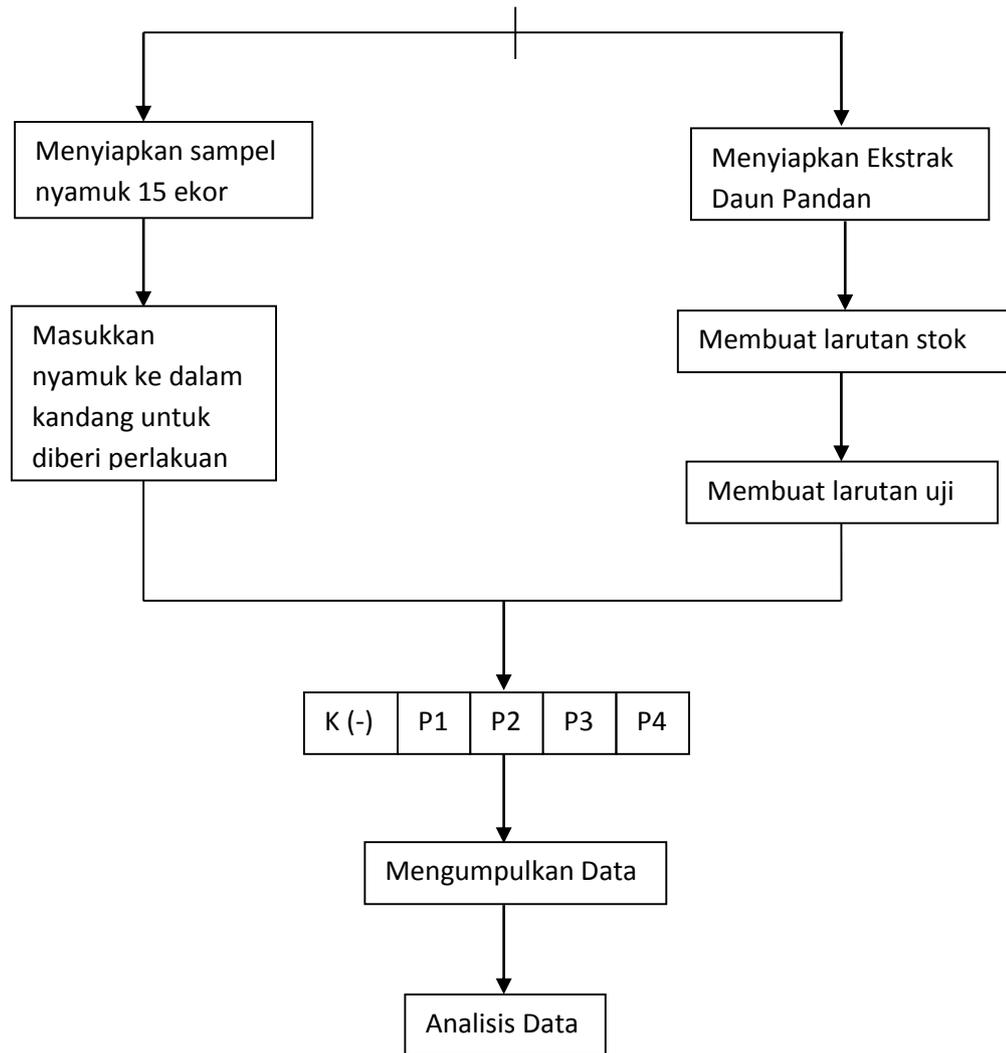
Normalitas data digunakan analisis Kolmogorov-Smirnov karena data yang diperoleh berjumlah 72 (df >50) untuk mengetahui data tersebut normal atau tidak. Nilai normalitas terpenuhi jika $P > 0,05$. Analisis dilanjutkan dengan test Homogenitas untuk mengetahui tingkat homogenitas data. Nilai signifikansi diperoleh bila $P < 0,05$. (SPSS v11.0).

Analisis dilanjutkan test post hoc (Turkey HSD test – SPSS v.11.0) untuk mengetahui signifikansi data tiap perlakuan dan sub perlakuan berdasarkan besar konsentrasi (numerik) dan waktu (interval). Analisis selanjutnya dilakukan uji regresi linear (SPSS v.11.0) untuk mengetahui persamaan tersebut, validitas positif kuat diperoleh apabila R-square >50%. Analisis berikutnya dilakukan uji korelasi (SPSS v11.0) untuk mengetahui hubungan diantara konsentrasi larutan

ekstrak daun pandan dengan efek knockdown. Nilai positif kuat diperoleh jika $P < 0,05$.

Alur Kerja

Menyiapkan Alat dan Bahan



Keterangan :

- Kontrol (-) : larutan aquades
- P1 : larutan ekstrak daun pandan sebesar 10 %
- P2 : larutan ekstrak daun pandan sebesar 20 %
- P3 : larutan ekstrak daun pandan sebesar 30 %
- P4 : larutan ekstrak daun pandan sebesar 40 %