

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium, dengan rancangan *true experimental-post test only control group design* untuk mengetahui dan membandingkan efek ekstrak etanol daun dewa (*Gynura pseudochina*) sebagai *repellent* terhadap nyamuk *Culex sp.* dalam berbagai konsentrasi.

## 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk dewasa betina *Culex sp.* yang memenuhi kriteria inklusi. Kriteria inklusi penelitian ini adalah:

- Semua nyamuk *Culex sp.* dewasa yang hidup
- Semua nyamuk *Culex sp.* dewasa yang aktif bergerak
- Semua nyamuk *Culex sp.* dewasa yang telah dipuaskan minimal selama 4 jam.

Sampel adalah bagian dari populasi yang akan diteliti. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sejumlah nyamuk *Culex sp.* dewasa betina yang memenuhi kriteria inklusi dan sudah diseleksi. Jumlah nyamuk yang digunakan adalah 50 ekor nyamuk.

Perlakuan yang diberikan pada sampel dibagi dalam 5 kelompok perlakuan, yaitu:

- Perlakuan I (Kontrol Negatif) : Cawan berisi kapas dan 2,5 cc glukosa 20% + 2,5 CC aquades
- Perlakuan II (Kontrol Positif) : Cawan berisi kapas dan 2,5 cc glukosa 20% + 2,5 cc DEET
- Perlakuan III (Ekstrak 5%) : Cawan berisi kapas dan 2,5 cc glukosa 20% + 2,5 cc ekstrak etanol Daun Dewa 5%
- Perlakuan IV (Ekstrak 7,5%) : Cawan berisi kapas dan 2,5 cc glukosa 20% + 2,5 cc ekstrak etanol Daun Dewa 7,5%
- Perlakuan V (Ekstrak 10%) : Cawan berisi kapas dan 2,5 cc glukosa 20% + 2,5 cc ekstrak etanol Daun Dewa 10%

Maka perkiraan jumlah pengulangan berdasarkan perhitungan rumus:

$$P(n-1) \geq 16 \quad (\text{Tjokronegoro, 2004})$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Berdasarkan rumus di atas perhitungan untuk pengulangan perlakuan adalah:

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

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

$$5n-5 \geq 16$$

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

Jadi, berdasarkan rumus di atas, pengulangan yang diperlukan pada penelitian ini adalah minimal 4 kali.

#### 4.3 Lokasi dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Oktober 2016 dan uji potensi akan dimulai antara pukul 17.00 sampai pukul 22.00.

#### 4.4 Variabel Penelitian

- Variabel independen (variabel bebas) adalah dosis dan lamanya paparan repelan dari ekstrak etanol daun dewa.
- Variabel dependen (variabel tergantung) adalah jumlah nyamuk yang hinggap di masing-masing cawan.

#### 4.5 Definisi Operasional

- a. Daun Dewa (*Gynura pseudochina*) yang digunakan adalah Daun Dewa (*Gynura pseudochina*) yang diperoleh dari daerah Malang, Jawa Timur. Ekstrak Daun Dewa adalah Daun Dewa (*Gynura pseudochina*) yang

sudah dikeringkan kemudian diekstraksi secara dingin dengan pelarut etanol yang hasilnya berupa minyak yang sifatnya tidak larut air. Ekstrak Daun Dewa (*Gynura pseudochina*) yang didapat dianggap mempunyai kandungan ekstrak sebesar 100%.

- b. Nyamuk yang dipakai dalam penelitian ini adalah nyamuk dewasa betina *Culex sp.* yang didapatkan dari Dinas Kesehatan Kota Surabaya.
- c. Jumlah hinggapan nyamuk adalah jumlah nyamuk yang hinggap pada perlakuan selama 5 menit, dengan ketentuan seekor nyamuk dapat dihitung lebih dari satu kali hinggap.
- d. Kotak nyamuk adalah kotak berbentuk kubus dengan ukuran 40x40x40 cm<sup>3</sup> yang terbuat dari kawat kasa, kecuali pada dua sisi untuk pengamatan dilapisi dengan mika. Pada sisi tersebut, dilengkapi dengan sebah jendela berdiameter 10 cm. Jendela ini dimaksudkan untuk memudahkan proses pengisian nyamuk.
- e. Larutan gula 20% yaitu campuran 20 gram gula yang dilarutkan dengan 100cc air, berfungsi sebagai atraktan nyamuk.
- f. Pemilihan interval waktu (jam ke-0, 1, 2, 4, 6) adalah untuk membandingkan potensi tiap jamnya yang diperkirakan makin lama potensinya akan menurun.

#### **4.6 Bahan dan Instrumen Penelitian**

##### **4.6.1 Bahan Penelitian**

###### **4.6.1.1 Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Dewa**

- Daun Dewa yang sudah dikeringkan
- Pelarut ekstrak (etanol) 96%

- Aquades
- Aseton

#### 4.6.1.2 Bahan Uji Efektifitas Penolak Nyamuk

- Nyamuk *Culex sp.*
- Larutan gula 20% DEET
- Ekstrak Daun Dewa dengan 3 konsentrasi (5%, 7,5%, 10%)
- Kapas
- Aquades
- DEET

#### 4.6.2 Instrumen Penelitian

##### 4.6.2.1 Alat-Alat Pembuatan Ekstrak

- Alat penggerus / blender
- Tabung untuk merendam Daun Dewa yang sudah digerus
- 1 set alat evaporasi
- Klem statis
- Selang plastik
- Waterbath
- *Water pump*
- Bak penampung aquades
- Botol penampung hasil ekstraksi
- Oven
- Timbangan analitik
- *Freezer / lemari es*

##### 4.6.2.2 Instrumen Uji *Repellent Culex sp.*

- Cawan

- Kotak nyamuk
- Alat pengukur waktu
- Senter

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Dewa

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

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

1. Daun Dewa yang akan diekstrak adalah Daun Dewa yang sudah dikeringkan dan kemudian disediakan sebanyak 0,5 kg atau 500 g dibungkus kertas saring, kemudian dimasukkan ke dalam botol untuk direndam dengan etanol.
2. Pelarut etanol dimasukkan ke dalam botol tersebut sampai Daun Dewa 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 Dewa 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 yang berisi aquades, kemudian *waterpump* 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°C (sesuai titik didih etanol).
- Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama 2-3 jam.
- Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 50-60°C selama 1-2 hari, sehingga didapatkan hasil akhir ekstrak 100%.
- Hasil akhir ekstrak berupa minyak Daun Dewa.
- Didapatkan Ekstrak Daun Dewa yang dianggap mempunyai konsentrasi 100% (konsentrasi induk).
- Hasil akhir ini ditimbang dengan timbangan analitik dan disimpan di dalam lemari es untuk memperlambat kerusakan.
- Ekstrak ini yang digunakan dalam percobaan.

#### 4.7.2 Penyiapan Larutan Stok

Larutan stok yang digunakan merupakan ekstrak Daun Dewa dengan konsentrasi 100%. Selanjutnya ekstrak Daun Dewa ini akan diencerkan dengan

menggunakan pelarut aquades untuk mendapatkan konsentrasi 5%, 7,5%, dan 10%.

#### 4.7.3 Penyiapan Larutan Uji

Larutan ekstrak Daun Dewa akan diencerkan dengan aquades sehingga didapatkan dosis yang diinginkan dengan menggunakan rumus pengenceran :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

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

Kelompok perlakuan digunakan tiga dosis, yaitu 10%, 7,5%, dan 5%. Cara pembuatan larutan uji adalah sebagai berikut:

- Ekstrak Daun Dewa 10% : 0,5 ml dari larutan stok
- Ekstrak Daun Dewa 7,5% : 0,375 ml dari larutan stok
- Ekstrak Daun Dewa 5% : 0,25 ml dari larutan stok

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

#### 4.7.4 Persiapan Sampel dan Kandang Penelitian

Dalam penelitian ini, dibutuhkan nyamuk *Culex sp.* dewasa betina sebanyak 50 ekor. Nyamuk *Culex sp.* tersebut dimasukkan ke dalam kandang yang khusus dirancang untuk penelitian ini. Sebelum penelitian, nyamuk-nyamuk tersebut harus distarvasi minimal 4 jam.

#### 4.7.5 Uji Potensi *Repellent*

Penelitian dilakukan pada petang hingga malam hari, antara pukul 17.00 – 23.00 WIB

- a. Percobaan dilakukan dengan menggunakan kotak yang diletakkan pada ruangan bersuhu  $\pm 27^\circ\text{C}$  dengan tingkat kelembaban antara 60-70%.
- b. Ekstrak Daun Dewa dipersiapkan.
- c. Kotak nyamuk diisi dengan nyamuk *Culex sp.* dewasa betina 50 ekor dan telah dipuasakan 4 jam.
- d. Cawan 1 berisi kapas yang telah dibasahi dengan 2,5cc larutan gula 20% + aquades 2,5cc (kontrol -), cawan 2 berisi *repellent* yang sudah diketahui / DEET (kontrol +), cawan 3,4,5 diberi kapas yang telah dibasahi dengan 2,5 cc larutan gula 20% + ekstrak Daun Dewa dengan konsentrasi yang berbeda.
- e. Dilakukan pengamatan dan penghitungan jumlah nyamuk yang hinggap pada kapas dan dihitung jumlah hinggapannya nyamuk pada jam ke-0, 1, 2, 4, dan ke-6. Setiap pengamatan dilakukan selama 5 menit. Pada tiap interval waktu antara jam perlakuan, cawan dikeluarkan dari kotak.
- f. Setiap pengamatan yang dilakukan selama 5 menit, jumlah nyamuk yang hinggap pada tiap cawan ditulis.

g. Presentase kemampuan *repellent* dihitung dengan rumus sebagai berikut:

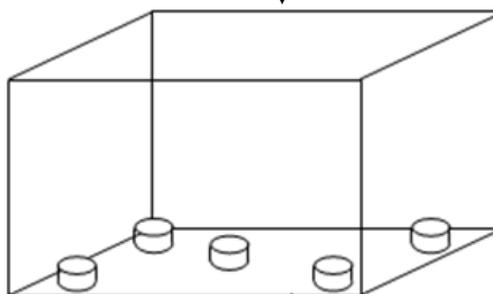
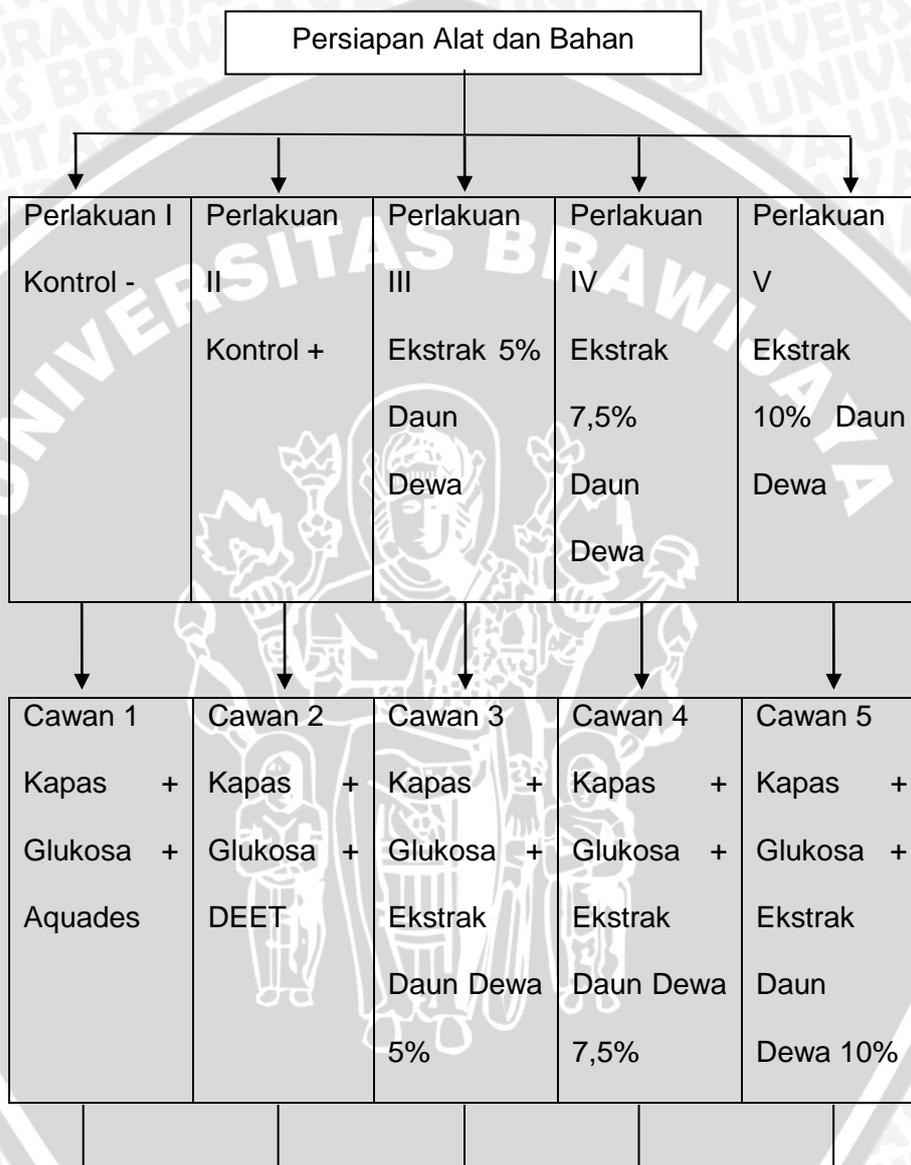
$$\frac{nc - r}{nc} \times 100\%$$

Keterangan:

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



4.7.6 Alur Penelitian



Amati dan catat jumlah nyamuk yang hinggap selama 5 menit pada setiap jam ke-0,1,2,4,6 lalu keluarkan cawan pada tiap interval waktu antar jam perlakuan

#### 4.8 Pengumpulan Data dan Analisis Data

Data hasil yang telah diperoleh dari pengamatan dimasukkan ke dalam tabel dan diklasifikasikan menurut perlakuan jumlah nyamuk yang mendarat untuk tiap-tiap konsentrasi (ekstrak Daun Dewa) setelah pengamatan 6 jam.

Analisis data yang digunakan adalah uji *One Way ANOVA* dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product Service Solution*). Uji *One Way ANOVA* bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan jumlah pendaratan nyamuk *Culex sp.* 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 harus normal, varian data harus identik (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-Wallis*.
4. Jika pada uji ANOVA atau *Kruskal-Wallis* 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-Wallis*). Uji *Kruskal-Wallis* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan potensi antar kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan potensi.

5. Uji korelasi *Pearson* digunakan untuk mengetahui hubungan antara besarnya potensi repelan dari masing-masing konsentrasi ekstrak Daun Dewa dengan lama perlakuan.

