

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *true experimental-post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan potensi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai insektisida terhadap lalat *Musca domestica* dewasa

4.2 Populasi dan sampel penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah lalat *Musca domestica* dewasa. Sampel yang digunakan adalah lalat *Musca domestica* dewasa yang memenuhi kriteria inklusi. Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah lalat *Musca domestica* dewasa yang hidup dan masih bergerak aktif.

4.3 Jumlah Pengulangan dan Jumlah sampel

Jumlah pengulangan pada masing-masing kelompok mengikuti rumus sebagai berikut (Lukito, 1998):

$$[(3n-1)+(p-1)] \geq 16$$

$$[(3n-1)+(5-1)] \geq 16$$

$$[(3n-1)+4] \geq 16$$

$$3n-1 \geq 12$$

$$3n \geq 13$$

$$n \geq 4,3$$

n = Jumlah pengulangan tiap kelompok

22

p = Jumlah kelompok perlakuan

Berdasarkan hasil perhitungan dari rumus tersebut maka pada penelitian ini masing-masing kelompok akan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali

Jumlah lalat pada masing-masing kandang yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan rumus sebagai berikut (Hanafian, 1995):

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(t-1)(4-1) \geq 15$$

$$(t-1)3 \geq 15$$

$$t \geq 6$$

t = Jumlah lalat tiap kandang

r = Jumlah pengulangan

Menurut rumus diatas, jumlah lalat dewasa yang digunakan adalah minimal 6 ekor lalat untuk setiap jenis perlakuan. Pada Penelitian ini digunakan 10 ekor lalat dewasa tiap kandangnya. Jadi jumlah sampel yang diperlukan pada penelitian ini adalah :

Jumlah lalat tiap kandang x jumlah perlakuan x jumlah pengulangan

$$10 \times 5 \times 4 = 200 \text{ ekor lalat}$$

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dengan waktu pelaksanaan pada bulan Mei-Juni 2013

4.5 Identifikasi Variabel

4.5.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung penelitian ini adalah jumlah lalat yang mati setelah penyemprotan ekstrak etanol daun sirih merah dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30%

4.5.2 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih merah dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30%

4.6 Bahan Penelitian

4.6.1 Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah

1. Daun sirih sebanyak 1 kg
2. Ethanol sebagai pelarut ekstrak

4.6.2 Bahan untuk Uji Insektisida Ekstrak Daun Sirih Merah

1. Larutan ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30%
2. Lalat *Musca sp.*
3. Aquades steril
4. Aseton
5. Air gula (glukosa 10 %)
6. Larutan malathion 0,28%

4.7 Instrumen Penelitian

4.7.1 Instrumen untuk Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah

- Alat penggerus / blender untuk menghaluskan daun sirih merah
- Tabung untuk merendam bubuk daun sirih merah, dengan diameter ± 8 cm, tinggi ± 30 cm
- Satu set alat evaporasi
- Klem statis
- Selang plastik
- *Waterbath*
- *Waterpump*
- Bak penampung aquadest, dengan ukuran : 60 x 25 x 30 cm
- Kertas saring
- Tabung Erlenmeyer
- Botol penampung hasil ekstraksi, dengan diameter ± 8 cm, tinggi ± 30 cm
- *Oven*
- Timbangan

4.7.2 Instrumen untuk Persiapan Lalat *Musca domestica* Dewasa

- Sangkar kaca (25 cm x 25 cm x 25 cm) (WHO, 2006)
- Jaring serangga

4.7.3 Instrumen untuk Menguji Potensi Insektisida Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah Terhadap Lalat *Musca domestica* Dewasa

- Sangkar kaca (25 cm x 25 cm x 25 cm)

4.8 Definisi Operasional

- Ekstrak daun sirih merah adalah ekstraksi berupa minyak kental yang diperoleh dari akhir evaporasi (setelah etanolnya dihilangkan) . Daun sirih merah yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan di Materia Medika. Batu.
- Insektisida pembanding yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan malathion 0,28% (WHO,2006).
- Potensi insektisida adalah kemampuan ekstrak etanol daun sirih merah dalam mematikan 10 ekor lalat *Musca domestica* dewasa (WHO,2006).

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Proses Ekstraksi

1. Daun sirih merah yang akan digunakan diiris kecil-kecil dan dioven selama 8 jam.
2. Setelah kering daun sirih merah dihaluskan dengan blender sehingga didapatkan serbuk dan ditimbang hasilnya 500 g.
3. Serbuk daun sirih tersebut dimasukkan ke dalam botol untuk direndam dengan ethanol selama \pm 1 minggu
4. Hasil ini selanjutnya akan dievaporasi (untuk memisahkan ekstrak daun sirih merah dengan pelarut ethanol).

4.9.2 Proses Evaporasi

1. Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung kemiringan 30° - 40° terhadap meja percobaan.
2. Hasil rendaman ethanol dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi.
3. Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah evaporator, pendingin spiral dihubungkan pada bagian atas evaporator, pendingin spiral dihubungkan dengan vakum dengan selang plastik.
4. *Water pump* ditempatkan dalam bak yang berisi aquadest, water pump dihubungkan dengan sumber listrik sehingga aquadest akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan merata).
5. Satu set alat evaporasi diletakkan, sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquadest pada *water bath*.
6. Vakum dan *water bath* dihubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhu pada *water bath* sekitar 90° C (sesuai dengan titik didih ethanol).
7. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama $\pm 2 - 3$ jam.
8. Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu $50 - 60^{\circ}$ C.
9. Hasilnya ekstrak yang diperoleh adalah 50 ml
10. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam penelitian.

4.9.3 Persiapan Lalat *Musca domestica* dewasa

Lalat *Musca sp.* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan di area sekitar Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

sejumlah 200 ekor. Lalat rumah yang digunakan adalah lalat yang masih aktif bergerak dan hidup. Persiapan sampel seperti ini merupakan sampel inklusi. Setelah itu lalat *Musca sp.* dimasukkan ke dalam kandang berukuran 25cm x 25cm x 25cm di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Brawijaya yang selanjutnya dilakukan penelitian

4.10 Persiapan Larutan untuk Perlakuan

Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok yakni kelompok kontrol (+), kontrol (-), ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30%. Untuk kelompok kontrol (+) digunakan malathion 0,28% karena kerja malathion yang dapat menghambat enzim asetilkolinerasa dengan cepat, kontrol (-) dengan aseton 1%, sedang untuk kelompok perlakuan terdapat ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30% dengan cara pengenceran. Sebelum melakukan pengenceran, dilakukan pencampuran untuk mendapatkan aseton 1% didalam aquadest. Kegunaan aseton adalah sebagai pelarut, khususnya untuk zat-zat non polar. Dalam hal ini aseton berfungsi untuk melarutkan ekstrak daun sirih merah didalam aquades karena sifatnya yang kurang polar. Untuk mendapatkan dosis yang diinginkan tersebut digunakan rumus pengenceran sebagai berikut :

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

Keterangan: M_1 = Konsentrasi larutan stok awal
 M_2 = Konsentrasi larutan stok yang diinginkan
 V_1 = Volume larutan stok awal yang harus dilarutkan
 V_2 = Volume larutan yang diinginkan

4.11 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan bersifat *trial* atau *error* yang bertujuan untuk:

- Memperoleh konsentrasi minimal larutan daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang dapat membunuh lalat dalam jumlah maksimal (LD100). Konsentrasi larutan yang digunakan pada penelitian pendahuluan ini seperti uji toksisitas yang lain berdasar pada deret hitung yaitu 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%. Selanjutnya setelah dilakukan penelitian pendahuluan, konsentrasi yang digunakan sebagai dasar melakukan penelitian adalah konsentrasi 10%, 20%, dan 30% dengan LD100 penelitian pendahuluan berada pada konsentrasi 30%.

4.12 Pelaksanaan Penelitian

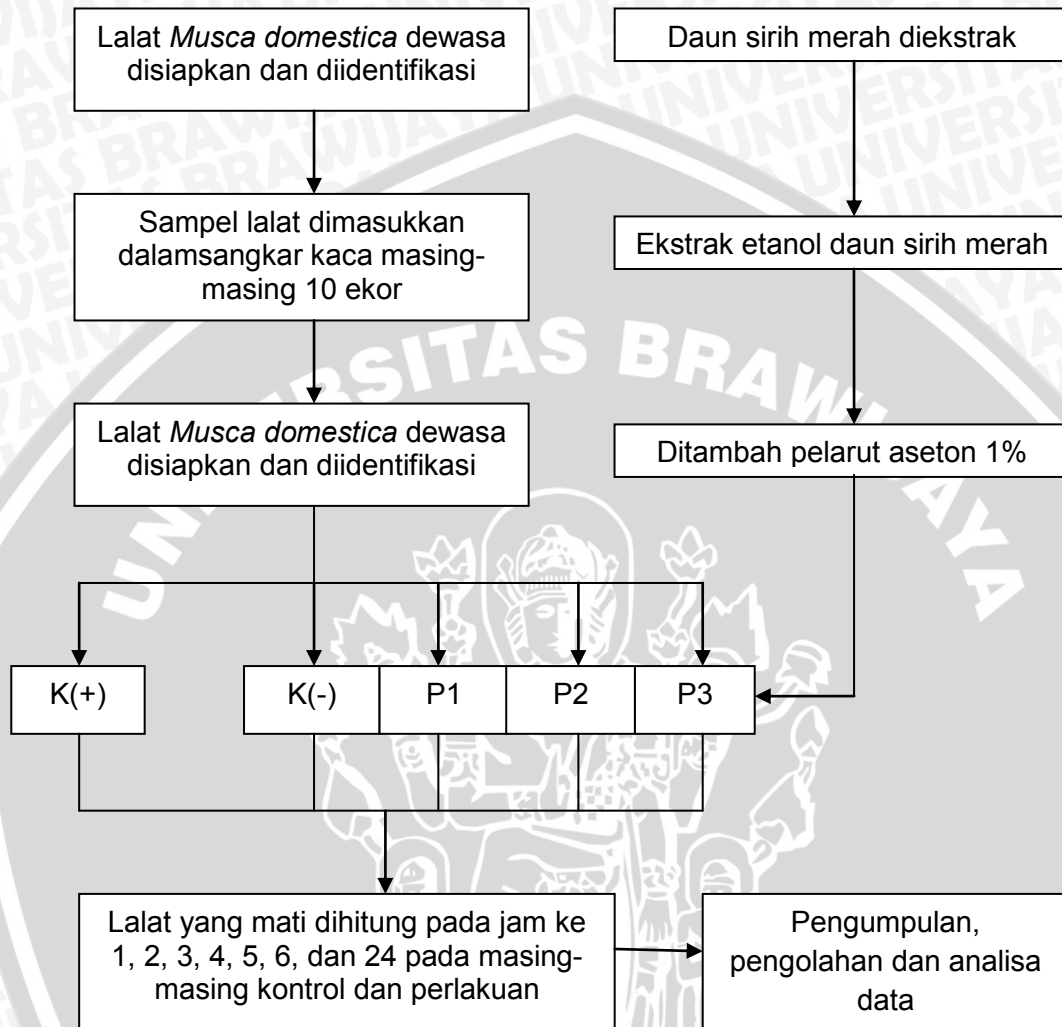
1. Mempersiapkan 5 buah kandang kaca untuk tempat perindukan lalat berukuran 25cm x 25cm x 25cm.. Pada tiap kandang lalat diisi lalat 10 ekor.
2. Larutan ekstrak etanol daun sirih dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30% dipersiapkan.
3. Pada saat akan digunakan, ambil secukupnya (untuk masing-masing konsentrasi, kontrol positif, dan kontrol negatif) untuk dimasukkan ke masing-masing sprayer
4. Isi sprayer dengan ekstrak sirih merah konsentrasi 10%,20%, dan 30%, lalu disemprotkan ke dalam masing-masing kandang sampai habis
5. Kandang 1 disemprot menggunakan aquades yang sudah dicampur aseton 1% sebanyak 3,5 ml sebagai kontrol negatif.

6. Kandang 2 disemprot dengan menggunakan malathion 0,28% sebanyak 3,5 ml sebagai kontrol positif.
7. Kandang 3 disemprot dengan menggunakan ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi 10% sebanyak 3,5 ml.
8. Kandang 4 disemprot dengan menggunakan ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi 20% sebanyak 3,5 ml.
9. Kandang 5 disemprot dengan menggunakan ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi 30% sebanyak 3,5 ml.
10. Jumlah lalat yang mati pada setiap perlakuan dihitung setelah penyemprotan
11. Tes ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali untuk setiap perlakuan
12. Sebelum dilakukan pengulangan kandang harus dibersihkan terlebih dahulu, dan lalat yang mati dibuang sedang lalat yang masih hidup pada jam ke-24 akan dimatikan.
13. Potensi kematian lalat *Musca domestica* dewasa dihitung dengan menggunakan rumus Abbot (Pavela, 2007), sebagai berikut :

$$A_1 = \frac{A-B}{100-B} \times 100\%$$

Keterangan :
A₁ = persentase potensi (dalam persen)
A = persentase kematian uji
B = persentase kematian kontrol negatif

4.13 Diagram Alur Penelitian



Keterangan :

- K (+) : penyemprotan dengan 3,5 ml malathion 0,28%
- K (-) : penyemprotan dengan 3,5 ml larutan aseton 1%
- P1 : penyemprotan dengan 3,5 ml larutan ekstrak etanol daun sirih merah dengan konsentrasi 10%
- P2 : penyemprotan dengan 3,5 ml larutan ekstrak etanol daun sirih merah dengan konsentrasi 20%
- P3 : penyemprotan dengan 3,5 ml larutan ekstrak etanol daun sirih merah dengan konsentrasi 30%

4.14 Rencana Pengolahan dan Analisa Data

Hasil pengukuran kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 19 untuk windows 7 dengan tingkat signifikansi

0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut :

1. Uji normalitas data: bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak kaerena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non-parametrik.
2. Uji homogenitas varian: bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah ada data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogeny. Jika didapatkan varian yang homogen maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji *One-way* ANOVA: bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan.
4. *Post Hoc Test* (uji Tuckey HSD): bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji Tuckey HSD dengan tingkat kemaknaan 95% ($p<0,05$).