

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true experimental-post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan potensi ekstrak daun Babadotan (*Ageratum conyzoides* L.) dari berbagai konsentrasi sebagai insektisida terhadap *Musca domestica*. Pada penelitian ini dilakukan randomisasi pada sampel sehingga kelompok kontrol dan eksperimen dianggap sama sebelum diberi perlakuan dan tidak diadakan pre-test.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

##### 4.2.1 Populasi

Dalam penelitian ini, populasi yang akan digunakan adalah *Musca domestica* dewasa yang memenuhi kriteria inklusi dan eklusi. Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah *Musca domestica* dewasa (sesuai morfologi) yang hidup dan aktif bergerak, sedangkan kriteria eklusi adalah *Musca domestica* dewasa yang mati sebelum percobaan dilakukan dan tidak aktif bergerak.

##### 4.2.2 Sampel

Sampel penelitian yang diambil adalah *Musca domestica* dewasa, baik jantan maupun betina yang memenuhi kriteria inklusi dan telah diseleksi, yang hidup dan sehat (dapat dilihat dari keaktifan bergerak). *Musca domestica* dewasa yang dimaksud adalah sesuai morfologi.

Penelitian ini meliputi 3 perlakuan dan 2 kontrol, yaitu:

- Kontrol negatif : Disemprot dengan aquades
- Kontrol positif : Disemprot dengan *malathion* 0,28%
- Perlakuan 1 : Disemprot dengan ekstrak daun Babadotan konsentrasi A
- Perlakuan 2 : Disemprot dengan ekstrak daun Babadotan konsentrasi B
- Perlakuan 3 : Disemprot dengan ekstrak daun Babadotan konsentrasi C

Penentuan jumlah ulangan mengikuti rumus penentuan pengulangan yang dilakukan oleh Rasyad (1999) yaitu dihitung berdasarkan rumus :

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

Keterangan :

p : jumlah taraf perlakuan

r : jumlah pengulangan (replikasi)

Maka :

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

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

dari perhitungan didapatkan  $r \geq 4$ , jadi pengulangan dilakukan minimal 4 kali untuk setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Untuk penelitian ini dipilih 4 kali pengulangan untuk setiap kelompok kontrol dan perlakuan.

Untuk estimasi besar sampel menggunakan rumus di bawah ini (Rasyad, 1999):

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

Keterangan :

t : jumlah sampel

r : jumlah pengulangan (replikasi)

Maka hasil yang diperoleh adalah:

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

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

$$3t - 3 \geq 15$$

$$3t \geq 18$$

$$t \geq 6$$

dari perhitungan didapatkan  $t \geq 6$ , jadi besar sampel untuk tiap perlakuan minimal 6 ekor. Penelitian ini akan menggunakan 10 ekor lalat per kandang (WHO, 1996). Jadi jumlah *Musca domestica* yang diperlukan pada penelitian ini sebanyak 10 ekor x 5 kelompok coba x 4 pengulangan, sehingga total 200 ekor lalat *Musca domestica* yang digunakan. Setiap kali pengulangan memerlukan 50 ekor lalat.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun Babadotan (*Ageratum conyzoides* L.).

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah lalat *Musca domestica* yang mati setelah disemprot dengan ekstrak daun Babadotan (*Ageratum conyzoides* L.).

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Alokasi waktu yang digunakan mulai dari persiapan sampai dengan penelitian sekitar dua bulan.

## 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

### 4.5.1 Bahan

Dalam penelitian ini bahan yang digunakan juga dibagi dalam 2 kelompok peralatan, yaitu bahan untuk ekstraksi dan evaporasi daun *Ageratum conyzoides* L., dan bahan untuk uji ekstrak daun *Ageratum conyzoides* L.

#### 4.5.1.1 Bahan untuk Ekstraksi dan Evaporasi Daun *Ageratum conyzoides*

Dalam proses ekstraksi dan evaporasi daun *Ageratum conyzoides* digunakan beberapa bahan, yaitu daun *Ageratum conyzoides* L., etanol 80% sebagai pelarut ekstrak, dan aquades.

#### 4.5.1.2 Bahan untuk Uji Ekstrak Daun *Ageratum conyzoides*

Dalam pengujian ekstrak daun *Ageratum conyzoides* digunakan beberapa bahan, yaitu lalat rumah *Musca domestica*, larutan ekstrak daun *Ageratum conyzoides* L., nutrisi lalat berupa larutan gula 10% dalam 100 ml aquades, *malathion* 0,28% sebagai kontrol positif, dan aquades sebagai kontrol negatif.

### 4.5.2 Alat

Dalam penelitian ini alat yang digunakan juga dibagi dalam 2 kelompok peralatan, yaitu alat untuk ekstraksi dan evaporasi daun *Ageratum conyzoides* L., dan alat untuk uji ekstrak daun *Ageratum conyzoides* L.

#### 4.5.2.1 Alat untuk Ekstraksi dan Evaporasi Daun *Ageratum conyzoides* L.

Dalam proses ekstraksi dan evaporasi daun *Ageratum conyzoides* digunakan beberapa alat, yaitu alat pemotong (pisau atau gunting), alat penggerus/ blender, gelas ukur, *waterbath*, labu erlenmeyer atau *beaker glass* (dengan volume 1 liter) untuk merendam bubuk daun *Ageratum conyzoides* L.,

rotary evaporimeter, cawan petri, neraca analitik, kertas saring, pinset, gelas kimia, pipet tetes, batang pengaduk, alumunium foil, dan kertas label.

#### 4.5.2.2 Alat untuk Uji Ekstrak Daun *Ageratum conyzoides* L.

Dalam pengujian ekstrak daun *Ageratum conyzoides* L. digunakan beberapa alat, yaitu kantung plastik transparan sebagai penangkap lalat, toples, kasa, kandang perlakuan dengan ukuran 25 cm<sup>3</sup>, sprayer, dan timer.

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Lalat *Musca domestica* adalah lalat dewasa sesuai morfologi dalam kondisi hidup dan sehat (aktif bergerak) yang ditangkap dari tempat pembuangan sampah di sekitar Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan menggunakan umpan berupa sampah organik.
2. Ekstrak daun *Ageratum conyzoides* L. adalah daun *Ageratum conyzoides* L. yang diambil di daerah Kerek, Tuban, Jawa Timur dan telah dilakukan identifikasi sesuai morfologinya. Proses ekstraksinya dilakukan berdasarkan tata cara pelaksanaan ekstraksi menggunakan pelarut etanol 80%. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.
3. Lalat mati adalah lalat jatuh, tidak mampu bergerak secara aktif, dan tidak dapat bergerak meskipun diberi rangsang berupa sentuhan (Saleh, 1996). Sentuhan mekanik di sini yang dimaksud bisa disentuh atau digerakkan dengan menggunakan batang lidi.
4. Potensi insektisida adalah rerata jumlah kematian lalat yang dihitung berdasarkan rumus potensi insektisida Abbott:

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

(Pavela, 2007)

5. Perbandingan adalah kontrol positif berupa malathion 0,28%, sedangkan kontrol negatif berupa aquades.
6. Lethal concentration (LC) adalah konsentrasi insektisida yang dibutuhkan untuk menimbulkan sejumlah kematian pada populasi serangga. LC<sub>50</sub> adalah konsentrasi insektisida yang dibutuhkan untuk menimbulkan kematian pada 50% populasi serangga. LC<sub>100</sub> adalah konsentrasi insektisida yang dibutuhkan untuk menimbulkan kematian pada 100% populasi serangga, namun secara teoritis hal ini sulit untuk diestimasi karena selalu ada faktor-faktor lain yang mempengaruhi kematian serangga, selain paparan insektisida (WHO, 2006).

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun *Ageratum conyzoides* L.

Metode yang digunakan untuk ekstraksi adalah metode Harborne (1973) yaitu bahan diekstrak dengan rotary evaporimeter, proses ekstraksi yang dilakukan adalah ekstrak kasar, tahapannya adalah sebagai berikut:

- 1) Daun dari *Ageratum conyzoides* L. dikeringkan pada udara terbuka dan tidak boleh langsung terkena sinar matahari (dalam kondisi suhu ruangan).
- 2) Daun yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender kemudian disaring untuk mendapatkan serbuk yang halus.
- 3) Selanjutnya dilakukan maserasi. Tahap ini merupakan tahap yang cukup menentukan keberhasilan karena dalam tahap ini harus mengetahui

pelarut yang cocok untuk senyawa tertentu. Daun yang sudah dihaluskan kemudian direndam dengan pelarut etanol selama 2 hari pada suhu kamar. Sebagai asumsi pelarut etanol dapat menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun *Ageratum conyzoides* L., khususnya senyawa yang polar (larut dalam air). Maserasi minimum 3 x 24 jam diulang beberapa kali sampai diperoleh maserat bening. Hasil proses maserasi kemudian disaring dengan kertas saring.

- 4) Daun hasil maserasi kemudian pelarutnya diuapkan dengan menggunakan rotary evaporimeter pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak 100%.
- 5) Ekstrak yang dihasilkan diambil untuk dibuat konsentrasinya, masing-masing konsentrasi ekstrak siap digunakan untuk pengujian.

#### 4.7.2 Cara Pembuatan Larutan Stok

Ekstrak daun *Ageratum conyzoides* L. yang didapatkan dari hasil ekstraksi dan evaporasi adalah sebagai larutan stok awal dengan konsentrasi 100%. Kemudian, dari sediaan dengan konsentrasi 100% ini dibuat beberapa sediaan larutan stok dengan konsentrasi sesuai dengan perlakuan dalam penelitian. Pembuatan larutan stok ini dilakukan dengan cara mengencerkan larutan stok awal dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:  $M_1$  = Konsentrasi larutan stok awal (100%)  
 $M_2$  = Konsentrasi larutan stok yang diinginkan  
 $V_1$  = Volume larutan stok awal yang harus dilarutkan  
 $V_2$  = Volume larutan yang diinginkan

Sediaan untuk masing-masing konsentrasi dilarutkan dalam aquades hingga 20 ml. Volume ini menyesuaikan dengan kebutuhan larutan untuk 4 kali pengulangan. Jumlah perbandingan larutan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperti tersebut di bawah ini yang diperoleh dari hitungan dengan rumus:

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

Misal, untuk membuat 20 ml larutan dengan konsentrasi 5%, dilakukan pencampuran 1 ml larutan stok 100% dengan 19 ml aquades. Untuk membuat 20 ml larutan dengan konsentrasi 10%, dilakukan pencampuran 2 ml larutan stok 100% dengan 18 ml aquades. Untuk membuat 20 ml larutan dengan konsentrasi 15%, dilakukan pencampuran 3 ml larutan stok 100% dengan 17 ml aquades, begitu seterusnya.

#### 4.7.3 Cara Penangkapan dan Penyiapan Sampel

Lalat *Musca domestica* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari sekitar Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Lalat *Musca domestica* ditangkap dengan menggunakan umpan berupa sampah organik yang diletakkan di dalam botol plastik air mineral 1500 ml. Kemudian bila ada lalat yang masuk botol, lalat ditangkap dengan menggunakan plastik yang ditutupkan pada bagian mulut botol. Lalat yang sudah ditangkap kemudian ditampung dalam toples berpenutup kasa dan di dalamnya terdapat wadah kecil berisi larutan glukosa sebagai makanannya. Jumlah sampel sebanyak 50 ekor lalat.

#### 4.8 Cara Kerja

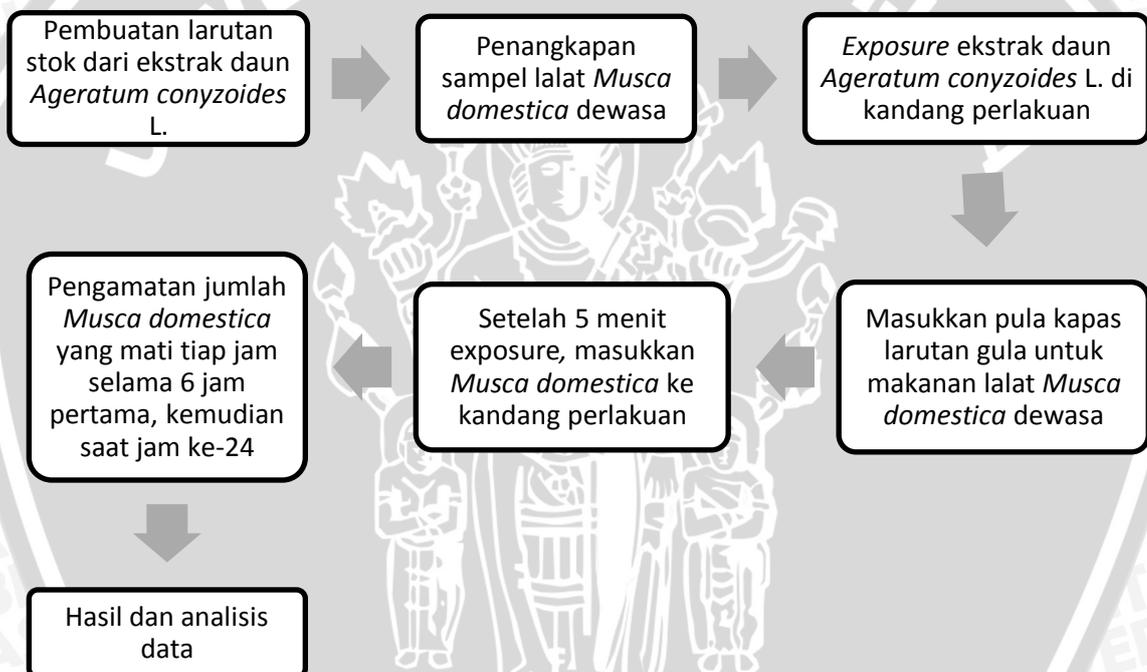
1. Sebelum dilakukan penelitian, dilakukan terlebih dahulu penelitian pendahuluan untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak daun *Ageratum*

*conyzoides* L. yang efektif (larutan dengan konsentrasi minimum yang memiliki daya bunuh maksimum) yaitu dengan cara menyemprotkan ekstrak daun *Ageratum conyzoides* L. dengan konsentrasi 0%, 20%, 40%, 60%, dan 80%.

2. Larutan ekstrak daun *Ageratum conyzoides* L. disiapkan dengan 3 konsentrasi berbeda, yaitu konsentrasi 40%, 50%, dan 60%.
3. Pada saat akan digunakan, ekstrak daun *Ageratum conyzoides* L. (untuk masing-masing konsentrasi), insektisida yang mengandung malation 0,28% sebagai kontrol positif, dan aquades sebagai kontrol negatif, masing-masing diambil 4 ml untuk dimasukkan ke dalam tiap-tiap sprayer.
4. Isi sprayer disemprotkan ke dalam masing-masing kandang sampai habis dengan cara disemprotkan ke segala arah dan diupayakan agar merata ke seluruh permukaan sisi dalam kandang. Penelitian dilakukan dengan menggunakan 5 buah kandang berbentuk bujur sangkar berukuran 25 cm<sup>3</sup> yang diletakkan dalam ruang dengan temperatur ruang 27 ± 2°C dan tingkat kelembaban antara 60-70%.
5. Sebelum dimasukkan dalam kandang perlakuan, *Musca domestica* dikarantina dalam kandang penampungan yang di dalamnya terdapat wadah kecil berisi larutan glukosa sebagai makanannya. Setelah dikarantina, lalat *Musca domestica* dewasa dimasukkan ke dalam kandang yang telah disiapkan, masing-masing 10 ekor lalat.
6. Pengamatan dilakukan tiap jam selama 6 jam pertama, kemudian dilihat lagi setelah 24 jam. Dihitung dan dicatat berapa lalat yang mati.

7. Pengulangan dilakukan berdasarkan rumus  $p(n-1) \geq 15$  dengan  $p$  adalah jumlah perlakuan dan  $n$  adalah jumlah pengulangan (Rasyad, 1999). Dan diperoleh hasil bahwa pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali.
8. Pada penelitian ini menggunakan kontrol positif (malation 0,28%) dan hasil penelitian hanya diterima bila kematian *Musca domestica* pada kontrol negatif kurang dari 10% populasi (Ahmad, 2008).

#### 4.9 Alur Penelitian



#### 4.10 Analisis Data

Data-data yang telah dikelompokkan dan ditabulasi kemudian dilakukan analisis statistik dengan menggunakan fasilitas SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) 17.0 for Windows dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

Untuk mengetahui apakah terdapat keragaman antar perlakuan dilakukan uji hipotesis komparatif. Metode yang dapat digunakan yaitu uji *One-way ANOVA* dengan alternatifnya yaitu uji *Kruskal-Wallis*. Metode *One-way ANOVA (Analysis of Variance)* dapat digunakan jika data memenuhi syarat-syarat sebagai berikut (Dahlan, 2004).

1. Terdapat lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan.
2. Distribusi data normal, yang dapat diketahui dari uji normalitas (*Kolmogorov-Smimov* atau *Shapiro-Wilk*). Jika distribusi data tidak normal, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya distribusi data menjadi normal.
3. Varians data sama atau homogen, yang dapat diketahui dari uji homogeritas. Jika varians data tidak sama atau homogen, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya varians data menjadi sama atau homogen.
4. Jika data hasil transformasi tidak berdistribusi normal atau varians tetap tidak sama, maka alternatifnya dipilih uji *Kruskal-Wallis*.

Jika pada uji *One-way ANOVA* atau *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai  $p < 0,05$ , maka dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi dan perbedaan waktu terhadap potensi insektisida. Kemudian untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda dilakukan *post-hoc test* dengan uji *Tukey HSD* untuk data yang menggunakan uji *One-way ANOVA* dan uji *Mann-Whitney* untuk data yang menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Kemudian untuk mengetahui apakah terdapat korelasi antara perbedaan konsentrasi ekstrak daun *Ageratum conyzoides* L. dengan jumlah lalat yang mati dan perbedaan lama waktu kontak antara insektisida ekstrak daun *Ageratum conyzoides* L. dan lalat

terhadap jumlah lalat yang mati, dilakukan uji korelasi *Pearson* atau *Spearman* (Dahlan, 2004).

