

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true experimental-post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) sebagai insektisida terhadap lalat *Musca domestica* dengan menggunakan metode semprot.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Proses ekstraksi dan evaporasi kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) dilakukan di Laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

4.3 Sampel dan Estimasi Besar Sampel

4.3.1 Jumlah Sampel

Sampel penelitian yang diambil adalah sejumlah lalat *Musca domestica*. Lalat *Musca domestica* ditangkap dengan menggunakan cara umpan di tempat pembuangan akhir (TPA) sampah di daerah Supit Urang.

Pada penelitian ini menggunakan lalat *Musca domestica* yang memenuhi kriteria inklusi. Kriteria inklusi penelitian ini adalah:

- Lalat *Musca domestica* yang masih hidup
- Masih bergerak secara aktif

Sedangkan kriteria eksklusi adalah lalat *Musca domestica* yang tidak aktif bergerak atau mati sebelum diberi perlakuan.

Jumlah sampel Lalat *Musca domestica* yang digunakan adalah 10 ekor untuk setiap jenis perlakuan (WHO,2006).

4.3.2 Perlakuan

Adapun perlakuan yang diberikan pada sampel adalah dengan membagi menjadi lima perlakuan, perlakuan-perlakuan dalam penelitian ini adalah:

- 1) Kontrol positif:
Larutan Malathion 0,28% (WHO, 2006)
- 2) Kontrol negatif:
Aseton 1% (WHO, 2006)
- 3) Perlakuan I:
Larutan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) 25%
- 4) Perlakuan II:
Larutan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) 30%
- 5) Perlakuan III:
Larutan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) 35%

4.3.3 Pengulangan

Pengulangan eksperimen berdasarkan rumus (Tjokronegoro, 2001):

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

Keterangan:

P = Banyaknya kelompok perlakuan
n = Jumlah replikasi (pengulangan)

Perhitungan:

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

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

$$5n-5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2$$

Jadi berdasarkan rumus di atas, pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini minimal adalah 5 kali.

4.4 Identifikasi Variabel

4.4.1 Variabel *Dependent* (tergantung)

Variabel *dependent* (variabel tergantung) adalah potensi ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) (dalam %) sebagai insektisida terhadap lalat *Musca domestica*.

4.4.2 Variabel *Independent* (bebas)

Variabel *independent* (variabel bebas) adalah konsentrasi (dalam %) dan lama waktu paparan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) sebagai insektisida terhadap lalat *Musca domestica*.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat-Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terbagi dalam 2 kelompok yaitu alat-alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak etanol kulit jeruk lemon serta alat-alat yang digunakan untuk uji potensi insektisida kulit jeruk lemon (*Citrus limon*).

❖ Alat Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limon*):

- 1) Alat penggerus/*blender*
- 2) Tabung untuk merendam serbuk kering kulit jeruk lemon yang sudah digerus
- 3) Satu set alat evaporasi
- 4) Selang plastik
- 5) Waterbath
- 6) Water pump
- 7) Bak penampung aquades
- 8) Botol penampung hasil ekstraksi
- 9) Klem statis
- 10) *Oven*
- 11) Timbangan analitik
- 12) *Freezer*/lemari es

❖ Alat Untuk Uji Potensi Insektisida Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limon*):

- 1) Kandang lalat
- 2) *Sprayer*/alat semprotan
- 3) Gelas ukur
- 4) Jarum
- 5) Spet

4.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terbagi dalam 2 kelompok yaitu bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) dan bahan uji potensi insektisida kulit jeruk lemon (*Citrus limon*).

- Bahan Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Lemon:

- 1) Kulit jeruk lemon (*Citrus limon*)
- 2) Aquades
- 3) Pelarut ekstrak (Etanol 96%)
- 4) Kertas saring

- ❖ Bahan Uji Potensi Insektisida Kulit Jeruk Lemon:

- 1) Ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*)
- 2) Aseton 1%
- 3) Lalat 10 ekor setiap perlakuan
- 4) Cairan Malathion 0,28%

4.6 Definisi Operasional

- Buah jeruk lemon (*Citrus limon*) dibeli di Pasar Besar Alun-Alun.
- Potensi insektisida adalah kemampuan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) membunuh lalat *Musca domestica*.
- Uji potensi adalah kemampuan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) mematikan lalat *Musca domestica* dalam waktu 24 jam.
- Ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*): Berupa minyak kental dan mempunyai aroma khas diproduksi setelah serbuk kering kulit jeruk lemon direndam dalam pelarut etanol 96% dan dilakukan evaporasi. Metode yang sama pernah digunakan sebelumnya dalam penelitian kulit jeruk lemon dan metode ini berbasis "Technique of Simple Extraction" (An Introduction to Modern Experimental Organics, 1969).

- Kontrol positif adalah bahan pembanding yang telah terbukti memiliki potensi insektisida. Kontrol positif menurut WHO adalah larutan Malathion 0,28% (WHO, 2006).
- Kontrol negatif adalah bahan pelarut ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) yang tidak memberikan pengaruh pada hasil penelitian. Pada penelitian ini digunakan kontrol negatif Aseton 1% (WHO, 2006).
- Lalat mati: Lalat *Musca domestica* yang distimulasi dengan ujung lidi, tidak menunjukkan respon sama sekali.

4.7 Cara Kerja Penelitian

4.7.1 Ekstraksi dan Evaporasi Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limon*)

4.7.1.1 Proses Ekstraksi Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limon*)

Persiapan penelitian meliputi proses ekstraksi kulit jeruk lemon untuk mengambil minyak atsirinya dan kemudian hasilnya akan digunakan dalam proses penelitian selanjutnya, yaitu uji efek ekstrak etanol kulit jeruk lemon sebagai insektisida. Proses ekstraksi kulit jeruk lemon dilakukan mengikut langkah-langkah yang didapat di dalam "Technique of Simple Extraction" yang dinyatakan didalam buku eksperimen kimia organik yaitu *An Introduction to Modern Experimental Organic*. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96% (*An Introduction to Modern Experimental Organics*, 1969).

Pertama, kulit jeruk lemon dicuci terlebih dahulu menggunakan air bersih yang mengalir, kemudian kulit jeruk lemon tersebut diiris tipis dan segera dikeringkan di bawah sinaran matahari. Kulit jeruk lemon yang sudah kering kemudiannya dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60-80 °C agar ia menjadi

kering dengan sempurna. Kulit jeruk lemon yang sudah benar-benar kering kemudiannya dihaluskan menggunakan *blender* sehingga didapatkan serbuk. Serbuk kulit jeruk lemon tersebut harus diambil beratnya. Kulit jeruk lemon disediakan sebanyak 0,7 kg atau 700 g dibungkus kertas saring. Serbuk kulit jeruk yang sudah ditimbang kemudian dimasukkan kedalam botol dan direndamkan ke dalam etanol 96% selama satu minggu. Proses seterusnya adalah mengevaporasi atau memisahkan hasil ekstrak kulit jeruk yang didapat dengan pelarut etanolnya.

4.7.1.2 Proses Evaporasi Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limon*)

Langkah pertama adalah memasang *evaporator* pada tiang permanen agar dapat digantung pada kemiringan 30° - 40° terhadap meja percobaan. Labu pemisah ekstraksi digunakan untuk memisahkan hasil rendaman etanol 96% yang berbentuk larutan dengan cara menghubungkan labu pemisah dengan bahagian bawah evaporator, lalu pendingin spiral dihubungkan ke bahagian atas evaporator. Pendingin spiral juga dihubungkan dengan vakum dan *water pump* dengan selang plastik.

Water pump pula ditempatkan ke dalam bak yang berisi aquades, apabila dihidupkan dengan sumber listrik, aquades akan mengalir memenuhi pendingin spiral dan perlu ditunggu sehingga air mengalir rata. Satu set *evaporator* diletakkan sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *water bath*.

Vakum dan *water bath* dihidupkan dengan sumber listrik, suhu *water bath* kemudian dinaikkan sampai 70°C , yaitu merupakan titik didih etanol 96%. Selama kurang lebih 2-3 jam, sirkulasi dibiarkan berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa di dalam labu pemisah.

Hasil evaporasi dipanaskan di dalam oven selama 1-2 hari pada suhu 50-60 °C. Hasil akhir ekstrak etanol kulit jeruk lemon adalah berupa minyak kental, lalu hasil ekstrak ini ditimbang dengan timbangan analitik dan disimpan di dalam lemari es untuk memperlambat kerusakan.

4.7.1.3 Pembuatan Larutan Stok 50%

Ekstrak pekat kulit jeruk lemon 100% yang disimpan di dalam kulkas perlu diturunkan suhunya sesuai dengan suhu kamar dengan cara membiarkannya di udara kamar selama 15 menit. Ekstrak etanol kulit jeruk lemon sebanyak 5 ml dicampurkan dengan campuran pelarut 5 ml Aseton 1% untuk menghasilkan larutan stok 50%.

4.7.1.4 Pembuatan Larutan Perlakuan

Larutan stok 100% dilarutkan dalam Aseton 1% hingga didapatkan dosis yang diinginkan dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:

M_1 : Konsentrasi larutan stok yang sebesar-besarnya 100%

M_2 : Konsentrasi larutan yang diinginkan

V_1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan

V_2 : Volume larutan perlakuan yang besarnya 3,5 ml

Untuk kelompok kontrol negatif digunakan 3,5 ml Aseton 1% dan untuk kontrol positif menggunakan 3,5 ml Malathion 0,28%. Sedangkan untuk kelompok perlakuan digunakan 3 dosis (M_2) : 25%, 30% dan 35%. Semua kelompok dilarutkan dalam Aseton 1% hingga didapatkan volume akhir sebanyak 3,5 ml. Konsentrasi 25%, 30% dan 35% ditentukan melalui proses studi pendahuluan (WHO, 2006).

4.8 Cara Kerja Penelitian

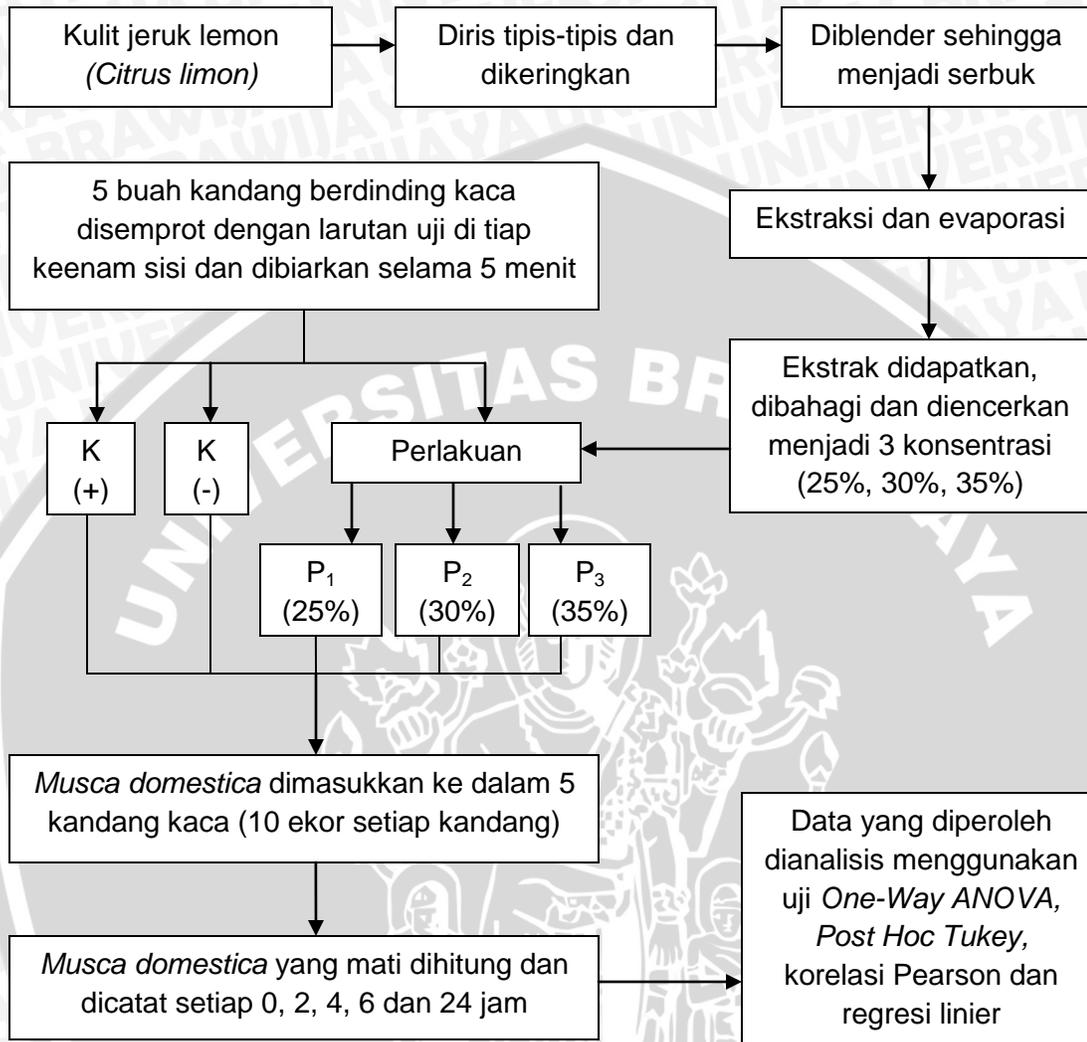
4.8.1 Studi Pendahuluan

Studi pendahuluan dilakukan untuk mencari dosis atau konsentrasi perlakuan yang sesuai untuk uji coba di dalam eksperimen. Dasar penentuan dosis atau konsentrasi pada studi pendahuluan adalah *trial* dan *error*. Dosis atau konsentrasi yang diuji coba hanya akan dilakukan pengulangan sebanyak 1 kali. Sampel akan dibagi menjadi 6 kelompok, kelompok 1 adalah kontrol yaitu hanya diberikan Aseton 1% dan 5 kelompok perlakuan dengan konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30% dan 35%. Jumlah lalat ditetapkan 10 ekor per kelompok. LD₁₀₀ ditentukan dengan melihat seberapa besar dosis atau konsentrasi minimal yang diperlukan untuk membunuh 100% sampel lalat dalam jangka waktu 24 jam.

4.8.2 Pelaksanaan Penelitian

- 1) Penelitian dilakukan dengan menggunakan 5 buah kandang berdinding kaca dan berbentuk kubus berukuran 25 cm x 25 cm x 25 cm diletakkan dalam ruang dengan temperatur 27 ± 2 °C dan tingkat kelembaban antara 60 -70%.
- 2) Siapkan larutan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) dengan berbagai konsentrasi.
- 3) Pada saat akan digunakan, ambil ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) secukupnya (untuk masing-masing konsentrasi), insektisida Malathion 0,28% sebagai kontrol positif, dan Aseton 1% sebagai kontrol negatif untuk dimasukkan ke dalam masing-masing *sprayer*.
- 4) Isi *sprayer* disemprotkan kedalam masing-masing kandang pada setiap keenam sisi dinding kaca sampai habis.

- 5) Kandang 1 disemprot dengan menggunakan Malathion 0,28% sebanyak 3,5 ml sebagai kontrol positif (WHO, 2006).
- 6) Kandang 2 disemprot dengan menggunakan Aseton 1% sebanyak 3,5 ml sebagai kontrol negatif (WHO, 2006).
- 7) Kandang 3 disemprot dengan menggunakan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) dengan konsentrasi 25% sebanyak 3,5 ml.
- 8) Kandang 4 disemprot dengan menggunakan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) dengan konsentrasi 30% sebanyak 3,5 ml.
- 9) Kandang 5 disemprot dengan menggunakan ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) dengan konsentrasi 35% sebanyak 3,5 ml.
- 10) Kemudian, dibiarkan selama 5 menit sehingga larutan yang disemprot merata pada seluruh ruang kandang.
- 11) Setelah 5 menit, masukkan lalat *Musca domestica* sebanyak 10 ekor kedalam masing-masing kandang yang akan diteliti.
- 12) Jumlah lalat yang mati pada setiap perlakuan dihitung setelah penyemprotan yaitu pada 0 jam, 2 jam, 4 jam, 6 jam dan 24 jam setelah penyimpanan di laboratorium.
- 13) Tes ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 5 kali untuk tiap perlakuan.



Gambar 4.1 Diagram Alur Kerja Penelitian

Keterangan:

- K (+) : Perlakuan dengan 3,5 ml Malathion 0,28% (kontrol positif)
- P₁ : Perlakuan dengan 3,5 ml ekstrak dengan konsentrasi 25%
- P₂ : Perlakuan dengan 3,5 ml ekstrak dengan konsentrasi 30%
- P₃ : Perlakuan dengan 3,5 ml ekstrak dengan konsentrasi 35%
- K (-) : Perlakuan dengan 3,5 ml Aseton 1% (kontrol negatif)

4.9 Pengumpulan Data

Data hasil yang telah diperoleh dari pengamatan dimasukkan dalam tabel dan diklasifikasikan menurut perlakuan, jumlah lalat *Musca domestica* yang mati dan waktu pengulangan. Dari tabel tersebut, hasilnya dianalisis dan dimasukkan dalam perhitungan statistik.

4.10 Metode Pengukuran Potensi Insektisida

Persentase potensi insektisida ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) dihitung menggunakan formula Abbot dengan rumus:

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

Keterangan:

A_1 : Potensi insektisida

A : Persentase kematian lalat uji dengan berbagai konsentrasi

B : Persentase kematian lalat kontrol negatif (Suwasano, H dan Soekirno, M, 2004)

4.11 Analisis Data Penelitian

Data-data hasil yang telah dikelompokkan dan dimasukkan ke dalam tabel, diuji kemaknaannya dengan menggunakan *One-way ANOVA*. *Anova* ini untuk menganalisis apakah ada perbedaan persentase kematian lalat *Musca domestica* antara lebih dari dua kelompok. Syarat-syarat analisis ANOVA : (1) kelompok lebih dari tiga kelompok, (2) distribusi skor setiap perlakuan adalah normal dan (3) varian tiap perlakuan adalah homogen.

Hipotesis statistik dalam penelitian ini adalah :

- H_0 : tidak terdapat perbedaan persentase jumlah kematian lalat *Musca domestica* antara kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) dibanding dengan kelompok kontrol yang tidak mendapat pemberian ekstrak etanol kulit jeruk lemon.
- H_1 : terdapat perbedaan yang signifikan persentase jumlah kematian lalat *Musca domestica* antara kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol kulit jeruk lemon (*Citrus limon*) dibandingkan kelompok kontrol yang tidak mendapat pemberian ekstrak etanol kulit jeruk lemon. Terdapat ≥ 2 kelompok yang berbeda.

Apabila didapatkan perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan analisis dengan uji *Post Hoc Tukey* untuk menguji kelompok mana saja yang memiliki perbedaan nyata. Kemudian dilanjutkan dengan analisis korelasi Pearson, dimana analisis untuk melihat kekuatan hubungan antara 2 variabel, yaitu konsentrasi dan lama waktu paparan ekstrak etanol kulit jeruk lemon dengan potensi insektisida. Selain itu, turut dilakukan uji regresi linier.