

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true eksperimental-post test only controlling group design* yang bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan potensi beberapa konsentrasi ekstrak daun ceremai (*Phyllanthus acidus L.*) sebagai insektisida terhadap Lalat *Kematian Chrysomya sp.* dengan metode semprot.

4.2 Subjek penelitian

Subjek penelitian ini adalah *Chrysomya sp.* penelitian ini meliputi 3 perlakuan dan 2 kontrol, yaitu :

- Kontrol negatif : Disemprot dengan steril akuades (tanpa pemberian ekstrak daun ceremai)
- Kontrol positif : Disemprot dengan komponen *malathion* 0,28% (tanpa pemberian ekstrak daun ceremai)
- Perlakuan 1: Disemprot dengan ekstrak daun ceremai konsentrasi 32,5 %
- Perlakuan 2: Disemprot dengan ekstrak daun ceremai konsentrasi 35%
- Perlakuan 3: Disemprot dengan ekstrak daun ceremai konsentrasi 37,5%

4.3 Pengulangan dan Besar Sampel

4.3.1 Pengulangan

Pada penelitian ini, digunakan 5 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda, serta 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus $P(n-1) \geq 15$. Berdasarkan rumus tersebut hubungannya jumlah pengulangan adalah sebagai berikut (solimun, 2001):

$$P(n-1) \geq 15$$

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4 \sim 5$$

Jadi besarnya pengulangan yang dilakukan adalah 4 kali.

Keterangan : n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (konsentrasi ekstrak daun ceremai)

4.3.2 Besar Sampel

Untuk pengukuran jumlah sampel yang digunakan untuk penelitian menggunakan rumus (Supranto J, 2000):

Dengan: t = jumlah sampel

r = jumlah pengulangan

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

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

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

$$3t \geq 18$$

$$t \geq 6$$

Besar sampel yang akan digunakan adalah minimal 6 lalat *Chrysomya sp* dalam setiap perlakuan pada penelitian ini menggunakan 10 ekor lalat *Chrysomya sp*. sesuai rekomendasi (WHO,2006), maka setiap kali percobaan membutuhkan 3 kali perlakuan dan 1 kontrol negatif serta 1 kontrol positif sehingga jumlah lalat *Chrysomya sp* yang dibutuhkan adalah $10 \times 5 \times 4 = 200$ ekor lalat *Chrysomya sp*.

4.4 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan juni sampai juli tahun 2014.

4.5 Definisi Oprasional

1. Ekstrak daun ceremai adalah hasil ekstraksi berupa minyak kental yang diperoleh dari akhir proses evaporasi (setelah pelarut etanolnya dihilangkan).
2. Lalat Hijau yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari sekitar Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya lalat yang tetap hidup yang akan dipakai sebagai sempel.
3. Metode semprot yang digunakan dalam penelitian dilakukan dengan menyemprotkan ekstrak daun ceremai berbagai konsentrasi yang dimasukkan dalam botol *sprayer* pada dinding-dinding kandang lalat rumah dari jarak 25 cm yaitu pada lubang untuk tempat tangan masuk ke kandang tersebut.
4. Potensi insektisida adalah di saat lalat jatuh ke dasar kandang dan tidak aktif atau tidak bergerak pada saat diberikan rangsangan sentuh yang selanjutnya diolah dengan menggunakan formula *Abbot*.

4.6 Variabel Penelitian

4.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak daun ceremai dengan 3 konsentrasi yaitu : 32,5%, 35%, 37,5%

4.6.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung penelitian ini adalah jumlah lalat hijau yang mati setelah dimasukkan dalam kandang yang telah disemprot dengan pemberian insektisida ekstrak daun ceremai dengan konsentrasi yang berbeda. Lalat hijau mati adalah lalat yang tidak aktif bergerak dengan pemberian rangsang sentuhan.

4.7 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.7.1 Bahan Penelitian

4.7.1.1 Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus*)

- Daun ceremai (*Phyllanthus acidus*) yang telah dikeringkan
- Etanol 96%
- Akuades
- Kertas saring

4.7.1.2 Bahan untuk persiapan lalat *chrysomya sp.*

- Larutan glukosa 10% digunakan untuk makanan lalat *Chrysomya sp* selama penelitian

4.7.1.3 Bahan untuk uji potensi ekstrak daun ceremai (*Phyllanthus acidus L*) terhadap lalat *chrysomya sp.*

- Larutan ekstrak daun ceremai dengan konsentrasi 32,5%, 35% dan 37,5% sebanyak 3,5 ml.
- Lalat *chrysomya sp*
- akuades steril

- Larutan malathion 0,28%

4.7.2 Instrumen Penelitian

4.7.2.1 Instrumen Pembuatan Ekstrak Daun Ceremai

- Botol hasil ekstrak
- Oven / di jemur dibawah matahari
- Blender untuk menghaluskan daun ceremai
- Timbangan
- Gelas Erlenmeyer
- Corong gelas
- Labu evaporator
- Labu penampung etanol
- Evaporator
- *Rotatory evaporator*
- Selang *water pump*
- *Water pump*
- Water bath
- *Vacuum pump*

4.7.2.2 Instrumen untuk Persiapan Lalat *Chrysomya sp.*

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

4.7.2.3 Instrumen uji potensi insektisida ekstrak daun ceremai terhadap lalat *chrysomya sp.*

- Sangkar kaca (25 cm x 25 cm x 25 cm)
- *Sprayer*
- Timer
- Gelas ukur

4.8 PROSEDUR PENELITIAN

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Ceremai

Pada penelitian ini, bahan uji yang digunakan adalah ekstrak daun ceremai. Pada ekstraksi daun ceremai, digunakan *etanol* sebagai pelarut karena lebih selektif, bakteri sulit tumbuh dalam *etanol* diatas 20%, tidak beracun, netral dan absorbsinya baik. *Etanol* dapat melarutkan *alkaloid* basa, minyak menguap, *glikosida*, *kurkumin*, *kumarin*, *antrakinon*, *steroid*, *flavonoid* (Widayati,2008).

a. Proses Pengeringan

- Mencuci bersih daun ceremai kemudian dikeringkan
- Memotong kecil-kecil
- Daun ceremai yang telah dipotong kecil-kecil lalu dioven dengan suhu 80°C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air)

b. Proses Ekstraksi

- Setelah kering, sampel dihaluskan dengan blender.
- Bubuk daun ceremai ditimbang dengan menggunakan timbangan kemudian dimasukkan dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter.

- Kemudian direndam di dalam larutan etanol 96% sampai volume 900 ml dan dikocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit)
- Didiamkan selama 1 malam sampai mengendap.

c. Proses Evaporasi

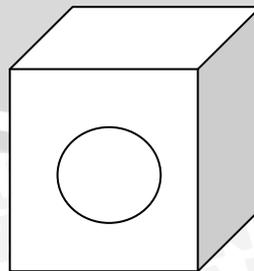
Proses evaporasi bertujuan untuk memisahkan hasil ekstrak yang telah didapat dengan pelarut etanol. Adapun prosesnya sebagai berikut :

- Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30° - 40° terhadap meja percobaan.
- Hasil rendaman etanol yang berupa larutan dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi.
- Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah evaporator, pendingin spiral dihubungkan dengan vakum dengan selang plastik, pendingin spiral dihubungkan dengan *water pump* dengan selang plastik yang dialiri air dingin.
- *Water pump* ditempatkan dalam bak yang berisi aquades, *water pump* dihubungkan dengan sumber listrik sehingga aquades akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan rata).
- Satu set evaporasi diletakkan sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *water bath*.

- Vakum dan *water bath* dihubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhu pada *water bath* sekitar 70°C (sesuai dengan titik didih etanol).
- Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama kurang lebih 2-3 jam.
- Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 50-60°C selama 1-2 hari.
- Hasil akhir yang memiliki konsentrasi 100% inilah yang akan digunakan dalam percobaan.
- Hasil ekstrak ini ditimbang dengan timbangan analitik dan disimpan dalam lemari es untuk memperlambat kerusakan.

4.8.2 Persiapan Lalat *Chrysomya sp.*

Lalat *chrysomya sp* yang digunakan dalam penelitian ini di dapatkan dari area sekitar Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sejumlah 200 ekor. Lalat hijau yang digunakan adalah lalat yang masih aktif bergerak dan hidup, penyiapan sample seperti ini merupakan sample inklusi. Setelah itu lalat *chrysomya sp* dimasukkan ke dalam kandang berukuran 25x25x25 cm³ di laboratorium parasitologi fakultas kedokteran brawijaya yang selanjutnya dilakukan penelitian.



Gambar 5.1 Kandang Lalat

Keterangan:

Kotak berukuran 25 cm x 25 cm x 25 cm yang dibuat dengan memodifikasi sangkar dan menempelkan kasa pada lubang sebagai tempat memasukkan lalat.

4.8.3 Persiapan larutan uji

Penelitian ini terdapat 2 kelompok yakni kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, untuk kelompok kontrol digunakan aquades steril sebagai kontrol negatif serta malathion 0,28% sebagai kontrol positif karena kerja malathion yang dapat menghambat enzim asetilkolineras dengan cepat.

Sebelum melakukan pengenceran, dilakukan pencampuran untuk mendapatkan aseton 1% di dalam akuades. Kegunaan aseton adalah sebagai pelarut, khususnya untuk zat-zat non polar dan kurang polar. Dalam hal ini aseton berfungsi untuk melarutkan ekstrak daun cermai di dalam aquades karena sifatnya yang kurang polar. Kemudian, untuk mendapatkan campuran yang diinginkan dapat digunakan rumus :

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

Keterangan :

M_1 : Konsentrasi aseton (90%)

V_1 : Volume aseton

M_2 : Konsentrasi aseton yang diinginkan (1%)

V_2 : Volume campuran aseton

Sedangkan untuk kelompok perlakuan terdapat 3 macam perlakuan dengan dosis yang berbeda-beda. Dosis yang akan dipergunakan adalah 32,5%, 35%, dan 37,5%. 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 ekstrak daun ceremai

V_1 : Volume ekstrak daun ceremai

M_2 : Konsentrasi ekstrak daun ceremai yang diinginkan

V_2 : Volume campuran ekstrak daun ceremai

4.8.4 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan bersifat trial and error yang bertujuan untuk memperoleh konsentrasi minimal ekstrak daun ceremai yang dapat membunuh lalat *chrysomya sp* dalam jumlah maksimal. Kosentrasi yang ditemukan digunakan sebagai dasar untuk menetapkan kosentrasi pada pelaksanaan penelitian ini. Penelitian dilakukan mulai dari kosentrasi 50 %, 40%, 30%, 20%, dan 10% sesuai dengan aturan WHO. Oleh karena kesemua kosentrasi dapat membunuh lalat seluruhnya saat pengamatan jam ke 24, maka kosentrasi ekstrak daun ceremai diturunkan. Dari hasil penelitian eksplorasi didapatkan kosentrasi minimum yang dapat membunuh

semua lalat adalah 50% dan 40%, konsentrasi minimum yang dapat membunuh separuh dari sampel lalat adalah 30%. Jadi diambil konsentrasi antara 40% hingga 30%, sebagai konsentrasi tetap yaitu, 32,5%, 35%, dan 37,5% Penelitian dilakukan dengan menggunakan konsentrasi tetap tersebut dengan pengulangan sebanyak 4 kali.

4.8.5 Pelaksanaan Penelitian

1. Mempersiapkan kandang untuk tempat perindukan lalat *chrysomya sp* berukuran 25x25x25 cm³. Siapkan larutan dengan konsentrasi 32,5%, 35%, 37,5% serta kontrol positif dan kontrol negatif.
2. Siapkan nutrisi untuk lalat *chrysomya sp* berupa air gula yang di letakkan di kapas dan plastik, kemudian dimasukkan ke dalam kandang setelah kandang di semprot.
3. Kandang 1 disemprot dengan *akuades* sebanyak 4 ml sebagai kontrol negatif.
4. Dilanjutkan kandang 2 dilakukan penyemprotan *malathion* 0,28% sebanyak 4 ml sebagai kontrol positif.
5. Penyemprotan kandang 3 dengan ekstrak daun ceremai konsentrasi 32,5% sebanyak 4 ml
6. Penyemprotan kandang 4 dengan ekstrak daun ceremai konsentrasi 35% sebanyak 4 ml
7. Penyemprotan kandang 5 dengan ekstrak daun ceremai konsentrasi 37,5% sebanyak 4 ml

8. Lakukan pengamatan setiap jam ke-1, 2, 3, 4, 5, 6, dan jam ke-24. Hitung jumlah lalat *chrysomya sp* yang mati.
9. Penelitian ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali untuk setiap perlakuan.

4.8.6 Diagram Alur Penelitian

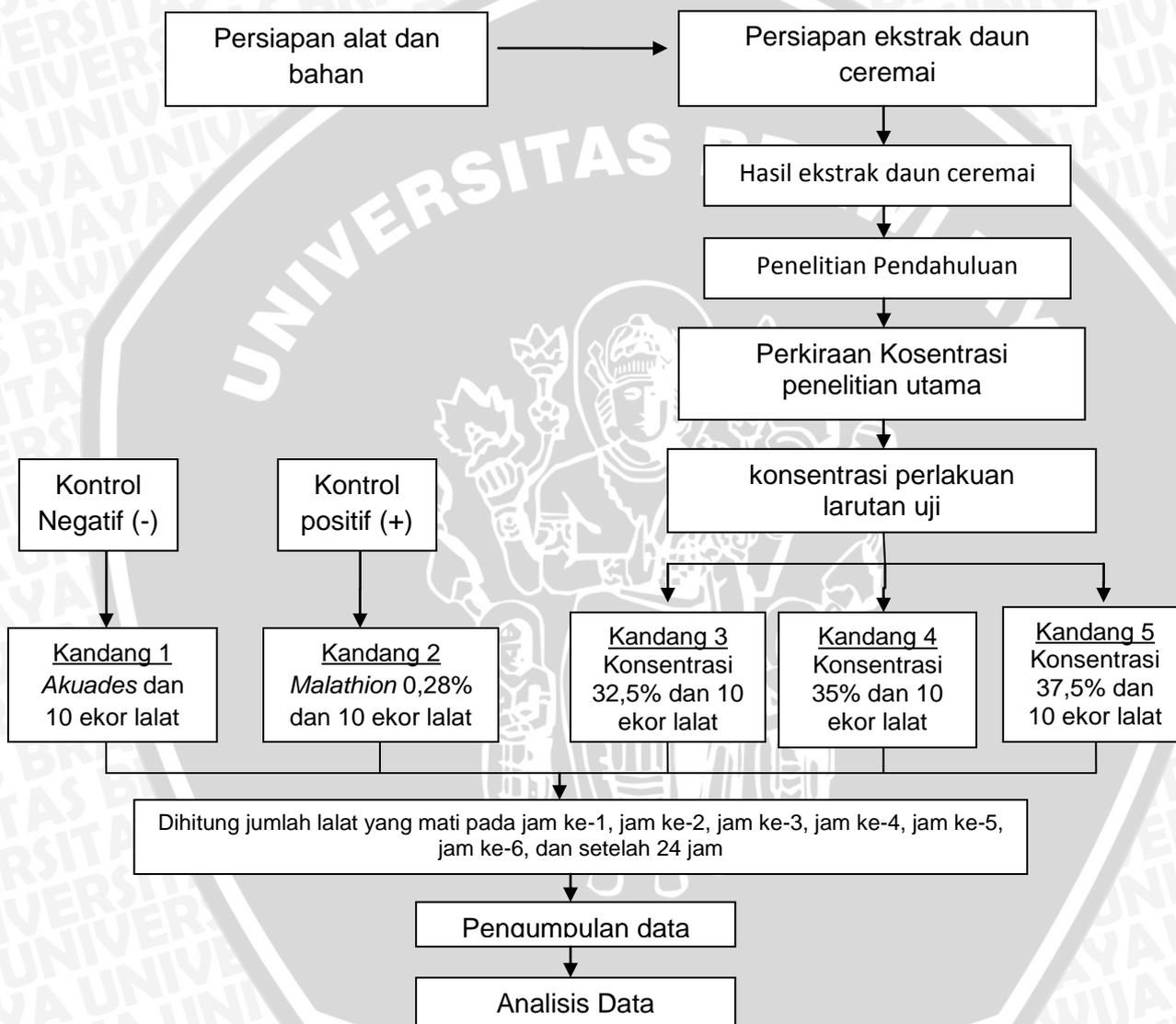


Diagram 4.1 Alur Penelitian

4.9 Pengumpulan Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan adalah jumlah lalat yang mati untuk setiap perlakuan setelah pengamatan waktu. Data kematian lalat *chrysomya sp* akan diolah dengan menggunakan *formula abbot* menjadi data potensi insektisida yang disajikan dalam bentuk tabel.

$$\frac{X - Yx}{100 - Y} 100\%$$

Keterangan :

- X = persentase jumlah lalat *chrysomya sp* yang mati dengan menggunakan ekstrak daun ceremai konsentrasi 32,5% ; 35% ; dan 37,5% atau berdasarkan masing-masing perlakuan.
- Y = persentase jumlah lalat *chrysomya sp* yang mati pada kontrol negatif.

4.10 Metode Analisa Data

Hasil penelitian ini dianalisis menggunakan analisis statistik SPSS versi 20 untuk windows. Dilakukan beberapa test sebagai syarat untuk dapat menggunakan *One-way ANOVA* yaitu dengan cara, *test of homogeneity of variance* menunjukkan data memiliki varian yang homogen atau tidak homogen dan dengan uji statistik *Kolmogorov-Smirnov*. Setelah mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan maka dapat dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey HSD* untuk mengetahui perbandingan berbeda nyata atau tidak antara

masing-masing komponen lama waktu dan konsentrasi. Jika salah satu syarat atau kedua syarat tidak terpenuhi maka *Ona-way ANOVA* tidak dapat digunakan dan selanjutnya data dianalisis menggunakan uji beda non parametrik *Kruskal Wallis*. Maka akan diketahui perbedaan potensi diantara berbagai perlakuan. Dalam penelitian ini, besar interval kepercayaan yang dipakai adalah 95% untuk tingkat signifikansi $(\alpha) = 0.05$. Uji statistik korelasi bertujuan untuk menentukan kekuatan dan arah hubungan antara ekstrak daun ceremai (*Phyllanthus acidus*) terhadap jumlah kematian lalat *chrysomya sp.*

