

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 dan membandingkan efek ekstrak etanol kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) sebagai insektisida terhadap lalat *Chrysomyia sp.* dengan menggunakan metode semprot.

4.2 Lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Proses ekstraksi dan evaporasi kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) dilakukan di Laboratorium Politeknik Negeri Malang. Penelitian dilakukan selama dua bulan pada bulan September sampai dengan Oktober 2014.

4.3 Sampel dan Estimasi Besar Sampel

4.3.1 Cara Pemilihan Sampel

Penelitian ini menggunakan lalat *Chrysomyia sp.* yang memenuhi kriteria inklusi, yaitu semua lalat *Chrysomyia sp.* yang hidup dan aktif bergerak. Lalat yang digunakan adalah lalat *Chrysomyia sp.* dewasa yang akan diletakkan sepuluh ekor pada setiap kandang. Cara mendapatkan lalat *Chrysomyia sp.* dewasa adalah dengan menaruh daging busuk didalam plastik kemudian didekatkan di tempat yang terdapat banyak lalat, seperti pasar dan tempat sampah. Lalat akan tertarik dengan bau busuk

daging, sehingga mengundang lalat untuk kemudian terbang memasuki plastik. Jika lalat sudah masuk ke dalam plastik kemudian lalat *Chrysomya sp.* ditangkap dengan menutup plastik. Selanjutnya dilakukan pemilihan lalat, agar tidak terkontaminasi dengan jenis lalat selain *Chrysomya sp.*

4.3.2 Estimasi Besar Sampel

Sampel yang digunakan adalah lalat *Chrysomya sp.* Sampel dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol negatif (disemprot dengan Akuades), 1 kelompok kontrol positif (disemprot dengan *malathion* 0,28%) dan menggunakan 3 kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak kulit kayu durian dengan konsentrasi yang berbeda. Masing-masing kelompok perlakuan mewakili 1 dosis (konsentrasi) ekstrak dengan jumlah anggota sampel yang sama. Jumlah pengulangan (n) penelitian ditentukan dengan rumus berikut:

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

Keterangan:

P = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan tiap sampel

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 5, maka pengulangan perlakuan dilakukan:

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

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

$$5n - 5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2$$

(Lukito, 1998)

Jadi jumlah pengulangan sampel dilakukan minimal 5 kali. Dalam penelitian ini dilakukan 5 kali pengulangan dengan konsentrasi dari larutan stok yang sama.

Rumus untuk estimasi besar sampel yaitu:

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

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

$$4t - 4 \geq 15$$

$$4t \geq 19$$

$$t \geq 4,75$$

Keterangan:

t : jumlah sampel

r : jumlah pengulangan

(Supranto J. 2000)

Jadi jumlah sampel tiap perlakuan minimal 5 ekor lalat disetiap kandang.

Berdasarkan rumus di atas, didapatkan jumlah pengulangan yang harus dilakukan adalah sebanyak 5 kali dan jumlah sampel setiap kandang adalah sebanyak 10 ekor lalat *Chrysomya sp.* Cara perkiraan estimasi besar sampel dejaskan seperti berikut:

$$\begin{aligned} \text{Besarnya sampel} &= \text{jumlah sampel setiap kandang} \times \text{jumlah perlakuan} \times \\ &\quad \text{jumlah pengulangan} \\ &= 10 \text{ ekor} \times 5 \text{ perlakuan} \times 5 \text{ pengulangan} \\ &= 250 \text{ ekor} \end{aligned}$$

Penelitian ini meliputi 3 perlakuan dan 2 kontrol, yaitu:

- Kontrol negatif : Disemprot dengan akuades
- Kontrol positif : Disemprot dengan malathion 0,28%

- Perlakuan 1 : Disemprot dengan ekstrak kulit kayu durian konsentrasi 15%
- Perlakuan 2 : Disemprot dengan ekstrak kulit kayu durian konsentrasi 30%
- Perlakuan 3 : Disemprot dengan ekstrak kulit kayu durian konsentrasi 45%

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel *independent* (variabel bebas) adalah konsentrasi (dalam %) dan durasi paparan ekstrak etanol kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr).

4.4.2 Variabel Tergantung (*Dependent*)

Variabel tergantung penelitian ini adalah jumlah lalat *Chrysomyia sp.* dewasa yang mati setelah disemprotkan ekstrak etanol kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr.).

4.5 Alat dan Bahan Uji Potensi Ekstrak Kulit Kayu Durian

4.5.1 Alat-Alat Penelitian

1. Alat untuk mendapatkan ekstrak kulit durian

Alat untuk mendapatkan ekstrak kulit durian adaah alat penggerus/*blender*, tabung untuk merendam serbuk kulit kayu durian yang sudah digerus, satu set alat evaporasi, selang plastik, *waterbath*, *water pump*, bak penampung akuades, botol penampung hasil ekstraksi, klem statis, *oven*, timbangan analitik, serta *freezer*/lemari es.

2. Alat untuk uji potensi insektisida ekstrak kulit kayu durian

Alat penyemprot sebanyak 5 (lima) buah, kandang lalat, lidi, spuit, *stop watch*, dan gelas ukur.

3. Alat untuk persiapan dan perlakuan lalat *Chrysomyia* sp.

Kandang berukuran 25cm x 25cm x 25cm sebanyak 5 buah dan lidi.

4.5.2 Bahan Penelitian

1. Bahan pembuatan ekstrak etanol kulit kayu durian

Kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr), akuades, pelarut ekstrak (*Etanol* 96%), dan kertas saring.

2. Bahan uji potensi insektisida kulit kayu durian

Ekstrak etanol kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr.), *Akuades*, 10 ekor lalat *Chrysomyia* sp. untuk setiap perlakuan, cairan Malathion 0,28%, nutrisi lalat berupa larutan gula 10% dalam 100 ml akuades, akuades dan kertas alumunium.

4.6 Definisi Operasional

1. Lalat *Chrysomyia* sp.

Adalah lalat *Chrysomyia* sp. dengan karakteristik sebagai berikut:

- dewasa sesuai morfologi
- kondisi hidup dan sehat (aktif bergerak) yang ditangkap dari pembuangan sampah dengan umpan berupa daging busuk.

2. Kulit Kayu Durian

Kulit kayu durian diperoleh dari petani durian di daerah Kasembon, Kabupaten Malang. Bagian yang digunakan adalah kulit dalam yang

langung berkenaan dengan bagian dalam kayu serta kambium. Sedangkan kulit luar kayu yang keras dibersihkan dan tidak digunakan.

3. Ekstrak Kulit Kayu Durian

Ekstrak berupa pasta dan mempunyai aroma khas, diproduksi setelah serbuk kering kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) direndam dalam pelarut etanol 96% dan dilakukan evaporasi (dihilangkan pelarut etanolnya). Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Politeknik Negeri Malang.

4. Potensi Insektisida

Kernampuan ekstrak etanol kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) membunuh lalat *Chrysomyia* sp. dihitung berdasarkan rumus potensi insektisida Abbott:

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

(Pavela, 2007)

5. Uji Potensi

Kemampuan ekstrak etanol kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) mematikan lalat *Chrysomyia* sp. dalam waktu 24 jam.

6. Kontrol Positif

Adalah bahan pembanding yang telah terbukti memiliki potensi insektisida. Kontrol positif menurut WHO adalah larutan Malathion 028% (WHO, 2006)

7. Kontrol Negatif

Adalah bahan pelarut ekstrak etanol kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) yang tidak memberikan pengaruh pada hasil penelitian. Pada penelitian ini digunakan kontrol negatif akuades (WHO, 2006).

8. Lalat Mati

Lalat *Chrysomya* sp. yang distimulasi dengan ujung lidi, tidak menunjukkan respon sama sekali.

9. *Lethal concentration*

Adalah konsentrasi insektisida yang dibutuhkan untuk menimbulkan sejumlah kematian pada populasi serangga. LC_{50} adalah konsentrasi insektisida yang dibutuhkan untuk menimbulkan kematian pada 50% populasi serangga. LC_{100} 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 terpapar insektisida yang digunakan (WHO, 2006).

4.7 Cara Kerja Penelitian

4.7.1 Ekstraksi dan Evaporasi Ekstrak Kulit Kayu Durian

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit kayu durian yang didapatkan dari daerah Kasembon, Kabupaten Malang. Ekstraksi menggunakan etanol sebagai pelarut dikarenakan lebih selektif, bakteri sukar tumbuh dalam etanol di atas 20%, tidak beracun, netral serta berabsorpsi baik. Etanol dapat melarutkan alkaloid biasa, dapat menguapkan minyak, glikosida, kurkumin, kumarin, antraknon, steroid, flavonoid, tanin dan saponin (Widyawati, 2008).

Persiapan penelitian meliputi proses ekstraksi kulit kayu durian untuk mengambil bahan aktifnya dan kemudian hasilnya akan digunakan dalam proses penelitian selanjutnya, yaitu uji efek ekstrak etanol kulit kayu durian

sebagai insektisida. Proses ekstraksi kulit kayu durian dilakukan berdasarkan tatacara pelaksanaan ekstraksi "*Technique of Simple Extraction*" yang terdapat dalam buku eksperimen kimia organik "*An introduction to Modern Experimental Organic chemistry*" dengan etanol 96% sebagai pelarutnya.

4.7.1.1 Proses Pengeringan

Dalam proses ekstraksi, kulit kayu durian dengan berat kering 1.5 kg dicuci pada air bersih yang mengalir. Setelah dicuci kulit kayu durian diiris tipis dan dikeringkan dengan sinar matahari kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu oven 60-80° C agar kulit kayu tersebut menjadi kering sempurna (bebas kandungan air)

4.7.1.2 Proses Ekstraksi

Setelah kering kulit kayu durian tersebut dihaluskan dengan blender sehingga didapatkan serbuk dan ditimbang hasilnya. Serbuk kulit kayu durian dengan berat kering 500 g dimasukkan ke dalam beker gelas dan di tuangkan pelarut dengan perbandingan (1: 3) 1 kg bahan dalam 3 liter pelarut Rendam bahan dan diamkan pada suhu kamar selama minimal 2 x 24 jam dengan sesekali diaduk (proses ekstrak dapat dipercepat dengan ultrasonic). Setelah 2 x 24 jam. saring bahan dengan menggunakan kertas saring *whatman* nomor 40 dan pelarut yang diperoleh (yang mengandung bahan aktif) di evaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut.

4.7.1.3 Proses Evaporasi

Proses evaporasi bertujuan untuk memisahkan hasil ekstrak yang telah didapat dengan pelarut etanol. 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 pada bagian atas evaporator, pendingin spiral dihubungkan dengan vakum dengan selang plastic, pendingin spiral dihubungkan dengan *wafer pump* melalui selang plastik *water pump* ditempatkan dalam bak yang berisi akuades, *water pump* dihubungkan dengan sumber listrik sehingga akuades akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan rata). Satu set evaporasi diletakkan, sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam akuades pada *water bath*. Vakum dan *water bath* duhubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhu pada *water bath* sekitar 70° C (sesuai dengan titik didih etanol).

Sirkulasi dibiarkan berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama kurang lebih 2-3 jam. Setelah itu, hasil evaporasi dipanaskan dalam oven dengan suhu 50-60° C selama 1-2 hari, untuk menguapkan pelarut yang tersisa, sehingga didapatkan hasil akhir ekstraksi kulit kayu durian 100%. Hasil akhir yang berupa pasta kemudian ditimbang dengan neraca analitik dan disimpan dilemari es untuk memperlambat kerusakan.

4.7.2 Cara Pembuatan Larutan Stok

Ekstrak kulit kayu durian yang didapatkan dari hasil ekstraksi dan evaporasi adalah sebagai larutan stok awal dengan konsentrasi 100%. Kemudian, dari sediaan konsentrasi 100% dibuat beberapa sediaan larutan stok dengan konsentrasi sesuai dengan perlakuan dalam penelitian. Pembuatan larutan stok ini digunakan dengan cara mengencerkan stok awal dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan:

M1 : Konsentrasi larutan stok (100%)

M2 Konsentrasi larutan yang diinginkan

V1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan

V2 : Volume larutan perlakuan yang besarnya 3,5 ml

Sediaan untuk masing-masing konsentrasi dilarutkan dalam akuades hingga 25 ml. Volume ini menyesuaikan dengan kebutuhan larutan untuk 5 kali pengulangan. Untuk kelompok kontrol negatif digunakan 3,5 ml akuades dan untuk kontrol positif menggunakan 3,5 ml Malathion 0,28%. Sedangkan untuk kelompok perlakuan digunakan 3 dosis (M2) yang akan ditentukan setelah penelitian pendahuluan. Semua kelompok dilarutkan dalam akuades hingga didapatkan volume akhir konsentrasi 15%, 30% dan 45% ditentukan melalui proses studi pendahuluan.

4.7.3 Cara Penangkapan dan Persiapan Sampel

Cara mendapatkan lalat *Chrysomya sp.* dewasa adalah dengan menaruh daging busuk didalam plastik kemudian diletakkan di tempat yang terdapat banyak lalat, seperti pasar dan tempat sampah. Lalat akan tertarik dengan bau busuk daging, sehingga mengundang lalat untuk kemudian

terbang memasuki plastik. Jika lalat sudah masuk kedalam plastik kemudian lalat *Chrysomya* sp. ditangkap dengan menutup plastik.

4.8 Pelaksanaan Penelitian

4.8.1 Penghitungan Larutan Stok

Akuades ditambahkan untuk pengenceran pertama kali pada larutan stok ekstrak kulit kayu durian konsentrasi 100% (Wang Shu Tong, 2001). Larutan uji diambil dari larutan stok ekstrak kulit kayu durian dan disiapkan dalam berbagai konsentrasi yang telah ditentukan yaitu 15%, 30% dan 45%, namun sebelum menentukan dosis pasti, perlu dilakukan penelitian pendahuluan.

Pembuatan dosis dengan cara pengenceran dan larutan stok 100% adalah dengan menggunakan rumus molaritas :

1. Konsentrasi 5% : didapatkan dengan melarutkan stok 100% sebanyak 0.175 ml kedalam 3.325 ml akuades.
2. Konsentrasi 10% : didapatkan dengan melarutkan stok 100% sebanyak 0.35 ml kedalam 3.15 ml akuades.
3. Konsentrasi 15% : didapatkan dengan melarutkan stok 100% sebanyak 0.525 ml kedalam 2.975 ml akuades.
4. Konsentrasi 30% : didapatkan dengan melarutkan stok 100% sebanyak 1.05 ml kedalam 2.45 ml akuades.
5. Konsentrasi 45% : didapatkan dengan melarutkan stok 100% sebanyak 1.575 ml kedalam 1.925 ml akuades.

4.8.2 Penelitian Pendahuluan

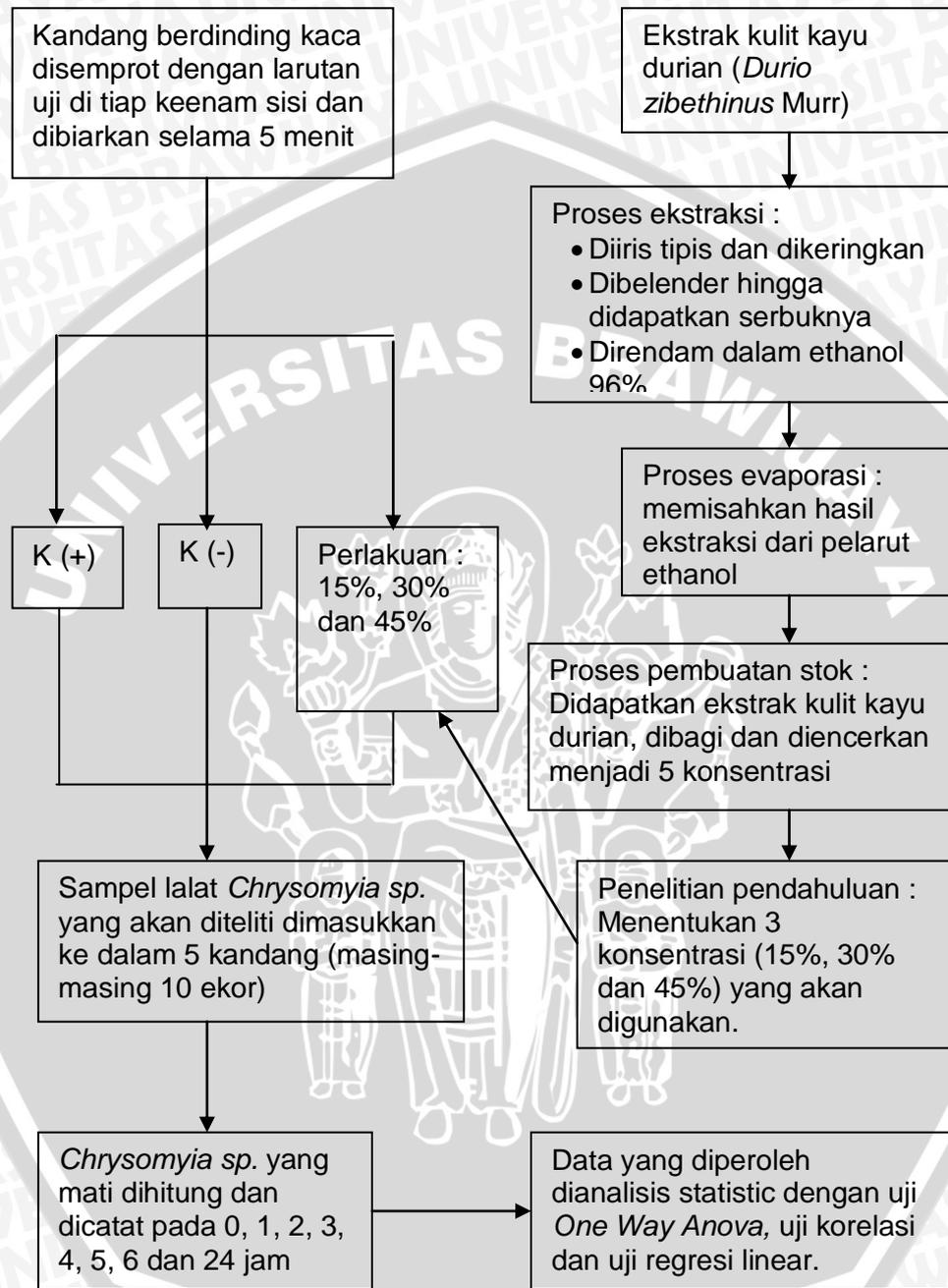
Studi pendahuluan dilakukan untuk mencari dosis atau konsentrasi perlakuan yang sesuai untuk uji coba di dalam eksperimen. Dasar penentuan dosis atau konsentrasi pada studi pendahuluan adalah *trial* dan *error*. Dosis atau konsentrasi yang diuji coba hanya akan dilakukan pengulangan sebanyak 1 kali. Sampel akan dibagi menjadi 6 kelompok, kelompok 1 adalah kontrol yaitu hanya diberikan akuades dan 5 kelompok perlakuan dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 30% dan 45%. 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.

4.8.3 Perlakuan

- Percobaan dilakukan dengan menggunakan 5 buah kandang berdinding kaca dan berbentuk kubus berukuran 25 cm x 25 cm x 25 cm dan diletakkan di dalam ruang dengan suhu kamar sekitar 27°C dan tingkat kelembapan antara 60-70%.
- Ekstrak kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) dengan dosis 15%, 30% dan 45% dipersiapkan dan dimasukkan ke dalam *sprayer*.
- Ekstrak kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) dengan konsentrasi yang telah ditetapkan di semprotkan ke masing-masing kandang pada keenam sisi dinding kaca sampai habis. Setiap kandang akan disemprot dengan:
 - a) Kandang 1 disemprot dengan menggunakan larutan akuades sebanyak 3,5 ml sebagai kontrol negatif.

- b) Kandang 2 disemprot dengan menggunakan malathion 0,28 % sebanyak 3,5 ml sebagai kontrol positif.
 - c) Kandang 3 disemprot dengan menggunakan kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr,) dengan dosis 15% sebanyak 3,5 ml.
 - d) Kandang 4 disemprot dengan menggunakan ekstrak kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr) dengan dosis 30% sebanyak 3,5 ml.
 - e) Kandang 5 disemprot dengan menggunakan ekstrak kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr,) dengan dosis 45% sebanyak 3,5 ml.
- Setelah disemprot biarkan kandang selama 5 menit sehingga larulan yang disemprot merata pada seluruh kandang.
 - Siapkan nutrisi untuk lalat *Chrysomya* sp. berupa air gula yang diletakkan di kapas dan plastik, kemudian dimasukkan kedalam kandang setelah kandang disemprot.
 - Setelah 5 menit, masukan lalat *Chrysomya* sp. sebanya 10 ekor kedalam masing-masing kandang yang akan diteilti
 - Jumlah lalat yang mati pada setiap perlakuan dihitung setelah penyemrotan, yaitu pada setiap jam selama 6 jam pertama dan 24 jam setelah penyimpanan di laboratorium
 - Tes ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 5 kali untuk setiap perlakuan
 - Data iumlah lalat uji yang mati pada berbagai konsentrasi dan berbagai interval waktu pengamatan dianalisis untuk mengetahui besarnya potensi insektisida pada setiap konsentrasi yang berupa persentase kematian lalat uji setelah dikoreksi dan dihitung menurut Abbott's formula.

4.8.4 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.8.4 Diagram Alur Kerja Penelitian

Keterangan:

K (+) : Perlakuan dengan Malathion 0,28% (kontrol positif)

K (-) : Perlakuan dengan larutan Akuades (kontrol negatif)

4.7 Pengumpulan Data

Data hasil yang telah diperoleh dan penelitian dimasukkan kedalam label dan diklasifikasikan menurut jumlah lalat yang mati, pengulangan, dan konsentrasi. Pengumpulan data dilakukan pada setiap jam pada 6 jam pertama dan 24 jam setelah penelitian, dan dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan.

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Data-data yang telah dikeompokkan dan ditabulasi kemudian dilakukan analisis statistik dengan menggunakan fasilitas SPSS (*Scientific Package for the Social Science*) 16,0 untuk windows dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p = 0,05$) atau taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Pengolahan dan analisis data dibuat berdasarkan perhitungan jumlah lalat yang mati untuk tiap-tiap konsentrasi larutan uji ekstrak kulit kayu durian dihitung menggunakan rumus Abbot dan dinyatakan sebagai potensi insektisida.

Langkah-langkah pengujian data hasil penelitian ini antara lain:

1. Uji normalitas data dengan menguji *One-Sample Kolmogorof-Smirnov*.
2. Uji homogenitas data dengan menggunakan uji homogenitas Levene.
3. Analisis data dilakukan dengan uji *one-way Anova*. Syarat-syarat analisis ANOVA : (1) kelompok lebih dan tiga kelompok, (2) distribusi skor setiap perlakuan adalah normal dan (3) varian tiap perlakuan adalah homogen.
4. Analisis *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perlakuan mana yang memiliki signifikansi tinggi.
5. Jika data tidak berdistribusi normal dan/atau varians data tidak homogen, maka dilanjutkan untuk mentransformasikan data

6. Jika data tetap tidak berdistribusi normal dan/atau varians data tidak homogen, maka dilanjutkan dengan metode statistik non parametrik *Kruskal Wallis*
7. Analisis *Post Hoc Mann Withney*
8. Analisis Uji korelasi menggunakan *Pearson* jika data berdistribusi normal, namun menggunakan *Spearman* jika data tidak berdistribusi normal.
9. Analisis regresi linear

