

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true eksperimental-post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) sebagai insektisida terhadap lalat rumah (*Musca domestica*) dengan metode elektrik.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Cara Pemilihan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah lalat rumah (*Musca domestica*) yang masih hidup (aktif bergerak dan bisa terbang). Sedangkan kriteria eksklusi yaitu semua lalat *Musca domestica* yang tidak aktif bergerak/mati sebelum diberi perlakuan.

4.2.2 Estimasi Besar Sampel

Lalat dimasukkan sebanyak 10 ekor per kandang (WHO, 2006), dengan menggunakan kriteria lalat rumah (*Musca domestica*) yang hidup. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan yang terdiri dari :

1. Kelompok yang diberikan perlakuan insektisida elektrik dengan gabus yang mengandung *d-allethrin* (HIT) (kontrol positif)
2. Kelompok yang diberikan perlakuan insektisida elektrik dengan gabus yang direndam aseton 1 % (kontrol negatif)
3. Kelompok yang diberikan perlakuan insektisida elektrik dengan gabus yang direndam ekstrak daun cengkeh dengan konsentrasi 20%
4. Kelompok yang diberikan perlakuan insektisida elektrik dengan gabus yang direndam ekstrak daun cengkeh dengan konsentrasi 30%
5. Kelompok yang diberikan perlakuan insektisida elektrik dengan gabus yang direndam ekstrak daun cengkeh dengan konsentrasi 40%

Pada penelitian ini dilakukan 4 kali pengulangan. Banyaknya pengulangan tersebut dihitung dengan menggunakan rumus [$p(n-1) \geq 16$] (Tjokronegoro, 2001).

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

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

$$5n-5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2 \sim 4$$

Keterangan :

p : Jumlah Perlakuan

n : Jumlah Pengulangan

Percobaan ini membutuhkan 200 ekor lalat yang dihitung dengan cara seperti dibawah ini :

10 lalat x 5 kelompok coba x 4 kali pengulangan = 200 ekor

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Agustus 2015.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

1. Ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dengan 3 konsentrasi yaitu 20%, 30%, 40%.
2. Waktu paparan ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap lalat *Musca domestica*.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah jumlah lalat *Musca domestica* yang mati setelah diberikan perlakuan insektisida elektrik dengan gabus yang direndam pada ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*).

4.5 Definisi Operasional

- *True experimental-post test only control group design* merupakan rancangan penelitian yang dilakukan randomisasi pada sampel sehingga kelompok kontrol dan eksperimen dianggap sama sebelum diberi perlakuan dan tidak diadakan *pre-test*.
- Kontrol negatif berupa perlakuan insektisida elektrik dengan gabus yang direndam aseton 1 % sedangkan kontrol positif adalah perlakuan dengan pemberian *d-allethrin* (HIT) dan ekstrak daun cengkeh 20%, 30%, 40%.
- Lalat yang digunakan diperoleh dari hasil penangkapan di lingkungan kampus Universitas Brawijaya.
- Cara deteksi lalat yang mati adalah dengan cara disentuh dengan menggunakan lidi, lalat tidak bergerak setelah disentuh.
- Efek insektisida adalah efek yang ditimbulkan oleh ekstrak daun cengkeh terhadap kematian lalat *Musca domestica*.
- Potensi ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) sebagai insektisida terhadap lalat *Musca domestica* adalah kemampuan ekstrak daun cengkeh dilihat dari jumlah kematian lalat *Musca domestica* pada konsentrasi 20%, 30%, 40% terhadap waktu yang diamati.

- Berpotensi sebagai insektisida *Musca domestica* dengan melakukan uji potensi kemampuan ekstrak daun cengkeh membunuh 100% lalat dalam 24 jam.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi 2 kelompok yaitu alat-alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol daun cengkeh serta alat-alat yang digunakan untuk uji potensi insektisida daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*).

4.6.1.1 Alat pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cengkeh

1. Alat penggerus blender
2. Tabung untuk merendam serbuk kering daun cengkeh 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

4.6.1.2 Alat untuk Uji Potensi Insektisida Daun Cengkeh

1. Lima buah alat pemanas obat nyamuk elektrik
2. 20 buah gabus obat nyamuk elektrik
3. Gelas ukur
4. *Timer*
5. Spet 5ml/cc
6. Kandang berukuran 100cm x 100 cm x 60 cm

4.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian terbagi dalam dua kelompok yaitu bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak etanol daun cengkeh dan bahan untuk uji potensi insektisida daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*).

4.6.2.1 Bahan pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cengkeh

1. Daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*)
2. Aseton 1 %
3. Pelarut ekstrak (etanol 96%)
4. Kertas kering

4.6.2.2 Bahan untuk Uji Potensi Insektisida Daun Cengkeh

1. Estrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*)
2. Lalat *Musca domestica* 10 ekor tiap perlakuan
3. Gabus obat nyamuk elektrik yang mengandung *d-allethrin*
4. Aseton 1%

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Ekstraksi dan Evaporasi

4.7.1.1 Proses Ekstraksi

Poses ekstraksi daun cengkeh dilakukan berdasarkan tata cara pelaksanaan ekstraksi "*Technique of Simple Ekstraction*" yang terdapat dalam buku eksperimen kimia organik "*An introduction to Modern Experimental Organic Chemistery*" dengan ethanol 96% sebagai pelarutnya. Adapun prosesnya sebagai berikut:

1. Daun cengkeh yang akan digunakan dicuci dengan air bersih yang mengalir
2. Setelah dicuci diiris tipis-tipis dan dikeringkan dengan sinar matahari kemudian dimasukkan kedalam oven agar dauntersebut menjadi kering sempurna dengan suhu oven 60°-80° C
3. Kemudian dihaluskan menggunakan *blender* sehingga didapatkan dalam bentuk serbuk seberat 100 gr

4. Serbuk daun cengkeh tersebut dimasukkan kedalam botol 1,5 L untuk direndam dengan ethanol.
5. Hasil ini selanjutnya akan dievaporasi (untuk memisahkan ekstrak daun cengkeh dengan pelarut ethanol)

4.7.1.2 Proses Evaporasi

Proses evaporasi bertujuan untuk memisahkan hasil ekstrak dengan ethanol. Adapun prosesnya sebagai berikut :

1. Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30° – 40° terhadap meja percobaan
2. Hasil rendaman ethanol yang berupa larutan dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi
3. Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah evaporator, pendingin spiral dihubungkan dengan bagian atas evaporator; pendingin spiral dihubungkan dengan selang plastik ; pendingin spiral dihubungkan dengan *water pump* dengan selang plastik
4. 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)
5. Satu set evaporasi diletakkan, sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada water bath

6. Vakum dan water bath dihubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhu pada water bath sekitar 70°C (sesuai dengan titik didih ethanol)
7. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama kurang lebih 2-3 jam.
8. Dilanjutkan dengan pemanasan dalam oven dengan suhu 50°C - 60°C selama 1-2 hari
9. Hasil akhir yang berupa minyak kental dan beraroma khas dari daun cengkeh inilah yang akan digunakan dalam percobaan.

4.7.2 Cara Pembuatan Larutan Stok

Ekstrak pekat yang tersimpan di freezer disesuaikan suhunya dengan suhu kamar dengan cara dibiarkan diudara kamar selama 15 menit

4.7.3 Pembuatan Larutan Perlakuan

Larutan stok dalam jumlah tertentu dilarutkan dalam aseton 1% hingga didapatkan dosis yang diinginkan dengan menggunakan rumus:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan :

M1 : konsentrasi larutan stok 100 %

M2 : konsentrasi larutan yang diinginkan

V1 : Volume larutan stok yang harus dilarutkan

V2 : Volume larutan perlakuan yang besarnya 6 ml

Volume akhir larutan perlakuan yang diperlukan untuk setiap konsentrasi adalah 6 ml. Jadi, setelah diambil dari larutan stok kemudian ditambahkan dengan pelarut (aseton 1%) sampai mencapai volume 6 ml.

4.7.4 Pembuatan Obat Nyamuk Elektrik

Gabus obat nyamuk yang mengandung *d-allethrin* (HIT) dipasang dan dipanaskan dengan pemanas obat nyamuk elektrik hingga warna gabus berubah menjadi putih. Proses ini membutuhkan waktu sekitar 24 jam. Kemudian gabus direndam dengan alkohol 70% selama 2 x 24 jam. Setelah proses sterilisasi menggunakan alkohol 70% selesai, dilakukan perendaman dengan aquades steril selama 12 jam. Gabus dinyatakan bersih jika warna sudah benar-benar putih dan wewangian tidak tercium lagi. Proses terakhir adalah pengeringan dibawah sinar matahari atau menggunakan inkubator selama 30 menit untuk memastikan tidak ada aquades yang tersisa dalam gabus steril.

Gabus kemudian direndam pada larutan ekstrak sesuai konsentrasi yang telah ditentukan dan ditunggu sampai ekstrak terserap ke dalam gabus kurang lebih 15 menit. Gabus yang sudah mengandung ekstrak siap digunakan (Sugiharti, 2012).

4.7.5 Penelitian Pendahuluan

Penelitian 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 and error*. Dosis atau konsentrasi ekstrak daun cengkeh yang digunakan dalam penelitian pendahuluan ini adalah 10 %, 15%, 20%, 30%. 40% jumlah lalat ditetapkan 10 ekor perkelompok . LD100 ditentukan dengan melihat seberapa besar dosis atau konsentrasi minimal yang diperlukan untuk membunuh 100% sampel lalat dalam jangka waktu 24 jam.

4.7.6 Persiapan Lalat

Lalat di aklimatisasi selama 6 jam. Dimasukkan kedalam kandang yang diberi larutan glukosa untuk makanan lalat. Hal ini untuk mencegah lalat mati karena kelaparan.

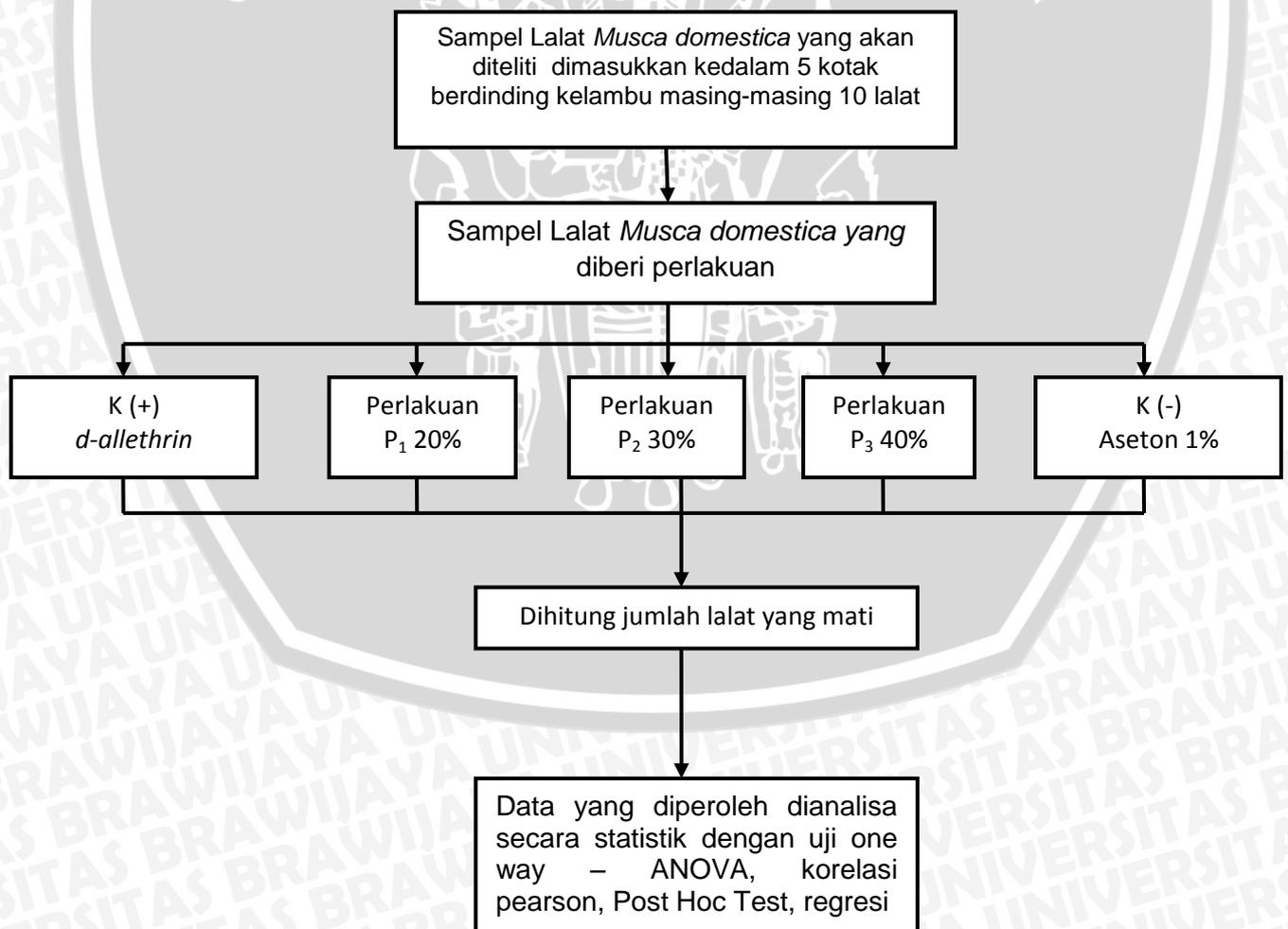
4.7.7 Pelaksanaan Penelitian

1. Penelitian dilakukan dengan menggunakan 5 buah kandang berdinding kelambu ukuran 100 cm x 100 cm x 60 cm.
2. Siapkan larutan ekstrak ethanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dengan konsentrasi 20%, 30%, 40% serta kontrol positif dan kontrol negatif.
3. Pada saat akan digunakan, ambil ekstrak ethanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) secukupnya (untuk masing-masing konsentrasi), insektisida *d-allethrin* sebagai kontrol positif dan aseton 1% sebagai kontrol negatif digunakan untuk merendam masing-masing gabus.
4. Kandang 1 diberikan perlakuan insektisida elektrik dengan gabus yang mengandung *d-allethrin*
5. Kandang 2 diberikan perlakuan insektisida elektrik dengan gabus yang direndam aseton 1%.
6. Kandang 3 diberikan perlakuan insektisida elektrik dengan gabus yang direndam ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) konsentrasi 20%.
7. Kandang 4 diberikan perlakuan insektisida elektrik dengan gabus yang direndam ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) konsentrasi 30%.
8. Kandang 5 diberikan perlakuan insektisida elektrik dengan gabus yang direndam ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*)

konsentrasi 40%.

9. Jumlah lalat yang mati pada setiap perlakuan di hitung tiap 1 jam sekali dan dilakukan selama 24 jam. Penelitian ini diulang selama 4 kali untuk tiap perlakuan.
10. Lalat yang dianggap mati dimasukkan kedalam kandang lain yang bersih berisi larutan glukosa untuk melihat apakah lalat tersebut benar-benar mati atau hidup kembali.

4.7.8 Diagram Alur kerja Penelitian



4.7.9 Pengumpulan Data

Data jumlah lalat *Musca domestica* pada berbagai perlakuan dan pengulangan dianalisis untuk mengetahui potensi ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) sebagai insektisida terhadap lalat *Musca domestica* yang mati, menggunakan formula Abbott dengan rumus :

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

Keterangan

A₁ : Presentase kematian lalat setelah dikoreksi

A : Presentase kematian lalat uji

B : Presentase kematian lalat kontrol (Boesri dkk., 2001)

4.8 Analisis Data

Data-data hasil yang telah dikelompokkan dan dimasukkan table, diuji kemaknaannya dengan menggunakan *One-way ANOVA*. ANOVA ini untuk menganalisa apakah ada perbedaan persentase kematian lalat *Musca domestica* antara lebih dari dua kelompok. Syarat-syarat analisis ANOVA :

- Sampel dipilih secara acak
- Kelompok lebih dari tiga
- Distributor skor setiap perlakuan adalah normal
- 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 daun cengkeh dibanding dengan kelompok kontrol yang tidak mendapat pemberian ekstrak daun cengkeh.

H_1 : terdapat perbedaan signifikan antara persentase jumlah kematian lalat *Musca domestica* antara kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun cengkeh dibanding dengan kelompok kontrol yang tidak mendapat pemberian ekstrak daun cengkeh.

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 ekstrak daun cengkeh dengan jumlah kematian. Setelah uji korelasi dilakukan uji regresi linier. Uji regresi linier digunakan untuk mengetahui koefisien determinasi yang akan menunjukkan besarnya

pengaruh atau kontribusi variabel bebas (waktu dan konsentrasi) terhadap variabel terikat (jumlah lalat yang mati).

