

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya dan pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2023.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah kandang (*barrel uji*) berukuran $20 \times 20 \times 20$ cm³ terbuat dari kertas karton dan kawat kasa, alat semprot (*sprayer pompa* merek HIT), pinset, gelas ukur, batang pengaduk, *stopwatch*, lembar observasi.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu: ekstrak kulit jeruk lemon dan perasan jeruk lemon (*Citrus limon L.*), *transflutrin* dan *aquadest*. Nyamuk *Aedes aegypti* sebanyak 600 ekor diperoleh dari Balai Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI) Jalan Ketintang baru XVII No. 14 Kota Surabaya.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental dan Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Percobaan

Acak Lengkap (RAL). Percobaan ini menggunakan bahan perlakuan tunggal (*Citrus limon L.*) yang terdiri dari tiga konsentrasi, yaitu: 30%, 35%, 40% ekstrak kulit jeruk lemon dan perasan buah lemon (*Citrus limon L.*) dengan konsentrasi 30%, 35%, 40%, serta dua kontrol yaitu kontrol negatif menggunakan aquades dan kontrol positif menggunakan transflutrin. Sehingga ada 8 taraf penguji sebagai perlakuan dan 3 ulangan. Setiap satuan perlakuan dilakukan pengamatan terhadap jumlah nyamuk yang mati selama 1 jam dengan interval waktu setiap 15 menit. Satuan percobaan perlakuan adalah 20 ekor nyamuk *Aedes aegypti* dewasa.

3.3.2 Variabel Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan variabel-variabel berikut :

- 1) Variabel bebas yaitu konsentrasi ekstrak kulit jeruk lemon dan konsentrasi perasan buah lemon (*Citrus limon L.*).
- 2) Variabel terikat yaitu jumlah nyamuk *Aedes aegypti* yang mati.
- 3) Variabel kontrol yaitu suhu, teknik penyemprotan dan waktu jarak kematian nyamuk.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembiakan Nyamuk *Aedes aegypti*

Proses pemeliharaan nyamuk *Aedes aegypti* dimulai dari pemeliharaan larva nyamuk yang diperoleh dari Balai Penelitian dan Konsultasi Industri (BPK) Jalan Ketintang baru XVII no 14 Kota Surabaya. Larva nyamuk yang telah didapatkan,

dipelihara di dalam botol plastik yang berisi sedikit air, lalu botol berisi larva disimpan pada suhu ruangan 26-27°C (Septianto, 2014) dibiarkan 2-3 hari hingga menjadi nyamuk dewasa (Lampiran 2.). Nyamuk *Aedes aegypti* dipindahkan dari botol plastik masing-masing 20 ekor ke dalam 24 kandang uji. Pemindahan nyamuk *Aedes aegypti* dilakukan cara mulut botol pemeliharaan dimasukkan ke dalam lubang yang tersedia pada salah satu sisi kandang uji.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak Kulit dan Perasan Jeruk Lemon (*Citrus limon L.*)

Pembuatan ekstrak kulit jeruk lemon dan perasan buah lemon (*Citrus limon L.*) yang digunakan pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Metode yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kulit jeruk lemon adalah metode ekstraksi dengan larutan etanol 96% (Sari dan Laoli, 2019). Prosedur pembuatan ekstrak kulit jeruk lemon adalah sebagai berikut :

Kulit jeruk lemon sebanyak 2 kg dicuci dengan air mengalir, ditiriskan, dijemur di bawah sinar matahari selama satu hari lalu kulit jeruk lemon dipotong kecil ukuran 3 inchi, kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40-50°C. Kulit jeruk lemon yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender lalu disaring dengan menggunakan saringan bubuk, serbuk kulit jeruk lemon ditimbang dan dimasukkan ke dalam toples. Pembuatan ekstrak etanol kulit jeruk dilakukan dengan cara serbuk dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 5 hari sambil sekali-sekali diaduk. Pelarut etanol 96% yang digunakan dalam pembuatan ekstrak

kulit jeruk lemon adalah pelarut yang lebih selektif, sifat toksin yang rendah dari pada pelarut lainnya, bersifat semipolar sehingga dapat melarutkan zat kimia yang bersifat polar maupun non polar (Saleh *et al.*,2017). Larutan tersebut disaring menggunakan kertas saring sehingga di peroleh cairan jernih kemudian dipekatkan dengan alat *Vacum Rotary Evaporator* sehingga diperoleh cairan ekstrak. Selanjutnya ekstrak dibagi pada setiap perlakuan dengan konsentrasi 30%, 35%, dan 40%.

Pembuatan perasan buah lemon yaitu dengan menyiapkan buah lemon segar sebanyak 2 kg, diperas dan dimasukkan ke dalam *beaker glass*. Selanjutnya perasan dibagi pada setiap perlakuan dengan konsentrasi 30%, 35%, dan 40%.

3.4.3 Pembuatan Larutan Konsentrasi

Pembuatan konsentrasi ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limon L.*) terdiri atas tiga konsentrasi yaitu 30%, 35%, dan 40% dan konsentrasi perasan buah lemon yaitu 30%, 35% dan 40%. Cara pembuatan konsentrasi ini dengan cara mengencerkan ekstrak kulit jeruk lemon dan perasan buah lemon (*Citrus limon L.*) dengan aquades steril. Rumus pembuatan konsentrasi ini adalah sebagai berikut:

$$\mathbf{M1 \times V1 = M2 \times V2}$$

Keterangan :

VI = Volume awal (ml)

M1 = Konsentrasi awal (%)

V2 = Volume akhir (ml)

M2 = Konsentrasi akhir (%)

Konsentrasi ekstrak kulit jeruk lemon yang digunakan dalam percobaan adalah sebagai berikut :

1. Pembuatan ekstrak konsentrasi 30% dilakukan dengan mencampur 30 ml ekstrak kulit jeruk lemon ditambah 70 ml aquades.
2. Pembuatan ekstrak konsentrasi 35% dilakukan dengan mencampur 35 ml ekstrak kulit jeruk lemon ditambah 65 ml aquades.
3. Pembuatan ekstrak konsentrasi 40% dilakukan dengan mencampur 40 ml ekstrak kulit jeruk lemon ditambah 60 ml aquades.
4. Pembuatan perasan lemon konsentrasi 30% dilakukan dengan mencampur 30 ml perasan lemon ditambah 70 ml aquades.
5. Pembuatan perasan lemon konsentrasi 35% dilakukan dengan mencampur 35 ml perasan lemon ditambah 65 ml aquades.
6. Pembuatan perasan lemon konsentrasi 40% dilakukan dengan mencampur 40 ml perasan lemon ditambah 60 ml aquades.

3.4.4 Pembagian Kelompok Penelitian

Perlakuan yang dilaksanakan terdiri dari :

P(-) : Kelompok nyamuk disemprot dengan aquades (kontrol negatif).

P(+) : Kelompok nyamuk disemprot dengan transflutrin (kontrol positif).

P₁ : Kelompok nyamuk disemprot dengan konsentrasi 30% ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limon L.*).

P₂ : Kelompok nyamuk disemprot dengan konsentrasi 35% ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limon L.*).

P₃ : Kelompok nyamuk disemprot dengan konsentrasi 40% ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limon L.*).

P₄ : Kelompok nyamuk disemprot dengan konsentrasi 30% perasan buah lemon (*Citrus limon L.*).

P₅ : Kelompok nyamuk disemprot dengan konsentrasi 35% perasan buah lemon (*Citrus limon L.*).

P₆ : Kelompok nyamuk disemprot dengan konsentrasi 40% perasan buah lemon (*Citrus limon L.*).

3.4.5 Observasi Nyamuk *Aedes aegypti*

Observasi dilakukan selama 1 jam pemaparan dengan interval waktu setiap 15 menit (Armayanti dan Rasjid, 2020). Lalu amati dan hitung berapa banyak nyamuk yang mati.

3.4.6 Rumusan Perhitungan Ulangan

Jumlah ulangan dihitung dengan menggunakan rumus Federer,

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

Dimana t = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan

dengan t = 8 perlakuan, maka

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

$$(8-1)(n-1) \geq 15$$

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 15+7$$

$$7n \geq 22$$

$$n = 3,14$$

$$n = 3$$

Jumlah ulangan menurut rumus Federer diatas adalah 3 ulangan.

3.5 Prosedur Pengumpulan Data

3.5.1 Kontrol Positif

Nyamuk *Aedes aegypti* dewasa yang berada di dalam kandang pemeliharaan dimasukkan ke dalam *barrel uji* masing-masing sebanyak 20 ekor nyamuk. Siapkan sprayer berisi transflutrin, semprot *barrel uji* yang berisi nyamuk sebanyak 5 kali atau maksimal 10 kali semprot (Saleh *et al.*, 2017). Kemudian amati nyamuk yang mati

setiap 15 menit dan sisihkan ke bagian yang kosong di dalam *barrel uji*. Setelah 1 jam pemaparan hitung berapa banyak total nyamuk yang mati.

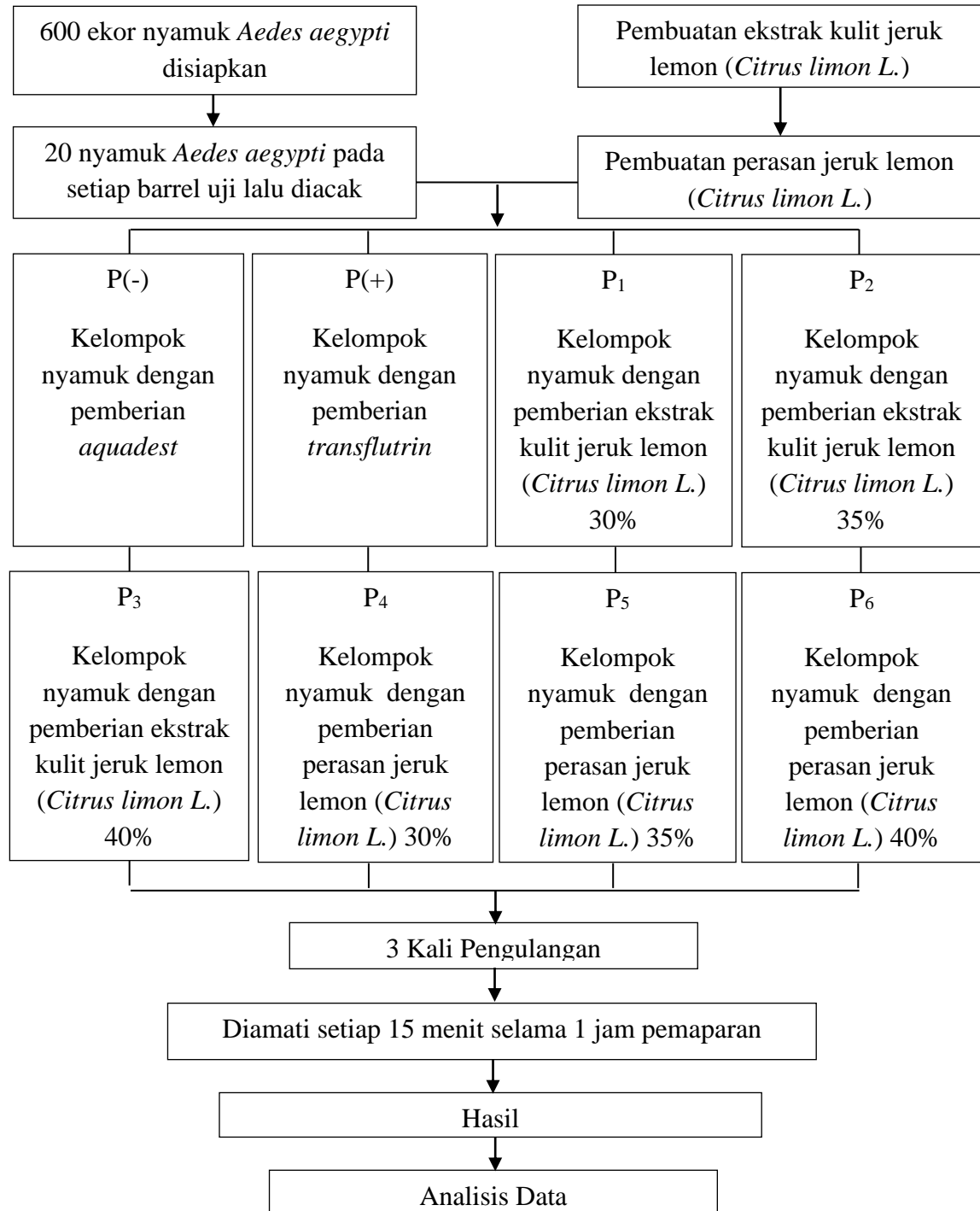
3.5.2 Kontrol Negatif

Nyamuk *Aedes aegypti* dewasa yang berada di dalam kandang pemeliharaan dimasukkan ke dalam *barrel uji* masing-masing sebanyak 20 ekor nyamuk. Siapkan sprayer berisi *aquadest*, semprot *barrel uji* yang berisi nyamuk sebanyak 5 kali. Kemudian amati nyamuk yang mati setiap 15 menit dan sisihkan ke bagian yang kosong di dalam *barrel uji*. Setelah 1 jam pemaparan hitung berapa banyak total nyamuk yang mati.

3.5.3 Perlakuan dengan Ekstrak Kulit dan Perasan Jeruk Lemon (*Citrus limon L.*)

Nyamuk *Aedes aegypti* dewasa yang berada di dalam kandang pemeliharaan dimasukkan ke dalam *barrel uji* masing-masing sebanyak 20 ekor nyamuk. Siapkan sprayer berisi ekstrak kulit jeruk lemon masing-masing dengan konsentrasi 30%, 35%, dan 40%, dan perasan buah lemon dengan konsentrasi 30%, 35%, dan 40% kemudian semprot *barrel uji* yang berisi nyamuk sebanyak 5 kali. Kemudian amati nyamuk yang mati setiap 15 menit dan sisihkan ke bagian yang kosong di dalam *barrel uji*. Setelah 1 jam pemaparan hitung berapa banyak total nyamuk yang mati.

3.6 Kerangka Penelitian



3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil uji ditabulasi dalam tabel, diuji dengan *one way* ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji *Duncan* dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 5\%$) menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistics 20.