

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan penelitian

Jenis penelitian ini ditunjukkan untuk mengetahui kombinasi efektivitas ekstrak daun jambu biji (*P. guajava*) dan ekstrak daun belimbing wuluh belimbing wuluh (*A. bilimbi*) sebagai insektisida nabati terhadap nyamuk *Anopheles* sp berdasarkan konsentrasi.

Jumlah level tiap level faktor dan atau jumlah replikasi yang dilakukan mungkin tidak sama, blok sampel yang digunakan Randomized sampling, metode rancangan acak (RAL) yang terdiri, formula terdiri dari sebelas level, yaitu F-1 (100%:0%), F-2 (90%:10%), F-3 (80%:20%), F-4 (70%:30%), F-5 (60%:40%), F-6 (50%:50%), F-7 (40%:60%), F-8 (30%:70%), F-9 (20%:80%), F-10 (10%:90%), F-11 (0%:100%) . Waktu paparan dihitung setiap 15 menit selama 2 jam. Perisipan ekstrak dengan menggunakan metode ekstrak maserasi menggunakan *etanol* teknis 96% dengan waktu kontak 4x24 jam. Sehingga jumlah variasi yang didapatkan yaitu 33 variasi, besar sampel untuk satu perlakuan dalam penelitian eksperimen adalah 10 nyamuk *Anopheles* sp. Dengan 3 kali replikasi sehingga jumlah perlakuan sebanyak 33 kali, Sehingga jumlah nyamuk *Anopheles* sp yang dibutuhkan sebanyak 330 ekor (33 x 10 ekor). Secara lengkap variasi perlakuan adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1
Formulasi kombinasi konsentrasi dan waktu kontak daun jambu biji
(*P. guajava*) dan ekstrak Daun belimbing wuluh
(*A. bilimbi*) terhadap Kematian
nyamuk *Anopheles* sp.

Waktu kontak	Dosis										
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
15 Menit sekali selama 2 jam	100%: 0%	90%: 10 %	80%: 20%	70%: 30%	60%: 40%	50%: 50%	40%: 60%	30%: 70%	20 %:8 0%	10%:9 0%	0%: 100 %

B. Lokasi Penelitian Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengendalian Vektor Jurusan Kesehatan Lingkungan, Poltekkes Tanjung Karang dan waktu penelitian dilaksanakan pada Januari 2024 – Mei 2024.

C. Subjek Penelitian

Menurut WHO (2005), besar sampel untuk satu perlakuan dalam penelitian eksperimen adalah 25. Subjek yang diteliti adalah nyamuk *Anopheles* sp. yang dikembang biakkan sendiri, nyamuk yang digunakan yaitu 10 ekor untuk setiap perlakuan. Banyaknya replikasi setiap perlakuan dicari menggunakan rumus Federer (1977) dalam penelitian Lestari (2020), sebagai berikut:

$$(t - 1) (r - 1) > 15$$

$$(11 - 1) (r - 1) > 15$$

$$10 (r - 1) > 15$$

$$10 r - 10 > 15$$

$$10 r > 15 + 10$$

$$\begin{aligned}
 10 r &> 25 \\
 R &> \underline{25} \\
 &10 \\
 &= 2,5 \\
 &= 3
 \end{aligned}$$

t = perlakuan

r = replikasi

Berdasarkan perhitungan diatas maka replikasi penelitian dilakukan sebanyak 3 kali sehingga jumlah perlakuan sebanyak 33 kali. Sehingga jumlah nyamuk *Anopheles* sp. yang dibutuhkan sebanyak 330 ekor (33 x 10 ekor).

Pemilihan subjek ke dalam kedua kelompok yang dikenai eksperimen menggunakan proses randomisasi. Randomisasi sampel menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (*RAL*) Faktorial Berdasarkan Modul pengantar perancangan percobaan, randomisasi dan *Lay Out*, Penelitian ini dilakukan randomisasi dengan blok (*Blocked randomization*). Randomisasi dan pembuatan *Lay Out* dengan cara undian, dengan langkah Langkah :

1. Siapkan tabel nomor acak tiga digit, lalu pilih secara random menggunakan pena,
2. Setelah mendapatkan nomor susun nomor tersebut kebawah sesuai urutan nomor yang didapat dan tulis urutan nomor dari terkecil sampai terbesar.

Hasil randomisasi blok sampel disajikan sebagai berikut

Tabel 3.2
Randomisasi Blok Sampel Replika

Nomor	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
1	F3	F9	F7
2	F6	F5	F8
3	F2	F11	F11
4	F11	F3	F10
5	F10	F1	F2
6	F9	F7	F6
7	F1	F8	F1
8	F8	F2	F5
9	F7	F6	F9
10	F4	F4	F3
11	F5	F10	F4

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (Independent)

Dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kombinasi Daun jambu biji (*P. guajava*) dan Daun Belimbing Wuluh (*A. bilimbi*) F-1 (100%:0%), F-2 (90%:10%), F-3 (80%:20%), F-4 (70%:30%), F-5 (60%:40%), F-6 (50%:50%), F-7 (40%:60%), F-8 (30%:70%), F-9 (20%:80%), F-10 (10%:90%), F-11 (0%:100%) , dengan waktu kontak 2 jam pengamatan terhadap kematian nyamuk *Anopheles* sp.

2. Variabel Terikat (Dependent)

Dalam penelitian ini adalah jumlah kematian nyamuk *Anopheles* sp.

E. Definisi Operasional

Tabel 3.3
Definisi Operasional

No	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Kematian nyamuk	Banyaknya nyamuk <i>Anopheles</i> sp. yang mati.	Stopwatch	Observasi	Ekor (jumlah nyamuk yang mati)	Rasio
2	Formulasi Ekstrak Daun jambu biji dan Daun belimbing wukluh	Penggabungan dua larutan bioinsektisida yang menggunakan perbandingan daun jambu biji (<i>P. guajava</i>) dan daun ekstrak (<i>A. bilimbi</i>) dengan campuran etanol teknis 96%	Volumetri	Pengukuran	Persen (100%:0%), (90%:10%),(80%:20%), (70%:30%),(60%:40), (50%:50%),(40%:60%), (30%:70%),(20%:80), (10%:90%),(0%:100%)	Interval
3	Waktu kontak	Lamanya sampel nyamuk <i>Anopheles</i> sp. Kontak dengan ekstrak kombinasi Ekstrak Daun Jambu Biji (<i>P. guajava</i>) Dan Daun Belimbing Wuluh (<i>A. bilimbi</i>)	Stopwatch	Observasi/ pengukuran	15 menit, 30 menit, 45 menit, 60 menit, 75 menit, 90 menit, 105 menit, 120 menit	Interval

F. Teknik Pengumpulan Data

Tabel 3.4
Teknik Pengumpulan data

No.	Variabel	Teknik Pengumpulan Data
1	Formulasi daun jambu biji (<i>P. guajava</i>) dan belimbing wuluh (<i>A. bilimbi</i>)	1. Pengukuran 2. Alat ukur volumetri 3. Variasi ekstrak daun jambu biji dan daun belimbing wuluh F1: (0%:100%) F2: (10%:90%) F3: (20%:80%) F4: (30%:70%) F5: (40%:60%) F6: (50%:50%) F7: (60%:40%) F8: (70%:30%) F9: (80%:20%) F10: (90%:10%) F11: (100%:0%)
2	Waktu pengamatan	1. Pengukuran 2. Alat ukur Stopwatch 3. Pengukuran dilakukan pada waktu setiap 15 menit selama 2 jam
3	kematian nyamuk <i>Anopheles sp.</i>	1. Observasi 2. Pengamatan diukur menggunakan stop watch
4	Suhu	1. Pengukuran 2. Alat ukur thermometer 3. Diukur pada masing masing blok sampel 4. Pengukuran dilakukan saat awal, tengah, danakhir waktu kontak

G. Tahapan Penelitian

1. Alat dan Bahan

a. Alat

- 1) Beaker Glass
- 2) Blender
- 3) Botol *bioassay*
- 4) *Sprayer (hand pump atomizer)*
- 5) Sangkara tau kandang nyamuk
- 6) Gelas ukur 100 ml
- 7) Pipet ukur 10 ml
- 8) Timbangan
- 9) Pisau
- 10) Saringan plastik
- 11) Batang Pengaduk
- 12) Aspirator
- 13) *Thermometer*
- 14) *Stopwatch*
- 15) Alat Tulis

b. Bahan

- 1) Daun jambu biji (*P. guajava*) dan daun belimbing wuluh (*A. bilimbi*)
- 2) Air keran
- 3) Larutan *Etanol* 96%
- 4) Kertas saring

c. Tahapan Penelitian

a) Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Tahap awal dimulai dengan pembuatan simplisia. Simplisia dibuat dengan cara memilih daun jambu biji dan belimbing wuluh yang sudah tua lalu mencuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Daun jambu biji dan daun belimbing wuluh dipisahkan dan ditimbang hingga seberat 2 kg. Selanjutnya daun tersebut dikeringkan dengan cara dioven dengan suhu 50-60° C selama 24 jam atau dengan cara dikeringkan di udara ruangan hingga mengering sehingga didapat 1 kg simplisia.

b) Simplisia daun dihaluskan menggunakan blender sampai berbentuk serbuk halus, selanjutnya disaring menggunakan kertas saring dan corong saring

c) Pembuatan ekstrak *etanol* daun jambu biji dan daun belimbing wuluh dilakukan dengan metode *maserasi*, yaitu merendam simplisia daun jambu biji dan daun belimbing wuluh ke dalam pelarut *etanol* 96% dengan perbandingan 1 : 4 (1 kg simplisia : 4 liter etanol). Perendaman dilakukan selama 3 hari, dan campuran tersebut diaduk secara berkelanjutan setiap 8 jam sekali.

d) Hasil maserasi atau perendaman dari larutan tersebut disaring menggunakan kain kasa untuk mendapatkan filtrat hasil perendaman. Kemudian filtrat dipekatkan menggunakan waterbath dengan suhu 40 –50° C hingga diperoleh hasil akhir berupa ekstrak daun jambu biji dan ekstrak daun belimbing wuluh masing – masing dengan konsentrasi 100 % sebanyak 1 Liter.

a) Persiapan Nyamuk *Anopheles* sp.

Menangkarkan nyamuk *Anopheles* sp dengan cara :

Alat dan Bahan:

- 1) Sangkar
- 2) Mangkuk kecil
- 3) Pipet mulut lebar
- 4) Jentik *Anopheles* sp
- 5) Air
- 6) Larutan gula
- 7) Nampan plastic
- 8) Tabung Erlenmeyer volume 150 ml

2. Cara kerja

Penelitian menggunakan nyamuk *Anopheles* sp. yang diambil dari beberapa rumah didaerah teluk, Provinsi Lampung, menggunakan gayung bertangkai panjang dan wadah plastik untuk menampung larva. Wilayah tersebut merupakan daerah endemik malaria dengan vektor utama *Anopheles sundaicus* (Dinas Kesehatan Kabupaten Lampung Selatan, 2017).

1. Kolonisasi nyamuk dimulai dengan menetas telur *Anopheles* sp yang terdapat pada kertas saring dengan merendamnya dalam nampan plastik yang telah berisi air setinggi 2 cm, yang akan menetas selama 3 hari dan diperoleh kepadatan larva sebanyak 200-600 ekor.
2. Setelah menetas, larva diberi makan berupa larutan air gula
3. Setelah 4 hari larva menetas menjadi pupa, pupa dipindahkan dengan pipet mulut lebar ke dalam mangkuk yang berisi air

sebanyak 1/3 volume mangkuk. Selanjutnya mangkuk yang berisi pupa tersebut dimasukkan ke dalam sangkar nyamuk. Di dalam sangkar nyamuk dimasukkan tabung elenmeyer volume 150ml yang berisi larutan gula 10%. Pada tabung tersebut juga dilengkapi dengan sumbu kapas sehingga larutan dapat meresap dalam sumbu kemudian akan dihisap oleh nyamuk jantan dan betina yang baru menetas.

4. Setelah pupa menjadi nyamuk maka nyamuk tersebut siap untuk digunakan dalam penelitian.

b) Kematian Nyamuk *Anopheles* sp.

Kematian nyamuk adalah kematian dari *Anopheles* sp. yang apa bila disentuh tidak bergerak dengan kriteria objektif sebagai berikut

Hidup : Apabila larva disentuh & masih mengalami pergerakan

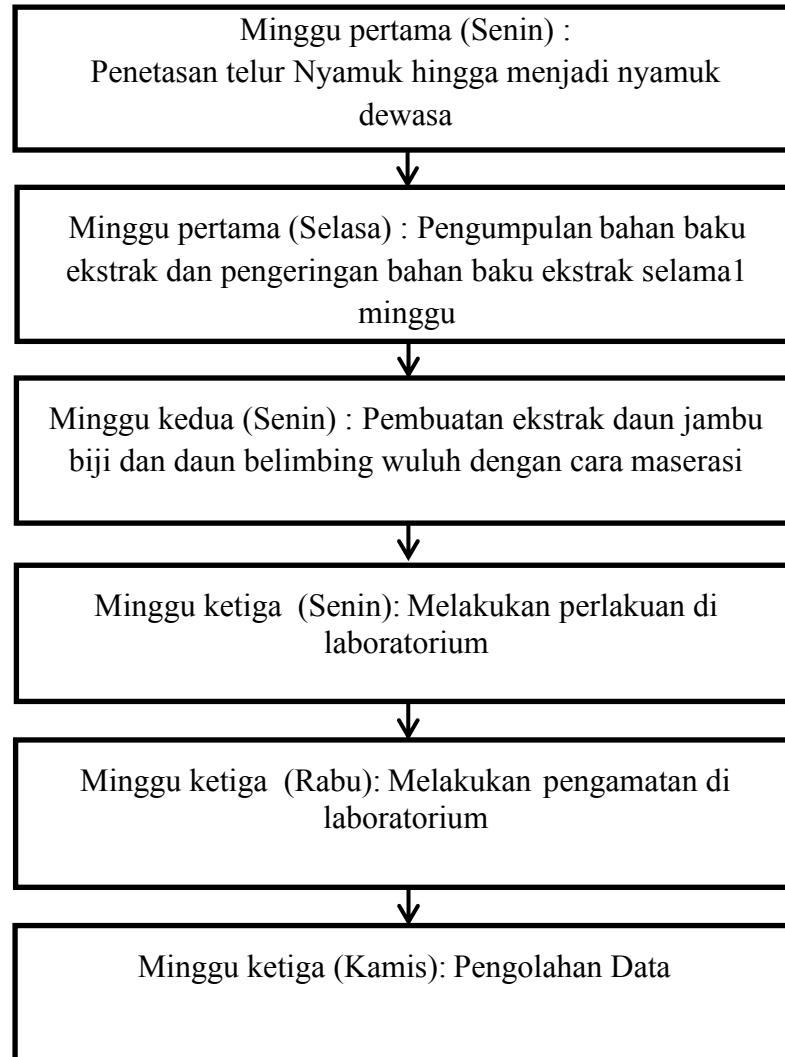
Mati : Apabila nyamuk disentuh tidak bergerak (Afrindayanti,2017).

c) Tahap Perlakuan:

- 1) Menyiapkan 11 botol *bioassay* dan kandang untuk satu kali pengulangan.
- 2) Kemudian semprotkan dengan insektisida yang telah dikombinasikan.
- 3) Ukur suhu dan ph pada masing masing botol *bioassay*
- 4) Biarkan botol tersebut menguap selama 1 jam.
- 5) Setelah dibiarkan menguap selama 1 jam Masukkan nyamuk sebanyak 10, lalu ditutup dengan kain kasa.
- 6) Setelah dipaparkan selama 1 menit
- 7) Kemudian, amati dan catat nyamuk yang mati dalam 15 menit,

selama 24 jam.

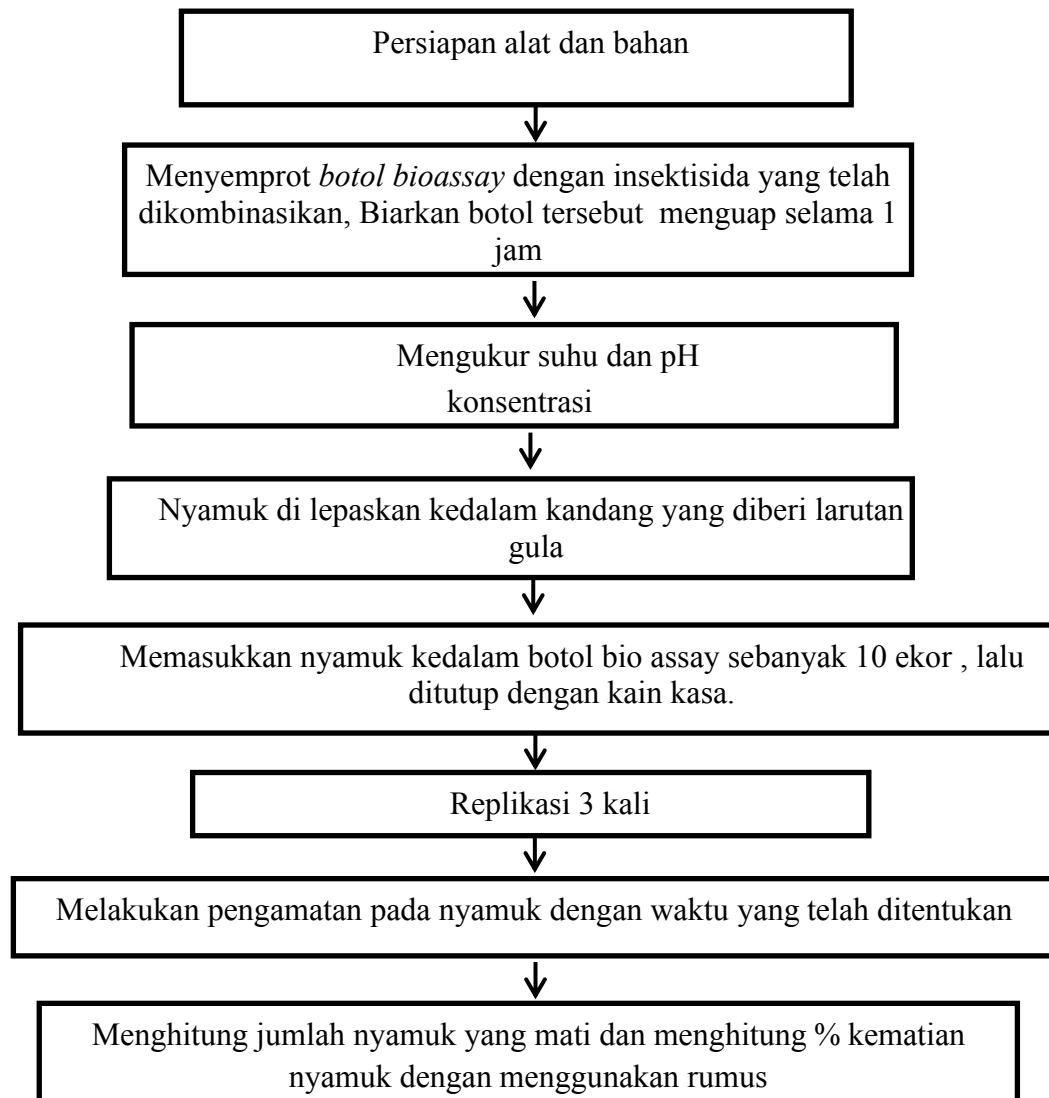
H. Alur Waktu Penelitian



Gambar 3.1
Alur Waktu Penelitian

I. Alur Kerja Penelitian.

Mengikuti *Guidlines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvacides* oleh WHO (2005) dalam Lestari (2020), alur kerja penelitiannya adalah sebagai berikut:



Gambar 3.2
Alur kerja penelitian

J. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

a. Coding

Coding adalah mengubah data berbentuk kalimat/huruf menjadi suatu data angka atau bilangan.

b. Editing

Sebelum data diolah, data perlu diedit terlebih dahulu. Data atau keterangan yang telah dikumpulkan dalam *record book* perlu dibaca sekali lagi apabila masih terdapat hal-hal yang salah atau meragukan maka perlu diperbaiki.

c. Cleaning

Semua data dari setiap sumber data selesai dimasukkan, perlu dicek kembali untuk melihat kemungkinan adanya kesalahan kode, tidak lengkapnya data dan sebagainya, kemudian dilakukan pembetulan atau koreksi.

d. Tabulating

Memasukkan data ke dalam tabel-tabel, dan mengatur angka-angka sehingga dapat dihitung jumlah kasus dalam berbagai kategori.

2. Analisis Data

a. Anava Two Way

Analisis yang digunakan untuk mengetahui pengaruh hubungandua variabel atau lebih variabel bebas (independen) terhadap variabel terikat (dependen). Analisis data yang menggunakan tingkat kepercayaan (p) 95% dan

tingkat kesalahan (α) 5% atau 0,05 digunakan pada penelitian ini adalah ANOVA Two Way yaitu untuk mengetahui apakah ada pengaruh dari kombinasi ekstrak daun jambu biji dan daun belimbing wuluh terhadap kematian nyamuk *Anopheles Sp.* Diperlukan dua variabel independen pada skala data kategorikal dan satu variabel dependen pada skala data kuantitatif/numerik (periode atau rasio). Two-way ANOVA (two-way ANOVA test) digunakan untuk pengujian statistik lebih dari dua sampel, dan two-way ANOVA X - YX digunakan untuk mengetahui ada tidaknya interaksi antara faktor- faktor yang akan diteliti.