

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental untuk mengetahui pengaruh formulasi ekstrak daun sirsak (*A. muricata*) daun belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap mortalitas nyamuk *Anopheles* sp.

Konsentrasi terdiri dari 11 level, yaitu BD-1 (100%:0%), BD-2 (90%:10%), BD-3 (80%:20%), BD-4 (70%:30%), BD-5 (60%:40%), BD-6 (50%:50%), BD-7 (40%:60%), BD-8 (30%:70%), BD-9 (20%:80%), BD-10 (10%:90%), BD-11 (0%:100%) waktu paparan dihitung sejak nyamuk dipaparkan kombinasi formula dan dosis yang ditentukan, Pencatatan kematian nyamuk *anopheles* sp dilakukan setiap 15 menit, 30 menit, 45 menit, 60 menit, 75 menit, 90 menit, 105 menit dan 120 menit. Percobaan, pada setiap blok sempel. Persiapan ekstrak dengan metode ekstrak maserasi menggunakan *etanol* teknis 96% dengan waktu kontak 4x24 jam, besar sempel 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
 Kombinasi ekstrak daun sirsak (*A. muricata*) daun belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap mortalitas nyamuk *Anopheles* sp.

Formulasi ekstrak daun sirsak (<i>A. muricata</i>) daun belimbing wuluh (<i>A. bilimbi</i>) (%)											
Waktu kontak	Dosis										
15 menit sekali dalam 2 jam	BD1	BD2	BD3	BD4	BD5	BD6	BD7	BD8	BD9	BD10	BD11
	100%:0%	90%:10%	80%:20%	70%:30%	60%:40%	50%:50%	40%:60%	30%:70%	20%:80%	10%:90%	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 Desember 2023 - April 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 di pelihara 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:

$$\begin{aligned}
 (t - 1) (r - 1) &> 15 \\
 (11 - 1) (r - 1) &> 15 \\
 10 (r - 1) &> 15 \\
 10 r - 10 &> 15 \\
 10 r &> 15 + 10 \\
 10 r &> 25 \\
 R &> 25/10 \\
 &= 2,5 \\
 &= 3
 \end{aligned}$$

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 langkah langkah:

1. Siapkan tabel nomor acak tiga digit, lalu pilih secara random menggunakan pena,
2. Setelah mendapatkan nomor susun nomor tersebut kebawah sesuai urutannomor 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	BD3	BD9	BD7
2	BD6	BD5	BD8
3	BD2	BD11	BD11
4	BD11	BD3	BD10
5	BD10	BD1	BD2
6	BD11	BD7	BD6
7	BD1	BD8	BD1
8	BD8	BD2	BD5
9	BD7	BD6	BD9
10	BD4	BD4	BD3
11	BD5	BD10	BD4

D. Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas (Independent)

Dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kombinasi daun sirsak (*Annona muricata* L) dan daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) BD-1 (100%:0%), BD-2 (90%:10%), BD-3 (80%:20%), BD-4 (70%:30%), BD-5 (60%:40%), BD-6 (50%:50%), BD-7 (40%:60%), BD-8 (30%:70%), BD-9 (20%:80%), BD-10 (10%:90%), BD-11 (0%:100%), dengan waktu kontak 15 menit, 30 menit, 45 menit, 60 menit, 75 menit, 90 menit, 105 menit dan 120 menit. pengamatan terhadap mortalitas nyamuk *Anopheles* sp.

b. Variabel Terikat (Dependent)

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

E. Definisi Operasional

Tabel 3.3
Definisi Operasional

No	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Mortalitas nyamuk	Banyaknya nyamuk <i>Anopheles sp.</i> yang mati dapat dihitung dengan rumus: $\text{Mortalitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva yang diuji}} \times 100\%$	Tally Counter	Observasi % (persen)	Rasio
2	Lama waktu kontak	Lamanya sampel nyamuk <i>Anopheles sp.</i> Kontak dengan formulasi ekstrak daun sirsak (<i>Annona muricata</i> L) daun belimbing wuluh. (<i>Averrhoa bilimbi</i> L)	Stopwatch	Observasi /pengukuran	Jam (Diamati 15 menit, 30 menit, 45 menit, 60 menit, 75 menit, 90 menit, 105 menit dan 120 menit.)	Interval
3	Formulasi ekstrak daun sirsak (<i>Annona muricata</i> L) dan daun belimbing wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> L)	Penggabungan dua larutan bioinsektisida yang menggunakan perbandingan ekstrak daun sirsak (<i>Annona muricata</i> L) daun belimbing wuluh. (<i>Averrhoa bilimbi</i> L) dengan campuran etanol teknis 96%	Volumetri	Pengukuran	Formula (100%:0%), (90%:10%) (80%:2%) (70%:30%) (60%:4), (50%:50%) (40%:6%), (30%:70%) (20%:8), (10%:90%) (0%:100)	Interval

F. Teknik Pengumpulan Data

Tabel 3.4
Teknik Pengumpulan data

No.	Variabel	Teknik Pengumpulan Data
1	Kombinasi ekstrak Daun sirsak (<i>Annona Muricata L</i>) dan Daun Belimbing Wuluh (<i>Averrhoa bilimbi L.</i>)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pengukuran 2. Alat ukur volumetri 3. Daun sirsak dan daun belimbing wuluh diperoleh dari kebun milik salah satu warga 4. Formulasi ekstrak pada tahapan penelitian dengan perbandingan BD1: (100%:0%) BD2: (90%:10%) BD3: (80%:20%) BD4: (70%:30%) BD5: (60%:40%) BD6: (50%:50%) BD7: (40%:60%) BD8: (30%:70%) BD9: (20%:80%) BD10: (10%:90%) BD11: (0%:100%)
2	Lama waktu kontak	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pengukuran 2. Alat ukur Stopwatch 3. Pengukuran dilakukan 15 menit, 30 menit, 45 menit, 60 menit, 75 menit, 90 menit, 105 menit dan 120 menit.
3	Jumlah Mortalitas nyamuk <i>Anopheles sp.</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Persiapkan botol bioassay yang disemprotkan dengan insektisida yang telah dikombinasikan 2. Biarkan botol tersebut menguap selama 1 jam 3. Masukkan nyamuk sebanyak 10 kedalam botol bioassay yang telah menguap, lalu dittup dengan kain kasa 4. Setelah dipaparkan selama 15 menit, nyamuk di lepaskan kedalam kandang yang diberi larutan gula, lalu di cek per 15 menit sekali selama 2 jam 5. Alat ukur <i>Tally Counter</i> 6. Setiap terdapat nyamuk yang mati, mata alat ukur ditekan 1 kali 7. $Mortalitas (100\%) = \frac{\text{Jumlah larvayangmati}}{\text{jumlah larva yang diuji}} \times 100\%$
4	Suhu	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pengukuran 2. Alat ukur thermometer

		<ol style="list-style-type: none"> 3. Diukur pada masing masing blok sampel 4. Pengukuran dilakukan saat awal, tengah, dan akhir waktu kontak
5	pH	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pengukuran 2. Alat ukur pH meter 3. Diukur pada masing masing blok sampel 4. Pengukuran dilakukan saat awal, tengah, dan akhir waktu kontak 5. Pengukuran 6. Alat ukur pH 7. Diukur pada masing masing blok sampel 8. Pengukuran dilakukan saat awal, Tengah, dan akhir waktu

G. Tahapan Penelitian

a. Bahan

- 1) Daun sirsak (*A. muricata* L) dan daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L)
- 2) Air kran
- 3) Larutan *Etanol* 96%
- 4) Kertas saring

b. Tahapan Penelitian

- 1) Persiapan Pembuatan konsentrasi ekstrak kombinasi daun sirsak (*A. muricata* L) daun belimbing wuluh. (*A. bilimbi* L) langkah pembuatan ekstrak ekstrak kombinasi daun sirsak (*A. muricata* L) daun belimbing wuluh. (*A. bilimbi* L) yaitu daun sirsak dan belimbing wuluh yang sudah didapatkan dari daerah kecamatan Natar kemudian dibersihkan lalu ditimbang, berat basah yang didapatkan masing masing sebesar 3 kg selanjutnya daun sirsak dan belimbing wuluh di bersihkan lalu di tiriskan. Daun sirsak dan belimbing wuluh yang sudah di cuci dan di tiriskan kemudian dikeringkan selam 3-4 hari, berat kering daun sirsak dan daun belimbing wuluh yang didapatkan setelah dijemur yaitu 2 kg. Setelah

dikeringkan kemudian daun sirsak dan daun belimbing wuluh dihaluskan dengan menggunakan blender sampai halus menjadi serbuk, serbuk daun sirsak dan daun belimbing wuluh yang sudah halus tersebut dinamakan simplisia. Simplisia yang didapatkan yaitu sebanyak 1 kg, kemudian simplisia dimasukkan kedalam beaker glass untuk dimaserasi (direndam) menggunakan etanol 96% sebanyak 1000 ml sampai daun sirsak dan belimbing wuluh yang halus terendam semua, dan direndam selama 24 jam. Simplisia yang sudah direndam kemudian akan disaring menggunakan corong dan kertas saring. Setelah disaring maka didapatkan ekstrak cair daun sirsak dan daun belimbing wuluh kemudian ekstrak cair diuapkan dengan menggunakan *hot plate* untuk menguapkan etanol dari ekstrak cair daun sirsak dan belimbing wuluh sampai mendapatkan ekstrak daun sirsak dan belimbing wuluh yang kental dalam bentuk pasta.

2) Persiapan Nyamuk *Anopheles* sp.

Penelitian menggunakan nyamuk *Anopheles* sp yang di ternak sendiri di laboratorium parasitology poltekkes tanjung karang jurusan Kesehatan lingkungan. Menangkarkan nyamuk *Anopheles* sp dengan cara:

a. Alat dan Bahan:

- a) Sangkar
- b) Mangkuk kecil
- c) Pipet mulut lebar
- d) Telur *Anopheles* sp
- e) Air

- f) Larutan gula 10%
- g) Nampan plastic
- h) Tabung Erlenmeyer volume 150 ml

b. Cara kerja

Penelitian menggunakan larva *Anopheles* sp. yang diambil dari beberapa *lagoon* (tambak terlantar) di wilayah Pesawaran, Provinsi Lampung, menggunakan gayung bertangkai panjang dan wadah plastik untuk menampung larva. Wilayah tersebut merupakan daerah endemik malaria dengan vektor utama *Anopheles* sp (Dinas Kesehatan Kabupaten Lampung Selatan, 2017).

Besar sampel pada penelitian ini adalah 20 nyamuk *Anopheles* sp untuk tiap kelompok dengan pengulangan 3 kali sehingga jumlah larva *Anopheles* sp yang dibutuhkan 660 nyamuk.

- a) Kolonisasi nyamuk dimulai dengan menetas telur *Anopheles* sp yang terdapat pada kertas saring dengan merendamnya dalam nampan plastik yang telah berisi air setinggi 2cm, yang akan menetas selama 3 hari dan diperoleh kepadatan larva sebanyak 200-600 ekor. Setelah menetas, larva diberi makan berupa larutan air gula
- b) 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. Setelah pupa menjadi nyamuk maka nyamuk tersebut siap untuk digunakan dalam penelitian.

3) Mortalitas Nyamuk *Anopheles* sp.

Mortalitas nyamuk adalah kematian dari *Anopheles* sp. Yang apabila disentuh tidak bergerak dengan kriteria objektif sebagai berikut

Hidup: Apabila larva disentuh & masih mengalami pergerakan

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

Perhitungan mortalitas nyamuk dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Mortalitas} = \frac{\text{jumlah nyamuk mati}}{\text{jumlah nyamuk yang di uji}} \times 100\%$$

4) Tahap Persiapan bioassay:

a) Bahan dan Alat

- 1) Botol Wheaton volume 250 ml berwarna bening beserta tutupnya. Untuk tiap kali uji digunakan 5 buah botol, yaitu 4 botol untuk uji dan 1 untuk control. Pipet plastik (*disposable pipette*) atau micropipette dengan tips dengan volume minimal 1 ml
- 2) Aspirator untuk mengumpulkan nyamuk yang akan diuji. Paper cup untuk penyimpanan sementara nyamuk sebelum dimasukkan ke botol uji

- 3) Botol untuk stok larutan insektisida berupa botol berwarna atau botol bening yang dilapisi dengan foil wrapped/aluminium foil
- 4) Timer untuk menghitung dalam menit. permanent markers/spidol untuk labelling/menandai botol, tutup, dan pipet agar tidak tertukar. Sarung tangan karet sekali pakai (*Disposable gloves*) kertas, bolpoint, dan pensil untuk pencatatan data
- 5) Alas (Lab Mat)/taplak meja untuk menghindari kontaminasi pada meja uji

b) Persiapan Botol Uji

Botol uji dapat dipergunakan beberapa kali setelah dicuci. Untuk botol yang akan dipergunakan lagi, badan dan tutup botolnya harus diberi label dengan marking tape sebagai penanda (Jangan menulis langsung di badan botol).

- 1) Tandai 11 botol dan tutupnya lainnya dengan angka (1, 2, 3 dst 11) sesuai jumlah replikasi, dan juga tanggal uji. Botol ini merupakan botol uji berinsektisida (treated). Bila lebih dari satu konsentrasi yang akan diuji, tulis konsentrasi yang akan diuji dan tanggal pelaksanaan
- 2) Tandai botol dan tutupnya agar tidak tertukar, hal ini penting karena insektisida yang melapisi botol akan sama dengan insektisida yang menempel ditutupnya.

c) Cara Melapisi Botol Uji Dengan Insektisida

- 1) Pastikan botol dan tutupnya kering sempurna Lepaskan tutup botol Siapkan botol untuk membuat larutan stok (larutan untuk siap uji) misalnya 50 ml/jenis insektisida yang dapat digunakan untuk beberapa kali uji. Apabila tidak segera digunakan larutan stok dapat disimpan dalam kulkas (40° C).
- 2) Teteskan insektisida yang akan diuji sebanyak 1 ml ke dalam botol uji (treated) kemudian tutup rapat-rapat. Pemolesan botol uji (coating) dan kontrol sebaiknya dilakukan berjauhan atau ada jeda waktu 1 atau 2 jam agar tidak tertukar dan terkontaminasi.
- 3) Ulangi untuk botol berikutnya dengan cara yang sama Putar botol yang telah ditetesi insektisida atau kontrol agar larutan menempel merata ke dasar botol. Botol dibalik kemudian diputar agar menempel ditutupnya juga
- 4) Kemudian letakkan botol miring atau tidur dan kemudian digulirkan. Lakukan berulang hingga larutan tersebut menempel merata pada permukaan dalam botol. Lakukan pada semua botol uji
- 5) Buka tutup botol secara perlahan untuk mengeluarkan gas dan lanjutkan dengan menggulirkan botol hingga terlihat dari seluruh ruang tidak ada larutan lagi dan botol kering sempurna Biarkan botol mengering, lalu tutup dengan kain atau karton agar terlindung dari cahaya

- 6) Botol yang sudah berinsektisida tidak boleh digunakan lebih dari 5 hari dihitung dari awal pemolesan botol uji (coating) dan 5 kali penggunaan uji. Prosedur Pencucian dan pengeringan botol uji. Botol uji dicuci dengan air hangat dan dibilas dengan air bersih minimal 3 kali
- 7) Botol dikeringkan di dalam oven suhu 500 C selama 15 – 20 menit hingga keseluruhan botol kering sebelum digunakan
Apabila tidak ada oven dapat dikeringkan pada suhu ruang atau dijemur dibawah sinar matahari dengan posisi tutup dibuka. Apabila dalam kondisi lembab, botol uji dikeringkan dengan tutup terbuka selama semalam atau dengan waktu pengeringan lebih lama.
- 8) Untuk memastikan pengeringan botol uji sudah memenuhi syarat, masukkan beberapa nyamuk rentan ke dalam botol uji yang baru saja dicuci dan dikeringkan. Indikator kebersihan botol ditunjukkan dengan tidak adanya nyamuk yang mati ketika dimasukkan ke dalam botol. Apabila nyamuk mati lakukan pengulangan prosedur pencucian dan pengeringan.

d) Memasukkan Nyamuk Uji ke Dalam Botol

- 1) Usahakan dalam aspirator tidak berembun atau basah oleh udara dari dalam mulut agar nyamuk tidak menempel di dinding aspirator.
- 2) Hembuskan perlahan-lahan nyamuk ke dalam botol dan tidak terlalu keras dengan jumlah yang tidak terlalu banyak. Sebaiknya tidak lebih dari 5 ekor setiap kali ditiupkan ke dalam botol agar nyamuk tidak mati sebelum tersentuh dengan insektisida. Berhati-hati agar ujung aspirator tidak menyentuh ke dinding botol agar tidak terkontaminasi dengan insektisida. Aspirator untuk kontrol tidak dicampur penggunaannya dengan untuk treated
- 3) Jumlah nyamuk pada tiap botol tidak harus berjumlah sama satu dengan yang lainnya
Identifikasi spesies dari nyamuk sebelum atau sesudah dilakukan uji.

e) Prosedur Uji Botol CDC

Uji Botol CDC dapat dilakukan dengan posisi berdiri atau ditidurkan, yang penting harus tetap atau konsisten dengan prosedur yang sama. Langkah- langkahnya:

- 1) Dengan aspirator masukkan 10 – 25 nyamuk ke dalam botol kontrol Dengan aspirator yang berbeda masukkan 10 – 25 nyamuk ke dalam botol uji

- 2) Siapkan timer untuk menghitung waktu. Pastikan awal masuknya nyamuk ke dalam botol sebagai menit ke 0. Catat dan masukkan sesuai dalam formulir

Jika ditemukan nyamuk mati pada menit 0 catat dan masukkan ke dalam formulir

- 3) Catat jumlah nyamuk yang hidup atau mati saja, tergantung mana yang lebih memudahkan untuk dihitung setiap 15 menit, 30 menit, 45 menit, 60 menit, 75 menit, 90 menit, 105 menit dan 120 menit.

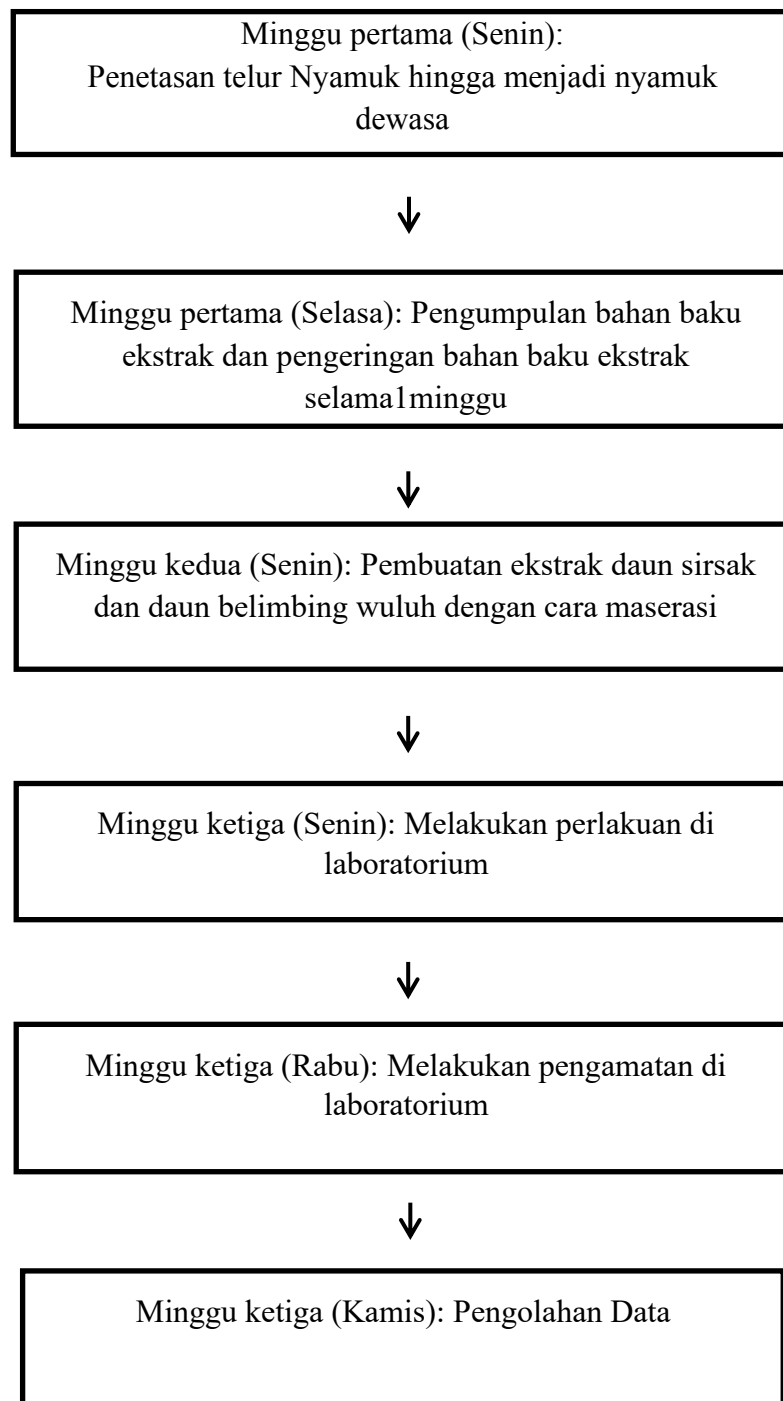
Apabila kematian nyamuk pada botol kontrol lebih dari 10 % dalam waktu 2 jam, maka uji harus diulang. Tetapi apabila kematian kontrol antara 3 – 10 % maka perhitungan harus menggunakan “Abbot formula”

f). Kriteria Nyamuk Mati

- 1) Nyamuk dinyatakan “mati” apabila nyamuk tidak dapat berdiri. Untuk meyakinkan mati atau hidup bisa dengan memutar botol perlahan – lahan, apabila nyamuk tidak dapat bergerak dan terguling ketika botol diputar perlahan, maka nyamuk dapat dikategorikan mati
- 2) Untuk memudahkan perhitungan, maka pada menit-menit awal uji dilakukan, yang dihitung adalah nyamuk yang mati, dan sebaliknya pada menit-menit akhir uji yang dihitung adalah nyamuk yang hidup.

3) Pada tahap akhir dari uji, nilai prosentase nyamuk mati pada waktu diagnostik (nyamuk mati/total nyamuk assay) adalah nilai yang paling penting dalam grafik.

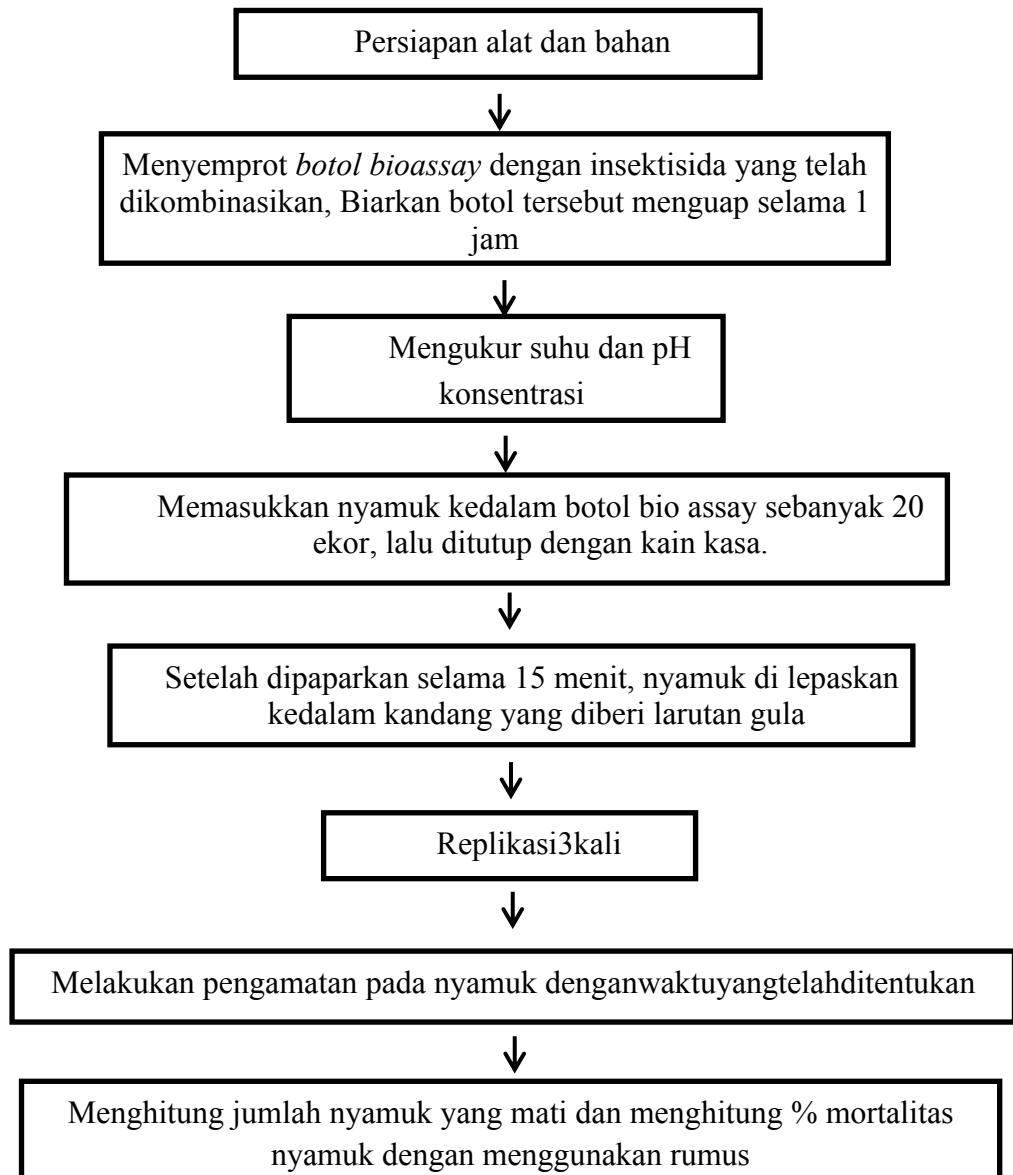
4) Alur Waktu Penelitian



Gambar 3.1 Alur Waktu Penelitian

6) Alur Kerja Penelitian.

Mengikuti *Guidlines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvacides* oleh WHO (2005) (Lestari2020), alur kerja penelitiannya adalah sebagai berikut:



Gambar 3.2 Alur kerja penelitian

H. Pengolahan dan Analisis Data

1. Analisis Data

a. *Anova Tow Way*

Analisis yang digunakan untuk mengetahui pengaruh hubungan dua 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 Tow Way yaitu untuk mengetahui apakah ada pengaruh dari kombinasi ekstrak daun sirsak dan daun belimbing wuluh terhadap Mortalitas 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 - Y X digunakan untuk mengetahui ada tidaknya interaksi antara faktor-faktor yang akan diteliti. Uji Tukey juga diterapkan untuk mengetahui perbedaan mean individu dari sekumpulan mean. Pengujian menggunakan alfa 5%.