

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental untuk mengetahui pengaruh Ekstrak Daun Binahong (*Anredera Cordifolia*) terhadap kematian larva *Aedes aegypti* instar III berdasarkan konsentrasi dan waktu kontak. Penelitian yang dilakukan menggunakan Rancangan eksperimen *Posttest-only with Control Group Design* yaitu dimana satu kelompok dilakukan perlakuan dan satu kelompok lagi merupakan kontrol (tidak dilakukan perlakuan). Dan pada akhir penelitian kedua kelompok dikenai *Posttest*.

Pemilihan subjek ke dalam kedua kelompok yang dikenai eksperimen menggunakan proses randomisasi. Randomisasi sampel menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial, merupakan eksperimen yang menggunakan lebih dari satu perlakuan atau lebih dari satu variabel bebas, rancangan acak lengkap faktorial digunakan apabila terdiri atas dua faktor atau lebih dengan melakukan kombinasi antar level faktor (Herdianto, 2013 dalam Ahyanti, 2018 dalam Putri, 2019). Jumlah level tiap level faktor dan atau jumlah replikasi yang dilakukan mungkin tidak sama, blok sampel yang digunakan *Randomized sampling* yang terdiri dari 6 taraf konsentrasi (0% sebagai kontrol, 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% sebagai perlakuan) dan 4 taraf waktu kontak, sehingga jumlah variasi yang didapatkan yaitu 24 variasi. Secara lengkap variasi perlakuan adalah sebagai berikut :

**Tabel 3.1**  
**Variasi konsentrasi dan waktu kontak ekstrak daun binahong**  
**(*Anredera Cordifolia*) terhadap kematian larva nyamuk *Aedes***  
***aegypti* instar III**

Konsentrasi Ekstrak Daun Binahong ( <i>Anredera Cordifolia</i> ) (%)						
Waktu Kontak	(A) 0 %	(B) 10%	(C) 20 %	(D) 30 %	(E) 40 %	(F) 50 %
(1) 1 jam	A1	B1	C1	D1	E1	F1
(2) 4 jam	A2	B2	C2	D2	E2	F2
(3) 8 jam	A3	B3	C3	D3	E3	F3
(4) 12 jam	A4	B4	C4	D4	E4	F4

## B. Lokasi Penelitian Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Vektor Jurusan Kesehatan Lingkungan, Poltekkes Tanjung Karang dan waktu penelitian dilaksanakan pada bulan April tahun 2023

## C. Subjek Penelitian

Menurut WHO (2005), besar sampel untuk satu perlakuan dalam penelitian eksperimen adalah 25. Subjek yang diteliti adalah larva *Aedes aegypti* yang dikembangkan sendiri. Larva yang digunakan yaitu 25 ekor untuk setiap perlakuan dan kontrol. Banyaknya replikasi setiap perlakuan dicari menggunakan rumus Federer (1977) dalam penelitian Lestari (2020), sebagai berikut:

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

$$(24 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$23(r - 1) \geq 15$$

$$23r - 23 \geq 15$$

$$23r \geq 15 + 23$$

$$23r \geq 38$$

$$r \geq 38/23$$

$$= 1,65 = 2$$

t = perlakuan r = replikasi

Berdasarkan perhitungan diatas maka replikasi penelitian dilakukan sebanyak 2 kali sehingga jumlah perlakuan sebanyak 40 kali. Selanjutnya, untuk mengetahui pengaruh setiap perlakuan, maka digunakan kontrol pada setiap waktukontak perlakuan. Maka akan diperoleh 48 data penelitian yang terdiri dari 40 data perlakuan dan 8 data non-perlakuan (kontrol). Sehingga jumlah larva *Aedes aegypti* yang dibutuhkan sebanyak 1200 ekor (48 x 25 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 48 ( $t \times r = 24 \times 2 = 48$ ) potong kertas, dan tuliskan simbol simbol (A1, A2, A3.....B1, B2, B3,.....E1, E2, E3,.....F1, F2,F3.....) yang menunjukkan perlakuan. Campurkan ke 48 potong kertas dengan tulisan perlakuan dan ulangan tersebut dalam satu wadah..
2. Ambillah satu potong kertas tersebut tersebut, tanpa dikembalikan, ambil satu kertas lagi, dan seterusnya. Sebelum mengambil potongan kertas dalam wadah, harap diaduk aduk dulu, dan tuliskan tulisan pada potongan kertas kertas tadi pada tabel *Lay Out* yang telah dipersiapkan.

Hasil randomisasi blok sampel disajikan sebagai berikut:

**Tabel 3.2 Randomisasi Blok Sampel Replika 1**

<b>B4</b>	<b>A4</b>	<b>B2</b>	<b>E3</b>	<b>D1</b>	<b>F4</b>
<b>B1</b>	<b>B3</b>	<b>A2</b>	<b>D4</b>	<b>E1</b>	<b>C3</b>
<b>C2</b>	<b>D3</b>	<b>E2</b>	<b>F1</b>	<b>A3</b>	<b>D2</b>
<b>E4</b>	<b>C1</b>	<b>F2</b>	<b>A1</b>	<b>C4</b>	<b>F3</b>

**Tabel 3.3 Randomisasi Blok Sampel Replika 2**

<b>C2</b>	<b>A4</b>	<b>D2</b>	<b>B1</b>	<b>E2</b>	<b>F2</b>
<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E1</b>	<b>C1</b>	<b>F1</b>	<b>D1</b>
<b>C3</b>	<b>A1</b>	<b>B2</b>	<b>B4</b>	<b>C4</b>	<b>F4</b>
<b>D4</b>	<b>A3</b>	<b>B3</b>	<b>F3</b>	<b>D3</b>	<b>A2</b>

#### **D. Variabel Penelitian**

Variabel bebas (*independent*) dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun binahong (*Anredera Cordifolia*) 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% serta waktu kontak 1 jam, 4 jam, 8 jam, dan 12 jam pengamatan terhadap kematian larva nyamuk *Aedes aegypti*, variabel intervening dalam penelitian ini adalah pH dan suhu. Sedangkan untuk volume air sebanyak 100 ml untuk setiap perlakuan maupun kontrol. Dan variabel terikat (*dependent*) dalam penelitian ini adalah jumlah kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* Instar III.

## E. Definisi Operasional

Tabel 3.4

### Definisi Operasional

No	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Konsentrasi ekstrak daun binahong ( <i>Anredera Cordifolia</i> )	Jumlah konsentrasi ekstrak daun binahong ( <i>Anredera Cordifolia</i> ) yang digunakan.	Volumetri	Pengukuran	Persen (%) volume (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%)	Interval
2	Lama waktu kontak	Lamanya sampel larva <i>Aedes aegypti</i> kontak dengan ekstrak daun binahong ( <i>Anredera Cordifolia</i> ).	Stopwatch	Observasi/ pengukuran	Jam (Diamati setiap 1 jam, 4 jam, 8 jam, dan 12 jam)	Interval
3	Jumlah kematian larva <i>Aedes aegypti</i>	Banyaknya larva <i>Aedes aegypti</i> yang mati setelah perlakuan dengan variasi ekstrak dan lama waktu kontak	Tally Counter	Observasi	Ekor (Jumlah Larva <i>Aedes Aegypti</i> yang mati)	Rasio
4.	Suhu	Derajat panas pada masing masing blok sampel	Thermometer	Pengukuran	Derajat Celcius (°C)	Rasio
5.	pH	Tingkat Keasaman pada masing masing blok sampel	pH meter	Pengukuran	<6 : Asam >7 : Basa =7 : Netral	Interval

## F. Teknik Pengumpulan Data

**Tabel 3.5**  
**Teknik Pengumpulan data**

No.	Variabel	Teknik Pengumpulan Data
1	Konsentrasi ekstrak daun binahong ( <i>Anredera Cordifolia</i> )	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pengukuran</li> <li>2. Alat ukur volumetri</li> <li>3. Daun Binahong diperoleh dari salah satu kebunmilik warga</li> <li>4. Konsentrasi ekstrak dihitung menggunakan rumus <math>V_1.N_1 = V_2.N_2</math> (Perhitungan ekstrak pada ada pada tahapan penelitian)</li> </ol>
2	Lama waktu kontak	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pengukuran</li> <li>2. Alat ukur Stopwatch</li> <li>3. Pengukuran dilakukan pada waktu kontak 1jam, 4 jam, 8 jam, dan 12 jam</li> </ol>
3	Jumlah kematian larva <i>Aedes aegypti</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Observasi</li> <li>2. Alat ukur <i>Tally Counter</i> Setiap terdapat larva yang mati, mata alat ukur ditekan 1 kali</li> <li>3. Diamati pada waktu 1 jam, 4 jam, 8 jam, dan 12 jam</li> </ol>
4	Suhu	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pengukuran</li> <li>2. Alat ukur thermometer</li> <li>3. Diukur pada masing masing blok sampel</li> <li>4. Pengukuran dilakukan saat awal, tengah, danakhir waktu kontak</li> </ol>
5	pH	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pengukuran</li> <li>2. Alat ukur pH meter</li> <li>3. Diukur pada masing masing blok sampel</li> <li>4. Pengukuran dilakukan saat awal, tengah, dan akhir waktu kontak</li> </ol>

## **G. Tahapan Penelitian**

### **1) Alat dan Bahan**

#### **a. Alat**

- 1) Beaker Glass
- 2) Blender
- 3) Corong
- 4) Gelas Ukur
- 5) Pipet ukur 10 ml
- 6) Pipet ukur 5 ml
- 7) Timbangan
- 8) Pisau
- 9) Saringan plastik
- 10) Batang Pengaduk
- 11) Gelas uji plastik

#### **b. Bahan**

- 1) Daun Binahong (*Anredera Cordifolia*)
- 2) Air keran
- 3) Larutan Etanol 96%
- 4) Kertas saring



c. Tahapan Penelitian

1) Pembuatan Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*).

Modifikasi penelitian (Lestari, 2020):

- a) Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Tahap awal dimulai dengan pembuatan simplisia. Simplisia dibuat dengan cara memilih daun binahong yang sudah tua lalu mencuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Daun binahong dipisahkan dan ditimbang hingga seberat 2 kg. Selanjutnya daun binahong 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 daun binahong.
- b) Simplisia daun binahong dihaluskan menggunakan blender sampai berbentuk serbuk halus, selanjutnya disaring menggunakan kertas saring dan corong saring
- c) Pembuatan ekstrak etanol daun binahong dilakukan dengan metode maserasi, yaitu merendam simplisia daun binahong 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 binahong (*Anredera Cordifolia*) dengan konsentrasi 100 % sebanyak 1 Liter.

## 2) Persiapan Larva *Aedes aegypti*

Subjek yang diteliti adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* hasil pembiakan dari telur yang diperoleh dari Loka Litbang P2B2 Baturaja Sumatera Selatan. Untuk mendapatkan kondisi yang sesuai, telur nyamuk *Aedes aegypti* dipelihara dalam baskom atau nampan plastik dan diberi penutup kain berlubang kecil di atasnya. Setelah larva mencapai stadium larva instar I, kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang berisi makanan ikan (*fish food*). Larva nyamuk *Aedes aegypti* yang telah mencapai stadium larva instar III dipindahkan ke tiap wadah (gelas plastik), Larva yang menjadi sampel dalam penelitian adalah larva *Aedes aegypti* instar III yang berukuran 4-5 mm atau yang berumur 3-4 hari setelah telur menetas. Larva *Aedes aegypti* instar III digunakan karena pada fase ini larva aktif mengkonsumsi makanan di air (Afrindayanti, 2017). Pengambilan larva secara acak, menggunakan pipet kecil/ sendok plastik kemudian dimasukkan ke dalam gelas uji.

## 3) Kematian Larva

Kematian larva nyamuk adalah larva dari *Aedes aegypti* instar III disentuh tidak bergerak dengan kriteria objektif sebagai berikut  
Hidup: Apabila larva disentuh & masih mengalami pergerakan  
Mati : Apabila larva disentuh tidak bergerak (Afrindayanti,2017)

## 4) Konsentrasi Ekstrak

Konsentrasi ekstrak yang digunakan untuk uji kerentanan masing masing sebesar 10%,20%, 30%, 40%, dan 50%. Pengenceran ekstrak dilakukan dengan menggunakan air aquades.

Pengenceran menggunakan rumus:

Untuk mendapatkan Dengan menggunakan rumus pengenceran

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

Keterangan:

- $N_1$  : Konsetrasi ekstrak daun binahong yang tersedia (%)
- $V_1$  : Konsentrasi larutan yang diinginkan (ml)
- $N_2$  : Konsentrasi ekstrak daun binahong yang akan dibuat (%)
- $V_2$  : Volume larutan (air+ekstrak) yang diinginkan (ml)

Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi perlakuan (0% sebagai kontrol, 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%) dilarutkan dengan aquades hingga 100ml

**Tabel 3.6. Formulasi Konsentrasi Ekstrak Daun Binahong**

*(Anredera Cordifolia)*

$N_1$	$V_1$	$N_2$	$V_2 = \frac{V_1 \cdot N_1}{N_2}$	Pengulangan ( $V_2 \times 2$ )
100%	100 ml	10%	10 ml	20 ml
100%	100 ml	20%	20 ml	40 ml
100%	100 ml	30%	30 ml	60 ml
100%	100 ml	40%	40 ml	80 ml
100%	100 ml	50%	50 ml	100 ml
Total			150 ml	300 ml

Perhitungan :

Konsentrasi 10%

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100\% = 100 \text{ ml} \times 10\%$$

$$V_1 = 1000/100$$

$$V_1 = 10 \text{ ml}$$

Konsentrasi 20%

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100\% = 100 \text{ ml} \times 20\%$$

$$V_1 = 2000/100$$

$$V_1 = 20 \text{ ml}$$

Konsentrasi 30 %

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100\% = 100 \text{ ml} \times 30\%$$

$$V_1 = 3000/100$$

$$V_1 = 30 \text{ ml}$$

Konsentrasi 40 %

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100\% = 100 \text{ ml} \times 40\%$$

$$V_1 = 4000/100$$

$$V_1 = 40 \text{ ml}$$

Konsentrasi 50 %

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100\% = 100 \text{ ml} \times 50\%$$

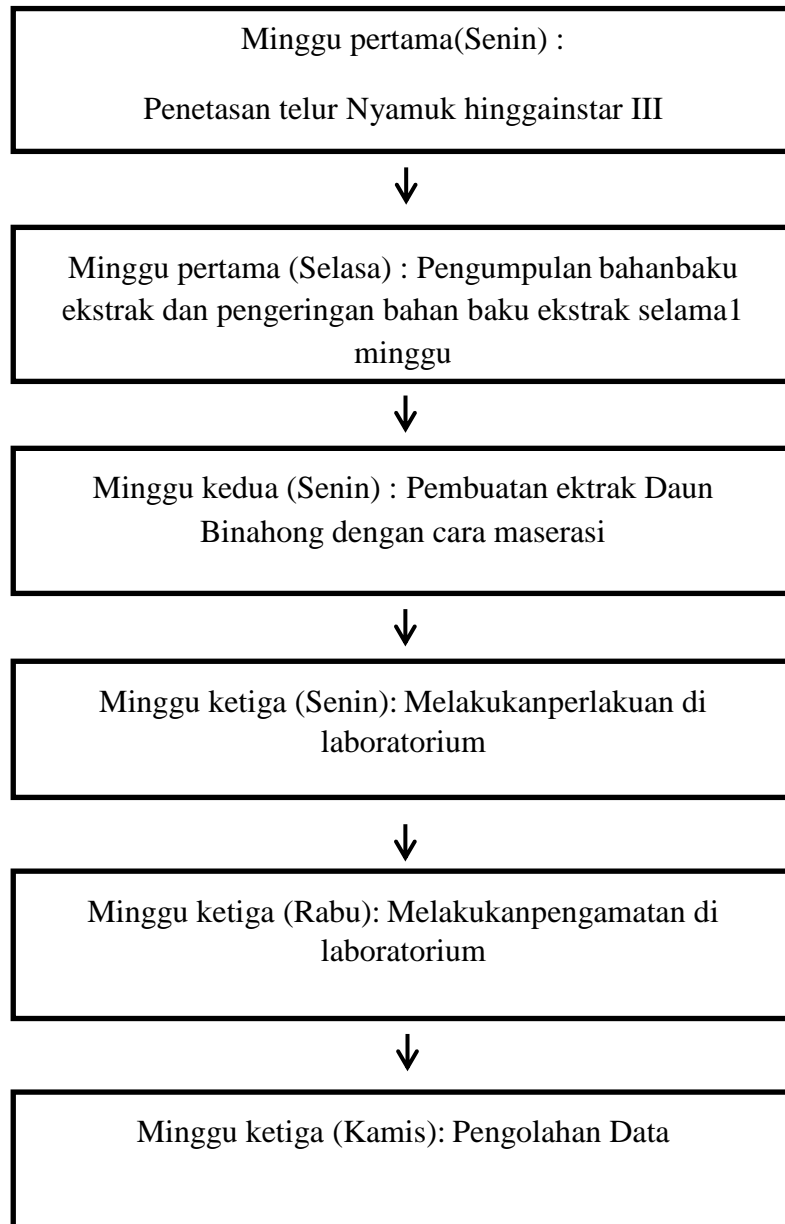
$$V_1 = 5000/100$$

$$V_1 = 50 \text{ ml}$$

#### 5) Posedur Penelitian

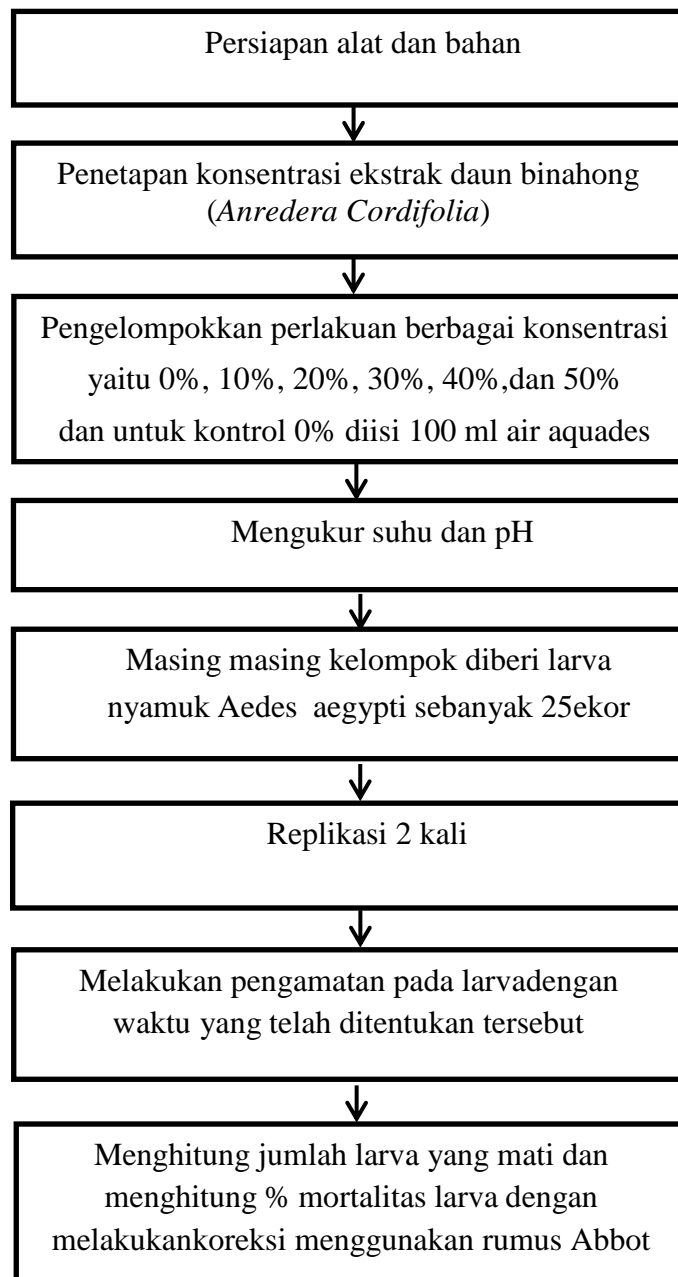
- a) Siapkan 24 gelas uji untuk satu kali pengulangan (20 untuk perlakuan dan 4 untuk non-perlakuan (kontrol))
- b) Ini gelas uji tersebut menggunakan aquades dan ekstrak daun binahong (*Anredera Cordifolia*). Untuk konsentrasi 10% (10 ml ekstrak + 90 ml aquades), konsentrasi 20% (20ml + 80 ml aquades), konsentrasi 30% (30 ml + 70 ml aquades, konsentrasi 40% (40 ml + 60 ml aquades), dan konsentrasi 50% (50 ml + 50 ml aquades), untuk kontrol diisi dengan 100 ml aquades.
- c) Ukur suhu dan pH pada masing masing gelas uji
- d) Masukkan 25 ekor larva *aedes aegypti* pada setiap gelas uji
- e) Setelah itu, amati dan catat kematian larva pada lama waktu kontak 1 jam, 4 jam, 8 jam, dan 12 jam.

## 6) Alur Waktu Penelitian



### 7) Alur Kerja Penelitian

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



## 8) Cara Melakukan Penelitian

### a) Persiapan larva nyamuk *Aedes aegypti*

Subjek penelitian ini adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* hasil pembiakan dari telur yang diperoleh dari Loka Litbang P2B2 Baturaja Sumatera Selatan. Untuk mendapatkan kondisi yang sama telur nyamuk *Aedes aegypti* dipelihara dalam baskom atau nampan plastik. Kemudian larva yang telah mencapai instar I, dimasukkan kedalam wadah yang berisi makan aikan (*Fish food*). Larva nyamuk *Aedes aegypti* yang telah mencapai stadium larva dipindahkan ke tiap wadah (gelas plastik), larva yang digunakan dalam penelitian ini yaitu larva instar III yang berukuran 4-5 mm (Supriyono, 2008 dalam Sarah (2020)

### b. Tahapan Perlakuan

Menggunakan ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) hanya diberikan pada kelompok perlakuan, dan pada kelompok non-perlakuan (kontrol) diberi perlakuan menggunakan aquadest. Setelah dilakukan 24 jam setelah perlakuan dengan menghitung jumlah larva yang mati. Besar sampel pada penelitian ini adalah 25 ekor larva *Aedes aegypti* untuk tiap kelompok dengan pengulangan 2 kali sehingga jumlah larva *Aedes aegypti* yang dibutuhkan 1.200 larva. Kelompok eksperimen dibagi menjadi 6 kelompok, diantaranya 1 kelompok non perlakuan (kontrol) dan 5 kelompok perlakuan dengan berbagai konsentrasi..



## H. 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 pembedulan 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. Analisis Multivariat

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 ( $\alpha$ ) 5% atau 0,05 digunakan pada penelitian ini adalah Two-way ANOVA membandingkan rata-rata perbedaan antara kelompok yang dibagi pada dua variabel bebas (faktor) (konsentrasi ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) dan waktu kontak (1 jam, 4 jam, 8 jam, 12 jam) terhadap 1 satu variabel terikat (Kematian larva *Aedes aegypti*). 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. Pada dasarnya pengujian ini sama dengan pengujian lainnya dengan tujuan yang sama untuk mengetahui variasi dari setiap faktor, hanya langkah pengambilan hasil yang berbeda tergantung dari jumlah sampel dan uji statistik yang akan digunakan

### b. Analisis Uji Toksisitas

Penentuan Lethal Concentration 50 (LC50) digunakan uji toksisitas dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) untuk melihat estimasi besar konsentrasi yang dapat mengakibatkan mortalitas kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* sebesar 50%(LC50).