

BAB III **METODE PENELITIAN**

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas adalah ekstrak metanol daun mangkokan (*Nothopanax scutellarium*) 2% 4,5% 7% 9,5% dan 12% dengan menggunakan 2 kontrol yaitu kontrol positif abate 1% dan kontrol negatif *aquadeast* 100% dan variabel terikat adalah mortalitas larva instar III nyamuk *Anopheles sp.*

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Pelaksanaan penelitian di Laboratorium Parasitologi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis. Pembuatan ekstrak dan determinasi dilakukan di Laboratorium Botani, Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

2. Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei - Juni 2025.

C. Subjek Penelitian

Subjek dari penelitian ini adalah daun mangkokan yang dipetik dari pohon mangkokan di wilayah Bandar Lampung yang bersih dari hama, daun mangkokan (*Nothopanax scutellarium*) yang digunakan sebagai larvasida adalah daun berwana hijau yang masih muda dan tua, selanjutnya ekstrak dibuat dan kemudian dilarutkan pada konsentrasi 2% 4,5% 7% 9,5% dan 12% (pada lampiran 8, gambar 1). Kontrol (+) abate 1% dan Kontrol (-) *aquadeast* 100%. Sampel larva *Anopheles sp* diambil dari tempat tambak terbengkalai di wilayah kerja Puskesmas Hanura, Kec. Teluk Pandan, Kab. Pesawaran (pada lampiran 10, gambar 2).

Masing-masing konsentrasi menggunakan 25 ekor sampel dengan 4x pengulangan, berdasarkan rumus Federer, yaitu:

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

Keterangan :

t : Jumlah perlakuan (treatment)

n : Jumlah pengulangan (repetition)

Diketahui t : 7 (Kontrol Positif, Kontrol Negatif, Konsentrasi ekstrak daun
Mangkokan 2% 4,5% 7% 9,5% dan 12%)

Ditanya : n = ?

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

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

$$(6) (n - 1) \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 21/6$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \geq 4$$

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat	Hasil	Skala
				Ukur	Ukur	
1	Variabel bebas : ekstrak daun mangkokan (<i>Nothopanax scutellarium</i>)	Daun mangkokan (<i>Nothopanax scutellarium</i>) yang berwarna hijau muda dan tua tetapi bukan yang kuning karena yang kuning cenderung tidak efektif, yang diekstrak dengan pelarut metanol dan diencerkan dengan konsentrasi 2% 4,5% 7% 9,5% dan 12%. Kontrol (-), <i>Aquaest</i> kontrol (+) abate (<i>Themepos</i>) yang termasuk golongan organofosfat.	Pengenceran	Labu ukur, batang pengaduk	2%, 4,5%, 7%, 9,5% dan 12%	Rasio Kontrol (-)) <i>aquadest</i> 100%
2.	Variabel terikat: mortalitas larva nyamuk <i>Anopheles sp</i>	Variabel terikat: jumlah kematian larva nyamuk <i>Anopheles sp</i>	Observasi	Visual	ekor	Nominal

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Prosedur penelitian
 - a. Pembuatan perizinan dari Poltekkes Tanjungkarang
Surat perizinan pengambilan larva di Puskesmas Hanura, Kec. Teluk Pandan, Kab. Pesawaran dari Poltekkes Tanjungkarang (lampiran 15)
 - b. Determinasi bahan uji daun mangkokan (*Nothopanax scutellarium*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung (lampiran 13).
 - c. Pembuatan Simplisia dengan menyiapkan daun mangkokan (*Nothopanax scutellarium*) kemudian dibersihkan menggunakan air mengalir. Keringkan daun di bawah sinar matahari secara tidak langsung yaitu dengan penutup kain hitam Hasil pengeringan ini disebut simplisia (Handoyo 2020) (lampiran 8, gambar 3 dan 4)
 - d. Pembuatan ekstrak daun mangkokan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Univeritas Lampung dengan cara mengekstraksi simplisia daun mangkokan menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol (lampiran 9, gambar 1,2, dan 3).
 - e. Uji Fitokimia
Uji fitokimia dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung untuk mengkonfirmasi keadaan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak daun mangkokan yang mengandung flavonoid, saponin, tanin, dan alkaloid (Kurniawan, 2018) (lampiran 9, gambar 4).
 - f. Pembuatan konsentrasi uji ekstrak metanol daun Mangkokan pada konsentrasi 2% 4,5% 7% 9,5% dan 12% dengan menggunakan rumus pengenceran $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ (lampiran 11, gambar 1).
 - g. Pengambilan sampel larva adalah dengan melakukan pencidukan kemudian di cek kembali dengan mikroskop untuk memastikan bahwa larva nyamuk *Anopheles* sudah menjadi larva instar III memiliki panjang 5mm, duri-duri (spinae) pada bagian dada yang mulai tampak jelas, corong pernafasan berwarna coklat kehitaman, memiliki 8 segmen (lampiran 10, gambar 4).

h. Uji efektifitas ekstrak metanol daun mangkokan dengan konsentrasi 2% 4,5% 7% 9,5% dan 12% dengan cara memasukkan larva ke dalam cawan petri yang telah diisi dengan berbagai konsentrasi. Data yang dikumpulkan adalah dengan menghitung mortalitas larva nyamuk di setiap wadah. Perhitungan mortalitas larva dilakukan setiap menit ke 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480, dan 1440 di masing-masing konsentrasi. Kontrol negatif adalah *aquadest* 100 ml dan kontrol positif berupa abate 1% (lampiran 11, gambar 2).

2. Cara Kerja

a. Persiapan alat dan bahan

- 1) Alat penelitian yang digunakan adalah beaker glass 200ml, labu ukur 50ml, objek glass, *deck glass*, *evaporator*, mikroskop, cawan petri, batang pengaduk, pipet volume, *stopwatch*, corong gelas, dan label.
- 2) Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol, air suling, bubuk abate, daun mangkokan, dan larva instar III nyamuk *Anopheles sp.*

b. Pembuatan Simplisia

Simplisia yang digunakan adalah daun mangkokan berwarna hijau yang masih muda dan tua (Ahdiyah, 2015) sebanyak 2kg. Daun mangkokan yang sudah diambil kemudian dicuci sampai bersih dengan air mengalir untuk menghindari kotoran tanah dan kotoran lainnya lalu dipotong kecil kecil (pada lampiran 8, gambar 2). Selanjutnya daun mangkokan dikeringkan dengan menutupnya menggunakan kain hitam dan menjemurnya dibawah sinar matahari secara tidak langsung selama 7 hari (pada lampiran 8, gambar 3). Setelah kering, daun tersebut dihaluskan dengan *blender* hingga menjadi bentuk serbuk yang disebut dengan simplisia (pada lampiran 8, gambar 4). Serbuk ini kemudian ditimbang sebanyak 500 gram lalu disimpan dalam wadah yang kering dan siap di ekstraksi (Pamungkas, 2023).

c. Pembuatan Ekstrak Metanol daun Mangkokan

Ekstrak ini dibuat dengan menerapkan metode yang telah digunakan (Putri, 2022).

- 1) Siapkan Beaker Glass 5000ml.
- 2) Simplisia daun Mangkokan (*Nothopanax scutellarium*) ditimbang sebanyak 500 gram kemudian dimasukkan kedalam beaker glass.
- 3) Selanjutnya rendam dengan pelarut metanol sebanyak 5000 ml hingga keseluruhan terendam dengan sempurna (lampiran 9, gambar 1).
- 4) Simplisia dimaserasi selama 3x24 jam dan sesekali diaduk.
- 5) Setelah dimaserasi 3 hari, saring hingga maserat atau ekstrak dicapai (pada lampiran 9, gambar 2).
- 6) Ekstrak dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada kecepatan 60 rpm dan suhu 40°C hingga menghasilkan ekstrak kental (pada lampiran 9, gambar 3).
- 7) Disimpan ekstrak dalam gelas beaker yang steril, bersih, dan kering lalu diletakkan di dalam kulkas dengan suhu 2-8°C.

d. Pembuatan konsentrasi uji

- 1) Ekstrak daun Mangkokan yang sudah dikentalkan dengan *evaporator* lalu akan diencerkan dengan konsentrasi yang sudah di tetapkan.
- 2) Pipet ekstrak sebanyak 1ml, 2,25ml, 3,5ml, 4,75ml, dan 6ml lalu dimasukkan kedalam labu ukur 50ml.
- 3) Setelah itu diencerkan dengan cara di tambahkan *aquadest* sampai dengan batas garis atas atau sampai volume 50ml.
- 4) Lalu ekstrak dengan yang sudah diencerkan di masukkan kedalam masing-masing cawan petri berbeda sesuai dengan konsentrasi yang akan dibuat (Fitriya, 2018) (pada lampiran 11, gambar 2).
- 5) Encerkan ekstrak menggunakan *aquadest* steril dengan varian konsentrasi 2% 4,5% 7% 9,5% dan 12% menggunakan *aquadest* steril dan menggunakan rumus pengenceran:
(Nurhaifah, 2015)

$$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$$

Keterangan:

V_1 = Volume larutan yang akan dipipet (ml)

$\%_1$ = Konsentrasi larutan uji (100%)

V_2 = Volume larutan uji yang akan dibuat dengan *aquadest* steril

$\%_2$ = Konsentrasi yang akan dibuat (%)

e. Penyediaan larva *Anopheles sp*

Penelitian menggunakan larva *Anopheles sp.* yang diperoleh dari tambak terbengkalai di wilayah kerja Pesawaran, Provinsi Lampung yang merupakan wilayah endemik malaria sebagai vektor utama, larva diperoleh dengan gayung bertangkai panjang dan ditampung dengan drum (Dinas Kesehatan Kabupaten Lampung Selatan, 2017).

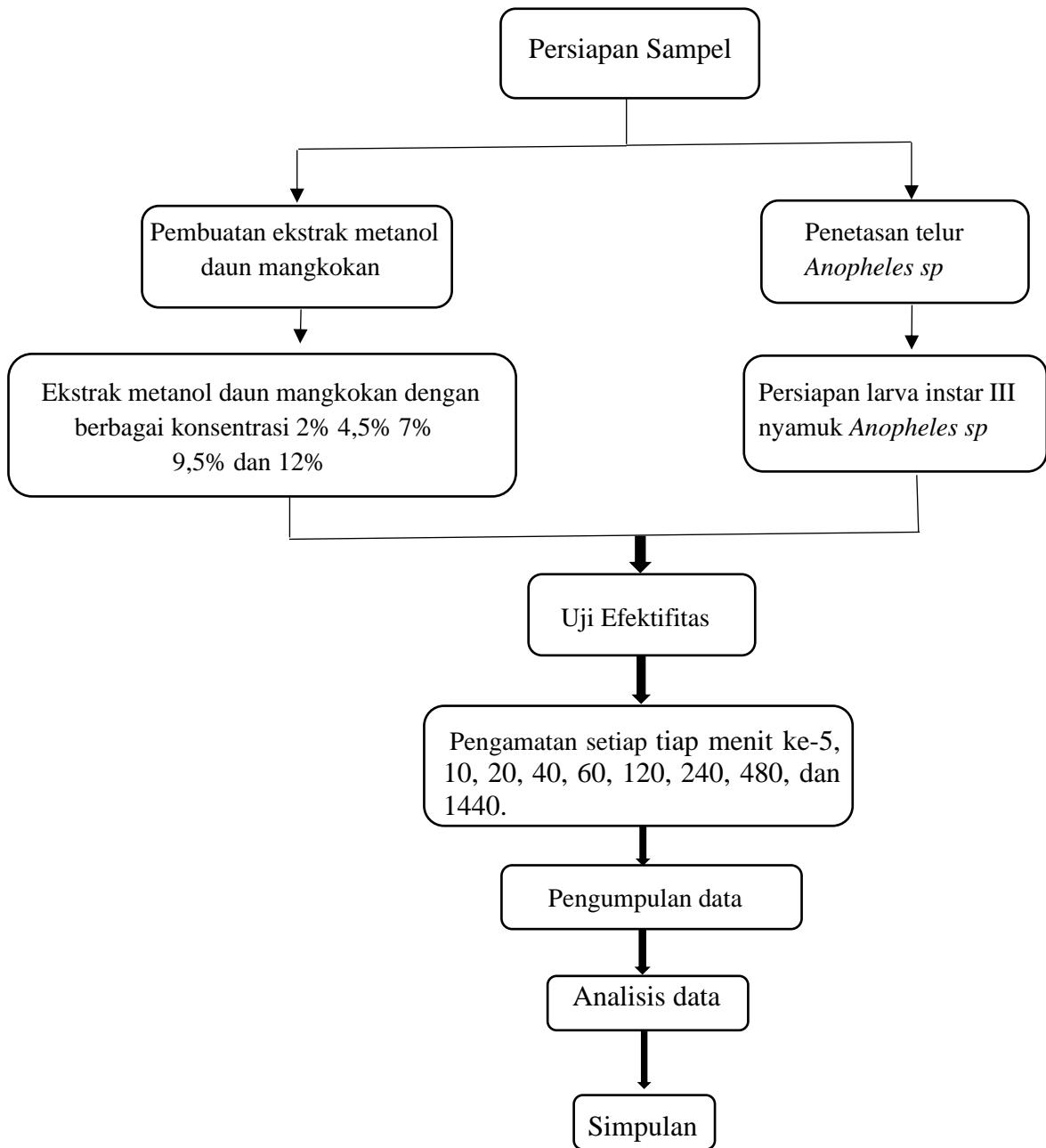
Larva diperiksa secara mikroskopis sebelum dilakukan penelitian;

- 1) Pada *objek glass* letakkan larva kemudian ditutup *deck glass* dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 4 x 10 (pada lampiran 10, gambar 3).
- 2) Karakteristik larva instar III nyamuk *Anopheles sp* : mulai terlihat jelas duri *thorax*, memiliki 8 segmen, dengan pergerakan sangat aktif dalam media air, larva instar III ini siap digunakan (lampiran 10, gambar 4).

f. Uji efektifitas konsentrasi dan uji waktu optimum

- 1) Disiapkan 7 cawan petri, masing-masing diisi 50ml ekstrak metanol daun mangkokan dengan konsentrasi yang telah ditetapkan.
- 2) Dibuat kontrol negatif dengan mengisi satu cawan petri menggunakan 50 ml aquades.
- 3) Dibuat kontrol positif dengan mengisi satu cawan petri menggunakan 1 gram bubuk abate dalam 50 ml aquades.
- 4) Diambil dan dipindahkan sebanyak 25 ekor larva *Anopheles sp* ke masing-masing cawan petri yang berisi ekstrak metanol daun mangkokan yang telah diencerkan pada setiap konsentrasi (lampiran 11, gambar 2).
- 5) Dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali dengan waktu pengamatan setiap menit ke-5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480, dan 1440. (WHO, 2005).

3. Alur Penelitian



F. Pengolahan Data dan Analisis Data

Data mortalitas larva nyamuk *Anopheles sp* yang diperoleh kemudian dihitung untuk mengetahui rata-rata persentase mortalitas larva nyamuk pada masing-masing perlakuan konsentrasi dan pada waktu kontak dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kematian (\%)} = \frac{X}{N} \times 100\%$$

(Yuniarty, 2016).

Keterangan: X = Jumlah larva mati

N = Jumlah keseluruhan larva

Data mortalitas dianalisis menggunakan *Analysis Of Variances (ANOVA)* untuk mengidentifikasi perbedaan jumlah mortalitas larva. Jika uji *One-Way ANOVA* menunjukkan perbedaan yang signifikan, maka analisis dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc LSD*.