

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian adalah eksperimental dan dengan Rancangan Acak Lengkap. Variabel bebas yaitu fraksi kulit pisang kepok (*Musa x paradisiaca L.*) dan variabel terikat yaitu larva nyamuk *Anopheles sp.*

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Pembuatan dan Uji Efektivitas biolarvasida fraksi etanol kulit pisang kepok (*Musa x paradisiaca L.*) terhadap *Anopheles sp.* dilakukan di Laboratorium Parasitologi Poltekkes Tanjungkarang Jurusan Teknologi Laboratorium Medis. Pemeriksaan potensi senyawa metabolit skunder dengan GCMS dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran.

2. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Maret-Mei 2023

C. Subjek Penelitian

Subjek dari penelitian ini adalah kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca L.*) kemudian dilakukan fraksinasi lalu diambil fraksi etanolnya setelah itu diencerkan dalam konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%.

1. Kriteria Kulit Pisang Kepok

Kulit pisang yang digunakan adalah limbah kulit pisang kepok lampung varietas *Musa paradisiaca L.* berwarna hijau, segar, tidak ada indikasi busuk yang ditandai dengan perubahan warna menjadi coklat dan sudah dibersihkan dari kotoran seperti getahnya.

2. Kriteria Larva Instar III Nyamuk *Anopheles sp.*

Larva yang digunakan adalah larva instar III *Anopheles sp.* hasil pencarian langsung di daerah endemis provinsi Lampung (Hanura) dengan ciri-ciri memiliki ukuran 3-4 mm, tidak memiliki siphon, bagian ekor berbentuk palmate seta dengan filamen sama panjang, tubuh berwarna coklat kehitaman, dan posisi larva sejajar permukaan air.

Besar sampel pada penelitian ini adalah 10 ekor di setiap konsentrasi dengan 3 kali pengulangan berdasarkan rumus Federeer, yaitu:

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

Keterangan:

t: Perlakuan n: Pengulangan

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

$$(10-1)(n-1) \geq 15$$

$$(9)(n-1) \geq 15$$

$$9n \geq 14 + 9$$

$$n \geq 23/9$$

$$n \geq 2,5 \text{ (3 kali pengulangan)}$$

D. Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel	Sub Variabel	Definisi	Metode	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Bebas Fraksi etanol kulit pisang kepok (<i>Musa paradisia ca L.</i>)	Konsentrasi	Kulit pisang kepok dengan kriteria berwarna hijau, segar, dan sudah dibersihkan yang di fraksinasi dengan etanol 96% lalu dan diencerkan dengan konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%.	Dengan metode fraksinasi	Botol reagen, corong gelas, corong pisah, Erlenmeyer, dan kertas saring	Persen (%)	Rasio
		Perhitungan LC50	<i>Lethal Concentration</i> 50 adalah metode perhitungan untuk mengetahui berapa konsentrasi minimal yang dapat membunuh lebih dari 50% larva	SPSS	Probit	E (Estimasi %)	Rasio
		Perhitungan LT50	<i>Lethal Time</i> 50 adalah perhitungan untuk mengetahui berapa waktu minimal yang dapat membunuh lebih dari 50% larva	SPSS	Probit	E (Estimasi jam)	Rasio

	Analisa senyawa metabolit skunder dengan GCMS	GCMS (<i>Gas Chromatography and Mass Spectroscopy</i>) adalah alat yang digunakan untuk mengetahui apa jenis dan berapa banyak senyawa metabolit skunder yang bersifat toksik di dalam sampel	Identifikasi dan perhitungan dengan memisahkan senyawa metabolit skunder dengan bantuan gas seperti nitrogen	GCMS	Senyawa metabolit skunder hasil perhitungan dan identifikasi	Rasio
2	Terikat Larva nyamuk <i>Anopheles sp.</i>	Kematian Jumlah larva instar III nyamuk <i>Anopheles sp.</i> dengan ciri-ciri memiliki ukuran 3-4 mm, tidak memiliki siphon, bagian ekor berbentuk palmate seta dengan filamen sama panjang, tubuh berwarna coklat kehitaman, dan posisi larva sejajar permukaan air yang tidak menunjukkan pergerakan/mati	Mengamati jumlah larva yang mati tiap 2 jam sekali di setiap konsentrasi selama 12 jam	Visual secara makroskopis	Jumlah kematian larva instar III nyamuk <i>Anopheles sp.</i>	Rasio

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Prosedur Penelitian

- a. Pembuatan surat izin penelitian dari Poltekkes Tanjungkarang.
- b. Uji Determinasi kulit pisang kepok ke laboratorium FMIPA Biologi Unila
- c. Pembuatan simplisia dengan menyiapkan kulit pisang kepok yang sesuai, kemudian kulit pisang kepok dicuci lalu dijemur di bawah sinar matahari secara tidak langsung atau ditutup dengan kain hitam hingga kering.
- d. Pembuatan ekstrak kulit pisang kepok di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang
- e. Pembuatan Fraksi Etanol-Air kulit pisang kepok
- f. Pembuatan konsentrasi bahan uji fraksi etanol kulit pisang kepok 100% yang sudah dievaporasi lalu diencerkan menjadi konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10%.
- g. Penyediaan sampel larva dengan mencari larva instar III *Anopheles sp.* di wilayah endemis malaria lampung dilengkapi dengan Uji Salinitas dan

Uji pH air.

- h. Uji Identifikasi larva nyamuk yang telah diambil dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang.
- i. Uji efektivitas toksisitas fraksi etanol kulit pisang kepok dengan fraksi etanol-air dengan konsentrasi 1%-10% dengan kontrol negatif aquadest dan kontrol positif berupa abate 0,01%.
- j. Data yang dikumpulkan adalah dengan menghitung jumlah larva *Anopheles sp.* yang mati di setiap kontainer. Perhitungan larva yang mati dilakukan setiap 2 jam selama 12 jam pada masing-masing konsentrasi fraksi etanol kulit pisang kepok.
- k. Uji GCMS fraksi etanol kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca L.*) untuk mengetahui senyawa metabolit skunder khas kulit pisang yang bersifat toksik terhadap larva *Anopheles sp.* dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran.
- l. Analisis data dengan menggunakan SPSS.

2. Cara Kerja

a. Persiapan Alat dan Bahan

- 1) Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *trash bag* hitam, aluminium foil, oven, labu ukur, pipet tetes, pipet ukur, cover glass, objek glass, botol reagen berwarna gelap, *rotatory evaporator*, GCMS, cawan petri.
- 2) Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, kulit pisang kepok, etanol, dan larva nyamuk *Anopheles sp.*

b. Uji Determinasi Kulit Pisang Kepok Uji determinasi adalah uji untuk mengetahui kebenaran identitas spesies tersebut apakah sesuai dengan identitas yang diinginkan dilakukan di Lab Botani FMIPA Unila

c. Pembuatan Simplisia

Limbah kulit pisang kepok yang berwarna hijau sebanyak 3 kg, kemudian dicuci dengan air mengalir untuk dihilangkan kotorannya dan tiriskan. Selanjutnya dipotong kecil kecil kurang lebih 0,5 cm X 0,5 cm dan dikeringkan di atas *trash bag*. Simplisia yang telah kering kemudian

dioven sebentar untuk memastikan agar tidak ada bagian yang masih lembab. Simplisia yang telah kering lalu diserbuk dan disimpan dalam wadah kering.

d. Pembuatan Ekstrak Kulit Pisang Kepok Metode Fraksinasi

- 1) Gelas ukur dengan volume 2000 ml disiapkan untuk pembuatan ekstrak.
- 2) Masukkan 500 gram simplisia halus ke dalam botol berwarna gelap, lalu tambahkan larutan etanol 96% sebanyak 1000 ml dan diamkan selama lima hari dengan pengadukan selama duabelas jam sekali setiap hari, lalu dipisahkan antara endapan dan filtratnya dengan kertas saring (maserat).
- 3) Kemudian diuapkan menggunakan evaporator hingga ekstrak kental, setelah itu ekstrak diuapkan kembali dengan suhu 60°C (BPOM RI, 2010).
- 4) Setelah itu dilakukan Fraksinasi dengan cara ekstrak etanol pekat ditambahkan n-heksan dengan perbandingan 1:1. Setelah itu dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian kocok perlahan-lahan. Jika terdapat gas di corong pisah, buang gas terlebih dahulu. Kemudian didiamkan hingga terjadi pemisahan. Lalu pisahkan komponen-komponen beda fasanya (fraksi N-Heksan dan fraksi residu ekstrak). Lalu fraksi residu ekstrak ditambah dengan etil asetat dan aquadest dengan perbandingan 1:1. Lakukan cara yang sama untuk mendapatkan fraksi etil asetat dan fraksi etanol+aquadest.
- 5) Kemudian didapatkan fraksi etanol yang selanjutnya diuapkan.

- e. Lalu fraksi etanol kental diencerkan aquades sampai konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10% menggunakan aquadest dengan rumus pengenceran:

$$V1 \times \%1 = V2 \times \%2$$

Keterangan:

V1 = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

%1 = Konsentrasi larutan uji (100%)

V2 = Volume larutan uji yang akan dibuat dengan aquadest (ml)

%2 = Konsentrasi yang akan dibuatn (%)

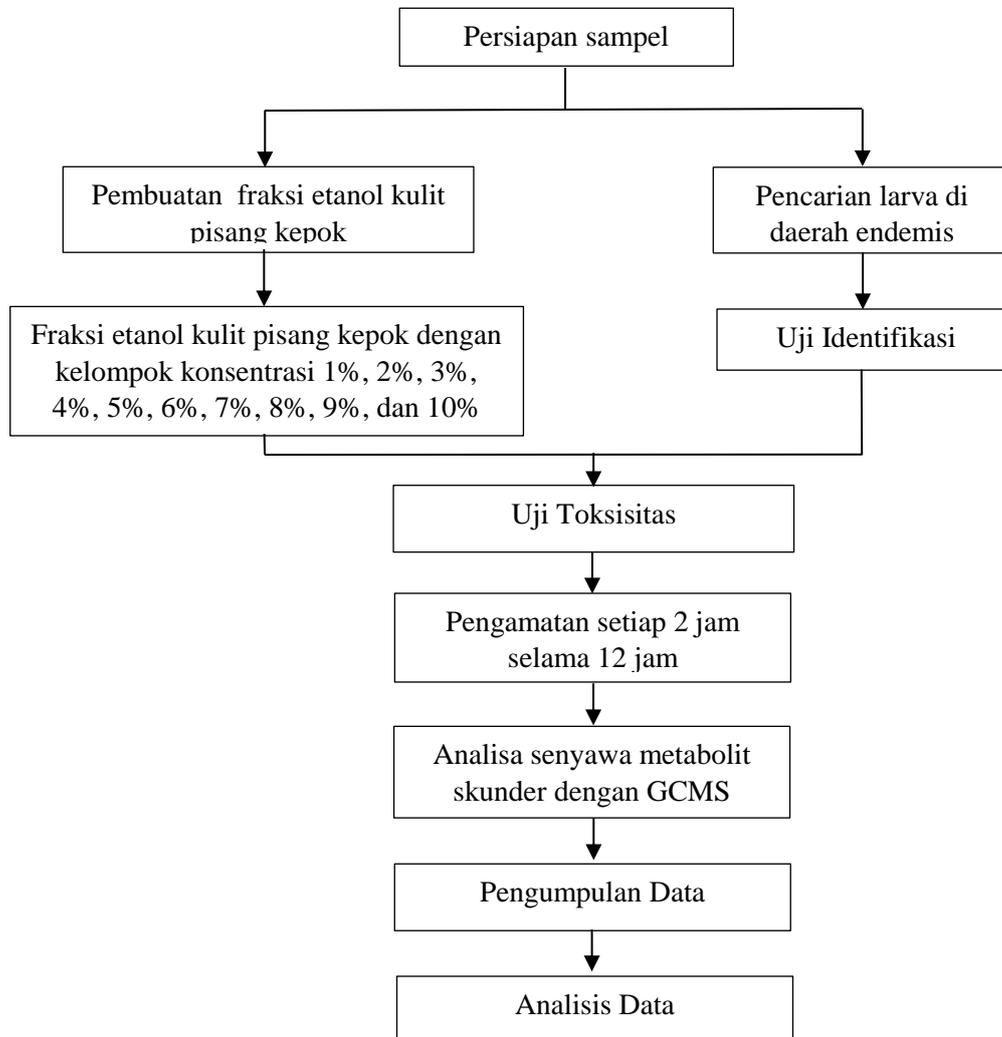
- f. Penyediaan dan identifikasi Larva *Anopheles sp.* Larva nyamuk *Anopheles*

- sp.* diperoleh langsung dari pencarian di daerah endemis Provinsi Lampung.
- g. Sebelum diuji efektifitas toksisitas dilakukan uji identifikasi salah satu larva secara mikroskopis dengan cara:
- 1) Diletakkan larva di objek glass lalu ditutup dengan deck glass
 - 2) Diperiksa larva di bawah mikroskop perbesaran 4 X 10
 - 3) Ciri-ciri larva instar III nyamuk *Anopheles sp.*: tidak memiliki siphon, badan coklat kehitaman, dan pergerakan aktif di permukaan air.
- h. Uji Efektivitas
- 1) Menyiapkan 10 cawan petri tak bertutup diisi 15ml fraksi etanol kulit pisang kepok yang telah dilarutkan dengan aquadest dengan konsentrasi yang berbeda-beda.
 - 2) Membuat kontrol negatif dengan mengisi satu cawan petri menggunakan 15 ml aquades.
 - 3) Membuat kontrol positif dengan mengisi satu cawan petri menggunakan 0,01 gram bubuk abate dalam 15 ml aquades
 - 4) Mengambil sebanyak 10 ekor *Anopheles sp.* dan dipindahkan ke masing-masing cawan petri yang berisi fraksi etanol kulit pisang kepok yang telah diencerkan pada setiap konsentrasi.
 - 5) Dilakukan pengamatan dengan menghitung jumlah kematian larva *Anopheles sp.* dengan waktu pengamatan setiap 2 jam selama 12 jam.
- i. Uji GCMS untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder bersifat toksik terhadap larva nyamuk *Anopheles sp.* dalam fraksi etanol kulit pisang kepok dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran:
- 1) Pelarut diinjeksi sebanyak 2 μ L ke dalam kolom, lalu puncak pelarut akan muncul dalam waktu kurang dari 1 menit bila aliran gas pembawa dan pemanasan sempurna.
 - 2) Setelah pena kembali ke nol, kemudian diinjeksikan 5 μ L campuran standar, bila semua puncak telah keluar kemudian diinjeksikan 5 μ L sampel.
 - 3) Alat GCMS akan melakukan analisis waktu retensi dan puncak masing-masing komponen kemudian membandingkan waktu retensinya dengan standar hal ini dilakukan untuk mendapatkan informasi mengenai jenis

dari senyawa metabolit skunder dalam sampel (Utami, 2016).

j. Semua perlakuan diatas diulangi sebanyak 3 kali (Riski, 2017).

3. Alur Penelitian



F. Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan aplikasi SPSS menggunakan Analisis Correlation untuk menentukan hubungan pelarut dengan jumlah kematian larva. Selanjutnya untuk menentukan konsentrasi yang paling efektif menggunakan LC50 (median letal konsentrasi) dan waktu yang paling efektif menggunakan LT50 (median letal time) bahan uji yang dapat memberantas stadium infektif penyebab malaria dihitung dengan menggunakan program komputer SPSS Analisa Probit (Rumampuk, 2010)

G. Ethical Clearance

Limbah yang dihasilkan dari proses penelitian ini akan dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah oleh karena itulah penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan. Limbah larutan konsentrasi fraksi kulit pisang kepok dari cawan petri pengujian akan langsung dibuang ke saluran pembuangan karena tidak membahayakan lingkungan. Sementara untuk sisa larva nyamuk *Anopheles sp.* akan dikubur atau ditimbun ke dalam tanah.