

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini berjenis eksperimental dan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebasnya yaitu fraksi n-heksana dari ekstrak daun tomat (*Solanum lycopersicum L.*) dengan berbagai konsentrasi yaitu 1,2%, 1,5%, 2%, dan 2,5%, kontrol positif (*abate*) dan kontrol negatif (aquadest). Variabel terikat yang diteliti adalah angka kematian larva *Aedes aegypti*, setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali.

B. Lokasi Dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang Jurusan Teknologi Laboratorium Medis. Uji Determinasi daun tomat. Pembuatan ekstrak dan fraksinasi dilakukan di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung.

2. Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret – Mei 2024.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah Daun tomat yang diambil dari Perkebunan di daerah Kecamatan Way Tenong Lampung Barat. Lalu difraksinasi dan dipilih fraksi n-Heksan, kemudian diencerkan dalam konsentrasinya 1,2%, 1,5%, 2%, dan 2,5%.

1. Kriteria Daun Tomat

Daun yang berukuran kecil biasanya tumbuh 1-2 daun di antara daun yang berukuran besar. Tipe daun berselang seling atau tersusun spiral mengelilingi batang tanaman (Vina, 2016).

2. Kriteria Larva Instar III Nyamuk *Aedes aegypti*

Larva *Aedes aegypti* instar III yang digunakan adalah hasil penetasan telur yang diperoleh dari Balai Litbang Kesehatan Baturaja. Larva instar III memiliki ukuran 4-5mm, terlihat duri dada dan corong pernapasannya memiliki warna hitam kecoklatan. Instar ini mempunyai sifon yang besar, adanya gigi sisir di segmen abdomen kedelapan terjadi mengganti kulit selama 3-4 hari.

Besar sampel pada penelitian ini adalah 25 ekor disetiap konsentrasi dengan 5 kali pengulangan berdasarkan rumus Federer, yaitu :

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

Keterangan :

t = Jumlah Perlakuan (repetition)

n = Jumlah Pengulangan (treatment)

Diketahui: t = Ekstrak n-Heksan daun tomat perlakuan (1,2%, 1,5%, 2%,2,5%)

n = ?

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

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$(3)(n-1) \geq 15$$

$$3n \geq 15$$

$$n \geq 15/3$$

$$n \geq 5$$

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3. 3 Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Variabel bebas : a) ekstrak n- Heksan daun tomat (<i>Sollanum lycopersicum L.</i>)	Daun tomat (<i>Solanum lycopersicum L.</i>) yang dipetik langsung dari pohonnya dengan keadaan daun berwarna hijau segar dan harus terbebas dari hama, yang di ekstrak menggunakan ethanol 96% dan dilakukan fraksinasi dengan lar. n-Heksan lalu diencerkan dengan konsentrasi 1,2%, 1,5%, 2%, 2,5%.	Pengenceran	Botol reagen, corong gelas, erlenmeyer, batang pengaduk, dan kertas saring.	Konsentrasi 1,2%, 1,5%, 2% 2,5%. Kontrol positif (+) Abate 1 gram (Temephos 1%) kontrol negatif (-) aquadest	Rasio
2	Variabel bebas: waktu kontak bahan aktif daun tomat (<i>Sollanum lycopersicum L.</i>) dengan larva nyamuk (<i>Aedes aegypti</i> hingga menimbulkan mortalitas dengan rentang waktu pengamatan 2 sampai 12 jam.	Waktu kontak antara bahan aktif ekstrak n- Heksan daun tomat (<i>Sollanum lycopersicum L.</i>) dengan larva nyamuk (<i>Aedes aegypti</i> hingga menimbulkan mortalitas dengan rentang waktu pengamatan 2 sampai 12 jam.	Observasi	Visual dan stopwatch	2 jam 4 jam 6 jam 8 jam 10 jam 12 jam	Rasio
3	Variabel terikat kematian larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	Jumlah larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i> yang tidak menunjukkan pergerakan, untuk meyakinkan larva mati atau tidak bisa dengan memutar gelas plastik perlahan – lahan apabila larva nyamuk tidak dapat bergerak dan terguling ketika gelas plastik diputar perlahan maka nyamuk dikategorikan mati.	Observasi	Visual	Jumlah larva (ekor)	Nominal

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Prosedur penelitian

- a) Membuat surat izin dari Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang. Membuat surat izin untuk memesan telur di Balai Litbang Kesehatan Baturaja dari Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
 - b) Uji Determinasi Daun Tomat. Uji determinasi yaitu pengujian guna melihat validitas identitas spesies untuk penentuan kesesuaian identitas yang diharapkan dilaksanakan di Laboratorium Botani FMIPA Unila
 - c) Membuat simplisia dengan menyiapkan daun tomat, kemudian dilakukan pencucian dan penjemuran di bawah sinar matahari secara tidak langsung atau dibungkus menggunakan kain hitam sampai kering, hasilnya dinamakan simplisia.
 - d) Membuat ekstrak daun tomat di Laboratorium Botani Fakultas Mipa Universitas Lampung yang memproses ekstraksi 700 gram simplisia daun tomat melalui maserasi dengan pelarut ethanol.
- e. Pembuatan konsentrasi bahan uji
1. Larutan ekstrak daun tomat 100% yang sudah dipekatkan lalu difraksinasi dengan metode ekstraksi cair- cair, yaitu proses memisahkan sejumlah bahan dari sebuah benda padat ataupun cair dengan pelarut cair sebagai agen pemisah
 2. Rumus pengenceran ekstrak n-Heksan daun tomat yaitu:

$$V_1 \times \%1 = V_2 \times \%2.$$
- f. Menyediakan sampel larva melalui telur nyamuk *Aedes aegypti* yang menetas jadi larva.
- g. Uji efektivitas ekstrak n-Heksan dari daun tomat dengan berbagai konsentrasi terhadap larva *Aedes aegypti*. Konsentrasi yang digunakan adalah 1,2%, 1,5%, 2%, dan 2,5%. Larva ditempatkan dalam gelas plastik yang berisi berbagai konsentrasi ekstrak tersebut. Data yang dikumpulkan adalah dengan menghitung jumlah larva *Aedes aegypti* yang mati di setiap konsentrasi dilakukan setiap 2 jam selama 12 jam pada masing-masing konsentrasi ekstrak n-Heksan daun tomat, kontrol positif abate, dan kontrol negatif aquadest 100 ml.

2. Cara kerja

a. Persiapan alat dan bahan

1. Alat yang digunakan dalam penelitian sebagai berikut :
labu ukur, beaker glass, kertas saring, objek glass, toples kaca, evaporator, mikroskop, gelas plastik, gelas ukur, sendok plastik, corong pisah, cawan penguap, tangas air, batang pengaduk.
2. Bahan yang digunakan dalam penelitian sebagai berikut :
aquadest, bubuk abate, daun tomat, etanol 96%, n-Heksan, dan larva instar III nyamuk *Aedes aegypti*.

b. Pembuatan Simplisia

Daun tomat dicuci hingga bersih, dikeringkan dengan tissue, dan dipotong menjadi potongan kecil. Kemudian, daun tomat ditimbang sebanyak 6 kilogram, dan kemudian ditutup dengan kain hitam dan dijemur secara tidak langsung di bawah sinar matahari. 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 (Handoyo *et al.*, 2020).

c. Pembuatan Ekstrak Daun Tomat (*Sollanum lycopersicum L.*)

1. Siapkan gelas ukur dengan volume 1000 ml untuk pembuatan ekstrak.
2. 700 gram simplisia yang telah halus dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap, ditambahkan larutan etanol 96% dan didiamkan selama 3 x 24 jam Setelah di maserasi kemudian di saring hingga didapatkan maserat 1.
3. Endapan direndam kembali dengan etanol 96% kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring (maserat 2).
4. Maserat 1 dan maserat 2 dicampur dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator selama 4 jam dengan kecepatan 60 rpm suhu 50°C hingga dihasilkan ekstrak pekat daun tomat 100%.
5. Ekstrak kemudian disimpan pada wadah berbahan gelas yang steril, bersih, dan kering (Setyaningrum, 2019).

d. Proses fraksinasi dan variasi konsentrasi Ekstrak n-Heksan Daun Tomat (*Sollanum lycopersicum L.*)

1. Ekstrak pekat ethanol 96% daun tomat selanjutnya di fraksinasi dengan menggunakan 100 ml ekstrak daun tomat dan 100 ml n-Heksana dengan perbandingan 1 : 1.
2. Dimasukkan kedalam corong pisah, dikocok perlahan-lahan, jika terdapat gas di corong pisah buang gas terlebih dahulu.
3. Biarkan campuran tersebut dibiarkan sampai terjadi pemisahan antara ekstrak dengan pelarut n-Heksan. Tahap ini menghasilkan filtrat dan residu.
4. Senyawa yang tidak larut pada pelarut n-Heksan (residu) dimasukkan Kembali ke dalam corong pisah dan ditambahkan n-Heksan dengan perbandingan yang sama pada tahap pertama.
5. Lapisan n-Heksan dikeluarkan dari corong pisah dan ditampung dalam gelas kimia lain.
6. Proses ini dapat diulangi beberapa kali dengan menggunakan pelarut yang berbeda untuk memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang berbeda.
7. Fraksinasi n-Heksan dilakukan berkali-kali hingga jernih, kemudian diuapkan di Waterbath (Yelvita, 2022).
8. Ekstrak diencerkan dengan varian konsentrasi 1,2%, 1,5%, 2% , dan 2,5% menggunakan rumus pengenceran :
(Manu, 2013)

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

Keterangan :

V1 = Volume larutan uji yang dipipet

%1 = Konsentrasi larutan uji (100%)

V2 = Volume larutan uji yang akan dibuat dengan aquadest steril

%2 = Konsentrasi yang akan dibuat (%)

d. Penyediaan larva *Aedes aegypti*

Telur nyamuk *Aedes aegypti* diperoleh dari Balai Litbang Kesehatan Baturaja. Telur ditetaskan dalam nampan plastik yang dipenuhi dengan air bersih. Telur menetas menjadi larva dan diberi ati ayam yang sudah direbus dan dihancurkan sampai halus. Dalam dua hari, telur berubah menjadi larva instar 1, kemudian

menjadi larva instar II, dan kemudian menjadi larva instar III. Sebelum digunakan, salah satu larva diperiksa secara mikroskopis.dengan cara :

1. Larva diletakkan di objek glass, lalu ditutup deck glass dan diperiksa di bawah mikroskop perbesaran 4 x 10.

Ciri-ciri larva instar III nyamuk *Aedes aegypti* : Larva instar III berukuran 4-5 mm, duri-duri dada mulai jelas dan corong pernapasan berwarna coklat kehitaman. Pada instar III ini memiliki sifon yang gemuk, gigi sisir pada segmen abdomen ke-8 mengalami pergantian kulit dan berlangsung 3-4 hari, larva instar III siap digunakan.

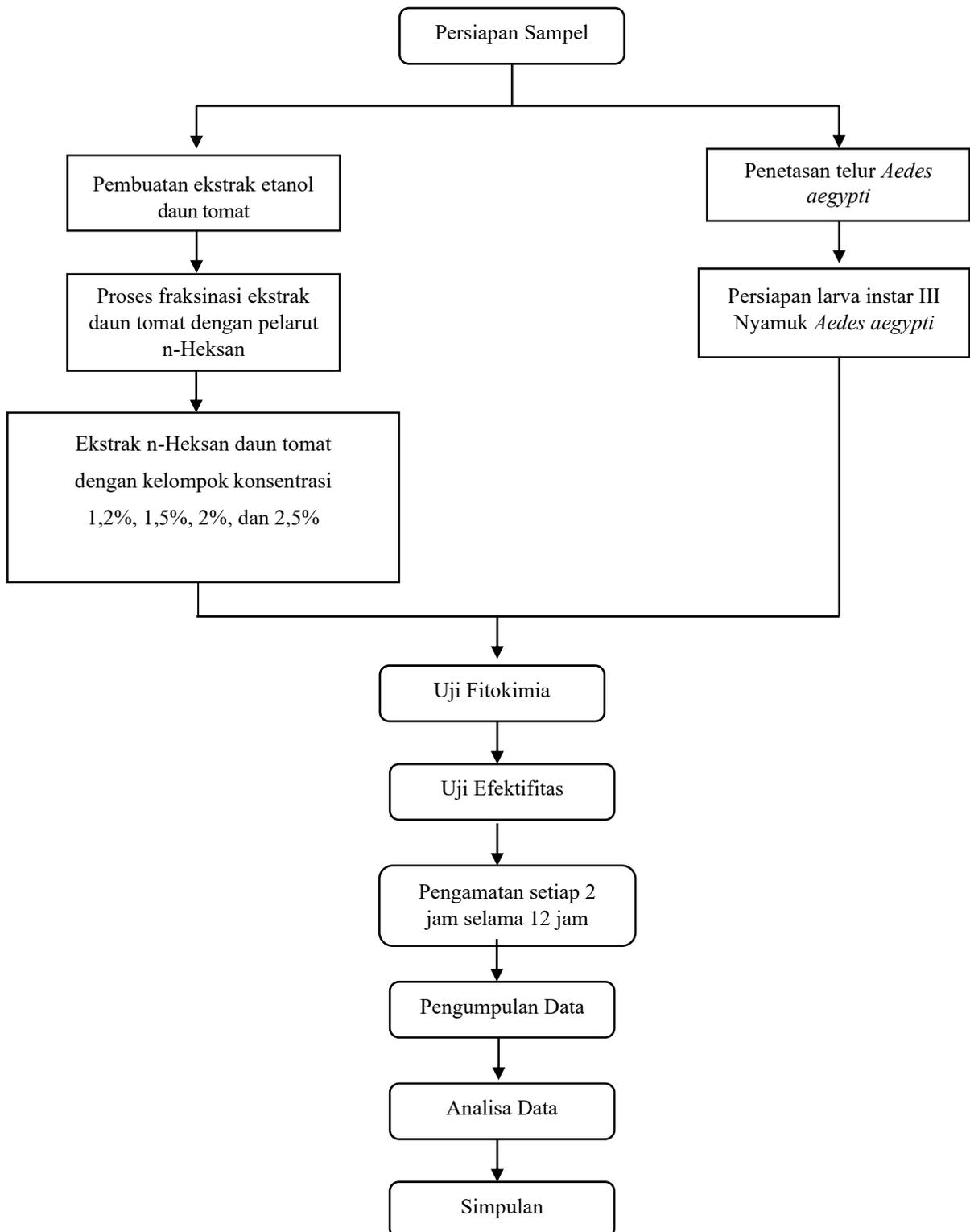
e. Uji fitokimia

1. Dilakukan Proses Fraksinasi ekstrak n-Heksan daun tomat.
2. Selanjutnya uji fitokimia akan dilakukan di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung.

f. Uji efektivitas

1. Menyiapkan 6 gelas plastik, masing-masing gelas plastik diisi ekstrak n-Heksan daun tomat dengan konsentrasi 1,2%, 1,5%, 2%, 2,5%.
2. Membuat kontrol negatif dengan mengisi 1 gelas plastik menggunakan 100 ml aquades.
3. Membuat kontrol positif dengan mengisi 1 gelas plastik menggunakan 0,2 gram bubuk abate dalam 100 ml aquades.
4. Mengambil 25 ekor larva instar III *Aedes aegypti* dan masukkan ke dalam gelas plastik masing-masing dengan ekstrak n-Heksan daun tomat yang telah diencerkan.
5. Semua pengulangan di atas dilakukan 5 kali, dengan pengamatan setiap 2 jam selama 12 jam (La taha *et al.*, 2018).

3. Alur Penelitian



F. Pengolahan data dan analisis data

Setelah semua data yang didapatkan dari jumlah larva instar instar III *Aedes aegypti* yang mati, selanjutnya dilakukan pengolahan dan analisis data menggunakan program komputer SPSS. Terdapat beberapa uji statistik yang dilakukan yaitu.

1. Uji Analisa Varian (One Way ANOVA) digunakan untuk menentukan apakah perbedaan jumlah kematian larva *Aedes aegypti* tiap perlakuan.
2. Uji *post Hoc* LSD (*Least Significance Different*) digunakan untuk menunjukkan perlakuan mana yang paling efektif.
3. Analisis Probit digunakan untuk menentukan konsentrasi dan waktu yang paling efektif dari suatu bahan uji. Konsentrasi efektif dihitung menggunakan LC50 (konsentrasi letal median), sedangkan waktu efektif dihitung menggunakan LT50 (median letal time).

G. Ethical clearance

Penelitian dilakukan dengan persetujuan izin komatik etik, Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang No. 391/KEPK-TJK/IV/2024, pada tanggal : 22 April 2024. Penelitian ini tidak akan membahayakan lingkungan karena limbah dikumpulkan dan dibuang di tempat pembuangan limbah. Limbah larutan Ekstrak n-Heksan daun tomat (*Sollanum lycopersicum L.*) dari aqua gelas dikumpulkan dan langsung dibuang ke limbah bahan anorganik. Karena itu, limbah ini tidak membahayakan lingkungan dan langsung dibuang ke saluran pembuangan. Sementara itu , larva dan telur nyamuk *Aedes aegypti* ditanam atau ditimbun di dalam tanah.