

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi bertingkat kloroform dan metanol dari kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca L.*). Variabel terikatnya adalah angka kematian larva *Aedes aegypti*. Kontrol positif (+) Abate 1 gram (*Temephos* 1%) sedangkan Kontrol negatif (-) *aquadest*. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan sesuai dengan rumus Federer.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi FMIPA Unila dan Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Tanjungkarang.
2. Penelitian dilakukan pada bulan April-Mei 2025.

C. Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca L.*), yang diekstraksi bertingkat untuk memperoleh ekstrak kloroform dan metanol, kemudian diencerkan dengan konsentrasi 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10%.

1. Kriteria Kulit Pisang Kepok

Kulit pisang kepok jenis pisang kepok kuning yang digunakan merupakan limbah kulit pisang, berwarna hijau, bersih dari kotoran dan getah, serta tidak menunjukkan tanda-tanda pembusukan atau perubahan warna menjadi coklat. Pisang kepok ini didapatkan di Kecamatan Kotabumi Selatan, Kabupaten Lampung Utara dapat dilihat pada lampiran 5, gambar 1.

2. Kriteria Larva Instar III Nyamuk *Aedes aegypti*

Larva instar III *Aedes aegypti* yang digunakan adalah hasil penetasan telur dari Balai Laboratorium Entomologi SKHB Institut pertanian Bogor. Larva pada tahap ini memiliki ukuran 4-5 mm, dengan corong pernapasan berwarna coklat kehitaman dan duri pada dada. Memiliki sifon besar serta gigi sisir pada segmen abdomen ke-8 dan mengalami pergantian kulit dalam periode 3-4 hari (Wahyuni, 2016). Alasan penggunaan larva instar III ukurannya lebih besar lebih memiliki ketahanan terhadap faktor mekanis saat terjadi pemindahan tempat larva (Lilia, 2016), aktif dalam mencari makan, dapat dilihat pada lampiran 13, gambar 16.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Variabel dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat	Hasil Ukur	Skala
			Ukur		
Variabel bebas	Ekstraksi bertingkat	Pengenceran	Botol reagen, elenmeyer, ,corong, gelas, kertas, saring batang pengaduk	Konsentrasi 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10% positif (+) Abate 1 gram (Temephos 1%) kontrol negatif (-) aquadest	Rasio
a) ekstrak bertingkat	menggunakan pelarut berdasarkan polaritas yang dilakukan dengan cara perendaman pada sampel kulit pisang (maserasi) dengan pelarut kepok berbeda secara berurutan guna menarik bahan kimia yang terkandung pada kulit pisang kepok (<i>Musa paradisiaca</i> L.).				
	mengunakan kloroform dan metanol.				
Variabel bebas: waktu kontak bahan aktif kulit pisang kepok (<i>Musa paradisiaca</i> L.).	lamanya waktu dalam jam antara setiap konsentrasi ekstrak dengan larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i> hingga menimbulkan kematian dengan pengamatan 1 sampai 12 jam.	Observasi (Ceklis)	Visual dan stopwatch	1 – 12 jam	Rasio
Variabel terikat	Jumlah larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i> yang tidak menunjukan pergerakan, nyamuk <i>Aedes aegypti</i> .	Observasi (Ceklis)	Visual	Jumlah Larva mati (ekor)	Nominal
kematian larva	apabila larva nyamuk tidak dapat bergerak maka nyamuk dikategorikan mati.				

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Prosedur penelitian
 - a. Mengurus izin penelitian No.PP.01.04/F.XXXV/2745/2025 yang dikeluarkan oleh Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dan surat pemesanan telur dari Balai Laboratorium Entomologi SKHB Institut pertanian Bogor dapat dilihat pada lampiran 7.
 - b. Determinasi bahan uji kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca L.*) di Laboratorium Botani, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Lampung dapat dilihat pada lampiran 8.
 - c. Pembuatan simplisia dimulai dengan mencuci kulit pisang kepok hingga bersih, kemudian dijemur di bawah sinar matahari atau ditutup kain hitam hingga kering (Salsabila K. et al. 2024), dapat dilihat pada lampiran 5.
 - d. Pembuatan ekstrak bertingkat kulit pisang kapok dilakukan di Laboratorium Botani, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Lampung, melalui proses pengekstraksian simplisia kulit pisang kepok dengan metode maserasi menggunakan pelarut kloroform dan metanol, dapat dilihat pada lampiran 9 dan lampiran 10.
 - e. Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilaksanakan di Laboratorium Botani, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Lampung. untuk mengkonfirmasi keberadaan senyawa metabolit sekunder ekstrak kulit pisang kepok yang mengandung flavonoid, saponin, terpenoid, tanin, fenolik, dan alkaloid, dapat dilihat pada lampiran 11.
 - f. Pembuatan konsentrasi bahan uji
 - 1) Larutan ekstrak 100% yang telah dipanaskan kemudian diencerkan sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan mulai dari 6%, 7%, 8% % dan 10%.
 - 2) Rumus pengenceran ekstrak kulit pisang kepok yang dipakai adalah $V1 \times \%1 = V2 \times \%2$.
 - g. Menyediakan sampel larva dengan menetasan telur *Aedes aegypti* di Laboratorium Parasitologi hingga larva mencapai instar III.

- h. Uji pengaruh ekstrak bertingkat kulit pisang kepok dengan konsentrasi 6%, 7%, 8% % dan 10%. Larva dimasukkan ke dalam gelas plastik berisi kulit pisang kepok dengan jumlah konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang dikumpulkan dilakukan dengan mencatat jumlah larva instar III *Aedes aegypti* yang tidak menunjukan pergerakan di setiap wadah. Perhitungan kematian larva dilakukan setiap 1 jam selama 12 jam pengamatan, sesuai dengan konsentrasi ekstrak kulit pisang kepok yang terdapat di masing-masing wadah. 100 ml *aquades* berfungsi sebagai kontrol negatif, sedangkan 0,01% abate berfungsi sebagai kontrol positif (Kurniawan, 2018).

2. Cara Kerja

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. Persiapan alat dan bahan

- 1) Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi labu ukur, gelas beaker 100 ml, kaca penutup, pipet tetes 5 ml, pipet ukur, gelas objek, blender, gelas plastik, kertas saring, toples kaca, mikroskop, rotary evaporator, nampan plastik, dan batang pengaduk.
- 2) Bahan yang digunakan: *aquadest*, bubuk abate, kulit pisang kepok, kloroform (p.a), metanol *absolute*, dan larva instar III *Aedes aegypti*.

b. Pembuatan Simplisia

- 1) Kulit pisang kepok yang masih hijau dikumpulkan sebanyak 3 kilogram.
- 2) Selanjutnya, Kulit pisang dibersihkan dengan mencucinya menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel dan ditiriskan.
- 3) Setelah itu, kulit pisang yang sudah dibersihkan dicacah untuk memudahkan proses pengeringan. Kulit pisang yang sudah dicacah kemudian dijemur di bawah sinar matahari dan ditutup

dengan kain hitam untuk proses pengeringan lama waktunya selama 1 minggu, sehingga menghasilkan simplisia.

- 4) Simplisia yang sudah kering lalu dikeringkan sebentar di dalam oven untuk memastikan tidak ada uap air yang tersisa di bagian mana pun dari bahan.
 - 5) Kulit pisang yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender dan kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk dengan ukuran partikel 60 mesh (Putu, N. et al., 2017) dan menghasilkan simplisia sebanyak 800 gram.
 - 6) Serbuk kulit pisang (*Musa paradisiaca L.*) selanjutnya dievaluasi secara makroskopis melalui pengamatan langsung menggunakan indera manusia untuk menilai karakteristik morfologi simplisia kulit pisang. Hasil penilaian makroskopis menunjukkan bahwa serbuk kulit pisang kepok memiliki warna coklat tua hingga kehitaman, bau khas kulit pisang, dan rasa yang agak sepat (Salsabila K. et al.2024).
- c. Pembuatan Ekstrak Bertingkat Kulit Pisang Kepok Metode Ekstraksi
- 1) Simplisia kulit pisang kepok yang telah ditimbang sebanyak 800 gram, selanjutnya dimasukkan ke dalam masing-masing gelas ukur.
 - 2) Kemudian dituangkan 2500ml kloroform pada masing-masing gelas ukur.
 - 3) Didiamkan selama 3 hari dengan diaduk 3 kali setiap hari.
 - 4) Selanjutnya dipisahkan antara ampas dan filtratnya menggunakan kertas saring melalui metode maserasi.
 - 5) Lalu ampasnya di angin-anginkan untuk menghilangkan residu dari kloroform setelah itu diekstraksi Kembali dengan pelarut metanol dituangkan 2500ml pada masing-masing gelas ukur.
 - 6) Didiamkan selama 3 hari dengan diaduk 3 kali sekali setiap hari.
 - 7) Selanjutnya Ekstrak kemudian diuapkan menggunakan evaporator hingga mencapai konsistensi kental, Setelah itu,

ekstrak diuapkan kembali pada suhu maksimal 60°C untuk menghilangkan sisa pelarut.

- 8) Hasil ekstraksi diperoleh 90 cc ekstrak kloroform dan 90 cc ekstrak metanol yang telah diencerkan hingga konsentrasi 100% disimpan dalam wadah kaca yang bersih, steril, dan kering. (Hamka et al., 2022).
- 9) Selanjutnya ekstrak diencerkan dengan varian konsentrasi 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10% .

Pengenceran dilakukan menggunakan *aquadest* dengan rumus sebagai berikut:

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

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 diinginkan (%)

Dengan rumusan ini, kita dapat menentukan volume larutan yang perlu dicampur untuk mencapai konsentrasi tertentu, dapat dilihat pada lampiran 2, contoh pengenceran pada konsentrasi 6%.

- a). Sebanyak 3ml ekstrak kloroform dipipet dengan pipet ukur.
- b). Sebanyak 3ml ekstrak metanol dipipet dengan pipet ukur.
- c). Kedua ekstrak tersebut kemudian dimasukkan ke dalam 94 ml *aquades* dan dihomogenkan hingga tercampur merata.

d. Penyediaan Larva *Aedes aegypti*

Telur nyamuk *Aedes aegypti* diperoleh dari Balai Laboratorium Entomologi SKHB Institut pertanian Bogor. Telur-telur tersebut kemudian ditetaskan di Laboratorium Parasitologi, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Kesehatan Tanjungkarang, kemudian ditaruh dalam wadah plastik berisi air bersih. Setelah ditetaskan, telur-telur tersebut berkembang menjadi larva di hari ke-3 dan diberikan hati ayam rebus sebagai sumber makanan. Pada hari ke-4, larva tersebut berkembang menjadi

stadium instar I, kemudian pada hari-6 berubah menjadi larva instar II, dan akhirnya mencapai stadium instar III pada hari ke-8. Sebelum digunakan, salah satu larva diperiksa dengan mikroskop, yang dilakukan sebagai berikut, dapat dilihat pada lampiran 13.

- 1) Larva diletakkan pada objek glass, kemudian ditutup dengan deck glass sebelum diperiksa di bawah mikroskop dengan ukuran 4x10.
- 2) Karakteristik larva nyamuk instar III *Aedes aegypti* yang diamati meliputi duri toraks yang terlihat jelas, sifon berwarna coklat tua, dan gerakan yang sangat aktif dalam media air, Larva instar III ini dianggap siap digunakan untuk percobaan dapat dilihat pada lampiran 13, gambar 16.

e. Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa aktif yang terkandung dalam kulit pisang kepok setelah proses ekstraksi. Uji ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Lampung dapat dilihat pada lampiran 11.

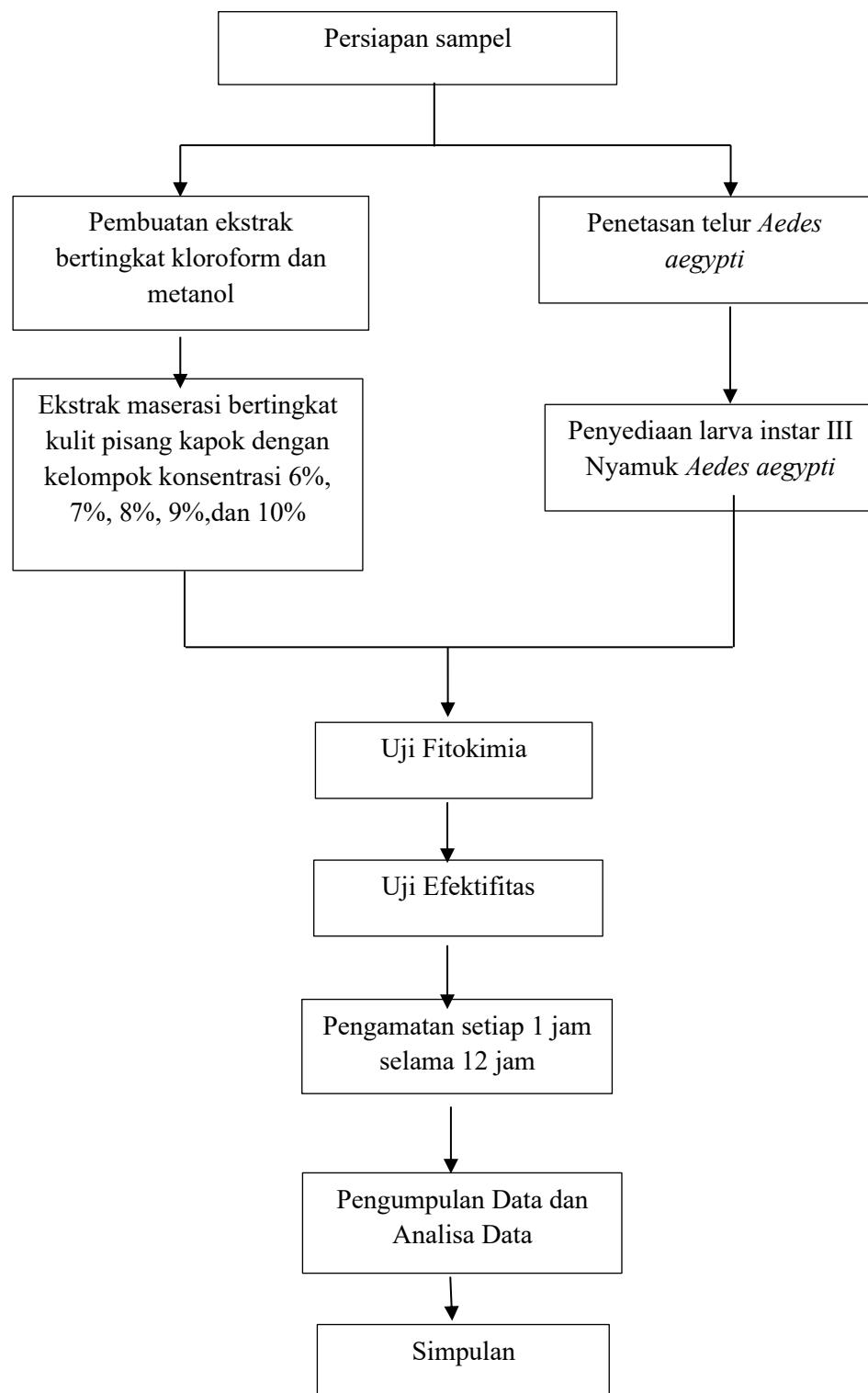
f. Uji Efektivitas

- 1) Menyiapkan 7 gelas plastik lalu beri label ekstrak kloroform dan metanol kulit pisang kepok sesuai konsentrasi 6%, 7%, 8%, 9%, 10% dapat dilihat pada lampiran 14, gambar 18.
- 2) Kontrol negatif dibuat dengan mengisi 1 gelas plastik dengan 50 ml *aquades* tanpa penambahan larvasida atau bahan aktif lainnya.
- 3) Kontrol positif dibuat dengan mencampurkan 50 ml *aquades* dengan 0,01 gram bubuk Abate ke dalam gelas ukur.
- 4) Diambil 25 larva *Aedes aegypti* instar III menggunakan pipet plastik (diameter lubang 2 mm) dan letakkan di setiap gelas plastik yang berisi ekstrak bertingkat kloroform dan metanol dari setiap konsentrasi kulit pisang kepok yang telah diencerkan. Setiap gelas plastik akan menjadi satu perlakuan dengan konsentrasi ekstrak yang berbeda, semua perlakuan berasal dari air yang sama berupa *aquadest*, pada pengukuran dengan ph universal didapatkan ph 7 dan suhu 25°C dapat dilihat pada lampiran 14.

5) Dilakukan pengamatan dengan menghitung jumlah kematian larva *Aedes aegypti* setiap 1 jam selama 12 jam persamaan.

6) Prosedur di atas diulang sebanyak 4 kali (Dwi S., 2018) dapat dilihat pada lampiran 14.

3. Alur Penelitian



F. Pengolahan dan Analisis Data

Setelah semua data yang didapatkan dari jumlah larva instar III *Aedes aegypti* yang mati, kemudian dihitung untuk mencari rata-rata presentasi kematian larva nyamuk pada masing-masing perlakuan konsentrasi dan pada waktu kontak dengan menggunakan rumus rata-rata : Kematian (%): $\frac{x}{n} \times 100\%$ (Yuniarty, 2016). kemudian data kematian akan dianalisis menggunakan uji statistik antara lain :

1. Uji Analisis Spesifisitas dan Sensitivitas digunakan untuk menentukan kemampuan daya bunuhnya serta lebih spesifik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*. Dengan rumus perhitungan :

Sensitivitas : $[\frac{TP}{(TP+FN)} \times 100\%]$ dan Spesitifitas : $[\frac{TN}{(TN+FP)} \times 100\%]$

TP : Jumlah nyamuk yang mati setelah perlakuan (*true positive*).

FN : Jumlah nyamuk uji yang masih hidup setelah perlakuan ekstrak kulit pisang kepok, tetapi seharusnya mati seperti pada abate (*false negative*).

TN : Jumlah nyamuk mati pada pada kontrol (+) abate yang di gunakan sebagai gold standar (*true negative*).

FP : Jumlah nyamuk uji yang mati pada kontrol (-) *aquadest* (*false positive*) (Akrom,2020).

G. Ethical Clearance

Penelitian dilakukan dengan persetujuan izin komisi etik, Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang No.299/KEPK-TJK/IV/2025, pada tanggal : 03 Mei 2025. Penelitian ini tidak akan membahayakan lingkungan karena limbah dikumpulkan dan dibuang di tempat pembuangan limbah. Limbah larutan Ekstrak bertingkat kloroform dan metanol kulit pisang kapok (*Musa paradisiaca 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.