

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Berdasarkan tujuannya, penelitian ini adalah jenis penelitian eksperimental. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan analisis dekriptif untuk mengidentifikasi formulasi granul larvasida ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) dengan metode ekstraksi maserasi.

B. Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di beberapa laboratorium :

1. Determinasi Tanaman alpukat (*Persea americana* Mill) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.
2. Pembuatan ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam.
3. Pembuatan granul larvasida ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi.
4. Uji daya larvasida granul ekstrak biji (*Persea americana* Mill) dilakukan di Laboratorium Teknologi konservatif.

C. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel biji alpukat (*Persea americana* Mill) yang digunakan dalam pembuatan granul sebagai larvasida alami yang diperoleh dari penjual jus yang terletak di daerah Ungaran, Kabupaten

Semarang. Biji alpukat (*Persea americana* Mill) yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 12 Kilogram.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak biji alpukat yaitu 0,09% dan 8% serta Amilum manihot sebagai bahan penghancur dengan konsentrasi 3% dan 15%.

2. Variabel terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dapat dipengaruhi oleh variabel bebas dalam penelitian ini variabel terikatnya adalah persentase kematian larva nyamuk dan mutu fisik granul.

3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol adalah variabel yang sengaja dikendalikan atau dibuat konstan oleh peneliti sebagai usaha untuk meminimalisir bahkan menghilangkan pengaruh lain selain variabel dalam penelitian ini

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah bahan yang digunakan, metode pembuatan dan metode ujinya

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan yaitu pisau, penjemur dari bambu yang berlubang-lubang, kain hitam, Erlenmeyer, pengaduk, *Rotary vacuum evaporator*, *waterbath*, *beaker glass*, pipet tetes, pencatat waktu, neraca digital *Excellent*, cawan porselen, loyang, oven *Thermo scientific*

Thermolyne, *muffle furnace*, cawan kusible, *moisture analyzer* OHAUS, blender simplisia GETRA, ayakan mesh 16 dan mesh 18 serta alat fotografi.

2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu biji alpukat (*Persea americana* Mill), larva *Aedes aegypti* instar III, air, etanol 96%, polivinilpirolidon, *Saccharum Lactis*, amilum, Abate, Na Benzoat, surbuk Mg, HCl pekat, HCl 2N, FeCl₃ 1%, Kalium iodida, CH₃COOH glasial, H₂SO₄, asam asetat, Dragendroff.

F. Definisi Operasional

1. Biji Alpukat (*Persea americana* Mill) yang diperoleh dari penjual jus yang terletak di daerah Ungaran, Kabupaten Semarang
2. Konsentrasi ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) dalam formula yaitu 0,09% sampai dengan 8%.
3. Konsentrasi Amilum dalam formula yaitu 3% sampai 15%
4. Metode maserasi dengan pelarut etanol 96% adalah metode yang digunakan dalam pembuatan ekstrak

G. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tanaman yang akan digunakan dalam penelitian harus dilakukan determinasi terlebih dahulu. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).

2. Pengambilan Biji Alpukat (*Persea americana* Mill)

Biji alpukat (*Persea americana* Mill) yang digunakan dalam pembuatan granul sebagai larvasida alami yang diperoleh dari penjual jus yang terletak di daerah Ungaran, Kabupaten Semarang. Biji yang terkumpul dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang melekat pada biji. Ketika sudah dicuci biji alpukat dipotong kecil-kecil setelah itu biji dihamparkan di atas penjemur yang berlubang dan dijemur di bawah sinar matahari langsung dengan ditutupi kain hitam.

3. Pembuatan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill)

Biji alpukat dicuci dan dipotong-potong kecil dan selanjutnya dikeringkan selama satu minggu. Biji alpukat kering diblender hingga halus, lalu disaring dengan ayakan 40. Ekstraksi biji alpukat dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 200 gram direndam dengan etanol (alcohol 96%) selama 48-72 jam, perbandingan 200 gram serbuk dengan 1500 mL etanol kemudian disaring sehingga diperoleh filtrat. Resida diremaserasi dengan etanol 500mL selama dua hari. Tahap selanjutnya sisa pelarut pada filtrat diuapkan dengan rotary evaporator dan di *waterbath* (Nombe & Binawati, 2017).

4. Uji Kadar Air Simplisia

Analisis kadar air menggunakan alat *moisture analyzer*, dimana air yang menguap selama pemanasan dihitung sebagai persen kadar air. *Moisture analyzer*, 2 gram simplisia dan dipanaskan selama ± 5 menit.

Proses selesai setelah keluar angka konstan pada alat dan dinyatakan sebagai persen kadar air (Nurhidajah & Pranata, 2021).

5. Uji Kadar Abu Ekstrak

Pengujian kadar abu dilakukan dengan menggunakan metode gravimetri (pengeringan) yaitu dengan cara menimbang 2 g simplisia yang dipijarkan dalam tanur 400°C selama 3 jam, lalu didinginkan dan ditimbang.

Kemudian dihitung kadar abu dengan rumus dibawah ini :

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{x-a}{w} \times 100\%$$

Keterangan :

a : bobot cawan (g)

w : bobot sampel awal (g)

x : berat (cawan+abu) (g)

6. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui masih ada atau tidaknya etanol yang terkandung dalam ekstrak. Uji bebas etanol dilakukan dengan cara memasukan 1 gram ekstrak kental ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes H₂SO₄ dengan cara dipipet dan 2 tetes asam asetat kemudian dipanaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester yang khas dari etanol (Tivani *et al.*, 2021).

7. Uji Kadar Air Ekstrak

Analisis kadar air menggunakan alat *moisture analyzer*, dimana air yang menguap selama pemanasan dihitung sebagai persen kadar air. *Moisture analyzer*, 2 gram sampel dan suhu diatur ± 100°C, lalu dipanaskan selama ± 5 menit. Proses selesai setelah keluar angka konstan pada alat dan dinyatakan sebagai persen kadar air (Nurhidajah & Pranata, 2021).

8. Uji Fitokimia Pada Ekstrak

a. Uji flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan mengambil 1 gram ekstrak sampel kemudian ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi NaOH 10%. Hasil yang positif flavonoid akan membentuk warna orange, merah atau kuning (Sarjito *et al.*, 2020).

b. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan mengambil 1 gram ekstrak lalu ditambahkan dengan 2 mL pereaksi Mayer. Hasil yang positif akan membentuk endapan berwarna putih, coklat atau kuning (Sarjito *et al.*, 2020).

c. Uji Saponin

Pengujian saponin dilakukan dengan menimbang ekstrak sampel sebanyak 2 gram lalu ditambahkan 10 mL aquades dan dikocok kuat-kuat, Kemudian ditambahkan 1 tetes HCl 2N. Uji positif mengandung saponin ditandai dengan terbentuknya busa atau buih (Amelia *et al.*, 2022).

d. Uji Tanin

Pengujian tanin dilakukan dengan menimbang 0,5 gram ekstrak dengan ditambahkan 2 tetes besi (III) klorida. Ekstrak yang positif ditandai dengan munculnya warna kecoklatan atau biru hitam (Amelia *et al.*, 2022).

9. Formulasi Granul

Metode granulasi basah adalah salah satu metode yang proses pencampuran partikel bahan aktif dan eksipien menjadi partikel yang lebih besar dengan penambahan cairan pengikat dalam jumlah yang tepat dan ditentukan (Zahroh et al.,2023). Formula granul didapatkan dengan menggunakan aplikasi *design expert* untuk bagian ekstrak biji alpukat menggunakan batas bawah 0,09 dan batas atas 8 sedangkan amilum manihot menggunakan batas bawah 3 dan batas atas 15. Penentuan batas atas dan bawah amilum. Aras rendah dan Aras tinggi terdapat pada tabel 3.1

Tabel 3. 1 Aras Rendah Aras Tinggi Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill) dan Amilum Manihot

Bahan	Aras Rendah (%)	Aras Tinggi (%)
Ekstrak biji alpukat	0,09	8
Amilum	3	15

Desain faktorial merupakan aplikasi persamaan regresi untuk memberikan model hubungan antara variabel respon dengan satu atau lebih variabel bebas. Faktorial adalah jenis desain yang paling umum untuk perbaikan proses. Dalam penelitian, faktorial digunakan untuk mencari efek dari berbagai kondisi terhadap hasil dari penelitian dan juga digunakan untuk melihat interaksi didalamnya dikuantifikas(Hidayat, Zuhrotun and Sopyan, 2020).

Tabel 3. 2 Formula Granul Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill) dengan Bahan Penghancur Amilum Manihot *Design Expert 13*

Std	Run	Ekstrak (%)	Amilum (%)
12	F1	8	15
8	F2	0.09	15
5	F3	8	3
6	F4	8	3
11	F5	8	15
1	F6	0.09	3
3	F7	0.09	3
2	F8	0.09	3
7	F9	0.09	15
4	F10	8	3
9	F11	0.09	15
10	F12	8	15

Dalam desain faktorial terdapat faktor, level dan efek. Faktor diartikan sebagai besaran variabel independen yang akan mempengaruhi hasil output atau variabel dependen. Faktor dibedakan menjadi faktor kuantitatif (faktor yang bersifat numerikal. misal, konsentrasi 1%, 2%) dan kualitatif (faktor non-numerikal. Efek adalah perubahan respon yang disebabkan variasi tingkat faktor. Respon diartikan sifat atau hasil percobaan yang diamati dan dapat dikuantifikasi.

Tabel 3. 3 Formula Granul Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill) dengan Bahan Penghancur Amilum Manihot *Design Expert 13*

Std	Run	Ekstrak (%)	Amilum (%)	PVP (%)	Natrium Benzoat (%)	Saccharum Lactis (%)
12	F1	8	15	0,5	0,1	76,4
8	F2	0.09	15	0,5	0,1	84,31
5	F3	8	3	0,5	0,1	88,4
6	F4	8	3	0,5	0,1	88,4
11	F5	8	15	0,5	0,1	76,4
1	F6	0.09	3	0,5	0,1	96,31
3	F7	0.09	3	0,5	0,1	96,31
2	F8	0.09	3	0,5	0,1	96,31
7	F9	0.09	15	0,5	0,1	84,31
4	F10	8	3	0,5	0,1	88,4
9	F11	0.09	15	0,5	0,1	84,31
10	F12	8	15	0,5	0,1	76,4

Setiap formula yang ada di tabel 3.3 dibuat dengan cara menimbang masing-masing bahan sesuai kebutuhan tiap formula. Pertama, campurkan natrium benzoat dengan etanol untuk melarutkannya. Kedua, campurkan PVP dan ekstrak. Ketiga, campurkan amilum dan laktosa. Setelah itu, campurkan semua bahan sampai mendapatkan massa granul yang baik. Massa lalu diayak menggunakan ayakan mesh No. 16, hasil ayakan kemudian dikeringkan di lemari pengering dengan suhu 40°C-50°C selama kurang lebih 1 jam. Granul yang sudah kering kemudian diayak kembali menggunakan mesh No. 18 (Yuliana *et al.*, 2021).

10. Evaluasi Mutu Fisik

a. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan untuk mengetahui tampilan fisik dari sediaan. Uji organoleptik dilakukan secara visual, untuk melihat warna, bentuk, aroma dan rasa (Pratama, Roni and Fajarwati, 2022)

b. Uji Kecepatan alir

Granul sebanyak 100 gram dimasukkan ke dalam *flowbility tester* sampai masa granul melewati corong, lalu dicatat waktunya (Riki *et al.*, 2019).

c. Uji Ukuran Partikel

Pengukuran distribusi ukuran partikel granul dimodifikasi dilakukan dengan menggunakan ayakan mesh 60, 80, 100, 120. Sejumlah 25 gram granul digetarkan dengan alat sieve shaker dengan waktu 5 menit. Bobot granul yang tertinggal di masing-masing

pengayak ditimbang untuk menentukan distribusi ukuran partikel granul (Utami *et al.*, 2022).

d. Uji Sudut Diam

Sejumlah massa granul dimasukkan ke dalam corong, granul yang jatuh akan membentuk kerucut. Kerucut lalu diukur tinggi dan diameternya (Riki *et al.*, 2019).

Sudut diam diukur dengan rumus :

$$\tan a = \frac{h}{r}$$

Keterangan :

α = sudut diam

h = tinggi kerucut

r = jari-jari

e. Waktu Larut Granul

Granul sebanyak 400 mg ditimbang dan dituang ke dalam 1 liter air, diaduk sampai terdispersi sempurna, lalu dicatat waktunya (Riki *et al.*, 2019).

11. Uji Daya Larvasida

Uji daya larvasida dilakukan dengan 8 variasi perlakuan yaitu 1 kontrol positif, 1 kontrol negatif, 1 kelompok ekstrak aras atas, 1 kelompok ekstrak aras bawah, Granul dengan variasi konsentrasi biji alpukat dan amilum manihot. Jumlah larva yang digunakan dalam pengujian ini adalah 13 ekor disetiap perlakuan. Perlakuan kontrol positif dilakukan dengan cara menambahkan abate 0,225 gram berdasarkan petunjuk yang ada di kemasan dan dilarutkan dengan air 250 mL. Uji daya larvasida dilakukan dengan cara

melarutkan granul sesuai dengan formulanya masing-masing dan ditambahkan air 250 mL pengamatan dilakukan selama 6 jam dimana tiap 1 jam dilakukan pengamatann lalu diamati lagi setelah 24 jam dilakukan dengan replikasi 3x (Chusniasih *et al.*, 2022). Pembagian kelompok masing-masing perlakuan terdapat pada table 3.2.

Tabel 3. 4 Kelompok Variasi Formula granul

Kontrol +	Abate 0,225 gram dilarutkan dalam 250 mL air
Kontrol -	Air keran 250 mL
Kelompok ekstrak aras rendah	3,375 mg ekstrak dalam 250 mL air
Kelompok ekstrak aras atas	0,3 gram ekstrak dalam 250 mL air
Kelompok F1	Granul F1 sebanyak 3,75 gram dilarutkan dalam 250 mL air
Kelompok F2	Granul F2 sebanyak 3,75gram dilarutkan dalam 250 mL air
Kelompok F3	Granul F3 sebanyak 3,75 gram dilarutkan dalam 250 mL air
Kelompok F4	Granul F4 sebanyak 3,75 gram dilarutkan dalam 250 mL air
Kelompok F5	Granul F4 sebanyak 3,75 gram dilarutkan dalam 250 mL air
Kelompok F6	Granul F4 sebanyak 3,75 gram dilarutkan dalam 250 mL air
Kelompok F7	Granul F4 sebanyak 3,75 gram dilarutkan dalam 250 mL air
Kelompok F8	Granul F4 sebanyak 3,75 gram dilarutkan dalam 250 mL air
Kelompok F9	Granul F4 sebanyak 3,75 gram dilarutkan dalam 250 mL air
Kelompok F10	Granul F4 sebanyak 3,75 gram dilarutkan dalam 250 mL air
Kelompok F11	Granul F4 sebanyak 3,75 gram dilarutkan dalam 250 mL air
Kelompok F12	Granul F4 sebanyak 3,75 gram dilarutkan dalam 250 mL air

12. Analisis Hasil

Data hasil uji daya larvasida granul ekstrak biji alpukat di analisis dengan menghitung mortalitas larva dan analisis statistik menggunakan *Design Expert*. Jika pada kelompok kontrol negatif terjadi mortalitas larva antara 5% - 9% maka dilakukan koreksi dengan formula “Abbot” untuk menentukan % mortalitas, dengan rumus:

$$\% \text{mortalitas} = \frac{\% \text{mortalitas kelompok uji} - \% \text{mortalitas kelompok kontrol}}{100 - \% \text{mortalitas kelompok kontrol}} \times 100\%$$