

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental. Penelitian eksperimental merupakan pengujian yang dilakukan untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang disebabkan oleh suatu faktor atau perlakuan. Dalam hal ini dapat diketahui optimasi formula granul larvasida ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) dengan bahan penghancur explotab.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di :

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 Prodi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Pembuatan dan uji aktivitas granul larvasida ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

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

Semarang. Biji alpukat (*Persea americana* Mill) yang digunakan dalam penelitian sebanyak 6 kg.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah sebuah tindakan yang dilakukan peneliti untuk mempengaruhi hasil yang diharapkan (Adijaya, 2017). Variabel bebas pada penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak biji alpukat dan explotab.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi akibat dari adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah mutu fisik meliputi kadar air, kecepatan alir, sudut diam dan waktu larut, serta mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti*.

3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol adalah variabel yang besarnya ditentukan sebelum penelitian dan nilainya dijaga tetap sama selama pengujian berlangsung. Dalam penelitian ini variabel terkontrolnya adalah biji alpukat, suhu dan waktu ekstraksi metode maserasi, metode pembuatan granul, metode evaluasi sediaan.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pisau, penjemur dari bambu yang berlubang-lubang, kain hitam, cawan porselin, cawan

krusible, kertas saring (Waterman no.42), *muffle furnace* (Tanur), *flowbility tester*, corong kaca (Iwaki), *stopwatch*, pengaduk (Iwaki), tabung reaksi (Iwaki), *moisture analyzer* (Ohaus), *Rotary vaccum evaporator* (Ika RV10 Digital V), *waterbath* (Memmert), *beaker glass* (Aprox), pipet tetes, neraca digital, *sieve shaker*, ayakan mesh 40, 12 dan 16, alat fotografi dan kontainer.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu biji alpukat (*Persea americana* Mill), larva *Aedes aegyty* instar III (247 larva), etanol 96% (teknis), air kran, abate, explotab, PVP (0,5%), natrium benzoate (0,1%), *saccharum lactis* (ad 100 gram), serbuk Mg, HCl pekat, HCl 2N, FeCl₃ 1%, kalium iodida, CH₃COOH glasial, dragendroff, H₂SO₄ dan asam asetat.

F. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi biji alpukat (*Persea americana* Mill) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang. Surat keterangan Determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pengajuan Ijin Penelitian

Penelitian dilakukan di Reservoir Balai Besar Laboratorium Kesehatan Lingkungan Salatiga. Pengujian granul larvasida dilakukan dengan persyaratan surat *Ethical Clearance* dan surat izin penelitian dari

Kemenkes. Surat keterangan *Ethical Clearance* dan surat izin penelitian dari Kemenkes dapat dilihat pada lampiran 2 dan 3.

3. Pembuatan Simplisia Ekstrak Biji Alpukat

a. Pembuatan Simplisia

Biji alpukat (*Persea americana* Mill) dicuci dengan air mengalir, setelah itu biji dirajang kecil-kecil dan jemur hingga kering. Penjemuran dilakukan dengan ditutup kain hitam selama pengeringan di bawah sinar matahari langsung karena jika dikeringkan dengan suhu yang terlalu tinggi atau terkena sinar matahari langsung dapat merusak komponen aktif yang terdapat didalam biji alpukat (*Persea americana* Mill). Pengeringan dilakukan sampai kering. Biji alpukat yang telah kering disortasi kembali kemudian simplisia dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan mesh 40 dan disimpan (Permadi, 2021).

b. Uji Kadar Air Simplisia

Sebanyak 2 gram biji alpukat dimasukkan dalam plat *moisture analyzer* kemudian tombol *read* ditekan, ditunggu hingga lampu menyala hijau dan hasil akan tertera pada layar *moisture analyzer* (Cahyaningrum *et al.*, 2019)

c. Uji Kadar Abu Simplisia

Penentuan kadar abu dilakukan dengan cara mengeringkan cawan *krusible*, selanjutnya cawan ditimbang bobot kosongnya. Menimbang 2 g simplisia dimasukkan ke dalam cawan *krusible*

tersebut. Cawan yang telah berisi sampel selanjutnya dimasukkan ke dalam *furnace* dengan suhu 400°C dalam tanur selama 3 jam sampai sampel menjadi abu. Selanjutnya cawan diangkat dari dalam tanur dan didinginkan dan ditimbang (Narsa *et al.*, 2022). Kadar abu dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar abu} = \frac{x-a}{w} \times 100\%$$

Keterangan:

a = Bobot cawan (g)

w = Bobot sampel awal (g)

x = Berat (cawan + abu) (g)

4. Ekstraksi Biji Alpukat (*Persea americana* Mill) Metode Maserasi

Ekstraksi dilakukan sebanyak 2 kali masing-masing dengan berat 200 gram serbuk biji alpukat, tambahkan 1,5 L etanol 96% pada suhu ruang selama 5 hari, lalu disaring. Kemudian residu diremaserasi dengan 500 mL etanol 96% pada suhu ruang selama 2 hari lalu disaring. Filtrat dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak yang masih mengandung pelarut dalam volume yang kecil. Penguapan pelarut dilanjutkan dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak kental (Padmasari *et al.*, 2013).

5. Uji Ekstrak Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui masih ada atau tidaknya etanol yang terkandung dalam ekstrak. Melakukan uji bebas etanol dilakukan dengan cara 1 gram ekstrak kental dimasukan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes H₂SO₄ dan 2 tetes asam asetat

kemudian dipanaskan. Ekstrak dinyatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester yang khas dari etanol (Tivani *et al.*, 2021).

6. Skrining Fitokimia Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill)

a. Flavonoid

Sebanyak 0,3 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan air panas secukupnya. Filtrat yang ada sebanyak 5 mL ditambahkan 0,05 mg serbuk magnesium dan 1 mL HCl pekat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga, menunjukkan adanya flavonoid (Kopon *et al.*, 2020).

b. Saponin

Sebanyak 2 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan 10 mL air panas lalu didinginkan, setelah itu dikocok kuat-kuat selama 10 detik lalu tambahkan 1 tetes HCl 2N. Hasil positif ditandai dengan adanya buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama 10 menit (Kaempe *et al.*, 2023).

c. Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dan ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 1%. Jika terjadi perubahan warna menjadi biru, ungu atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Ekayani *et al.*, 2021).

d. Alkaloid

Sebanyak 0,1 gram sampel diekstraksi dengan kalium iodida 5 mL dan ditambahkan CH_3COOH glasial 5 mL, kemudian dimasukkan

ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 tetes. Selanjutnya ditambahkan pereaksi dragendroff pada tabung reaksi. Pada pereaksi dragendroff akan terbentuk endapan yang menandakan positif adanya alkaloid (Kaempe *et al.*, 2023).

7. Formulasi Granul Larvasida Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill)

a. Formulasi Granul Larvasida

Formulasi granul larvasida dibuat dengan menggunakan metode granulasi basah. Formula bahan yang digunakan untuk pembuatan granul larvasida ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill). Formula granul dibuat menggunakan aplikasi *Desing expert* dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Formula Granul Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill)

Nama Bahan	Jumlah Bahan (%)			
	F1	F2	F3	F4
Ekstrak Biji Alpukat	0,09	8	0,09	8
Explotab	8	8	2	2
PVP	0,5	0,5	0,5	0,5
Natrium benzoat	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Saccharum lactis</i>	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Pada penelitian ini dibuat empat formula dengan menggunakan aplikasi *Design expert* untuk konsentrasi ekstrak menggunakan aras rendah 0,09% dan aras tinggi 8%, kemudian untuk bahan penghancur

yaitu explotab dengan aras rendah 2% dan aras tinggi 8%. Setiap formula dibuat sebanyak 150 gram dan direplikasi sebanyak 3 kali.

b. Pembuatan Granul

Pembuatan granul diawali dengan melakukan penimbangan semua bahan sesuai perhitungan pada lampiran 4, campuran basah terdiri dari natrium benzoat 0,1% dilarutkan dalam etanol hingga larut setelah natrium benzoat larut ditambahkan PVP sebanyak 5 mL, kemudian dicampur hingga PVP larut atau jernih, setelah itu ditambahkan dengan ekstrak aras rendah 0,09% (F1 dan F3) dan aras tinggi 8% (F2 dan F4) kemudian campuran kering terdiri dari explotab sesuai formula ditambahkan dengan *Saccharum lactis* ad 100. Jumlah ekstrak dan explotab yang digunakan masing-masing formula sesuai dengan perhitungan pada lampiran 4, kemudian diaduk hingga mendapatkan massa granul yang baik. Massa lalu diayak menggunakan mesh No. 12, hasil ayakan kemudian dikeringkan dalam lemari pengering pada suhu 40°C-50°C selama kurang lebih 1 jam. Granul yang sudah kering kemudian diayak kembali dengan menggunakan mesh No.16 (Riki *et al.*, 2019)

c. Evaluasi Mutu Fisik.

1) Uji Kadar Air

Granul ditimbang 3 gram dan dimasukkan ke dalam alat *moisture analyzer* pada suhu 105°C, ditunggu hingga alat berbunyi dan lampu dari alat mati yang menunjukkan proses telah selesai.

Pengujian dilakukan pada setiap sediaan yang dibuat. Catat hasil dari pengujian sebagai nilai kadar air (Cheiya *et al.*, 2023).

2) Distribusi Ukuran Partikel

Pengujian distribusi ukuran partikel granul dilakukan dengan menggunakan ayakan mesh 60, 80, 100 dan 120 (Utami *et al.*, 2022). Pengayak ditimbang masing-masing berat kosong, sejumlah 25 gram granul dimasukkan ke dalam alat *sieve shaker* dan pasang penutup. Agitasi susunan pengayak selama 5 menit. Kemudian dengan hati-hati angkat setiap pengayak dari susunannya. Timbang ulang setiap pengayak, dan tentukan bobot dalam setiap pengayak. Dengan cara yang sama, tentukan bobot disetiap ayakan. Pasang kembali susunan ayakan, dan agitasi selama 5 menit. Angkat dan timbang setiap pengayak seperti cara yang sebelumnya. Ulangi langkah tersebut hingga kriteria titik akhir tercapai. Jumlah susut bobot tidak lebih dari 50% bobot awal (Farmakope Indonesia, 2015).

3) Uji Kecepatan Alir

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

$$\text{Kecepatan Alir} : \frac{\text{Bobot Granul (g)}}{\text{waktu alir (detik)}}$$

4) Uji Sudut Diam

Sejumlah 100 gram masa granul dimasukkan ke dalam corong kaca, granul yang jatuh akan membentuk kerucut. Kerucut lalu diukur tinggi dan diameternya (Riki *et al.*, 2019).

$$\tan \alpha : \frac{h}{r}$$

Keterangan:

α = Sudut diam ($^{\circ}$)

h = Tinggi kerucut (cm)

r = Jari-jari alas kerucut (cm)

5) Waktu Larut

Sejumlah 20 gram granul dituang ke dalam wadah gelas berisi 200 mL air, kemudian hitung waktu larut sediaan dengan *stopwatch*. Waktu yang diperlukan granul untuk larut kurang dari 5 menit. Air yang digunakan adalah air dingin yang diaduk secara kontinyu hingga butiran granul larut (Husni *et al.*, 2020).

8. Uji Larvasida

a. Pembagian Kelompok

Uji larvasida dilakukan dengan membagi 156 larva nyamuk ke dalam 8 kelompok yang berisi masing-masing 13 larva untuk pemengujian daya larvasida. Terdapat 2 kelompok ekstrak aras tinggi dan aras rendah, serta 2 kontrol yaitu positif (abate) dan kontrol negatif (air kran). Pengujian daya larvasida granul ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) sebagai berikut :

Kontrol positif : Abate 0,25 gram dalam 250 mL air kran

- Kontrol negatif : Air kran 250 mL
- Ekstrak aras bawah : 3,375 mg ekstrak dalam 250 mL air kran
- Ekstrak aras atas : 0,3 gram ekstrak dalam 250 mL air kran
- Kelompok F1 : Granul F1 sebanyak 3,75 gram dilarutkan dalam 250 mL air kran
- Kelompok F2 : Granul F2 sebanyak 3,75 gram dilarutkan 250 mL air kran
- Kelompok F3 : Granul F3 sebanyak 3,75 gram dilarutkan 250 mL air kran
- Kelompok F4 : Granul F4 sebanyak 3,75 gram dilarutkan 250 mL air kran

b. Pengujian Larvasida

Pengujian larvasida dilakukan dengan 8 variasi perlakuan, yaitu 2 kelompok ekstrak dengan aras tinggi dan aras rendah, 2 kontrol (positif : abate dan kontrol negatif : air kran), serta 4 perlakuan dengan variasi konsentrasi bahan penghancur (*explotab*). Uji daya larvasida pada kelompok ekstrak aras tinggi dan aras rendah dilakukan dengan memasukan 250 mL air kran ke dalam *beaker glass*, kemudian ditambahkan 13 ekor larva *aedes aegypti* instar III. Kelompok ekstrak diuji dengan melarutkan ekstrak etanol biji alpukat hasil penyarian pada konsentrasi ekstrak aras rendah 3,375 mg. Selanjutnya, konsentrasi ekstrak aras tinggi 0,3 gram ekstrak pekat

tersebut dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang sudah berisi 250 mL air kran. Granul yang telah larut dan tercampur, kemudian ditambahkan 13 ekor larva *aedes aegypti* instar III. Perlakuan kontrol positif dilakukan dengan memasukan air kran 250 mL ke dalam *beaker glass* kemudian diberi 13 ekor larva nyamuk *aedes aegypti* instar III. Perlakuan kontrol negatif dilakukan dengan menggunakan abate 0,25 gram yang dicampurkan dengan 250 mL air dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian ditambahkan 13 ekor larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III.

Uji daya larvasida pada 4 perlakuan granul dilakukan menggunakan 4 wadah masing-masing berisi 250 mL air sebagai media uji. Pada setiap wadah ditambahkan 3,75 gram granul dengan 4 variasi konsentrasi ekstrak biji alpukat dan bahan penghancur. Waktu yang dibutuhkan setiap variasi granul larvasida untuk larut sempurna dihitung. yang ditandai dengan tidak adanya butiran granul larvasida. Granul larvasida yang telah larut sempurna, ditambahkan 13 ekor larva *Aedes aegypti* instar III ke dalam wadah. Pengamatan mortalitas larva selama 24 jam. Pengujian dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali, setiap 1 jam selama 6 jam (Rukminingsih & Pujiastuti, 2020). Menurut (Yuliana *et al.*, 2021) persentase mortalitas larva dihitung dengan :

$$\text{Persentase Mortalitas (\%)}: \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\% \dots (1)$$

Hasil perhitungan dengan rumus pada persamaan (1) menunjukkan konsentrasi efektif yang dapat membunuh larva. Penentuan formula dilakukan dengan metode Desain Faktorial menggunakan *Software Design Expert*. Aras rendah dan aras tinggi yang akan digunakan yaitu rentang konsentrasi ekstrak dan exploitab diinput ke dalam perangkat lunak *Design Expert* untuk memperoleh rancangan formula optimal. Pengujian replikasi sebanyak 3 kali (Kartini *et al.*, 2017).

G. Analisis Data

Data hasil pengamatan yang telah diperoleh dilakukan analisis dengan menggunakan *software SPSS (Statistical Product and Service Solution)*. Data dari hasil penelitian akan di analisis secara statistik dengan uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dengan nilai signifikansi:

1. $P > 0,05$: Data terdistribusi normal
2. $P < 0,05$: Data tidak terdistribusi normal

Jika hasil data terdistribusi normal, maka dapat dilanjutkan dengan *One Way Anova* dimana jika hasil $p < 0,05$ artinya terdapat pengaruh dari masing-masing konsentrasi ekstrak biji alpukat (*Persea Americana* Mill) dan bahan penghancur exploitab terhadap mortalitas atau kematian larva. Jika data tidak terdistribusi normal ataupun tidak homogen maka menggunakan uji *Kruskal Wallis*.

Data hasil uji Optimasi formula kemudian dibandingkan dengan data prediksi dari *Design Expert* menggunakan *software SPSS (Statistical Product*

and Service Solution). Perbandingan dilakukan dengan uji *Paired Sampel T-Test*, jika data terdistribusi normal, dan menggunakan *Mann-Withney* jika data tidak terdistribusi normal. Hasil ditentukan dengan syarat signifikansi $p < 0,05$ terdapat perbedaan signifikan sedangkan $p > 0,05$ tidak terdapat perbedaan yang signifikan.