

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian eksperimental dilakukan dengan mengelompokkan larva *Aedes aegypti* menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Konsentrasi ekstrak biji kedawung pada larva *Aedes aegypti* adalah 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, dan 1%.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni-Juli 2024 dengan lokasi

1. Determinasi biji kedawung (*Parkia timoriana* (DC.) Merr.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Fakultas MIPA jurusan Biologi Universitas Diponegoro.
2. Pembuatan ekstrak biji kedawung (*Parkia timoriana* (DC.) Merr.) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Fakultas Kesehatan Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Fakultas Kesehatan Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
4. Uji larvasida dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Lingkungan Salatiga.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Tanaman biji kedawung didapat dari petani Surabaya Provinsi Jawa Timur.

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini yaitu biji kedawung yang sudah tua dan kering yang berbentuk lonjong dan berwarna hitam.

D. Definisi Operasional

1. Ekstrak biji kedawung (*Parkia timoriana* (DC.) Merr.) diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.
2. Konsentrasi ekstrak adalah konsentrasi yang digunakan untuk melihat efek larvasida.
3. LC₅₀ adalah kematian 50% larva *Aedes aegypti* instar III dari penambahan ekstrak etanol biji kedawung.

E. Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer, yang dikumpulkan secara langsung dari sumber penelitian.

1. Alat dan bahan

a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu, neraca analitik (Ohaus), saringan, blender, evaporator, pipet ukur, pipet tetes, batang pengaduk, ayakan nomor 40 mesh, kompor, *water bath* (Memmert), kertas saring whatman 42, pipet mikro, oven (Memmert UN-55), rak tabung, tabung reaksi (Iwaki), hot plate, beaker glass (Iwaki), kain flanel, cawan

porcelain, corong kaca, stopwatch, gelas ukur (Iwaki), beaker glass (Iwaki), labu ukur (Iwaki), moisture meter (Ohaus), spatula, ball pipet, cup, lidi.

b. Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu, Biji kedawung (*Parkia timoriana* (DC.) Merr.) etanol 96%, aquadest, NH₃, CHCl₃, pereaksi drragendorff, HCl, pereaksi besi (III) klorida, dietil eter, pereaksi Liebermann-Burchard, Abate®.

2. Determinasi tanaman

Tanaman dipilih untuk menentukan validitas sampel yang digunakan, serta identitas biji kedawung (*Parkia timoriana* (DC.) Merr.) yang digunakan sebagai bahan uji dalam penelitian. Penelitian di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro di Semarang.

3. Persiapan bahan

Biji kedawung (*Parkia timoriana* (DC.) Merr.) diperoleh dari *e-commerce* di Surabaya Jawa Timur.

4. Pembuatan simplisia biji kedawung (*Parkia timoriana* (DC.) Merr.)

Simplisia biji kedawung selanjutnya dilakukan sortasi kering yaitu dengan memisahkan kotoran dengan sampel. Langkah selanjutnya yaitu pengupasan kulit luar biji kedawung dengan cara dipecah menggunakan martil dengan posisi vertikal hingga membelah dan mengeluarkan daging biji yang berwarna hijau kekuningan. Setelah pengupasan biji langkah

selanjutnya yaitu menghaluskan biji kedawung menggunakan blender, dan sesudah halus dilakukan pengayakan menggunakan ayakan nomor 40 mesh, dan hasil ayakan ditimbang.

5. Pembuatan ekstrak biji kedawung dengan metode maserasi

Biji kedawung (*Parkia timoriana* (DC.) Merr.) yang sudah menjadi serbuk sebanyak 400 gram kemudian ditambahkan 2000 mL etanol 96%. Maserasi selama 72 jam pengadukan dilakukan setiap 12 jam sekali. Kemudian diremaserasi dengan etanol 96% sebanyak 1000 mL selama 1 x 24 jam, disaring menggunakan kain flanel dan dipisahkan antara ekstrak etanol 96% dengan ampas biji kedawung. Kemudian diuapkan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Filtrat yang didapatkan kemudian dikentalkan dengan *water bath* dengan suhu 50°C (Hidayati *et al.*, 2020).

6. Perhitungan Nilai Rendemen Ekstrak

Hasil perhitungan rendemen pada ekstrak biji kedawung (*Parkia timoriana* (DC.) Merr.) dibagi dengan berat bahan yang digunakan, kemudian hasil dikalikan 100%.

Rendemen ekstrak dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (gram)}}{\text{berat serbuk kering (gram)}} \times 100\%$$

7. Uji Kadar Air Ekstrak

Cawan porselen dioven selama satu jam pada suhu 105 ° C, kemudian ditimbang, dan kemudian menambahkan dua gram ekstrak biji kedawung ke dalam cawan yang sudah ditimbang. Wadah kemudian

dipanaskan kembali pada suhu 105°C selama tiga jam, dan kemudian ditimbang hingga beratnya konstan (Srikandi *et al.*, 2020).

Rumus kadar air

$$\% \text{ kadar air} = \frac{(b - c)}{(b - a)}$$

Keterangan

a = berat konstan cawan.

b = berat cawan dan sampel sebelum dikeringkan.

c = berat cawan dan sampel sesudah dikeringkan.

8. Uji bebas pelarut

Setelah ekstrak mengental, 1 ml asam asetat (CH_3COOH) dan 1 ml asam sulfat (H_2SO_4) ditambahkan pada sejumlah larutan uji. Setelah campuran tercampur, panaskan api bunsen. Jika hasilnya tidak menunjukkan bau ester, maka ekstrak positif tidak mengandung etanol.

Dalam metode kedua, 2 tetes asam sulfat (H_2SO_4) pekat dan 1 mL kalium dikromat ditambahkan ke dalam larutan uji. Perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan menunjukkan bahwa ekstrak mengandung etanol (Rante *et al.*, 2020).

9. Mengidentifikasi senyawa metabolit ekstrak etanol biji kedawung

Identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder ekstrak biji kedawung yang bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya.

a. Pengujian alkaloid

Setelah mengimbang ekstrak 0,5 gram, ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 , 10 mL amonia, dan 2 mL kloroform. Kemudian campurkan lalu diamkan

hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan H₂SO₄ dimasukkan ke 3 tabung reaksi yang masing-masing memiliki volume 2,5 mL. Digunakan pereaksi meyer dan dragendorff untuk menguji larutan dalam tiga tabung. Pereaksi Mayer menunjukkan endapan putih, pereaksi Dragendorff menunjukkan warna merah jingga (Rante *et al.*, 2020).

b. Pengujian flavonoid

Dimasukkan 0,5 gram ekstrak ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air, dan panaskan selama lima menit. Kemudian, ditambahkan 100 mL serbuk Mg, 1 mL asam klorida pekat, dan 3 mL amil alkohol. Kemudian dikocok dengan kuat dan biarkan terpisah. Adanya flavonoid pada lapisan amil alkohol ditunjukkan oleh warna merah, kuning, atau jingga (Noer *et al.*, 2018).

c. Pengujian saponin

Dalam tabung reaksi, 0,5 gram ekstrak dan tambahkan 10 mL aquades. Dikocok dengan kuat selama sekitar 1 menit, tunggu selama 10 menit dan perhatikan apakah terbentuk buih atau busa. Terbentuknya buih yang stabil selama sepuluh menit dengan tinggi 1-3 cm menunjukkan adanya senyawa saponin dalam sampel (Noer *et al.*, 2018).

10. Pengujian Larvasida

a. Pembuatan larutan kontrol positif

Pembuatan larutan kontrol positif Abate® 0,01% yaitu dengan menimbang Abate® sebanyak 10 mg lalu masukkan ke dalam wadah yang terisi air sebanyak 100 mL lalu aduk hingga tercampur.

b. Pembuatan seri konsentrasi sampel

Pembuatan konsentrasi 0,6% yaitu dengan menimbang 0,6 gram ekstrak kental lalu ditambahkan dengan aquades hingga volume 100 mL lalu diaduk hingga terlarut lalu masukkan dalam wadah yang sudah disiapkan dan diberi tanda konsentrasi 0,6%. Pada pembuatan konsentrasi 0,7% yaitu menimbang ekstrak kental sebanyak 0,7 gram lalu tambahkan aquades hingga 100 mL lalu aduk hingga ekstrak terlarut masukkan dalam wadah yang sudah disiapkan dan diberi tanda konsentrasi 0,7%. Lalu pembuatan konsentrasi 0,8% dengan cara menimbang 0,8 gram ekstrak kental lalu tambahkan aquades sebanyak 100 ml lalu aduk hingga larut lalu masukkan dalam wadah yang sudah disiapkan dan diberi tanda konsentrasi 0,8%. Selanjutnya untuk pembuatan konsentrasi 0,9% yaitu timbang ekstrak kental 0,9 gram dan ditambahkan aquades sebanyak 100 mL lalu aduk hingga tercampur lalu masukkan dalam wadah yang sudah diberi tanda konsentrasi 0,9%. Pada pembuatan konsentrasi 1% yaitu menimbang ekstrak kental sebanyak 1 gram lalu ditambahkan dengan aquades sebanyak 100 mL lalu aduk hingga larut lalu masukkan dalam wadah yang sudah diberi tanda konsentrasi 1%.

c. Uji larvasida

Langkah awal yaitu dengan cara menyiapkan wadah cup lalu masukkan larutan konsentrasi 0,6%, 0,7% 0,8% 0,9% dan 1% yang sudah dibuat lalu masukkan larva *Aedes aegypti* instar III sebanyak 10 ekor setiap

wadahnya. Selanjutnya menyiapkan wadah kontrol diberi Abate® 0,01% selanjutnya masukkan larva sebanyak 10 ekor lalu di tunggu selama 1 x 24 jam lalu amati dan mencatat kematian larva. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

F. Pengolahan Data

Pengolahan data yang digunakan yaitu menghitung nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50*) atau bisa diartikan dengan menghitung kematian 50% larva dengan cara mencatat kematian larva 1 x 24 jam perlakuan selanjutnya menghitung rata-rata kematian dengan persentase lalu menganalisis untuk menentukan konsentrasi menggunakan LC_{50} jumlah larva.

G. Analisis Data

Pengolahan data dengan cara menggunakan metode Kruskal-Wallis untuk menentukan Mann-Whitney yang menghasilkan nilai signifikan. Data efektivitas larvasida menggunakan analisis probit untuk memperoleh nilai *Lethal Concentration* LC_{50} (Riyadi *et al.*, 2018).

Data hasil pengamatan yang diperoleh dilakukan analisis dengan menggunakan *software* SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Pengolahan data dengan cara menggunakan metode Kruskal-Wallis untuk menentukan Mann-Whitney yang menghasilkan nilai signifikan.

Data hasil penelitian akan dianalisis secara statistik dengan uji Mann-whitney:

1. Tidak signifikan ($p > 0,05$)
2. Signifikan ($p < 0,05$)

Hasil analisis probit dalam menentukan nilai LC_{50} diperoleh dosis konsentrasi ekstrak yang direkomendasikan untuk membunuh larva *Aedes aegypti* instar III sebesar 50% dari total larva uji selama 24 jam.

