

BAB III

METODE PENELITIAN

A. *Desain penelitian*

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, penelitian dalam pengujian yang disebabkan suatu pengaruh atau perlakuan. Dalam hal ini mengetahui konsentrasi optimal biji alpukat (*Persea americana* Mill) dan starch 1500 yang menghasilkan mutu fisik granul larvasida dan mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti*.

B. *Lokasi Penelitian*

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 Balai Besar Laboratorium Kesehatan Lingkungan Salatiga.

C. *Subjek Penelitian*

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah biji alpukat (*Persea americana* Mill). Biji alpukat ini digunakan sebagai granul larvasida. Biji alpukat diperoleh di daerah Bergas Kabupaten Semarang tempat warung jus Karangjati. Biji alpukat (*Persea americana* Mill) yang digunakan dalam penelitian sebanyak 6 kg.

D. Variabel Penelitian

Variabel penelitian (objek penelitian) adalah suatu objek atau kegiatan yang mempunyai variasi tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Rezka, 2020).

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pengaruh dari hasil yang diharapkan. Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill) dan starch 1500.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini dengan parameter yaitu kadar air, waktu larut, kecepatan alir, dan sudut diam. sediaan granul dan mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti*.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah bahan dan alat penelitian, proses ekstraksi metode maserasi dan pembuatan granul larvasida dari biji alpukat (*Persea americana* Mill).

E. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu pisau, penjemur dari bambu yang berlubang lubang, kain hitam, cawan porselin, (*flowbility tester*), corong, (*stopwatch*), pengaduk, tabung reaksi, (*Rotary vaccum evaporator*), mesh 16 dan 18, alat fotografi, mesh 40 dan kontainer, (*waterbath*), (*beaker glass*), pipet tetes, neraca digital, cawan porselen dan gelas ukur. Bahan yang digunakan biji alpukat, larva *Ae. aegypti instar* IV, air kran, etanol 96%, dan strach 1500, serbuk magnesium, HCl pekat, HCl 2N, larutan besi (III) klorida 3%, Kalium

iodida, CH₃COOH glasial, dragendroff, *Saccharum lactis*, PVP, H₂SO₄, natrium benzoat, asam asetat dan Abate[®].

2. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman alpukat (*Persea americana* Mill) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosismatika jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

3. Pengumpulan dan pengeringan bahan

Biji alpukat yang telah terkumpul kemudian dibelah dan dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada biji alpukat. Biji yang sudah bersih dipotong kecil-kecil lalu disebar di atas penjemur yang berlubang dan dijemur di bawah sinar matahari langsung dengan ditutup kain hitam. Biji alpukat yang sudah kering dimasukkan ke blender untuk dihaluskan hingga menjadi serbuk. Biji yang sudah menjadi serbuk kemudian di ayak menggunakan mesh 40 hingga didapatkan serbuk yang halus.

4. Uji kadar air simplisia

Kadar air adalah kandungan air yang terdapat pada simplisia biji alpukat (*Persea americana* Mill). Kadar air ditentukan dengan menimbang 2 gram simplisia biji alpukat (*Persea americana* Mill). Kadar air dapat ditentukan dengan cara menimbang cawan *moisture analyzer* kosong kemudian sampel simplisia biji alpukat (*Persea americana* Mill) dimasukkan ke dalam cawan. Sampel ditimbang menggunakan cawan *moisture analyzer* yang diatur pada suhu 105°C penutup *moisture analyzer* ditutup dan ditunggu selama beberapa menit hingga muncul hasil kadar airnya (Kusuma *et al.*, 2023).

5. Uji kadar abu (*ash*)

Penentuan kadar abu dilakukan dengan cara mengeringkan cawan porselin, selanjutnya cawan ditimbang bobot kosongnya. Masukkan sampel ke dalam cawan kosong tersebut. Cawan yang telah berisi sampel selanjutnya dimasukkan ke dalam *furnace* dengan suhu 400°C selama 3 jam sampai sampel menjadi abu. Selanjutnya cawan diangkat dari dalam tanur dan didinginkan di dalam desikator, lalu ditimbang (Kusuma *et al.*, 2023). Kadar abu dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:

a = Bobot cawan (g)

w = Bobot sampel (g)

x = Berat (cawan + abu) (g)

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

Simplisia Biji alpukat diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, sejumlah 200 gram simplisia yang sudah menjadi serbuk dimasukkan dalam wadah maserasi, kemudian direndam dengan 1,5 liter etanol 96% selama 5 hari dalam suhu ruangan dan dilakukan pengadukan sesekali. Selanjutnya diremaserasi selama 2 hari dengan 500 mL etanol 96%. Setelah itu filtrat menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak yang masih mengandung pelarut dalam volume yang kecil kemudian diuapkan dengan *waterbath* pada suhu 50°C hingga didapatkan ekstrak etanol kental (Nadya, 2019).

7. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui masih ada atau tidaknya etanol yang terkandung dalam ekstrak. Uji bebas etanol dilakukan dengan cara 1 gram ekstrak kental

ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 dan 2 tetes asam asetat kemudian dipanaskan. Ekstrak dinyatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester yang khas dari etanol (Wardiyah, 2021).

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

a. Flavonoid

Sebanyak 0,3 gram ekstrak ditambahkan dengan air panas secukupnya, kemudian didihkan selama 10 menit lalu disaring. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan 0,05 mg serbuk Magnesium dan 7 tetes HCl pekat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning, jingga, dan coklat menuju merah (Kopon, Baunsele and Boelan, 2020).

b. Saponin

Sebanyak 2 gram ekstrak dimasukan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan 10 mL air panas lalu didinginkan, setelah itu dikocok kuat-kuat ± 10 detik lalu tambahkan 1 tetes HCl 2N. Uji dikatakan positif ditandai dengan adanya buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama 10 menit (Kopon, Baunsele and Boelan, 2020).

c. Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 2 tetes larutan besi (III) klorida 1%. Jika terjadi perubahan warna coklat keruh menuju hitam menunjukkan adanya tanin (Kopon, Baunsele and Boelan, 2020).

d. Alkaloid

Sebanyak 0,1 gram sampel dengan Kalium Iodida 5 mL dan ditambahkan CH_3COOH glasial 5 mL. kemudian dimasukan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 tetes. Selanjutnya ditambahkan pereaksi dragendroff pada tabung eaksi. Pada pereaksi

dragendroff akan terbentuk endapan yang menandakan positif adanya alkaloid (Kopon, Baunsele and Boelan, 2020).

9. Formula Larvasida Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill)

a. Formula Granul Larvasida

Granul larvasida dibuat dengan menggunakan metode granulasi basah. Formula granul ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill). Formula granul didapatkan dengan menggunakan aplikasi *design expert* untuk bagian ekstrak biji alpukat menggunakan aras bawah 0,09% dan aras atas 8% sedangkan strach 1500 menggunakan aras bawah 5% dan aras atas 10%. Penentuan aras atas dan bawah starch 1500. Aras rendah dan Aras tinggi terdapat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Aras Rendah dan Aras Tinggi Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill) dan strach 1500.

	Aras Rendah (%)	Aras Tinggi (%)
Ekstrak biji alpukat	0,09	8
Strach 1500	5	10

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 dikuantifikasi. (Hidayat, Zuhrotun, and Sopyan 2020).

Tabel 3. 2 Formula Granul Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill) dengan Bahan Penghancur Strach 1500 Design Expert 13

	Std	Run	Ekstrak (%)	Strach 1500 (%)
	4	F1	8	5
	2	F2	0.09	5
Desain	3	F3	0.09	5
faktorial	11	F4	8	10
terdapat	5	F5	8	5
faktor,	9	F6	0.09	10
level dan	8	F7	0.09	10
efek.	1	F8	0.09	5
Faktor	10	F9	8	10
diartikan	6	F10	8	5
sebagai	7	F11	0.09	10
besaran	12	F12	8	10

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 (factor non-numerikal. Misal, mutu/kualitas polimer). Level diartikan nilai atau tetapan untuk faktor. Efek adalah perubahan respon yang disebabkan variasi tingkat faktor. Respon diartikan sifat atau hasil percobaan yang diamati dan dapat dikuantifikasi (Hidayat et al. 2020).

Tabel 3. 2 Formula Granul Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill) dengan Bahan Penghancur Strach 1500 Design Expert 13

Std	Run	Ekstrak (%)	Strach 1500 (%)	PVP (%)	Natrium Benzoat (%)	Saccharum Lactis

						(%)
4	F1	8	5	0,5	0,1	93,2
2	F2	0.09	5	0,5	0,1	97,29
3	F3	0.09	5	0,5	0,1	97,29
11	F4	8	10	0,5	0,1	90,7
5	F5	8	5	0,5	0,1	93,2
9	F6	0.09	10	0,5	0,1	94,79
8	F7	0.09	10	0,5	0,1	94,79
1	F8	0.09	5	0,5	0,1	97,29
10	F9	8	10	0,5	0,1	90,7
6	F10	8	5	0,5	0,1	93,2
7	F11	0.09	10	0,5	0,1	94,79
12	F12	8	10	0,5	0,1	90,7

b. Pembuatan Granul

Pembuatan granul diawali dengan melakukan penimbangan, langkah pertama natrium benzoat 0,1% di larutkan dengan etanol sebanyak 10 mL, langkah kedua, campurkan PVP 0,5% sebanyak 5 mL dengan ekstrak kental, langkah ketiga, campurkan starch 1500 dan *saccharum lactis* ad 100. Campur semua bahan dan aduk hingga homogen. Lalu diayak menggunakan mesh No. 16, hasil ayakan kemudian dikeringkan dalam lemari pengering pada suhu 50°C hingga kering. Granul yang sudah kering kemudian diayak kembali dengan menggunakan mesh No.18 untuk menyeragamkan ukuran granul.(Elisabeth, Yamlean and Supriati, 2018).

F. Evaluasi Mutu Fisik

1. Uji Kadar Air

Granul kering dimasukkan sebanyak 3 gram ke dalam cawan, lalu dimasukkan ke dalam *moisture analyzer* pada suhu 105°C hingga alat berbunyi dan lampu alat mati (Mursalim, 2017).

2. Uji Kecepatan Alir

Granul dimasukkan sebanyak 100 gram ke dalam *flowbility tester* sampai masa granul melewati corong, lalu dicatat waktunya (Husni *et al.*, 2011)

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

3. Sudut Diam

Sejumlah 100 gram masa granul dimasukkan ke dalam corong, granul yang jatuh akan membentuk kerucut. Kerucut lalu diukur tinggi dan diameternya (Jamal, Susilawaty and Azriful, 2016).

$$\text{Tan } \alpha : \frac{h}{r}$$

Keterangan :

α = Sudut istirahat

h = Tinggi kerucut (cm)

r = Jari-jari kerucut (cm)

4. Waktu larut

Pengujian waktu larut dilakukan dengan menimbang sebanyak 20 gram granul. Granul yang telah ditimbang kemudian dilarutkan pada 200 mL air. Waktu larut dimulai dari granul dimasukan hingga granul larut sempurna di larutan. Kecepatan larutnya dihitung dengan stopwatch. Syarat yang diperlukan granul untuk melarut kurang dari 5 menit. Air

yang digunakan yaitu air dingin dengan pengadukan secara kontinyu saat granul dilarutkan (Husni *et al.*, 2011).

G. Uji Larvasida

1. Pembagian Kelompok

Granul yang telah dipersiapkan akan pindahkan ke dalam kontainer yang telah dipersiapkan dan dibagi menjadi 4 kelompok formula, 1 kelompok ekstrak aras tinggi dan rendah dengan 2 kontrol positif dan negatif. Dengan pembagian sebagai berikut:

Table 3.4 Variasi Pengujian Larvasida

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

2. Pengujian Larvasida

Pengujian larvasida dilakukan dengan 12 formula yaitu ekstrak untuk aras rendah dan tinggi, 1 kontrol positif, 1 kontrol negatif, dan 4 granul larvasida dengan variasi konsentrasi ekstrak biji alpukat dan bahan penghancur. Sebagai berikut:

- a. Kontrol positif dilakukan dengan melarutkan 250 mL air dengan 0,225 gram abate setelah itu dimasukkan 13 ekor larva *Aedes aegypti* instar IV.
- b. Kontrol negatif dilakukan dengan menambahkan 250 mL air kran dan 13 ekor larva *Aedes aegypti* instar IV.
- c. Kelompok ekstrak aras rendah dengan 3,375 mg dilarutkan ke dalam 250 mL air setelah itu dimasukkan 13 ekor larva *Aedes aegypti* instar IV.
- d. Kelompok ekstrak aras tinggi dengan 0,3 gram dilarutkan ke dalam 250 mL air setelah itu masukkan 13 ekor larva *Aedes aegypti* instar IV.
- e. Pada tiap *beaker glass* ditambahkan 3,75 gram granul larvasida dari 12 formula variasi konsentrasi ekstrak biji alpukat dan bahan penghancur. F1, F2, F3. sampai F12 ke dalam 250 mL air setelah itu masukkan 13 ekor larva *Aedes aegypti* IV.

- f. Pengamatan dilakukan selama 6 jam dimana tiap 1 jam dilakukan pengamatann lalu diamati lagi setelah 24 jam dilakukan dengan replikasi 3 kali.

H. Analisis Data

Data hasil uji daya larvasida ekstrak biji alpukat di analisis dengan menghitung mortalitas larva dan analisis statistik menggunakan SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) dan Design Expert. Data dari hasil penelitian akan di analisis secara statistik dengan uji normalitas (Shapiro-Wilk) dengan nilai signifikansi:

$P > 0,05$: Data terdistribusi normal

$P < 0,05$: Data terdistribusi tidak normal

Jika hasil data terdistribusi normal, maka dapat dilanjutkan dengan *One Way Anova*. Jika data terdistribusi tidak normal ataupun tidak homogen maka menggunakan uji *Kruskal Wallis*.