

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Maret 2025 di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi S-1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi dan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Lingkungan Salatiga Semarang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan antara lain *Rotary evaporator* (Biobase RE-301), Oven (Yeneko), Timbangan analitik (*Pioneer precision balance* 320), *Waterbath* (Biobase), Kompor listrik (Maspion), *Blender* (Philips), Desikator (Tipe standar CL62930-06), *Moisture analyzer* (Biobase DSH-50), gelas ukur 100 mL (*Pyrex*), tabung reaksi (*Pyrex*), rak tabung reaksi, cawan porselen 60 mL (*Pyrex*), mortir, stamper, ayakan Mesh No 16, ayakan Mesh No 12, corong kaca (*Pyrex*), kurs porselen 50 mL (*Pyrex*), gelas plastik 300 mL, pipet tetes (*Pyrex*), batang pengaduk (*Pyrex*), mangkuk, toples kaca, *stopwatch*, sendok tanduk, kaca pembesar, jaring-jaring, penggaris, kain kasa, kain flannel, kapas.

3.2.2 Bahan Penelitian

Sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol akar dan daun pulai (*Alstonia scholaris* (L) R. Br), etanol 70%, serbuk themepos (abate), larva *Aedes aegypti* instar III, pereaksi Mayer, pereaksi Dregendroff, pereaksi Wagner, serbuk magnesium, HCl pekat, FeCl₃, H₂SO₄, PVP, laktosa dan aquadest.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan eksperimental murni (*true experiment*) dengan rancangan *Posttest Only Control Group Design*, yaitu merupakan desain penelitian yang tidak menggunakan pretes terhadap sampel perlakuan. Dalam desain ini terdapat dua kelompok masing-masing dipilih secara acak (*randomization*) meliputi kelompok kontrol pembanding dan kelompok eksperimen dengan berbagai konsentrasi granul ekstrak akar dan daun pulai (*Alstonia scholaris* (L) R. Br) dengan tujuan untuk mengetahui berapa nilai LC_{50} aktivitas larvasda dari granul ekstrak akar dan daun pulai (*Alstonia scholaris* (L) R. Br).

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel terikat, variabel bebas pada penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak akar dan daun pulai (*Alstonia scholaris* (L) R. Br) pada sediaan granul.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena adanya variabel bebas, variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah kematian larva *Aedes aegypti* setelah pemberian perlakuan.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol merupakan variabel yang sengaja dikendalikan atau dibuat konstan sehingga pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat tidak terpengaruh oleh faktor eksternal yang tidak diselidiki. Vari-

abel terkendali pada penelitian ini adalah hewan uji, ekstraksi, pengambilan sampel, larutan kontrol positif dan kontrol negatif.

3.4 Prosedur penelitian

Prosedur penelitian aktivitas larvasida ekstrak etanol akar dan daun pulai (*Alstonia scholaris* (L) R. Br) terhadap larva *Aedes aegypti* meliputi:

3.4.1 Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan pulai dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi. Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran pada tumbuhan yang digunakan dalam penelitian (Klau & Hesturini, 2021).

3.4.2 Preparasi Sampel

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu akar dan daun pulai (*Alstonia scholaris* (L) R. Br) yang diperoleh dari daerah Wisata Kesehatan Jamu (WKJ), Kabupaten Tegal. Akar pulai yang dibutuhkan sebanyak 1 kg berat basah dan daun pulai yang dibutuhkan sebanyak 10 kg berat basah, kemudian dilakukan sortasi. Setelah dilakukan sortasi, akar dan daun pulai dicuci dengan air bersih untuk membersihkan akar dan daun pulai dari kotoran yang menempel, selanjutnya dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C hingga kadar air kurang dari 10%. Akar dan daun pulai yang telah kering kemudian diserbuk dengan menggunakan *blender* kemudian diekstraksi (Saleh *et al.*, 2022).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi akar dan daun pulai dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% yang dilakukan di Laboratorium Bahan

Alam Farmasi Universitas Bhamada Slawi. Ditimbang sebanyak 450 gram simplisia akar pulai yang sudah halus dan 741 gram simplisia daun pulai yang sudah halus, kemudian kedua simplisia tersebut dilakukan maserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:4 (b/v) selama 3 hari dan sesekali dilakukan pengadukkan. Maserat disaring menggunakan kain flannel dan dievaporasi menggunakan *Vaccum Rotary Evaporator* dengan suhu 40°C untuk mendapatkan ekstrak kental akar dan daun pulai (Suryadi *et al.*, 2024). Ekstrak kental yang didapatkan ditimbang berat bersihnya, kemudian dilakukan perhitungan persen rendemen dengan rumus sebagai berikut (Wenas *et al.*, 2023):

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Bobot sampel yang di ekstrak (g)}} \times 100\%$$

3.4.4 Standarisasi Ekstrak

Berikut parameter standarisasi ekstrak spesifik dan non spesifik, antara lain:

1. Uji parameter spesifik

Uji parameter spesifik meliputi uji organoleptis dengan panca indra pada ekstrak akar dan daun pulai (*Alstonia scholaris* (L) R. Br) (Utami *et al.*, 2017).

2. Uji parameter non spesifik

Uji parameter non spesifik meliputi:

a. Uji susut pengeringan

Uji susut pengeringan dilakukan untuk memberikan batasan maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses

pengeringan. Uji susut pengeringan dapat diketahui dengan cara menimbang ekstrak sebanyak 1 gram dan dimasukkan kedalam kurs porselen tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit, sebelum ditimbang ekstrak diratakan dalam kurs porselen, dengan menggoyangkan kurs hingga membentuk lapisan setebal 5-10 mm. Masukkan kedalam oven, buka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap, kemudian didinginkan dalam deksikator (Utami *et al.*, 2017).

b. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui masih ada atau tidaknya etanol yang terkandung dalam ekstrak. Pengujian ini dilakukan dengan cara meimbang ekstrak sebanyak 0,5 gram lalu ditambahkan 2 mL asam asetat dan 2 mL H_2SO_4 , selanjutnya tutup tabung reaksi dengan kapas serta dipanaskan sampai mendidih. Setelah mendidih diidentifikasi bau ester pada kapas. Hasil positif ekstrak bebas etanol ditandai dengan tidak terciumnya bau ester wangi dari etanol pada kapas (Priamsari & Rokhana, 2020).

c. Uji penetapan kadar air

Uji penetapan kadar air dilakukan untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam ekstrak, yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dan berdampak buruk pada

kandungan senyawa aktif selama proses penyimpanan. Timbang ekstrak sebanyak 1 gram dalam *punch* dimasukkan kedalam *moisture analyzer*. Sampel diratakan hingga menutupi permukaan *punch* lalu ditutup, pada suhu 105°C, sampai terdengar bunyi bip yang menandakan bahwa proses telah selesai. Pada layar akan tertera persen kadar air dari sampel yang diujikan secara otomatis. Persyaratan kadar air tidak boleh lebih dari 10% (Effendi *et al.*, 2016).

3.4.5 Skrining Fitokimia

1. Pengujian Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air suling lalu dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit dan didinginkan kemudian disaring. Hasil filtrat yang diperoleh digunakan untuk uji alkaloid, diambil 3 tabung reaksi dan kedalamnya dimasukkan 3 tetes filtrat. Masing-masing tabung reaksi pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer sampai terbentuk endapan berwarna putih atau kuning. Tabung reaksi kedua ditambahkan 2 tetes pereaksi Wagner sampai terbentuk endapan coklat. Tabung reaksi ketiga ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendroff sampai terbentuk endapan jingga. Sampel dikatakan mengandung alkaloid jika terjadi endapan atau kekeruhan paling sedikit pada dua dari tiga percobaan diatas (Sagala *et al.*, 2022).

2. Pengujian Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan 10 mL air panas kemudian didinginkan dan dikocok kuat sampai mengeluarkan busa, lalu ditambahkan 1 tetes asam klorida 2N dan jika busa tersebut tidak hilang maka ekstrak tersebut positif mengandung saponin (Sagala *et al.*, 2022).

3. Pengujian Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 10 mL air panas kemudian dipanaskan kembali selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Ambil 5 mL filtrat kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida pekat. Kocok larutan dengan kuat, jika hasilnya berwarna merah, kuning atau jingga maka positif mengandung flavonoid (Sagala *et al.*, 2022).

4. Pengujian Tanin

Sebanyak 0,5 gram ditambah 10 mL air suling lalu disaring. Filtrat diencerkan pada labu ukur 50 mL dengan air suling sampai tanda batas. Ambil 2 mL filtrat lalu ditambahkan 2 tetes FeCl₃, jika menghasilkan warna biru tua atau hijau kehitaman maka menunjukkan adanya tanin (Sagala *et al.*, 2022).

3.4.6 Formulasi Sediaan Granul

Sediaan granul dibuat dalam 4 formula yang dibedakan pada konsentrasi ekstrak etanol akar dan daun pulai pulai (*Alstonia scholaris* (L) R. Br). Masing-masing granul mengandung ekstrak akar dan daun

pulai sebesar 0;10;15; dan 20%. Formula sediaan granul dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3. 1 Formulasi sediaan granul akar/daun pulai (Rowe *et al.*, 2009).

Bahan	Formulasi (%)				Standar (%)	Fungsi
	KN	F1	F2	F3		
Ekstrak akar/daun pulai (g)	-	10	15	20	-	Zat Aktif
PVP	2	2	2	2	0,5-5%	Pengikat
Laktosa	ad	ad	ad	ad	-	Pengisi
	100	100	100	100		
Aquadest	qs	qs	qs	qs	-	Pembasah

3.4.7 Pembuatan Granul

Proses pembuatan granul diawali dengan menimbang ekstrak akar, ekstrak daun pulai (*Alstonia scholaris* (L) R. Br), PVP, dan laktosa sesuai perhitungan. Hasil penimbangan dimasukkan ke dalam mortir digerus hingga homogen, kemudian tambahkan aquadest secukupnya sampai terbentuk massa yang kompak. Massa yang diperoleh diayak dengan menggunakan pengayak No. Mesh 16 untuk menghasilkan granul dengan ukuran yang serupa, selanjutnya granul dikeringkan dalam oven bersuhu 50°C selama kurang lebih 1 jam. granul diayak kembali dengan pengayak No. Mesh 16 (Suhaimi & Kartikasari, 2018).

3.4.8 Uji Evaluasi Granul

1. Uji Organoleptis

Dilihat secara langsung mulai dari bentuk, warna, bau dan rasa dari granul yang dihasilkan. Bentuk, warna yang dihasilkan sedapat

mungkin sama antara satu dengan yang lainnya (Elisabeth *et al.*, 2018).

2. Uji Kandungan Lembap

Pada uji ini digunakan *moisture balance*, pada alat tersebut dimasukkan 1 gram granul dalam alumunium foil lalu ditara dan diukur kandungan lembapnya dengan menekan tombol *start* maka akan didapatkan persen kandungan lembap. Kandungan lembap yang baik adalah 1-5% (Husni *et al.*, 2020).

3. Uji Kecepatan Alir

Aliran granul diuji dengan mengalirkan 25 gram granul kedalam corong kaca kemudian dicatat waktunya saat granul melewati corong kaca. Daya alir granul dihitung dengan perbandingan waktu dan massa granul setelah melewati corong kaca (Daswi & Arisanty, 2020).

4. Uji Sudut Istirahat

Sudut istirahat ditentukan dengan memasukkan sejumlah massa granul ke dalam corong kaca. Massa yang jatuh akan membentuk kerucut, lalu diukur tinggi dan diameter kerucut menggunakan penggaris (Daswi & Arisanty, 2020).

5. Uji Waktu Larut

Uji waktu larut dilakukan dengan menimbang sebanyak 20 gram granul dan dilarutkan kedalam 200 mL air. Kemudian dihitung kecepatan melarutnya dengan stopwatch. Syarat waktu yang

diperlukan granul untuk melarut kurang dari 5 menit. Air yang digunakan adalah air dingin dengan pengadukkan secara kontinyu saat granul dilarutkan (Husni *et al.*, 2020).

3.4.9 Uji Larvasida

1. Penyiapan Larva Uji

Larva yang menjadi sampel pada penelitian ini didapatkan dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Lingkungan Salatiga Semarang. Jenis larva yang akan digunakan yaitu larva *Aedes aegypti* instar III yang berukuran 4-5 mm atau berumur 3-4 hari setelah telur menetas (WHO, 2005).

2. Penyiapan Larutan Uji Kontrol Negatif

Larutan uji kontrol negatif dibuat dengan penambahan granul tanpa ekstrak sebanyak 0,01 gram kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquadest diaduk sampai homogen dengan batang pengaduk dan dimasukkan 10 ekor larva *Aedes aegypti* dalam wadah gelas plastik (Suhaimi & Kartikasari, 2018).

3. Penyiapan Larutan Uji Kontrol Positif

Larutan uji kontrol positif menggunakan serbuk temephos (abate) 0,01%. Dibuat larutan temephos dengan cara menimbang serbuk temephos sebanyak 0,01 gram kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquadest, diaduk sampai homogen dengan batang pengaduk dan dimasukkan 10 larva *Aedes aegypti* dalam wadah gelas plastik (Suhaimi & Kartikasari, 2018).

4. Uji toksisitas Larvasida

Pengujian aktivitas larvasida dilakukan pada 5 wadah gelas plastik yang telah diisi dengan larutan konsentrasi dan 10 ekor larva *Aedes aegypti*, 3 gelas plastik sebagai wadah eksperimen dan 2 gelas plastik sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan untuk memenuhi jumlah sampel yang diperlukan dan diamati selama 24 jam (Suhaimi & Kartikasari, 2018). Kematian larva ditandai dengan ketidakmampuan larva naik ke permukaan air atau tidak menunjukkan reaksi menyelam yang khas ketika air terganggu (WHO, 2005). Aktivitas larvasida dapat diketahui dari nilai *Lethal Concentration* (LC₅₀) pada perlakuan selama 24 jam.

3.5 Analisis data

Analisis data dilakukan setelah diperoleh nilai kematian hewan uji kemudian untuk menghitung nilai LC₅₀ dengan menggunakan metode analisis regresi probit. Perhitungan statistik dilakukan dengan menggunakan program statistik SPSS (*Statistical Product Service Solution*). Data yang diperoleh dapat disajikan dalam bentuk tabel, narasi dan pembahasan yang diakhiri dengan penarikan kesimpulan.