

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Jurusan Biologi Undip dan Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Undip. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 1999 sampai dengan Maret 2000.

#### B. Alat dan Bahan

##### B.1. Alat :

- Mangkuk Plastik
- Gelas Ukur
- Nampan Plastik
- Timbangan Elektrik
- Cawan Petri
- Erlenmeyer
- Botol maserasi
- Ayakan
- Pipet Tetes
- Kuas kecil
- Kaca Pembesar
- Rotary Evaporator
- Blender

##### B.2. Bahan :

- Daun Mindi (*M. azedarach*)
- Telur *Aedes aegypti*
- Ekstrak hati sapi
- Etanol 96%
- Aquades
- Air sumur
- Larutan Tween 80

## C. Cara Kerja

### C.1. Pengadaan Ekstrak Etanol Daun Mindi (*M. azedarach*)

Bahan ekstrak diperoleh dari daerah Boyolali. Daun mindi dipisahkan dari ranting dan kotoran lainnya, kemudian dikeringanginkan selama kurang lebih satu minggu pada suhu kamar, agar senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung didalam daun tidak rusak oleh sinar matahari. Setelah kering daun digiling dengan menggunakan blender sehingga menjadi serbuk. Serbuk diayak dengan menggunakan ayakan untuk mendapatkan serbuk yang halus. Kemudian serbuk dimacerasi dengan menggunakan pelarut polar etanol 96% selama 3-4 hari pada suhu kamar untuk menarik senyawa-senyawa yang terkandung di dalam serbuk. Setelah 3-4 hari langkah selanjutnya adalah dilakukan penyaringan untuk mendapatkan maserat yang ditampung dalam erlenmeyer. Ampasnya dimacerasi ulang sampai beberapa kali dengan pelarut yang sama sampai filtrat yang diperoleh tidak berwarna atau bening. Selanjutnya larutan dikisatkan dengan alat "rotary eveporator" pada suhu paling tinggi 50<sup>0</sup>C sehingga diperoleh ekstrak yang kental yang digunakan untuk penelitian (Harborne, 1997).

### C.2. Pengadaan Hewan Uji

Hewan uji berasal dari telur *Aedes aegypti* yang diperoleh dari Stasiun Penelitian Vektor Penyakit (SPVP) Salatiga. Telur ditetaskan dalam nampan plastik yang berisi air sumur. Setiap hari larva diberi pakan ekstrak hati sapi. Larva dipelihara sampai instar 3 dan kemudian digunakan sebagai perlakuan.

## D. Uji Toksisitas

### D.1. Pengaruh ekstrak etanol daun mindi (*M.azedarach*) terhadap mortalitas larva *A. aegypti*

#### D.1.1. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mencari konsentrasi antara batas atas ( $LC_{90}$ -24 jam) dan dengan konsentrasi ambang bawah ( $LC_5$ -48 jam) untuk menentukan konsentrasi yang digunakan pada uji sesungguhnya.

Pada uji ini digunakan lima konsentrasi bahan uji ditambah satu konsentrasi sebagai kontrol yaitu konsentrasi 0, 2%, 4%, 8%, 16% (b/v). Konsentrasi bahan uji dibuat dengan mengencerkan ekstrak dengan aquadest ditambah larutan tween 80 sebagai pencampur bahan. Hewan uji adalah larva *Aedes aegypti* instar III. Pengamatan dilakukan setiap 6, 12, 18, 24, ....., 48 jam setelah aplikasi. Kriteria batas-batas nilai  $LC_5$  -  $LC_{90}$  adalah konsentrasi yang mengakibatkan kematian sebanyak 5% dan 90% dari jumlah hewan uji.

#### D.1.2. Uji Utama

Berdasarkan nilai  $LC_5$  - 48 jam dan  $LC_{90}$ -24 jam yang diperoleh dari uji pendahuluan maka ditentukan 5 tingkatan konsentrasi uji dan 1 perlakuan kontrol. Setiap perlakuan dengan 3 kali ulangan dan setiap ulangan menggunakan 20 ekor larva instar III. Pengamatan dilakukan 6, 12, 18, 24, ....., 48 jam setelah aplikasi. Nilai  $LC_{50}$  ditentukan dengan Analisa Probit menurut Busvine-Nash (Koestoni, 1985).

## D.2. Pengaruh ekstrak etanol daun mindi (*M. azedarach*) terhadap mortalitas, pertumbuhan dan perkembangan larva *A. aegypti*.

### D.2.1. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui batas-batas ( $LC_5$  48 jam -  $LC_{90}$  24 jam). Hewan uji yang digunakan adalah larva *Aedes aegypti* instar I. Dalam uji pendahuluan digunakan 5 tingkatan konsentrasi ekstrak (b/v) yaitu 0,01%; 0,03%; 0,07%; 0,1%; 0,5% dan 0% sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan pada 6, 12, 18, 24,....., 48 jam setelah aplikasi.  $LC_5$  -  $LC_{90}$  adalah konsentrasi yang mengakibatkan kematian sebanyak 5% dan 90% dari jumlah hewan uji.

### D.2.2. Uji Utama

Berdasarkan nilai-nilai  $LC_5$  - 48 jam dan  $LC_{90}$  - 24 jam yang diperoleh dari uji pendahuluan maka ditentukan 5 tingkatan konsentrasi uji dan 1 perlakuan kontrol. Setiap perlakuan dengan 3 ulangan dan setiap ulangan menggunakan 20 ekor larva instar I. Pengamatan dilakukan 6, 12, 18, 24,....., 48 jam setelah aplikasi. Nilai  $LC_{50}$  ditentukan dengan analisa probit menurut Bushvine-Nash (Koestoni, 1985).

### D.2.3. Uji Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Larva *A.aegypti*

Untuk uji pertumbuhan dan perkembangan ditentukan 5 tingkatan konsentrasi dibawah nilai  $LC_{50}$  yang diperoleh dan satu perlakuan sebagai kontrol. Setiap perlakuan diulang 3 kali dan setiap ulangan menggunakan 20 ekor larva instar I. Pengamatan dilakukan mulai larva instar I sampai menjadi pupa.

Pertumbuhan larva dapat digambarkan oleh kemampuan larva untuk molting dan berkembang menjadi instar berikutnya. Indeks pertumbuhan larva yang dapat menggambarkan laju pertumbuhan dapat dihitung berdasarkan distribusi larva yang mati dan hidup pada setiap instar dan jumlah larva yang berhasil menjadi pupa. Untuk menentukan Indeks Pertumbuhan (GI) dan Indeks Pertumbuhan Relatif (RGI) digunakan rumus yang dikemukakan oleh Zhang, *et al* (1993) dalam Yusnarti (1996), yaitu :

$$GI = \frac{\sum_{i=1}^{i_{max}} (n_{(i)} \times i) + \sum_{i=1}^{i_{max}} (n'_{(i)} \times i-1)}{N \times i_{max}}$$

Dimana:  $i$  : nomor stadium

$n(i)$  : Jumlah larva yang hidup pada stadium  $i$

$n'(i)$  : Jumlah larva yang mati pada stadium  $i$

$i_{max}$  : Stadium tertinggi yang dicapai serangga dalam siklus hidupnya

$N$  : Jumlah total larva dalam group

$$RGI = \frac{\text{Indeks pertumbuhan pada perlakuan}}{\text{Indeks pertumbuhan pada kelompok kontrol}} \times 100\%$$

### E. Parameter yang diamati

Pada uji terhadap mortalitas parameter yang diamati adalah jumlah larva yang mati. Sedangkan untuk uji terhadap pertumbuhan parameter yang diamati meliputi jumlah larva yang hidup dan mati pada tiap instar, untuk uji terhadap perkembangan meliputi jumlah larva yang menjadi pupa normal dan jumlah larva yang gagal menjadi pupa normal.

### F. Model Analisis

Percobaan dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data mortalitas yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis probit (Koestoni, 1985). Data mortalitas dan jumlah larva yang berhasil menjadi pupa normal dianalisis dengan menggunakan ANOVA. Jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji Duncan taraf uji 5 % (Gomez and Gomez, 1995). Adapun data distribusi larva yang hidup dan mati pada tiap instar diolah dengan menggunakan rumus yang dikemukakan oleh Zhang, *et al* (1993 dalam Yusnarti, 1996) sehingga diperoleh nilai Indeks Pertumbuhan (GI) dan nilai Indeks Pertumbuhan Relatif (RGI).