

IV. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi dan pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro Semarang.

Telur nyamuk diperoleh dari Stasiun Penelitian Vektor dan Penyakit (SPVP) Puslit Ekologi Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Depkes RI Salatiga.

Penelitian dilakukan pada bulan September 1999 - Maret 2000.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

No.	Nama Alat	Satuan / Ukuran	Kegunaan
1.	Ayakan	1x1 mm	mengayak simplisia
2.	Blender	-	menggiling daun atau biji
3.	Botol maserasi	liter	maserasi daun
4.	Gelas ukur	2,5 ml dan 100 ml	mengukur volume
5.	Gelas beaker	100 ml	mengukur volume
6.	Hand counter	-	menghitung jumlah larva
7.	Kuas kecil	nomor 1	mengambil larva yang mati
8.	Mangkuk plastik	250 ml	unit percobaan
9.	Nampan plastik	40 x 20 x 3 cm	tempat penetasan larva
10.	Evaporator putar	-	mengentalkan maserat
11.	Batang pengaduk	-	mengaduk ekstrak
12.	Soxhlet	-	mengekstraksi biji
13.	Timbangan	gram	menimbang ekstrak kental

2. Bahan

No.	Nama Bahan	Kegunaan
1.	Air sumur	media penetasan telur dan pemeliharaan larva
2.	Aquadest	pengencer bahan
3.	Daun dan Biji <i>A. muricata</i> L	bahan ekstrak
4.	Ekstrak hati sapi	pakan larva
5.	Etanol 96 %	pelarut bahan aktif ekstrak
6.	n – heksan	pelarut lemak pada biji
7.	Larva <i>C. quinquefasciatus</i> SAY	hewan uji
8.	Tween – 80	pencampur bahan ekstrak dan aquadest

C. Cara Kerja

C.1. Pengadaan Ekstrak

C.1.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *A. muricata* L

Daun *A. muricata* L yang diperoleh dari daerah Semarang, dikumpulkan dan dikeringanginkan pada suhu kamar kurang lebih selama tiga hari. Daun yang telah kering kemudian dipotong-potong agar mempermudah dalam proses penggilingannya. Daun digiling dengan menggunakan blender sehingga dihasilkan serbuk daun. Serbuk daun yang telah diperoleh ini kemudian diayak dan sisa daun yang masih kasar digiling kembali. Serbuk daun kemudian direndam dalam etanol 96 % selama tiga hari dan dimaserasi dengan pelarut etanol 96 % secara berulang-ulang sampai maseratnya jernih. Maserat berupa ekstrak cair kemudian diuapkan pelarutnya dengan menggunakan evaporator putar pada suhu 40 - 50°C. Hasil evaporasi berupa ekstrak kental siap digunakan sebagai bahan uji dalam berbagai tingkat konsentrasi.

C.1.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Biji *A. muricata* L

Bahan untuk pembuatan ekstrak berupa biji *A. muricata* L diperoleh dari industri pembuatan dodol di Pekalongan dan pembuatan sirup di Semarang. Biji *A. muricata* L yang diperoleh dikeringanginkan pada suhu kamar selama tiga hari. Selanjutnya biji digiling dengan menggunakan blender sehingga didapatkan serbuk biji. Serbuk biji yang telah halus ini kemudian diekstraksi selama 72 jam menggunakan alat soxhlet dengan pelarut n – heksan untuk menghilangkan lemak. Serbuk kemudian dikeringanginkan sampai semua pelarutnya menguap. Serbuk yang telah kering ini diekstrak kembali menggunakan alat soxhlet dengan pelarut etanol 96 % untuk mendapatkan ekstrak cairnya. Maserat berupa ekstrak cair ini diuapkan pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40 – 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental yang siap digunakan dalam berbagai tingkat konsentrasi.

C.1.3. Pembuatan Ekstrak Air Daun *A. muricata* L

Daun *A. muricata* L yang diperoleh kemudian dipotong-potong dan digiling dengan menggunakan blender. Serbuk daun yang diperoleh kemudian direndam dalam aquadest pada suhu 40°C selama 10 – 12 jam dengan perbandingan satu kilogram daun dalam 0,5 liter aquadest. Hasil perendaman kemudian disaring dan ekstrak cairnya siap digunakan untuk bahan uji dengan berbagai tingkat konsentrasi.

C.2 Pengadaan Hewan Uji

Telur nyamuk *C. quinquefasciatus* SAY yang diperoleh dari SPVP Salatiga ditetaskan dalam nampan plastik ukuran 40 x 20 x 3 cm yang berisi air sumur dan ditutup dengan kain kassa. Setelah sehari telur akan menetas dan menjadi larva instar I. Untuk uji terhadap pertumbuhan larva instar I ini langsung digunakan. Sedangkan untuk uji terhadap mortalitas, larva instar I terlebih dahulu dipelihara dalam nampan-nampan plastik dan diberi pakan larva berupa ekstrak hati sapi dan nampan ditutup dengan kain kassa. Larva dipelihara sampai mencapai instar III dan siap digunakan untuk perlakuan.

C.3 Pengujian Ekstrak Etanol Daun, Ekstrak Etanol Biji, dan Ekstrak Air Daun *A. muricata* L Terhadap Mortalitas Larva *C. quinquefasciatus* SAY

C.3.1. Uji Pendahuluan

Uji Pendahuluan ini dilakukan untuk mencari konsentrasi antara ambang batas atas (LC 95 – 24 jam) dan konsentrasi ambang batas bawah (LC 5 – 48 jam). Ambang batas atas adalah konsentrasi yang menyebabkan mortalitas larva sebanyak 95 % dalam waktu 24 jam dan ambang batas bawah adalah konsentrasi yang menyebabkan mortalitas larva sebanyak 5 % dalam waktu 48 jam. Ambang batas atas dan ambang batas bawah ini nantinya akan digunakan untuk menentukan konsentrasi yang digunakan pada Uji Utama. Uji Pendahuluan dilakukan tiga kali secara terpisah yaitu uji pendahuluan untuk ekstrak etanol daun, uji pendahuluan untuk ekstrak etanol biji, dan uji pendahuluan untuk ekstrak air daun.

C.3.1.1 Uji Pendahuluan Ekstrak Etanol Daun *A. muricata* L

Pada Uji Pendahuluan ini ditentukan lima tingkatan konsentrasi yaitu 0,2 % ; 0,6 % ; 1,0 % ; 1,4 % ; 1,8 % (b/v) dan 0% sebagai kontrol. Sebanyak 20 ekor larva *C. quinquefasciatus* SAY instar III dimasukkan dalam mangkuk-mangkuk plastik yang telah berisi masing-masing bahan ekstrak dengan konsentrasi yang telah ditetapkan di atas. Ke dalam setiap mangkuk ditambahkan pakan larva berupa ekstrak hati sapi. Pengamatan dilakukan setiap enam jam selama 48 jam dan dicatat jumlah larva yang mati setiap pengamatan.

C.3.1.2 Uji Pendahuluan Ekstrak Etanol Biji *A. muricata* L

Konsentrasi yang digunakan untuk Uji Pendahuluan ini adalah 0 % sebagai kontrol ; 0,015 % ; 0,025 % ; 0,05 % ; 0,075 % ; 0,100 % (b/v). Sebanyak 20 ekor larva *C. quinquefasciatus* SAY instar III dimasukkan ke dalam mangkuk-mangkuk plastik yang telah berisi bahan ekstrak dengan masing-masing tingkat konsentrasi dan ditambahkan pakan larva berupa ekstrak hati sapi. Pengamatan dilakukan setiap enam jam selama 48 jam dan dicatat jumlah larva yang mati setiap pengamatan.

C.3.1.3 Uji Pendahuluan Ekstrak Air Daun *A. muricata* L

Pada Uji Pendahuluan ini digunakan lima tingkatan konsentrasi yaitu 5 % ; 10 % ; 20 % ; 40 % ; 80 % (v/v) dan 0 % sebagai kontrol. Sebanyak 20 ekor larva *C. quinquefasciatus* instar III dimasukkan ke dalam mangkuk-mangkuk plastik yang telah berisi bahan ekstrak dan pakan larva berupa ekstrak hati sapi.

Pengamatan dilakukan setiap enam jam selama 48 jam dan dicatat jumlah larva yang mati setiap pengamatan.

C.3.2 Penentuan Nilai LC 50 – 48 jam

Untuk penentuan nilai LC 50 – 48 jam konsentrasi yang digunakan didasarkan atas hasil perhitungan ambang bawah (LC 5 – 48 jam) dan ambang atas (LC 95 – 24 jam) dari Uji Pendahuluan. Dari konsentrasi ini kemudian dipakai sebagai konsentrasi terendah dan tertinggi dan dicari lima kisaran konsentrasi dengan menggunakan Rumus Hubert.

$$\text{Log } N/n = k \cdot \log a/n \dots\dots\dots(1)$$

$$a/n = b/a = c/b = d/c = e/d \dots\dots\dots(2)$$

dimana :

N = ambang atas (LC 95– 24 jam)

n = ambang bawah (LC 5 – 48 jam)

k = banyaknya konsentrasi perlakuan

Dari Rumus Hubert diatas diperoleh konsentrasi untuk ekstrak etanol daun adalah 0,2 % ; 0,3 % ; 0,4 % ; 0,6 % ; 0,7 % (b/v) dan kontrol. Pada ekstrak etanol biji konsentrasinya adalah 0,022 % ; 0,032 % ; 0,046 % ; 0,066 % ; 0,095 % (b/v) dan kontrol. Sedangkan untuk ekstrak air daun konsentrasinya adalah 5,7 % ; 6,6 % ; 7,6 % ; 8,7 % ; 9,9 % (v/v) dan kontrol.

Pada masing-masing perlakuan ekstrak etanol daun, ekstrak etanol biji dan, ekstrak air daun *A. muricata* L, sebanyak 20 ekor larva instar III dimasukkan dalam mangkuk-mangkuk plastik yang telah berisi ekstrak dengan berbagai konsentrasi yang telah ditentukan berdasarkan Rumus Hubert di atas.

Ke dalam mangkuk-mangkuk tersebut ditambahkan pakan larva berupa ekstrak hati sapi. Setiap perlakuan diulang tiga kali dan pengamatan dilakukan setiap enam jam selama 48 jam dan dicatat jumlah larva yang mati pada setiap pengamatan. Analisa LC-50 dapat ditentukan berdasarkan analisa probit menurut Bushvine-Nash (Koestoni, 1985).

C.4 Pengujian Ekstrak Etanol Daun, Ekstrak Etanol Biji dan Ekstrak Air Daun *A. muricata* L Terhadap Pertumbuhan Populasi Larva *C. quinquefasciatus* SAY

Pengujian pertumbuhan populasi larva mengacu pada metode yang diperkenalkan oleh Zhang *et al* (1993 dalam Yusnarty, 1996). Konsentrasi yang digunakan adalah konsentrasi di bawah nilai LC 50. Untuk ekstrak etanol daun konsentrasi yang digunakan adalah 0,012 % ; 0,015 % ; 0,018 % ; 0,021 % ; 0,025 % (b/v) dan kontrol. Untuk ekstrak etanol biji konsentrasinya adalah 0,012 % ; 0,014 % ; 0,016 % ; 0,018 % ; 0,020 % (b/v) dan kontrol. Sedangkan untuk ekstrak air daun konsentrasi yang digunakan adalah 1,326 % ; 1,758 % ; 2,33 % ; 3,088 % ; 4,09 % (v/v) dan kontrol.

Sebanyak 20 ekor larva instar I dimasukkan ke dalam mangkuk-mangkuk yang telah berisi bahan ekstrak dengan berbagai konsentrasi seperti tersebut di atas. Ke dalam mangkuk ditambahkan pakan larva berupa ekstrak hati sapi. Perlakuan diulang tiga kali dan pengamatan dilakukan setiap hari untuk mengamati perubahan instar, jumlah larva yang mati dan yang masih hidup, dan jumlah larva yang berhasil menjadi pupa.

Pertumbuhan larva secara individu digambarkan oleh kemampuan larva untuk molting dan menjadi instar berikutnya. Indeks Pertumbuhan larva yang

menggambarkan laju pertumbuhan dapat dihitung berdasarkan distribusi larva yang mati dan hidup pada setiap instar dan jumlah larva yang berhasil menjadi pupa.

Dengan menggunakan rumus yang dikemukakan oleh Zhang *et al* (1993 dalam Yusnarty 1996) berikut ini dapat ditentukan Indeks Pertumbuhan dari larva *C. quinquefasciatus* SAY.

$$GI = \frac{\sum_{i=1}^{i \max} [n(i)xi] + \sum_{i=1}^{i \max} [n'(i)x(1-i)]}{Nxi \max}$$

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
- N = Jumlah total larva dalam grup

Untuk menghitung Indeks Pertumbuhan Relatif dari larva digunakan rumus berikut ini.

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

D. Parameter Yang Diamati

Pada Uji Terhadap Mortalitas parameter yang diamati adalah jumlah larva yang mati, sedang untuk Uji Terhadap Pertumbuhan Populasi parameter yang diamati meliputi jumlah larva yang mati, jumlah larva yang hidup, jumlah larva yang menjadi pupa, jumlah pupa yang normal, dan jumlah pupa yang cacat.

E. Analisis Statistik

Percobaan dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap dengan enam perlakuan dan tiga kali ulangan. Data mortalitas dianalisis dengan Analisa Probit menurut Bushvine-Nash (Koestoni, 1985) untuk menentukan nilai LC 50 – 48 jam, dan untuk mengetahui adanya pengaruh ekstrak terhadap larva uji data mortalitas dianalisis dengan ANOVA dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5 %. Data distribusi larva yang hidup dan mati pada setiap instar diolah dengan menggunakan rumus yang dikemukakan oleh Zhang *et al* (1993 dalam Yusnarty, 1996) sehingga diperoleh nilai Indeks Pertumbuhan dan Indeks Pertumbuhan Relatif larva.