

PENUNTUN PRAKTIKUM TOKSIKOLOGI



DISUSUN OLEH :

Dr. Resti Rahayu

Prof. Dr. Dahelmi

**Laboratorium Fisiologi Hewan , Jurusan Biologi,
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Andalas**

1. Kerentanan larva *Aedes aegypti* terhadap insektisida

Tujuan :

Mengetahui status kerentanan larva *Aedes aegypti* terhadap temephos.

Alat dan Bahan :

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas plastik ukuran 300 ml, kertas label, saringan kecil, jarum, pipet hisap, wadah plastik, *beaker glass*, gelas ukur, erlenmeyer, mikroskop, *object glass*, *cover glass*, *ependorf*, mikropipet, alat tulis, lampu senter, botol sampel dan kamera. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva nyamuk *Ae. aegypti* instar III, air mineral/aquades, insektisida *temephos* larutan stok 6,25 mg/L.

Cara kerja :

Pengambilan larva nyamuk dan diidentifikasi dengan mikroskop perbesaran 10 kali. Jika larva tersebut merupakan larva *Ae. aegypti* maka dapat dilanjutkan. Identifikasi dengan menggunakan buku Zootaxa 589: *Pictorial Keys for the Identification of Mosquitoes (Diptera: Culidae) Associated with Dengue Virus Transmission*. Stok Insektisida temephos 6,25 mg/L. Untuk mendapatkan konsentrasi 0,012 mg/L; 0,0075 mg/L dan 0,005 mg/L diencerkan dengan menggunakan rumus pengenceran:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Ket: M_1 = Konsentrasi larutan yang diencerkan

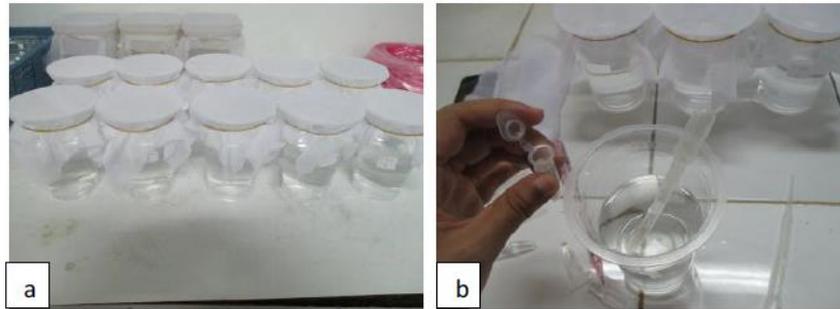
V_1 = Volume larutan induk yang diambil

M_2 = Konsentrasi larutan hasil pengenceran

V_2 = Volume larutan hasil pengenceran

Setelah didapatkan stok larutan temephos dimasukkan masing-masing konsentrasi tersebut ke dalam gelas plastik ukuran 300 ml sebanyak 100 ml masing-masing konsentrasi. Disiapkan juga perlakuan tanpa larutan temephos. Diseleksi larva yang sehat dan dalam instar III yang kemudian dimasukkan ke dalam gelas plastik berisi

larutan temephos. Dilakukan pengamatan terhadap kematian pada menit ke 15; 30; 45; 60 dan 24 jam. (WHO, 2016).



(a). Pengamatan 24 jam dan (b). Larva yang mati dan yang hidup dimasukkan ke dalam *appendorf* yang telah diisi alkohol 70%

Parameter Eksperimen :

$$\% \text{ Kematian larva uji} = \frac{\text{Jumlah larva uji yang mati}}{\text{Jumlah seluruh larva uji}} \times 100\%$$

Data persentase kematian disesuaikan dengan kriteria *susceptibility* terhadap insektisida menurut WHO (2016) untuk menentukan status kerentanan nyamuk, yaitu:

- Resisten apabila kematian < 90%
- Toleran apabila kematian 90-97%
- Rentan apabila kematian 98-100%

Hasil dan Pembahasan:

.....
.....
.....
.....

2. Kerentanan nyamuk *Aedes aegypti* terhadap malathion dan permethrin

Tujuan :

Untuk mengetahui kerentanan nyamuk dewasa terhadap malathion 0,8% dan permethrin 0,25%.

Alat dan Bahan :

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas plastik ukuran 250 ml, kertas saring, plastik hitam ukuran 10x15 cm, perekat, kertas label, kandang nyamuk, kit uji kerentanan, gunting, alat tulis, dan kamera. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk dewasa *Ae. aegypti*. umur 3-5 hari, air mineral, kertas bersih, *impregnated paper* malathion 0,8% dan permethrin 0,25% (merujuk dari WHO, 2016), serta larutan gula 10%.

Larva *Ae. aegypti* dikumpulkan sebagai stok. Nyamuk betina diseleksi dan diidentifikasi dengan *Zootaxa Pictorial Keys for the Identification of Mosquitoes (Diptera: Culidae) Associated with Dengue Virus Transmission* (Rueda, 2004). Uji kerentanan dilakukan mengacu pada WHO (2016) dengan langkah sebagai berikut :

1. Kit standar uji kerentanan terdiri dari 1 tabung kontrol, 4 tabung kontak (bertanda merah) dan 4 tabung *holding* (bertanda hijau).
2. Setiap tabung *holding* dimasukkan 20 nyamuk betina aktif kenyang air gula dari kandang nyamuk melalui lubang pengisian. Setelah nyamuk dipindahkan, lubang pengisian ditutup dan atur tabung *holding* dalam posisi tegak, jika ada nyamuk yang pingsan atau mati dalam tabung *holding* diganti dengan nyamuk yang sehat.
3. Gulung satu persatu kertas putih berukuran 12 x 15 cm (berlapis *impregnated paper* malathion 0,8% dan permethrin 0,25%) kemudian masukkan kedalam tabung uji dan satu tabung kontrol dengan selembar kertas putih biasa.
4. Pasang 2 tabung uji ke posisi yang kosong pada slide, dan buka lubang pengisian. Setelah itu tiup nyamuk yang ada pada tabung *holding* ke dalam tabung uji kemudian lubang pengisian ditutup. Isi 1 tabung kontrol dengan nyamuk dengan cara yang sama. Amati jumlah kematian nyamuk dalam waktu 15 menit, 30 menit, 45 menit, dan 60 menit.
5. Setelah satu jam, pindahkan kembali nyamuk kedalam tabung *holding*. Basahi kapas dengan 10% larutan air gula dan tempatkan di atas layar.
6. Nyamuk dibiarkan dalam tabung *holding* selama 24 jam untuk pemulihan. Suhu dan kelembaban dicatat selama periode pemulihan.
7. Pada akhir periode pemulihan 24 jam, hitung dan catat jumlah nyamuk yang mati. Jika kematian nyamuk di tabung kontrol kurang dari 10% maka penelitian dapat dilanjutkan, tetapi jika kematian melebihi 10%, maka percobaan perlu diulangi.



Uji kerentanan nyamuk dengan *impregnated paper*

Parameter Eksperimen :

$$\%kematian = \frac{\text{Total kematian nyamuk uji}}{\text{Jumlah total nyamuk}} \times 100\%$$

Data tersebut lalu dikelompokkan berdasarkan WHO (2016) yaitu :

- Rentan apabila kematian 98-100%
- Toleran apabila kematian < 98%
- Resisten apabila kematian < 90%

Hasil dan Pembahasan:

.....
.....
.....
.....

3. Pengaruh Bioinsektisida terhadap kecoak jerman

Tujuan :

1. Menganalisis pengaruh kandungan ekstrak etanol daun ketapang, papaya dan salam terhadap kematian kecoak jerman dengan metode kontak.
2. Menganalisis daya tolak atau tarik dari ekstrak etanol daun ketapang, papaya dan salam terhadap kecoak jerman.
3. Menganalisis pengaruh kandungan ekstrak etanol daun ketapang, papaya dan salam terhadap hambatan makan kecoak jerman.

Alat dan Bahan :

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah toples volume 16 L, cawan petri diameter 9 cm dan 15 cm, batang pengaduk, mikropipet 100 – 1000 μ L, masker, gelas piala, *aluminium foil* (AVO), botol gelap, seperangkat alat *vacuum rotary evaporator*, pinset mata, *hand-scoon*, oven, timbangan analitik, kapas, kertas label, tisu gulung, kertas saring, kain kasa, karet kain, karet gelang, *stop watch* dan botol air mineral 240 ml. Bahan yang digunakan adalah kecoak Jerman (*Blattella germanica* L.) populasi lapangan dan standar yang dikoleksi dari tiga tempat berbeda, daun Ketapang, selai nanas merk MORIN, etanol 96%, *vaseline*, pakan *universal* dan akuades.

Cara kerja :

Rearing hewan uji

Mengacu pada penelitian Ahmad and Suliyat (2011) dimana kecoak jerman betina diseleksi dari tiap populasi sebanyak 50 ekor yang membawa ooteka agar memperoleh hewan uji yang berumur sama. Kemudian kecoak tersebut dimasukkan ke dalam wadah toples 16 L secara terpisah untuk dipelihara. Kecoak diberi makan dengan pakan kecoak (*universal*) dan air secara *ad libitum*. dua populasi lapangan dan satu populasi standar WHO (kecoak yang tidak pernah terpapar insektisida sebelumnya) disiapkan untuk tiga jenis uji (toksisitas metode kontak, uji repelensi dan uji hambat makan).

Uji toksisitas metode kontak

Kecoak jerman dua populasi lapangan dan satu populasi standar WHO. Dipersiapkan daun ketapang, pepaya dan salam sebanyak 1 kg. Daun tersebut diekstraksi dan dievaporasi sehingga pelarut menguap. Setelah dievaporasi ekstrak tersebut dilarutkan dalam 96% etanol untuk mengencarkan sesuai konsentrasi yang diinginkan. Metode kontak untuk uji toksisitas mengacu pada Ladonni (2000), cawan petri dioleskan campuran *vaseline* dan *baby oil*, kemudian dimasukkan ekstrak daun ketapang dan salam konsentrasi 80% sebanyak 2 ml dan daun pepaya konsentrasi 60% sebanyak 2 ml. Dimasukkan kecoak jerman sebanyak 10 ekor ke dalam cawan petri, dilakukan pengamatan setiap menit selama 10 menit, setiap 10 menit selama 50

menit, setiap 1 jam selama 6 jam, pada jam ke-24, 48, 72 dan 96. Dicatat jumlah kecoak yang lumpuh dan mati.



Metode Kontak (*Glass jar*) A. Minum kecoak; B. Pakan kecoak; C. Kecoak Jerman

Uji repelensi

Metode Repelensi mengacu dari metode Manzoor *et al.* (2012). Disiapkan cawan petri dan kertas saring (berdiameter 15 cm). Ekstrak daun ketapang dan pepaya konsentrasi 5% dan ekstrak daun salam konsentrasi 10% sebanyak 1 ml dimasukkan ke kertas saring berdiameter 15 cm yang telah dibagi menjadi dua bagian yang sama besar. Sedangkan kertas saring bagian kedua hanya diberi 1 ml etanol 96%. Kemudian dikering anginkan selama satu jam hingga etanol menguap. Kertas saring diletakkan di dasar cawan petri. Kemudian dimasukkan 10 ekor kecoak Jerman jantan dewasa ke tengah cawan petri dan diamati pergerakan kecoak Jerman setelah 24 jam. Diamati posisi kecoak jerman setelah 24 jam dan dihitung jumlah kecoak pada kertas saring yang diberi perlakuan dan hanya diberi pelarut organik.



Uji repelensi (*repellency test*) A. Zona perlakuan; B. Zona kontrol; C. Kecoak Jerman

Uji hambat makan

Uji dilakukan dengan mengacu pada Rahayu *et al.* (2011) menggunakan cawan petri. Ekstrak ketapang dan pepaya dengan konsentrasi ekstrak 5% dan daun salam konsentrasi 10% diberikan sebanyak 1 ml yang telah dilarutkan di dalam etanol 96% pada cawan petri dan dikering anginkan selama 24 jam hingga etanol dalam larutan menguap. Pakan kecoak sebanyak 250 mg dan kapas yang telah diberi air diletakkan di atas *aluminium foil* (AVO), selanjutnya dimasukkan masing–masing kecoak jantan dewasa sebanyak 10 ekor ke dalam cawan petri tersebut. Sebelum diperlakukan kecoak dipuaskan selama satu hari dan hanya diberi air untuk menghindari pengaruh pakan yang dikonsumsi kecoak sebelum perlakuan, kontrol hanya diberi etanol 96% pada cawan petri dan pakan kecoak. Diberi juga pakan kecoak ke cawan petri tanpa diberi ekstrak dan kecoak Jerman sebagai faktor koreksi untuk mengetahui persentase kehilangan atau penambahan air. Ditimbang berat awal dan akhir (pada hari ketiga) pakan kecoak. Berat pakan sebelum diberi kecoak Jerman dikurangi pakan yang diberi kecoak Jerman untuk melihat pengaruh pendedahan ekstrak terhadap jumlah konsumsi makan kecoak Jerman. Dicatat suhu dan kelembaban dengan *thermohygrometer*.



Uji Jumlah Konsumsi Makan

Parameter Eksperimen :

Uji toksisitas metode kontak

Data kelumpuhan dan kematian dianalisis menggunakan program Ms. Excel untuk mendapatkan nilai persentase kelumpuhan dan kematian yang didapat. Setiap perlakuan dicari rata-rata dan standar deviasi yang kemudian dikelompokkan berdasarkan Kriteria efektivitas insektisida menurut Direktorat Pupuk dan Pestisida

(2004). Efektivitas insektisida dapat ditentukan dari persentase kelumpuhan dan kematian dalam periode tertentu. Kriteria insektisida dikatakan efektif untuk kecoak Jerman adalah sebagai berikut, persentase kelumpuhan hewan uji sebanyak 90% harus dicapai paling lama 20 menit atau kematian hewan uji sebanyak 90% harus dicapai paling lama 6 jam setelah pemaparan. Kelumpuhan adalah kondisi dimana hewan tidak mampu berpindah dari satu titik ke titik lain, namun ketika disentuh masih bisa bergerak, sedangkan *lethal* adalah hewan yang sudah tidak bergerak/mati meskipun disentuh.

Uji repeleksi

Analisis yang digunakan untuk mengukur repeleksi dari insektisida berdasarkan formula yang dipakai oleh Thavara *et al.* (2007) di bawah ini :

$$\text{Repeleksi (\%)} = 100 - \left[\frac{T \times 100}{N} \right]$$

Keterangan :

T = Jumlah kecoak Jerman pada zona perlakuan

N = Jumlah kecoak Jerman pada zona tanpa perlakuan

Nilai repeleksi tiap populasi yang didapatkan dikelompokkan menjadi beberapa kelas menurut Dales (1996) yaitu:

Level 0 (tidak ada efek <i>repellent</i>)	: < 0,1%
Level 1 (Sangat rendah)	: 0,1 – 20%
Level 2 (Rendah)	: 20,1 – 40%
Level 3 (Sedang)	: 40,1 – 60%
Level 4 (Tinggi)	: 60,1 – 80%
Level 5 (Sangat Tinggi)	: 80,1 – 100%

Uji hambat makan

Pengukuran jumlah makanan yang dikonsumsi kecoak menggunakan formula Rahayu *et al.* (2011) yaitu :

$$KM = BB - (BA - FK)$$

Keterangan :

KM = Makanan yang dikonsumsi

BB = Berat makanan sebelum perlakuan

BA = Berat makanan setelah perlakuan

FK = Berat makanan setelah perlakuan setelah dikalikan Faktor Koreksi

Pengukuran hambatan makan yang dikonsumsi kecoak menggunakan metode Isman *et al.* (1990) yaitu :

$$\text{Hambatan makan} = \frac{C-T}{C+T} \times 100\%$$

Keterangan :

C = Berat makanan yang dimakan pada kontrol

T = Berat makanan yang dimakan pada perlakuan

Persentase hambatan makan (*antifeedant*) dapat dikelompokkan berdasarkan kriteria Park *et al.* (1997) sebagai berikut :

- | | |
|-----------|--|
| 0 – 40% | : aktivitas <i>antifeedant</i> sangat lemah atau tidak ada aktivitas |
| 40 – 60% | : aktivitas <i>antifeedant</i> lemah |
| 61 – 80% | : aktivitas <i>antifeedant</i> sedang |
| 81 – 100% | : aktivitas <i>antifeedant</i> kuat |

Hasil dan Pembahasan:

.....
.....
.....
.....

REFERENSI

- Ahmad, I. and Suliyat. 2011. Development of Fipronil Gel Baits Against German Cockroach (Dictyopter: Blattellidae): Laboratory and Field Performance in Bandung, Indonesia. *Journal of Entomology*. **8** (3) : 288 – 294.
- Dales, M. J. 1996. *A Review of Plant Materials Used for Controlling Insect Pests of Stored Products*. NRI Bulletin. United Kingdom.
- Direktorat Pupuk dan Pestisida. 2004. *Metode Pengujian Efikasi Hygiene Lingkungan*. Departemen Pertanian Republik Indonesia. Jakarta.
- Efrizal dan M. Afriazi. 1998. Pengaruh Penyuntikan Ovaprim Terhadap Kualitas Telur Ikan Lele Lokal (*Clarias batrachus* L). *Fisheries Journal Garing* 7(1) : 43-51.
- Isman, M. B., O. Koul, A. Luczynski and J. Kaminski. 1990. Insecticidal and Antifeedant Bioactivities of Neem Oils and Their Relationship to Azadirachtin Content. *Journal Agriculture Food Chemical*. **38** : 1406 – 1411.
- Khairida, S. 2011. *Analisis Tahapan Perkembangan Embrio, Larva dan Kualitas Telur Hasil Hibrid Ikan Tawes *Puntius javanicus* (Blkr.) dengan Ikan Mas *Cyprinus carpio* (L.) Strain Merah*. Skripsi Sarjana Biologi FMIPA Universitas Andalas. Padang.
- Ladonni, H. 2000. Permethrin Resistance Ratio Compared by Two Methods of Testing Nymphs of the German Cockroach, *Blattella germanica*. *Medical and Veterinary Entomology*. **14** : 213 – 216.
- Manzoor, F., N. Munir, A. Ambreen and S. Naz. 2012. Efficacy of Some Essential Oils Against American Cockroach *Periplaneta Americana* (L.). *Journal of Medicinal Plants Research*. **6** (6) : 1065 – 1069.
- Park, S. J., S. G. Lee, S. C. Shin, B. Y. Lee and Y. J. Ahn. 1997. Larvicidal and Antifeeding Activities of Oriental Medicinal Plant Extracts against Four Species of Forest Insect Pests. *Applied Entomology Zoology*. **32** (4) : 601 – 608.
- Rahayu, R., K. M. V. Jansen, M. Kristensen dan I. Ahmad. 2011. Pengaruh Permetrin Dosis Sub-lethal terhadap Konsumsi Makan Kecoak Jerman *Blattella germanica* Strain Rentan dan Resisten. *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Entomologi Indonesia (PEI)*. Bandung.

- Sari, N. 2010. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Hipofisa Sapi (Bos taurus L.) Terhadap Respon Ovulasi Ikan Gabus (Channa striata Bloch)*. Skripsi Sarjana Biologi FMIPA Universitas Andalas. Padang.
- Takzare, N. 2009. Influence of *Aloe vera* Gel on Dermal Wound Healing Process in Rat. *Informa Health care* 19 : 73-77.
- Thavara, U., A. Tawatsin, P. Bhakdeenuan, P. Wongsinkongman, T. Boonruad, J. Bansiddhi, P. Chavalittumrong, N. Komalamisra, P. Siriyasatien and M. S. Mulla. 2007. Repellent Activity of Essential Oils Against Cockroaches (Dictyoptera: Blattidae, Blattellidae and Blaberidae) in Thailand. *Southeast Asian Journal Tropical Medical Public Health*. **38** (4) : 663 – 673.
- Triana, E., N. Nurhidayat. 2006. Pengaruh Pemberian Beras yang di Fermentasi oleh *Monascus purpureus* Jmba Terhadap Darah Tikus Putih (*Rattus* sp.) Hiperkolesterolemia. *Biodiversitas* 7 (4) : 317-321.
- World Health Organization. 2016. *Monitoring and Managing Insecticide Resistance in Aedes mosquito Populations*. Interim guidance for entomologist.