

Effectiveness Test of Sedap Malam Flower Extract (*Polianthes tuberosa*) Against Mortality of House Fly (*Musca domestica*): Uji Efektivitas Ekstrak Bunga Sedap Malam (*Polianthes tuberosa*) Terhadap Mortalitas Lalat Rumah (*Musca domestica*)

Maghfiroh Ramadhani Rani
Syahrul Ardiansyah

Universitas Muhammadiyah Sidoarjo
Universitas Muhammadiyah Sidoarjo

Diarrhea is a disease caused by the house fly insect (*Musca domestica*). It is necessary to do alternatives using natural ingredients as house fly repellent (*Musca domestica*), one of which is tuberose extract (*Polianthes tuberosa*). Ethanol extract of tuberose flower has Eugenol compound which can be used as an insecticide. This research was conducted to determine the toxic effect of tuberose extract (*Polianthes tuberosa*) on the mortality of house fly (*Musca domestica*). This research is an experimental study (experimental) and Completely Randomized Design Test (CRD) by conducting 6 treatment groups including negative control (aquades) and tuberose flower extract concentrations of 10%, 20%, 30%, 40%, and 50%. The data obtained for 72 hours were analyzed by using the One Way ANOVA statistical test, a significance value of $P = 0.000$ ($p < 0.005$) was obtained and continued with the probit test, it can be said that tuberose bug extract has a toxic effect on house flies with LC50 at a concentration of 45.808%.

Pendahuluan

Indonesia sebagai salah satu negara berkembang yang memiliki banyak permasalahan penyakit terutama pada hewan maupun manusia, salah satunya adalah penyakit endemik. Bakteri, jamur, cacing, virus dan parasit merupakan mikroorganisme penyebab terjadinya penyakit infeksi. Terdapat beberapa penyakit yang menjadi permasalahan serius yang disebabkan oleh parasit. Lalat mempunyai metamorfosis yang sempurna yaitu, telur, larva, pupa, dan dewasa [1].

Lalat memiliki kemampuan dalam mereproduksi yang amat cepat, seekor lalat betina yang mampu bertelur 5-6 kali dengan jumlah telurnya bisa 100-150 butir untuk setiap kalinya, atau bisa mencapai 500-900 butir sepanjang hidupnya. Kemampuan dalam bereproduksi akan meningkat jika berada pada lingkungan yang sesuai terutama banyak bahan organik yang membusuk seperti sampah, tinja, dan bangkai [2].

Namun infeksi yang disebabkan oleh parasit kurang mendapat perhatian dari sebagian masyarakat dikarenakan tidak mengganggu serta mengancam jiwa secara langsung. Diare merupakan penyebab terbesar nomor satu kematian pada anak di bawah lima tahun (balita) di seluruh dunia. Di Indonesia diare merupakan penyakit pembunuh balita nomor dua setelah ISPA (Infeksi Saluran Pernafasan Akut) yang merupakan penyakit saluran pernafasan yang di sebabkan virus dan dapat menularkan terutama lansia dan juga anak-anak [3]. Pemberian insektisida nabati yang didapatkan dari berbagai tumbuhan yang ternyata dapat berpotensi untuk mengendalikan vektor, baik saat

pemberantasan larva maupun lalat dewasa, maka jenis insektisida ini bersifat mudah terurai (bio-degradable) sehingga tidak berdampak pada lingkungan dan juga alam, bagi manusia dan binatang ternak pun akan tetap aman karena residu-residunya akan cepat menghilang. Kandungan eugenol didapatkan dari tanaman bunga sedap malam (*Polianthes tuberosa*). Sedap malam (*Polianthes tuberosa*) adalah tumbuhan berbunga ini berasal dari famili Amaryllidaceae. Selama ini masyarakat dimanfaatkan sebagai pengharum ruangan atau kebanyakan masyarakat di manfaat untuk menabur bunga yang ada di pemakaman [4].

Menurut penelitian sebelumnya melaporkan terhadap bunga sedap malam sebagai anti nyamuk elektrik terhadap *Aedes aegypti* yang telah membuktikan bahwa ekstrak bunga mampu menjadi anti nyamuk terhadap nyamuk *Aedes aegypti* [5].

Metode Penelitian

- Desain dan sampel Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL), dimana percobaan dilakukan dengan enam (6) perlakuan ekstrak ethanol bunga sedap malam yaitu konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%, dan kontrol negatif (-) menggunakan aquades dengan empat (4) kali pengulangan. Sampel bunga sedap malam di dapatkan di pandaan, Pasuruan secara random sampling. Jika sampel lalat didapatkan dari pemeliharaan.

- Tempat dan waktu Penelitian

Pembuatan simplisia bunga sedap malam, perlakuan dan pengamatan hewan coba dilakukan di kediaman peneliti, sedangkan untuk pembuatan ekstrak ethanol bunga sedap malam dilakukan di PT Genau Loka Gantari (Genau Lab). Penelitian ini dilaksanakan mulai pada Bulan Februari sampai dengan Bulan April 2021.

- Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan meliputi : kurungan (kandang), mangkok kecil, neraca analitik, pipet, gelas ukur, wadah plastik, beaker glass, kertas label, *stop watch*, termometer, batang pengaduk, blender, pisau, spatula, ekstraktor (alat maserasi), *rotary evaporator*, kotak perlakuan, botol semprot.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu: bunga sedap malam; larutan ekstrak etanol bunga sedap malam dengan konsentrasi 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%; aquades; nasi; tempe kadaluarsa; gula jawa; aquades; lalat rumah (*Musca domestica*).

- Prosedur

Melakukan pemeliharaan lalat dengan cara pembuatan perangkap yang didalamnya sudah ada berisi makanan dan tempat untuk berkembang biak lalat, kemudian diletakkan di dekat tempat sampah.

Tahapan persiapan

- Pembuatan simplisia

Tahapan dalam pembuatan simplisia adalah dengan menimbang sampel bunga basah dan mengeringkannya dengan oven hingga kondisi setengah kering dan kemudian dihaluskan dengan blender. Setelah dihaluskan direndam dengan ethanol 96% selama 3x24 jam.

- Pembuatan larutan stok

Pembuatan stok ekstrak bunga sedap malam dilakukan untuk menghindari penimbangan berulang-ulang. Pembuatan larutan stok ekstrak bunga sedap malam 100% sebanyak 150 ml, dilakukan dengan menimbang sebanyak 75 gram ekstrak bunga sedap malam kemudian dilarutkan dengan aquadest 75 ml.

- Hitung mortalitas

Menghitung jumlah kematian lalat selama 72 jam dalam 24 jam pertama dilakukan pengamatan secara intens setiap 1 jam sekali pada tiap kelompok perlakuan. Kematian lalat rumah ditandai dengan lalat rumah yang tidak bergerak/tidak memiliki respon terhadap ransangan.

- Analisis data

Hasil pengolahan data yaitu menggunakan uji Rancangan Acak Lengkap (RAL) kemudian uji statistik yang diperoleh dan disajikan dalam bentuk tabel. Selanjutnya dilakukan dengan uji normalitas dengan Shapiro-Wilk dengan hasil normalitas $p < 0,05$ sehingga memenuhi sebuah syarat untuk uji statistika parametrik maka dilanjutkan dengan uji *one way ANOVA*. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc* bila menggunakan parametrik. Selanjutnya dilakukan uji probit. Analisis probit yang dimaksudkan untuk mengetahui dan menentukan *Lethal Concentration (LC50)* yaitu konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh 50% lalat.

Hasil dan Pembahasan

1. Pemeliharaan Hewan Uji

Tahapan awal yang dilakukan adalah melakukan pemeliharaan pada hewan uji lalat rumah dewasa yang digunakan adalah dengan jumlah setiap kandangnya 6 jantan dengan 4 betina yang diperoleh dari membuat perangkap yang di letakkan di dekat tempat sampah yang sudah berisi makanan manusia yang telah membusuk. Lalat di ternak dalam kandang berukuran sedang yang sering digunakan untuk wadah hewan jangkrik. Setelah tertangkap di dalam kandang di sediakan media untuk berkembangbiak. Di dalam kandang diletakkan mangkuk plastik yang berisi sumber makanan dari lalat rumah dan sebagai media lalat untuk berkembangbiak yaitu nasi yang di campur dengan tempe goreng yang sudah kadaluarsa seberat 4 gram, ada juga gula jawa cair yang diletakkan pada wadah yang berbeda sebagai sumber makanan dari lalat rumah.

2. Pembuatan simplisia

Bunga yang didapat terlebih dahulu ditimbang dan didapat berat sebesar 6 kg kemudian mencuci daun tersebut dengan air mengalir. Daun yang diambil merupakan daun yang segar tidak rusak. Kemudian dipotong kecil-kecil dan dijemur tetapi tanpa terkena sinar matahari secara langsung. Setelah mengering daun dihaluskan menjadi serbuk bunga sedap malam dengan tujuan untuk proses ekstraksi yang efektif sehingga mendapat hasil senyawa yang maksimal. Dari 6 kg bunga sedap malam basah diperoleh 2,5 kg serbuk bunga sedap malam. Kemudian dilakukan proses ekstraksi dengan metode maserasi.

3. Proses Meserasi

Pelarut etanol 96% yang digunakan dalam pembuatan ekstrak bunga sedap malam adalah pelarut yang lebih selektif, sifat toksik yang rendah dari pelarut lainnya. Etanol 96% memiliki sifat semipolar sehingga dapat melarutkan zat kimia yang bersifat polar maupun non polar [6].

Metode maserasi ini dilakukan untuk memperoleh komponen yang diinginkan dengan mengekstrak simplisia menggunakan pelarut tanpa suhu tinggi [7].

Setelah proses simplisia selesai kemudian dilakukan penyaringan untuk memisahkan ampas dan

filtrat. Filtrat kemudian diuapkan bertujuan untuk menghilangkan sisa etanol sehingga memperoleh ekstrak pekat. Dari 2500 gram serbuk sedap malam didapatkan ekstrak pekat sebesar 75,0319 gram. Lalu ekstrak pekat yang didapatkan dihitung nilai % rendemennya. seperti yang terlihat pada Tabel berikut :

Parameter	Berat sampel
Berat basah	6000 g
Berat kering	3000 g
Berat serbuk	2500 g

Table 1. Hasil Berat sampel bunga sedap malam (*Polianthes tuberosa*)

4. Pembuatan larutan stok bunga sedap malam

Pembuatan stok ekstrak bunga sedap malam dilakukan untuk menghindari penimbangan berulang-ulang. Pembuatan larutan stok ekstrak bunga sedap malam 100% sebanyak 150 ml, dilakukan dengan menimbang sebanyak 75 gram ekstrak bunga sedap malam kemudian dilarutkan dengan aquadest 75 ml.

Pembuatan konsentrasi ekstrak bunga sedap malam

V_1 = Volume awal (larutan stok)

V_2 = Volume akhir yang dibutuhkan (ml)

M_1 = konsentrasi awal (100%)

M_2 = konsentrasi akhir (deret konsentasi)

5. Metode Pengumpulan

Data penelitian ini merupakan data primer yang diambil berdasarkan teknik observasi langsung (pengamatan), dengan menghitung jumlah kematian lalat selama 72 jam dalam 24 jam pertama dilakukan pengamatan secara intens setiap 1 jam sekali pada tiap kelompok perlakuan. Kematian lalat rumah ditandai dengan lalat rumah yang tidak bergerak/tidak memiliki respon terhadap rangsangan. Presentase mortalitas lalat dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

Keterangan :

M : Presentase mortalitas hewan uji (%)

M_t : Jumlah lalat yang mati

M_o : Jumlah lalat awal

Data yang diperoleh dari mortalitas lalat dalam penelitian ini kemudian

6. Uji Perlakuan

Lalat yang berada dalam kandang perlakuan semua kondisi lingkungan terkontrol ukuran, kandang yang sama dan dengan ukuran suhu dikontrol, alat penyemprot yang sama, kemudian masing - masing kandang diberikan perlakuan dengan larutan ekstrak bunga sedap malam sesuai dengan konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini. Untuk lalat yang berada dalam 24 kandang dengan kondisi lingkungan terkontrol ukuran kandang sama dan dengan suhu terkontrol kemudian diberi perlakuan dengan menyemprotkan masing - masing konsentrasi dalam penelitian ini.

24 kandang yang meliputi 4 kontrol negatif, 4 konsentrasi 10%, 4 konsentrasi 20%, 4 konsentrasi 30%, 4 konsentrasi 40%, dan 4 konsentrasi 50%. Kemudian menambahkan aquades yang merupakan larutan yang digunakan sebagai larutan kontrol dalam penelitian ini. Sehingga berdasarkan hasil pengukuran jumlah kematian lalat yang setelah pemberian perlakuan dengan menggunakan larutan aquades sebagai kontrol diperoleh hasil bahwa tidak ada lalat yang mati saat diberikan perlakuan pada kandang kontrol baik pada perlakuan pertama, kedua, ketiga, dan keempat. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa aquades tidak efektif dalam membunuh lalat rumah. Hasil perhitungan jumlah kematian lalat setelah dilakukan selama 72 jam dengan ekstrak bunga sedap malam adalah sebagai berikut :

No	Kelompok Perlakuan	Jumlah awal lalat rumah <i>Musca domestica</i>	Perlakuan dan total lalat rumah <i>Musca domestica</i> yang mati				Rata - rata	Presentase %
			1	2	3	4		
1	Kontrol Negatif	10	0	0	0	0	0	0%
2	P1 (10%)	10	0	1	1	1	0,75	4% ^a
3	P2 (20%)	10	1	2	1	1	1,25	13% ^b
4	P3 (30%)	10	2	3	2	4	2,75	28% ^c
5	P4 (40%)	10	3	4	4	5	4	40% ^c
6	P5 (50%)	10	5	5	7	8	6,25	63% ^c

Table 2. Tabel pengumpulan data

Ket : Perbedaan huruf pada presentase mengidentifikasi adanya perbedaan nyata pada analisis *one way anova* dilanjutkan dengan uji lanjut uji Duncan.

Hasil dari penelitian yang telah dilakukan ini menunjukkan jika dalam penggunaan ekstrak bunga sedap malam (*Polianthes tuberosa*) efektif terhadap kematian lalat rumah (*Musca domestica*). Hasil ini dikarenakan adanya kandungan Metyl eugenol yang dapat membunuh lalat selainjuga untuk memancing lalat jantan agar tidak terjadinya perkawinan. Dengan menggunakan bunga selasih yang memiliki kandungan yang sama dengan bunga sedap malam yaitu minyak atsiri yang terdiri dari geraniol, linaool, dan eugenol yang menggunakan dosis 20 gram ekstrak bunga selasih sebagai pemikat lalat buah [8]. Pada tanaman ini mempunyai kandungan senyawa *Eugenol* yang terdapat dalam ekstrak bunga sedap malam yang diduga berfungsi sebagai insektisida dengan cara kerja sebagai racun kontak (*contact poison*) melalui permukaan tubuh lalat rumah. *Eugenol* (fenol) mudah terserap melalui kulit dan dapat menyebabkan terjadinya perubahan sifat (denaturasi) dengan menghancurkan integument sehingga mengakibatkan efek seperti terbakar. *Eugenol* berperan dalam denaturasi protein sitoplasmik dan nekrosis jaringan [9]. Insektisida berbahan minyak atsiri daun kemangi aman bagi lingkungan, karena bersifat tidak persisten. Hal ini karena minyak atsiri mudah diurai secara alami. Minyak atsiri juga efektif terhadap organisme sasaran, aman dan tidak toksik terhadap organisme bukan sasaran sertalingkungan dan kesehatan manusia, sehingga minyak atsiri mempunyai potensi yang sangat besar untuk dikembangkan sebagai bioinsektisida secara komersial [10].

Dalam penelitian ini saya menggunakan kandungan dari geraniol, linaool, dan eugenol yang dapat digunakan sebagai pembunuh lalat rumah dosis 75 gram, sehingga ekstrak bunga sedap malam ini dapat membunuh lalat rumah (*Musca domestica*).

7. Uji Statistik

Hasil dari uji statistika dengan uji normalitas Shapiro-Wilk dimana data yang diperoleh sebesar 0,065 ($p > 0,05$) sehingga dapat dikatakan bahwa data tersebut terdistribusi normal.

Tests of Normality						
Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk			
Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
mortalitas	.175	20	.109	.910	20	.065
a. Lilliefors Significance Correction						

Table 3. Hasil Shapiro-Wilk

Berdasarkan hasil uji one way annova dapat disimpulkan hasil hipotesis pada penelitian ini Ho ditolak dan Ha diterima karena terdapat pengaruh dalam jumlah kematian lalat rumah pada masing-masing konsentrasi ekstrak bunga sedap malam. Dilanjutkan dengan perhitungan secara statistic dengan menggunakan uji one way anova.

ANOVA					
mortalitas					
Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
Between Groups	79.000	4	19.750	22.788	.000
Within Groups	13.000	15	.867		
Total	92.000	19			

Table 4. Hasil Uji ONE WAY ANOVA

Menunjukkan hasil ekstrak dapat dilihat dimana kematian lalat berbanding lurus dengan konsentrasi yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka presentase kematian juga akan meningkat. Hasil tersebut disebabkan karena semakin tinggi konsentasi yang digunakan maka semakin tinggi pula kandungan senyawa bio-aktif yang terkandung [11]. Tingkat konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian ditentukan dengan nilai konsentrasi letal 50 (LC50). Hal ini diperlukan untuk mengetahui jumlah penggunaan konsentrasi yang tepat dalam aplikasinya. Berikut merupakan hasil dari uji probit LC50:

Konsentrasi(%)	Konsentrasi Maximum(%)	Kosentrasi minimum(%)
45808	58332	38896

Table 5. Hasil analisa probit

Nilai LC50 merupakan konsentrasi dari suatu bahan yang menyebabkan 50% populasi hewan uji mengalami kematian. Hasil analisa probit dari penelitian ini diperoleh hasil 45808% yang artinya laalat akan mati sebesar 50% jika pada konsentrasi 45808%. Hasil tersebut lebih rendah dari konsentrasi uji yang digunakan yaitu 50% yang membunuh lalat rumah sebanyak 63% dari seluruh populasi sampel yang digunakan dalam penelitian. Sehingga dapat dikatakan bahwa penelitian ini berhasil mematikan larva sebanyak 50% dengan konsentrasi 50%. Estimasi nilai *Lethal Concentration* 50% melalui uji analisis probit adalah pada konsentrasi ekstrak bunga sedap malam 45808 dengan interval 38.896-58.332.

Berdasarkan hasil uji normalitas dengan Shapiro-Wilk telah diperoleh hasil 0,065 ($p > 0,05$) sehingga dapat dikatakan bahwa data tersebut terdistribusi normal. Berdasarkan hasil uji one way annova dapat disimpulkan hasil hipotesis pada penelitian ini Ho ditolak dan Ha diterima karena terdapat pengaruh dalam jumlah kematian lalat rumah pada masing-masing konsentrasi ekstrak bunga sedap malam. Dilanjutkan dengan perhitungan secara statistic dengan menggunakan uji one way anova. Selanjutnya untuk mengetahui rerata ekstrak bunga sedap malam dilakukan uji Post Hoc dengan uji *Least significance difference* (LSD).

Hasil uji lanjut Post Hoc LSD, jika nilai signifikasi ($p < 0,05$) maka terdapat perbedaan yang signifikan dan apabila nilai signifikasi ($p > 0,05$) maka tidak terdapat perbedaan atau sama. Dapat

diketahui terdapat hasil signifikan dari P3, P4, P5, dan P6. Pada P3 menyebabkan kematian lalat rumah sebesar 28%, sedangkan pada P4 menyebabkan kematian lalat rumah dengan presentase kematian 40%, pada P5 menyebabkan kematian paling tinggi dengan presentase 62,5% dan pada P6 sebagai kontrol negatif yang terdapat perbedaan signifikan dengan semua kelompok perlakuan.

Hal ini menunjukkan jika kandungan senyawa aktif yang ada di bunga sedap malam mampu dalam membunuh lalat rumah. Senyawa aktif yang ada dalam bunga sedap malam adalah senyawa *Euganol* karena senyawa ini salah satu kandungan aktifnya *eugenol* yang memiliki sifat neurotoksik bagi lalat dapat mempengaruhi.

Kesimpulan

Adanya uji efektifitas ekstrakbunga sedap malam (*Polianthes tuberosa*) terhadap jumlah kematian lalat rumah (*Musca domestica*) dengan menggunakan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%. Sehingga didapatkan hasil yang signifikan 0.000 ($P < 0.05$). Pada Konsentrasi 40% dapat membunuh 5 ekor lalat dan pada konsentrasi 50% dapat membunuh 8 ekor lalat. Dengan menggunakan Lc 50 telah didapatkan hasil selama 72 jam sebesar 45,808%, karena pada konsentrasi 50% dapat membunuh hingga 63% lalat.

References

1. Adhiningsih, Y. R., Athiyah, A. F., & Juniastuti. 2009. Diare Akut pada Balita di Puskesmas Tanah KaliKedinding Surabaya. DOI : <https://doi.org/10.36590/jika.v1i2.31>
2. GEDEN, J. C. (2012). STATUS OF BIOPESTICIDES FOR CONTROL OF HOUSE FLIES. USDA-ARS, GAINESVILLE, FL. RETRIVED FROM <HTTPS://WWW.RESEARCHGATE.NET/PUBLICATION/265026238>
3. WHO (2008). The global burden of diseases: 2004 update Geneva: World Health Organization. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf.
4. Malik, A., Singh, N., dan Satya, S. (2013). House fly (*Musca domestica*): A review of control strategies for a challenging pest. DOI : <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4965-x>
5. Luthfia, F. I. (2018). Efektifitas Ekstrak Bunga Sedap Malam Sebagai anti nyamuk elektrik Terhadap *Aedes aegypti*. Skripsi. Surabaya : studi Analisis Kesehatan Politeknik Kesehatan Surabaya. Retrived from <http://digilib.poltekkesdepkes-sby.ac.id/public/POLTEKKESBY-Studi-3464-cover.pdf>.
6. Haditomo, I. (2010). Efek Larvasida Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) Terhadap *Aedes aegypti* L. Skripsi. Surakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta. Retrived from : <https://eprints.uns.ac.id/7308/1/122803107201011151.pdf>
7. Pratiwi, E. (2010). Perbandingan metode maserasi, remeserasi, perkolasi dan reperkolasi dalam ekstraksi senyawa Aktif Andrographolide dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. F) Ness). Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
8. Oktarina. (2004). Penggunaan Bunga Selasih (*Ocimum basillicum*) Sebagai Senyawa Pemikat (ATRAKTAN) Lalat Buah. Jurnal. Jember : Staf Pengajar Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Jember. Retrived from : <umj-1x-oktarina-91-1-6.rina.pdf>
9. Soedarsono, Gunawan, D., Wahyuono, S., Donatus, I.A., Purnomo. 2002. Tumbuhan Obat II (Hasil Penelitian, Sifat-sifat dan Penggunaan. Pusat Studi Tradisional Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
10. Hartati SY, 2012. Prospek Pengembangan Minyak Atsiri sebagai Pestisida Nabati. Perspektif Vol.11 No.1/Juni 2012. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Bogor.
11. Hairani, S. (2014). Efektivitas ekstrak daun mundu (*Garcinia dulcis*) sebagai larvasida nyamuk *Culex quinquefasciatus* dan *Aedes aegypti*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/71f4/aa986065f95adff52cb2efd8c28761c2deb1.pdf>.