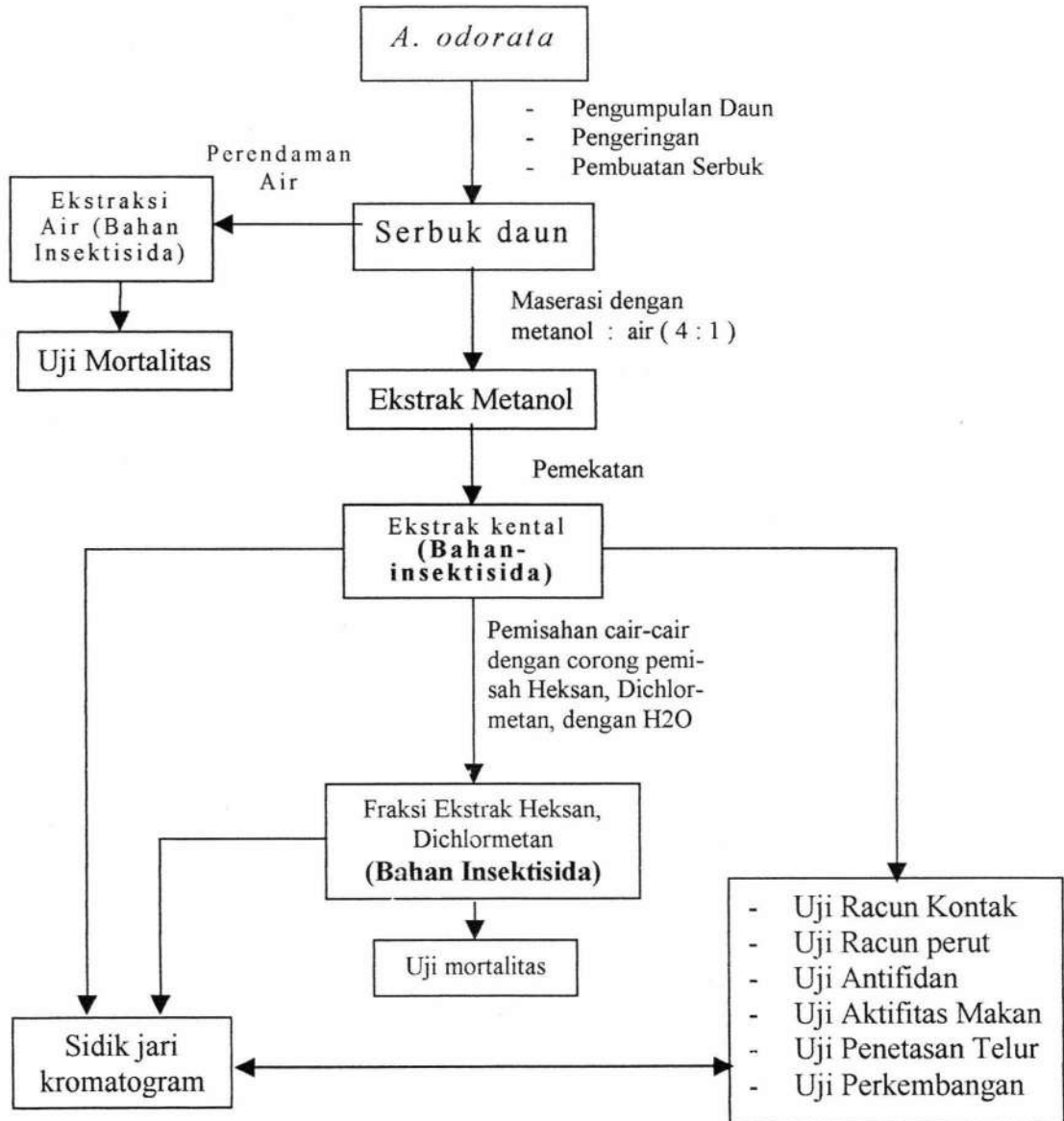


BAB IV
METODE PENELITIAN

BAB IV METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium. Kerangka operasional penelitian disajikan pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. : Kerangka Operasional Penelitian
(—————>) menunjukkan urutan pelaksanaan penelitian

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pestisida, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Jember mulai bulan Juli 1996 sampai dengan Juni 1997.

Sebelum penelitian laboratorium, dilakukan pemeliharaan serangga selama 3 bulan dari bulan April sampai Juli 1996.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan adalah serangga uji *C. binotalis*, daun *A. odorata* yang diperoleh dari Purwodadi, Kabupaten Pasuruan. Pelarut yang digunakan adalah metanol, heksan dan dichlormetan. Beberapa peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, adalah rotary evaporator, cawan petri, blender, corong, timbangan, corong buchner, gelas ukur, siringe, kertas saring, wadah plastik, HPLC merk Gynkotek, Program Gynkosof versi 5,30, detektor photo diode, - Array - Detektor UVD 340 S.

Kolom HPLC, Eurospher 100-C18 (5 μ m; 125 x 4 mm). Pelarut yang digunakan adalah campuran antara metanol HPLC dan Aquabidest (asam fosfat 0,015 % dengan pH 2,0).

4.3 Pelaksanaan Penelitian

4.3.1 Pemeliharaan Serangga Uji

Larva *C. binotalis* dibiakkan di laboratorium dengan cara seperti diuraikan oleh Prijono dan Hassan (1993). Larva diberi

makan brokoli (*Brassica olearaceae*) dan dimasukkan dalam kotak plastik yang berukuran 28 cm x 20 cm x 7,5 cm dengan sedikit lubang udara, serangga dewasa diberi makan larutan madu (10 %).

Larva yang sudah dewasa dipindahkan ke cawan petri yang berisi campuran pasir dan tanah steril (tebal 2 Cm) sebagai media pupa. Setelah satu minggu pupa dipindahkan ke kurungan kasa yang berukuran 40 cm x 40 cm x 40 cm. Untuk persiapan makan imago diberikan larutan madu 10 % yang diserapkan pada sepotong kapas yang telah dibalut kain kasa. Kapas tersebut digantung pada salah satu sudut dalam kurungan pemeliharaan. Di dalam kurungan diberikan semai tanaman kubis (3 - 4 daun) sebagai tempat imago meletakkan telur. Daun yang ada telurnya dipindah dari kurungan ke kotak plastik sampai menetas. Larva instar III digunakan untuk percobaan.

4.3.2 E k s t r a k s i

Ekstraksi dilakukan berdasarkan modifikasi Alkofahi (Martono, 1994). Pada penelitian ini, sebagai tanaman sumber digunakan daun tanaman *A. odorata* yang berasal dari daerah Purwodadi, Kabupaten Pasuruan. Daun dikeringkan pada suhu kamar hingga berat daun berkurang sampai 50-60 %. Daun diblender hingga menjadi serbuk, kemudian diayak dengan menggunakan ayakan 0,5 mm. Serbuk daun direndam dalam

metanol dengan perbandingan 1 : 4 (berat/volume) selama 24 jam. Campuran ekstrak kemudian disaring dengan corong buchner (diameter 9 cm) beralaskan kertas saring whatman No. 41. Cairan ekstrak hasil penyaringan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator (penangas putar) pada tekanan 560-600 mm Hg dan suhu 40°C. Ekstrak yang diperoleh setelah penguapan disimpan dalam lemari es ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) hingga saat digunakan.

Pada tahap selanjutnya, sebagian hasil ekstrak dipisahkan dalam sistem pelarut heksan dan air (1:1) dalam labu pemisah selama 6 jam hingga didapatkan fase heksan dan air. Fase heksan diuapkan pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator. Ekstrak (fase heksan) yang diperoleh disimpan dalam lemari es hingga saat digunakan.

Pada fase air ditambahkan HCl sampai pH 2-3, kemudian diekstraksi dengan Dichlormetan, lapisan dipisahkan dan dikeringkan dengan Na_2SO_4 "anhydrous", kemudian lapisan dichlormetan diuapkan dengan rotary evaporator. Ekstrak (fase dichlormetan) yang diperoleh disimpan dalam lemari es hingga saat digunakan.

4.3.3 Pengujian

4.3.3.1 Pengujian racun kontak

Pengujian efek racun kontak dilakukan dengan menggunakan metode Aplikasi Topikal. Cara pengujian ini

merupakan adaptasi dari cara yang dikemukakan oleh Prijono dan Hassan (1993).

Ekstrak diemulsikan dalam air yang mengandung metanol dan alkil gliserol fosfat 0,154 % dan dibuat dalam 6 konsentrasi 0 % (kontrol), 2 % ; 4 % ; 6 % ; 8 % ; dan 10 % yang ditentukan berdasarkan uji pendahuluan (dilakukan dengan berbagai konsentrasi ekstrak yang dapat mematikan larva Uji dengan tingkat kematian antara 20 - 100 %). Kemudian dengan jarum injeksi mikro syringe diteteskan 5 mikro liter pada bagian dorsal torak. Sedangkan pada perlakuan kontrol hanya ditetesi metanol dan pengemulsi. Larva uji yang telah mendapatkan perlakuan dimasukkan dalam wadah plastik diameter 11 cm tinggi 9 cm, yang dialasi kertas tissue dan berisi makanan larva (daun kubis). Untuk setiap perlakuan digunakan 10 ekor larva, dan diulang 3 kali. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap.

Pengaruh racun kontak terhadap kematian larva dicatat setiap hari hingga saat berkepompong. Analisis data hubungan konsentrasi ekstrak dan tingkat kematian larva dengan Metode Analisis Probit (Finney, 1971). Metode analisis probit dilakukan dengan komputer program Quantum. Untuk membandingkan rata-rata perlakuan ekstrak maupun kontrol digunakan Uji Berganda Duncan.

4.3.3.2 Pengujian racun perut

Pengujian efek racun perut dilakukan dengan menggunakan Metode Aplikasi Oral (Priyono, 1994).

Prosedur pengujian

1. Ekstrak kasar dilarutkan dalam metanol dan pengemulsi menjadi beberapa taraf konsentrasi (0 % ; 0,5 % ; 1,0 % ; 2,0 % ; 3,0 % ; 4,0 % ; 5,0 % ; dan 6,0 %). Kemudian daun kubis ukuran 3 x 3 cm dicelupkan satu persatu dalam suspensi ekstrak pada masing-masing konsentrasi selama 5 detik, dan dikering-anginkan. Daun kontrol dicelup dalam air dan pengemulsi tanpa ekstrak.
2. Setelah daun perlakuan dan kontrol kering, dimasukkan dalam wadah plastik diameter 11 cm tinggi 9 cm yang dialasi kertas saring. Kemudian ke dalam wadah plastik dimasukkan 10 ekor larva *C. binotalis* instar III. Untuk setiap taraf konsentrasi digunakan tiga ulangan. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap. Setelah 24 jam daun sisa diganti dengan daun baru yang diberi perlakuan sama dengan perlakuan sebelumnya. Setelah 24 jam berikutnya, baik pada perlakuan maupun kontrol, daun sisa diganti dengan daun tanpa perlakuan.

Pengaruh racun perut terhadap kematian larva dicatat setiap hari hingga saat berkepompong.

Analisis data hubungan antara konsentrasi ekstrak dan tingkat kematian larva dilakukan dengan Metode Analisis Probit (Finney, 1971). Metode analisis probit dilakukan dengan komputer program Quantum. Untuk membandingkan rata-rata perlakuan ekstrak maupun kontrol digunakan Uji Berganda Duncan.

4.3.3.3 Pengujian aktivitas makan

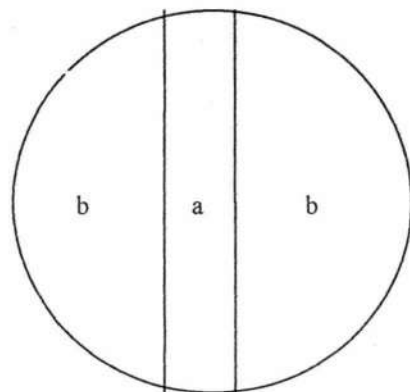
Uji terhadap senyawa insektisida aktivitas makan dilakukan dengan metode daun pilihan dan metode daun tanpa pilihan.

1. Metode daun pilihan

Metode yang digunakan adalah adaptasi dari Priyono dan Hassan (1993), yang menggunakan makanan berupa daun sesuai dengan kesukaan serangga uji. Untuk Larva *C. binotalis* digunakan daun kubis (*Brassica olearaceae*). Daun dipilih diusahakan yang mempunyai ketebalan yang sama, dipotong segi empat dengan ukuran 3x3 cm. Senyawa yang akan diuji dilarutkan dalam metanol dan pengemulsi menjadi 7 konsentrasi yakni : 0 % (kontrol); 0,5 % ; 1,0 % ; 2,0 % ; 3,0 % ; 4,0 % ; 5,0 % ; dan 6,0 %.

Kemudian daun kubis dicelupkan selama 5 detik pada larutan dengan konsentrasi yang diinginkan, sebagai kontrol

digunakan pelarut metanol dan pengemulsi tanpa bahan ekstrak. Daun yang sudah mendapat perlakuan kemudian dikering-anginkan selama setengah jam untuk menguapkan pelarutnya. Dalam wadah plastik diameter 11 cm tinggi 9 cm yang dialasi kertas saring diletakkan satu lembar daun yang diberi bahan ekstrak dan 1 lembar kontrol, serta penempatan larva instar sebanyak 10 ekor diletakkan sedemikian rupa pada tengah-tengah wadah plastik di antara dua jenis daun perlakuan dan kontrol, sehingga serangga dapat memilih dua jenis daun yang ada (Gambar 4.2)



Keterangan :
a = Larva
b = Daun kubis

Gambar 4.2 Pengujian Aktivitas Makan

Pengamatan dilakukan sesudah 6 jam. Daun dihitung luas yang dimakan, baik daun yang diberi perlakuan atau kontrol. Perlakuan diulang 3 kali. Rancangan yang digunakan adalah

Rancangan Acak Lengkap. Untuk membandingkan rata-rata konsumsi daun perlakuan maupun kontrol digunakan Uji t.

Penurunan aktivitas makan dengan rumus menurut Prijono (1988):

$$P = \left(1 - \frac{T}{C} \right) \times 100 \%$$

Keterangan :

P = Penurunan Aktivitas Makan.

T = Luas daun perlakuan yang dikonsumsi.

C = Luas daun kontrol yang dikonsumsi

2. Metode daun tanpa pilihan

Pada metode ini serangga uji tidak diberikan pilihan antara daun yang diberi senyawa uji dan kontrol. Kedua jenis daun ini yakni senyawa uji dan kontrol terpisah dalam masing-masing wadah plastik. Pada perlakuan ini digunakan 7 taraf konsentrasi (sama dengan Metode Daun Pilihan).

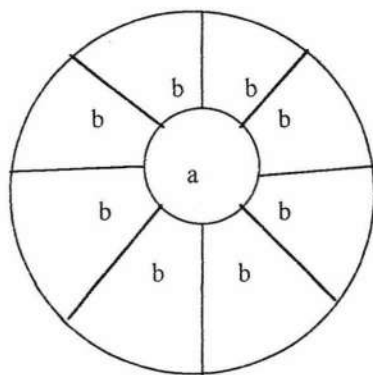
Analisis data untuk aktivitas makan tanpa pilihan digunakan Uji Duncan pada taraf 5 %.

4.3.3.4 Uji anti makan

Dalam uji ini 15 ekor larva dimasukkan dalam wadah plastik diameter 20 cm tinggi 5 cm. Sebelum dimasukkan ke dalam wadah plastik larva dilaparkan selama 24 jam.

Ekstrak kasar dilarutkan dalam metanol dan pengemulsi menjadi beberapa taraf konsentrasi (0,5 % ; 1,0 % ; 2,0 % ; 3,0 % ; 4,0 % ; 5,0 %; dan 6,0 %). Kemudian daun kubis ukuran $3 \times 3 \text{ cm}^2$ dicelupkan satu per satu dalam suspensi ekstrak pada masing-masing konsentrasi selama 5 detik dan dikering-anginkan. Daun kontrol dicelup dalam metanol dan pengemulsi tanpa bahan ekstrak. Kemudian daun perlakuan dan kontrol dimasukkan dalam wadah plastik secara acak.

Percobaan ini diulang tiga kali. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap. Pengamatan dilakukan 1, 6, 12, dan 24 jam setelah perlakuan dengan menghitung jumlah serangga yang dijumpai pada masing-masing perlakuan dalam wadah plastik.



Keterangan : a = larva
b = daun kubis

Gambar 4.3 Pengujian Anti makan

Untuk membandingkan rata-rata perlakuan ekstrak maupun kontrol digunakan Uji Beganda Duncan pada taraf 5 %.

4.3.3.5 Pengaruh ekstrak terhadap perkembangan larva *C. binotalis*

Sebagai serangga uji digunakan 10 ekor larva instar terakhir dari *C. binotalis*. Konsentrasi senyawa ekstrak dibuat serial mulai 0,5 % ; 1,0 % ; 2,0 % ; 3,0 % ; 4,0 % ; 5,0 % ; 6,0 % dan kontrol. Perlakuan kontrol hanya diberi metanol dan pengemulsi. Kemudian daun kubis ukuran 3 x 3 Cm dicelupkan satu per satu dalam suspensi ekstrak pada masing-masing konsentrasi selama 5 detik dan dikering-anginkan. Daun kontrol dicelup dalam metanol dan pengemulsi tanpa ekstrak. Setelah daun perlakuan dan kontrol kering, dimasukkan dalam wadah plastik diameter 11 cm, tinggi 9 cm yang dialasi kertas tissue, kemudian dimasukkan 10 ekor larva. Setelah 24 jam daun sisa diganti dengan daun baru tanpa perlakuan.

Pengamatan dilakukan setiap hari sampai berubah menjadi imago yang meliputi jumlah dan lamanya larva menjadi pupa dan jumlah pupa yang menjadi serangga dewasa. Perlakuan diulang tiga kali dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Untuk membandingkan rata-rata perlakuan data dianalisis dengan Uji Berganda Duncan pada taraf 5 %.

4.3.3.6 Uji penetasan telur

Stadium serangga yang diuji adalah telur . Ekstrak dibuat dalam suatu serial konsentrasi mulai 0 (kontrol); 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ;

3,0 ; 4,0 ; 5,0 ; dan 6,0 persen. Pengujian dilakukan dengan mencelupkan satu kelompok telur ke dalam larutan ekstrak. Percobaan diulang tiga kali dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Pengamatan dilakukan sampai telur tersebut menetas. Jumlah telur yang menetas maupun yang tidak menetas dihitung. Data dianalisis dengan Uji Berganda Duncan padataraf 5 %.

4.3.3.7 Pengaruh ekstraksi dengan air terhadap mortalitas larva *C. binotalis*.

Dalam ekstraksi dengan air sebagai pengeksrak, daun yang telah dikering-anginkan dihaluskan dengan menggunakan blender kering hingga menjadi serbuk. Kemudian 5 gram serbuk daun dimasukkan dalam 100 ml air yang mengandung 0.1 % triton (pengemulsi) selama 30 menit. Ekstrak disaring dengan menggunakan kain kasa halus. Cairan hasil saringan tersebut bisa digunakan untuk pengujian. Konsentrasi ekstrak tersebut adalah 5 gr/100 ml air. Konsentrasi yang digunakan pada pengujian ini adalah 5 gr/100 ml air, 10 gr/100 ml, 15 gr/100 ml, 20 gr/100 ml, 25 gr/100 ml, dan 30 gr/100 ml air. Kemudian daun kubis ukuran 3 x 3 cm dicelupkan satu persatu dalam suspensi ekstrak pada masing-masing konsentrasi selama lima detik, dan dikering-anginkan. Daun kontrol dicelup dalam air dan pengemulsi tanpa ekstrak.

Setelah daun perlakuan dan kontrol kering, dimasukkan dalam wadah plastik diameter 11 cm, tinggi 9 cm yang dialasi kertas tissue, kemudian dimasukkan 10 ekor larva *C. binotalis* instar III. Untuk setiap taraf konsentrasi digunakan tiga ulangan. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap. Setelah 24 jam daun sisa diganti dengan daun baru yang diberi perlakuan sama dengan perlakuan sebelumnya. Setelah 24 jam berikutnya, baik pada perlakuan maupun kontrol, daun sisa diganti dengan daun tanpa perlakuan.

Pengaruh ekstrak terhadap kematian larva dicatat setiap hari hingga saat berkepompong. Untuk membandingkan rata-rata perlakuan ekstrak maupun kontrol digunakan Uji Berganda Duncan pada taraf 5 %. Analisis data hubungan antara konsentrasi ekstrak dan tingkat kematian larva dilakukan dengan metode Analisis Probit (Finney, 1971). Metode analisis probit menggunakan komputer program quantum.