

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi dan Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang. Waktu penelitian dilaksanakan bulan Januari – Juli 2004.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah tabung pemeliharaan, toples, tisu, petridish, timbangan, gelas ukur, pipet tetes, erlenmeyer, pisau, rotary evaporator, kuas kecil, beaker glass, labu rotary, corong buchner, kertas saring, aluminium foil, blender, batang pengaduk, keranjang, ayakan dan nampan.

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun dan ranting tanaman *A. odorata*, metanol, larva *C. binotalis*, larutan madu, dan kubis.

3.3. Cara Kerja

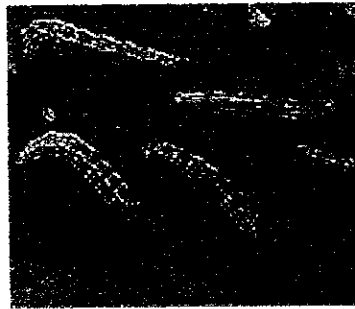
3.3.1. Ekstraksi Campuran Daun dan Ranting *A. odorata*

Tanaman *A. odorata* yang digunakan sebagai ekstrak didapatkan dari wilayah Semarang dan sekitarnya. Daun dan ranting tanaman *A. odorata* yang

telah didapat digiling menjadi satu dalam blender sampai menjadi serbuk, lalu serbuk yang diperoleh diayak dengan ayakan. Serbuk kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer untuk direndam dengan metanol selama 24 jam pada suhu kamar. Campuran disaring dengan corong buchner, dan ampasnya dibilas berulang-ulang dengan metanol sampai hasil saringan tidak berwarna. Cairan hasil saringan diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C - 60°C sampai pekat. Ekstrak pekat yang diperoleh dari hasil penguapan ditampung dan disimpan dalam lemari es pada suhu $\leq 4^{\circ}$ C sampai saat digunakan untuk penelitian (Priyono dan Lina, 1999).

3.3.2. Hewan Uji

Larva *C. binotalis* yang digunakan sebagai hewan uji merupakan hasil perbanyakan di Laboratorium Fisiologi dan Toksikologi Serangga Jurusan HPT-UGM. Larva dipelihara dalam toples dan diberi makan daun kubis segar. Menjelang berkepompong larva dipindahkan ke cawan petri yang dialasi dengan tanah steril. Kepompong yang sempurna dipindahkan dalam toples yang bersih dan imago yang muncul diberi makan madu yang diserapkan pada kapas. Kelompok telur yang dihasilkan kemudian ditempatkan dalam toples yang bersih. Larva yang menetas dipelihara sampai instar III lalu digunakan sebagai hewan uji penelitian.



Gambar 02. Larva *C. binotalis*

3.4. Uji Toksisitas (LC_{50})

Uji toksisitas ini dilakukan menggunakan 'dipping method' (metode celup), dimana makanan serangga (daun kubis) dicelupkan pada larutan ekstrak uji untuk beberapa saat kemudian dikeringanginkan selama beberapa detik, lalu diberikan pada larva (Koestoni, 1985).

3.4.1. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan ini dilakukan untuk menentukan batas-batas LC_5 – LC_{90} dari konsentrasi ekstrak yang diujikan. Untuk menetapkan nilai LC_5 dan LC_{90} tersebut sebelumnya ditentukan terlebih dahulu 5 tingkat konsentrasi dari ekstrak *A. odorata* dan ditambah satu perlakuan kontrol (Koestoni, 1985). Konsentrasi yang digunakan adalah 0,0%; 5,0%; 15,0%; 25,0%; 35,0%; 55,0% (b/v). Hewan uji yang dipakai adalah larva *C. binotalis* instar III sebanyak 10 ekor untuk masing-masing konsentrasi perlakuan dan diulang sebanyak 2 kali. Mortalitas larva diamati setiap 6, 12, 24, 48, 72, dan 96 jam.

3.4.2. Uji Sebenarnya

Penentuan LC_{50} yang sebenarnya dari ekstrak *A. odorata* dilakukan dengan menentukan 5 tingkatan konsentrasi berdasarkan dari batasan LC_5 dan LC_{90} ditambah dengan satu perlakuan kontrol (Koestoni, 1985). Tingkatan konsentrasi yang akan digunakan dihitung dengan menggunakan rumus Hubert (1979 dalam Istiadi, 1998), yaitu :

$$\log \frac{N}{n} = k \left(\log \frac{a}{n} \right)$$

- dimana,
- N : nilai konsentrasi ambang atas
 - n : nilai konsentrasi ambang bawah
 - a : nilai konsentrasi terkecil pada uji penentuan LC_{50}
 - k : jumlah konsentrasi ekstrak yang akan diujikan

Setelah nilai a diperoleh maka dilakukan penghitungan terhadap tingkatan konsentrasi yang lain dengan menggunakan rumus :

$$\frac{a}{n} = \frac{b}{a} = \frac{c}{b} = \frac{d}{c} = \frac{e}{d}$$

Tingkatan konsentrasi yang diperoleh dan digunakan pada uji sebenarnya adalah 0,0%; 8,0%; 13,0%; 21,0%; 34,0%; 55,0% (b/v). Larva yang digunakan adalah larva instar III sebanyak 10 ekor untuk tiap-tiap konsentrasi, diulang sebanyak 2 kali dan mortalitas larva diamati setiap 6, 12, 24, 48, 72 dan 96 jam.

3.5. Uji Pertumbuhan

Untuk uji pertumbuhan ini ditentukan tingkatan konsentrasi ekstrak dibawah nilai LC_{50} yaitu 3,5%; 7,0%; 14,0% (b/v) dan ditambah satu perlakuan kontrol. Uji ini menggunakan konsentrasi dibawah nilai LC_{50} karena diharapkan pada konsentrasi tersebut semua larva tidak mengalami kematian yang cepat sehingga pengamatan terhadap pertumbuhan dapat dilaksanakan. Setiap konsentrasi diujikan 10 ekor larva *C. binotalis* instar I dan diulang sebanyak 3 kali. Pengamatan dilakukan setiap hari.

Untuk menentukan Indeks Pertumbuhan (GI) dan Indeks Pertumbuhan Relatif (RGI) digunakan rumus Zhang *et al.* (1993 dalam Permana, 1999), yaitu :

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

- GI : indeks pertumbuhan
- i : jumlah tahapan
- n(i max) : jumlah larva yang hidup pada stadium i maksimal
- nⁱ : jumlah larva yang mati pada stadium i
- i_{max} : tahap tertinggi yang dapat dicapai oleh serangga
- N : jumlah larva awal yang digunakan dalam setiap kelompok

$$RGI = \frac{GI_{Perlakuan}}{GI_{Kontrol}} \times 100\%$$

3.6. Parameter

Parameter yang diamati untuk toksisitas adalah jumlah larva yang mati pada setiap konsentrasi ekstrak. Sedangkan uji pertumbuhan yang diamati adalah jumlah larva yang hidup atau berhasil tumbuh menjadi instar berikutnya dan yang mati atau tidak tumbuh menjadi instar berikutnya serta larva yang tumbuh menjadi pupa .

3.7. Analisis Data

Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data toksisitas dianalisis menggunakan analisis probit untuk mengetahui nilai LC_{50} (Koestoni,1985). Data larva yang hidup atau tumbuh menjadi instar berikutnya dan yang mati atau tidak tumbuh menjadi instar berikutnya dianalisis menggunakan rumus Zhang *et al.* (1993 dalam Permana, 1999). Data toksisitas dan jumlah larva yang menjadi pupa normal dianalisis menggunakan Anova, jika terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji lanjut dengan taraf uji 5% (Hanafiah, 2000).