

IV. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian :

Penelitian dilakukan di Kepuh GKIII/809,
Kelurahan Klitren, Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian :

Penelitian dilakukan bulan November 1995 -
Februari 1996.

B. Bahan dan Alat

1. Bahan Penelitian:

- Daun Mimba, *A. indica*. Daun mimba diambil didalam taman Susteran Carolus Boromeus Kompleks Rumah Sakit Panti Rapih, Jl. Colombo, Yogyakarta. Daun yang diambil adalah daun yang cukup tua, diambil 10 tangkai daun terbawah dari setiap cabang (Agung, 1995).
- Daun Kedelai, *Glycine max* varietas Wilis diambil dari ladang di dusun Soropadan, Kelurahan Condong Catur, Yogyakarta. Umur daun kedelai kurang lebih 40 hari setelah tanam.

- Ulat grayak , *S. litura* diambil dari daerah pertanian di selatan Pabrik Gula Madukismo, Bantul, Yogyakarta. Jumlah larva 109. Semua larva yang didapat dipelihara dan dibiakkan secara massal dan yang digunakan untuk perlakuan adalah instar ketiga.

- Aqua Bides
- Alkohol 60%
- Larutan Madu 10%

2. Alat :

- Gelas ukur
- Timbangan
- Pipet
- Gelas plastik
- Nampan plastik
- Toples plastik transparan berbagai ukuran.
- Kasa strimin
- Pinset
- Kertas Towel
- Kapas
- Termometer
- Mortir
- Gelas ukur
- Botol kaca gelap
- Penggaris
- Karet gelang

C. Metode Percobaan

Percobaan dilakukan dengan 6 perlakuan (termasuk kontrol) dengan 5 ulangan. Penempatan nampan uji pada tiap ulangan berbeda (diacak).

Pengujian toksisitas dilakukan dengan metode celup, dengan pengamatan selang 6 jam selama 72 jam setelah sehari perlakuan. Pengamatan efek ekstrak terhadap tahap perubahan dari pupa ke ngengat, dilakukan setelah pengamatan uji toksisitas selesai (hari ke 4, jam ke 78 sampai dewasa).

D. Cara Kerja

1. Pembiakkan Ulat Grayak

Ulat grayak yang didapat dari lapangan dipelihara dalam nampan plastik yang dibawahnya dilapisi kertas towel dan diberi pakan daun kedelai. Larva yang telah mencapai akhir instar IV dipindahkan dengan menggunakan kuas dan diletakkan di atas media tanah steril. Larva tersebut nanti akan masuk ke dalam tanah dan memasuki stadium pupa (kurang lebih 2 hari).

Pupa dipisahkan antara pupa betina dan

jantan (skema ciri pupa jantan dan betina terlampir). Menurut Kalshoven (1981) ngengat betina selalu siap kawin, oleh karena itu perbandingan antara ngengat betina dan ngengat jantan adalah 1:3 (Listyo, 1996). Untuk menjaga kelembaban pupa, tiap kelompok (3 betina 9 jantan) diletakkan di atas kain penutup wadah berisi air dan dimasukkan toples berlapis kertas towel.

Ngengat yang didapat diberi makan cairan madu 10%. Setelah 2 hari ngengat berkopulasi dan siap bertelur. Setelah peneluran ngengat dipindah pada toples lain, dan kelompok telur digunting dari tertas towel. Kelompok telur ini diletakkan pada toples dengan kertas towel di dasar toples.

Pada hari ke-3 telur menetas dan menjadi larva. Larva dipindah ke nampan plastik ukuran tinggi 16 cm, lebar 39 cm, panjang 40 cm. Larva dipelihara dengan memberi makan daun kedelai secukupnya. Dilakukan penjarangan dengan memindah sebagian larva kenampan yang lain. Larva ulat grayak mencapai instar III kurang lebih 5 hari setelah telur menetas. Larva instar III ini siap digunakan untuk penelitian.

2. Pembuatan ekstrak air daun Mimba, *A. indica* dengan pelarut Aqua bides (Latum,1985):

Daun Mimba segar digerus dengan mortir sampai lembut kemudian ditempatkan dalam suatu wadah. Tujuan penggerusan daun untuk memudahkan pelarutan bahan aktif daun. Gerusan daun ditimbang, kemudian direndam dalam aqua bides selama 24 jam. Dibuat konsentrasi 0, 5%, 10%, 20%, 40%, 80% (b/v).

Pada penentuan nilai LC 50 digunakan 5 konsentrasi diantara nilai LC 5 dan LC 95. Setelah didiamkan 24 jam, ekstrak tersebut siap digunakan.

3. Percobaan pendahuluan, penentuan nilai LC 5 dan LC 95 ekstrak air daun mimba pada ulat grayak dengan metode pencelupan daun kedelai ("dipping"), (Koestoni, 1993). :
 - a. Menentukan lima macam konsentrasi dari insektisida yang diuji, hingga jumlah keseluruhan perlakuan ditambah kontrol adalah enam perlakuan. Konsentrasi yang dipilih adalah 5%, 10%, 20%, 40%, 80%.
 - b. Menyiapkan 40 ekor ulat grayak instar III untuk tiap konsentrasi perlakuan. Ulat tersebut ditem-

patkan dalam nampan plastik dengan alas kertas towel dan penutup atas plastik strimin dengan ukuran mata terkecil. Ukuran nampan plastik yang digunakan tinggi 16 cm, lebar 30 cm dan panjang 40 cm. Untuk 6 macam konsentrasi perlakuan dibutuhkan 240 larva ulat grayak hasil biakkan.

- c. Daun kedelai (dengan 3 anak daun) dicelupkan ke dalam 5 ekstrak uji dan satu kontrol (aqua bides) selama 10 detik. Daun kemudian dikering anginkan (Koestoni M, 1993). Daun kedelai 20 lembar yang telah kering angin dimasukkan nampan plastik beralas kertas towel kemudian didalamnya dimasukkan 40 ekor larva ulat grayak instar III, kemudian ditutup plastik strimin dan diikat dengan karet gelang.
- d. Keenam nampan plastik perlakuan diletakkan di atas meja dengan urutan acak dalam suhu ruang selama 24 jam.
- e. Setelah 24 jam, ulat dipindahkan dalam nampan plastik yang baru dan kemudian diberi pakan daun kedelai tanpa pencelupan. Dilakukan pengamatan dan pencatatan larva ulat yang mati pada jam ke 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 (Koestoni, 1985).
- f. Penentuan nilai LC 5 dan LC 95 ditentukan oleh konsentrasi yang mengakibatkan kematian sebanyak

5% dan 95% dari jumlah larva yang diuji.

4. Penentuan nilai LC 50 dari ekstrak air daun Mimba pada ulat grayak, dengan metoda pencelupan daun kedelai ("dipping") (Koestoni,1993):
 - a. Perlakuan untuk menentukan nilai LC 50 digunakan 5 konsentrasi diantara nilai LC 5 dan LC 95.
 - b. Daun kedelai yang akan digunakan untuk perlakuan di bersihkan dari kotoran. Dan kemudian dilakukan pencelupan pada ekstrak dengan konsentrasi perlakuan ditambah kontrol. Daun dicelupkan selama 10 detik kemudian dikering anginkan.
 - c. Daun ditata dalam tiap nampan plastik tempat perlakuan. Dalam tiap nampan plastik dimasukkan 40 larva ulat.
 - d. Setelah 24 jam semua larva ulat dalam nampan plastik dipindahkan ke dalam nampan plastik yang baru dan kemudian diberi daun kedelai tanpa perlakuan.
 - e. Dilakukan pengamatan pada jam ke 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72 (Koestoni,1985). Pada jam tersebut dilakukan pengamatan dan pencatatan jumlah larva ulat yang mati.
 - f. Penetapan nilai LC 50 yang sesungguhnya dilakukan penghitungan cara grafik menurut Koestoni (1993).

Data tambahan berupa hasil pengamatan diskriptif terhadap semua larva ulat yang tidak mati pada waktu penentuan nilai LC dilakukan.

5. Parameter Yang Diamati:

- a. Pada penentuan LC 5 dan LC 95, dan LC 50 yang sesungguhnya, parameter yang diamati adalah jumlah larva ulat grayak yang mati pada jam ke 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, dan 72.
- b. Pada pengamatan efek ekstrak perlakuan terhadap salah satu tahap siklus metamorfosa (stadium perubahan dari larva ulat grayak ke ngengat), dilakukan pengamatan data deskriptif yaitu :
 1. Ukuran panjang.
 2. Bentuk ngengat yang dihasilkan.
 3. Waktu atau lama tiap instar.

Pada stadium pupa, tiap satu unit perlakuan dilakukan penghitungan dan pengukuran panjang serta dicatat ciri-ciri morfologi yang khas. Pupa yang telah diukur kemudian dikelompokkan terpisah.

Ngengat yang didapat dipelihara dan dilihat apakah mampu terbang, mencari makan dan kawin.