

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi dan Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang. Waktu penelitian dilaksanakan dari bulan April sampai September 1997.

B. Alat dan Bahan

B.1. Alat

- Blender
- Cawan petri
- Gelas ukur
- Pipet tetes
- Timbangan Sartorius
- Kandang pembiakan
- Kandang pemeliharaan
- Botol maserasi
- Evaporator putar
- Erlenmeyer

B.2. Bahan

- Daun dan berbagai stadium bunga *Chrysanthemum sp.*
- Larva *H. armigera*.
- Etanol 95 %
- Kacang buncis dan “baby corn”
- Larutan Tween 20

- Bahan agar
- Air
- Vitamin B komplek
- Vitamin C (powder)
- Nipagin
- Formalin
- Glukosa

C. Cara Kerja

C.1. Ekstraksi Bahan Uji

Bahan dasar ekstraksi berupa daun dan berbagai stadium bunga *Chrysanthemum sp.* yang dikumpulkan dari kebun bunga petani di daerah Bandungan, Semarang. Bunga dan daun tumbuhan tersebut setelah dibersihkan dari kotoran, kemudian dikering-anginkan, supaya senyawa metabolik sekunder yang dikandungnya tidak menjadi rusak karena terdedah sinar matahari langsung (Harborne, 1987). Setelah kering, untuk memudahkan penetrasi pelarut yang digunakan dalam mengekstraksinya, bunga maupun daun secara terpisah digiling dengan mesin penggiling hingga diperoleh serbuk kering. Bahan serbuk kering yang sudah siap diekstraksi selanjutnya disebut simplisia (Soetarno, 1995).

Simplisia dimaserasi dengan pelarut polar etanol 95 % selama 3-4 hari pada suhu kamar (Harborne, 1987). Penggunaan pelarut etanol 95 %, dikarenakan sifat kepolarannya yang dapat menarik semua senyawa yang terkandung di dalam

simplisia, khususnya senyawa yang bersifat polar. Setelah 3-4 hari dilakukan penyaringan terhadap maserat yang dihasilkan, maserat yang dihasilkan ditampung dalam suatu erlenmeyer. Tahapan maserasi ini diulang beberapa kali sampai maserat yang diperoleh sudah tampak bening. Maserat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan destilasi menggunakan evaporator putar pada suhu 40-50^o C untuk memisahkan senyawa dari pelarutnya, hingga diperoleh ekstrak pekat.

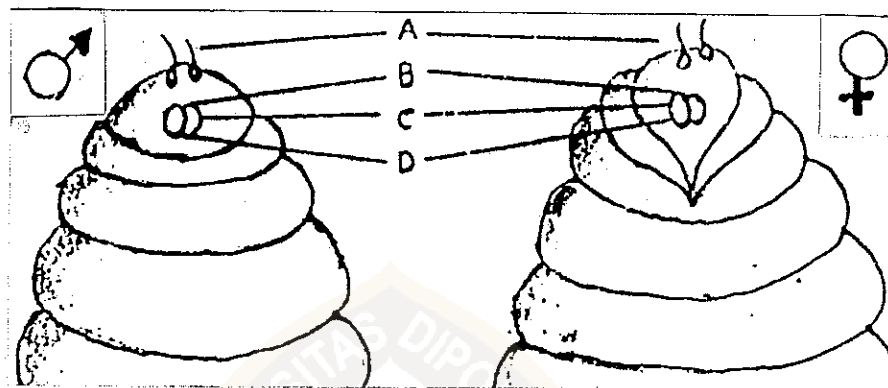
Sebagai tindakan pencegahan atas kerusakan komposisi kimia simplisia karena pengurangan atau perusakan senyawa yang terkandung, maka ekstrak kasar tersebut disimpan dalam pendingin pada suhu 0^o C. Pelaksanaan tahapan ekstraksi dilakukan secara bertahap dan kontinyu, dengan asumsi supaya sediaan bahan uji masih relatif baru.

C.2. Hewan Uji

Larva *H. armigera*. diperoleh dari perkebunan jagung di daerah Bandungan. Larva biasa ditemukan pada ujung tongkol jagung yang terlihat rusak atau membusuk dan ditandai dengan rambut terputus-putus. Larva yang berhasil dikumpulkan sebagai induk hewan uji, dipelihara di Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA, dengan menggunakan pakan buncis atau "baby corn" (Gambar 05). Sisa makanan buncis ini diganti setiap hari, untuk menghindari kematian larva akibat kandungan airnya.

Larva yang telah menjadi stadia pra-pupa dipindahkan ke tempat yang bersih dan kering. Larva yang berhasil menjadi pupa dikumpulkan, kemudian

diperiksa jenis kelaminnya menggunakan lensa pembesar, berdasarkan bentuk yang dikemukakan oleh Nasir (1991 dalam Hadi, 1996), yang terdapat pada ujung abdomen bagian ventral (Gambar 01).

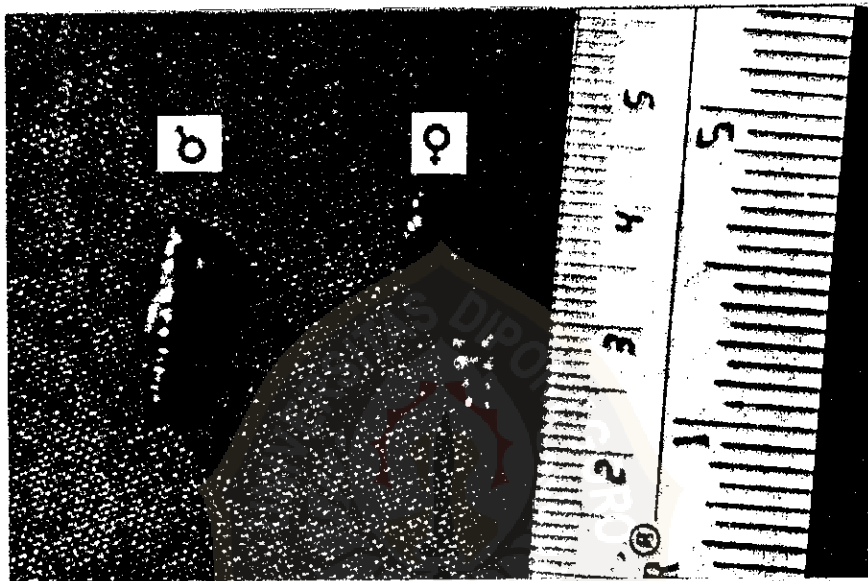


Gambar 01. Segmen terakhir abdomen bagian ventral pupa *H. armigera* jantan dan betina. A. cremaster, B. calon anus, C. sutura, D. calon organ genital.

Pembiakan serangga dilakukan dengan memilih serangga pada fase pupa dengan perbandingan 5 jantan dan 5 betina (Gambar 02). Kemudian pupa dimasukkan ke dalam kandang perkawinan. Bagian atas kandang diberi kertas tissue berwarna putih sebagai tempat peletakan telur dan disekelilingnya diberi kain hitam yang bertujuan untuk mengurangi intensitas cahaya. Pemeliharaan ngengat dilakukan pada suhu kamar dengan kelembaban relatif (Rh) sekitar 70-80 % dan fotoperiode 12 jam terang dan 12 jam gelap. Pada periode gelap, di luar kandang perkawinan dilengkapi dengan lampu 5 watt berwarna merah, untuk merangsang terjadinya perkawinan.

Sebagai makananya diberikan larutan gula 10 % dan larutan madu 10 % secara terpisah. Kertas-kertas tissue yang telah dipenuhi dengan telur disimpan

dalam suatu nampan plastik yang dilengkapi dengan ventilasi udara dan dibiarkan menetas. Larva yang baru menetas dimasukkan ke dalam vial-vial plastik berisi pakan buatan dan siap digunakan untuk pengamatan mortalitas, pertumbuhan dan perkembangan berdasarkan metoda Zhang *et al.* (1993 dalam Yusnarty, 1996).



Gambar 02. Pupa *H. armigera* jantan dan betina.



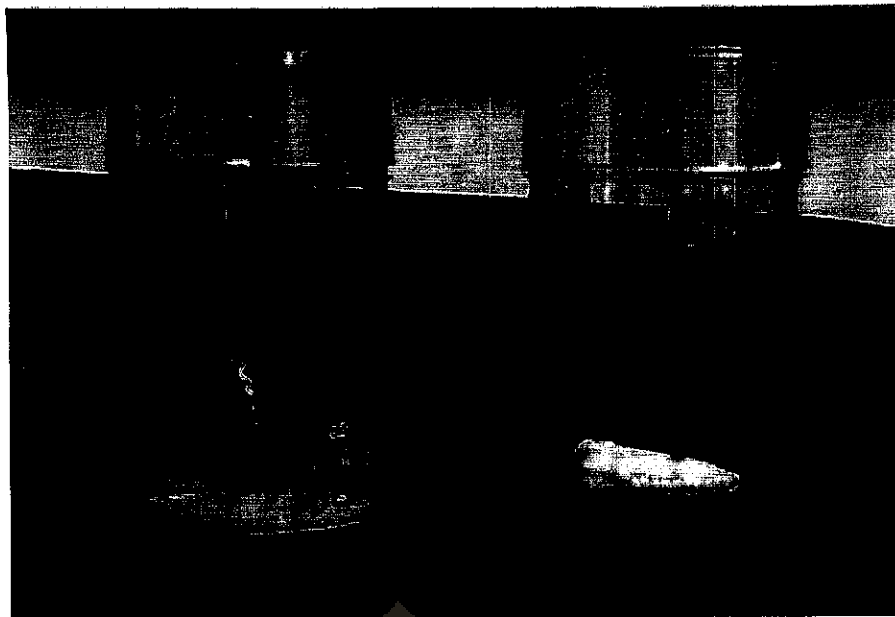
Gambar 03. Larva instar V *H. armigera*.



Gambar 04. Ngengat *H. armigera*

C. 3. Pembuatan Pakan Buatan

Pembuatan pakan buatan ini mengacu kepada metoda yang dikemukakan oleh Waldbauer *et al* (1984 dalam Hadi, 1996). Sebanyak 20 gr bahan agar dimasak dengan 800 ml air hingga mendidih, kemudian didinginkan sampai suhu kurang lebih 60⁰ C. Sementara itu sebanyak 120 gr sari kedelai, 40 gr “baby corn”, digiling dalam blender dengan 100 ml air. Kemudian dimasukan larutan agar yang sudah mulai dingin (50⁰ C) terus diaduk dalam blender hingga berbentuk pasta dan tercampur rata. Setelah itu dimasukan 2,5 gr nipagin, 2 gr vitamin B kompleks, 2 gr vitamin C (powder), 4 gr glukosa, dan 2 gr fruktosa. Terakhir baru ditambahkan 5 ml formalin 5 % sambil terus diaduk rata, kemudian dituangkan dalam vial-vial plastik berdiameter 5 cm dan tinggi 8 cm dengan ketebalan 1-1,5 cm yang diperkirakan cukup untuk pemeliharaan larva sampai akhir instar IV (Gambar 05).



Gambar 05. Tabung pemeliharaan larva *H. armigera*. A. dengan pakan buatan, B. dengan pakan alami.

Pencampuran bahan ekstrak ke dalam pakan buatan, didasarkan dari modifikasi Hadi, (1996). Bahan ekstrak dalam ukuran tertentu sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan, dikocok hingga rata dengan 1 % larutan tween 20, kemudian dicampur dengan makanan buatan pada suhu 50^o C, untuk menghindari kerusakan bahan ekstrak akibat panas. Setelah dikocok rata, baru dituangkan ke dalam wadah plastik segi empat berukuran 9 X 10 X 4 cm. Apabila sudah dingin dan mengeras, siap digunakan sebagai pakan larva untuk pengukuran LC-50. Untuk pengukuran mortalitas, laju pertumbuhan dan perkembangan larva, pakan dimasukan ke dalam vial-vial plastik berdiameter 5 cm dan tinggi 8 cm.

D. Uji Toksisitas (LC-50)

Uji LC-50 dilakukan untuk menentukan konsentrasi larutan perlakuan.

Dalam usaha menetapkan nilai LC 5 dan LC 90 / 48 jam ditentukan 5 tingkatan

konsentrasi dari bahan ekstrak uji ditambah dua perlakuan kontrol. Konsentrasi bahan uji yang dipakai untuk ekstrak etanol daun maupun berbagai stadium bunga adalah 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 persen (v/v). Konsentrasi bahan uji dibuat dengan menambahkan ekstrak uji dengan 1 % larutan tween 20 sebagai pencampur bahan (Hadi, 1996). Hewan uji adalah larva instar V *H. armigera* (Gambar 03) yang baru molting dan belum makan, sebanyak sepuluh ekor untuk masing-masing konsentrasi perlakuan. Banyaknya ulangan adalah satu kali. Mortalitas larva uji diamati setiap 2, 4, 6,...48 jam.

Penentuan LC-50 yang sesungguhnya dari bahan ekstrak yang diuji dilakukan dengan menentukan lima kisaran konsentrasi berdasarkan dari batasan-batasan LC 5 dan LC 90 / 48 jam yang telah dilakukan sebelumnya, ditambah perlakuan kontrol. Banyaknya larva setiap perlakuan sebanyak 15 ekor. Waktu pengamatan dilakukan pada 2, 4, 6, ...48 jam, setelah aplikasi. Data mortalitas larva uji kemudian dianalisis menggunakan Analisis Probit (Koestoni, 1985), untuk memperoleh nilai LC-50 bahan uji.

E. Pengaruh Ekstrak Daun dan Berbagai Stadium Bunga *Chrysanthemum sp.* Terhadap Mortalitas, Pertumbuhan dan Perkembangan Larva *H armigera*.

Untuk pengukuran mortalitas, pertumbuhan dan perkembangan larva mengacu pada metoda yang diperkenalkan oleh Zhang *et al.* (1993 dalam Yusnarty, 1996). Ke dalam vial-vial plastik yang berisi campuran pakan buatan dan bahan

ekstrak dengan empat tingkat konsentrasi dibawah nilai LC-50 dimasukkan larva instar I *H. armigera*. Pengamatan dilakukan setiap hari, untuk mengamati perubahan instar, jumlah larva yang mati dan yang masih hidup pada setiap instar, dan jumlah larva yang berhasil menjadi pupa. Mortalitas larva adalah jumlah larva yang mati pada setiap perlakuan konsentrasi.

Pertumbuhan larva dapat digambarkan oleh kemampuan larva untuk molting dan berkembang menjadi instar berikutnya. Indek pertumbuhan larva yang dapat menggambarkan laju pertumbuhannya dapat dihitung berdasarkan distribusi larva yang mati dan hidup pada setiap instar dan jumlah larva yang berhasil menjadi pupa. Dengan menggunakan rumus Zhang *et al.* (1993 dalam Yusnarty, 1996) berikut ini, dapat ditentukan indek pertumbuhan dari larva *H. armigera*.

$$GI = \frac{[n(i_{max}) \times i_{max}] + \sum_{i=1}^{i_{max}} [n'(i) \times (i-1)]}{N \times i_{max}}$$

dimana,

GI : Indeks pertumbuhan

i : Nomor stadium

$n(i_{max})$: Jumlah larva yang hidup pada stadium i_{max}

$n'(i)$: Jumlah larva yang mati pada stadium i

i_{max} : Stadium tertinggi yang dicapai serangga, biasanya 5 atau 6

N : Jumlah total larva dalam kelompok

Untuk menghitung RGI (Relative Growth Index = Indeks Pertumbuhan Relatif) dari larva, digunakan rumus berikut ini :

$$\text{RGI} = \frac{\text{indek pertumbuhan pada perlakuan}}{\text{indek pertumbuhan pada kelompok kontrol}}$$

F. Model Analisis Data

Percobaan dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perulangan perlakuan 15 kali.

Data mortalitas yang diperoleh dianalisis dengan Analisis Probit (Koestoni, 1985). Data mortalitas, dan jumlah larva yang berhasil menjadi pupa normal dianalisis dengan Analisis of Varian (ANOVA). Jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan Uji jarak Berganda Duncan pada taraf uji 5 %. (Gomez dan Gomez, 1995). Adapun data distribusi larva yang hidup dan yang mati pada tiap instar diolah dengan menggunakan rumus yang dikemukakan oleh Zhang *et al.* (1993 dalam Yusnarty, 1996) sehingga diperoleh nilai indeks pertumbuhan dan nilai pertumbuhan relatif larva uji.