

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Undip. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai bulan September 2004.

#### **3.2. Alat dan Bahan**

##### **3.2.1. Alat**

Alat-alat yang digunakan adalah mangkok porselin, erlenmeyer, labu ukur, cawan petri, dan buret.

##### **3.2.2. Bahan**

Bahan yang digunakan adalah *A. odorata*, *C. binotalis*, *E. argenteopilosus*, aquades, kloroform, metanol, dan kubis.

#### **3.3. Cara Kerja**

##### **3.3.1. Pembuatan dan Pengujian Ekstrak Daun dan Ranting *A. odorata***

###### **Cara ekstraksi :**

Daun dan ranting *A. odorata* dibersihkan dan dikering-anginkan serta diiris kecil-kecil sebanyak 400 g. Irisan ditampung ke dalam suatu mangkok

porcelain dan ditumbuk menggunakan mortir. Hasilnya dimasukkan ke dalam Erlenmeyer lalu ditambahkan 400 mL metanol. Campuran tersebut diaduk dalam corong Buchner yang dilapisi kertas saring Whatman no. 1. Cairan ekstrak hasil saringan diuapkan pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 45-50 °C dan tekanan 15 mm Hg sampai volume minimum (F:1). Kemudian filtrat dimasukkan ke dalam corong funnel dengan campuran metanol-kloroform-air (1:3:4) dan 0.7% NaCl, dibiarkan 24 jam sampai terjadi pemisahan menjadi lapisan air dan methanol-kloroform (F:2). Selanjutnya methanol-kloroform diuapkan kembali dengan menggunakan rotary evaporator. Labu penguap ditimbang lebih dahulu sebelum ekstrak dimasukkan, kemudian labu dan ekstrak dimasukkan ke dalam labu penguap. Setelah penguapan selesai, labu dan ekstrak ditimbang kembali sehingga berat ekstrak dapat diketahui. Ekstrak disimpan dalam lemari pendingin ( $t^0 -4^0C$ ) selama tidak digunakan (Martono, 1994). Keseluruhan proses diatas menghasilkan ekstrak sebanyak 0,6 gram.

#### **Cara pembuatan larutan uji :**

Larutan uji pada konsentrasi tertentu digunakan pada penelitian dengan metode residu pada daun. Ekstrak daun dan ranting *A. odorata* dilarutkan dalam 600 ml larutan metanol untuk dibuat larutan induk dengan konsentrasi 1000 mg/L. Kemudian dari larutan induk diambil 1 mL yang dilarutkan dengan metanol sampai 10 mL untuk membuat larutan uji 100 mg/L, demikian seterusnya untuk konsentrasi yang lain. Larutan induk disimpan dalam lemari pendingin ( $t -4^0C$ ) selama tidak digunakan.

### 3.3.2. Koleksi dan Pembiakan Hewan Uji

#### Koleksi dan Pembiakan *C. binotalis*

Larva *C. binotalis* dikoleksi dari kebun kubis Kopeng (Jawa Tengah) dengan cara mengamati tanaman yang terserang hama tersebut. Kemudian dengan cara memetik daun yang terserang atau dengan mengambil langsung ulatnya dan kemudian dimasukkan kedalam stoples plastik (diameter 15 cm, tinggi 20 cm) yang bagian atasnya ditutup dengan kain strimin.

Larva *C. binotalis* hasil koleksi dibiakkan di laboratorium untuk mendapatkan hewan uji yang seragam dalam jumlah cukup. Larva dipelihara dengan memberi pakan daun kubis. Setelah memasuki instar terakhir, larva dipindahkan ke dalam stoples yang di dasarnya diberi pasir steril setinggi 5 cm untuk membantu proses pupasi. Pupa yang terbentuk dipilih yang hidup dan dipindahkan ke dalam stoples yang bagian dasar dan sisi tingginya diberi kertas saring, dan bagian atas ditutup dengan kain strimin. Setelah imago keluar, bagian atas stoples diberi kapas yang telah ditetesi larutan gula 10 % untuk pakan imago. Stoples dibungkus plastik hitam agar suasananya gelap sehingga merangsang imago melakukan kopulasi dan peletakan telur. Telur dipanen dengan cara menggantung kertas di sekeliling kelompok telur, kemudian diinkubasikan dalam stoples dan diberi daun kubis sebagai pakan.

#### Koleksi dan Pembiakan *E. argenteopilosus*

Parasitoid *E. argenteopilosus* dikoleksi dengan cara menggunakan jaring yang diayunkan diatas tanaman kubis berkali-kali dan juga dengan cara mengkoleksi larva yang diduga terparasit, kemudian dimasukkan kedalam stoples

plastik dan didalamnya diberikan bola-bola kapas yang dicelupkan kedalam larutan gula 10% sebagai makanan parasitoid dan daun kubis sebagai makanan larva. Hewan hasil koleksi kemudian dipelihara ditempat pembiakan parasitoid yang didalamnya diberi kapas yang dicelupkan kedalam larutan gula 10%, juga diberikan umpan larva sebanyak 10 ekor larva instar pertama dan kedua. Parasitoid yang muncul kemudian dibiakan lebih lanjut sampai jumlah parasitoid mencukupi untuk keperluan uji parasitoid.

### **3.3.3. Pengujian Toksisitas Ekstrak Daun dan Ranting *A. odorata* terhadap Larva *C. binotalis***

Pengujian toksisitas ekstrak terhadap *C. binotalis* menggunakan larva instar 2 dilakukan dengan enam taraf konsentrasi larutan, yaitu 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 mg/L, dan satu perlakuan kontrol. Penentuan konsentrasi ini didasarkan pada hasil uji pendahuluan dengan taraf konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250, 300 mg/L, dan satu perlakuan kontrol.

Satu lembar daun kubis berbentuk lingkaran (diameter 10 cm) dicelupkan ke dalam larutan uji selama 20 detik sesuai dengan konsentrasi yang dikehendaki, kemudian dikering-anginkan. Sedangkan untuk kontrol, daun hanya dicelupkan ke dalam larutan metanol tanpa perlakuan ekstrak.

Daun yang telah diberi perlakuan ekstrak dan kontrol dimasukkan ke dalam tujuh botol gelas (tinggi 20 cm dan diameter 10 cm) sesuai konsentrasi yang dikehendaki, dan pada setiap botol dimasukkan 10 ekor larva *C. binotalis* instar 2. Perlakuan ekstrak terhadap larva hanya dilakukan sekali saja yaitu pada

hari pertama, sedangkan pada hari kedua dan selanjutnya hingga saat larva menjelang kepompong, serangga uji hanya diberi pakan daun kubis segar tanpa perlakuan ekstrak. Jumlah larva yang mati dihitung pada setiap konsentrasi, kemudian dianalisis dengan Probit Analisis (Finney, 1997) untuk mengetahui konsentrasi ekstrak pada  $LC_5$  dan  $LC_{25}$ . Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai konsentrasi ekstrak pada  $LC_5$  sebesar 25,96 mg/L dan pada  $LC_{25}$  sebesar 147,12 mg/L.

#### **3.3.4. Pengujian Ekstrak Daun dan Ranting *A. odorata* terhadap Parasitasi dan Enkapsulasi *E. argenteopilosus***

Percobaan ini untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun dan ranting *A. odorata* terhadap parasitasi dan enkapsulasi baik stadium telur ataupun larva parasitoid *E. argenteopilosus*.

Daun kubis yang mengandung residu ekstrak diujikan terhadap larva instar dua *C. binotalis*, kemudian diumpankan pada imago *E. argenteopilosus* yang sudah kawin. Konsentrasi yang digunakan adalah konsentrasi yang setingkat dengan  $LC_5$  yaitu 25,96 mg/L dan setingkat dengan  $LC_{25}$  yaitu 147,12 mg/L ekstrak daun dan ranting *A. odorata* terhadap parasitoid *E. argenteopilosus*. Daun perlakuan dan kontrol ditempatkan dalam botol gelas. Setiap perlakuan diulang 3 kali.

Pada hari kedua setelah perlakuan larva diberi pakan daun kubis segar tanpa perlakuan ekstrak, demikian juga pada hari-hari berikutnya. Sedangkan pada parasitoidnya diberi pakan larutan gula 10% pada bola-bola kapas. Ada

tidaknya telur parasitoid di dalam tubuh larva *C. binotalis* dan proses terbentuknya enkapsulasi baik pada telur ataupun larva dapat diamati melalui pembedahan larva *C. binotalis* instar 4 di bawah mikroskop binokuler.

Persentase parasitasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$P (\%) = \frac{\sum x}{\sum y} \times 100 \%$$

Keterangan: P = parasitasi

x = jumlah larva *C. binotalis* yang terparasiti

y = jumlah total larva *C. binotalis* yang diujikan

Sedangkan persentase renkapsulasi dihitung dengan menggunakan rumus:

$$E(\%) = \frac{\sum x}{\sum y} \times 100 \%$$

Keterangan: E = enkapsulasi

x = jumlah telur atau larva *E. argenteopilosus* yang terenkapsulasi

y= jumlah total larva *C. binotalis* yang diujikan

### 3.4. Parameter

Parameter yang diamati dalam parasitasi adalah menghitung jumlah telur parasitoid yang terdapat di dalam larva *C. binotalis* dan pada uji enkapsulasi adalah jumlah telur maupun larva parasitoid yang terenkapsulasi dalam larva *C. binotalis*.

### **3.5. Analisa Data**

Percobaan ini menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap).  
Data dianalisis dan perbandingan nilai tengah antar perlakuan diuji dengan Khi Kuadrat.