

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni sampai September 1997, di Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi FMIPA UNDIP Tembalang.

B. Bahan dan Alat

B.1. Bahan :

- biji *Pachyrrhizus erosus*
- ulat daun tembakau (*Agrotis sp.*)
- daun sawi
- akuades
- larutan madu 10%
- etanol 96% teknis
- tween 20

B.2. Alat :

- gelas ukur
- vial-vial plastik diameter 4,5 cm dan tinggi 8 cm
- Stoples plastik berdiameter 12 cm dan tinggi 4 cm.
- blender
- kertas tissue
- kuas kecil
- evaporator putar
- kertas saring

C. Cara Kerja

C.1. Pengadaan Hewan Uji

Hewan uji diperoleh dari lapangan yaitu perkebunan tembakau di daerah Candiroto Temanggung. Larva *Agrotis sp* tersebut kemudian dikembangbiakkan di dalam stoples plastik yang diberi alas kertas tissue dan diberi pakan daun sawi. Kertas tissue berguna menyerap air dari kotoran ulat serta sisa makanan. Setiap hari stoples pemeliharaan dibersihkan dan diganti kertas tisuannya, agar kelembaban stoples pemeliharaan dari kotoran larva dan sisa makanan tidak menyebabkan kematian larva.

Larva yang telah mencapai stadium pre pupa dipindahkan ke dalam stoples baru yang juga diberi alas dengan kertas tissue hingga mencapai stadium pupa dan tidak diberi makan. Stoples pemeliharaan tadi setiap \pm 12 jam selalu disemprot air agar kelembaban stoples pemeliharaan selalu terjaga. Pupa yang telah diperoleh dibedakan jantan dan betinanya untuk dipindahkan ke kandang perkawinan hingga menjadi ngegat dewasa. Pemeriksaan jenis kelamin pupa dapat dilakukan dengan membedakan besar kecilnya pupa. Pupa jantan lebih kecil dibandingkan pupa betina.

Tiap kandang perkawinan diisi dengan 10 pupa jantan dan 10 pupa betina. Pupa diletakkan diatas tissue yang basah hingga menjadi ngegat dewasa. Kandang perkawinan dilengkapi dengan kertas tissue putih sebagai tempat peneluran. Kandang juga ditutup dengan kain hitam dan diberi pencahayaan 5 watt untuk merangsang terjadinya

perkawinan. Ke dalam kandang perkawinan dimasukkan pula larutan gula 10% dan larutan madu 10% sebagai makanan ngengat.

Telur-telur pada kertas peneluran dikumpulkan dan dibiarkan sampai menetas. Setelah menetas larva dipelihara dalam stoples pemeliharaan dengan diberi pakan daun sawi. Setelah mencapai umur 12-13 hari larva akan masuk ke instar IV yang ditandai dengan gambaran leher dibelakang kapsul kepala sebagai tanda akan melakukan ganti kulit (Hadi, 1996). Pada tahap ini larva siap digunakan sebagai hewan uji untuk digunakan dalam penelitian. Penggunaan instar IV disebabkan karena pada instar tersebut kemampuan makan larva paling besar. Pemeliharaan larva dilanjutkan sampai diperoleh jumlah populasi yang mencukupi untuk stok induk.

C.2. Pengadaan ekstrak biji *P. erosus*

Bahan uji yang digunakan untuk penelitian adalah ekstrak biji *P. erosus* dalam berbagai konsentrasi. Biji diperoleh dengan pengumpulan dari daerah Gabukan Sragen dan daerah Klaten.

Biji 2,2 kg yang diperoleh dikupas kulitnya dan dikeringanginkan pada suhu kamar supaya bahan aktif dalam biji tidak terurai oleh sinar matahari. Biji digiling dengan blender hingga menjadi tepung. Kemudian tepung dimaserasi dengan 11 liter etanol 96% dengan alasan etanol mempunyai kepolaran yang tinggi sehingga diharapkan bahan aktif yang terkandung dalam tepung dapat larut semua.

Pelaksanaan maserasi dilakukan selama 3-4 hari yang diteruskan dengan penyaringan terhadap maserat yang diperoleh dan ditampung dalam erlenmeyer. Tahapan maserasi di ulang beberapa kali sampai maserat yang diperoleh sudah kelihatan bening. Selanjutnya maserat diuapkan dengan evaporator putar pada suhu 40°C - 50°C , untuk memisahkan senyawa dari pelarutnya, hingga diperoleh ekstrak. Selanjutnya ekstrak hasil penguapan dipindahkan ke botol selai dan dibiarkan terbuka untuk menguapkan sisa pelarut yang masih tercampur pada suhu ruang selama 7 hari, hingga diperoleh 500 ml ekstrak yang siap pakai.

C.3. Pengujian ekstrak biji *P. erosus* terhadap mortalitas larva *Agrotis sp.*

C.3.1. Uji pendahuluan

Penentuan uji pendahuluan ini dilakukan untuk mengetahui kisaran batas ambang bawah (LC 5) dan ambang atas (LC 90) dari konsentrasi uji yang akan digunakan untuk pengujian sesungguhnya. Caranya adalah dengan menentukan lima tingkatan konsentrasi perlakuan dari ekstrak yang akan diuji dan ditambah satu konsentrasi kontrol (Koestoni, 1985). Jumlah hewan uji tiap perlakuan konsentrasi sebanyak 15 ekor. Konsentrasi yang digunakan pada uji pendahuluan adalah 0, 5, 10, 40, 60, dan 80 persen (v/v).

C.3.2. Uji sesungguhnya

Pengujian ekstrak biji *P. erosus* terhadap mortalitas larva *Agrotis sp.* dengan menggunakan dua uji yaitu uji racun kontak dan uji racun perut. Tahap pelaksanaan pengujian bahan ekstrak biji *P. erosus* adalah : ekstrak yang telah siap digunakan dari hasil penguapan rotary evaporator diencerkan dengan akuades untuk mendapatkan konsentrasi uji yang berbeda. Adapun konsentrasi uji yang digunakan adalah lima tingkatan konsentrasi ditambah satu konsentrasi kontrol berdasarkan nilai ambang bawah dan ambang atas dari hasil uji pendahuluan. Konsentrasi uji pada uji racun kontak dan racun perut adalah sama hanya ditambahkan tween 20 sebanyak 1% dari volume konsentrasi uji yang berfungsi sebagai pencampur bahan larutan (Hadi, 1996).

Hewan uji yang dipergunakan adalah larva *Agrotis sp.* instar IV awal dengan masing-masing unit perlakuan satu ekor sehingga pada tiap perlakuan diperlukan 10 ekor.

C.3.2.1. Cara pengujian racun kontak

Dipersiapkan vial plastik dengan diameter 4,5 cm dan tinggi 8 cm yang di dalamnya dilapisi kertas saring beserta tutupnya [dalamnya diisi dengan 1 lembar daun sawi (*Brassica sp*)]. Larva dicelupkan ke dalam ekstrak sesuai tingkat konsentrasi perlakuan yang diberi tween 20 dan dikeringanginkan ke dalam wadah yang dialasi kertas saring selama 5 menit. Larva diambil dan dimasukkan ke dalam vial plastik yang berisi pakan dengan masing-masing vial satu

ekor larva. Pengamatan mortalitas larva dilakukan setiap 6, 12, 24, 48, 72 jam setelah perlakuan.

C.3.2.2. Cara pengujian uji racun perut

Disiapkan vial-vial plastik dengan diameter 4,5 cm dan tinggi 8 cm yang diberi alas kertas saring di dalamnya beserta tutupnya. Dibuat cakram daun sawi dengan luas $12,56 \text{ cm}^2$ (hasil transformasi berat kering kertas yang diplot dari cakram daun sawi) yang akan digunakan sebagai pakan uji. Kemudian satu lembar cakram daun dicelupkan ke dalam masing-masing ekstrak uji yang telah diberi larutan tween 20 sebagai pencampur bahan. Satu lembar cakram daun dimasukkan ke dalam akuades ditambah larutan tween 20 sebagai kontrol. Cakram daun tersebut dimasukkan ke dalam vial-vial plastik yang disiapkan yang sebelumnya dikeringanginkan dulu selama 5 menit. Ke dalam masing-masing vial uji dimasukkan satu ekor larva uji untuk masing-masing konsentrasi uji 10 kali ulangan. Pengamatan dilakukan setiap 6, 12, 24, 48, 72 jam terhadap mortalitas.

C.3.2.3. Pengujian aktivitas makan larva *Agrotis sp.* yang diperlakukan dengan ekstrak etanol biji *P.erosus*.

Sifat aktivitas makan dari ekstrak etanol biji *P.erosus* terhadap larva *Agrotis sp.*, dapat diketahui dengan adanya metode tanpa memilih dan metode memilih menggunakan cakram daun. Parameter luas cakram daun berasal dari transformasi berat kering dari kertas yang sudah diplot dengan cakram daun sebagai pakan hewan uji. Rumus

transformasi (hasil modifikasi dari korelasi regresi) sebagai berikut:

$$L = \frac{L_s}{Y} \times X$$

Keterangan:

L = luas cakram daun

X = Berat kering kertas yang belum diketahui luasnya

Y = Berat kering kertas yang sudah diketahui luasnya

Ls = luas daun yang diketahui beratnya.

a. Metode tanpa memilih

Pengujian aktivitas makan dengan metode tanpa memilih pada dasarnya sama dengan pengujian racun perut (C.3.2.2.). Perbedaannya pada pengujian aktivitas makan tanpa memilih ini parameter yang diamati adalah luas cakram daun yang di makan larva. Luas cakram daun merupakan hasil tranformasi berat kering kertas yang diplot dari cakram daun.

b. Metode memilih

Cara kerjanya aktivitas makan dengan metode memilih adalah dibuat cakram daun dari daun sawi (*Brassica sp*) dengan luas tertentu (12,56 cm²). Konsentrasi pengujian yang digunakan adalah 0, 10, 20, 40, 60, 80, persen (v/v) dan 0 persen (v/v) hanya akuades saja. Pada masing-masing konsentrasi uji diberi larutan tween 20, sebagai pencampur bahan sebanyak 1 persen dari volume bahan uji dalam berbagai konsentrasi (Hadi, 1996). Satu lembar cakram

daun dicelupkan ke dalam larutan uji sebagai perlakuan dan satu lembar cakram daun dicelupkan pada akuades sebagai kontrol, kemudian dimasukkan ke dalam stoples berdiameter 12 cm dan tinggi 4 cm. Satu ekor larva uji dimasukkan ke dalam stoples uji, masing-masing konsentrasi uji dengan tiga kali ulangan. Pengamatan terhadap luas cakram daun yang dimakan larva dilakukan setelah 10 jam perlakuan, dengan asumsi larva sudah cukup makan.

D. Parameter yang Diamati

- Jumlah mortalitas larva *Agrotis sp.*
- Luas daun sawi yang dimakan larva *Agrotis sp.*

E. Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL), kemudian data mortalitas dan luas cakram daun yang dimakan larva pada metode tanpa memilih dianalisa dengan analisis of varians (Anova) yang dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dengan taraf uji 5% (Kemas, 1991). Selanjutnya untuk pendugaan nilai LC 50 dengan menggunakan analisis Probit menurut metode Busvine-Nash (Koestoni, 1985).

Data uji aktivitas makan dengan metode memilih menggunakan uji t test yang hanya membandingkan antara kontrol dan perlakuan tiap konsentrasi uji.