

## BAB IV

### METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Tempat dan Waktu Penelitian

Evaporasi maserat dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia, sedangkan pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Bio-Sistematik jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

Waktu pelaksanaan penelitian adalah pada bulan Mei sampai dengan bulan Desember 2000.

#### B. Alat dan Bahan

##### 1. A l a t :

- Kandang pembiakan
- Kertas saring
- Botol maserasi
- Erlenmeyer
- Cawan petri
- Blender
- Gelas ukur
- Evaporator putar
- Lemari es
- Pipet tetes
- Timbangan
- Kain putih
- Kertas tissue
- Kuas kecil
- Stoples/vial plastik
- Mikroskop binokuler
- Alumunium foil
- Nampan plastik

## 2. Bahan :

- Daun nimba (*Azadirachta indica* Juss) - Vitamin B kompleks
- Larva *Heliothis armigera* Hubner - Vitamin C
- Aquades - Nipagin
- Etanol 95 % - Formalin 4 %
- Larutan Tween 80 - Gula
- Jagung muda (“putren”) - Madu
- Bahan agar - Minyak jagung

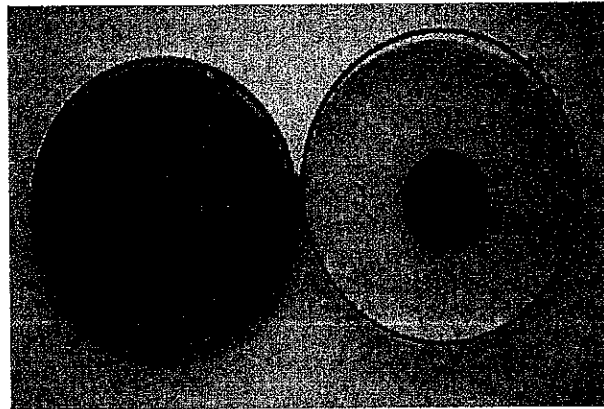
## C. Cara Kerja

### 1. Pengadaan Ekstrak Bahan Uji.

Bahan dasar ekstrak adalah daun nimba (*A. indica*) yang diperoleh dari daerah Ponorogo, Jawa Timur.

Daun nimba dipisahkan dan dibersihkan dari ranting dan kotoran ikutan lainnya, kemudian dikeringanginkan selama kurang lebih satu minggu pada suhu kamar, agar senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung di dalam daun tidak rusak oleh sinar matahari (Dahelmi, 1991).

Setelah kering, daun digiling dengan menggunakan blender sehingga menjadi serbuk. Serbuk diayak dengan menggunakan ayakan untuk mendapatkan serbuk yang halus untuk memudahkan penetrasi pelarut. Kemudian serbuk halus dimaserasi dengan menggunakan pelarut polar etanol 95% selama 3 - 4 hari pada suhu kamar untuk menarik senyawa-senyawa yang terkandung di dalam serbuk.



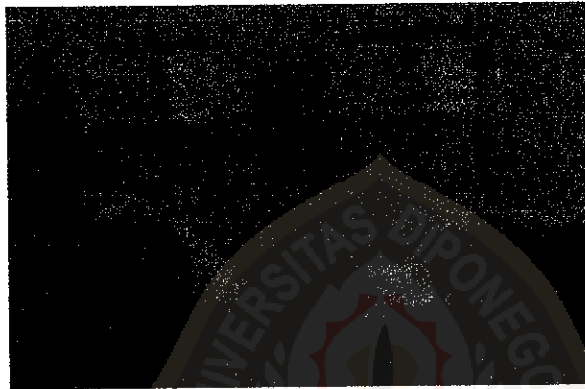
Gambar 05. Serbuk daun dan Ekstrak daun *A. indica*

Setelah 3 - 4 hari langkah seterusnya adalah dilakukan penyaringan untuk mendapatkan maserat yang ditampung dalam erlenmeyer. Ampasnya dimaserasi ulang sampai beberapa kali dengan pelarut yang sama sampai maserat yang diperoleh tidak berwarna atau relatif bening. Selanjutnya larutan dipekatkan dengan menggunakan alat “vacum rotary evaporator” untuk memisahkan senyawa dengan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak yang kental berupa pasta yang digunakan untuk penelitian (Dahelmi, 1991). Suhu yang digunakan dalam “vacum rotary evaporator” adalah antara 30°C hingga 40°C. Sebagai tindakan pencegahan baku untuk mencegah kerusakan senyawa, maka ekstrak pekat harus disimpan dalam lemari es (Harborne, 1987).

## 2. Pengadaan dan Pemeliharaan Hewan Uji.

Hewan uji dalam penelitian ini berupa larva *H. armigera* yang diperoleh dari kebun jagung rakyat di daerah Bandungan, Semarang. Larva *H. armigera* biasanya dapat ditemukan pada ujung tongkol jagung yang terlihat rusak. Larva ini dijadikan sebagai induk hewan uji yang selanjutnya dipelihara secara

individual dalam vial-vial plastik di laboratorium. Larva diberi pakan berupa potongan jagung muda (“putren”). Tempat hewan uji harus dijaga kebersihannya agar dapat berbiak dengan baik dan percobaan dapat berhasil dengan baik pula (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Untuk itu setiap hari makanan diganti dan wadah dibersihkan. Hal ini diperlukan untuk mencegah kematian larva, karena sisa makanan yang busuk dan kotoran larva serta kandungan air makanan dapat menyebabkan kematian larva.



Gambar 06. Larva *H. armigera*  
Keterangan : a. pada pakan alami (“putren”)  
b. pada pakan buatan

Larva yang menjadi pupa dipindah ke tempat yang kering dan bersih. Selanjutnya pupa tersebut dilihat jenis kelaminnya dengan menggunakan bantuan mikroskop binokuler. Pupa jantan dan betina dapat dibedakan dengan melihat ujung abdomen bagian ventral (Natsir (1991 dalam Hadi, 1996). Kemudian dimasukkan ke dalam kandang perkawinan dengan perbandingan 5 jantan dan 5 betina. Pada kandang bagian atas dan samping diberi kain putih sebagai tempat untuk meletakkan telur apabila pupa telah menjadi dewasa dan tiba saatnya bertelur. Pemeliharaan ngengat dilaksanakan dengan memberikan makanan

berupa larutan madu 10% dan larutan gula 10% secara terpisah yang diletakkan di dalam kandang. Ngengat dipelihara pada suhu kamar dengan kelembaban relatif (Rh) 70% - 80% dan fotoperiode 12 jam terang dan 12 jam gelap dan pada suhu ruangan. Pada periode gelap, diluar kandang dilengkapi dengan lampu untuk merangsang terjadinya perkawinan (Istiadi, 1998). Kemudian kain putih yang telah dipenuhi dengan telur disimpan dalam nampan plastik dan dibiarkan hingga menetas. Larva yang baru menetas dimasukkan ke dalam vial-vial plastik berisi pakan buatan secara individual. Penggunaan pakan buatan dalam penelitian ini karena lebih praktis, awet mutunya dan dapat lebih terjaga keseragamannya serta tidak mudah busuk. Setelah mencapai umur 14 hari larva umumnya telah mencapai akhir instar IV dan segera memasuki instar V. Pada instar V ini larva siap dipakai sebagai hewan uji dalam penelitian.

Pembiakan serangga secara massal ini memiliki peran penting antara lain untuk mendapatkan serangga yang relatif seragam dalam jumlah banyak dan juga mempertahankan populasi serangga hama selama beberapa waktu tertentu sehingga serangga selalu cukup tersedia jika dibutuhkan untuk keperluan penelitian (Tarwotjo, 1995).

### **3. Pembuatan Pakan Buatan.**

Bahan agar 7 g direbus dengan menggunakan air sebanyak 600 ml hingga mendidih dan diturunkan suhunya menjadi kurang lebih 60°C. Sementara itu sari kedelai 50 g, jagung pipil 50 g, dicampur dengan air 50 ml dikocok dengan menggunakan blender. Kemudian larutan agar yang telah mulai dingin ( $\pm 50^\circ\text{C}$ ) dimasukkan ke dalam campuran tersebut sambil terus dikocok dengan

menggunakan blender hingga tercampur dengan baik, lalu nipagin 1 g, vitamin B 2 g, vitamin C 2 g, gula 10 g, dan yeast 3 g, serta minyak jagung 2 ml juga dimasukkan, dan yang terakhir di tambahkan formalin 4% sebanyak 2 ml sebagai pengawet. Bahan ini kemudian dimasukkan ke dalam cetakan berukuran 8 x 10 cm. Setelah dingin pakan buatan ini dipotong-potong dengan ukuran 1,5 x 1,5 cm dan dimasukkan ke dalam vial-vial plastik sebagai makanan larva. Sisa pakan buatan yang belum dipakai disimpan di dalam kulkas.

#### D. Uji Toksisitas (LC<sub>50</sub>)

Uji toksisitas ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi efektif larutan perlakuan. Dalam usaha menetapkan nilai LC<sub>5</sub> dan LC<sub>90</sub> /120 jam ditentukan 5 tingkatan konsentrasi dari bahan ekstrak uji ditambah satu perlakuan kontrol. Konsentrasi bahan uji yang dipakai untuk ekstrak etanol daun nimba adalah : 0,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 dan 32,0 persen (b/v). Konsentrasi bahan uji dibuat dengan menambahkan ekstrak uji dengan 1% larutan Tween 80 sebagai pencampur bahan (Hadi, 1996). Hewan uji adalah larva *H. armigera* instar V yang baru “molting” dan belum makan, sebanyak 10 ekor untuk masing-masing konsentrasi perlakuan. dan diulang sebanyak 10 kali. Mortalitas hewan uji diamati tiap 6, 12, 24, 48, 72, 96 dan 120 jam.

Penentuan LC<sub>50</sub> yang sebenarnya dari bahan ekstrak yang diuji dilakukan dengan menentukan 5 kisaran konsentrasi berdasarkan dari batasan LC<sub>5</sub> dan LC<sub>90</sub> /120 jam seperti yang dilakukan sebelumnya ditambah dengan 1 perlakuan kontrol. Interval lima tingkatan konsentrasi yang digunakan ini dihitung dengan menggunakan rumus Hubert (1979 dalam Widyastuti, 1999), yaitu :

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

dimana, N : nilai konsentrasi ambang atas

n : nilai ambang bawah

a : nilai konsentrasi terkecil yang digunakan pada uji penentuan LC-50

k : jumlah konsentrasi ekstrak yang akan diujikan

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

$$\frac{a}{n} = \frac{b}{a} = \frac{c}{b} = \frac{d}{c} = \frac{e}{d} \text{ (lampiran 1). Semua tingkatan konsentrasi yang diperoleh}$$

yaitu 0,0; 6,0; 9,0; 14,0; 21,0 dan 32,0 persen (b/v), digunakan juga dalam uji mortalitas. Banyaknya larva tiap perlakuan adalah 10 ekor. Waktu pengamatan dilakukan tiap 6, 12, 24, 48, 72, 96 dan 120 jam tiap aplikasi. Data mortalitas larva uji lalu dianalisa dengan menggunakan analisa probit (Koestoni, 1985) untuk memperoleh nilai LC<sub>50</sub> bahan uji (lampiran 3).

#### **E. Pengaruh Ekstrak Daun Nimba (*A. indica*) terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan larva *H. armigera***

Ke dalam vial-vial plastik berisi campuran bahan pakan buatan dan bahan ekstrak dengan 3 tingkatan konsentrasi dibawah nilai LC<sub>50</sub> yaitu ½, ¼, 1/8 dari nilai LC<sub>50</sub> atau 7,0; 3,5 dan 1,75 persen (b/v) ditambah dengan satu perlakuan kontrol, dimasukkan larva *H. armigera* instar I sebanyak 10 ekor. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali. Pengamatan dilaksanakan tiap hari untuk mengamati perubahan instar, jumlah larva yang mati dan yang hidup pada tiap

instar, dan jumlah larva yang berhasil menjadi pupa. Mortalitas larva adalah jumlah larva yang mati pada tiap perlakuan konsentrasi.

Pertumbuhan larva dapat digambarkan oleh kemampuan larva untuk molting dan tumbuh menjadi instar selanjutnya. Perkembangan adalah suatu proses perubahan yang menyebabkan deferensiasi organ yang meliputi berbagai perubahan pada organ larva dan diganti dengan organ imago, meskipun beberapa organ larva masih ada yang terbawa menjadi organ imago.

Indeks pertumbuhan larva dapat menggambarkan laju pertumbuhan, dapat dihitung berdasarkan distribusi larva yang mati dan yang hidup pada tiap instar dan jumlah larva yang berhasil menjadi pupa. Untuk menentukan indeks pertumbuhan (Growth Index = GI) dan indeks pertumbuhan relatif (Relative Growth Index = RGI) digunakan rumus Zhang *et. al.*, (1993 dalam Yusnarti, 1996), yaitu :

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

dimana, GI : Indeks pertumbuhan

i : Nomor stadium

n (i max) : Jumlah larva yang hidup pada stadium i maksimal

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

i max : Stadium tertinggi yang dicapai larva

N : Jumlah total larva dalam kelompok

$$RGI = \frac{\text{indeks pertumbuhan pada perlakuan}}{\text{indeks pertumbuhan pada kelompok kontrol}} \times 100\%$$



## F. Parameter Yang Diamati

Parameter yang diamati pada uji mortalitas adalah jumlah larva yang mati pada tiap-tiap konsentrasi ekstrak. Untuk uji terhadap pertumbuhan parameter yang diamati adalah jumlah larva yang hidup dan yang mati pada tiap-tiap instar. Dan untuk uji terhadap perkembangan parameter yang diamati adalah jumlah larva yang berhasil menjadi pupa normal dan jumlah larva yang gagal menjadi pupa normal.

## G. Model Analisa

Percobaan dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan ekstrak uji dan satu perlakuan kontrol, masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali. Data mortalitas yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan analisa probit untuk mendapatkan nilai  $LC_{50}$ . Data mortalitas dan jumlah larva yang berhasil menjadi pupa dianalisa dengan menggunakan ANOVA. Jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji DUNCAN pada taraf uji 5% (Gomes and Gomes, 1995). Adapun data distribusi larva yang hidup dan yang mati pada tiap instar diolah dengan menggunakan rumus Zhang *et al.*, (1993 dalam Yusnarti, 1996) untuk memperoleh nilai indeks pertumbuhan (GI) dan indeks pertumbuhan relatif (RGI).