

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimen. Penelitian eksperimental merupakan penelitian yang dilakukan dengan memanipulasi obyek penelitian disertai dengan adanya kontrol sebagai pembanding (Nazir, 2003). Pada penelitian ini dilakukan uji hayati dari ekstrak daun *Ageratum conyzoides* terhadap serangga uji dengan memanipulasi konsentrasi ekstrak dengan adanya kontrol.

#### **B. Desain Penelitian**

Pada penelitian ini desain yang digunakan adalah desain penelitian. Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL adalah suatu desain percobaan dengan menggunakan randomisasi perlakuan dengan menempatkan perlakuan secara acak pada tiap unit perlakuan. Rancangan ini biasa dilakukan pada percobaan dengan kondisi yang relatif homogen (Nazir, 2003). Konsentrasi yang digunakan pada uji penentuan  $LC_{50}$  sebanyak 9 konsentrasi dan pengulangan yang dilakukan sebanyak 3 kali. Jumlah pengulangan yang diterapkan pada tiap konsentrasi didasarkan pada perhitungan menurut Gomez (1995) sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

t = Perlakuan (treatment)

r = Pengulangan (replication)

15 = Faktor nilai derajat kebebasan

Berdasarkan rumus diatas, jika jumlah perlakuan (t) = 8, maka jumlah pengulang dapat diketahui sebagai berikut :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(9-1)(r-1) \geq 15$$

$$8r-8 \geq 15$$

$$8r \geq 23$$

$$r \geq 2,875$$

jadi pengulangan dalam penelitian ini digenapkan menjadi tiga kali pengulangan. Penentuan posisi cawan petri pengamatan dilakukan secara acak tanpa membedakan kontrol dan perlakuan seperti pada tabel berikut ini :

Tabel 3.1 Rancangan Acak Lengkap

C1	F2	A2	E2	G3	C3	H1	F1	I2
E3	D1	C2	B3	A3	I3	H2	D2	E1
A1	B1	H3	I2	F3	D3	B2	G1	G2

Keterangan :

A : Kontrol air

E : Konsentrasi 2900 ppm

B : kontrol CMC

F : Konsentrasi 3100 ppm

C : Konsentrasi 2300 ppm

G : Konsentrasi 3300 ppm

D : Konsentrasi 2500 ppm

H : Konsentrasi 3500 ppm

E : Konsentrasi 2700 ppm

- 1 : Ulangan ke1
- 2 : Ulangan ke 2
- 3 : ulangan ke 3

### **C. Populasi dan Sampel**

Populasi yang dijadikan objek dalam penelitian ini adalah seluruh larva *Spodoptera litura* F. yang dikembangbiakkan di laboratorium Hama dan Penyakit di Balai Penelitian dan Sayuran (BALITSA), Lembang. Sampel yang akan digunakan dalam penelitian adalah larva *Spodoptera litura* F. instar 3.

### **D. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Lokasi penelitian dan waktu Penelitian ini dilakukan di laboratorium Hama dan Penyakit di Balai Penelitian dan Sayuran (BALITSA), Lembang dan di laboratorium Struktur Hewan Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Alokasi waktu yang digunakan mulai dari persiapan sampai dengan penelitian sekitar tiga bulan.

## E. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Beberapa alat yang digunakan dalam penelitian ini, diantaranya

Tabel 3.2 Daftar alat yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Alat	Jumlah
1	Blender	1 buah
2	Waterbath	1 buah
3	Timbangan Analitik	1 buah
4	Rotary Evaporimeter	1 buah
5	Gunting	1 buah
6	Kertas saring	1 buah
7	Alumunium foil	1 roll
8	Kertas label	2 lembar
9	Pinset	2 buah
10	Cawan petri diameter 9cm	30 buah
11	Gelas ukur	1 buah
12	Labu erlemeyer	1 buah
13	Gelas kimia	2 buah
14	Pipet tetes	2 buah
15	Batang pengaduk	2 buah

### 2. Bahan

- a. Bahan yang digunakan sebagai eksplan adalah organ daun dari tanaman *Ageratum conyzoides* L.
- b. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi adalah methanol ( $\text{CH}_3\text{COH}$ ) yang berderajat teknis.
- c. Hewan yang digunakan dalam uji hayati adalah *Spodoptera litura* F. Instar 3 (hasil rearing).
- d. Aquades
- e. Pelarut ekstrak yang digunakan CMC (Carboxy Metil Cellulosa).

## F. Langkah Kerja

### 1. Tahapan persiapan

#### a. Persiapan Ekstraksi *Ageratum conyzoides* L

Metode yang digunakan untuk ekstraksi adalah metode Harborne (1987) yaitu bahan diekstrak dengan rotary evaporimeter, proses ekstraksi yang dilakukan adalah ekstrak kasar, tahapannya adalah sebagai berikut:

- 1) Daun dari *Ageratum conyzoides* L. dikeringkan pada udara terbuka dan tidak boleh langsung terkena sinar matahari (dalam kondisi suhu ruangan).
- 2) Daun yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender kemudian di sieve untuk mendapatkan serbuk yang halus.
- 3) Selanjutnya dilakukan maserasi. Tahap ini merupakan tahap yang cukup menentukan keberhasilan karena dalam tahap ini harus mengetahui pelarut yang cocok untuk senyawa tertentu. Daun yang sudah dihaluskan kemudian direndam dengan pelarut methanol selama 2 hari pada suhu kamar. Sebagai asumsi pelarut metanol dapat menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun *Ageratum conyzoides*, khususnya senyawa yang polar (larut dalam air). Maserasi minimum 3 x 24 jam diulang beberapa kali sampai diperoleh maserat bening. Hasil proses maserasi kemudian disaring dengan kertas saring.

- 4) Daun hasil maserasi kemudian pelarutnya diuapkan dengan menggunakan rotary evaporimeter pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak berbentuk pasta.
- 5) Ekstrak yang dihasilkan diambil untuk dibuat konsentrasinya, masing-masing konsentrasi ekstrak siap digunakan untuk pengujian.



**Gambar 3.1** Daun *Ageratum conyzoides* L. yang sudah dikeringkan  
**Sumber** : Dokumentasi pribadi



**Gambar 3.2** Ekstrak Daun *Ageratum conyzoides* L.  
**Sumber** : Dokumentasi pribadi

**b. Penyediaan larva *Spodoptera litura* sebagai hewan uji**

- 1) Larva dan imago *Spodoptera litura* F. dikumpulkan dan dibawa ke laboratorium hama dan penyakit di Balai Penelitian dan Sayuran (BALITSA) selanjutnya dipelihara di sangkar pemeliharaan.
- 2) Telur hasil pemeliharaan (*rearing*) dipisahkan sehingga diperoleh larva uji yang homogen.
- 3) Larva yang sehat akan langsung melingkar dengan posisi bagian kepala berada di tengah ( Gambar 3.3).
- 4) Larva yang digunakan dalam penelitian sejumlah 10 larva instar 3 pada tiap perlakuan.



**Gambar 3.3** *Spodoptera litura* F  
**Sumber** : Dokumentasi pribadi

## 2. Uji Toksisitas LC<sub>50</sub>

Uji toksisitas meliputi 2 tahap penelitian yaitu uji pendahuluan (*Range Finding Test*) dan uji penelitian (*Definitive Test*).

### a. Pra Penelitian

Penentuan konsentrasi perlakuan (*Range Finding Test*)

Konsentrasi ekstrak kasar suatu tanaman untuk uji pendahuluan tidak melebihi 0,5%, Hal ini disebabkan ketidaklayakan pestisida nabati baik secara ekonomi atau lingkungan dengan konsentrasi diatas 0,5 (priyono, 1999). Penentuan konsentrasi perlakuan dilakukan dengan menguji beberapa konsentrasi ekstrak *Ageratum conyzoides* yaitu dimulai dari konsentrasi terendah sampai konsentrasi tertinggi, konsentrasi larutan yang digunakan pada pra penelitian yaitu: 2000 ppm, 2500 ppm, 3000 ppm, 3500 ppm, 4000 ppm, 4500 ppm, 5000 ppm dan kontrol (air dan CMC). Konsentrasi tersebut diperlakukan pada larva instar 3 *Spodoptera litura* sebanyak 10 ekor untuk masing-masing konsentrasi kemudian diamati kematiannya dalam waktu 3 x 24 jam.

### b. Penelitian (*Definitive test*)

Konsentrasi *Ageratum conyzoides* yang didapatkan dari hasil *range fiding test* kemudian selanjutnya diuji dalam *Definitive test* dengan kisaran teloransi yang lebih halus, idealnya besarnya nilai konsentrasi yang digunakan dalam *Definitive test* adalah 50% dari jumlah nilai *Range Fiding Test* ( Cristina, 2006).



Berdasarkan analisa probit didapatkan rentang konsentrasi yang dapat membunuh larva sebanyak 50%, dengan nilai batas bawah konsentrasi dan batas atas, maka didapatkan tujuh konsentrasi yang akan ditetapkan dalam penelitian yaitu 2300 ppm, 2500 ppm, 2700 ppm, 2900 ppm, 3100 ppm, 3300 ppm, 3500 ppm serta kontrol. Analisa probit disajikan pada Lampiran I.

Setelah didapatkan konsentrasi ekstrak *Ageratum* yang akan diujicobakan maka tahapan pelaksanaan uji hayati dapat dilaksanakan dengan, tahapan sebagai berikut:

- 1) Menyiapkan konsentrasi ekstrak *Ageratum conyzoides L.*
- 2) Ekstrak berbentuk pasta kemudian dilarutkan dengan CMC agar ekstrak dapat larut dalam air.
- 3) Melarutkan ekstrak dengan air sesuai dengan konsentrasi yaitu 2300 ppm, 2500 ppm, 2700 ppm, 2900 ppm, 3100 ppm, 3300 ppm, 3500 ppm serta kontrol (air dan CMC).
- 4) Daun kubis yang digunakan sebagai makanan larva di potong sehingga memiliki diameter 4,5 cm kemudian Potongan daun kubis direndam selama 5 menit dalam ekstrak *Ageratum conyzoides L* dengan konsentrasi yang berbeda beda.
- 5) Pada cawan petri dimasukkan 10 ekor larva instar 3 yang telah dilaparkan selama 2 jam dan pada cawan petri tersebut kemudian dimasukkan daun kubis bunga yang mempunyai diameter 4,5 cm yang telah diberi perlakuan.

- 6) Pengamatan mortalitas dilakukan pada 12, 24, 48, dan 72 jam setelah perlakuan dengan tiga kali pengulangan.

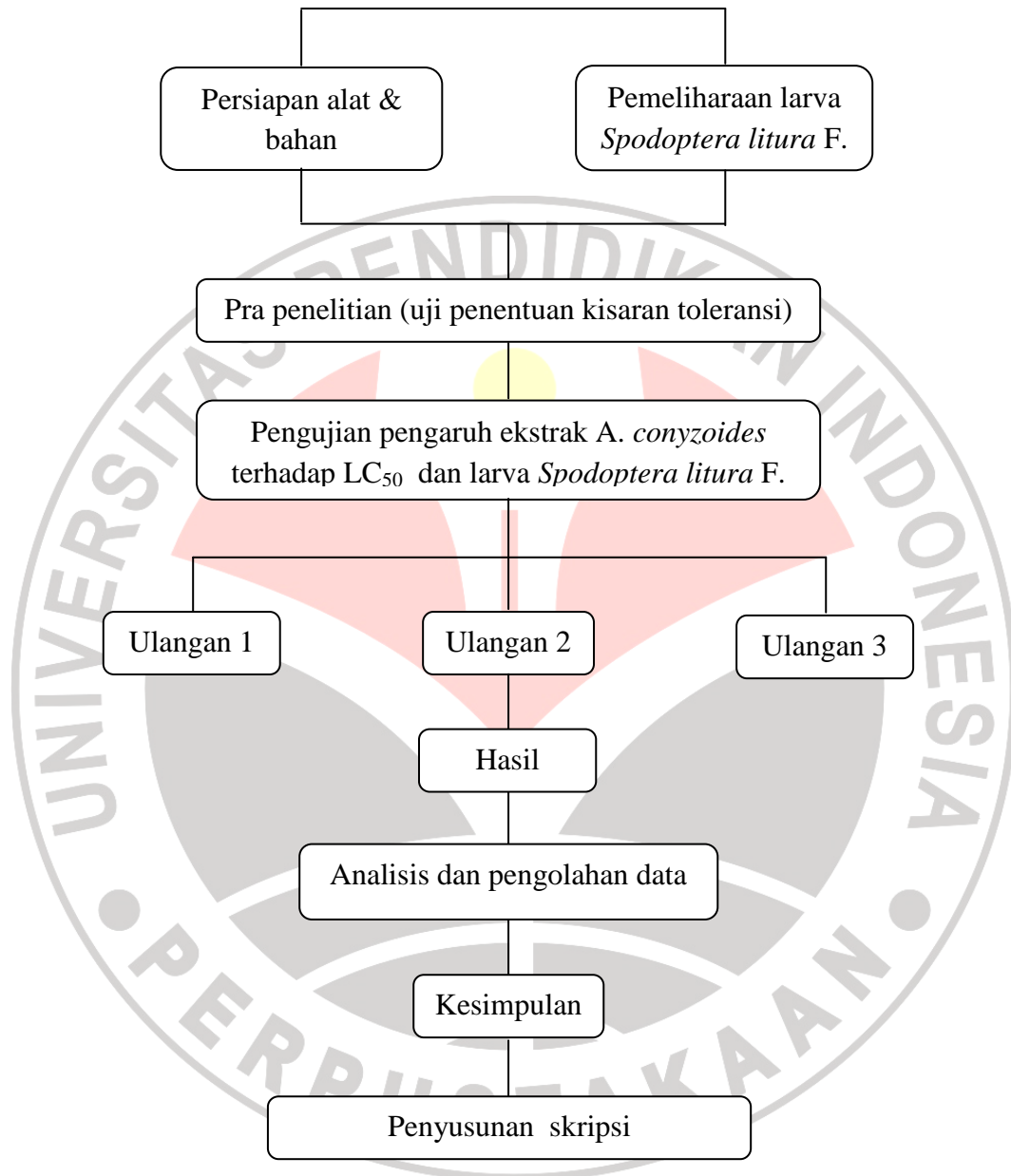
**c. Mortalitas (kematian) Larva *Spodoptera Litura***

Setiap cawan petri yang diberi perlakuan, diamati kematian larva *Spodoptera litura* dalam 3 x 24 jam. Larva yang tidak melakukan pergerakan dan aktivitas lagi diamati dan dilihat kematiannya kemudian dihitung jumlah kematiannya dan lakukan analisis data.

**3. Analisis data**

Hasil percobaan ditentukan dari banyaknya larva yang mati pada perlakuan dalam waktu 72 jam. Larva yang mati ditentukan dari banyaknya larva yang tidak menunjukkan adanya aktivitas gerakan. Dari data larva yang mati untuk tiap konsentrasi dapat ditentukan nilai  $LC_{50}$  dengan analisa probit pada software SPSS 16, Analisa probit merupakan suatu metode pengujian yang umum untuk menilai toksisitas dari insektisida (Koestoni dalam Rosaningsih, 2006).

#### 4. Alur Penelitian



Gambar 3.4 Alur Penelitian