

### **III. BAHAN DAN METODE**

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

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Komponen Bioaktif, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian untuk kegiatan fraksinasi daun mint (*Mentha arvensis* Linn.). Selanjutnya uji hayati pada larva penggerek batang jagung (*Ostrinia furnacalis* Guen.) dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Penelitian dilakukan pada bulan November– Mei 2013.

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

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva penggerek batang jagung, daun mint, air (H<sub>2</sub>O), etil asetat (EtOAc), aquades, etanol, dan pakan larva penggerek batang jagung. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kawat kasa setenlis, stoples plastik, gelas ukur, cawan petri, penggaris, labu ekstrak, corong pemisah, rotary evaporator, baskom plastik, timbangan elektrik, kurungan serangga, blender kering, kertas saring, kuas kecil, rak tabung reaksi, mikro pipet 10 dan 1000 µL, dan tips.

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada semua uji hayati (*bioassay*). *Bioassay* I dilakukan dengan tiga perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan *Bioassay* I terdiri atas kontrol, EtOAc, dan H<sub>2</sub>O. Konsentrasi yang digunakan adalah 20.000 ppm. *Bioassay* II dilakukan dengan lima perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan *bioassay* II adalah kontrol, 100% H<sub>2</sub>O, 20% MeOH/H<sub>2</sub>O, 50% MeOH/H<sub>2</sub>O, dan 100% MeOH. Konsentrasi yang digunakan adalah 40.000 ppm. *Bioassay* III dilakukan dengan delapan perlakuan dan tiga ulangan. Konsentrasi fraksi 100% H<sub>2</sub>O ekstark daun mint yang digunakan adalah 0 ppm, 625 ppm, 1.250 ppm, 2.500 ppm, 5.000 ppm, 10.000 ppm, 20.000 ppm, dan 40.000 ppm.

Ekstrak daun mint sesuai dengan konsentrasi dicampur sampai merata ke dalam pakan uji kemudian dimasukkan ke dalam stoples yang berisi 25 larva penggerek batang jagung. Data yang diperoleh diolah dengan sidik ragam dan dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf nyata 5%.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Pembiakan Serangga Uji

Penyiapan serangga uji dilakukan dengan melakukan pencarian larva penggerek batang jagung dari lapang di kebun petani Desa Trimukti, Kecamatan Candipuro, Lampung Selatan. Larva yang telah terkumpul diberi pakan buatan dan dipelihara dalam stoples plastik dengan diameter 26 cm, tinggi 5 cm, dan jari-jari 13 cm yang ditutup dengan kawat kasa stenlis hingga mencapai fase pupa dan imago.

Imago kemudian dipindahkan ke dalam stoples yang lebih besar dan ditutup dengan kawat kasa stenlis. Kurungan yang terbuat dari kain kasa dan kayu dengan ukuran 70 x 50 x 60 cm berfungsi untuk memindahkan imago ke stoples yang lebih besar. Di dalam stoples diletakkan kapas yang telah diolesi madu 50% sebagai pakan imago. Telur yang dihasilkan oleh serangga uji dipelihara sampai menetas dan menjadi larva instar III untuk digunakan dalam pengujian.

Pembiakan serangga uji dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pembiakan serangga uji larva penggerek batang jagung, (a) lokasi pencarian larva penggerek batang jagung, (b) pemeliharaan penggerek batang jagung, (c) pupa penggerek batang jagung, (d) imago penggerek batang jagung, (e) kurungan untuk memindahkan imago, (f) toples besar sebagai tempat kawin imago, (g) telur penggerek batang jagung tampak seperti sisik ikan, (h) larva penggerek batang jagung instar 1

### 3.4.2 Ekstraksi

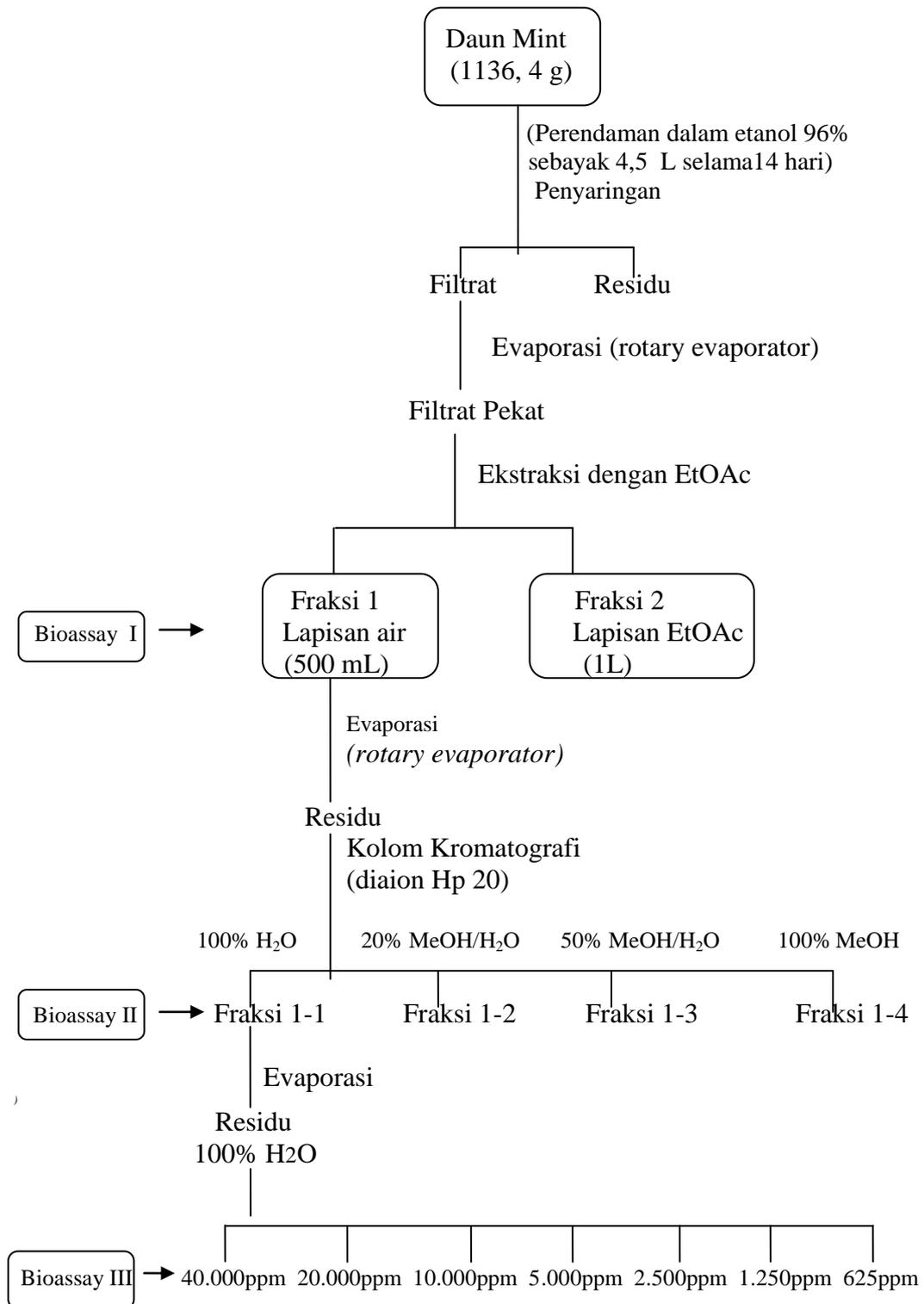
Penelitian dilakukan dengan cara menggunakan sebanyak 2 kg daun mint yang dijemur dengan panas matahari selama 3 hari, kemudian dihaluskan dengan blender kering. Selanjutnya ditimbang dan diperoleh tepung daun mint kering sebanyak 1136,4 g.

Tepung ini kemudian direndam dalam 4,5 L larutan etanol 96% selama 14 hari. Setiap hari selama 10 menit dilakukan pengadukan. Setelah empat belas hari perendaman dengan etanol dilakukan penyaringan, diperoleh filtrat dan residu.

Filtrat kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator*, dan didapat filtrat pekat.

Filtrat pekat ini kemudian diekstrak dengan EtOAc (etil asetat) hingga diperoleh fraksi lapisan H<sub>2</sub>O (air) dan fraksi lapisan EtOAc. Kedua fraksi tersebut selanjutnya digunakan untuk pengujian aktivitas insektisida (*bioassay I*). Fraksi air terbukti mempunyai aktivitas insektisida terhadap larva penggerek batang jagung, selanjutnya fraksi air diuapkan hingga kering dan dimasukkan ke dalam diaion Hp 20 kolom khromatografi dan dielusi dengan 100% H<sub>2</sub>O (1 L), 20% MeOH/H<sub>2</sub>O (1 L), 50% MeOH/H<sub>2</sub>O (1 L), dan 100% MeOH (1 L) secara berurutan. Demikian pula jika fraksi EtOAc terbukti mempunyai aktivitas insektisida terhadap larva penggerek batang jagung, selanjutnya fraksi EtOAc diuapkan hingga kering dan dimasukkan ke dalam silika kolom khromatografi dan dielusi dengan CHCl<sub>3</sub> (500 mL), 3% MeOH/CHCl<sub>3</sub> (500 mL), 20% MeOH/CHCl<sub>3</sub> (500 mL), dan MeOH (500 mL) secara berurutan. Fraksi yang diperoleh dilakukan untuk *bioassay II* terhadap larva penggerek batang jagung pada konsentrasi 40.000 ppm pada masing-masing fraksi. Pengamatan dilakukan untuk

mengetahui jumlah serangga yang mati pada 24, 48,72, sampai 408 (jsa). Fraksi yang aktif dilakukan untuk pengujian lebih lanjut yaitu *bioassay* III untuk mengetahui mortalitas larva penggerek batang jagung. Ekstrasi daun mint dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Tahapan pelaksanaan penelitian

### 3.4.3 Uji Toksisitas

Uji toksisitas ekstrak daun mint (*M. arvensis*) dilakukan melalui tiga tahap uji hayati (*bioassay*). *Bioassay* I merupakan pengujian aktifitas insektisida antara fraksi lapisan air (H<sub>2</sub>O) dan fraksi lapisan etil asetat (EtOAc). Kedua fraksi tersebut digunakan untuk pengujian aktivitas insektisida terhadap larva penggerek batang jagung (*O. furnacalis*), dengan cara memaparkan larva penggerek batang jagung instar III sebanyak 25 ekor dengan 3 ulangan. Konsentrasi fraksi yang digunakan adalah 20.000 ppm. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui mortalitas larva penggerek batang jagung pada 24, 48, 72, sampai 408 jam setelah aplikasi (jsa). Salah satu fraksi pada *bioassay* I yang aktif terhadap mortalitas larva penggerek batang jagung kemudian dielusi dengan air (H<sub>2</sub>O) dan methanol (MeOH) untuk mengetahui pengaruh polaritas pelarut terhadap mortalitas penggerek batang jagung sebagai *bioassay* II. Untuk *bioassay* III, fraksi yang digunakan yaitu fraksi yang paling aktif terhadap penggerek batang jagung dari *bioassay* II.

Pada *bioassay* III, konsentrasi ekstrak daun mint yang digunakan adalah 625, 1.250, 2.500, 5.000, 10.000, 20.000, dan 40.000 ppm dengan 3 ulangan. Setiap satuan percobaan ekstrak daun mint terdiri atas stoples plastik dengan tutup kawat kasa stenlis yang berisi 25 ekor larva uji. Pakan larva dicetak terlebih dahulu dengan cawan petri dengan tinggi 2 cm, jari-jari 4,5 cm dan diameter 9 cm. Daya tampung cawan petri terhadap pakan larva penggerek batang jagung sebanyak 120 mL. Pakan larva diberikan sesuai dengan konsentrasi (ppm) yang digunakan. Perlakuan kontrol digunakan 25 ekor larva uji dan diberi pakan sebanyak 120 mL

tanpa ekstrak daun mint, selanjutnya dimasukkan ke dalam stoples plastik dan ditutup kawat kasa stenlis. Setiap perlakuan diaplikasikan dengan cara mencampurkan ekstrak daun min kedalam pakan larva penggerek batang jagung sesuai dengan konsentrasi perlakuan masing-masing. Setelah pengamatan 24 jam setelah aplikasi (jsa) pakan diganti dengan pakan yang tidak diberi ekstrak daun mint, dengan cara dipotong persegi dengan ukuran 2x2 cm. Pakan diganti 24 jam sekali sampai selesai pengamatan. Pengamatan mortalitas dilakukan setiap 24, 48,72, sampai 408 jam setelah aplikasi.

#### 3.4.4 Pengamatan

Pengamatan dilakukan untuk mengetahui persentase mortalitas larva penggerek batang jagung yang dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{A}{B} \times 100\%$$

Keterangan : A = Jumlah serangga yang mati

B = Jumlah serangga uji

Menurut Hasibuan (2003) sebelum melakukan perhitungan faktor kematian (faktor kematian pada kontrol yang disebabkan oleh faktor lain) harus terlebih dahulu dikoreksi dengan rumus Abbot (1925), dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Kematian Terkoreksi} = \frac{A - B}{100 - B} \times 100\%$$

Keterangan : A = Persentase serangga uji yang mati pada perlakuan

B = Persentase serangga uji yang mati pada kontrol

### **3.4.5 Daya Racun (LC<sub>50</sub>)**

Untuk mengetahui daya racun (LC<sub>50</sub>) setelah aplikasi ekstrak daun mint digunakan analisis probit, dengan cara mengentri data serangga uji yang mati pada perlakuan ke dalam program micro probit 3.0 (T. Sparks and A. Sparks, 1986).