

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium biokimia FMIPA Universitas Riau selama 4 (empat) bulan.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat-alat yang digunakan

Adapun alat-alat yang akan digunakan adalah kotak bening berukuran $\pm 20 \times 13 \times 15$ cm, oven, neraca timbang, *C. binotalis*, buret, serta peralatan lainnya seperti yang tersebut dalam prosedur kerja.

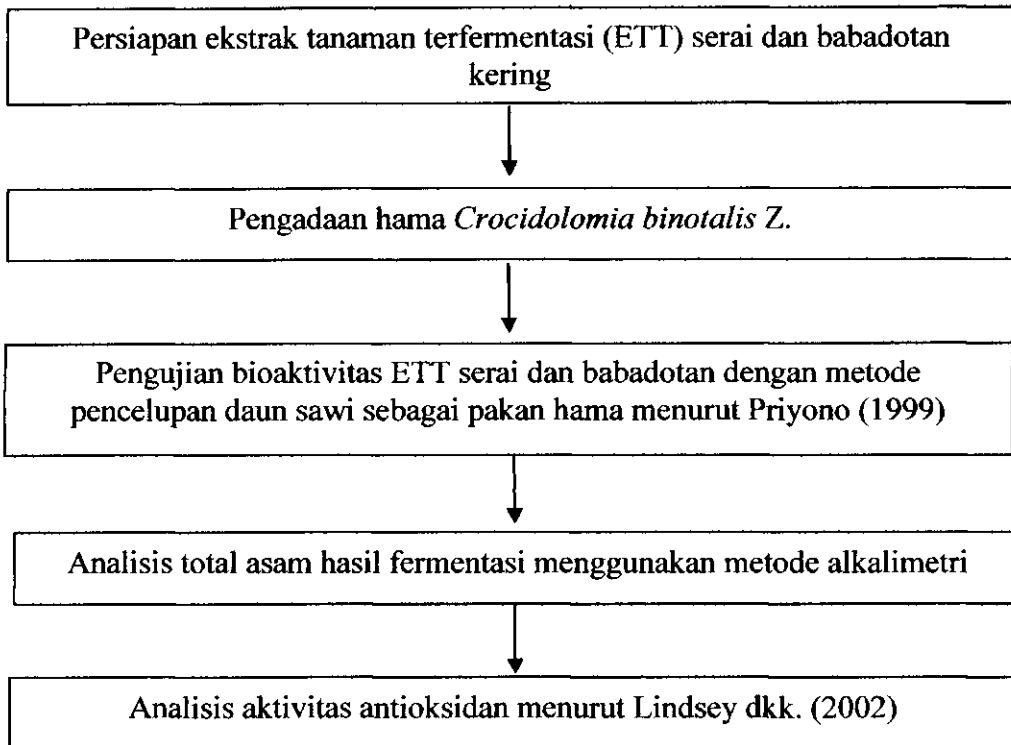
3.2.2. Bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah EM-4 produksi PT. Songgolangit, larutan gula merah, tanaman serai (*Cymbopogon citratus* D.C.), tanaman babadotan (*Ageratum conyzoides* L.), daun sawi segar yang diperoleh dari pasar lokal dan hama ulat sawi spesies *Crociodolomia binotalis* Z. yang diperoleh dari tanaman sawi, larutan NaOH 0,1 N, indikator PP 1%, larutan $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan bahan-bahan lainnya seperti yang tersebut dalam prosedur kerja.

3.3. Metoda Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan pengujian bioaktivitas ETT tanaman serai dan babadotan kering dengan menggunakan metode pilihan dan pencelupan daun menurut Prijono (1999). Penentuan total asam hasil fermentasi dilakukan dengan metode titrasi alkalimetri, sedangkan penentuan total aktivitas antioksidan menurut Lindsey dkk. (2002).

Adapun secara keseluruhan rancangan metode penelitian dapat dirangkum sebagaimana yang terlihat pada skema dibawah ini



3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Persiapan ekstrak tanaman terfermentasi (ETT) serai (*Cymbopogon citratus* D.C.) dan babadotan (*Ageratum conyzoides* L.).

ETT dibuat dengan menggunakan bahan dari tanaman kering dalam bentuk serbuk. Oleh sebab itu tanaman serai dan babadotan harus dikeringkan terlebih dahulu. Tanaman serai yang digunakan adalah mulai dari bagian pangkal tanaman sampai ujung daun, sedangkan bagian tanaman babadotan yang digunakan adalah bagian daunnya. Pembuatan serbuk kering tanaman serai maupun babadotan dilakukan dengan cara, sebanyak 250 gram masing-masing tanaman dirajang halus dan dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C. Selanjutnya daun kering tersebut dihaluskan hingga menjadi serbuk halus.

Cara pembuatan ETT adalah sebagai berikut, masing-masing serbuk kering tanaman serai dan babadotan dimasukkan ke dalam botol plastik berukuran 1,5 liter. Air ditambahkan sebanyak 1 liter pada masing-masing botol. Larutan gula merah dan EM-4 dimasukkan sebanyak 5% dari jumlah air (50 ml), diaduk rata dan ditutup rapat (suasana anaerob). Gas yang terbentuk selama fermentasi



dikeluarkan secara berkala (2 hari sekali atau sesuai keadaan gas) selama 7-15 hari (gas tidak terbentuk lagi). ETT sudah dapat digunakan dengan pengenceran sesuai dengan konsentrasi yang akan digunakan yaitu konsentrasi 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 25 %, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan ETT murni untuk ETT babadotan, sedangkan untuk ETT serai hanya tahap konsentrasi 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%.

3.4.2. Pengadaan hama *Crocidolomia binotalis* Z. dari sawi

Jenis hama yang digunakan adalah ulat krop (*Crocidolomia binotalis* Zeller). Penyediaan hama dilakukan dengan cara, larva dalam bentuk instar 1 dikumpulkan dari sawi dan ditunggu beberapa hari hingga menjadi instar ketiga. Hama yang digunakan harus seragam agar memiliki kemampuan makan yang relatif sama.

3.4.3. Uji bioaktivitas

Uji bioaktivitas dilakukan di laboratorium dengan menggunakan metoda pilihan dan metoda pencelupan daun menurut Prijono (1999). Metoda pilihan digunakan untuk menguji kemampuan *antifeedant* ETT terhadap hama, sedangkan metoda pencelupan daun diambil sebagai metoda perlakuan ETT terhadap pakan hama. Pada metoda pilihan, daun berpelakuan dan daun kontrol yang sama banyaknya ditempatkan dalam wadah yang sama, beberapa ekor serangga uji dibiarkan memilih makanan dalam wadah tersebut. Banyaknya daun perlakuan (dalam satuan jumlah daun) dibandingkan dengan kontrol setelah selang waktu 24 jam.

Cara kerjanya adalah daun sawi yang dibeli dari pasar tradisional dibersihkan dengan air mengalir agar terbebas dari sisa-sisa pestisida. Perlakuan seperti ini dilakukan sebanyak 3 kali, untuk lebih meyakinkan daun telah terbebas dari sisa pestisida. Selanjutnya daun tersebut dibuat cakram (bundaran) dengan diameter 5 cm dengan menggunakan cetakan.

Bundaran dicelupkan satu per satu ke dalam ETT yang telah diencerkan dengan konsentrasi tertentu selama variasi waktu yang ditentukan yakni 30 detik, 60 detik dan 60 menit, selanjutnya dikeringkan di udara bebas. Daun kontrol hanya direndam dalam air saja.



Enam (6) cakram daun diletakkan dalam kotak bening, masing-masing 3 daun kontrol dan 3 daun perlakuan kemudian dimasukkan 5 ekor hama *Crociodolomia binotalis*. Hama uji dibiarkan memilih makanan dalam wadah tersebut. Setelah 24 jam, jumlah kerusakan daun akibat dimakan hama, dihitung dengan melihat luas lembaran yang tersisa. Untuk setiap taraf konsentrasi atau kontrol digunakan tiga ulangan (3X5 larva)

Kerusakan pada daun yang mendapat perlakuan dibandingkan dengan kerusakan pada daun kontrol. Masing-masing perlakuan juga dibandingkan antara konsentrasi satu dengan yang lainnya untuk melihat konsentrasi yang paling tidak disukai oleh hama ulat *Crociodolomia binotalis* Z. Setiap konsentrasi dipetakan terhadap kerusakan daun yang dimakan oleh hama ulat ini.

Perbandingan daun kontrol yang dimakan dan daun perlakuan yang dimakan dilakukan penghitungan Indeks Hambatan Makan (IHM) menurut Syahputra (2001), berdasarkan rumus berikut:

$$\text{Indeks Hambatan Makan (IHM)} = (\text{JK} - \text{JP}) / (\text{JK} + \text{JP})$$

Keterangan JK : Jumlah daun kontrol yang dimakan

JP : Jumlah daun perlakuan yang dimakan

3.4.4. Analisis total asam

Sebanyak 2ml bahan ekstrak tanaman terfermentasi, dititrasi menggunakan larutan standard NaOH 0,1 N dan ditambah 2-3 tetes indikator PP 1%, persentase total asam dihitung dengan rumus berikut menurut Fox, J.D. (1981).

$$\text{Total Asam (TA) \%} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times 0,09}{\text{ml bahan}} \times 100\%$$

3.4.5. Analisis aktivitas antioksidan

Metode yang digunakan adalah metode Lindsey dkk (2002). Sampel sebanyak 5 gram digerus, lalu dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Ekstrak sayuran disentrifuse selama 10 menit. Asam linoleat (50 µl) dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml etanol absolut. Supernatan (50 µl) ditambahkan ke dalam larutan, lalu divortex.



Larutan didiamkan di tempat gelap pada suhu 25⁰C selama 24 jam. FeCl₂ 0,014 M sebanyak 20 µl dan KSCN 30% sebanyak 20 µl ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Pengulangan dilakukan 3X. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 500 nm. Absorbansi blanko diukur pada waktu 0 dan setelah 24 jam. Blanko ekstrak tanaman adalah ekstrak tanaman itu sendiri ditambahkan FeCl₂ dan KSCN. Blanko adalah campuran dari etanol absolut, asam linoleat, FeCl₂ dan KSCN.

$$\% \text{ hambatan} = \left[1 - \frac{(AbsSampel_{T_{24}} - AbsEkstrak_{T_{24}}) - AbsSampel_{T_0}}{AbsBlanko_{T_{24}} - AbsBlanko_{T_0}} \right] \times 100\%$$

3.5. Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan grafik hubungan antara konsentrasi perlakuan terhadap kerusakan daun. Perbandingan berat daun yang dimakan antara kontrol dan perlakuan dihitung sebagai Indeks Hambatan Makan (IHM) menurut Syahputra (2001). IHM dan total aktivitas antioksidan dianalisis secara statistik menggunakan analisis ANOVA, dan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) jika memberikan perbedaan yang signifikan pada taraf 5%.

