

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Kegiatan penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 2 April sampai 25 Mei 2012 di Laboratorium Entomologi, Pusat Pengembangan dan Penelitian Biologi Bidang Zoologi LIPI, Cibinong.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan antara lain mikroskop, *fial tube*, *pinset*, gunting, *unit tray*, pensil, pipet, tabung reaksi, kompor listrik, kuas, *watch glass*, *petridish*, kaca *preparat*, *cover glass*, gunting mikro, kotak *preparat*, *kimwipes* (tissue), buku acuan klasifikasi: *The Moths of Borneo, Part 5: Lymantridae*, oven, serta kamera mikroskopis.

Bahan yang digunakan yaitu spesies *Arctornis*, KOH 10%, air, kertas label, buku pendataan, alkohol 30%, 70% dan 96%, *chlorazol black*, dan *eupharal*.

3.3. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode identifikasi genitalia. Metode identifikasi genitalia yaitu metode yang digunakan untuk mengetahui karakteristik alat reproduksi pada serangga. Metode penelitian ini digunakan untuk serangga ngengat khususnya ngengat genus *Arctornis*.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dalam penelitian ini merupakan koleksi ngengat khususnya genus *Arctornis* yang ada di Museum Zoologi, LIPI. Sampel diambil di berbagai wilayah di Indonesia, yang dilakukan dengan menggunakan perangkat cahaya (*light trap*) maupun jaring (*sweeping*).

3.4.2. Pengambilan dan Pelunakkan Abdomen

Sebelum membuat *preparat* permanen, terlebih dahulu dilakukan pengambilan *abdomen* dari *thoraks*. Pertama-tama yaitu memilih dan mengambil spesimen (spesies *Arctornis*) dari *unit tray*, yang kemudian dilakukan pemberian nomor label pada spesimen dan mendata setiap spesimen pada buku pendataan sesuai nomor label dan label distribusi. Selanjutnya memotong *abdomen* dari *thoraks* menggunakan *pinset* tipis secara mikroskopis, tanpa merusak struktur

abdomen maupun bagian lain dari spesimen dan meletakkan potongan *abdomen* tersebut pada *fial tube* dengan menyertakan nomor label.

Tahapan selanjutnya yaitu memasukkan *abdomen* ke dalam tabung reaksi yang telah diberi nomor label dengan menambahkan KOH 10% secukupnya menggunakan pipet ukur ke dalam tabung reaksi yang berisi *abdomen* tersebut. Tabung reaksi yang berisi *abdomen* dengan KOH 10% dilunakkan dengan cara direndam dengan air dan dipanaskan selama kurang lebih 5 menit ke dalam kompor listrik.

3.4.3. Pembuatan *Preparat Genitalia Jantan*

Proses pembuatan *preparat genitalia* jantan meliputi beberapa tahap diantaranya yaitu *clearing*, *staining*, *rinsing*, *dissecting*, *dehydrating*, dan *embedding*.

1) *Clearing*

Proses *clearing* merupakan proses menjernihkan jaringan menjadi transparan dan mengeluarkan serta menggantikan alkohol serta menyebabkan morfologinya keras sehingga memudahkan untuk melakukan pengamatan morfologi di bawah mikroskop. Tahapan pertama dari proses ini adalah mengambil *abdomen* yang sudah dilunakkan dalam tabung reaksi. Selanjutnya adalah memasukkan *abdomen* dalam *watch glass* yang berisi alkohol 30 %, setelah itu dilakukan pembersihan *abdomen* menggunakan kuas halus secara, proses ini dilakukan secara mikroskopis berkali-kali hingga *abdomen* terlihat bersih.

2) *Staining*

Proses *staining* merupakan proses pewarnaan spesimen sehingga memberi warna gelap pada spesimen agar mudah terlihat di mikroskop. Tahapan dari proses ini yaitu mencampurkan *chlorazol black* dengan alkohol 70% dengan konsentrasi larutan 1% kedalam *watch glass*. Selanjutnya menyelupkan *abdomen* yang telah terlihat bersih tersebut kedalam larutan *chlorazol black* secukupnya hingga terlihat hitam pekat.

3) *Rinsing*

Proses *rinsing* merupakan pembilasan dari pewarnaan spesimen. Tahapan dari proses ini antara lain menyiapkan *watch glass* yang berisi alkohol 30 %,

selanjutnya dilakukan pembersihan atau membilas *abdomen* kedalam *watch glass* yang berisi alkohol 30 % secara perlahan menggunakan kuas dari sisa *chlorazol black* dan mengulangi langkah tersebut hingga *abdomen* benar-benar bersih.

4) *Dissecting (Male)*

Proses *dissecting* merupakan pemotongan *genitalia* dari spesimen khususnya *genitalia* jantan. Tahapannya diantaranya adalah dengan memotong bagian lateral *abdomen* menggunakan gunting mikro di sepanjang *spirakel* dan memotong jaringan membranous diantara *genitalia* dan *abdomen* (antara segmen 8 sampai 10). Kemudian memisahkan *abdomen* dan *genitalia* serta membersihkan organ *genitalia* menggunakan kuas halus. Tahapan terakhir dari proses ini adalah memisahkan bagian *aedeagus* dari organ *genitalia* menggunakan *pinset* tipis secara perlahan, jika tidak dapat dilakukan dan dapat menimbulkan kerusakan organ *genitalia*, *aedeagus* dibiarkan tetap seperti keadaan semula.

5) *Dehydrating*

Proses *dehydrating* merupakan proses pembentukan posisi *genitalia* dengan menggunakan alkohol secara beringkat. Tahapan pertama dari proses ini adalah mengatur posisi *genitalia* di dalam *petridish* yang berisi alkohol 96%. Selanjutnya dalam rendaman alkohol 96%, *genitalia* segera mengeras sehingga secepatnya di atur posisi organ *genitalia*. Setelah itu, menutup dan menekan *genitalia* dengan *cover glass* dan dibiarkan hingga mengeras.

6) *Embedding*

Proses *embedding* merupakan proses terakhir dalam pembuatan *preparat*. Tahapannya antara lain mengambil *preparat* dan *cover glass* yang telah dibersihkan dengan *kimwipes* (tissue) yang selanjutnya mengoleskan beberapa tetes *eupharal* pada bagian tengah *preparat*. Kemudian meletakkan *genitalia* tersebut diatas *preparat* yang sudah diolesi *eupharal*. Setelah itu menutup dengan *cover glass* dan memberi nomor label sementara sesuai nomor label pada spesimen. *Preparat* yang sudah jadi kemudian diletakkan di kotak *preparat*.

3.4.4. Identifikasi dan Pelabelan

Proses akhir yang dilakukan setelah proses pembuatan *preparat* adalah meletakkan *preparat* yang berada di kotak *preparat* kedalam oven kurang lebih 48 jam dengan suhu 40-50 °C, untuk memperoleh hasil yang maksimal dari

tampilan *genitalia*. Setelah proses pengovenan selesai, selanjutnya adalah proses identifikasi spesies jantan dari genus *Arctornis*.

Preparat genitalia jantan selanjutnya diidentifikasi secara langsung dengan mencocokkan tiap-tiap bagian dari *genitalia* yang dibandingkan dengan literatur untuk penentuan spesies yang dilakukan dengan mengamati di bawah mikroskop. Selain itu pengamatan di bawah mikroskop lainnya yang dilakukan adalah menentukan ukuran *genitalia* tiap spesies secara manual dengan menggunakan penggaris. Proses identifikasi juga dapat dilakukan dengan memfoto *preparat genitalia* menggunakan kamera mikroskopis yang selanjutnya dilakukan proses identifikasi dengan mencocokkan sesuai literatur.

Proses akhir setelah semua spesies teridentifikasi adalah pemberian label yang sesuai dengan label distribusi yang ada di setiap spesimen. Selain itu pemberian label juga mencakup tanggal pembuatan *preparat* maupun nomor label yang tertera sesuai pendataan setiap spesies.

