

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium proteksi dan laboratorium agrobioteknologi tanaman milik Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juli 2018.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah padatan hasil fermentasi daun *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis*, larva ulat api (*Setora nitens*), Aseton, Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit (LCPKS), air kelapa, gula merah, dan daun kelapa sawit, pestisida.

Alat yang digunakan adalah gelas plastik, *rotary evaporator*, toples, saringan, timbangan elektrik, blender, oven, pisau, kertas label.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan menggunakan metode eksperimental yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal dengan 5 aras yaitu formula biopestisida hasil fermentasi *Bacillus thuringiensis* dan *Lantana camara* pada medium LCPKS dan air kelapa 3:1 sebanyak 100 ml dengan penambahan :

A. Hasil ekstraksi padatan 5 ml

B. Hasil ekstraksi padatan 10 ml

- C. Hasil ekstraksi padatan 15 ml
- D. Hasil ekstraksi padatan 20 ml
- E. Hasil ekstraksi padatan 25 ml
- F. Kontrol positif dengan pestisida (*Beta silflutrin 25g/L*)
- G. Kontrol negatif dengan air

Terdapat 7 perlakuan yang diulang sebanyak 3 kali sehingga terdapat 21 unit percobaan. Setiap unit terdapat sampel sebanyak 3 ulat. *Layout* terdapat pada Lampiran 1.

D. Cara Penelitian

Tahap 1. Identifikasi Dan Karakterisasi *Bacillus thuringiensis*

a. Identifikasi dan Karakterisasi *Bacillus thuringiensis* Dilakukan pada Awal Penelitian.

Identifikasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran isolat yang diperoleh sesuai dengan karakterisasi bakteri *B. thuringiensis*. Karakterisasi meliputi sifat koloni, bentuk sel, sifat aerobisitas, dan uji toksisitas (Lampiran 6a-d).

b. Perbanyak inokulum *Bacillus thuringiensis*

Perbanyak inokulum berupa *B. thuringiensis* dengan menggunakan media agar miring dan medium cair pada tabung reaksi dan diinkubasi pada temperatur yang tepat selama 48 jam. Kemudian dilakukan pengujian kembali secara mikroskopik dengan pengecatan, jika terdapat bakteri maka berhasil. Koloni murni kemudian diperbanyak dengan menggunakan erlenmeyer dan di shaker selama 48 jam.

Tahap 2. Fermentasi *L. camara* dan *B. Thuringiensis*

a. Pembuatan Serbuk *L. camara*

Pembuatan serbuk *L. camara* yaitu dengan memisahkan daun dengan batang. Daun yang sudah dipisahkan dari batang kemudian dikering anginkan selama 4 hari dilanjutkan dengan mengoven dengan suhu 40°C selama 3 hari (Lampiran 7a). Daun yang sudah kering (simplisia) kemudian dibuat serbuk dengan memblender hingga halus dan disaring (Lampiran 7b).

b. Pembuatan Media Fermentasi

Pembuatan media fermentasi dengan menggunakan Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit (LCPKS) dan air kelapa dengan perbandingan 3:1. Kemudian ditambahkan gula merah 10%. Bahan tersebut dimasukkan dalam botol jam dan dilakukan sterilisasi (Lampiran 7c).

c. Fermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis*

Fermentasi dilakukan dengan mencampurkan simplisia *L. camara* yang sudah di blender dengan *B. thuringiensis* pada media alternatif. Untuk mendapatkan formula cair dan ekstrak padatan dilakukan fermentasi selama 6 hari (Lampiran 7d).

d. Pemisahan padatan dan hasil fermentasi

Hasil fermentasi yang didapatkan berupa padatan dan cairan. Pemisahan cairan hasil fermentasi dilakukan dengan menyaring menggunakan kertas saring. Hasil fermentasi berupa cairan kemudian disimpan, sedangkan padatan dilakukan ekstraksi pada tahap selanjutnya.

Tahap 3 : Ekstraksi Padatan Hasil Fermentasi *L. camaradan B. thuringiensis***a. Meserasi Padatan Hasil Fermentasi *L. camara* Dan *B. thuringiensis***

Meserasi dilakukan dengan mencampurkan hasil fermentasi berupa padatan yang dicampurkan dengan menggunakan larutan aseton dengan perbandingan 1:5 dan dilakukan meserasi selama 24 jam (Lampiran 8a).

b. Pemisahan Padatan Hasil Maserasi *L. camaradan B. thuringiensis*

Pemisahan dilakukan dengan menyaring padatan hasil fermentasi yang telah di meserasi selama 24 jam. Penyaringan dilakukan dengan menggunakan kertas saring dan didapatkan filtrat.

c. Ekstraksi Cairan Hasil Maserasi *L. camaradan B. thuringiensis*

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan alat *rotary vacuum evaporator*. Hasil ekstraksi berupa ekstrak pekat dengan persentase penyusutan sejumlah 20% dari filtrat hasil maserasi (Lampiran 8b). (Hasil Pengujian Pendahuluan)

Tahap 4. Kombinasi Formula Cair Ekstrak *L. Camara* Setelah Difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan Hasil Ekstraksi Bahan Padatan.**a. Kombinasi Antara Formula Cair dengan Hasil Ekstraksi**

Pembuatan kombinasi hasil formula cair dengan hasil ekstraksi yaitu dengan membuat campuran 100 ml cairan hasil fermentasi ditambah hasil ekstraksi padatan sebanyak (5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, dan 25 ml). Kombinasi formula cair hasil fermentasi dan hasil ekstraksi dihomogenkan. Kemudian dilakukan pengujian sifat fisik dan kandungan fitokimia (*alkaloid* dan *tanin*) dengan metode detektor menggunakan alat Spektrofotometri UV-vis yang dilakukan di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada. Selanjutnya digunakan untuk pengujian daya bunuh (Lampiran 10a).

b. Pengujian Daya Bunuh dengan *Bioassay*

Pengujian daya bunuh formula aksi ganda ini diujikan secara *bioassay* pada hama ulat api Instar II dan III. Pemberian formula biopestisida (formula cair fermentasi ditambah hasil ekstraksi padatan sebanyak 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, dan 25 ml), kontrol positif dengan pestisida (*Beta silflutrin 25g/L*), dan negatif dengan air dilakukan pada makanan ulat api yaitu daun kelapa sawit. Daun kelapa sawit dicelupkan kedalam cairan biopestisida selama 2 menit dan diberikan pada ulat api. Pengamatan dilakukan selama 6 hari setelah pengaplikasian (Lampiran 9b-g).

E. Parameter yang Diamati

Tahap 1: Identifikasi dan Karakterisasi *B. thuringiensis*

1. Karakterisasi Koloni dan Sel *B. thuringiensis*

Identifikasi *B. thuringiensis* dilakukan pada awal penelitian. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui bahwa isolate yang digunakan sudah sesuai dengan karakter *B. thuringiensis*, meliputi bentuk koloni, bentuk tepi, elevasi, struktur dalam dan identifikasi sel *B. thuringiensis*.

2. Uji Toksisitas *B. thuringiensis* terhadap *Plutella xylostella*

Uji toksisitas dilakukan pada awal penelitian yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan *B. thuringiensis* dapat membunuh hama.

Tahap 2. Fermentasi *L. camaradan B. thuringiensis*

1. Perubahan Fisik Media Alami LCPKS dan Air Kelapa Selama Fermentasi

Uji fisik dilakukan untuk mengetahui perubahan pada saat fermentasi, yaitu

a. Suhu

Pengukuran suhu dilakukan pada awal fermentasi dan akhir fermentasi menggunakan alat thermometer.

b. pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter pada awal fermentasi dan akhir fermentasi.

c. Warna

Warna diukur pada saat awal fermentasi dan akhir fermentasi. Warna diukur menggunakan *Muncle soil colour chart*.

d. Aroma

Pengamatan aroma dilakukan pada awal dan akhir fermentasi menggunakan indera penciuman.

e. Total Zat Padat Terlarut (TDS)

Pengukuran TDS dilakukan pada saat awal fermentasi dan akhir fermentasi dengan cara mencelupkan ujung alat TDS meter ke dalam larutan.

2. Populasi *Bacillus thuringiensis* (cfu/ml).

Uji jumlah populasi *Bacillus thuringiensis* dilakukan pada media Natrium Agar pada petridis yang ditentukan dengan cara menghitung koloni *Bacillus thuringiensis* dengan alat coloni counter. Pengujian jumlah populasi *B. thuringiensis* dilakukan pada awal fermentasi dan akhir fermentasi (Lampiran 10a-b).

Syarat menghitung populasi:

1. Tidak ada *spreader*.
2. Jumlah koloni mulai dari 30-300 (cfu/ml)

3. Perbandingan jumlah bakteri antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran yang lebih kecil :
 1. Jika ≤ 2 , hasil perhitungan dirata-rata.
 2. Jika > 2 , dipakai hasil pengenceran yang sebelumnya.

Tahap 3. Ekstraksi Padatan Hasil Fermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis*

1. Berat Padatan Fermentasi (g)

Berat padatan yang digunakan yaitu padatan hasil fermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis*. Padatan ini kemudian dimaserasi menggunakan pelarut Aseton dengan perbandingan 1:5.

2. Jumlah Cairan Hasil Ekstraksi (ml)

Jumlah cairan hasil ekstraksi ini diperoleh dari maserasi padatan hasil fermentasi yang telah dimaserasi dengan pelarut aseton. Hasil maserasi diekstraksi menggunakan *RotaryVacum Evaporator* hingga mencapai 20% dari hasil maserasi. (Pengujian Pendahuluan). Cairan hasil ekstraksi dilakukan uji fisik (Lampiran 8d)

3. Populasi *Bacillus thuringiensis* (cfu/ml) Hasil Ekstraksi

Perhitungan jumlah populasi *Bacillus thuringiensis* hasil ekstraksi dilakukan menggunakan media Natrium Agar pada petridish dengan cara menghitung koloni *Bacillus thuringiensis* menggunakan alat coloni counter (Lampiran 10c).

Syarat menghitung populasi:

1. Tidak ada *spreader*.
2. Jumlah koloni mulai dari 30-300 (cfu/ml)
3. Perbandingan jumlah bakteri antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran yang lebih kecil :
 1. Jika ≤ 2 , hasil perhitungan dirata-rata.
 2. Jika > 2 , dipakai hasil pengenceran yang sebelumnya.

Tahap 4. Uji *Bioassay* Kombinasi Formula Cair Ekstrak *L. camara* Setelah Difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan Hasil Ekstraksi Bahan Padatan.

1. Pembuatan Formula Cair Ekstrak *L. camara* Setelah Difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan Hasil Ekstraksi Bahan Padatan

Formula biopestisida yang telah dikombinasikan dilakukan pengujian yang meliputi:

a. Sifat Fisika

Pengujian sifat fisika kombinasi hasil fermentasi dengan hasil ekstraksi padatan meliputi pengukuran suhu, pengukuran pH, warna, aroma, dan *Total dissolved solid* (TDS).

b. Sifat Kimia

Pengujian sifat kimia meliputi kandungan fitokimia *alkaloid* dan *tanin* menggunakan Spektrofotometri UV-vis yang dilakukan di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada. Pengujian dilakukan dengan memasukkan sampel kedalam *cuvet* (cup) dan ditambahkan 3 tetes FeCl_3 dan Gelatin. Sampel yang sudah disiapkan kemudian diletakkan pada alat UV-Vis Spektrofotometri, seting sesuai dengan parameter yang diinginkan dan tekan tombol start dan hasil muncul pada layar.

2. Populasi *B. thuringiensis*

Perhitungan jumlah populasi *Bacillus thuringiensis* hasil ekstraksi dilakukan menggunakan media Natrium Agar pada petridish dengan cara menghitung koloni *Bacillus thuringiensis* menggunakan alat coloni counter (Lampiran 10d).

Syarat menghitung populasi:

1. Tidak ada *spreader*.
 2. Jumlah koloni mulai dari 30-300 (cfu/ml)
 3. Perbandingan jumlah bakteri antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran yang lebih kecil :
 1. Jika ≤ 2 , hasil perhitungan dirata-rata.
 2. Jika > 2 , dipakai hasil pengenceran yang sebelumnya.
- 3. Pengujian *Bioassay* Formula Cair Ekstrak *L. Camara* Setelah Difermentasi dengan *B. thuringiensis* dengan Hasil Ekstraksi Bahan Padatan**

Pengujian *Bioassay* (Lampiran 10a) untuk mengetahui daya bubuh formulasi biopestisida cairan hasil fermentasi ditambah hasil ekstraksi padatan meliputi 3 parameter pengamatan yaitu:

a. Jumlah Hama Mati (%)

Pengamatan jumlah hama mati dilakukan dengan cara menghitung larva ulat api yang mati setelah diaplikasikan perlakuan setiap hari 24 jam setelah aplikasi (Putri, 2009).

$$M = \frac{A}{B} \times 100\%$$

Keterangan : M = Persentase kematian hama (%)
 A = jumlah hama yang mati
 B = jumlah total hama setiap unit percobaan

b. Kecepatan Kematian (ekor/hari)

Kecepatan kematian menunjukkan seberapa cepat pengaruh ekstrak *L. camara* dan *B. thuringiensis* pada kematian ulat api yang dilihat dari jumlah kematian per jamnya.

$$V = \frac{T1.n1 + T2.n2 + T3.n3 + \dots Tn.Nn}{N}$$

Keterangan : V = Kecepatan kematian
 T = Waktu pengamatan
 N = jumlah serangga yang diujikan

n = jumlah serangga yang mati

c. Efikasi (%)

Efikasi adalah efektifitas pestisida terhadap organisme sasaran yang didaftarkan berdasarkan pada hasil percobaan lapangan atau laboratorium.

$$\text{Efikasi} = 1 - \left(\frac{T_a}{C_a} \times \frac{C_b}{T_b} \right) \times 100 \%$$

Keterangan : T_b = Jumlah serangga yang hidup dalam toples perlakuan sebelum Diaplikasikan

T_a = Jumlah serangga yang hidup dalam toples perlakuan sesudah aplikasi pada hari ke-6

C_b = jumlah serangga yang hidup dalam toples kontrol sebelum Aplikasi

C_a = Jumlah serangga hidup dalam toples kontrol sesudah aplikasi pada hari ke-6

F. Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan sidik ragam dengan taraf kesalahan 5% untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Apabila ada pengaruh nyata, maka dilakukan uji lanjut menggunakan Duncans Multiple Range Test dengan taraf 5% untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Hasil pengamatan periodik disajikan menggunakan Tabel dan Diagram.