

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Lab. Agrobioteknologi dan Lab. Proteksi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan September sampai Oktober 2017.

B. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu padatan hasil fermentasi daun *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis*, larva ulat api (*Setora nitens*, methanol, Aseton, Etanol, aquadest, limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS), Air Kelapa, gula merah dan daun kelapa sawit.

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

C. Metode penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 tahap yaitu :

Tahap 1. Fermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis*

Penelitian dilakukan dengan cara memfermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis* menggunakan perlakuan faktor tunggal yaitu perbandingan media alami antara limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS) dan Air Kelapa, terdiri dari 5 perlakuan yaitu : A = LCPKS : Air Kelapa (1:0), B = LCPKS : Air Kelapa (1:3), C =

LCPKS : Air Kelapa (1:1), D = LCPKS : Air Kelapa (3:1), E = LCPKS : Air Kelapa (0:1). Setiap perlakuan diulang 3 kali, sehingga diperoleh 15 unit dan masing-masing unit diulang 3 kali, sehingga diperoleh 45 botol jam (*lay out* pada lampiran 1).

Tahap 2 : Ekstraksi padatan hasil fermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis*

Ekstraksi dilakukan menggunakan padatan dari fermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis* dengan rancangan percobaan faktor tunggal 15 perlakuan, sebagai berikut :

- A. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Metanol
- B. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Aseton
- C. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:0) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Etanol
- D. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:3) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Metanol
- E. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:3) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Aseton
- F. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:3) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Etanol
- G. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:1) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Metanol

- H. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:1) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Aseton
- I. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (1:1) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Etanol
- J. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (3:1) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Metanol
- K. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (3:1) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Aseton
- L. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (3:1) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Etanol
- M. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Metanol
- N. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Aseton
- O. Perbandingan Media Alami LCPKS dan Air Kelapa (0:1) dengan Fermentasi *B. thuringiensis*, ekstraksi dengan Etanol

Masing-masing perlakuan diulang 3 kali sehingga terdapat 45 sampel ekstraksi.

D. Cara Penelitian

Tahap 1: Identifikasi dan Karakterisasi *Bacillus thuringiensis*

a. Identifikasi dan karakter *Bacillus thuringiensis* dilakukan pada awal penelitian

Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui isolate yang diperoleh adalah benar dan sesuai karakterisasi *Bacillus thuringiensis*. Identifikasi meliputi sifat koloni, bentuk sel dan aerobisitas (Lampiran 2)

b. Perbanyak inokulum *Bacillus thuringiensis*

Perbanyak inokulum *B. thuringiensis* yaitu dengan memindahkan inokulum *B. thuringiensis* ke dalam agar miring dan medium cair pada tabung reaksi setelah itu diinkubasi pada temperatur yang sesuai selama 48 jam. Setelah selesai diinkubasi diuji kembali kemurniannya dengan mikroskopik jika di setiap tabung terdapat bakteri maka isolasi berhasil, koloni bakteri yang telah murni selanjutnya bisa di perbanyak pada media cair di erlenmeyer dan shaker selama 48 jam. Inokulum *B. thuringiensis* sudah siap digunakan (Lampiran 2).

Tahap 2: Fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis*

a. Pembuatan serbuk *Lantana camara*

Daun *Lantana camara* disortir untuk memisahkan daun dari batang yang masih tersisa. Daun hasil sortiran yang telah bersih kemudian dikeringanginkan selama 4 (empat) hari dilanjutkan dalam oven bersuhu konstan 40°C selama 3 (tiga) hari. Daun yang telah dibuat ke dalam bentuk sediaan kering (simplisia) ini dapat diketahui dengan cara diremas akan segera patah dan hancur, kemudian di blender hingga menjadi serbuk (Emand Syapriawan Tolanamy dkk., 2017) (Lampiran 5 a-f).

b. Pembuatan media fermentasi dengan berbagai perbandingan antara limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS) dan Air Kelapa

Pembuatan perbandingan media fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis* yaitu dengan cara mengukur limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS) dan Air Kelapa sesuai dengan perlakuan, kemudian ditambahkan gula merah 10 %. Dilanjutkan dengan memasukan bahan ke dalam botol jam dan dilakukan sterilisasi (Lampiran 4).

c. Fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis*

Pembuatan biopestisida dengan cara mencampurkan media alternatif dengan simplisia *L. camara* yang sudah diblender dengan *B. thuringiensis* untuk mendapatkan ekstraknya maka difermentasi selama 6 hari. (Lampiran 6).

Tahap 3 : Ekstraksi padatan hasil fermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis*

a. Maserasi padatan hasil fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis*

Maserasi dilakukan dengan cara mencampurkan padatan hasil fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis* dengan perbandingan 1:5 dengan pelarut Metanol, Etanol dan Aseton kemudian dimaserasi selama 24 jam.

b. Ekstraksi padatan hasil fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis*

Ekstraksi dilakukan dengan cara menyaring padatan hasil fermentasi yang telah di maserasi selama 24 jam. Kemudian larutan yang telah disaring dengan kertas saring dan diperoleh filtrat yang kemudian dimasukkan pada *rotary evaporator* agar bisa mendapatkan ekstrak pekat (Lampiran 6).

c. Pembuatan Pasta dengan penambahan *emulsifier*

Ekstrak pekat yang diperoleh dari hasil *rotary evaporator* kemudian dimasukkan ke dalam cawan selanjutnya dipanaskan menggunakan *waterbath* dengan suhu 30°C hingga ekstrak menjadi lebih kental. Ekstrak yang diperoleh tidak dapat mengental seperti pasta tetapi terlihat sangat keras, oleh karena itu ditambahkan *emulsifier*. Penambahan *emulsifier* sedikit demi sedikit menggunakan mikropipet hingga ekstrak kental menjadi seperti pasta.

E. Parameter yang diamati

Tahap 1: Identifikasi dan Karakterisasi *Bacillus thuringiensis*

1. Karakterisasi Koloni dan Sel *Bacillus thuringiensis*

Identifikasi *Bacillus thuringiensis* dilakukan pada awal penelitian. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui bahwa isolate yang digunakan sudah sesuai dengan karakter *Bacillus thuringiensis*, meliputi bentuk koloni, bentuk tepi, elevasi, struktur dalam dan identifikasi sel *Bacillus thuringiensis* (Lampiran 8 a-f).

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

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

Tahap 2. Fermentasi *Bacillus thuringiensis* dan *Lantana camara*

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 hari ke-0, hari ke-2, hari ke-4 dan hari ke-6 menggunakan thermometer

b. pH

Pengukuran pH dilakukan pada hari ke-0, hari ke-2, hari ke-4 dan hari ke-6.

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

Uji dinamika populasi *Bacillus thuringiensis* dilakukan pada media Natrium Agar pada petridis yang ditentukan dengan cara menghitung koloni *Bacillus thuringiensis* dengan alat *coloni counter*.

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 *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis*

a. Berat Padatan Fermentasi (g)

Berat padatan yang digunakan yaitu padatan hasil fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis*. Jumlah padatan yang digunakan untuk setiap perlakuan berbeda-beda tergantung padatan yang diperoleh dari hasil fermentasi. Padatan ini kemudian dimaserasi menggunakan berbagai pelarut seperti Metanol, Aseton dan Etanol dengan perbandingan 1:5.

b. Berat Padatan Hasil Ekstraksi (g)

Berat padatan hasil ekstraksi ini diperoleh dari hasil ekstraksi ekstrak pekat hasil fermentasi yang telah dimaserasi dengan berbagai pelarut. Ekstrak pekat yang diperoleh dari *rotary evaporator* kemudian dipanaskan menggunakan *waterbath* untuk mengentalkan ekstrak pekat hingga menjadi padatan.

c. Jumlah Penambahan *Emulsifier* (ml)

Emulsifier adalah zat untuk membantu menjaga kestabilan emulsi minyak dan air. Penambahan *emulsifier* pada penelitian ini untuk mengentalkan ekstrak pekat hasil ekstraksi dengan *rotary evaporator*.

d. Berat Padatan Setelah Ditambahkan *Emulsifier* (g)

Berat padatan setelah ditambahkan *emulsifier* akan berbeda dengan berat sebelum ditambahkan dengan *emulsifier*. Berat padatan ini ditimbang menggunakan timbangan analitik setelah ditambahkan *emulsifier*.

e. Hasil Rendemen Pasta (%)

Ekstrak pekat hasil evaporasi yang telah disemprot gas nitrogen, ditimbang dalam wadah yang telah diketahui beratnya kemudian berat ekstrak pekat dibandingkan dengan berat awal bubuk labu kuning.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstra pekat}}{\text{berat bubuk labu kuning}} \times 100 \%$$

F. Analisis Data

Setelah data hasil penelitian diperoleh, kemudian dilakukan pengujian menggunakan sidik ragam (*Analisis of variance*), bila ada beda nyata antar perlakuan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*).