

IV. HASIL ANALISIS DAN PEMBAHASAN

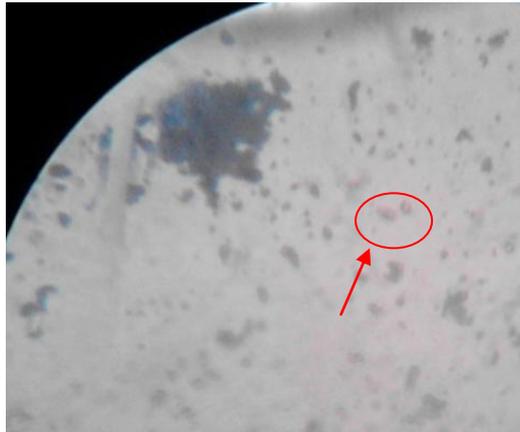
A. Karakterisasi dan uji bioassay *Bacillus thuringiensis*

1. Pengujian *B. thuringiensis*

Isolasi dilakukan dengan mengambil *spora B. thuringiensis* pada media Agar miring *B. thuringiensis* murni diremajakan dalam media Agar miring sebanyak 1 ose pada masing-masing media miring kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang $\pm 27^{\circ}\text{C}$. setelah diinkubasi selama 48 jam kemudian *B. thuringiensis* dipindahkan ke media NC pada petridis untuk karakterisasi isolat *B. thuringiensis*.

Sifat – sifat isolat yang didapat antara lain:

a. Sel bakteri. Pengamatan terhadap sel bakteri dilakukan setelah pengecatan gram pada isolat, lalu dilihat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Berdasarkan pengamatan pada pengecatan gram (gambar 1), diketahui bahwa sel berbentuk batang dan dinding sel berwarna ungu violet sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat yang didapatkan bersifat gram positif. Menurut Bahagiawati (2002), *B. thuringiensis* merupakan bakteri yang bersifat gram positif dan berbentuk batang.



Gambar 1. Bentuk dan sifat sel *B. thuringiensis*.

- b. Koloni.** Pengamatan terhadap morfologi dan warna koloni dilakukan terhadap koloni tunggal. Hasil pengamatan menunjukkan bentuk koloni *irregular*, elevasi *raised with concave bevelled edge*, bentuk tepi *ciliate*, struktur dalam *coarsely granular*, dan warna putih (gambar 2). Karakter tersebut sesuai referensi yakni koloni berwarna putih (Isroi, 2009).



Gambar 2. Koloni isolat *B. thuringiensis*

- c. Uji Aerobisitas.** Pengujian aerobisitas dilakukan dengan menumbuhkan isolat dalam media Nutrien Cair (NC) pada tabung reaksi steril. Koloni yang tumbuh dipermukaan bersifat aerob dan koloni yang didasar media bersifat anaerob,

sedangkan koloni yang tumbuh melayang atau homogen bersifat fakultatif anaerob. Isolat yang bersifat aerob membutuhkan oksigen untuk tumbuh dan berkembang sehingga saat ditumbuhkan dalam tabung reaksi akan tumbuh pada permukaan media yang mendapatkan kontak oksigen pada bagian atas tabung reaksi. Berdasarkan pengamatan yang tersaji pada lampiran (gambar 3), koloni tumbuh pada permukaan media cair sehingga isolat bersifat aerob. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian dari Dwi Wahyuono (2014)



Gambar 3. Sifat bakteri *B. thuringiensis* aerob

d. Uji *bioassay*. Uji *bioassay* dilakukan untuk mengkonfirmasi isolat yang diperoleh adalah *B. thuringiensis* penghasil delta endotoksin yang bersifat insektisidal terhadap ulat lepidoptera. Isolat dalam media NC yang diinkubasi selama 48 jam digunakan sebagai *bioassay*. Daun mentimun sebagai pakan dicelupkan dalam larutan 20 ml *B. thuringiensis*, lalu dikeringanginkan dan diletakkan dalam gelas plastik ukuran 300 ml. Jumlah ulat yang digunakan yaitu 10 ekor.

Hasil pengamatan menunjukkan isolat mempunyai daya insektisidal terhadap ulat yang diujikan (tabel 2). Pada hari pertama ulat mempunyai aktivitas makan yang tinggi. Terlihat perubahan setelah hari kedua, terlihat sudah ada ulat yg mati.

Tabel 2. Mortalitas ulat pada pengujian bioassay selama 5 hari (ekor)

Ulat	Hari ke-				
	1	2	3	4	5
Mati	0	0	5	5	6
Hidup	10	10	5	5	4

Pada percobaan ulat mentimun terbukti pada hari ketiga isolat dapat mengakibatkan mortalitas 50 %, sehingga diduga kuat memiliki daya insektisidal dan telah memenuhi syarat untuk digunakan dalam penelitian, berdasarkan pengamatan ciri – ciri kematian ulat tidak bergerak saat disentuh, tubuhnya lunak, berwarna lebih gelap hingga hitam, mengkerut, mengeluarkan cairan dan membusuk (gambar 4). Diduga kuat hal ini dikarenakan spora dan protein delta endotoksin yang dihasilkan isolat merusak saluran pencernaan sehingga aktivitas makan terhenti dan mengakibatkan kematian.

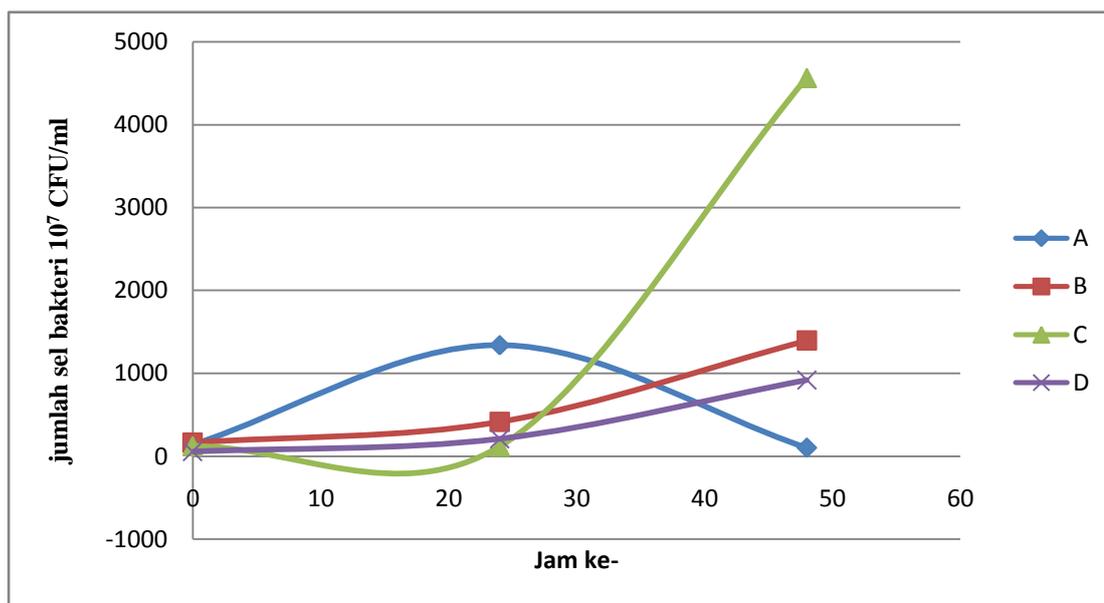


Gambar 4. Kematian ulat akibat serangan *B. thuringiensis* pada pengujian bioassay tahap karakterisasi isolat.

Berdasarkan hasil karakterisasi, hasil isolat yang didapatkan dari isolasi *B. thuringiensis* kultur murni mempunyai sifat gram positif, sel berbentuk batang, warna koloni putih dan bentuk koloni *irregular* dan mempunyai daya insektisidal terhadap ulat.

B. Formulasi *B. thuringiensis*

Pengembangan *B. thuringiensis* yang dimaksud adalah memberikan *B. thuringiensis* dalam media alternatif berupa limbah cair tahu agar bakteri tersebut tumbuh dan berkembang sampai memproduksi spora dan kristal protein delta endotoksin. Media yang digunakan sebagai media bakteri yaitu limbah cair tahu sebagai media fermentasi alternatif untuk mengembangkan *B. thuringiensis* pada erlenmeyer, yang berisi 100 ml formulasi limbah cair tahu pada masing-masing perlakuan pada tahap satu yang terdiri dari 3 formulasi. Kemudian diinkubasi dengan penggojogan di atas *shaker* selama 24 dan 48 dengan kecepatan 120 rpm. Tujuan dilakukan *shaker* untuk memperbanyak kontak permukaan media dengan udara dalam erlenmeyer. Setelah di *shaker* formulasi yang mengandung *B. thuringiensis* di ambil 1 ml dan dilarutkan kedalam 9,9 ml *distilled water* dan diencerkan secara berseri dengan pengenceran 10^7 , 10^8 , dan 10^9 kemudian dari pengenceran tersebut diambil 0,1 ml dan diinokulasikan pada media LBA pada *petridish* dengan metode *surface* kemudian diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam setelah itu dihitung koloni bakteri dengan metode *plate count*. Hasil tersaji pada gambar 5.



Gambar 5. Perkembangan jumlah sel bakteri *B. thuringiensis* pada media limbah cair tahu dan NC

Keterangan:

- A. Limbah cair tahu 100%
- B. Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g
- C. Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g
- D. Nutrient Cair

Perubahan pada kurva (gambar 5) menunjukkan transisi dari satu fase perkembangan ke fase lainnya. Kurva pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan menjadi empat fase utama: fase lag (fase lamban atau fase *lag phase*), fase pertumbuhan eksponensial (fase pertumbuhan cepat atau fase *log phase*), fase stasioner (fase statis atau *stationary phase*) dan fase penurunan populasi (*decline*). Fase-fase tersebut mencerminkan keadaan bakteri dalam kultur tertentu (Kusnadi *et al*, 2011).

Hasil pengamatan menuju ke-24 jam menunjukkan bahwa pada formulasi Limbah cair tahu 100% + NaOH 10% memasuki fase pertumbuhan atau *fase log*. Hal ini dikarenakan *B. thuringiensis* dalam *starter* berada dalam fase yang siap untuk memperbanyak diri. Sedangkan pada jam ke 0 perkembangan jumlah bakteri formulasi Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g

yaitu mencapai $163,3 \times 10^7$ CFU/ml, limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g mencapai $123,3 \times 10^7$ CFU/ml dan Nutrient Cair mencapai $55,6 \times 10^7$ CFU/ml mengalami *fase lag*. Hal ini dikarenakan bakteri sedang masuk dalam periode penyesuaian yang sangat penting untuk penambahan metabolit pada kelompok sel, menuju tingkat sel maksimum.

Pada inkubasi setelah jam ke-24 menunjukkan bahwa formulasi Limbah cair tahu 100% jumlah bakteri mencapai $1340,5 \times 10^7$ CFU/ml mengalami fase stasioner dan mengalami fase kematian namun tidak semua sel. Sedangkan pada formulasi Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g mencapai $414,3 \times 10^7$ CFU/ml dan Nutrient Cair mengalami $210,6 \times 10^7$ CFU/ml fase log pada mencapai dikarenakan *B. thuringiensis* memanfaatkan nutrisi yang terkandung dalam masing-masing formulasi seperti pada air kelapa tua dan Urea. Berbeda dengan formulasi pada limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g menunjukkan angka yang menurun dibandingkan dengan sebelumnya yaitu sebesar 119×10^7 CFU/ml.

Mendekati jam ke-48 terlihat bahwa formulasi Limbah cair tahu 100% + NaOH 10% sudah memasuki fase penurunan populasi hal tersebut dikarenakan nutrisi habis maka terjadi *lysis* sel bakteri sehingga mengalami penurunan jumlah sel bakteri. Perbedaan terjadi pada formulasi formulasi Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g dan Nutrient Cair yang masih memasuki fase log. Diikuti oleh limbah cair tahu 80% + air 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g yang mulai masuk *fase log*, dikarenakan zat hara yang terkandung dalam gula telah dimanfaatkan oleh *B. thuringiensis*.

Tepat pada jam ke-48 jumlah bakteri dari Limbah cair tahu 100% + NaOH 10% masih memasuki *fase log* yaitu mencapai angka 102×10^7 CFU/ml, sedangkan pada formulasi Limbah cair tahu 80%+ air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g jumlahnya mencapai 1395×10^7 CFU/ml dan Nutrient Cair mencapai $920,3 \times 10^7$ CFU/ml keduanya masih memasuki *fase log*, dari ketiga formulasi tersebut tidak mengalami perubahan yang signifikan. Perbedaan terjadi pada formulasi Limbah cair tahu 80% + air 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g yang mengalami fase pertumbuhan secara pesat dibandingkan dengan tiga formulasi yang ada. Pada formulasi tersebut menunjukkan jumlah sel 4563×10^7 CFU/ml. Menurut hasil penelitian Kunaepah (2008) hal tersebut diduga terjadi karena *B. thuringiensis* memanfaatkan gula sebagai nutrisi pertumbuhan yang mengandung sumber karbon. Hal tersebut didukung oleh penelitian Rahmawati (2011) bahwa urea merupakan sumber Nitrogen yang sesuai dengan kebutuhan mikroorganisme karena kemampuannya untuk menstabilkan pH.

Berdasarkan perbandingan jumlah rata-rata sel bakteri *B. thuringiensis* pada waktu inkubasi jam ke-0 hingga jam ke-48, maka dapat disimpulkan bahwa bakteri dapat berkembang di media limbah cair tahu. Tetapi hasil pertumbuhan bakteri berbeda karena dipengaruhi oleh unsur tambahan yang dicampurkan dengan limbah cair tahu. Pertumbuhan bakteri terbaik terjadi pada formulasi limbah cair tahu 80% + air 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g yang menghasilkan 4563×10^7 CFU/ml dalam waktu inkubasi selama 48 jam.

Salah satu kendala setelah dilakukan semacam ini, ternyata membutuhkan media NC yang tidak sedikit. Peneliti perlu menggunakan media alternatif untuk

digunakan penelitian terutama dalam tahap perhitungan bakteri dengan metode *plate count*. Berdasarkan berbagai sumber informasi, media air kelapa dan gula merah maupun media organik lainnya yang banyak mengandung nutrisi, berpotensi sebagai media pengganti NC.

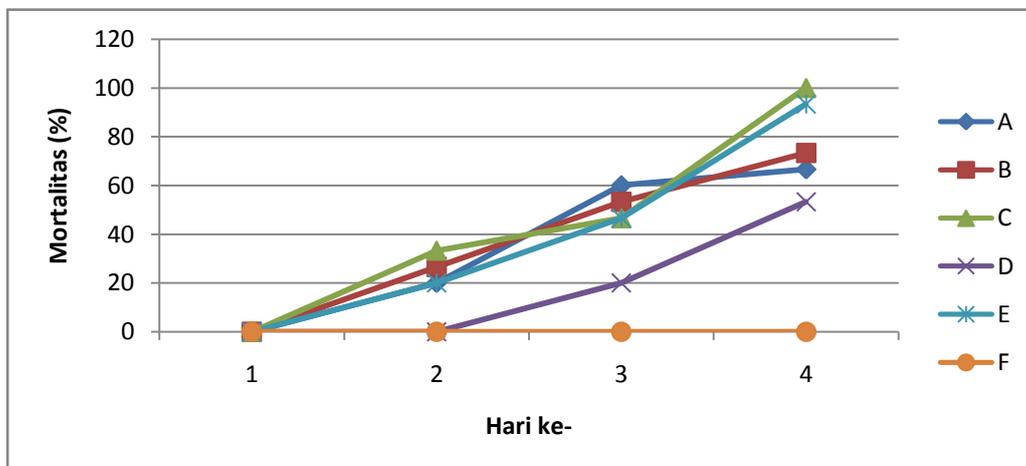
C. Pengujian *Bioassay B. Thuringiensis* dengan ulat daun mentimun

Uji *Bioassay B. Thuringiensis* dengan ulat daun mentimun bertujuan untuk mengetahui toksinitas bioinsektisida terhadap ulat daun mentimun instar III . Parameter yang diamati pada uji *Bioassay* yakni mortalitas (%), perubahan persentase populasi (%), efikasi (%), hambatan makan (%), kecepatan kematian (ekor/hari), serta kehilangan berat ulat (g).

a. Mortalitas (%)

Mortalitas atau tingkat kematian menunjukkan kemampuan daya bunuh bioinsektisida perlakuan dari jumlah ulat daun mentimun yang mati (gambar 6). Semakin banyak ulat daun mentimun yang mati berarti bahwa daya bunuh bioinsektisida lebih tinggi. Ciri-ciri kematian ulat Pada gambar 6 mortalitas setiap hari selama 4 hari pengamatan, menunjukkan setiap perlakuan bioinsektisidal mengakibatkan mortalitas ulat mentimun dengan peningkatan kematian yang berbeda-beda. Pada hari ke-1 kurva yang tertinggi dan terus menanjak yakni perlakuan *Bacillus thuringiensis* + limbah cair tahu 100% mencapai 20% , *Bacillus thuringiensis* + Limbah cair tahu 80% + air 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g mencapai 46,6% dan *Bacillus thuringiensis* + Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g mencapai 53,3%, menunjukkan daya bunuh yang

kuat terhadap ulat mentimun instar III. Grafik mortalitas setiap hari dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Mortalitas ulat daun mentimun pada setiap hari pengamatan

Keterangan:

- A. *Bacillus thuringiensis*+ limbah cair tahu 100%
- B. *Bacillus thuringiensis* + Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g
- C. *Bacillus thuringiensis* + Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g
- D. *Bacillus thuringiensis*+ Nutrient Cair
- E. Bioinsektisida komersial dengan konsentrasi 20g
- F. Kontrol

Pada gambar 6 mortalitas setiap hari selama 4 hari pengamatan, menunjukkan setiap perlakuan bioinsektisidal mengakibatkan mortalitas ulat mentimun dengan peningkatan kematian yang berbeda-beda. Pada hari ke-1 kurva yang tertinggi dan terus menaik yakni perlakuan *Bacillus thuringiensis* + limbah cair tahu 100% mencapai 20% , *Bacillus thuringiensis* + Limbah cair tahu 80% + air 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g mencapai 46,6% dan *Bacillus thuringiensis* + Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g mencapai 53,3%, menunjukkan daya bunuh yang kuat terhadap ulat mentimun instar III. Hal ini dikarenakan perkembangan *B. thuringiensis* pada inkubasi 48

jam memasuki fase pertumbuhan atau fase log, sehingga daya insektisidalnya masih kuat. Hal tersebut diduga kandungan limbah cair tahu serta penambahan air kelapa dan gula merah dapat membantu pertumbuhan bakteri saat diinkubasi dikarenakan diantara waktu inkubasi 24-48 jam jumlah sel bakteri yang memasuki fase sporulasi lebih banyak, sehingga jumlah spora dan delta endotoksin yang dihasilkan lebih banyak. Jika jumlah spora dan delta endotoksin yang dihasilkan lebih banyak maka daya bunuh cenderung lebih tinggi. Hal tersebut dapat dilihat pada gambar 5, bahwa pada waktu inkubasi 24-48 jam menunjukkan fase log masih terjadi hingga lebih dari 48 jam dan belum mengalami fase stasioner. Berbeda dengan formulasi Nutrient Cair yang daya bunuhnya cenderung mulai bekerja pada hari ke-2 mencapai 20%. Hal ini disebabkan oleh pertumbuhan bakteri pada fase stasioner. Pada fase inilah spora dan protein delta endotoksin diproduksi. Hal tersebut diduga mengakibatkan akumulasi protein delta endotoksin yang mulai bekerja sebagai insektisidal sehingga mengakibatkan kematian ulat mentimun.

Sedangkan pada perlakuan kontrol tidak ada menunjukkan kematian atau menunjukkan angka 0% sampai akhir hari pengamatan. Mortalitas terbaik pada formulasi *Bacillus thuringiensis* + Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g karena mencapai angka mortalitas sebesar 100% hanya dalam waktu 4 hari. Gejala awal yang nampak adalah ulat mulai kurang aktif, gerakannya mulai lamban dan aktivitas makan mulai menurun. Gejala ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Poinar & Thomas (1982), bahwa saluran pencernaan adalah organ yang mula-mula terserang oleh bakteri. Ulat yang

terinfeksi kemudian mati dengan gejala lanjut yaitu tubuh berubah warna dari hijau kecoklatan menjadi coklat kehitaman, tubuh lembek, berair namun setelah beberapa hari ulat tersebut mulai mengering dan kemudian mengerut. Hasil dari persentase mortalitas pada hari ke empat tersaji pada tabel 3.

Tabel 3. Persentase mortalitas ulat daun mentimun pada hari ke empat (%)

Perlakuan	Mortalitas (%)
Limbah cair tahu 100%	66,6
Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g	73,3
Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g	100
Nutrient Cair	53,3
Bioinsektisida komersial dengan konsentrasi 20g	93,3
Kontrol	0

Dari tabel 4 dijelaskan bahwa mortalitas pada semua perlakuan pada hari ke empat, mortalitas dari Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g mencapai angka paling tinggi sebesar 100% dibandingkan dengan Bioinsektisida komersial dengan konsentrasi 20 g yang mencapai 93,3%. Menurut pada penelitian Dwiyantores (2012) tentang pengembangan *B. thuringiensis* dalam media pupuk organik cair dan debu vulkanik merapi serta uji toksisitas terhadap ulat grayak pada tanaman *caisim*. Mortalitas tertinggi diakibatkan oleh perlakuan bioinsektisida hasil perlakuan fermentasi POC + 0,2% gula jawa + 0,3% Urea, inkubasi 48 jam yakni sebesar 93,33%.

b. Kecepatan kematian (ekor/hari)

Waktu kematian ulat daun mentimun bervariasi, pengamatan dilakukan terhadap rata-rata hari kematian ulat daun mentimun dengan mengamati jumlah

ulat daun mentimun yang mati. Hasil pengamatan terhadap rata-rata waktu kematian ulat daun mentimun dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata kecepatan kematian ulat daun mentimun (ekor/hari)

Perlakuan	Kecepatan kematian (ekor/hari)
Limbah cair tahu 100%	1,66 a
Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g	1,33 a
Limbah cair tahu 80% + air 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g	2,00 a
Nutrient Cair	1,33 a
Bioinsektisida komersial dengan konsentrasi 20g	1,33 a
Kontrol	0,00 b

Keterangan: huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata berdasarkan hasil DMRT taraf α 5%

Berdasarkan hasil pengamatan kecepatan kematian yang dianalisis menggunakan analisis sidik ragam dan uji lanjut DMRT dengan taraf kesalahan 5% (lampiran 2) bahwa ada pengaruh nyata terhadap kecepatan kematian, antara semua formulasi dengan perlakuan kontrol. Kecepatan mati ulat daun mentimun memiliki rata-rata yang sama, kecuali pada perlakuan Limbah cair tahu 80% + air 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g yang mengalami kematian 2 ekor/hari. Semakin singkat waktu yang dibutuhkan untuk mengendalikan hama maka lebih baik sesuai dengan pendapat Alfian Rusdy (2010), serta dengan rekomendasi dari *Centre for Agriculture and Bioscience International* (2005) bahwa isektisida yang mengandung *Bacillus thuringensis* untuk mengendalikan *Diaphani indica*.

Bacillus thuringensis bekerja sebagai racun pencernaan makanan serangga. Racun yang dihasilkan *Bacillus thuringensis*, yaitu δ -endotoksin, disintesis sebagai protoksin yang tidak aktif yang akan diaktifkan di dalam mesentron serangga. Toksin yang masuk ke dalam saluran pencernaan makanan larva membutuhkan waktu untuk dapat menyebabkan lisis pada sel-sel mesenteron dan kematian larva.

Semakin tinggi konsentrasi Bt semakin besar pula kemungkinan larva teracuni oleh *Bacillus thuringensis*. Nia Azizah (2011) melaporkan bahwa kematian larva *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) akibat perlakuan dengan *Bacillus thuringensis* dapat terjadi pada 1–5 hari setelah perlakuan.

c. Efikasi (%)

Efikasi adalah pengamatan dengan membandingkan jumlah populasi hama sebelum dan sesudah diaplikasikan dengan Bioinsektisida *B. thuringiensis* yaitu dengan cara menghitung hama yang hidup. Hasil dari perhitungan efikasi tersaji pada tabel 5.

Tabel 5. Persentase efikasi ulat daun mentimun pada hari ke empat (%)

Perlakuan	Efikasi (%)
Limbah cair tahu 100%	33,4
Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g	26,7
Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g	0
Nutrient Cair	46,7
Bioinsektisida komersial dengan konsentrasi 20g	6,7
Kontrol	100

Dari tabel 5 dijelaskan bahwa Efikasi pada semua perlakuan pada hari ke empat, efikasi dari Limbah cair tahu 80% + air 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g mencapai 0% dan Limbah cair tahu 100% mencapai 33,4% sedangkan Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g sebanyak 26,7%. Hal tersebut memiliki nilai efikasi yang sama baik jika dibandingkan dengan formulasi Nutrient Cair yang mencapai 46,7%, tetapi jika dibandingkan dengan Bioinsektisida komersial dengan konsentrasi 20 g yang nilai efikasi mencapai 7%,

oleh karena itu Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g yang terbaik karena mencapai nilai efikasi sebesar 0% dalam waktu 4 hari hal tersebut dipengaruhi oleh tingkat mortalitas yang efektif sesuai yang tersaji pada gambar 5 dan gambar 6. Pertumbuhan bakteri pada fase pertumbuhan eksponensial belum mengalami fase *lysis*, sehingga spora dan delta endotoksin diproduksi dengan efektif hingga mampu sebagai insektisidal ulat mentimun. Persentase dengan nilai kecil menunjukkan kualitas bioinsektisida lebih efektif karena mengakibatkan turunnya kerusakan tanaman, sehingga kerugian yang diakibatkan hama pun menjadi lebih rendah (Rohimatun, 2013).

d. Hambatan Makan (%)

Hambatan makan menunjukkan pengaruh bioinsektisida terhadap aktivitas makan ulat pada perlakuan dibandingkan kontrol. Bioinsektisida *B. thuringiensis* berkerja secara sistemik yakni menyerang saluran pencernaan setelah termakan oleh larva sehingga menghambat aktivitas makan, oleh karena itu larva yang terserang mengalami penurunan aktivitas makan. Pemberian pakan diberikan pada unit percobaan pada waktu aplikasi *B. thuringiensis* dan pengecekan ketersediaan pakan dilakukan minimal 6 jam berdasarkan jumlah ketersediaan pakan pada pengamatan terakhir. Hal ini dilakukan untuk mencegah kematian ulat mentimun karena ketiadaan pakan, bukan karena perlakuan, data hambat makan tersaji pada tabel 6.

Table 6. Persentase rata-rata hambat makan ulat mentimun selama 4 hari (%)

Perlakuan	Hambat Makan (%)
Limbah cair tahu 100%	- 23,0
Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g	- 43,0
Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g	11,2
Nutrient Cair	- 39,0
Bioinsektisida komersial dengan konsentrasi 20g	8,0
Kontrol	0,0

Keterangan: nilai (-) menunjukkan aktivitas makan lebih tinggi daripada kontrol negatif

Hambat makan yang bernilai positif menunjukkan perlakuan bioinsektisida mengakibatkan gangguan atau hambatan aktivitas makan larva sehingga pakan yang dikonsumsi lebih rendah. Hambat makan dari semua perlakuan mengalami nilai negatif, nilai negatif ini menunjukkan perlakuan bioinsektisida tidak mengakibatkan terhambatnya aktivitas makan. Pada perhitungan hambat makan selama 4 hari formulasi Limbah cair tahu 100% mencapai -23% Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g mencapai -43%, sedangkan Nutrient Cair mencapai -39% dari ketiga formulasi tersebut bernilai negatif oleh sebab itu tidak ada hambat makan dari kegiatan larva saat mengonsumsi daun mentimun. Hambat makan bernilai positif terjadi pada formulasi Bioinsektisida komersial dengan konsentrasi 20 g/l yang mencapai 8% sedangkan Limbah cair tahu 80% + air 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g sebesar 11,2%. Hambat makan yang lebih tinggi menunjukkan kualitas bioinsektisida lebih baik karena mengakibatkan turunnya aktivitas makan larva, sehingga kerugian yang diakibatkan hama pun menjadi lebih rendah (Dwiyantores, 2012).

Hambatan makan dipengaruhi oleh tingkat mortalitas, pengaruh bahan aktif bioinsektisida, dan umur larva. Semakin tinggi tingkat mortalitas maka semakin tinggi nilai hambatan makan, karena larva yang mati ikut menjadi pembagi dalam perhitungan hambatan makan. Bahan aktif bioinsektisida menyerang usus larva bagian tengah (*midgut*) sehingga mengganggu system pencernaan dan akhirnya menurunkan aktivitas makan. Umur larva juga menentukan efek toksik perlakuan terhadap hambatan makan yang diakibatkan oleh insektisida karena berkaitan daya tahan tubuh larva.

Penyemprotan insektisida hayati afektif pada saat ulat grayak masih muda, jika sudah tua dengan warna lebih gelap akan susah untuk dikendalikan (Saungani, 2011). Larva yang digunakan dalam penelitian ini diduga mempunyai daya tahan tubuh yang kuat sehingga perlakuan tidak berpengaruh nyata terhadap makan karena larva sudah dewasa yakni berumur dua minggu dan memasuki instar III. Dalam waktu dua hari setelah aplikasi, larva berubah warna menjadi lebih gelap menandakan terjadi perubahan instar. Diduga hal ini dikarenakan pakan daun caisim organik yang diberikan mempunyai nutrisi yang tinggi dan ketersediaan pakan yang dijaga agar tetap ada memacu pertumbuhan larva yang cepat.

e. Kehilangan berat (g)

Kehilangan berat menunjukkan bahwa adanya selisih berat antara berat awal dengan berat akhir setelah perlakuan. Bioinsektisida *B. thuringiensis* berkerja secara sistemik yakni menyerang saluran pencernaan oleh karena itu tubuh dari

larva pun mengalami perubahan dalam bentuk dan beratnya. Perhitungan berat dilakukan pada saat setelah larva dari seluruh perlakuan mati.

Tabel 7. Kehilangan berat larva setelah perlakuan di hari ke empat (g)

Perlakuan	Kehilangan berat (g)
Limbah cair tahu 100%	0,10
Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g	0,14
Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g	0,19
Nutrient Cair	0,18
Bioinsektisida komersial dengan konsentrasi 20g	0,16
Kontrol	- 0,04

Keterangan: nilai (-) menunjukkan penambahan berat badan larva

Kehilangan berat dengan nilai negatif menunjukkan bahwa adanya penambahan berat dari larva tersebut, sedangkan nilai positif adalah kebalikannya atau mengalami penurunan berat badan. Kehilangan berat pada Limbah cair tahu 100% mencapai 0,10 g, Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g mencapai 0,14 g, Nutrient Cair mencapai 0,18 g, dan Bioinsektisida komersial dengan konsentrasi 20 g mencapai 0,16 g, sedangkan nilai kehilangan berat tertinggi terjadi pada larva dengan perlakuan formulasi Limbah cair tahu 100% yaitu sebesar 0,19 g. Hal tersebut diduga daya insektisidal pada formulasi sangat kuat karena pada proses saat kematian larva mengalami mengkerut dan mengeluarkan cairan dari dalam tubuh larva.

Berdasar perhitungan dari keseluruhan hasil uji formulasi, perkembangan sel bakteri *B. thuringiensis* terbaik pada formulasi Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 karena mencapai jumlah sel sebesar

4563 x 10⁷CFU/ml. Sedangkan untuk perhitungan mortalitas sebesar 100% dalam empat hari, efikasi 0% selama empat hari, hambat makan sebesar 11,2%, dan kehilangan berat paling tinggi sebesar 0,19 g yaitu pada Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g, serta kecepatan kematian paling cepat 2,00 ekor/hari. Formulasi dalam bentuk media limbah cair tahu lebih baik dalam inkubasi selama 48 jam, dikarenakan bahan aktif akan lebih stabil karena kandungan vitamin dan proteinnya lebih baik sebagai pertumbuhan dan metabolisme bakteri, dari segi ekonomi pengembangan *B. thuringiensis* pada media limbah cair tahu cukup murah, oleh karena itu dapat dipakai sebagai penggantinya digunakan media NA sebagai media *B. thuringiensis* yang tersedia.