

III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

A. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Inversitas Muhammadiyah Yogyakarta, yang terletak di Desa Tamantirto Kecamatan Kasihan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta, Penelitian dilakukan pada Bulan Januari 2015 sampai dengan Bulan Maret 2015.

B. Bahan dan alat

Bahan yang digunakan antara lain adalah Ulat daun mentimun *Diaphania indica* instar III hasil *rearing* mandiri, Dipel, Nutrien Cair, Limbah Cair tahu Pabrik Tahu Pak Jamik Mayungan (lampiran 4.1), air kelapa tua , air (lampiran 4.2), Alkohol 75 %, pH, NaOH 10%, Urea, Gula Jawa, dan bakteri *B. thuringiensis* (koleksi Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Muhammadiyah Yogyakarta).

Alat yang dipergunakan jarum ose, lampu Bunsen, korek api, otoklaf, Petridis, gelas *beaker*, tabung reaksi.

C. Metode penelitian

Penelitian ini terdiri dari dua tahap yaitu tahap pertama pengembangan *Bacillus thuringiensis* pada media limbah cair pabrik tahu, dilanjutkan tahap pengujian *bioassay*.

Tahap satu adalah pertumbuhan *B. thuringiensis* pada formulasi:

- 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

Perlakuan diulang sebanyak 3 kali, pengamatan dilakukan terhadap jumlah bakteri *B. thuringiensis* pada jam ke 0, 24, dan 48 dengan metode *Plate Count*.

Tahap ke dua adalah uji bioassay pada ulat daun mentimun dengan formulasi *B. thuringiensis* sebagai berikut:

- 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
- E. Bioinsektisida komersil dengan konsentrasi 20 g/l
- F. Kontrol tidak diberi *Bacillus thuringiensis*.

Penelitian ini disusun Rancangan Acak Lengkap dengan rancangan percobaan Faktor tunggal dengan 6 perlakuan masing-masing perlakuan 3 kali ulangan dengan lima sampel ulat daun mentimun, sehingga total ada $5 \times 3 \times 6 = 90$ ulat daun mentimun.

D. Cara Penelitian

Tahap dalam penelitian ini adalah:

1. Karakterisasi dan uji bioassay *Bacillus thuringiensis*

Isolat *B. thuringiensis* penghasil protein kristal diambil dari Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. 1 ose bioinsektisida komersial *B. thuringiensis* disuspensikan dalam 9 ml *distilledwater steril* pada tabung reaksi, larutan dihomogenkan menggunakan *vortex*, setelah homogen diambil satu ose diinokulasikan pada medium *nutrient broth* padat pH 7,0 – 7,2. Pada petridish dengan metode *streak plating* sebanyak 2 ulangan lalu dibungkus dengan kertas payung. Inkubasi dilakukan selama 48 jam pada suhu ruangan 27°C.

Koloni tunggal yang tumbuh dikarakterisasi (koloni dan sel) dan dilakukan uji *bioassay* menggunakan larva ulat daun mentimun untuk memastikan koloni tersebut adalah *B. thuringiensis* penghasil protein kristal protoksin yang bersifat insektisidal. Selain itu dilakukan karakterisasi terhadap sifat gram dan bentuk sel.

Isolat *B. Thuringiensi* sdalam NA miring diperbanyak dalam medium *Nutrient broth* cair (NC). Lima ose penuh koloni diinokulasi dalam erlenmeyer 250 ml berisi 50 ml medium NC, lalu diinkubasikan di atas shaker selama 24 jam pada suhu ruang (27°C) dengan kecepatan 340 rpm lalu disimpan dalam almari pendingin.

2. Formulasi perlakuan tahap pertama : pengembangan *Bacillus thuringiensis*
 - A. Media *Bacillus thuringiensis* + limbah cair tahu 100% + NaOH 2,5 M hingga pH 7,
 - B. Terdiri dari *Bacillus thuringiensis* + Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g + NaOH 2,5 M hingga pH 7,
 - C. *Bacillus thuringiensis* + Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g + NaOH 2,5 M hingga pH 7, sedangkan
 - D. *Bacillus thuringiensis* + Nutrient Cair pada erlemeyer berukuran 100 ml
- Seluruh formulasi dimasukan ke dalam otoklaf selama 25 menit pada temperatur 120°C tekanan 1 atm. Inokulasi kultur murni *B. thuringiensis* diinokulasikan pada tiga unit percobaan A, B, C, dan D, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah sel bakteri pada jam ke 0, 24, dan 48 dengan metode *plate count*. Setiap perlakuan diambil 1 ml diencerkan dengan pengenceran berseri menggunakan *distilledwatersteril* hingga mengencerkan 10^{-8} . Pada faktor pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} , dan 10^{-8} . Inokulasi dilakukan dengan mengambil 0,1 ml ke medium NA dalam petridish menggunakan metode *surface plating* dengan 3 ulangan lalu dibungkus dengan kertas payung dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang 27°C lalu hitung jumlah koloninya menggunakan *colony counter* (lampiran 4. 3 dan 4.4).

3. Formulasi perlakuan tahap 2 : pengujian *bioassay*

- A. Perlakuan A terdiri dari media *Bacillus thuringiensis*+ limbah cair tahu 100% + NaOH 2,5 M hingga pH 7
- B. Perlakuan B terdiri dari *Bacillus thuringiensis* + Limbah cair tahu 80% + air kelapa tua 20% + Urea 0,012 g + NaOH 2,5 M hingga pH 7
- C. Perlakuan C terdiri dari *Bacillus thuringiensis* + Limbah cair tahu 80% + air 20% + gula 0,001 g + Urea 0,012 g + NaOH 2,5 M hingga pH 7
- D. Perlakuan D terdiri dari *Bacillus thuringiensis* + Nutrient Cair + NaOH 2,5 M hingga pH 7, pada erlenmeyer berukuran 100 ml dimasukkan ke dalam otoklaf selama 25 menit pada temperatur 120°C tekanan 1 atm
- E. Perlakuan E menggunakan bioinsektisida komersial dengan konsentrasi 20 g/l + NaOH 2,5 M hingga pH 7
- F. Perlakuan F adalah kontrol tidak diberi *Bacillus thuringiensis* + NaOH 2,5 M hingga pH 7

Inokulasi starter *B. thuringiensis* 10 ml, *Bacillus thuringiensis* diinokulasikan pada setiap unit percobaan A, B, C, dan D diinkubasi pada suhu ruangan selama 24 jam, dan perlakuan E adalah bioinsektisidal komersial dengan konsentarsi 20 g, sedangkan perlakuan F sebagai control digunakan *distilled water*.

4. Penyediaan larva ulat daun mentimun

Larva *Diaphania Indica* instar III didapat dari *rearing* mandiri. Metode *rearing* dengan mengumpulkan ulat daun mentimun dari pertanaman milik petani di kebun mentimun di desa Jurang Jero Kecamatan Pakem, mengutamakan larva

yang ukuran 0,3-0,7 cm, berwarna hijau muda, yang masih kecil tidak terparasit oleh parasitoid, lalu dipelihara selama 1 bulan.

Persiapan 2 wadah yang tertutup dan diberi lubang udara untuk perkembangan ulat, serta pada dasar wadah diberi tisu agar kotoran dari ulat tidak mengakibatkan kelembaban yang mengganggu dalam perkembangan ulat. Wadah pertama untuk perkembangan ulat sampai menjadi pupa, wadah yang kedua digunakan untuk pupa yang menjadi ngengat hingga bertelur. Setelah didapatkan ulat dari kebun maka dimasukkan ke dalam wadah pertama, lalu diberi daun mentimun sebagai pakan. Pengecekan pakan dilakukan setiap hari untuk memastikan bahwa ulat tersebut tidak mati akibat kehabisan pakan. Setelah ulat berubah menjadi pupa, maka dilakukan pemindahan pupa ke wadah yang kedua.

Wadah kedua sebagai tempat perkembangan pupa sebelumnya dipersiapkan 2 botol. Botol yang pertama digunakan sebagai stok makan ngengat diberi 100 ml cairan yang terdiri dari 10% larutan madu ditempatkan dalam botol lalu di bagian atas botol ditaruh kain kasa supaya ngengat lebih mudah mengkonsumsi cairan tersebut. Botol kedua diberi air sebagai media hidup dari batang mentimun yang berdaun muda digunakan sebagai tempat ngengat bertelur. Pupa yang berumur 17 hingga 22 hari baru menetas menjadi ngengat. Setelah ngengat berumur 11 hari maka bertelur pada dasar daun mentimun yang telah disiapkan pada botol kedua.

Umur telur yang telah menetas menjadi larva pada dasar daun berumur 3 hingga 4 hari, dengan ciri daun telah dimakan oleh larva dibagian bawah dan hanya menyisakan bagian atas. Untuk mendapatkan larva dengan instar III

ditunggu hingga 16 hari dengan ciri panjang larva 0,8-1,1 cm dan telah muncul dua garis putih diatas tubuhnya (lampiran 4. 6).

5. Uji *bioassay*

Uji *bioassay* dilakukan di dalam toples yang atasnya ditutupi jaring kelambu, perlakuan yang diujikan sebanyak 6 perlakuan dengan 3 ulangan sehingga jumlah unit percobaan adalah 18 unit. Larva ulat daun mentimun yang sehat diambil sebagai unit percobaan sebanyak 5 ekor, sehingga jumlah larva yang digunakan sebanyak 90 ekor larva ulat daun mentimun.

Larva ulat daun mentimun tidak diberi makan selama 24 jam setelah itu dilakukan uji pakan. Perlakuan A, B, dan C diinkubasi selama 24 jam menggunakan suhu ruangan, perlakuan D menggunakan *Bacillus thuringiensis* + Nutrient Cair 100 ml kemudian dilakukan pencelupan daun metimun muda selama 1 menit sebagai pakan larva, daun mentimun muda dikeringanginkan menggunakan kipas angin, lalu dimasukkan kedalam unit percobaan sesuai perlakuan dan ulangan. Cara aplikasi perlakuan E yakni dengan mengambil 20 g bioinsektisida perlakuan, kemudian ditaburkan dan dioleskan secukupnya hingga merata pada salah satu permukaan daun pakan kemudian diberikan pada larva uji (lampiran 4. 5).

Keberadaan pakan dimonitor setiap 6 jam sekali dilakuan penambahan pakan yang sudah diperlakukan saat pakan dalam unit pecobaan yang habis atau habis sebelum 6 jam berikutnya. Pengujian *bioassay* sehingga diketahui toksisitas terhadap larva ulat daun mentimun dengan parameter tingkat mortalitas, perubahan persentase populasi, dan hambatan makanan, dan perhitungan

kehilangan berat yang masing-masing toples diberi 5 ulat daun mentimun yang diberi makan daun mentimun muda. Ada juga ciri-ciri kematian larva antara lain: tidak bergerak saat disentuh, tubuh lunak, berwarna gelap hingga hitam, mengkerut, mengeluarkan cairan dan membusuk.

E. Parameter

a. Tahap satu :

1. Jumlah bakteri *Bacillus thuringiensis* (CFU/ml)

Parameter yang diamati adalah dengan menghitung jumlah bakteri dengan satuan *colony forming unit for milliliter* (CFU/ml) dengan metode *plate count*.

Jumlah koloni yang dihitung yakni yang memenuhi syarat:

- a. Jumlah koloni tiap cawan petri 30-300 koloni
- b. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri
- c. Perbandingan jumlah bakteri dari hasil pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran sebelumnya, jika sama atau lebih kecil dari 2 hasilnya dirata-rata, tetapi jika lebih besar dari 2 digunakan jumlah bakteri dari pengenceran sebelumnya (Soetarto *et al*, 2009 *cit* Wulandari, 2008)
- d. Tidak ada koloni yang memenuhi syarat maka tetap di hitung.

$$JB = JK \times \text{faktor pengenceran (Cappuccino dan Sherman, 1996)}$$

Keterangan : JB = jumlah bakteri (CFU/ml)
JK = jumlah bakteri tunggal

b. Tahap dua

1. Mortalitas (%)

Pengamatan mortalitas dilakukan dengan cara menghitung larva ulat daun mentimun yang mati setelah diaplikasikan perlakuan setiap hari 24 jam setelah aplikasi.

$$M = A/B \times 100 \% \text{ (Busvine, 1971)}$$

Keterangan : M = mortalitas (%)

A = jumlah larva yang mati

B = jumlah total larva setiap unit percobaan

2. Kecepatan kematian (ekor/hari)

Pengamatan dilakukan untuk mengetahui kecepatan mortalitas ulat daun mentimun. Setelah diaplikasikan dengan formulasi *B. Thuringiensis*, dengan menggunakan rumus (Suntoro, 1991):

$$V = \frac{T_1N_1 + T_2N_2 + T_3N_3 + \dots T_nN_n}{n}$$

Keterangan:

V= Kecepatan kematian

T= Waktu pengamatan

N= jumlah ulat yang mati

n= jumlah ulat yang diujikan

3. Efikasi (%)

Pengamatan dilakukan dengan membandingkan jumlah populasi hama sebelum dan sesudah diaplikasikan, yaitu dengan cara menghitung hama yang hidup dengan menggunakan perhitungan Henderson dan Tilton (Anonim, 1975)

$$\text{Efikasi} = 1 - \left(\frac{Ta}{Ca} \times \frac{Cb}{Tb} \right) \times 100\%$$

Keterangan :
 Tb : Jumlah larva yang hidup sebelum aplikasi
 Ta : Jumlah larva yang hidup setelah aplikasi
 Cb : Jumlah larva kontrol yang hidup sebelum aplikasi
 Ca : Jumlah larva kontrol yang hidup setelah aplikasi

4. Hambatan makan (%)

Hambatan makan dihitung berdasarkan persentase perbandingan antara berat pakan yang dimakan dalam perlakuan dengan berat pakan yang dimakan dalam kontrol, hambatan makan menyatakan besarnya hambatan aktivitas makan yang ditimbulkan bioinsektisida. (Alford dan Bentley, 1986)

$$FD = 1 - \left(\frac{\text{berat makanan yang dimakan dalam perlakuan}}{\text{berat makanan yang dimakan dalam Kontrol}} \right) \times 100 \%$$

Keterangan : FD = hambatan makan / *feeding dereten* (%)

5. Perhitungan kehilangan berat / *weight loss* (gram)

Dilakukan dengan melakukan selisih antara berat awal ulat dan berat akhir ulat terlihat pada rumus perhitungan kehilangan berat.

$$W = W_0 - W_A$$

W = Selisih berat (gram)
 W₀ = Berat sebelum uji (gram)
 W_A = Berat setelah uji (gram)

F. Analisis data

Data penelitian tahap 1 yakni jumlah bakteri dibuat grafik untuk analisisnya. Tahap 2 yakni mortalitas, kecepatan kematian, efikasi, dan hambatan makan dimasukkan dalam grafik dan tulisan, serta kehilangan berat dimasukkan

dalam tabel dan kecepatan kematian disajikan melalui tabel dengan pengujian menggunakan analisis sidik ragam (*analysis of variance*), apabila ada beda nyata dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf kesalahan 5 %.