

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 yaitu dimulai pada bulan 1 Juli 2017 – 2 Maret 2018.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun *Lantana camara*, *Bacillus thuringiensis*, ulat api, pelarut, limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS), air kelapa, gula merah.

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu gelas plastik, toples berdiameter 8cm, saringan, timbangan elektrik, blender, pisau, stiker label, alat tulis.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan metode eksperimental yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan rancangan percobaan faktor tunggal, yaitu formula media yang mengandung gula merah 5% + perbandingan bahan pembawa limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS) dan air kelapa pada formulasi Biopestisida *Bacillus thuringiensis* dan ekstrak *Lantana camara* sebagai berikut :

- A. LCPKS : air kelapa = 1 : 0
- B. LCPKS : air kelapa = 3 : 1
- C. LCPKS : air kelapa = 1 : 1
- D. LCPKS : air kelapa = 1 : 3
- E. LCPKS : air kelapa = 0 : 1

Setiap perlakuan diulang 5 kali ditambah 1 ulangan sebagai korban untuk digunakan pada *Plating*, sehingga ada 30 unit perlakuan. Setiap unit percobaan

di uji dengan 5 ekor ulat api sehingga total ada 150 ekor ulat api (*layout* pada Lampiran 1).

D. Cara Penelitian

1. Tahap pertama : Persiapan inokulum dan pembuatan formula LCPKS dan Air kelapa dengan *B. thuringiensis* + *L. camara*

a. Perbanyak inokulum *Bacillus thuringiensis*

Perbanyak inokulum *Bacillus thuringiensis* yaitu dengan memindahkan inokulum *Bacillus thuringiensis* ke dalam agar miring dan medium cair pada tabung reaksi kemudian diinkubasi pada temperatur yang sesuai selama 48 jam. Setelah diinkubasi isolat diuji kembali kemurniannya dengan mikroskopis bila di setiap tabung terdapat bakteri maka isolasi berhasil, koloni bakteri yang sudah murni selanjutnya dapat di perbanyak pada media cair di erlenmeyer dan *shaker* selama 48 jam baru Inokulum *Bacillus thuringiensis* sudah siap digunakan (Lampiran 2).

b. Karakterisasi dan uji virulensi *Bacillus thuringiensis* pada *Plutella xylostella*

Karakterisasi dilakukan dengan mengidentifikasi isolat *Bacillus thuringiensis* dengan melalui serangkaian test berupa identifikasi bentuk koloni dan uji cat gram, setelah dipastikan isolat merupakan isolat *B. thuringiensis*, isolat di uji dengan diaplikasikan pada *Plutella xylostella* dengan konsentrasi 50%, kemudian diamati selama 4 hari sehingga didapatkan tingkat mortalitasnya.

c. Pembuatan serbuk dari simplisia *L. camara*

Daun disortir untuk memisahkan daun dari batang yang masih tersisa (Lampiran 6 a). Daun hasil sortiran yang telah dibersihkan (Lampiran 6 b) kemudian dikeringanginkan hingga 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 ditentukan dengan cara diremas, maka

daun akan segera patah dan hancur, kemudian diblender hingga daun menjadi serbuk (Lampiran 6 d, e), (Emand Syapriawan Tolanamy dkk., 2017)

d. Pembuatan media fermentasi dengan berbagai perbandingan limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS) dan air kelapa

Pembuatan perbandingan media fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis* yakni dengan cara mengukur limbah cair pabrik kelapa sawit (LCPKS) dan air kelapa sesuai dengan perlakuan, kemudian ditambah molase 5% dan serbuk *Lantana camara* 10%. Kemudian dilanjutkan dengan memasukkan bahan ke dalam botol jam dan dilakukan sterilisasi (Lampiran 3).

e. Fermentasi *Lantana camara* dengan *Bacillus thuringiensis*

Lantana. camara yang sudah diblender dengan *B. thuringiensis* difermentasi selama 6 hari (Lampiran 8 a, b). Ekstrak kemudian disaring menggunakan kertas saring dan cairannya kemudian akan diuji efektivitasnya pada ulat api.

2. Tahapan kedua : Aplikasi *Bioassay* Larutan Formula LCPKS dan Air kelapa dengan *B. thuringiensis* + *L. camara* pada hama ulat api (*Setora nitens*)

a. Persiapan hama ulat api (*Setora nitens*)

Ulat api dipersiapkan sehari sebelum di laksanakan pengujian. Ulat api yang dipilih adalah ulat instar 2 atau 3 karena pada itu masih aktif mencari makan untuk keberlangsungan hidupnya.

b. Pengaplikasian cairan hasil fermentasi dari formulasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis* terhadap ulat api.

Persiapan 5 ekor ulat api yang sudah dilaparkan 24 jam, kemudian ditempatkan disetrap petridish. Menyiapkan makanannya berupa daun kelapa

sawit yang sudah dicelup dengan Biopestisida yaitu cairan hasil dari fermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis*, kemudian untuk dipakankan pada ulat api.

c. Pemeliharaan ulat api

Ulat api yang telah diaplikasikan tetap dijaga akan ketersediaan pakannya dan kebersihan wadah yang digunakan guna menghindari adanya faktor luar yang dapat membunuh ulat api itu sendiri.

d. Pengamatan ulat api

Pengamatan dilakukan setiap hari untuk mengetahui perkembangan ulat api yang sudah diberi sesuai perlakuan yaitu, jumlah ulat yang mati.

E. Parameter yang Diamati

1. Tahap pertama Perubahan Fisik Setelah Fermentasi *Bacillus thuringiensis* dengan *Lantana camara* dalam Media Alternatif

a. Suhu

Pengukuran suhu dilakukan pada hari ke-0 dan hari ke-6 menggunakan termometer.

b. pH

Pengukuran pH dilakukan pada hari ke-0 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. Perubahan Zat Padat Terlarut

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

Kemudian dihitung perubahannya dengan rumus

$$\text{Hasil TDS hari ke 0 (mula - mula) - hasil TDS hari ke 6 (akhir)}$$

f. Pertumbuhan koloni bakteri *Bacillus thuringiensis*

Menghitung pertumbuhan koloni bakteri dengan metode Total Plat Count. Lalu menghitung jumlah koloni dengan Colony counter.

Rumus yang digunakan untuk menentukan TPC :

$$\text{Jumlah sel} = \frac{\text{jumlah koloni cawan 1, 2, 3, ... dst} \times 1/fp}{\text{jumlah cawan}} \text{ cfu}$$

2. Tahap kedua : Uji Bioassay Larutan Formula LCPKS dan Air kelapa dengan *B. thuringiensis* + *L. camara* pada hama ulat api (*Setora nitens*)

Uji Toksisitas

1) Mortalitas (%)

Tingkat mortalitas dihitung menggunakan rumus :

$$M = a/b \times 100 \%$$

Keterangan :

M = Persentasi mortalitas serangga,

a = Jumlah serangga yang mati,

b = Jumlah serangga yang digunakan.

2) Kecepatan kematian (ekor/hari)

Waktu kematian Ulat api (*Setora nitens*) adalah jangka waktu yang dibutuhkan oleh pestisida sampai menimbulkan efek letal pada ulat api. Waktu kematian ulat api bervariasi dari ulat api satu dengan ulat api yang lain. Dengan demikian, pengamatan dilakukan terhadap rata-rata hari kematian ulat api dengan

mengamati jumlah ulat api yang mati. Kecepatan kematian setelah diaplikasi larutan garam dihitung dengan rumus :

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

Keterangan:

- V = Kecepatan kematian setelah aplikasi
 T = Waktu pengamatan pada waktu tertentu
 N = Jumlah hama ulat api yang mati pada waktu tertentu
 n = Jumlah hama ulat api dalam pengujian pada masing-masing ulangan

3) Tingkat efikasi (%)

Tingkat efikasi dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Tingkat Efikasi} = \left[1 - \frac{\text{Jumlah hidup akhir}}{\text{jumlah hidup kontrol}} \right] \times 100\%$$

Keterangan :

- Ta = Jumlah hama hidup pada petak perlakuan sesudah aplikasi
 Tb = Jumlah hama hidup pada petak perlakuan sebelum aplikasi
 Ca = Jumlah hama hidup pada petak kontrol sesudah aplikasi
 Cb = Jumlah hama hidup pada petak kontrol sebelum aplikasi.

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*). Hasil pengamatan dianalisis dengan Grafik.