

III. TATA LAKSANA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammdiyah Yogyakarta, Desa Tamantirto, Kecamatan Kasihan, Kabupaten Bantul, Provinsi DIY. Waktu penelitian dimulai pada bulan September 2017 sampai Januari 2018.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu ekstrasi *L. camara* cair mengandung *B. thuringiensis*, ekstrasi *L. camara* padat mengandung *B. thuringiensis*, Ulat api.

Alat yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu *petridish*, pipet, sendok, gelas plastik, toples berdiameter 10 cm dengan tinggi 5 cm, saringan santan, timbangan elektrik, kertas, blender, pisau, kertas label, alat tulis, *sprayer*.

C. Metode

Penelitian ini dilaksanakan dengan metode eksperimental yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan rancangan percobaan Faktor tunggal, yaitu padatan hasil fermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis* dengan perbandingan limbah cair kelapa sawit dan air kelapa yaitu:

- A. Padatan hasil fermentasi dengan LCPKS : air kelapa = 1 : 0
- B. Padatan hasil fermentasi dengan LCPKS : air kelapa = 1 : 3
- C. Padatan hasil fermentasi dengan LCPKS : air kelapa = 1 : 1
- D. Padatan hasil fermentasi dengan LCPKS : air kelapa = 3 : 1
- E. Padatan hasil fermentasi dengan LCPKS : air kelapa = 0 : 1

Terdapat 5 perlakuan dan satu kontrol, setiap perlakuan diulang 3 kali , sehingga ada 18 unit perlakuan, Setiap perlakuan terdiri dari 5 ulat, sehingga terdapat 90 ekor ulat. (*layout* pada lampiran 1).

D. Cara Kerja

Tahap 1: Identifikasi dan Karakterisasi *Bacillus thuringiensis*.

1. Identifikasi dan karakterisasi *Bacillus thuringiensis* dilakukan pada awal penelitian

Identifikasi dilakukan dengan cara *Cat gram* bakteri kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan tujuan mengetahui kebenaran dan kesesuaian karakterisasi *B. thuringiensis*. Identifikasi meliputi sifat koloni, bentuk sel dan aerobisitas. Kemudian dilanjutkan uji *Bioassay* terhadap *Plutella* sp. Cara pengaplikasian berupa sistemik, dimana pakan *Plutella* berupa bunga kol dicelupkan larutan *B. thuringiensis*. Hasil dari penelitian di lapang menunjukkan adanya variasi tetapi umumnya menyatakan hasil yang positif terhadap hama di lapang seperti *Plodia interpunctella*, *Spodoptera littoralis*, *Helicoverpa armigera*, *Lepidoptera decimlineata*, dan lain sebagainya (Dent, 1993).

2. Perbanyak inokulum *Bacillus thuringensis* untuk campuran ekstrak daun tembelean.

Perbanyak inokulum *Bacillus thuringensis* dilakukan dengan cara memindahkan inokulum yang telah diperoleh kedalam media agar miring dan media cair pada tabung reaksi, setelah itu inokulum yang telah dipindahkan diinkubasi selama 48 jam kemudian dilanjutkan dengan menguji kemurnian isolate dengan mikroskopik jika pada setiap tabung terdapat bakteri, maka isolate dinyatakan berhasil. Setelah menguji kemurniannya dilakukan

perbanyak pada media cair di erlenmayer dan di shaker selama 48 jam, sehingga inokulum *B. thuringiensis* sudah siap digunakan.

Tahap 2: Fermentasi *Bacillus thuringiensis* dalam Medium LCPKS dan air kelapa dengan *Lantana camara*

1. Pembuatan serbuk dari simplisia *Lantana camara*.

Pembuatan serbuk dari simplisia *L. camara* dilakukan dengan cara memisahkan daun dari batang yang masih tersisa (Lampiran 4 a – h). Daun yang telah bersih kemudian dikering anginkan 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).

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

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

3. 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. Ekstrak kemudian disaring menggunakan kertas saring dan padatnya dibuat serbuk, kemudian akan diuji efektifitasnya pada ulat api.

Tahap 3: Pembuatan *Wettable powder* hasil ekstraksi padatan dari fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis*

1. Pembuatan Formula

Pembuatan *Wettable powder* dilakukan pada akhir fermentasi. Hasil padatan fermentasi disaring menggunakan saringan santan dan ditiriskan selama 5 menit. Kemudian hasil padatan fermentasi di oven selama 4 hari dengan suhu 40° C.

Tahap 4: Pengujian *bioassay* hasil ekstraksi padatan dari fermentasi *Lantana camara* dan *Bacillus thuringiensis* pada Ulat Api

1. Persiapan hama ulat api

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. Persiapan 3 ekor ulat api yang sudah dilaparkan 24 jam, kemudian ditempatkan disetiap toples ukuran 15 cm.

2. Pengaplikasian padatan hasil fermentasi *Lantana camara* dengan *Bacillus thuringiensis* berupa *Wettable Powder* terhadap ulat api.

Menaburkan padatan hasil fermentasi dengan berbagai macam perbandingan ke daun kelapa sawit yang akan dijadikan pakan dari Ulat api.

3. Pemeliharaan ulat api

Pemeliharaan dengan memberi makan daun kelapa sawit sebelum dilakukan percobaan penelitian agar ulat tetap hidup sampai diberi perlakuan yang sudah disediakan.

4. Pengamatan ulat api.

Pengamatan dilakukan setiap hari untuk mengetahui perkembangan ulat api yang sudah diberi sesuai perlakuan yaitu, kematian ulat, susut bobot ulat, susut bobot makanan.

E. Parameter yang diamati

Tahap 1: Identifikasi dan Karakterisasi *Bacillus thuringiensis*

1. Karakterisasi Koloni dan Sel *Bacillus 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* (Lampiran 5 a-e).

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

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

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

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

a. Suhu

Pengukuran suhu dilakukan pada hari ke-0, ke-2, ke-4 dan hari ke-6 menggunakan thermometer.

b. pH

Pengukuran pH dilakukan pada hari ke-0, ke-2, 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. Kadar Air

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara mengoven padatan hasil fermentasi dengan suhu 40° C hingga berat padatan menjadi konstan.

f. Perubahan Total Zat Terlarut (TDS)

Pengukuran TDS dilakukan pada saat awal dan akhir fermentasi dengan menggunakan alat TDS meter.

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

Uji dinamika populasi *B. thuringiensis* dilakukan pada media Natrium Agar pada petridish yang ditentukan dengan cara menghitung koloni *B. 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 :
 - a. Jika ≤ 2 , hasil perhitungan dirata-rata.
 - b. Jika > 2 , dipakai pengenceran sebelumnya.

Tahap 3: Pengujian bioassay hasil ekstraksi padatan dari fermentasi *L. camara* dan *B. thuringiensis* pada ulat api

1. Tingkat mortalitas dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Tingkat Mortalitas} = \frac{(X_0 - X_1)}{X_0} \times 100\% \text{ (Fagoone dan Lauge, 1981 dalam Sinaga, 2009)}$$

Keterangan:

X_0 = Populasi hama sebelum aplikasi

X_1 = Populasi hama sesudah aplikasi

2. Kecepatan kematian (ekor/hari)

Pengamatan dilakukan dengan menghitung ulat api yang mati setiap hari setelah diberikan perlakuan. Mortalitas harian dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$M = a/b \times 100 \% \text{ (Martin et al. 1990)}$$

Keterangan: M = Persentasi mortalitas serangga, a= Jumlah serangga sebelum aplikasi, b = Jumlah serangga setelah aplikasi

3. Tingkat efikasi (%)

Tingkat efikasi dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Tingkat Efikasi} = \left[1 - \frac{Ta}{Ca} \times \frac{Tb}{Cb} \right] \times 100\% \text{ (Henderson \& Tilton, 1955)}$$

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*) pada taraf ketelitian 5%, bila ada beda nyata antar perlakuan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) pada taraf ketelitian 5%.