

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk ke dalam penelitian eksperimental. Penelitian dilakukan untuk melihat toksisitas NPP yang telah disintesis oleh bakteri entomopatogen *Bacillus thuringiensis*. Toksisitas tersebut dilihat dari mortalitas larva *Aedes aegypti* tahap instar III yang kemudian dari hasil mortalitas tersebut ditentukan LC50 menggunakan analisa probit.

3.2 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan uji toksisitas akut dengan perlakuan berupa NPP *Bacillus thuringiensis* yang dibuat dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Konsentrasi tersebut nantinya akan ditentukan mana yang lebih efektif dalam membunuh larva instar III *Aedes aegypti*. Kemudian, dilakukan penghitungan LC50 menggunakan probit analisis.

1. Variabel bebas : Konsentrasi NPP dalam membunuh 50% larva instar III *Ae. aegypti*.
2. Variabel terikat : Tingkat toksisitas NPP pada setiap konsentrasi.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian yaitu keseluruhan dari larva nyamuk *Aedes aegypti* yang telah dikembangbiakkan sampai fase instar III. Sampel yang digunakan yaitu larva instar III *Ae. aegypti*, pada masing-masing perlakuan berjumlah 10 ekor.

3.4 Instrumen Penelitian

3.4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada Bulan Maret 2021 sampai Mei 2021 yang berlokasi di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Selama melakukan penelitian, penulis melampirkan dokumentasi penelitian pada Lampiran 7.

3.4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan alat dan bahan didapatkan dari Laboratorium Riset Bioteknologi dan Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Pendidikan Biologi, FPMIPA UPI dan Balitsa yang secara lengkap terlampir pada Lampiran 1.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Alat dan Bahan

Setiap alat dan bahan yang akan digunakan dipersiapkan secara aseptik yaitu dengan tahapan seluruh alat dibersihkan terlebih dahulu dan bahan ditimbang atau diukur sesuai kebutuhan, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit (Istini, 2020).

3.5.2 Pemeliharaan Nyamuk *Aedes aegypti*

Telur *Aedes aegypti* yang didapatkan dari Laboratorium STIKES Jendral Achmad Yani dikembangbiakkan pada kertas saring yang disimpan didalam wadah berukuran 30 x 25 x 5 cm. Ketika telur yang dipelihara sudah muncul larva, kemudian kertas saring sebagai tempat menempelnya telur dipindahkan kedalam wadah berisi air sumur dengan ukuran 30 x 25 x 5 cm yang baru untuk melakukan perkembangbiakkan lebih lanjut. Larva dipelihara sampai memasuki fase instar III. Larva instar III dipilih kemudian barulah diberi perlakuan (Moehammadi, 2005). Penelitian ini menggunakan larva *Aedes aegypti* instar III karena larva instar ini cukup besar dan sudah memiliki organ-organ tubuh yang lengkap sehingga mudah diidentifikasi. Alasan pemilihan menggunakan larva instar III juga karena larva ini merupakan sampel penelitian yang menjadi standar dari WHO (Nurhaifah & Sukei, 2015).

3.5.3 Pembuatan Kultur Bakteri Entomopatogen

Isolat bakteri *B. thuringiensis* yang didapatkan dari Laboratorium Tani Mandiri Sekar Makmur dikultur kembali kedalam media NA. Sebanyak 1 ose isolat diinokulasikan ke dalam 16 ml media NA miring yang sudah mencair kemudian ditunggu hingga memadat, kultur diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 40°C (Manin *et al.*, 2012)

3.5.4 Karakterisasi Bakteri Entomopatogen

Ketika kultur bakteri *Bacillus thuringiensis* berhasil dibuat, selanjutnya dilakukan karakterisasi untuk mengetahui bahwa hasil kultur tersebut merupakan *B. thuringiensis*. Karakterisasi dilakukan dengan pewarnaan gram, pewarnaan endospora, dan uji *methyck red* (MR) sebagai berikut :

3.5.4.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram bertujuan untuk mengetahui apakah isolat merupakan *B. thuringiensis* yang diasumsikan bersifat gram positif. Sebanyak 1 ose isolat diambil, lalu digoreskan di atas kaca objek yang telah diberi akuades. Sebelum ditetesi sebanyak 2-3 tetes larutan kristal violet, preparat difiksasi di atas api bunsen, kemudian preparat didiamkan selama 1 menit, buanglah kelebihan warna pada preparat dengan aquades. Langkah selanjutnya yaitu preparat ditetesi larutan Gram's iodine sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan 1 menit, bilaslah kembali preparat dengan akuades untuk membuang kelebihan warna. Preparat didekolorisasi dengan menggunakan etil alkohol 95% ditetesi secara berlahan selama 20 detik, lalu dibilas kembali dengan akuades dan didiamkan hingga kering. Preparat ditetesi safranin kurang lebih 1 menit dan dibilas kembali dengan akuades, didiamkan hingga kering. Preparat ditutup dengan kaca penutup dan diberi tambahan minyak imersi sebanyak 1 tetes, diamati dengan mikroskop (Mafazah & Zulaika, 2017).

3.5.4.2 Pewarnaan Endospora

Bacillus thuringiensis diyakini mampu menghasilkan endospora berbentuk oval hingga silindris, terletak parasentral atau terminal (Muharsini *et al.*, 2003). Membuat apusan bakteri yaitu dengan mengambil sebanyak 1 ose isolat, lalu digoreskan di atas kaca objek yang telah diberi akuades. Sebelum ditetesi pewarna, preparat difiksasi di atas bunsen, selanjutnya preparat ditetesi *malachite green* hingga menutupi seluruh permukaan kaca objek pada bagian atas yang telah tertutupi kertas saring, sambil dipanaskan selama 3-4 menit di atas api bunsen dengan bantuan penangas kasa. Kertas saring pada preparat dibuang dan dibilas dengan akuades. Tahapan akhir yaitu preparat diwarnai dengan safranin \pm 1 menit dan dibilas kembali dengan akuades. Preparat ditutup

dengan kaca penutup dan diberi tambahan minyak imersi sebanyak 1 tetes, diamati dengan mikroskop (Mafazah & Zulaika, 2017).

3.5.4.3 Uji *Methyl Red* (MR)

Uji *Methyl Red* (MR) dirancang untuk menguji kemampuan organisme untuk menghasilkan dan mempertahankan produk akhir asam yang stabil dari fermentasi glukosa (Rahayu & Gumilar, 2017). *Bacillus thuringiensis* diyakini dapat menghasilkan metilen glikon (asam campuran) dari glukosa yang terkandung dalam media MR (Adriani, 2011). Inokulasi bakteri pada ke dalam 2 kaldu glukosa dengan jarum inokulasi, inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Ketika inkubasi selesai tambahkan 5 tetes metil red. Warna merah menunjukkan hasil positif (Sapitri & Afrinasari, 2019).

3.5.5 Pembuatan Ekstrak Kultur Bakteri Entomopatogen

Pembuatan ekstrak bakteri entomopatogen dilakukan dengan pengkulturan. Bakteri *Bacillus thuringiensis* dikultur kembali pada medium *Nutrient Broth* (NB) menggunakan botol kaca 250 ml. Bakteri *Bacillus thuringiensis* yang telah dilakukan pengkulturan kembali, dilakukan pengenceran bertingkat untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 10^8 , bakteri diinkubasi pada suhu 37°C dan 100 rpm, kemudian setelah 24 jam inkubasi disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit untuk memperoleh supernatan (Alsamhary, 2020).

3.5.6 Pensintesisan NPP

Ekstrak bakteri *Bacillus thuringiensis* entomopatogen diambil 50 ml dan dicampur dengan variasi larutan perak nitrat 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm sebanyak 50 ml, variasi konsentrasi tersebut didapatkan dari pengenceran larutan induk larutan perak nitrat 60 ppm. Perhitungan variasi larutan terlampir pada lampiran 5. Campuran larutan perak nitrat dengan ekstrak bakteri *Bacillus thuringiensis* entomopatogen diinkubasi dengan menggunakan *rotary shaker* (200 rpm) pada kondisi gelap selama 5 hari. Sintesis ekstraseluler AgNPs awalnya dideteksi dengan perubahan warna media kultur dari kuning muda bening menjadi coklat / hijau. AgNP ekstraseluler dipisahkan dari sel bakteri dengan disentrifugasi kembali pada 6000 rpm selama 20 menit (Alhussain *et al.*, 2017).

3.5.7 Pengukuran Spektrum UV-Vis

Pada penelitian ini pengukuran spektrum UV-Vis dengan menggunakan spektrofotometer genesys 10s bertujuan untuk mengetahui hubungan nilai absorbansi dengan nilai konsentrasi nanopartikel yang telah berhasil disintesis menggunakan *Bacillus thuringiensis*. Pengukuran ini berdasarkan hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa absorbansi cahaya sebanding dengan konsentrasi dari zat yang diukur, kemudian akan membentuk suatu garis linear (Junaidi, 2010). Pengukuran diawali dengan menyalakan spektrofotometer genesys 10s, tunggu selama 20 menit sampai alat siap untuk digunakan, setelah itu panjang gelombang 190-900nm dicantumkan, blanko dimasukkan terlebih dahulu dengan mengisi kuvet menggunakan aquades, barulah konsentrasi NPP-*B. thuringiensis* yaitu 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm dimasukkan, tunggu sampai alat berbunyi “bip” maka nilai absorbansi akan muncul.

3.5.8 Uji Toksisitas Akut (*Bioassay*)

Untuk melakukan uji toksisitas, terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan dengan menggunakan metode *range finding test* sebagai penentu dosis konsentrasi, pada uji utama. *Range Finding Test* bertujuan untuk mencari kisaran tertentu yang menyebabkan kematian hewan uji 50% (Caroline *et al.*, 2019). Pada uji pendahuluan digunakan konsentrasi NPP-*B. thuringiensis* 0, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm dengan 5 kali pengulangan. Dengan konsentrasi *Bacillus thuringiensis* 10^8 CFU.mL⁻¹ serta berdasarkan keamanan NPP dalam sebuah studi, menunjukkan bahwa 25 ppm AgNPs adalah dosis paling toksik (Budama-Kilinc *et al.*, 2018).

Pengujian dilakukan dengan menggunakan botol vial 10 ml, kemudian 10 ekor larva instar III *Aedes aegypti* dimasukan kedalam botol vial dan diamati sampai 72 jam. Setiap pengamatan diukur faktor abiotik yaitu suhu dan pH air. Hasil perhitungan kematian biota uji diperoleh dari hasil perkalian rasio dengan 100 % untuk tiap konsentrasi (Caroline *et al.*, 2019).

$$\text{Presentase kematian} = \frac{\text{Jumlah biota mati}}{\text{Jumlah biota total awal}} \times 100\%$$

Ketika presentase kematian pada uji pendahuluan telah diketahui, kemudian konsentrasi pada uji utama (*definitive test*) ditentukan.

3.5.9 Pengamatan Kematian Larva Nyamuk *Aedes aegypti*

Setiap kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* didokumentasikan menggunakan kamera. Kematian larva ditandai dengan larva yang tidak bergerak lagi dan larva terlihat mengapung ke permukaan air bila disentuh dengan menggunakan spatula (Ilham & Atika, 1991). Selanjutnya, larva yang mati pada setiap konsentrasi dianalisis menggunakan mikroskop.

3.5.10 Analisis Data

Data yang dihasilkan dari uji toksisitas akut dianalisis menggunakan analisa probit untuk melihat LC50 setelah perlakuan selama 72 jam. Nilai LC50-72 jam diperoleh dengan analisa probit menggunakan Microsoft Excel 2013 dan dilengkapi dengan 95% selang kepercayaan (*confidence interval*) dan 95% limit kepercayaan (*confidence limits*) menggunakan SPSS versi 23. Analisa probit umumnya digunakan dalam toksikologi untuk menentukan toksisitas relatif bahan kimia terhadap organisme hidup. Hal tersebut dilakukan dengan menguji respons suatu organisme di bawah berbagai konsentrasi dari masing-masing bahan kimia dan kemudian membandingkan konsentrasi untuk menemukan respons (Finney & Stevens, 1948). Data mortalitas yang dihasilkan pada uji utama menjadi angka acuan untuk menghitung nilai LC50-72 jam dengan analisa probit. Hubungan antara nilai logaritma dari konsentrasi bahan uji dengan nilai probit dari persentase mortalitas hewan uji merupakan fungsi linier dari $y = ax + b$ (Arfiati *et al.*, 2019).

