

III. METODOLOGI

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikologi dan *Growth Chamber*, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, mulai bulan Desember 2011 sampai Mei 2012.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri kaca dengan diameter 9 cm dan tinggi 1,5 cm, jarum ose, pinset, *cork borer*, bunsen, *autoclave*, kuas nomor 1, gelas objek, gelas penutup, *beaker glass*, mikroskop cahaya, *Laminar Flow Cabinet*, *haemocytometer*, *handcounter*, *handsprayer*, tabung reaksi, gelas ukur 10 ml, gelas plastik dengan diameter 4,5 cm tinggi 5 cm, toples plastik dengan diameter 20 cm tinggi 19 cm, pipet tetes, gunting, pisau potong, penggaris.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat jamur entomopatogen *B. bassiana* koleksi Laboratorium Toksikologi, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, alkohol 70%, Tween 80% sebagai perata, aquades, spiritus, media PDA (*potato dextrose agar*), alumunium foil, plastik *wrapping*, larva *Spodoptera litura* instar 2, daun jarak kepyar (*Ricinus communis*) sebagai pakan larva *S. litura*, daun jarak kepyar diperoleh dari daerah Soekarno-Hatta, kain kasa, kertas tisu dan kertas label.

Metode Penelitian

Perbanyakkan *S. litura*

Larva atau kelompok telur *S. litura* yang digunakan sebagai perbanyakkan diperoleh dari lapang. Larva *S. litura* yang digunakan dalam percobaan adalah larva instar dua. Larva atau kelompok telur *S. litura* dipelihara di toples plastik dan diberi pakan daun jarak kepyar yang masih segar. Larva yang akan membentuk pupa ditempatkan tersendiri pada toples plastik dengan memberi lapisan tanah setebal 1,5 cm sebagai tempat berpupa. Setelah pupa menjadi imago

ditempatkan dalam toples plastik lain dan diberi pakan larutan madu 10% yang diletakkan dibagian penutup toples. Sebagai tempat bertelur imago betina, di dalam dinding toples digantung kain kasa. Telur-telur yang dihasilkan dipindah ke toples tersendiri dan dipelihara sampai menjadi imago dan seterusnya seperti prosedur di atas sampai populasi larva cukup dan siap digunakan untuk percobaan.

Pembuatan Media PDA

Media PDA dibuat dengan cara: 200 gram kentang dikupas, dicuci bersih kemudian dipotong kecil dan direbus dalam 1 liter aquades sampai lunak. Kemudian disaring untuk memisahkan air dengan kentang. Air hasil saringan diukur hingga 1 liter kemudian ditambahkan 20 gram agar dan 20 gram *dextrose*, lalu direbus kembali sampai mendidih. Setelah itu, larutan tersebut disaring kembali dan dituangkan pada botol untuk disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit pada temperature 121°C dengan tekanan 1 atmosfer (atm).

Perbanyak *B. bassiana*

Perbanyak *B. bassiana* dilakukan dengan tujuan mendapatkan bahan penelitian dan mendapatkan umur jamur yang tidak terlalu tua. Inokulum *B. bassiana* diperbanyak dengan ditumbuhkan di media PDA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 21 hari. Pemindahan jamur ini dilakukan di dalam *Laminar Flow Cabinet* untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Jika terjadi kontaminasi, maka dilakukan pemurnian kembali dengan mengambil bagian jamur *B. bassiana* yang tidak terkontaminasi untuk ditumbuhkan pada media PDA, sampai didapatkan jamur *B. bassiana* yang tidak terkontaminasi pada media PDA.

Uji Virulensi Isolat *B. bassiana* sebagai Bahan Percobaan pada *S. litura*

Tujuan uji virulensi untuk mengetahui kerapatan jamur *B. bassiana* yang dapat mengakibatkan kematian pada larva *S. litura*. Kerapatan yang digunakan untuk uji patogenisitas adalah 0 (sebagai kontrol), 10^6 , 10^7 dan 10^8 konidia/ml dan diulang tiga kali. Setiap perlakuan digunakan 10 larva *S. litura*.

Metode yang digunakan untuk menginfeksi konidia jamur *B. bassiana* pada larva *S. litura* adalah dengan metode celup, yaitu larva *S. litura* dicelupkan dalam suspensi konidia jamur *B. bassiana* selama 5 detik dan dikeringanginkan. Sebagai perlakuan kontrol menggunakan aquades, larva *S. litura* dicelupkan dalam aquades. Kemudian setiap gelas plastik diisi oleh 5 ekor larva *S. litura* hingga 10 ekor larva, dan diberi pakan daun jarak kepyar yang masih segar. Pakan daun jarak kepyar diganti 24 jam sekali. Pengamatan kematian larva akibat terinfeksi *B. bassiana* dilakukan setiap hari selama 24 jam sekali setelah perlakuan hingga larva menjadi pupa. Persentase larva yang mati dan larva yang menjadi pupa dicatat. Larva yang mati akibat terinfeksi jamur dipindah ke cawan petri yang sudah dialasi tisu yang dibasahi untuk menjaga kelembaban dan untuk memungkinkan jamur untuk sporulasi (Thungrabeab dan Tongma, 2007). Hasil uji virulensi disajikan pada tabel lampiran 1.

Pembuatan Suspensi Konidia *B. bassiana*

Untuk keperluan aplikasi digunakan biakan jamur *B. bassiana* dari media PDA hasil perbanyakan. Biakkan jamur *B. bassiana* yang telah berumur tiga sampai empat minggu, dicampur dengan 10 ml aquades steril. Kemudian ditambahkan 0,1 % Tween 80 dan dilakukan pengadukan sehingga konidia terlepas dari media. Untuk membantu memudahkan perhitungan kerapatan konidia digunakan haemocytometer. Suspensi konidia *B. bassiana* 1 ml diambil dengan pipet tetes steril lalu diteteskan pada bagian kotak perhitungan haemocytometer dan ditutup dengan gelas penutup. Dengan cara tersebut dibuat suspensi dengan kerapatan untuk diujikan sebesar 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 konidia/ml. Perhitungan kerapatan menggunakan rumus (Hadioetomo, 1993) sebagai berikut:

$$K = \frac{t \times d}{n \times 0,25} \times 10^6$$

yang K adalah kerapatan konidia (konidia/ml), t adalah konidia dalam jumlah kotak sampel, d adalah faktor pengenceran, n adalah jumlah sampel yang diamati dan 0,25 adalah faktor koreksi.

Uji Patogenisitas *B. bassiana* pada *S. litura*

Rancangan percobaan yang digunakan untuk uji petogenisitas ini yaitu rancangan acak lengkap yang diulang tiga kali, dengan menggunakan perlakuan kerapatan *B. bassiana* yaitu: 0 (sebagai kontrol), 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 konidia/ml (Denah Percobaan disajikan pada Gambar 1). Setiap kerapatan menggunakan 20 ekor larva. Inokulasi ke larva menggunakan metode celup, larva *S. litura* dimasukkan ke dalam suspensi konidia *B. bassiana* selama 5 detik dan dikeringanginkan. Kemudian setiap gelas plastik diisi oleh 5 ekor larva *S. litura* hingga 20 ekor larva, dan diberi pakan daun jarak kepyar yang masih segar (Gambar 2). Sebagai perlakuan kontrol menggunakan aquades, larva *S. litura* dicelupkan dalam aquades. Pengamatan kematian larva akibat terinfeksi *B. bassiana* dilakukan setiap hari selama 24 jam sekali setelah perlakuan hingga larva menjadi pupa. Persentase larva yang mati dan larva yang menjadi pupa dicatat. Persentase kematian dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

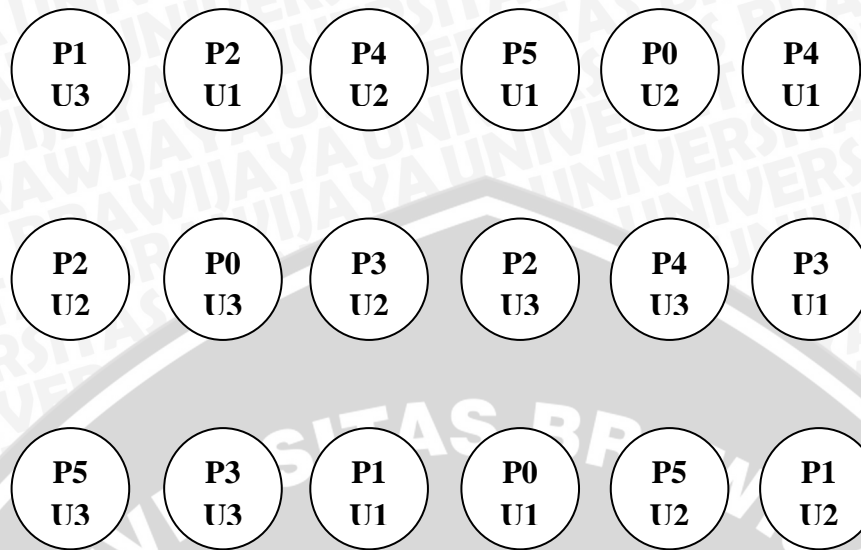
$$P = \frac{X}{Y} \times 100 \%$$

yang P adalah persentase kematian larva *S. litura*, X adalah jumlah larva *S. litura* yang mati, Y adalah jumlah larva *S. litura* yang diuji.

Jika pada kontrol terjadi kematian kurang dari 20%, maka Persentase kematian *S. litura* dihitung dengan rumus (Abbot dalam Busvine, 1971) sebagai berikut:

$$P_t = \frac{P_o - P_c}{100 - P_c} \times 100\%$$

yang P_t adalah persentase kematian larva *S. litura* yang telah dikoreksi, P_o adalah persentase kematian larva *S. litura* pada perlakuan, P_c adalah persentase kematian larva *S. litura* pada kontrol.



Keterangan: P0 : Kontrol (Aquades), P1 : Kerapatan *B. bassiana* 10^5 konidia/ml, P2 : Kerapatan *B. bassiana* 10^6 konidia/ml, P3 : Kerapatan *B. bassiana* 10^7 konidia/ml, P4 : Kerapatan *B. bassiana* 10^8 konidia/ml, P5 : Kerapatan *B. bassiana* 10^9 konidia/ml.
U1: Ulangan 1, U2: Ulangan 2, U3: Ulangan 3

Gambar 1. Denah Percobaan Uji Patogenisitas Jamur *B. bassiana* pada Larva *S. litura*.



Gambar 2. Gelas Plastik yang Digunakan untuk Uji Patogenisitas Jamur *B. bassiana* pada Larva *S. litura*.

Analisis Data

Data persentase kematian larva *S. litura* akibat infeksi *B. bassiana* dan data persentase menjadi pupa yang diperoleh kemudian dianalisis dengan sidik ragam dan Uji F taraf 5 %. Apabila hasil sidik ragam menunjukkan pengaruh yang nyata pada perlakuan maka dilakukan uji lanjutan dengan Uji Duncan dengan taraf 5 %. Data Persentase kematian larva *S. litura* akibat infeksi *B. bassiana* dan data persentase menjadi pupa ditransformasi menggunakan arcsin \sqrt{x} karena sebaran data 0 – 100 % dan data menggunakan persentase. Untuk menentukan *Median Lethal Time* (LT_{50}) dari perlakuan konidi jamur *B. bassiana* pada larva *S. litura* digunakan aplikasi analisis probit menurut Hsin Chi (1997).

