

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hama Tumbuhan sub Laboratorium Pengembangan Agens Hayati Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Mei sampai dengan bulan Juli 2014.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan, jarum ose, pipet tetes, autoclave, pinset, gelas objek, gelas penutup, beaker glass, mikroskop cahaya, haemocytometer, handcounter, alumunium foil, aerator, selang plastik, tabung reaksi, toples plastik, penggaris, timbangan analitik, kamera digital.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat jamur entomopatogen *M. anisopliae*, kentang, dextrose, gula, klorom fenicol, alkohol 70%, KMnO₄, kapas, aquades, alumunium foil, larva *L. stigma*, bibit jagung, tissue, tanah, kertas label.

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Penyediaan *L. stigma*

Uret *L. stigma* yang dikoleksi diperoleh dari lahan tegal yang ditanami beberapa komoditas seperti nanas, pepaya, cabai, dan singkong di Desa Bakung Kecamatan Udanawu Kabupaten Blitar dan Desa Purwodadi Kecamatan Ringinrejo Kabupaten Kediri. Uret *L. stigma* di pelihara di laboratorium dengan meletakkan pada media tanah steril di dalam toples plastik (9 x 9 x 7 cm) secara individu. Sterilisasi tanah dengan cara mengukus tanah agar tanah steril dari mikroorganisme. Untuk menjaga kelembaban media disemprotkan air secukupnya. Pemeliharaan uret secara individu membutuhkan tanah 500 ml dan air 10 ml (Harjaka *et al*, 2011). Sedangkan untuk pakan uret diberikan bibit jagung. Sebelum aplikasi dilakukan media tanah yang lama diganti dengan tanah steril yang baru. Untuk mengetahui perbedaan instar 2 dan instar 3 dengan cara mengukur lingkaran kepala uret *L. stigma*. Instar 2 *L. stigma* lingkaran kepala 0,5 – 0,7 cm, panjang tubuh 3 - 5 cm, dan lebar 0,5 – 1 cm. Instar 3 *L. stigma* lingkaran kepala 0,8 – 1 cm, panjang tubuh 6-7 cm, dan lebar 1 – 1,5 cm.

3.3.2 Perbanyakkan Jamur Entomopatogen *M. anisopliae*

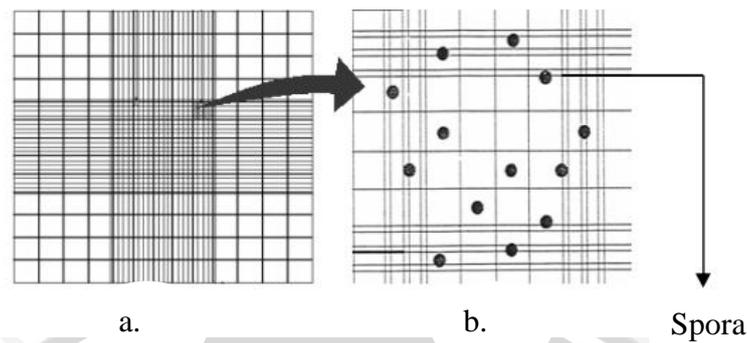
Isolat jamur *M. anisopliae* yang diperoleh dari Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan (BBP2TP) Surabaya yang merupakan isolat dari *Oryctes rhinoceros* yang dikembangkan pada media PDA selanjutnya diperbanyak dengan menggunakan media EKG. Pembuatan media EKG dilakukan dengan mengupas dan memotong kentang berbentuk dadu (1 x 1 x 1 cm). Kentang 250 gram yang sudah dipotong dimasukkan ke dalam beaker glass yang berisi aquadest 1 liter dan dimasak selama 20 menit. Kentang disaring dan diambil ekstraknya kemudian ditambahkan gula sebanyak 20 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Bahan-bahan yang telah dimasukkan ke dalam erlenmeyer diaduk sampai homogen. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan alumunium foil. Media EKG disterilkan dalam autoklaf 121⁰C dengan tekanan 1 atm selama 30 menit kemudian didinginkan. Setelah dingin, isolat *M. anisopliae* pada media PDA diambil sebanyak 1 gram dengan menggunakan jarum ose. Kemudian difermentor selama 5 hari.

3.3.3 Pembuatan Suspensi Spora *M. anisopliae*

Suspensi jamur *M. anisopliae* yang telah dipanen dari media EKG kemudian dilakukan perhitungan spora dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Gabriel dan Riyatno, 1989 ; Sudiby, 1994) :

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

C adalah kerapatan konidia (konidia/ml), **t** adalah konidia dalam jumlah kotak sampel, **n** adalah jumlah sampel yang diamati, dan **0,25** merupakan faktor koreksi.



Gambar 1. Haemocytometer (Caprette, 2006)

- a. Kamar hitung pada haemositometer.
- b. Satu buah kamar hitung pada haemocytometer.

Kemudian dilakukan standarisasi agar suspensi spora *M. anisopliae* memiliki konsentrasi 1×10^{10} (konsentrasi tinggi) spora/ml. Larutan ini disebut sebagai larutan stok yang digunakan pada seluruh penelitian. Sedangkan tingkat konsentrasi lain yang digunakan dalam penelitian yaitu 10^8 spora/ml (konsentrasi rendah) dan 10^9 spora/ml (konsentrasi sedang). Maka untuk memperoleh dengan cara mengencerkan larutan stok dengan menggunakan rumus:

$$V1.N1 = V2.N2$$

V1 adalah volume larutan stok (ml), **N1** adalah konsentrasi larutan stok (spora/ml), **V2** adalah volume larutan yang diharapkan (ml) dan **N2** adalah konsentrasi larutan yang diharapkan (spora/ml).

3.4 Uji patogenesis *M. anisopliae*

Pada penelitian percobaan disusun dengan menggunakan RAK (Rancangan Acak Kelompok) faktorial, faktor pertama adalah konsentrasi 10^8 (M_1), 10^9 (M_2), 10^{10} (M_3), dan 10^0 (M_0) dan faktor kedua adalah instar 2 (I_2) dan instar 3 (I_3) yang diulang sebanyak 3 kali ulangan :

Tabel 1. Daftar Perlakuan Uji Patogenesitas Jamur *M. anisopliae* Terhadap *L. stigma*

No.	Perlakuan
1.	M ₁ I ₂
2.	M ₂ I ₂
3.	M ₃ I ₂
4.	M ₁ I ₃
5.	M ₂ I ₃
6.	M ₃ I ₃
7.	M ₀ I ₂
8.	M ₀ I ₃

Keterangan:

- M₁I₂ : perlakuan instar 2 pada konsentrasi 10⁸ konidia/ml.
M₂I₂ : perlakuan instar 2 pada konsentrasi 10⁹ konidia/ml.
M₃I₂ : perlakuan instar 2 pada konsentrasi 10¹⁰ konidia/ml.
M₁I₃ : perlakuan instar 3 pada konsentrasi 10⁸ konidia/ml.
M₂I₃ : perlakuan instar 3 pada konsentrasi 10⁹ konidia/ml.
M₃I₃ : perlakuan instar 3 pada konsentrasi 10¹⁰ konidia/ml.
M₀I₂ : perlakuan instar 2 pada konsentrasi 10⁰ konidia/ml.
M₀I₃ : perlakuan instar 3 pada konsentrasi 10⁰ konidia/ml.

Gambar 2. Infeksi larva *L. stigma* metode celup ke dalam suspensi jamur *M. anisopliae*

Pada setiap perlakuan menggunakan 20 uret. Inokulasi yang dilakukan menggunakan metode celup (Gambar 4) dengan cara mencelupkan *L. stigma* satu per satu ke dalam suspensi jamur *M. anisopliae* selama 10 detik. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam aplikasi hingga hari ke-10. Parameter yang diamati meliputi mortalitas dan waktu kematian. Mortalitas merupakan parameter pengukuran terhadap banyaknya larva *L. stigma* yang mati dan mengetahui

efektifitas akibat infeksi dari jamur *M. anisopliae*. Dari hasil pengamatan persentase kematian dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$M = \frac{n}{N} \times 100 \%$$

M adalah persentase serangan mati, **n** adalah jumlah serangga mati, dan **N** jumlah serangga uji.

Apabila ada kematian pada kontrol (kurang dari 20 %) maka menurut Matsumura (1975) persen kematian perlu dikoreksi dengan menggunakan rumus Abbott's sebagai berikut:

$$P = \frac{x - y}{x} \times 100 \%$$

P adalah persentase kematian terkoreksi, **x** adalah persentase kontrol yang hidup, **y** adalah persentase larva yang hidup pada perlakuan.

3.5 Analisis data

Dari hasil penelitian data persentase kematian uret *L. stigma* akibat infeksi jamur *M. anisopliae* yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam dan uji F taraf 5% dengan bantuan aplikasi Genstat (versi 16). Dari hasil sidik ragam apabila menunjukkan pengaruh yang nyata pada perlakuan maka dilakukan uji lanjutan dengan Uji Duncan dengan taraf 5%. Sedangkan untuk menentukan *Median Lethal Time* (LT₅₀) dan *Median Lethal Concentration* (LC₅₀) dari perlakuan konidia jamur *M. anisopliae* yang diinfeksi pada *L. stigma* digunakan aplikasi analisis probit menurut Hsin Chi (1997).