III. METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan 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 2014 sampai dengan bulan Agustus 2014.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah, hand counter, kompor listrik, pisau, panci, botol, autoklaf, timbangan digital, pisau, erlenmeyer,gelas ukur, cawan petri, spatula, kaca penutup, kaca preparat, bor gabus,pinset, botol alkohol, pembakar spiritus, mikroskop, sangkar jangkrik, hands sprayer, erlenmeyer, Lamina Air Flow Cabinet (LAFC), pipet tetes, mikropipet, kamera digital, dan alat fermentor (selang plastik, botol cokelat 300 ml, sedotan, karet penutup, erlenmeyer, aerator).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Mikroorganisme yang digunakan adalah *Beauveria bassiana* dari koleksi Laboratorium Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang, alkohol 70%, akuades, spiritus, kapas, media Ekstrak Kentang Gula, tepung jangkrik, nimfa jangkrik (*Gryllus* sp.), sawi (caisin) sebagai pakan nimfa *Gryllus* sp., kertas label, aluminium foil, plastik wrapping, $KMnO_4$, dan kapas filter.

3.3 Metode Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan untuk uji patogenisitas ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Metode aplikasi yang digunakan yaitu metode kontak langsung dan metode umpan pakan. Masing-masing metode menggunakan perlakuan tingkat konsentrasi *B. bassiana* yang berbeda. Setiap perlakuan dari masing-masing metode diulang (U) sebanyak tiga kali, sehingga jumlah keseluruhan satuan percobaan adalah 15 plot percobaan untuk setiap metode perlakuan. Setiap perlakuan menggunakan 20 ekor nimfa jangkrik. Jumlah keseluruhan serangga uji pada dua metode yang berbeda adalah 600 ekor.

Faktor perlakuan yang diujikan adalah konsentrasi spora *B. bassiana*, sebagai berikut:

B0 : Kontrol (akuades)

B1 : *B. bassiana* 10^4 konidia/ml

B2 : *B. bassiana* 10^6konidia/ml

B3 : *B. bassiana* 10^8 konidia/ml

B4 : *B. bassiana* 10^{10} konidia/ml

3.4 Persiapan Penelitian

Penyediaan Serangga Uji *Gryllus* sp.

Nimfa *Gryllus* sp. yang digunakan diperoleh dari peternak jangkrik. Pemilihan jangkrik sebagai serangga uji karena untuk memudahkan dalam penyediaan serangga uji yang dapat mewakili genus Gryllidae. Nimfa yang berumur sama (25-30 hari) sebelum diperlakukan dipelihara didalam sangkar jangkrik dan diberi pakan sawi (caisin) yang telah dicuci dengan akuades dan telah dikeringanginkan.

Pembuatan Media Potato Dextrose Agar (PDA)

Kentang yang telah dicuci bersih, diiris kemudian ditimbang seberat 250 g dan direbus hingga lunak lalu disaring. Air rebusan kentang dituangkan ke dalam gelas ukur berukuran 1 liter, kemudian ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 1 liter. Air hasil rendaman kemudian dididihkan kembali dan ditambahkan 20 g agar-agar, 20 g dextrose ,dan tepung jangkrik 1% (37 gram) dididihkan kembali sambil diaduk hingga merata, kemudian larutan tersebut disaring kembali dengan kain kasa lalu dituangkan ke dalam botol Scott. Media PDA kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu 121^0 C selama 20 menit.

Jamur entomopatogen yang digunakan adalah jamur *B. Bassiana* isolat dari *Riptortus linearis* koleksi Laboratorium Jurusan Hama dan Penyakit Tanaman Fakultas Pertanian. Biakan jamur tersebut kemudian diperbanyak pada media PDA. Isolat jamur yang tersedia dalam bentuk suspensi tersebut diremajakan pada media PDA dengan metode tuang. Metode tuang merupakan cara perbanyakan jamur dengan meneteskan 100 µl suspensi jamur pada media

PDA yang belum memadat, lalu digoyang-goyangkan perlahan dan dibiarkan memadat. Koloni yang berkembang akan tertanam di dalam media tersebut (Stanier*et al*, 1982). Setelah itu diinkubasi selama 7 hari pada suhu 25^0 C hingga petridish penuh dengan spora.

Identifikasi. Identifikasi bertujuan untuk memastikan spesies jamur entomopatogen yang menyebabkan kematian pada *Gryllus* sp. adalah jamur *B. bassiana*. Identifikasi dilakukan dengan mengambil sedikit bagian isolat yang telah dipurifikasi dengan menggunakan jarum ose, kemudian diletakkan di atas gelas objek yang telah ditetesi media yang telah dicairkan. Setelah gelas objek ditutup dengan gelas penutup, kemudian diinkubasi selama 2 hari pada kondisi yang lembab. Identifikasi dilakukan berdasarkan pada morfologi konidia, hifa, konidiofor dan warna koloni menggunakan mikroskop. Kunci identifikasi cendawan yang digunakan adalah Barnett dan Hunter (1972). Isolat Cendawan yang sudah diidentifikasi, diperbanyak dengan media cair.

Pembuatan Media Ekstrak Kentang Gula (EKG)

Media EKG dibuat dengan menggunakan ekstrak kentang 250 gram kentang dicuci bersih kemudian dipotong kecil-kecil dengan ukuran (1x1x1 cm) dan direbus dalam akuades 1000 ml sampai lunak selama 20 menit. Kentang disaring untuk diambil ekstraknya. Air hasil saringan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan akuades hingga 1000 ml kemudian ditambahkan 20 gram gula, lalu dididihkan kembali hingga homogen. Erlenmeyer kemudian disumbat dengan kapas dan ditutup kertas aluminium foil untuk disterilkan dalam autoclave selama 30 menit pada temperatur 121^{o}C dengan tekanan 1 atmosfir (atm).

Perbanyakan Jamur *B. Bassiana* pada Media EKG

Persiapan Alat Fermentor

Peralatan yang akan dirangkai menjadi alat fermentor, terlebih dahulu disterilkan. Peralatan yang berbahan kaca seperti botol cokelat dan erlemeyer di sterilkan menggunakan autoclave, sedangkan peralatan seperi sedotan, selang plastik, karet penutup dan penutup botol disterilkan dengan cara direndam pada air panas selama 3 menit. Perangakaian alat fermentor dilakukan dengan

menyambungkan selang plastik antar peralatan dari aerator disambungkan berurutan ke larutan $KMnO_4$, fiberglass, media EKG yang telah diinokulasi *B. bassiana*, dan akuades sebagai indikator.

Perbanyakan Jamur *B. bassiana*

Perbanyakan jamur *B. bassiana* pada media cair dengan bantuan alat fermentor sederhana bertujuan untuk memperoleh suspensi jamur *B. bassiana* sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan yaitu 500 ml. Perbanyakan jamur dengan alat bantu fermentor ini merupakan cara yang umumnya dilakukan oleh para petani di lapang, maka pada penelitian ini teknik perbanyakan jamur disesuaikan dengan keadaan di lapang pada umumnya. Perbanyakan jamur diperoleh dengan cara membiakkan spora *B. bassiana* isolat *Riptortus linearis* koleksi Laboratorium Jurusan Hama dan Penyakit Tanaman Fakultas Pertanian, yang telah dipurifikasi pada media PDA dengan pengayaan media tepung jangkrik 1%. Spora hasil biakan murni diambil menggunakan cork borrer setiap 100 ml diberikan 1 plong spora. Media cair EKG yang digunakan sebanyak 500 ml, kemudian spora bersama medianya dicampurkan pada media EKG. Setelah itu, suspensi diinkubasikan selama 7 hari menggunakan alat fermentor.

Identifikasi. Identifikasi bertujuan untuk memastikan spesies jamur entomopatogen yang menyebabkan kematian pada *Gryllus* sp. adalah jamur *B. bassiana*. Identifikasi dilakukan dengan mengambil setetes suspensi *B.bassiana*, kemudian diletakkan di atas gelas objek. Setelah gelas objek ditutup dengan gelas penutup, kemudian diinkubasi selama 2 hari pada kondisi yang lembab. Identifikasi dilakukan berdasarkan pada morfologi konidia, hifa, konidiofor dan warna koloni menggunakan mikroskop. Kunci identifikasi cendawan yang digunakan adalah Barnett dan Hunter (1972). Suspensi jamur *B. bassiana* yang sudah diidentifikasi, kemudian diaplikasikan pada serangga uji.

Kerapatan Spora *B. bassiana*

Suspensi jamur entomopatogen yang telah dipanen dihitung kerapatannya dengan menggunakan haemocytometer. Suspensi jamur diambil sebanyak 100µl menggunakan mikropipet kemudian diteteskan di atas haemocytometer dan

ditutup dengan gelas penutup. Kerapatan konidia diamati di bawah mikroskop binokuler perbesaran 40x. Perhitungan kerapatan dihitung dengan menggunakan rumus Gabriel dan Riyanto (1989) sebagai berikut:

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

C adalah kerapatan spora per ml larutan, **t** adalah jumlah total spora dalam kotak sampel yang diamati, **n** adalah jumlah kotak sampel (5 kotak besar x 16 kotak kecil), dan **0,25** adalah faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada haemocytometer.

Jumlah kerapatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10^{10}, 10^8, 10^6, dan 10^4, sehingga jumlah kerapatan minimal adalah 10^{10}. Konidia yang telah dihitung kemudian distandarisasi agar memiliki konsentrasi 1 x 10^{10} konidia/ml. Jika kerapatan konidia mencapai 10^{10} atau lebih, maka selanjutnya adalah membuat suspensi *B. bassiana* kerapatan 10^8, 10^6, dan 10^4 dengan pengenceran berseri. Standarisasi dan pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

V1 adalah volume larutan stok (ml), **M1** adalah konsentrasi larutan stok (konidia/ml), **V2** adalah volume larutan yang diharapkan (ml) dan **M2** adalah konsentrasi larutan yang diharapkan (konidia/ml).

3.5 Pelaksanaan Penelitian

Uji Patogenisitas *B. bassiana* pada *Gryllus* sp.

Metode Kontak Langsung

Tujuan dari uji patogenisitas adalah untuk mengetahui kerapatan *B. bassiana* yang dapat mengakibatkan mortalitas paling efektif terhadap *Gryllus* sp. Kerapatan yang diujikan adalah konsentrasi perlakuan 10^4, 10^6, 10^8, dan 10^{10} konidia/ml dan akuades sebagai kontrol, dan di ulang sebanyak tiga kali. Masing-masing perlakuan berisi 20 ekor yang ditempatkan pada wadah plastik berdiameter 5 cm dan tinggi 7 cm. Jumlah serangga uji keseluruhan yang digunakan sebanyak 300 ekor.

Aplikasi jamur *B. bassiana* pada serangga uji menggunakan metode kontak langsung, dengan menggunakan hand sprayer (Kassa *et al.*, 2004) dengan kecepatan aliran 1,3 ml sekali semprot. Kemudian suspensi jamur disemprotkan merata pada serangga uji yang telah diletakkan di dalam wadah plastik sebanyak 2 kali semprot (2,6 ml) untuk setiap serangga. Aplikasi diawali dengan perlakuan akuades (kontrol) kemudian perlakuan lainnya dimulai dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi, selanjutnya serangga yang telah disemprot dipindahkan ke dalam wadah plastik dan diberi pakan sawi (caisin) dengan ukuran 3 x 3 cm. Setelah itu, serangga uji diletakkan dalam ruangan dengan kondisi gelap dengan suhu ruang.

Pengamatan kematian serangga dimulai dari 24 jam setelah aplikasi dan dilanjutkan sampai 15 hari. Jumlah serangga yang mati diamati dan dihitung setiap hari.

Metode umpan Pakan

Metode umpan pakan menggunakan empat konsentrasi jamur *B. bassiana* yaitu, 10^4, 10^6, 10^8, dan 10^{10} konidia/ml dan kontrol. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Setiap perlakuan menggunakan 20 ekor serangga uji. Pakan yang digunakan yaitu sawi (caisin), sawi dipotong dengan ukuran 3 x 3 cm, kemudian sawi tersebut direndam dalam cawan petri berisi suspensi *B. bassiana* sebanyak 50 ml selama 5 menit. Sawi tersebut kemudian ditiriskan dan dikeringanginkan selama 20 menit, setelah itu di letakkan pada wadah plastik berdiameter 5 cm dan tinggi 7 cm. Setiap satu pakan sawi (3 x 3 cm) untuk satu serangga uji. Setiap harinya serangga diberi pakan sawi segar (tanpa perlakuan). Pengamatan dilakukan 24 jam setelah aplikasi. Kematian serangga uji diamati dan dihitung setiap hari. Pengamatan dilakukan sampai hari ke 15.

Persentase kematian nimfa dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase kematian nimfa (\%)} = \frac{\text{Jumlah nimfa mati}}{\text{Jumlah seluruh nimfa}} \times 100\%$$

Persentase kematian yang diperoleh apabila kurang dari 20%, kemudian dikoreksi menggunkan rumus Abbot's berdasarkan Matsumura (1975), yaitu:

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

P adalah persentase kematian terkoresi, **x** adalah jumlah nimfa yang hidup pada kontrol dan **y** adalah persentase nimfa yang hidup pada perlakuan.

Isolasi Jamur *B. bassiana* dari Jangkrik Terinfeksi

Tujuan dari isolasi untuk mendapatkan jamur *B. bassiana* yang telah menyebabkan kematian pada *Gryllus* sp. Isolasi dilakukan di dalam LAFC. *Gryllus* sp. yang terinfeksi jamur *B. bassiana* dikeluarkan dari wadahnya dan disterilisasi dengan NaOCl 1%, alkohol 70%, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak dua kali. *Gryllus* sp. tersebut kemudian diletakkan dalam cawan petri yang berisi tisu lembab steril dan diinkubasi selama 4-7 hari pada suhu 27^{o} C untuk merangsang pertumbuhan miselia pada permukaan serangga tujuannya untuk mengkonfirmasi infeksi jamur dari serangga yang mati. Jamur yang tumbuh dari tubuh *Gryllus* sp. diambil dengan jarum inokulasi, kemudian dibiakkan pada media PDA dan diinkubasi selama 7 hari. Biakan murni hasil isolasi jamur ini kemudian diidentifikasi.

3.6 Analisis Data

Data persentase kematian *Gryllus* sp. akibat terinfeksi *B. bassiana* 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 Tukey dengan taraf 5%. Perhitungan dilakukan dengan bantuan program SPSS. Waktu kematian dan Konsentrasi mematikan *Gryllus* sp. dianalisis menggunakan Median Lethal Time (LT_{50}) dan Median Lethal Consentration (LC_{50}) yang perhitungannya menggunakan analisis probit menurun Hsin Chi (1997).