III. METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Entomologi dan Sub Laboratorium Pengembangan Agens Hayati, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, pada bulan Maret sampai dengan Juni 2014.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan Petri kaca dan plastik (d=9 cm), jarum Ose, api Bunsen, autoklaf, mikroskop cahaya, mikroskop stereo, kertas saring (d=5 mm), botol media, kuas nomor 00, *laminar air flow cabinet* (LAFC), *rotary shaker*, *haemocytometer*, gelas ukur, gunting, gelas Erlenmeyer (V=250 ml), gelas objek, gelas penutup, *handsprayer*, *handcounter*, pinset, penggaris, gunting, botol kaca, mikropipet, blender, spons, dan kamera digital.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu isolat jamur entomo-acaripatogen *Beauveria bassiana*, dekstrose, agar, pepton, *yeast*, aquades, kloramfenikol, kentang, daun sirsak, tanaman jeruk berumur 1-2 tahun, alkohol 70%, spirtus, plastik perekat, kertas tisu, kapas, kertas label, kertas saring, dan aluminum foil.

Metode Penelitian

Metode uji kompatibilitas dan uji patogenisitas pestisida nabati EDS dan jamur entomo-acaripatogen *B. bassiana* pada tungau *P. latus* diuraikan sebagai berikut.

Pembuatan Media Cair Ekstrak Kentang Dekstrose

Media ekstrak kentang dekstrose (EKD) dibuat dengan cara mengupas dan mencuci bersih 250 gr kentang. Kentang direbus dalam 1200 ml aquades hingga lunak kemudian disaring untuk memisahkan air dengan kentang. Air hasil saringan diukur hingga 1 liter kemudian ditambahkan 20 g *dekstrose*, 10 g pepton, dan 1 ml kloramfenikol, lalu direbus lagi hingga mendidih. Setelah itu larutan dituangkan ke dalam botol media untuk disterilisasi dalam autoklaf.

Pembuatan Media Padat Sabourous Dekstrose Agar Yeast

Media sabourous dekstrose agar yeast (SDAY) dibuat dengan cara mencampurkan 40 g dekstrose, 20 g agar, 10 g pepton, 2,5 g yeast, dan 1 ml kloramfenikol ke dalam 1000 ml aquades. Campuran bahan tersebut direbus hingga mendidih. Setelah itu larutan dituangkan ke dalam botol media untuk disterilisasi dalam autoklaf.

Perbanyakan Isolat Jamur

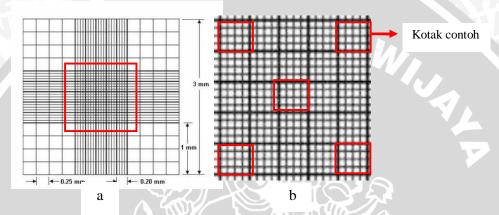
Isolat jamur entomo-acaripatogen B. bassiana yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya. Isolat jamur berasal dari serangga Riptortus linearis Fabricius (Hemiptera: Alydidae) yang ditemukan di Kendalpayak, Malang, Jawa Timur. Koleksi isolat jamur di media padat diperbanyak di media cair EKD. Tujuan perbanyakan pada media cair yaitu mempercepat waktu inkubasi dan memperbanyak biakan.

Pemindahan jamur dilakukan di dalam LAFC untuk menghindari kontaminasi. Sebanyak 20 ml aquades steril dituangkan ke dalam cawan Petri yang berisi isolat jamur B. bassiana. Kemudian cawan Petri diputar agar konidia jamur terlepas. Untuk mempermudah pelepasan konidia, koloni jamur disapu dengan menggunakan kuas halus. Hasil pencampuran tersebut dimasukan ke dalam gelas Erlenmeyer yang berisi 200 ml EKD. Biakan tersebut kemudian dishaker selama 48 jam dengan kecepatan 120 rpm. Hal ini bertujuan untuk memperbanyak jumlah konidia jamur B. bassiana. Biakan yang sudah dishaker diinkubasi selama lebih kurang enam hari. Setelah itu dilakukan perhitungan konsentrasi jamur *B. bassiana*.

Penghitungan konsentrasi dilakukan dengan mengambil 1 ml suspensi jamur kemudian diteteskan di atas haemocytometer. Konidia dihitung di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 400 kali. Konidia dihitung pada kotak tengah seperti pada Gambar 1a. Pada kotak tengah tersebut ditetapkan 5 kotak contoh (Gambar 1b). Tiap kotak contoh terdiri dari 16 kotak kecil. Konsentrasi konidia dihitung dengan menggunakan rumus Hadioetomo (1993) sebagai berikut:

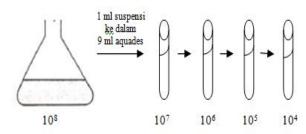
$$C = \frac{t}{n \times 0.25} \times 10^6$$

yang C adalah konsentrasi konidia per ml larutan, t adalah jumlah konidia dalam kontak contoh, n adalah jumlah kotak contoh (5 x 16 kotak kecil = 80 kotak) dan angka 0,25 adalah faktor koreksi penggunaan kotak contoh skala kecil pada haemocytometer.



Gambar 1. Bidang pandang pada *haemocytometer* a: kotak tengah dan b: kotak contoh yang masing-masing terdiri dari 16 kotak kecil

Kerapatan konidia jamur yang digunakan pada penelitian ini yaitu 10⁴, 10⁶, dan 10⁸ konidia/ml aquades. Suspensi massa konidia dihitung sampai tercapai konsentrasi tersebut melalui pengenceran berseri. Pengenceran berseri dilakukan jika konsentrasi jamur yang didapatkan lebih tinggi dari konsentrasi tertinggi yang diinginkan (10⁸ konidia/ml aquades), misal didapatkan konsentrasi 10⁹ konidia/ml aquades maka sebanyak 1 ml suspensi jamur diteteskan ke dalam 9 ml aquades steril sehingga didapatkan konsentrasi 10⁸ konidia/ml aquades (Gambar 2). Pengenceran dilakukan hingga tercapai konsentrasi terendah (10⁴ konidia/ml aquades) dengan cara yang sama. Jika kerapatan konidia yang dihasilkan kurang dari konsentrasi terendah, maka suspensi jamur diinkubasi pada suhu 26-29°C dan dilakukan perhitungan lagi hingga diperoleh kerapatan konidia yang diinginkan dengan cara yang sama.



Gambar 2. Pengenceran berseri

Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak

Daun sirsak yang digunakan pada penelitian ini berasal dari kota Malang, Jawa Timur. Daun yang sudah tua ditimbang sebanyak 1000 gram kemudian dicuci bersih dan dikeringanginkan. Kemudian daun dihaluskan dengan menambahkan 1 liter aquades steril. Setelah itu didiamkan selama 24 jam dan disaring hingga diperoleh ekstrak air daun sirsak (EDS) yang siap digunakan. Konsentrasi EDS yang digunakan pada penelitian ini adalah 0,5; 1,0; dan 1,5%. Konsentrasi EDS tersebut secara berurutan diperoleh dengan cara menambahkan 0,5; 1,0; dan 1,5 ml EDS ke dalam 99,5; 99,0; dan 98,5 ml aquades steril. Metode tersebut merupakan modifikasi dari Djunaedy (2009).

Uji Kompatibilitas

Uji kompatibilitas disusun dalam Rancangan Acak Lengkap dengan 12 kombinasi perlakuan dan diulang sebanyak 4 kali sehingga terdapat 48 satuan percobaan. Kombinasi perlakuan terdiri dari 3 konsentrasi *B. bassiana*, yaitu 10⁴, 10⁶ dan 10⁸ konidia/ml aquades, dan 4 konsentrasi EDS, yaitu 0 sebagai kontrol, 0,5; 1,0; dan 1,5%.

Uji kompatibilitas jamur entomo-acaripatogen *B. bassiana* dan EDS dilakukan secara *in vitro* dengan teknik peracunan media. Media SDAY dicampur dengan EDS sesuai konsentrasi perlakuan dengan perbandingan volume 3:1 kemudian diaduk rata. Selembar kertas saring dicelupkan ke dalam suspensi jamur entomo-acaripatogen *B. bassiana* sesuai konsentrasi perlakuan. Kemudian kertas saring diletakkan di dalam cawan Petri berisi media padat SDAY yang mengandung EDS sesuai konsentrasi perlakuan. Selembar kertas saring baru

Variabel pengamatan uji kompatibilitas yaitu pertumbuhan koloni, daya kecambah konidia, dan sporulasi yang diuraikan di bawah ini. Rerata diameter koloni pada 6 hari setelah aplikasi (HSA) dan jumlah konidia pada 15 HSA digunakan untuk menghitung nilai kompatibilitas. Data yang diperoleh diolah dengan sidik ragam, jika respon perlakuan berpengaruh nyata, dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf nyata 5%.

Pertumbuhan Koloni. Pengaruh EDS terhadap pertumbuhan koloni jamur ditentukan dengan cara mengukur diameter koloni jamur entomo-acaripatogen *B. bassiana*. Penghitungan diameter koloni jamur dilakukan pada 3 dan 6 HSA (Depieri *et al.*, 2005). Namun pada penelitian ini, diameter koloni dihitung setiap 3 hari sampai 15 HSA. Persentase penurunan pertumbuhan koloni jamur dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$Nr = \frac{N_1 - N_2}{N_1} x100\%$$

yang Nr adalah persentase penurunan pertumbuhan koloni, N_1 adalah pertumbuhan koloni jamur pada media yang tidak dicampur dengan EDS, dan N_2 adalah pertumbuhan koloni jamur pada media yang dicampur dengan EDS.

Daya Kecambah Konidia. Persentase kecambah dihitung dari 200 konidia. Konidia dinyatakan berkecambah apabila panjang tabung kecambah telah melebihi diameter konidia. Daya kecambah konidia ditentukan dengan rumus sebagai berikut:

$$V = \frac{K_1}{K_1} x 100\%$$

yang V adalah daya kecambah konidia (%), K_1 adalah jumlah konidia yang berkecambah, dan K_2 adalah jumlah konidia yang diamati.

Penghitungan daya kecambah konidia dilakukan pada 6 HSA. Jika terjadi penurunan daya kecambah konidia, maka persentase penurunan daya kecambah konidia dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$Mr = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100\%$$

yang Mr adalah persentase penurunan daya kecambah, M_1 adalah daya kecambah konidia pada media yang tidak dicampur dengan EDS, dan M_2 adalah daya kecambah konidia pada media yang dicampur dengan EDS.

Jumlah konidia. Pada 15 HSA, konidia jamur dipanen dengan cara menambahkan 5 ml aquades steril. Konidia dilepaskan dari media dengan menggunakan kuas halus. Suspensi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan konsentrasi konidia dihitung dengan menggunakan *haemocytometer*. Persentase penurunan sporulasi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$Sr = \frac{S_1 - S_2}{S_1} \times 100\%$$

Sr adalah persentase penurunan sporulasi, S_1 adalah jumlah konidia yang dihasilkan jamur pada media yang tidak dicampur dengan EDS, dan S_2 adalah jumlah konidia jamur pada media yang dicampur dengan EDS.

Penghitungan nilai kompatibilitas. Data pertumbuhan koloni dan jumlah konidia dimasukkan ke dalam rumus T dari Depieri *et al.* (2005) sebagai berikut:

$$T = \frac{[20(PK) + 80(SP)]}{100}$$

T adalah nilai kompatibilitas, PK adalah nilai relatif pertumbuhan koloni perlakuan dibandingkan dengan kontrol (%), dan SP adalah nilai relatif sporulasi perlakuan dibandingkan dengan kontrol (%).

Nilai T dibagi dalam kategori sebagai berikut: 0-30 sangat toksik, 31-45 toksik, 46-60 kurang toksik, dan >60 tidak toksik atau kompatibel. Perlakuan yang menunjukkan nilai kompatibel, akan dilanjutkan untuk uji patogenisitas *B. bassiana* dan EDS pada imago tungau *P. latus*. Jika semua perlakuan

menunjukkan nilai tidak kompatibel, maka uji patogenisitas pada *P. latus* dilakukan secara terpisah (uji tunggal).

Perbanyakan Massal dan Pemeliharaan P. latus

Imago *P. latus* diperoleh dari benih jeruk di kebun percobaan Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jawa Timur. Tungau *P. latus* diletakkan di atas daun jeruk di dalam arena perbanyakan. Perbanyakan dan pemeliharaan *P. latus* dilakukan pada arena untuk mendapatkan umur dan generasi *P. latus* yang sama. Sebanyak 10 *P. latus* diletakkan pada tiap daun jeruk di dalam arena.

Cara membuat arena yaitu busa dipotong, direndam air sampai basah kemudian diletakkan di cawan Petri dan dilapisi kertas tisu. Setelah itu, sehelai daun jeruk muda diletakkan di atas kertas tisu dengan posisi permukaan bawah daun berada di atas. Setelah itu daun ditutup dengan dua lembar kertas tisu yang sudah dilubangi lebih kecil dari ukuran daun. Hal ini bertujuan untuk mempermudah pengamatan dan *P. latus* tidak keluar dari daun. Arena perbanyakan diusahakan selalu dalam kondisi basah agar daun tidak cepat layu dan tungau *P. latus* tidak keluar dari arena.

Perbanyakan *P. latus* juga dilakukan pada tanaman jeruk umur 1-2 tahun di rumah kasa Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya. Pemindahan *P. latus* menggunakan kuas halus, yaitu dengan mendekatkan ujung kuas pada permukaan tubuh *P. latus* sehingga individu *P. latus* berpindah ke ujung kuas, kemudian kuas diletakkan di atas permukaan daun agar *P. latus* pindah dengan sendirinya.

Uji Patogenisitas

Dari uji kompatibilitas, semua perlakuan menunjukkan nilai <60 (tidak kompatibel) maka uji patogenisitas dilakukan secara terpisah (uji tunggal), tidak ada kombinasi aplikasi antara jamur entomo-acaripatogen *B. bassiana* dan EDS. Uji patogenisitas disusun dalam Rancangan Acak Kelompok dengan 7 perlakuan yang diulang sebanyak 5 kali, sehingga terdapat 35 satuan percobaan. Perlakuan yang digunakan pada uji patogesitas adalah 3 konsentrasi *B. bassiana* yaitu 10⁴,

10⁶ dan 10⁸ konidia/ml aquades, 3 konsentrasi EDS yaitu 0,5; 1,0; dan 1,5%, dan aquades sebagai kontrol. Masing-masing unit percobaan diaplikasikan pada 10 imago tungau *P. latus* di arena percobaan, sehingga jumlah tungau yang dibutuhkan untuk uji patogenisitas adalah 350 ekor tungau.

Uji patogenisitas jamur entomo-acaripatogen B. bassiana dan EDS dilakukan pada imago P. latus menggunakan menggunakan metode semprot. Sebanyak 10 imago *P. latus* di arena percobaan disemprot dengan masing-masing suspensi B. bassiana dan EDS. Pembuatan suspensi konidia B. bassiana menggunakan biakan jamur dari hasil perbanyakan pada media cair. Isolat dari media cair dengan konsentrasi10⁴, 10⁶ dan 10⁸ konidia/ml aquades diambil menggunakan mikropipet sebanyak 10 ml kemudian dimasukan ke dalam handsprayer steril. Suspensi EDS diperoleh dengan memindahkan 10 ml EDS konsentrasi 0,5; 1,0; dan 1,5% dari botol kaca ke dalam handsprayer steril. Aplikasi B. bassiana dan EDS dengan cara menyemprotkan suspensi menggunakan handsprayer. Perlakuan kontrol dilakukan dengan penyemprotan aquades. Penyemprotan dilakukan sebanyak dua kali semprot pada masing-masing arena. Saat aplikasi, posisi handsprayer agak miring dengan jarak sekitar 20 cm dari arena. Hal ini bertujuan agar daun tidak cepat busuk karena terlalu banyak air hasil semprotan yang mengenai daun. Setelah aplikasi, arena dilabeli dan ditutup kemudian diletakkan pada nampan.

Variabel pengamatan uji patogenisitas yaitu jumlah kematian tungau dan gejala yang ditimbulkan oleh jamur entomo-acaripatogen *B. bassiana* dan EDS. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam selama 6 hari. Data yang diperoleh diolah dengan sidik ragam, jika respon perlakuan berpengaruh nyata, maka dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf nyata 5%.