

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Perbanyakan isolat jamur *B. bassiana* dilaksanakan pada bulan Juni 2012 sampai Agustus 2012, dan aplikasinya pada bulan September sampai Oktober 2012.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi jamur *B. bassiana* isolat Tanggamus dan Lampung Barat, alkohol 70%, akuades, SDA (*Sobouroud Dextrose Agar*), dan serangga uji (*S. oryzae*) beserta pakannya berupa beras, dan kertas *tissue*. Alat-alat yang digunakan adalah cawan petri, jarum ose, bunsen, tabung reaksi, *autoclave*, *laminar air flow*, mikroskop majemuk dan mikroskop stereo.

3.3 Metode Penelitian

Pada penelitian ini digunakan 2 jenis isolat *B. bassiana*, yaitu isolat *B. bassiana* asal Lampung Barat dan isolat *B. bassiana* asal Tanggamus.

Setiap isolat *B. bassiana* tersebut diujikan pada serangga *S. oryzae* yang dilakukan pada set percobaan yang terpisah. Setiap set percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan yang diuji adalah tingkat kerapatan spora yang diperoleh dengan membuat suspensi jamur dengan tingkat pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dan kontrol (akuades). Sebagai satuan percobaan adalah 20 ekor kumbang *S. oryzae* dewasa yang dipelihara pada beras.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap. Tahapan tersebut meliputi penyediaan serangga uji, penyediaan jamur patogen, pengenceran suspensi jamur, perhitungan kerapatan spora, aplikasi jamur patogen, pengamatan dan perhitungan peubah patogenisitas.

3.4.1 Penyediaan Serangga Uji

Dalam penelitian ini, untuk menguji daya patogenesitas jamur *B. bassiana* digunakan serangga uji yaitu kumbang bubuk beras (*S. oryzae*, Coleoptera :Curculionidae). Kumbang bubuk beras didapatkan dari beras yang sudah lama tersimpan. Kumbang dibiakkan pada beras dalam toples berukuran besar (diameter 30 cm).

Penggunaan *S. oryzae* sebagai serangga uji pada uji patogenisitas *B. bassiana* dalam penelitian ini karena serangga tersebut masih dalam satu ordo dengan inangnya *H. hampei* yaitu Coleoptera. Diharapkan daya patogenisitas *B. bassiana* pada kumbang *S. oryzae* tidak berbeda dengan patogenisitas jamur ini pada serangga inang asalnya yaitu *H. hampei*. Selain itu alasan penggunaan *S. oryzae* sebagai serangga uji karena kumbang ini lebih mudah dipelihara dan dikembangkan sehingga mudah pengadaannya ketika diperlukan dalam pengujian.

3.4.2 Penyediaan Jamur Patogen

Inokulum *B. bassiana* diperoleh dari perkebunan kopi di daerah Sumberjaya Lampung Barat dan Tanggamus. Inokulum jamur tersebut berasal dari serangga penggerek buah kopi (*H.hampei*) yang terinfeksi oleh jamur *B. bassiana* (Gambar 1). Selanjutnya jamur pada serangga tersebut diisolasi dan ditumbuhkan pada media SDA (Gambar 2), kemudian dibiakkan dan diperbanyak menggunakan media SDA (Gambar 3). Jamur yang telah dimurnikan selanjutnya ditumbuhkan selama 2 minggu hingga media tertutupi penuh oleh koloni jamur (Gambar 4).



Gambar 1. Serangga PBKo yang terinfeksi oleh *B. bassiana*.



Gambar 2. Jamur pada serangga diisolasi dan ditumbuhkan pada media SDA.



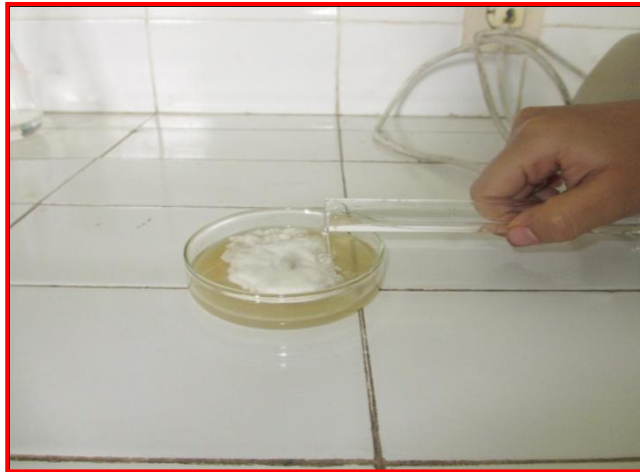
Gambar 3. Pembiakan dan perbanyakan *B. bassiana* pada media SDA.



Gambar 4. Koloni jamur *B. bassiana* berumur 2 minggu.

3.4.3 Pengenceran Suspensi Jamur

Media yang telah ditutupi miselium jamur dipanen dan dipisahkan dari media dengan cara memberikan sedikit akuades (Gambar 5), kemudian miselium jamur diambil menggunakan kaca preparat (Gambar 6). Miselium jamur yang telah dipisahkan dari media dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi akuades 9 ml (Gambar 7), kemudian di *rotary mixer* selama 1 menit (Gambar 8). Tahap ini menghasilkan tingkat pengenceran 10^{-1} . Selanjutnya pada tingkat pengenceran 10^{-2} dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 1 ml suspensi pada tingkat pengenceran 10^{-1} dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades. Demikian seterusnya dengan tahapan yang sama untuk mendapatkan tingkat pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} (Gambar 9).



Gambar 5. Pemberian akuades pada media ketika akan memanen spora jamur.



Gambar 6. Pemisahan miselium jamur dari media SDA menggunakan kaca preparat.



Gambar 7. Miselium jamur dipindahkan ke dalam tabung reaksi.



Gambar 8. *Rotary mixer* miselium jamur pada tabung reaksi.



Gambar 9. Tahap pengenceran spora jamur.

3.4.4 Perhitungan Kerapatan Spora

Setelah dilakukan pengenceran, selanjutnya kerapatan spora untuk tiap tingkat pengenceran dihitung menggunakan *Haemocytometer* di bawah mikroskop majemuk pada perbesaran 400 x. Kerapatan spora per ml dihitung dengan menggunakan rumus Gabriel & Riyatno (1989) sebagai berikut :

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

Di mana:

C : kerapatan spora per ml larutan

t : jumlah total spora dalam kotak sampel yang diamati

N : jumlah kotak sampel yang diamati

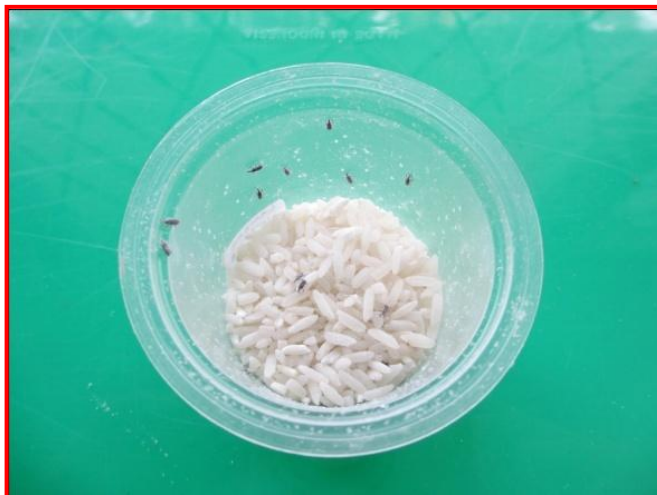
0,25 : merupakan faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil dalam *Haemocytometer*.

3.4.5 Aplikasi Jamur Patogen

Suspensi *B. bassiana* diaplikasikan dengan menggunakan metode semprot. Serangga uji diletakkan dalam wadah dan disemprot dengan 5 ml suspensi patogen sesuai perlakuan tingkat pengenceran (Gambar 10). Sedangkan pada kontrol serangga hanya disemprot dengan akuades. Volume semprot pada masing-masing perlakuan ialah sebanyak 5 ml. Serangga yang telah disemprot dibiarkan tergenang dalam suspensi selama ± 5 detik. Kemudian serangga tersebut diletakkan di permukaan *tissue*. Serangga yang telah diberi perlakuan, kemudian diberikan pakan beras (Gambar 11).



Gambar 10. Serangga uji disemprot dengan 5 ml suspensi patogen.



Gambar 11. Serangga uji diberikan pakan beras setelah aplikasi.

3.4.6 Pengamatan

Pengamatan dilakukan setiap hari untuk melihat tanda adanya infeksi patogen yaitu serangga menjadi sakit dengan menunjukkan gejala tidak aktif bergerak.

Serangga uji yang terindikasi sakit dikeluarkan dan ditempatkan pada wadah yang berbeda dan perkembangannya diamati setiap hari sampai mati.

3.4.7 Peubah Patogenisitas

Peubah patogenisitas yang diamati meliputi tingkat mortalitas, periode letal dan tingkat virulensi. Tingkat mortalitas dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Tingkat Mortalitas} = \frac{\text{Jumlah serangga mati}}{\text{Jumlah seluruh serangga}} \times 100\%$$

Periode letal dan tingkat virulensi *B. bassiana*, dihitung dengan menggunakan rumus Susilo (1993 *dalam* Indriyati 2009):

$$\text{Periode Letal (F)} = \frac{\Sigma(H_i)(M_i)}{\Sigma(M_i)} \quad \text{Tingkat Virulensi } (\delta) = \frac{1}{F}$$

Keterangan :

H_i = Waktu kematian

M_i = Jumlah serangga yang mati terinfeksi

Data hasil pengamatan dianalisis ragam dan dilanjutkan dengan uji pemisahan nilai tengah menggunakan uji BNT. Semua analisis statistik menggunakan taraf nyata 5% atau 1%.