

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hama Fakultas Pertanian Universitas Lampung sejak bulan Agustus 2014 sampai dengan bulan Januari 2015.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu inokulum *M. anisopliae*, media jagung, ekstrak daun babadotan, bahan perata (Agristick 400L), kepik hijau (*N. viridula*), kacang panjang, media PDA, alkohol 75%, dan air.

Adapun alat yang digunakan yaitu cawan petri, erlenmeyer, bunsen, autoklaf, laminar air flow, bor gabus, jarum ose, panci, kompor, sendok, baskom plastik, plastik anti panas, blender, penyaring ampas, toples plastik, kain kasa, karet gelang, mikroskop, dan sprayer.

3.3. Rancangan Percobaan

Penelitian ini terdiri dari 2 tahap yaitu pengujian kompatibilitas pertumbuhan jamur entomopatogen *M. anisopliae* pada PDA setelah diberi ekstrak daun babadotan dan pengaruh aplikasi campuran suspensi *M. anisopliae* dan ekstrak daun babadotan terhadap mortalitas *N. viridula*.

Pada pengujian kompatibilitas jamur entomopatogen *M. anisopliae* dan ekstrak daun babadotan dilakukan percobaan untuk mengetahui daya kecambah, pertumbuhan koloni, dan sporulasi *M. anisopliae*. Masing-masing percobaan terdiri dari 4 perlakuan dan 4 ulangan. Percobaan disusun dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Adapun pengujian aplikasi campuran suspensi *M. anisopliae* dan ekstrak daun babadotan terhadap mortalitas *N. viridula* dilakukan dengan 6 perlakuan dan 3 ulangan. Percobaan disusun dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

3.4. Persiapan Penelitian

3.4.1. Pemurnian dan perbanyakan jamur entomopatogen

1. Isolasi *M. anisopliae* pada media PDA (pemurnian jamur)

Biakan jamur ini diperoleh UPTD Balai Perlindungan Tegeneng, Lampung.

Selanjutnya diinokulasi pada media PDA.

- a. Disiapkan media PDA 200 ml steril dalam erlenmeyer dan dituangkan ke dalam 20 cawan petri steril
- b. Setelah media PDA dingin segera diinokulasi dengan *M. anisopliae*
- c. Selanjutnya diinkubasi selama 14 hari dan dilakukan pengamatan.

2. Perbanyakan *M. anisopliae* pada media menir jagung

- a. Disiapkan menir jagung sebanyak 2 kilogram, kemudian dikukus sampai matang dan ditiriskan sampai dingin

- b. Setelah dingin dimasukkan jagung sebanyak 400 gram kedalam baskom plastik berwarna putih, diinokulasi dengan *M. anisopliae* kemudian ditutup
- c. Diinkubasi selama 15 hari sehingga jamur *M. anisopliae* tumbuh pada media menir jagung

3.4.2. Penyiapan serangga uji

Koloni awal kepik hijau didapatkan dari lahan pertanian pada pertanaman kacang kedelai Balai Penelitian Tanaman Pangan (BPTP) Natar. Kepik hijau yang dipilih adalah imago kemudian dibiakkan dalam toples plastik yang ditutup dengan kain kasa, dengan pakan kacang panjang. Kepik hijau ini dipelihara sampai bertelur. Telur yang menetas dipelihara hingga menjadi nimfa. Pada penelitian ini digunakan serangga uji nimfa kepik hijau instar 4 atau 5. Pada satuan percobaan digunakan 10 ekor nimfa.

3.4.3. Penyediaan ekstrak daun babadotan

1. Disiapkan daun gulma babadotan yang tua dan segar dari lapang kemudian dibersihkan dengan air dan ditiriskan sebanyak 100 gram.
2. Setelah itu diblender dengan menambahkan air sebanyak 1000 ml, kemudian disaring dengan kertas saring, dan ditambahkan perekat (Agristick 400L) sebanyak 1 ml/liter kemudian aduk merata.
3. Pestisida nabati ekstrak daun babadotan siap digunakan.

3.4.4. Penyediaan suspensi jamur entomopatogen *M. anisopliae*

1. Disiapkan jamur entomopatogen *M. anisopliae* yang telah dibiakkan pada media jagung sebanyak 100 gram.
2. Setelah itu jamur tersebut diblender selama 7 detik dengan menambahkan 1000 ml air kemudian disaring dan diaduk hingga merata
3. Suspensi jamur *M. anisopliae* yang digunakan dengan konsentrasi 10^7 konidia/ml

3.5. Pelaksanaan Penelitian

Pengujian ini terdiri dari 2 tahap yaitu pengujian kompatibilitas pertumbuhan jamur entomopatogen *M. anisopliae* dan pengaruh aplikasi campuran suspensi *M. anisopliae* dan ekstrak daun babadotan terhadap mortalitas *N. viridula*.

3.5.1. Pengujian kompatibilitas jamur entomopatogen *M. anisopliae* dan pestisida nabati ekstrak daun babadotan

Pengujian kompatibilitas jamur entomopatogen *M. anisopliae* dan ekstrak daun babadotan terdiri dari tiga percobaan yaitu untuk mengetahui daya kecambah konidia, pertumbuhan koloni, dan sporulasi *M. anisopliae*.

a. Daya Kecambah Konidia *M. anisopliae*

Pemanenan konidia pada masing-masing perlakuan dilakukan dengan cara menggunakan kuas agar konidia *M. anisopliae* tercampur dengan aquades dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Percobaan untuk mengetahui daya kecambah konidia terdiri dari 4 perlakuan dan 4 ulangan.

Sebagai perlakuan adalah

X0: (Kontrol) tanpa penambahan ekstrak daun babadotan pada 10 ml PDA dan diinokulasi dengan *M. anisopliae*

X1: Perlakuan penambahan 1 ml ekstrak daun babadotan pada 10 ml PDA dan diinokulasi *M. anisopliae*

X2: Perlakuan penambahan 2 ml ekstrak daun babadotan pada 10 ml PDA dan diinokulasi *M. anisopliae*

X3: Perlakuan penambahan 3 ml ekstrak daun babadotan pada 10 ml PDA dan diinokulasi *M. anisopliae*

Pemanenan dilakukan dengan menambahkan 5 ml aquades untuk mendapatkan suspensi pada masing-masing perlakuan. Selanjutnya suspensi konidia

M. anisopliae diinkubasikan pada suhu 25°C selama 24 jam. Suspensi konidia

M. anisopliae sebanyak 1 ml pada masing-masing perlakuan diamati

perkecambahannya menggunakan mikroskop cahaya. Konidia dinyatakan

berkecambah apabila panjang tabung kecambah telah melebihi diameter konidia.

Daya kecambah konidia menurut Alves *et al.* (1998) dalam Depieri *et al.* (2005)

dihitung dengan rumus:

$$V = \frac{K1}{K2} \times 100 \%$$

dengan:

V = daya kecambah konidia (%),

K1= jumlah konidia yang berkecambah,

K2= jumlah konidia yang diamati.

Persentase penurunan daya kecambah konidia menurut Alves *et al.* (1998) dalam

Depieri *et al.* (2005) dihitung dengan rumus:

$$Mr = \frac{M2 - M1}{M1} \times 100\%$$

dengan:

Mr = Persentase penurunan daya kecambah,

M1= Daya kecambah konidia pada media yang tidak diberi ekstrak daun

babadotan (kontrol)

M2= Daya kecambah konidia pada media yang diberi ekstrak daun babadotan

b. Pertumbuhan Koloni *M. anisopliae*

Pengaruh ekstrak daun babadotan terhadap pertumbuhan koloni jamur ditentukan dengan cara mengukur diameter koloni jamur setiap lima hari yang dimulai dari hari ke-5 sampai hari ke-15 setelah inokulasi. Percobaan untuk mengetahui pertumbuhan koloni terdiri dari 4 perlakuan dan 4 ulangan.

Sebagai perlakuan adalah

Y0: (Kontrol) tanpa penambahan ekstrak daun babadotan pada 10 ml PDA dan diinokulasi dengan *M. anisopliae*

Y1: Perlakuan penambahan 1 ml ekstrak daun babadotan pada 10 ml PDA dan diinokulasi *M. anisopliae*

Y2: Perlakuan penambahan 2 ml ekstrak daun babadotan pada 10 ml PDA dan diinokulasi *M. anisopliae*

Y3: Perlakuan penambahan 3 ml ekstrak daun babadotan pada 10 ml PDA dan diinokulasi *M. anisopliae*

Pertumbuhan koloni diukur secara acak pada 5 spot *M. anisopliae* pada masing-masing perlakuan. Diameter koloni dari cendawan diukur menggunakan penggaris.

Persentase penurunan pertumbuhan koloni cendawan menurut Alves *et al.* (1998)

dalam Depieri *et al.* (2005) dihitung dengan rumus:

$$Nr = \frac{N1}{N2} \times 100 \%$$

dengan :

Nr = Persentase penurunan pertumbuhan koloni,

N1= Pertumbuhan koloni jamur pada media yang tidak diberi ekstrak daun babadotan,

N2= Pertumbuhan koloni jamur pada media yang diberi ekstrak daun babadotan

c. Sporulasi *M. anisopliae*

Pemanenan spora pada masing-masing perlakuan dilakukan dengan cara menggunakan kuas agar spora *M. anisopliae* tercampur dengan aquades dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Percobaan untuk mengetahui sporulasi terdiri dari 4 perlakuan dan 4 ulangan. Sebagai perlakuan adalah

V0: (Kontrol) tanpa penambahan ekstrak daun babadotan pada 10 ml PDA dan diinokulasi dengan *M. anisopliae*

V1: Perlakuan penambahan 1 ml ekstrak daun babadotan pada 10 ml PDA dan diinokulasi *M. anisopliae*

V2: Perlakuan penambahan 2 ml ekstrak daun babadotan pada 10 ml PDA dan diinokulasi *M. anisopliae*

V3: Perlakuan penambahan 3 ml ekstrak daun babadotan pada 10 ml PDA dan diinokulasi *M. anisopliae*

Sporulasi jamur *M. anisopliae* ditentukan dengan menghitung jumlah spora yang dihasilkan jamur pada masing-masing perlakuan. Setelah inkubasi selama 15 hari pada cawan petri konidia jamur dipanen dengan cara menambahkan 5 ml aquades steril dalam cawan Petri. Suspensi *M. anisopliae* sebanyak 1 ml dihitung dengan menggunakan hemositometer pada mikroskop cahaya.

Persentase penurunan sporulasi menurut Alves *et al.* (1998) dalam Depieri *et al.*

(2005) dihitung dengan rumus :

$$Sr = \frac{S1 - S2}{S1} \times 100 \%$$

dengan :

Sr = Persentase penurunan sporulasi,

S1= Jumlah spora yang dihasilkan jamur pada media yang tidak diberi ekstrak daun babadotan (kontrol),

S2= Jumlah spora yang dihasilkan jamur pada media yang diberi ekstrak daun babadotan

d. Penghitungan nilai kompatibilitas pertumbuhan jamur entomopatogen *M. anisopliae* dan ekstrak daun babadotan

Untuk mengetahui kompatibilitas ekstrak daun babadotan terhadap *M. anisopliae*, maka data hasil pengamatan kompatibilitas dimasukkan ke dalam rumus T dari Alves *et al.* (1998) dalam Depieri *et al.* (2005) sebagai berikut :

$$T = \frac{\{20(VG) + 80(SP)\}}{100}$$

dengan:

T = Nilai kompatibilitas,

VG = Nilai relatif pertumbuhan koloni perlakuan dibandingkan dengan kontrol (%),

SP = Nilai relatif sporulasi perlakuan dibandingkan dengan kontrol (%).

Nilai T dibagi kedalam kategori sebagai berikut:

0-30 sangat toksik; 31-45 toksik; 46-60 kurang toksik; dan > 60 tidak toksik atau kompatibel.

3.5.2. Pengaruh aplikasi ekstrak jamur entomopatogen *M. anisopliae* dan pestisida nabati ekstrak daun babadotan (*A. conyzoides*) terhadap mortalitas *N. viridula*.

Terdapat 6 perlakuan dan 3 ulangan untuk aplikasi, perlakuan tersebut adalah

H1: Kontrol (tanpa aplikasi *M. anisopliae* dan pestisida nabati)

H2: Perlakuan aplikasi 10 ml suspensi *M. anisopliae* ditambahkan 0 ml ekstrak daun babadotan

H3: Perlakuan aplikasi 0 ml suspensi *M. anisopliae* ditambahkan 10 ml ekstrak daun babadotan

H4: Perlakuan aplikasi 10 ml suspensi *M. anisopliae* ditambahkan 1 ml ekstrak daun babadotan

H5: Perlakuan aplikasi 10 ml suspensi *M. anisopliae* ditambahkan 2 ml ekstrak daun babadotan

H6: Perlakuan aplikasi 10 ml suspensi *M. anisopliae* ditambahkan 3 ml ekstrak daun babadotan

Pembuatan cairan semprot aplikasi dilakukan dengan cara pencampuran ekstrak babadotan seperti pada tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan suspensi *M. anisopliae* dengan ekstrak daun babadotan pada perlakuan H1 s.d H6.

Perlakuan	Suspensi <i>M. anisopliae</i> (10^7 spora/ml)	Ekstrak Babadotan
H1	0	0
H2	10 ml	0
H3	0	10 ml
H4	10 ml	1 ml
H5	10 ml	2 ml
H6	10 ml	3 ml

Cairan semprot yang telah dibuat, sebelum diaplikasi ditambahkan bahan perata dan perekat dengan konsentrasi 1% yaitu sebanyak 1 ml/100 ml campuran ekstrak suspensi *M. anisopliae* dan ekstrak dau babadotan . Setiap satuan percobaan menggunakan serangga uji nimfa kepik hijau instar 4 atau 5 sebanyak 10 ekor. Aplikasi dilakukan 3 kali penyemprotan pada masing-masing perlakuan sebanyak (2 ml).

3.6. Pengamatan

Pengamatan meliputi :

1. Pengamatan pada kompatibilitas dilakukan dengan penghitungan daya kecambah, penghitungan pertumbuhan koloni, dan sporulasi.
2. Pengamatan terhadap pengaruh campuran ekstrak jamur entomopatogen *M. anisopliae* dan pestisida nabati ekstrak daun babadotan (*A. conyzoides*) terhadap *N. viridula* yaitu pengamatan 1 hari setelah aplikasi sampai 7 hari setelah aplikasi. Pengamatan meliputi jumlah serangga yang mati dan indikasi kematian serangga. Indikasi kematian dilakukan dengan cara mengamati serangga yang mati di bawah mikroskop, apakah pada tubuh serangga uji tumbuh cendawan *M. anisopliae*.

Persentase kematian serangga dihitung dengan rumus sebagai berikut (Rustama *et al.*, 2008) :

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

dengan:

M = mortalitas serangga (%)

n = serangga yang mati (ekor)

N = jumlah serangga yang diuji

3.7 Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh diuji dengan analisis sidik ragam dan dilanjutkan dengan pengujian BNT dengan taraf nyata 5%. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *software SAS 9.1 for Windows*.