

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan Agustus 2011 sampai dengan bulan Januari 2012 di Laboratorium Hama Jurusan Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.2 Alat Dan Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini ialah serangga hama pengisap buah kakao (*H. theivora*), buah mentimun, media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*), tisu, alkohol 70%, kapas, aqua destilata steril, isolat *M. anisopliae* dari Tegineneng, Gading Rejo, Bantul, UGM, dan Trimurjo.

Sedangkan alat-alat yang dibutuhkan yaitu toples plastik, plastik tahan panas, kuas, kain sippon, karet gelang, cawan petri, hemositometer, erlenmeyer, *rotamixer*, jarum ose, bor gabus, mikropipet, *laminar air flow*, kompor gas, panci, *Autoclave*, dan tabung reaksi.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini berupa percobaan dalam Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan pengujian virulensi terdiri dari 6 perlakuan dan 4 kelompok, uji diameter terdiri dari 5 perlakuan dan 4 kelompok, uji viabilitas dan kerapatan terdiri dari 5 perlakuan dan 3 kelompok. Dengan Isolat *M. anisopliae* dari lima macam tempat (Tegineneng, Gading Rejo, UGM, Bantul, dan Trimurjo) dan 1 “kontrol” untuk uji virulensi sebagai perlakuan. Terdiri dari 4 kelompok waktu aplikasi yang berbeda. Aplikasi terhadap *H. theivora* pada pengenceran 10^{-2} /ml.

3.3.1 Pengujian Kerapatan, Viabilitas Konidia Dan Virulensi

Analisis data dari kerapatan, viabilitas, dan virulensi jamur menggunakan Anova atau sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji BNT pada taraf 5%. Data mortalitas *H. theivora* diperoleh setelah aplikasi. Kemudian data tersebut dianalisis menggunakan sidik ragam (Anova), lalu dilanjutkan dengan analisis uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5%.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Berikut ini beberapa langkah yang telah dilakukan dalam penelitian :

1. Pembiakan Serangga *Helopeltis theivora* Waterhouse.

Pembiakan serangga ini dilakukan di laboratorium, yaitu dengan menggunakan inang alternatif mentimun. Sebelum pembiakan, terlebih dahulu dilakukan pencarian indukan *H. theivora*. Indukan serangga terdiri dari imago dan nimfa *H. theivora* yang diambil dari lapangan. Indukan imago dan nimfa dipisahkan dan

dimasukkan ke dalam stoples plastik berdiameter 16 cm dengan tinggi 17 cm yang sudah ada pakan mentimun di dalamnya dan ditutup menggunakan kain sippon yang diikat menggunakan karet gelang. Setiap stoples diisi ± 20 ekor serangga dan ± 3 buah mentimun. Pakan diganti setiap 2 hari sekali. Setelah imago bertelur, maka mentimun yang digunakan sebagai media bertelur dipisahkan dan ditempatkan pada stoples yang baru sampai ± 4 mentimun, ditutup dan diberi label tanggal. Setelah telur menetas, maka nimfa dipindahkan ke dalam stoples yang baru dan diberi mentimun yang masih segar. Begitu seterusnya sampai diperoleh jumlah yang diperlukan.

2. Pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

Sabouraud Dextrose Agar merupakan media yang mengandung pepton di dalamnya. Satu liter media ini dikomposisikan dari 40 gr Dextrose, 5 gr Pepton, 5 gr kasein, 15 gr agar dan 1 liter air destilata. Semua larutan dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan aluminium foil, dikencangkan dengan karet gelang dan dibungkus plastik tahan panas. Selanjutnya larutan SDA diautoclave selama ± 2 jam. Setelah itu diangkat dan didiamkan sebentar supaya sedikit lebih dingin. Kemudian larutan SDA dituangkan ke masing-masing petridish dalam ruangan steril (*Laminar Air Flow*).

3. Penyiapan isolat *Metarhizium anisopliae*

Isolat *M. anisopliae* didapatkan dari 5 tempat berbeda, yaitu dari Tegineneng, Gading Rejo, Bantul, UGM, dan Trimurjo. Kemudian melalui proses yang sama yaitu diisolasi guna memepertahankan dan memperbanyak isolat murni. Isolasi

dilakukan di laboratorium mikologi jurusan Proteksi Tanaman menggunakan media SDA (*Saborroud dextrose agar*) kemudian melalui tahapan inkubasi selama 1 bulan. Setelah itu, jamur siap digunakan untuk pengujian lebih lanjut.

4. Pengujian pertumbuhan jamur

Pengujian dilakukan pada pengukuran koloni cendawan dari masing-masing tempat. Isolat jamur diambil menggunakan bor gabus dan ditumbuhkan pada bagian tengah media SDA. Setelah itu cendawan diinkubasi untuk melihat pertumbuhannya dengan diukur diameter koloninya. Pengukuran dilakukan pada 3 cawan isolat di hari ke-2, ke-4, dan ke-6 setelah inokulasi.

5. Pengujian kerapatan konidia *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin.

Dalam penghitungan kerapatan, yang perlu dilakukan ialah memanen konidia jamur entomopatogen dari cawan dengan cara memasukkan 10 ml aquades dan 1 tetes air sabun, lalu *dishaker* selama 3 menit. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu diambil 1 ml dari suspensi dan dimasukkan ke tabung reaksi yang baru serta ditambah 9 ml aquades. Kemudian diambil kembali 1 ml dari suspensi dan dimasukkan ke tabung reaksi yang baru serta ditambah kembali 9 ml aquades. Maka sudah didapati pengenceran 10^{-2} /ml. Selanjutnya menutup ruang hitung Hemositometer dengan gelas objek dan meneteskan suspensi dengan pipet tetes, sehingga suspensi mengalir ke bawah kaca obyek dan mengisi ruang hitung. Lalu menghitung jumlah spora dalam 5 kotak sedang, yang masing – masing dilakukan di bawah mikroskop.

Jumlah spora dicatat dan dihitung dengan rumus :

$$\text{Kerapatan spora} = \frac{\text{rata - rata jumlah spora} \times 10^3 \times d}{0,04} \text{ (per ml)}$$

Keterangan :

d = tingkat pengenceran

0,04 = tingkat kedalaman haemocytometer pada kotak sedang

Uji kerapatan ini dilakukan sebanyak 3 kali ulangan dari setiap masing-masing perlakuan isolat.

6. Pengujian viabilitas *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin.

Untuk menguji viabilitas konidia *M. anisopliae*, yang perlu dilakukan adalah menuangkan kultur media SDA ke dalam cawan petri cekung secara tipis untuk melapisi dasar cawan. Kemudian mengambil suspensi *M. anisopliae* dengan pengenceran 10^{-2} /ml dan ditetaskan ke cawan cekung yang sudah berisi media SDA. Kemudian diinkubasi dalam ruangan isolasi. Konidia yang tumbuh dihitung setelah 24 jam. Rata-rata konidia yang tumbuh dan tidak tumbuh dihitung di bawah mikroskop.

Persentase rata-rata perkecambahan dihitung dengan rumus :

$$V = \frac{g}{(g + u)} \times 100\%$$

Keterangan :

V = persentase konidia yang berkecambah

g = jumlah rata-rata konidia yang berkecambah

u = jumlah rata-rata konidia yang tidak berkecambah.

7. Pengujian virulensi entomopatogen

Spora yang diambil dari media diencerkan dengan air steril sampai 10^{-2} /ml.

Kemudian disemprotkan pada 20 ekor imago *H. theivora* lalu serangga kembali dimasukkan ke toples diberi pakan mentimun dan ditutup kain sipon/kasa.

Pengamatan mortalitas dan kecepatan mortalitas serangga dilakukan berturut-turut selama 7 hari. Menurut Rustama *et al* (2008) mortalitas serangga dapat dihitung menggunakan rumus seperti berikut :

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

Keterangan :

M : mortalitas serangga (%)

n : serangga yang mati (ekor)

N : jumlah serangga yang diuji (ekor)