

### **III. BAHAN DAN METODE**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hama Tumbuhan Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung dan Laboratorium Lapangan Terpadu Fakultas Pertanian Universitas Lampung pada bulan Oktober 2014 – Agustus 2015.

#### **3.2 Bahan dan Alat**

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah SDA (*Sabouroud Dextrose Agar*), isolat jamur *B. bassiana*, beras, aquades, *tissue*, alkohol 70%, tepung biomassa spora, tepung jagung, glycerol, sukrose, tween-80, kaolin, zeolit, propilen glycol, Na-alginat, urea, dan air. Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *autoclave*, kompor, mikroskop, timbangan elektrik, panci, blender, ayakan, nampan, plastik tahan panas, aluminium foil, karet gelang, steples, rotamixer, tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer, botol film, bunsen, gelas ukur, *sprayer*, jarum ose, mikropipet, pinset, kertas label, alat tulis, dan kamera.

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pada penelitian ini digunakan 4 perlakuan dan 4 ulangan dengan perincian sebagai berikut :

Tabel.1 Deskripsi perlakuan komposisi formulasi kering dan formulasi pasta jamur *B. bassiana*.

Perlakuan	Jenis Formulasi	Deskripsi
F0	Formulasi Cair	Komposisi tepung biomassa spora 40 g + Air 60 ml
F1	Formulasi Kering	Komposisi tepung biomassa spora 40 g + Tepung jagung 20 g + Kaolin 20 g + Zeolit 20 g
F2	Formulasi Pasta1	Komposisi tepung biomassa spora 40 g + Glycerol 1,6 g + Na-alginat 1,7 g + Urea 0,2 g + Air 56,5 ml
F3	Formulasi Pasta2	Komposisi tepung biomassa spora 40 g + Glycerol 9,8 g + Tween-80 0,01 g + Sukrose 2,39 g + Air 47,8 ml

Data uji pertumbuhan jamur berdasarkan tiga komposisi formulasi yang berbeda dianalisis dengan sidik ragam (*analysis of variance* = ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5% dengan menggunakan perangkat SAS.

### 3.4 Persiapan Penelitian

#### 3.4.1 Perbanyak dan Pemeliharaan Serangga Uji (*A. glycines*)

Serangga dikembangkan dan dipelihara pada tanaman kedelai yang ditanam di Lahan Percobaan BPTP Natar.

#### 3.4.2 Pembuatan media SDA (*Sabouroud Dextrose Agar*)

Pembuatan media SDA (*Sabouroud Dextrose Agar*) memerlukan 40 g dextrose, 15 g agar, 5 g kasein, 10 g pepton, dan 1 liter air aquades. Semua bahan tersebut dicampur dan dimasukkan kedalam tabung Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan aluminium foil, dikencangkan dengan karet gelang, dan dibungkus plastik tahan panas. Setelah itu, semua bahan tersebut diautoklaf selama 2 jam. Kemudian media tersebut diangkat dan didiamkan hingga dingin. Selanjutnya, media yang telah siap pakai dituang ke masing-masing cawan petri dalam ruangan steril (*Laminar Air Flow*).

#### 3.4.3 Penyiapan Isolat *B. bassiana*

Penyiapan Isolat *B. bassiana* yang diuji dalam penelitian ini berasal dari Tegineneng setelah dilakukan uji pendahuluan. Kemudian dilakukan isolasi untuk mempertahankan isolat murni. Isolasi dilakukan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Lampung dengan menggunakan media SDA (*Sabouroud Dextrose Agar*) kemudian dilakukan inkubasi selama 30 hari.

#### 3.4.4 Perbanyak *B. bassiana* menggunakan media beras

Perbanyakkan *B. bassiana* menggunakan media beras yang telah disiapkan dicuci sampai bersih, kemudian disiram dengan air mendidih. Setelah itu beras dikukus hingga setengah matang selama 15 menit, kemudian diangkat dan dikering anginkan. Setelah beras dingin, sebanyak 100 g dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Padatkan dan posisikan beras tersebut pada bagian bawah plastik, bagian atas plastik yang telah terisi dirapihkan dan digulung lalu disteples. Beras tersebut disterilkan dengan autoklaf pada suhu 120° C, tekanan 1 atm selama 20 menit. Setelah diautoklaf beras diangkat dan dikeringkan. Kemudian *B. bassiana* diinkubasi selama 2-3 minggu.

#### 3.4.5 Pembuatan Formulasi *B. bassiana*

Bahan baku yang digunakan untuk pembuatan formulasi *B. bassiana* adalah tepung biomassa spora jamur *B. bassiana*. Cara pembuatan tepung biomassa spora jamur *B. bassiana* yaitu dengan dikeringkan jamur *B. bassiana* yang tumbuh pada media beras. Pengeringan dilakukan di dalam lemari pendingin pada suhu 10° C selama 12 hari. Setelah kering lalu dihaluskan dengan cara diblender dan diayak sehingga jadilah tepung halus yang banyak mengandung biomassa spora.

Dalam penelitian ini terdapat 4 jenis formulasi yang diuji, yaitu F0 (Formulasi Cair) dengan komposisi tepung biomassa spora 40 g ditambah Air 60 ml yang di campurkan di dalam cawan, F1 (Formulasi Kering) mengacu pada metode yang telah dilakukan oleh Purnomo *et al.* (2012) dengan komposisi tepung biomassa spora 40 g ditambah tepung jagung 20 g ditambah kaolin 20 g ditambah Zeolit 20 g yang di campurkan di dalam cawan.

F2 (Formulasi Pasta1) mengacu pada metode yang telah dilakukan oleh Suwahyono dan Wahyudi (2008) yang telah dimodifikasi menjadi komposisi tepung biomassa spora 40 g ditambah glycerol 1,6 g ditambah na-alginat 1,7 g ditambah urea 0,2 g ditambah air 56,5 ml yang dicampurkan di dalam cawan, F3 (Formulasi Pasta2) mengacu pada metode yang telah dilakukan oleh Suwahyono dan Wahyudi (2008) yang telah dimodifikasi menjadi komposisi tepung biomassa spora 40 g ditambah glycerol 9,8 g ditambah tween-80 0,01 g ditambah sukrose 2,39 g ditambah air 47,8 ml yang dicampurkan di dalam cawan.

### **3.5 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.5.1 Perhitungan Kerapatan Konidia *B. bassiana***

Setelah formulasi diperoleh, dilakukan perhitungan jumlah spora sehingga diketahui kerapatan spora atau jumlah dalam 1 suspensi. Untuk mengetahui kandungan sporanya diambil 1 g formulasi kering dari masing-masing perlakuan yang berupa bubuk halus dan dimasukkan ke dalam 10 ml aquades. Setelah itu dihomogenkan dengan rotamixer, kemudian dilakukan pengenceran sampai  $10^{-1}$  lalu dihitung jumlah sporanya dengan bantuan alat *Haemocytometer*. Dengan cara meneteskan suspensi *B. bassiana* dengan pengenceran  $10^{-1}$  ke atas permukaan *Haemocytometer* menggunakan mikropipet, kemudian permukaan *Haemocytometer* ditutup dengan gelas objek, sehingga suspensi mengalir ke bawah kaca objek dan mengisi ruang hitung. Lalu jumlah konidia dihitung dalam 5 kotak ukuran sedang. Semua pekerjaan perhitungan dilakukan di bawah

mikroskop binokuler dengan perbesaran 10 x 40. Menurut Pujiastuti *et al.* (2006), kerapatan spora dihitung dengan rumus :

$$\text{Kerapatan spora} = \frac{\text{Rata-rata jumlah spora}}{0,04 \times 0,1} \times 10^3$$

Keterangan ;

0,04 : Luas kotak sedang *Haemocytometer*

0,1 : Kedalaman *Haemocytometer*

10<sup>3</sup> : Perhitungan per ml

### 3.5.2 Pengujian Viabilitas *B. bassiana*

Untuk menguji viabilitas konidia *B. bassiana* yang potensial dari beberapa formulasi jamur *B. bassiana*, hal pertama yang perlu dilakukan adalah sporanya diambil 1 g formulasi kering dari masing-masing perlakuan yang berisi 10 ml aquades. Kemudian media tersebut diinkubasi dalam ruangan isolasi selama 24 jam. Setelah itu dihomogenkan dengan rotamixer dilakukan pengenceran sampai 10<sup>-1</sup> lalu dihitung jumlah sporanya dengan bantuan alat *Haemocytometer*. Rata-rata konidia yang tumbuh dan tidak tumbuh dihitung di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 10 x 40. Menurut Pujiastuti *et al.* (2006), persentase rata-rata perkembangan 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

### 3.5.3 Pengujian Patogenesitas Beberapa Formulasi *B. bassiana*

Biakan formulasi kering jamur *B. bassiana* diambil sebanyak 1 g, kemudian diencerkan dengan 10 ml air steril dalam tabung reaksi lalu dikocok dengan menggunakan rotamixer hingga tercampur merata. Setelah itu, suspensi jamur disemprotkan pada serangga uji sebanyak  $\pm 5$  ml dengan menggunakan modifikasi *handsprayer* (volume 20 ml). Suspensi jamur disemprotkan pada tanaman kedelai yang terserang kutudaun 25 ekor. Tanaman dipotong sepanjang 10cm dimasukkan ke dalam gelas plastik yang telah diisi oleh air sebanyak 10ml. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 7 hari setelah aplikasi atau sampai serangga uji mati. Menurut Malau *et al.* (2010), persentase mortalitas dihitung dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

PI : Persentase infeksi (%)

n : Serangga yang mati (ekor)

N : Jumlah serangga yang diuji (ekor)