

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2014 - Oktober 2014 di Laboratorium Hama Tumbuhan, Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Lampung dan Laboratorium Lapangan Terpadu, Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sungkup, polibag, karet gelang, cawan petri, jarum ose, bor gabus, mikropipet, bunsen, erlenmeyer, autoklaf, panci, kompor gas, alat tulis, cangkul, *sprayer*, tali plastik, gelas ukur, *ground cloth* (kain hampar), *pitfall trap*, timbangan elektrik, botol film, mikroskop, kaca pembesar (lup), meteran, dan kertas label.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu media SDA (*Sabouroud Dextrose Agar*), beras, isolat jamur *B. bassiana*, aqua destilata steril, tissue, alkohol 70%, dan pupuk kandang.

3.3 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui virulensi dari beberapa isolat jamur *B. bassiana* terhadap kutudaun. Isolat yang digunakan pada uji pendahuluan ini yaitu isolat jamur yang berasal dari Tegineneng, Sumber Jaya dan Trimurjo. Pengujian ini dilakukan dengan memasukkan setangkai tanaman kedelai terserang kutudaun pada toples yang ditutup kain kasa. Setiap perlakuan memiliki tiga ulangan. Selanjutnya disemprotkan masing-masing isolat dan diamati dari 1 – 7 hsa (hari setelah aplikasi) dan dihitung persentase kematian kutudaun. Parameter yang diamati yaitu jumlah dan waktu kematian kutudaun terinfeksi jamur *B. bassiana*. Hasil pengujian isolat yang paling efektif digunakan pada percobaan di lapang. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan maka diperoleh jamur *B. bassiana* isolat Tegineneng memiliki tingkat virulensi lebih tinggi dibandingkan isolat Sumber Jaya dan Trimurjo.

3.4 Metode Penelitian

Penelitian ini disusun berdasarkan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang dilakukan pada plot-plot percobaan yang masing-masing berukuran 1 m x 2 m. Terdapat enam (6) perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 1). Masing- masing perlakuan diulang sebanyak 3 (tiga) kali.

Tabel 1. Perlakuan Frekuensi Aplikasi *B. bassiana* terhadap hama *A. glycines*.

Perlakuan	Keterangan
F ₀	tanpa aplikasi
F ₁	1 kali aplikasi <i>B. bassiana</i> pada 2 MST
F ₂	2 kali aplikasi <i>B. bassiana</i> pada 2 dan 3 MST
F ₃	3 kali aplikasi <i>B. bassiana</i> pada 2, 3, dan 4 MST
F ₄	4 kali aplikasi <i>B. bassiana</i> pada 2, 3, 4, dan 5 MST
F ₅	5 kali aplikasi <i>B. bassiana</i> pada 2, 3, 4, 5 dan 6 MST

3.5 Persiapan Penelitian

3.5.1 Pembuatan Media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA)

Pembuatan media ini digunakan dengan mencampur bahan-bahan 40 g dextrose, 15 g agar, 5 g kasein, 10 g pepton, dalam 1 l air destilata. Bahan-bahan yang telah tercampur tersebut dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer kemudian ditutup dengan aluminium foil, dikencangkan dengan karet gelang, dan dibungkus plastik tahan panas. Erlenmeyer berisi media di sterilisasi dengan autoklaf selama 2 jam. Kemudian media tersebut diangkat dan didiamkan hingga agak dingin. Akhirnya, media yang telah siap pakai dituangkan ke masing-masing cawan petri dalam ruangan steril (*laminar air flow*).

3.5.2 Penyiapan Isolat *B. bassiana*

Berdasarkan uji pendahuluan yang telah dilakukan sebelumnya, maka isolat jamur *B. bassiana* yang digunakan dilapang adalah isolat jamur *B. bassiana* yang berasal dari Tegineneng. Isolat tersebut di 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.

3.5.3 Perbanyakan *B. bassiana* menggunakan media beras

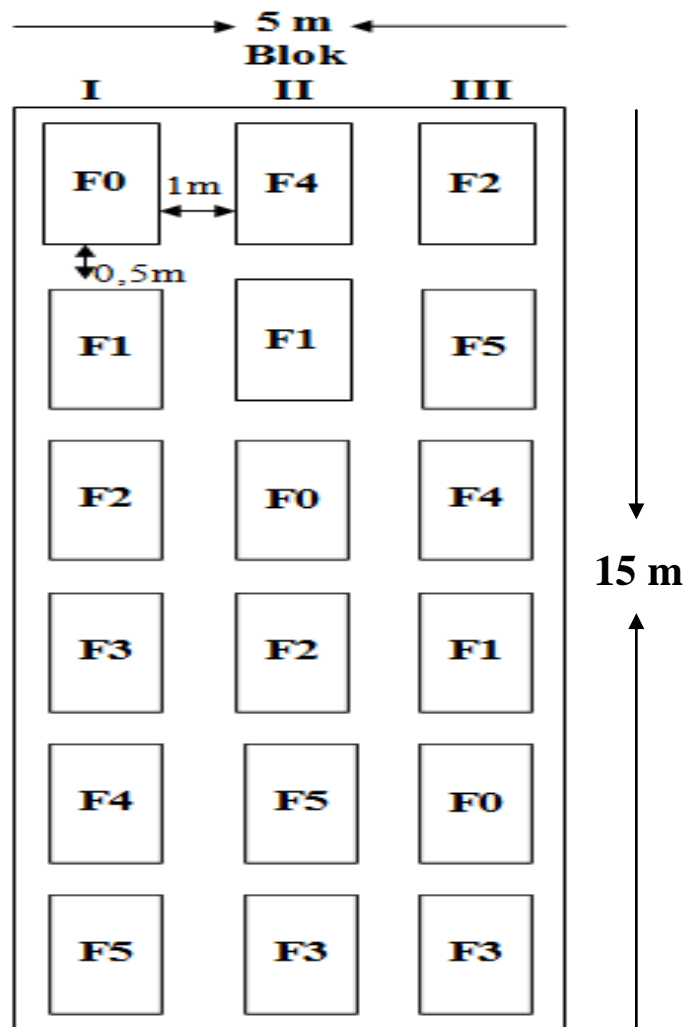
Beras yang telah disiapkan dicuci sampai bersih, kemudian disiram dengan air mendidih. Setelah itu, beras dikukus hingga setengah matang (± 15 menit), kemudian diangkat dan dikering anginkan. Setelah dingin, beras sebanyak 100 g dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Beras tersebut disterilkan dengan autoklaf pada suhu 120°C , tekanan 1 atm. Setelah diautoklaf, beras tersebut diangkat dan dikeringanginkan. Kemudian *B. bassiana* diinokulasi dan diinkubasi selama 2-3 minggu.

3.5.4 Pembuatan Formulasi Kering *B. bassiana*

Pembuatan formulasi kering dilakukan dengan mengeringkan *B. bassiana* yang tumbuh pada media beras. Pengeringan dilakukan di dalam lemari pendingin selama 12 hari. Kemudian beras dihaluskan dengan cara diblender dan diayak sehingga menjadi tepung biomassa spora. Setelah itu tepung biomassa spora dicampur dengan bahan pembawa, seperti kaolin, zeolit, dan tepung jagung, yang telah disterilisasi terlebih dahulu. Komposisi tepung biomassa spora dan bahan pembawa tersebut adalah: 40 g tepung biomassa spora, 20 g kaolin, 20 g zeolit, dan 20 g tepung jagung untuk menghasilkan formulasi kering sebanyak 100 g. Pembuatan formulasi kering ini mengacu pada Punomo dkk. (2012).

3.5.5 Penyiapan Lahan dan Pembuatan Plot

Lahan yang digunakan berada di Laboratorium Lapangan Terpadu, Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Lahan diolah agar tanah menjadi gembur dan bersih dari sisa- sisa akar. Kemudian dibuat tiga blok percobaan. Masing-masing plot berukuran 1 m x 2 m dengan jarak antarplot 0,5 m (Gambar 1). Pada setiap plot percobaan terdapat 3 tanaman sampel yang ditentukan secara acak. Jarak antara waktu pengolahan tanah dengan waktu penanaman sekitar 1- 2 hari.



Gambar 1. Tata Letak Plot Percobaan pengaruh frekuensi aplikasi *B. bassiana*; F₀ : Kontrol; F₁ : 1 kali aplikasi *B. bassiana* pd 2MST; F₂ : 2 kali aplikasi *B. bassiana* pd 2 & 3 MST; F₃ : 3 kali aplikasi *B. bassiana* pd 2, 3, & 4 MST; F₄ : 4 kali aplikasi *B. bassiana* pd 2, 3, 4, & 5MST; F₅ : 5 kali aplikasi *B. bassiana* pd 2,3,4,5 dan 6 MST.

3.5.6 Penanaman Kedelai

Penanaman dilakukan sekitar 1-2 hari setelah pengolahan tanah. Benih kedelai yang digunakan adalah varietas Dering. Penanaman benih dilakukan dengan cara tugal, yaitu dengan membuat lubang tugal sedalam 3- 4 cm lalu dimasukkan benih kedelai ke dalam tiap lubang tanaman, kemudian tutup dengan tanah halus dan tipis. Jarak tanam yang digunakan yaitu 30 cm x 30 cm.

3.5.7 Pemeliharaan Tanaman

Pemeliharaan tanaman berupa pemupukan, penyulaman, penyiraman, dan penyiangan gulma. Pemberian pupuk dilakukan dengan mencampur rata pupuk bersama tanah sewaktu akan tanam. Pupuk yang digunakan adalah pupuk kandang. Pupuk kandang yang digunakan sebanyak 75 kg untuk lahan seluas 150 m². Penyulaman dilakukan 5-6 hari setelah tanam apabila benih yang tidak tumbuh mencapai 10%. Penyiraman dilakukan secara rutin setiap sore, sedangkan penyiangan gulma dilakukan setiap minggunya.

3.6 Pelaksanaan Penelitian Aplikasi *B. bassiana*

Aplikasi *B. bassiana* dilakukan pada sore hari sesuai dengan perlakuan.

Banyaknya *B. bassiana* yang diaplikasikan (konsentrasi) adalah dengan menyuspensikan 20 gram formulasi kering dengan air menjadi 1 liter suspensi.

Volume semprot suspensi *B. bassiana* yang diaplikasikan adalah 70 ml/rumpun.

Metode aplikasi dilakukan dengan penyemprotan menggunakan *sprayer*.

Penyemprotan dilakukan sedemikian rupa agar tanaman dapat diaplikasikan secara merata. Lama waktu semprot yang digunakan pada saat pengaplikasian di lapang adalah 20 ml/detik, sehingga setiap rumpunnya disemprot selama 3,5 detik. Lama waktu semprot diperoleh dari kalibrasi yang dilakukan sebelumnya.

Perlakuan F0 atau kontrol dilakukan aplikasi tanpa *B. bassiana*. Perlakuan F1 dilakukan aplikasi *B. bassiana* sebanyak 1 kali pada 2 MST (minggu setelah tanam) saja. Perlakuan F2 dilakukan aplikasi *B. bassiana* sebanyak 2 kali pada 2 dan 3 MST. Perlakuan F3 dilakukan aplikasi *B. bassiana* sebanyak 3 kali pada 2, 3, dan 4 MST. Perlakuan F4 dilakukan aplikasi *B. bassiana* sebanyak 4 kali pada 2, 3, 4, dan 5 MST. Sedangkan perlakuan F5 dilakukan aplikasi *B. bassiana* sebanyak 5 kali pada 2, 3, 4, 5, dan 6 MST.

3.7 Teknik Pengamatan dan Pengumpulan Data

Pada setiap plot percobaan ditentukan secara acak tiga (3) rumpun tanaman yang terserang kutu daun sebagai sampel pengamatan kemudian ditandai sebagai tanaman sampel (terok). Pengumpulan data dilakukan menggunakan metode pengamatan secara langsung, teknik *ground cloth*, dan teknik *pitfall trap*.

3.7.1 Data Utama

3.7.1.1 Pengamatan mortalitas kutu *Aphis glycines* secara langsung dan dengan teknik *ground cloth*

Pengamatan mortalitas kutu dilakukan dengan dua metode, yaitu pengamatan secara langsung dan dengan teknik kain hampar. Pengamatan secara langsung dilakukan dengan mengamati kutu *A. glycines* mati terinfeksi jamur *B. bassiana* yang menempel pada bagian batang ataupun pada daun tanaman kedelai. Kain hampar (*ground cloth*) yang digunakan berukuran 30 cm x 30 cm. Sebelum aplikasi, kain hampar diletakkan di tanah pada tanaman sampel. Pengamatan dilakukan setiap hari hingga 7 hari setelah aplikasi. Kain hampar diperiksa untuk dihitung jumlah kutu *A. glycines* yang terinfeksi dan dilakukan identifikasi di Laboratorium Hama Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.7.1.2 Pengamatan populasi *Aphis glycines*

Pengamatan populasi kutu *A. glycines* secara langsung dilakukan dengan cara menghitung seluruh populasi kutu *A. glycines* di semua bagian tanaman kedelai. Populasi kutu *A. glycines* menggunakan kaca pembesar (lup) dan *hand colony counter* untuk mempermudah pengamatan.

3.7.1.3 Pengamatan organisme non-target

Pengamatan organisme nontarget dilakukan dengan teknik *pitfall trap*. *Pitfall trap* terbuat dari gelas plastik berdiameter 7cm dan tingginya 10cm yang diletakkan di dalam sebuah lubang pada tanah yang telah dipersiapkan sebelumnya. *Pitfall trap* diletakkan dengan bagian permukaan atas setara dengan permukaan tanah. *Pitfall trap* tersebut diisi dengan air sabun konsentrasi 5%. Untuk menghindari air masuk, bagian atas *pitfall trap* dinaungi oleh plastik mika yang disangga oleh kayu sepanjang 15cm. Pemasangan *pitfall trap* dilakukan setelah aplikasi. Pada masing-masing plot percobaan dipasang 2 *pitfall trap*. *Pitfall trap* dipasang selama 24 jam dan dilakukan hingga 7 hari setelah aplikasi. Untuk pengamatan, *pitfall trap* diambil dan dibawa ke Laboratorium Hama Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Lampung untuk penghitungan dan identifikasi organisme yang terjebak di dalam *pitfall trap*.

3.7.2 Data Penunjang

Data penunjang yang digunakan yaitu pengamatan pertumbuhan tanaman. Pengamatan dilakukan mulai 2MST. Variabel yang diamati adalah tinggi tanaman dan jumlah daun. Untuk 4- 6 MST dihitung dan diamati juga jumlah bunga, jumlah polong, dan berat polong. Pada proses pasca panen dilakukan penimbangan berat basah brangkasan tanaman dan polong. Penimbangan polong yang berisi dipisahkan dengan polong hampa dan dihitung jumlahnya. Setelah itu

brangkasan tanaman dan polong di oven selama 48 jam pada suhu 50°C.

Brangkasan tanaman dan polong kering dilakukan penimbangan kembali.

3.8 Analisis Data

Semua data utama yang meliputi mortalitas, populasi kutudaun (*Aphis glycines*) serta organisme nontarget dan data penunjang yang meliputi tinggi tanaman, jumlah daun, jumlah bunga, serta jumlah polong diuji dengan sidik ragam (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf nyata 5% dengan menggunakan perangkat pengolah data Statistik 8.