

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel buah kopi penelitian dilakukan pada perkebunan kopi rakyat di Sumberjaya. Kumbang penggerek buah kopi (*H. hampei*) diambil dan dikumpulkan dari buah-buah kopi yang terserang hama tersebut. Isolat jamur *B. bassiana* dari Sumberjaya didapatkan dari buah kopi yang terserang *H. hampei* dan kemudian diisolasi serta dibiakkan di laboratorium. Isolat *B. bassiana* asal Tigeneneng didapatkan dari Laboratorium Pengendalian Hayati Hama dan Penyakit Perkebunan di Tigeneneng yang belum diketahui asal serangannya. Isolasi dilakukan secara aseptik di Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Petanian, Universitas Lampung. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai dengan Oktober 2012.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan antara lain isolat jamur *B. bassiana* yang diisolasi dari kumbang *H. hampei* terinfeksi *B. bassiana* dari Sumberjaya dan isolat jamur *B. bassiana* dari Tigeneneng yang sudah berupa isolat murni dari Laboratorium Hama dan Penyakit Perkebunan Tigeneneng, media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*), aquades, alkohol 70 %, trimizin, plastik, kertas label, karet, kain dan buah-buah kopi, dan kumbang *H. hampei* dewasa. Alat yang digunakan dalam

penelitian ini adalah pisau/cutter, spidol, gunting, cawan petri, *laminar air flow*, bunsen, pinset, nampan plastik, gelas plastik, *rotamixer*, autoklaf, jarum ose, tabung reaksi, labu erlenmeyer, labu ukur, haemositometer, mikropipet, mikroskop majemuk, dan stoples plastik.

### **3.3 Metode Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Dua pengujian terpisah dilakukan yaitu, pengujian isolat jamur dari Sumberjaya dan isolat dari Tigeneneng. Masing-masing pengujian menggunakan lima perlakuan yaitu kontrol (air steril), suspensi jamur pada tingkat pengenceran P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, dan P<sub>4</sub>. Satuan percobaan disusun menggunakan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan 3 kelompok. Pengelompokan berdasarkan waktu aplikasi yang berbeda-beda. Jumlah serangga uji setiap satuan percobaan adalah 20 ekor kumbang *H. hampei* dewasa yang diambil langsung dari buah-buah kopi terserang di lapangan.

### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.1 Pengambilan Serangga Uji**

Serangga uji kumbang penggerek buah kopi dewasa *H. hampei* diambil dari buah kopi yang terserang *H. hampei* di lapangan. Kopi-kopi yang bergejala serangan dibelah menggunakan pisau *cutter* dan kumbang *H. hampei* dikumpulkan dan ditempatkan pada gelas– gelas plastik, setelah jumlahnya cukup segera diberi perlakuan suspensi jamur patogen.

### 3.4.2 Pembuatan Media SDA

Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) adalah media yang mengandung pepton dan kasein di dalamnya. Bahan yang digunakan untuk membuat 1 liter media ini dibutuhkan 40 gr gula pasir, 14 gr agar batang, 5 gr pepton, 10 gr kasein dan 1 liter air destilata. Semua bahan dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan aluminium foil, serta dikencangkan dengan karet gelang dan dibungkus plastik tahan panas. Selanjutnya, semua bahan yang telah dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer disterilkan selama  $\pm 2$  jam dengan tekanan 1 atm pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , kemudian didiamkan sebentar sampai dingin. Empat buah tablet trimizin antibiotik yang telah dihaluskan ditambahkan ke dalam media, dalam ruangan steril (*Laminar Air Flow*) media ini dituangkan ke Petridish.

### 3.4.3 Isolasi Jamur *Beauveria bassiana* dari Sumberjaya

Buah kopi yang mengandung *H. hampei* dan bertanda terinfeksi jamur *B. bassiana* diamati di bawah mikroskop stereo binokuler di Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan. Setelah diketahui bahwa jamur tersebut *B. bassiana*, dilakukan isolasi menggunakan media SDA (*Subouraud Dextrose Agar*). Kumbang *H. hampei* yang terinfeksi jamur *B. bassiana* diletakkan pada media SDA yang mulai disediakan. Pada media ini jamur *B. bassiana* dari *H. hampei* telah tumbuh pada hari ke tiga setelah inkubasi. Selanjutnya dilakukan pemindahan jamur ke media SDA yang baru untuk pemurnian dan diidentifikasi kembali. Perbanyak jamur dilakukan pada media yang sama selama dua puluh hari untuk mencapai pertumbuhan penuh. Isolat *B. bassiana* dari Tegineneng

didapatkan dalam bentuk isolat yang telah murni. Akan tetapi umur dari jamur tersebut sudah tua sehingga dibutuhkan peremajaan. Peremajaan dilakukan dengan mengambil sedikit *B. bassiana* dari isolat lama kemudian dipindahkan ke media SDA yang baru. Pertumbuhan penuh dari isolat *B. bassiana* asal Tegineneng dicapai pertumbuhan pada hari kedua puluh.

#### 3.4.4 Penyiapan Suspensi Jamur

Kultur *B. bassiana* pada cawan petri dicampur dengan aquades 10 ml, kemudian diaduk hingga rata agar spora terlepas dari media. Suspensi yang diperoleh ini adalah dianggap sebagai suspensi spora dengan tingkat pengenceran  $10^{-1}$ . Selanjutnya suspensi tersebut diencerkan lagi secara berseri sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , dan  $10^{-4}$ , yang selanjutnya disimbolkan pengenceran  $10^{-1}$  sebagai P<sub>4</sub>,  $10^{-2}$  sebagai P<sub>3</sub>,  $10^{-3}$  sebagai P<sub>2</sub>, dan  $10^{-4}$  sebagai P<sub>1</sub>.

Kerapatan spora pada setiap tingkat pengenceran secara berurutan dihitung dengan menggunakan haemositometer. Caranya, suspensi *B. bassiana* ditetaskan ke atas permukaan gelas haemositometer yang diletakkan di bawah mikroskop majemuk dengan perbesaran 400 X. Jumlah spora dihitung dengan bantuan *handcounter* sebanyak 3 kali. Kerapatan spora, diitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan : 0,04 : luas kotak sedang hemositometer

0,1 : kedalaman hemositometer

$10^3$  : perhitungan per ml

Masing-masing tingkat pengenceran suspensi diketahui konsentrasinya yaitu berturutan  $P_1 = 10^5$ ,  $P_2 = 10^5$ ,  $P_3 = 10^6$  dan  $P_4 = 10^7$ .

#### **3.4.4 Aplikasi Suspensi Jamur**

Aplikasi jamur *B. bassiana* pada kumbang *H. hampei* dilakukan dengan metode tetes. Sebanyak 20 ekor kumbang *H. hampei* dewasa diletakkan pada setiap wadah gelas plastik (*cup*), yang dialasi kertas saring. Kemudian, dengan cara memiringkan *cup* kumbang *H. hampei* uji dikondisikan agar dalam posisi berkumpul, kemudian ditetesi dengan suspensi jamur sesuai dengan dosis (tingkat pengenceran) sebanyak tiga tetes per satuan percobaan sehingga dapat dipastikan bahwa seluruh kumbang terkena tetesan suspensi jamur. Pada perlakuan kontrol, kumbang ditetesi dengan air steril. Kumbang *H. hampei* yang telah diberi perlakuan suspensi jamur, kemudian dipindahkan ke buah kopi sehat sebanyak 20 butir per wadah dan diinkubasi pada suhu ruang.

#### **3.4.6 Pengamatan**

Pengamatan kemunculan tanda adanya infeksi jamur entomopatogen dilakukan setiap hari pada kumbang *H. hampei* yang telah mati. Kumbang *H. hampei* yang telah mati diamati dengan menggunakan mikroskop untuk melihat tanda adanya infeksi jamur. Pengamatan juga dilakukan pada kopi yaitu dengan melihat adanya tanda hifa jamur pada liang gerakan kumbang *H. hampei*. Pengamatan terakhir yaitu 15 hari setelah aplikasi, dilakukan dengan cara membelah buah – buah kopi menggunakan pisau. Kumbang-kumbang di dalam buah diamati dan ditetapkan kumbang mati terinfeksi jamur dan kumbang sehat.

Tingkat kematian *H. hampei* berjamur dihitung dengan rumus :

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

Keterangan :

- M : Persentase kematian akibat *Beauveria bassiana* (%)  
 n : Jumlah serangga yang mati akibat infeksi jamur (ekor)  
 N : Jumlah serangga yang diuji (ekor)

Selain tingkat mortalitas, variabel lain yang diukur dalam penelitian ini adalah waktu kematian kumbang *H. hampei* uji yang dihitung melalui periode letal dan virulensi *B. bassiana* dengan rumus Susilo *et al.*, (1993, dalam Indiyati 2009).

$$\text{Periode Letal (T)} = [\sum(H_i \times M_i)] / [\sum(M_i)]$$

$$\text{Virulensi } (\delta) = 1/T$$

dengan

- T = Periode Letal  
 Hi = Waktu kematian (periode letal individu serangga uji)  
 Mi = Jumlah serangga yang mati (terinfeksi)

Dalam analisis data yang disajikan virulensi adalah dalam satuan persen (%) yaitu  $1/T \times 100\%$ .

### 3.4.7 Analisis Data

Data tingkat mortalitas dianalisis dengan analisis regresi linier pada taraf nyata 5%. Untuk menurunkan keragaman data kepadatan spora ditransformasi ke log<sub>10</sub>. Data hasil pengamatan virulensi dan periode letal dianalisis ragam dan pemisahan nilai tengah menggunakan uji BNT. Semua analisis statistik menggunakan taraf nyata 1% atau 5%.