

## **BAB III**

### **METODE PERCOBAAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) Faktorial dengan 2 faktor perlakuan, yaitu perlakuan jenis isolat (HJMA-5 dan HJMA-8) dan perlakuan konsentrasi ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  konidia/ml dan kontrol) dengan 4 kali ulangan, sehingga diperoleh 40 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdiri dari 20 ekor larva instar 3.

#### **3.2 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium untuk mengetahui patogenesis isolat HJMA-5 dan HJMA-8 terhadap mortalitas larva *H. armigera*.

#### **3.3 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Juni 2014, di Laboratorium Patologi Serangga, Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat Karangploso, Malang.

#### **3.4 Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah toples plastik untuk media pembiakan larva *H. armigera*, toples plastik untuk media pemeliharaan ngengat/imago *H. armigera*, vial plastik untuk media larva uji, nampan plastik, erlenmeyer 50 ml, kuas kecil, pipet tetes, *blender*, kompor gas, panci, pisau, sendok, mikroskop, inkubator, *Laminar Air Flow* (LAF), pengaduk,

*haemocytometer*, objek *glass*, *cover glass*, *micropipet*, *autoclave*, gelas ukur, tabung reaksi, gunting, kain kasa, botol kaca, lemari pendingin, kertas label dan alat-alat tulis. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur *M. anisopliae* isolat lokal (HJMA-5 dan HJMA-8), larva *H. armigera* instar 3, pakan buatan untuk larva *H. armigera* (berbahan dasar: tepung kedelai, agar, fermipan, *Sorbic acid*, *Ascorbic acid*, *vitamine mix*, *Streptomycin sulfat*, formalin, nipagin dan air) madu, air, *tissue*, 0.05% tween 80, kloroks, formalin dan kain kasa.

### **3.5 Variabel Penelitian**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah larva *H. armigera* dan konsentrasi isolat jamur *M. anisopliae* yaitu  $10^5$  konidia/ml,  $10^6$  konidia/ml,  $10^7$  konidia/ml,  $10^8$  konidia/ml dan kontrol. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah mortalitas harian larva *H. armigera* selama 14 hari,  $LC_{50}$  dan  $LT_{50}$ .

### **3.6 Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1 Persiapan Penelitian**

##### **3.6.1.1 Perbanyak Larva *H. armigera* (Rearing)**

Selama pemeliharaan, larva *H. armigera* diberikan pakan buatan. Saat stadia prepupa dan pupa (10-12 hari), larva dipindah ke dalam vial yang diisi pasir steril hingga diperoleh pupa. Pupa yang diperoleh dipindah ke dalam toples pemeliharaan hingga muncul imago. Imago yang muncul dimasukkan ke dalam toples yang bagian dalam dindingnya dilapisi dengan kain untuk meletakkan telur, kemudian ditutup dengan kain kasa pada bagian atas toples. Imago diberi pakan larutan madu yang telah direbus. Imago dipelihara dan dibiarkan kawin dalam toples untuk menghasilkan telur.

Pupa dan telur disterilisasi dengan 4 ml formalin + 1 liter air + 8 ml kloroks selama 30 menit untuk mencegah kontaminasi patogen. Kemudian pupa dan telur dijemur hingga kering. Telur diinkubasi di dalam toples penetasan selama kurang lebih 2-3 hari. Untuk pengujian digunakan larva (Instar 3) generasi baru dari telur yang telah menetas.

### **3.6.1.2 Pembuatan Pakan Buatan**

Pakan buatan dibuat dengan cara merebus 15 gr agar dengan 950 ml air sambil diaduk-aduk hingga mendidih. Kemudian agar dihaluskan dengan *blender*. Selama penghalusan agar, dimasukkan sedikit demi sedikit 100 gr tepung kedelai, 15 gr fermipan, 0,5 gr nipagin 1 gr *Sorbic acid* dan *Ascorbic acid*, 5 gr *vitamine mix*, 0,1 gr *Streptomycin sulfat*, dan 1 ml formalin. Setelah tercampur merata, semua bahan direbus kembali hingga mendidih sambil diaduk-aduk. kemudian dituang ke dalam nampan dan ditunggu hingga dingin atau mengental. Pakan yang telah mengental disimpan dalam lemari es.

### **3.6.1.3 Pembuatan Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)**

Dikupas 0,5 kg kentang dan direbus dengan 2000 ml aquades hingga mendidih. Setelah mendidih kentang disaring dan diambil larutannya sebanyak 2000 ml. Larutan kentang dicampur dengan 30 gr agar dan direbus sambil diaduk hingga mendidih. Larutan kentang yang telah mendidih di masukkan ke dalam 10 buah labu *Erlenmeyer* ukuran 500 ml, masing-masing labu diisi 200 ml larutan kentang. Kemudian labu yang berisi larutan kentang disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121° C, tekanan 1 atm selama 1,5 jam. Kemudian dituang ke dalam cawan petri secukupnya atau hingga rata pada permukaan cawan.

#### **3.6.1.4 Perbanyak Isolat Jamur *M. anisopliae* dalam Media PDA**

Perbanyak jamur dilakukan di dalam LAF dengan cara menumbuhkan isolat pada media PDA. Penumbuhan isolat jamur pada media PDA dilakukan dengan cara mengambil isolat menggunakan jarum ose sebanyak 1 ose kemudian diinokulasi ke dalam media PDA. Isolat diinkubasi dengan inkubator pada suhu 28° C selama kurang lebih 21-30 hari hingga jamur tumbuh dengan menampakan konidia yang berwarna kehijauan. Jamur kemudian dipanen dengan cara dikeruk konidianya dari media menggunakan *skalpel* steril.

#### **3.6.1.5 Pembuatan dan Pengenceran Suspensi Konidia *M. anisopliae***

##### **3.6.1.5.1 Pembuatan larutan stok**

Prosedur pembuatan larutan stok jamur adalah sebagai berikut:

1. Ditimbang 0.1 gr konidia jamur *M. anisopliae*
2. Dimasukkan konidia jamur ke dalam *beaker glass* berukuran 100 ml
3. Ditambah 50 ml 0.05% tween 80
4. Dikocok suspensi konidia jamur hingga homogen

##### **3.6.1.5.2 Pengenceran larutan stok**

Prosedur pengenceran suspensi jamur adalah sebagai berikut:

1. Disiapkan tabung reaksi berukuran 15 ml sebanyak 4 buah. Masing-masing tabung diberi label 10x, 100x, 1000x dan seterusnya sampai pengenceran yang diinginkan atau sampai konidia dapat dihitung.
2. Diambil 1 ml konidia dari stok, larutkan ke dalam 9 ml aquades pada tabung berlabel 10x. Kocok sampai larutan menjadi homogen. Apabila larutan masih terlalu pekat, encerkan lagi dengan cara yang sama sampai 100x atau 1000x.

### 3.6.1.6 Penghitungan Konidia Jamur

Langkah penghitungan konidia jamur adalah sebagai berikut:

1. Disiapkan *haemocytometer* dan diletakkan pada meja preparat mikroskop.  
Ditutup dengan gelas penutup
2. Diamati dengan perbesaran 40x, untuk mendapatkan bidang hitung pada *haemocytometer*
3. Diteteskan larutan konidia dari stok secara perlahan pada bidang hitung dengan *micropipet* hingga memenuhi kanal
4. Didiamkan satu menit agar posisi stabil
5. Diulangi pengamatan untuk memperoleh fokus pada konidia dan bidang hitung
6. Dihitung jumlah konidia yang terdapat pada kotak hitung pada 5 bidang pandang dengan perbesaran 40x menggunakan *handcounter*. Dilakukan 2 kali penghitungan untuk tiap bidang hitung
7. Dihitung rata-rata konidia dalam setiap 16 kotak kecil secara pengamatan diagonal

$$\text{Rata-rata konidia tiap 16 kotak (R)} = \frac{\text{I+II+III+IV+V}}{5}$$

Setelah diketahui banyaknya konidia pada kotak hitung *haemocytometer*, dihitung jumlah konidia dengan rumus:

$$S = R \times K \times F$$

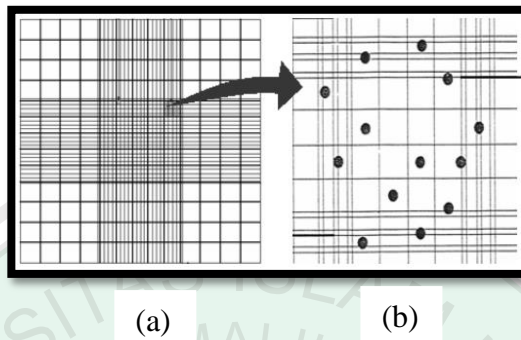
Keterangan:

S = jumlah konidia

R = jumlah rata-rata konidia pada 5 bidang pandang *haemocytometer*

K = konstanta koefisien alat ( $2.5 \times 10^5$ )

F = Faktor pengenceran yang dilakukan.



**Gambar 3.1** *Haemocytometer* (a) kamar hitung pada *haemocytometer* dan (b) satu buah kamar hitung pada *haemocytometer* (Rustama dkk., 2008).

### 3.6.1.7 Pembuatan Konsentrasi Konidia Jamur

Konsentrasi konidia jamur yang digunakan antara lain:  $10^5$  konidia/ml,  $10^6$  konidia/ml,  $10^7$  konidia/ml dan  $10^8$  konidia/ml. Pembuatan konsentrasi jamur dapat dilakukan dengan mengencerkan larutan stok menggunakan rumus (Rustama dkk., 2008):

$$V1 \cdot N1 = V2 \cdot N2$$

Keterangan:

V1 = volume larutan stok (ml)

N1 = konsentrasi larutan stok (konidia/ml)

V2 = volume larutan yang diharapkan (ml)

N2 = konsentrasi larutan yang diharapkan (konidia/ml)

### 3.6.2 Perlakuan

Perlakuan dilakukan dengan menyiapkan larva *H. armigera* instar 3 sebanyak 20 ekor larva untuk setiap perlakuan. Perlakuan dilakukan dengan metode pencelupan, yaitu dengan mencelupkan larva uji pada konsentrasi isolat selama 5-10 detik. Larva uji dimasukkan ke dalam vial plastik, masing-masing vial plastik berisi satu ekor larva *H. armigera* dengan pakan. Diamati sesuai dengan parameter pengamatan.

### 3.7 Analisis Data

Mortalitas larva *H. armigera* dianalisis menggunakan uji F faktorial *two way*, dan dilanjutkan uji perbandingan Duncan pada taraf signifikansi 0,05 (5%), sedangkan LC<sub>50</sub> dan LT<sub>50</sub> dianalisis menggunakan analisis probit.

Mortalitas larva dihitung dengan rumus (Susniahti dkk., 2005):

$$%M = \frac{A}{B} \times 100\%$$

Keterangan: A = Jumlah larva *H. armigera* yang mati (ekor)

B = Jumlah larva *H. armigera* yang diuji (ekor)

Mortalitas larva pada kontrol dikoreksi dengan formula Abbot, yaitu (Finney, 1952 dalam Susniahti dkk., 2005):

$$P_t = \frac{P_o - P_c}{100 - P_c} \times 100\%$$

Keterangan: P<sub>t</sub> = persentase banyaknya larva mati setelah dikoreksi

P<sub>o</sub> = persentase banyaknya larva mati setelah perlakuan

P<sub>c</sub> = persentase banyaknya larva mati pada kontrol