

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat (BALITTAS) Karangploso Malang pada bulan Maret sampai Mei 2014.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri kecil (9cm), cawan petri besar (14cm), kertas saring, gunting, label, vial, pipet tetes, spidol permanen, pinset, tisu, mikropipet, tutup vial, mikroskop, petridish, spayer, nampan, dan toples.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva *Spodoptera litura* instar IV, larva *Tenebrio molitor*, isolat nematoda, dan formalin.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan acak kelompok faktorial dengan 3 ulangan. Perlakuan yang dicobakan yaitu 3 isolat Jatim: (1.) PH-1, (2.) PH-2, dan (3.) DKS-1. Masing-masing perlakuan diujikan secara terpisah terhadap 20 ekor larva *Spodoptera litura* dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu 0 JI/ml, 50 JI/ml, 100 JI/ml, dan 200 JI/ml.

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Pembiakan Larva *Spodoptera litura*

Pembiakan serangga uji dilakukan dengan mengumpulkan larva *Spodoptera litura* dari lapangan kemudian dipelihara di Laboratorium Patologi

Serangga BALITTAS Malang dengan menggunakan wadah plastik. Kemudian untuk pemeliharaan larva diberi makan daun jarak kepyar yang diganti setiap hari. Saat larva akan memasuki stadia pupa, maka larva-larva tersebut dipindahkan ke dalam tempat besi berbentuk kotak yang ditutup dengan kain kasa. Pupa yang telah menetas menjadi imago, dipindahkan ke toples yang dindingnya dilapisi kain kasa, masing-masing toples berisi 20 ekor imago yang terdiri dari jantan dan betina, kemudian diberikan larutan madu sebagai makanan yang diganti setiap hari.

Imago dibiarkan berkopulasi dan meletakkan telur pada kain kasa ataupun pada dinding stoples. Telur yang ada pada kain kasa atau dinding toples kemudian dipanen dan dipindahkan ke dalam toples lain untuk penetasan larva. Sebelum dipindahkan, telur disterilkan dahulu dengan dengan larutan clorok 8 ml+ 4 ml formalin+ air 1 liter, kemudian dibiarkan selama 30 menit, setelah 30 menit telur dibilas dengan air bersih, dan dikeringkan. Sesudah kering, telur diletakkan di toples lain dan ditutup dengan kertas, ditunggu hingga telur menetas. Setelah menetas larva-larva kecil dipindahkan lagi ke dalam kotak pemeliharaan yang diisi dengan daun jarak kepyar sebagai makanan larva. Larva-larva terus dipelihara dengan diberikan makanan daun jarak kepyar segar sampai memasuki instar IV.

3.3.2 Pembiakan Nematoda

Isolat nematoda yang diujikan pada *Spodoptera litura* merupakan koleksi Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat Malang. Nematoda diperbanyak secara *in vivo* menggunakan *Tenebrio molitor* (Ulat hongkong). Teknik

pembiakan nematoda menggunakan metode White Trap (Woodring dan kaya, 1988). Setelah larva terinfeksi nematoda, kemudian dibilas dengan air bersih dan dipindahkan ke dalam cawan petri (14cm) yang dialasi kertas saring, larva yang mati diposisikan secara melingkar diatas kertas saring maksimal 20 ekor, dan cawan petri diisi dengan aquades sampai mencapai setengah cawan, selanjutnya diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang (29-30⁰ C). Nematoda dipanen dengan cara dipindahkan ke dalam vial bersih dan dibilas minimal 3x.

3.3.2 Uji Patogenisitas NEP Terhadap Larva *Spodoptera litura*

Pengujian dilakukan dengan metode kertas saring. Pertama menyiapkan vial-vial kecil yang dilapisi kertas saring sebanyak 540 buah dan diletakkan dalam box, masing-masing box berisi 20 vial, jadi terdapat 27 box + 3 kontrol. Kemudian menghitung konsentrasi nematoda yang akan dipakai pada percobaan dengan mengencerkan suspensi nematoda yang telah dipanen. Menyiapkan air 100ml pada gelas ukur kemudian ditetesi 2 ml nematoda, dan diaduk hingga air dan nematoda bercampur. Kemudian ditetaskan nematoda ke dalam petri kecil yang sudah diberi bilik-bilik, dan dihitung jumlahnya. Dilakukan pengulangan perhitungan sebanyak 3x untuk mencari rata-rata. Kemudian dimasukkan rumus :

- Contoh: didapat hasil pada perhitungan nematoda $44+40+44=128:3= 46$
 $46 \times 3 \times 100 = 9200$

Pelaksanaan percobaan menggunakan metode kertas saring dilakukan dengan cara memasukkan 20 larva *Spodoptera litura* instar IV ke dalam vial yang berisi kertas saring di dalamnya yang sebelumnya telah diinfestasikan 3 isolat nematoda yaitu: DKS-1, PH-1, dan PH-2 dengan konsentrasi yang berbeda-

beda. Konsentrasi berkisar 0 JL/ml, 50 JI/ml, 100 JI/ml, 200 JI/ml. Pelaksanaan percobaan dikelompokkan per ulangan, jadi ulangan pertama terdiri dari 9 box + 3 kontrol, demikian dengan ulangan 2 dan ulangan 3. Masing-masing box ditetesi dengan konsentrasi nematoda yang sudah disiapkan, masing-masing larva ditetesi $\frac{1}{2}$ ml suspensi nematoda, kemudian larva diberi pakan daun jarak kepyar yang dipotong kecil-kecil 3 jam setelahnya. Jumlah larva yang mati dicatat tiap hari dan seterusnya sampai tidak ada larva yang mati.

3.3.4 Produksi NEP

Setiap larva yang mati dipindahkan ke White Trap untuk memancing nematoda agar keluar. 1 White Trap diisi 5 ekor ulat yang sudah mati dari konsentrasi dan ulangan yang sama. Dalam 1 box terdapat 20 ekor larva, jadi masing-masing box menghasilkan 4 White Trap. Kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu ruangan, ditunggu sampai nematoda keluar. Setelah 7-10 hari, nematoda keluar kemudian dipanen. Nematoda dipanen sebanyak 3 kali. Panen dilakukan 2 hari sekali sampai 3 kali, kemudian hasil dari panen ke-1, panen ke-2, dan panen ke-3 dicampur dalam 1 botol dan dihitung produksi nematodanya.

Menghitung produksi nematoda perkonsentrasi adalah dengan memasukkan aquades sebanyak 80ml ke dalam gelas ukur 100ml, kemudian nematoda hasil dari panen 3x diambil $\frac{1}{2}$ ml dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam gelas ukur, lalu ditambah aquades sampai mencapai 100ml. Cara menghitungnya dengan mengambil $\frac{1}{2}$ ml dari gelas ukur dan ditetaskan ke petri kecil yang diberi bilik-bilik kecil untuk menghitung jumlah nematodanya dalam

lingkaran, diulang sebanyak 3 kali untuk mendapatkan rata-rata, kemudian dimasukkan ke dalam rumus :

Rata-rata $\times 2 \times 100$ (pengenceran) = hasil

Contoh: $53,6 \times 2 \times 100 = 10.720$ ekor/ml

- Untuk mengetahui produksi nematoda per konsentrasi maka jumlah stok nematoda dalam 1 konsentrasi dikalikan hasil

Contoh: jumlah stok isolat 85ml, jadi $10.720 \times 85 = 9112.2$ JI/ml

- Sedangkan untuk mengetahui produksi nematoda per panen maka hasil produksi nematoda per konsentrasi dibagi 3

Contoh: $9112.2 : 3 = 303.73$ JI/panen

- Sedangkan untuk mengetahui produksi nematoda dalam 1 ulat maka hasil produksi nematoda dalam 1 ulat dibagi 5

Contoh: $303.73 : 5 = 60.746$ JI/ulat

3.3.4 Parameter yang Diamati

1. Mortalitas larva *Spodoptera litura* yang didapatkan dengan rumus :

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\sum \text{Larva mati}}{\sum \text{Larva Uji}} \times 100\%$$

2. LC_{50} (Lethal Concentration) adalah konsentrasi yang menyebabkan larva uji mati sebanyak 50%. LC_{50} dihitung dengan menggunakan model hubungan antara mortalitas dan konsentrasi
3. LC_{90} (Lethal Concentration) adalah konsentrasi yang menyebabkan larva uji mati sebanyak 90%. LC_{90} dihitung dengan menggunakan model hubungan antara mortalitas dan konsentrasi
4. Produksi nematoda entomopatogen per ulat

5. Histologi larva *Spodoptera litura* yang terinfeksi nematoda entomopatogen.

3.4 Analisis Data

Untuk mengetahui jumlah mortalitas larva *Spodoptera litura* maka data yang didapat dianalisis dengan uji ANOVA *two way* menggunakan *software SPSS 16*. Jika dari hasil analisis tersebut ada pengaruh signifikansi 5% maka dilanjutkan dengan Uji jarak *Duncan* dengan taraf signifikansi 5% menggunakan analisis *software SPSS 16*. Sedangkan untuk mengetahui nilai LC_{50} dan LC_{90} digunakan analisis probit *software SPSS 16*.

