

### **III. TATA CARA PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan tempat**

Penelitian ini telah dilaksanakan di Lab Bioteknologi dan *Green house* Universitas Muhamadiyah Yogyakarta pada bulan Agustus 2017.

#### **B. Bahan dan alat penelitian**

**Bahan** yang digunakan meliputi EM4, dedak, sekam, daun kelapa, sabut kelapa, serbuk gergaji batang kelapa, media agar PDA, alkohol, molase, larva *O. rhinoceros* sehat instar III, isolasi jamur *Metarhizium Sp*, dan aquadest.

**Alat** yang akan digunakan meliputi mikroskop, gelas benda, cawan petri, drigalsky, pipet steril, jarum ose, thermometer, karung plastik, sendok semen, ember, alat tulis kantor, tali, botol, dan penyiram air.

#### **C. Metode penelitian**

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap. Tahap satu adalah pembuatan kompos dari limbah perkebunan kelapa, Tahap dua adalah perbanyakan jamur *M. anisopliae* pada berbagai kompos limbah perkebunan kelapa. Tahap tiga adalah aplikasi kompos aktif terhadap hama kumbang badak fase larva instar III.

**Tahap 1 : Pembuatan kompos dari limbah perkebunan kelapa.**

Limbah perkebunan kelapa yang digunakan pada tahap pembuatan kompos adalah sebagai berikut :

- A. Daun Kelapa
- B. Sabut Kelapa
- C. Serbuk Gergaji Batang Kelapa

Setiap perlakuan diulang tiga kali sehingga didapatkan 9 unit perlakuan. Kematangan kompos diuji dengan standart SNI.

**Tahap 2 : Perbanyak jamur *M. anisopliae* pada berbagai kompos limbah tanaman kelapa.**

Tahap ini disusun menggunakan metode faktor tunggal Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan sebagai berikut :

- A. Kompos Daun Kelapa
- B. Kompos Sabut Kelapa
- C. Kompos Serbuk Gergaji Batang Kelapa

Masing – masing perlakuan diulang tiga kali sehingga didapatkan 9 unit perlakuan. Setiap unit diambil tiga sampel yaitu atas, tengah, bawah.

**Tahap 3 : Aplikasi kompos aktif terhadap kumbang badak.**

Tahap ini menggunakan rancangan faktor tunggal yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan yaitu :

- A. Kompos Aktif Daun Kelapa
- B. Kompos Aktif Sabut Kelapa
- C. Kompos Aktif Serbuk Gergaji Batang Kelapa

Selain itu ditambah perlakuan serbuk gergaji batang kelapa sebagai kontrol dan Serbuk Gergaji Batang Kelapa+Starter *Metarhizium anisopliae*. Setiap perlakuan diulang tiga kali sehingga didapatkan 15 unit perlakuan, dan setiap perlakuan menggunakan 5 larva *O. rhinoceros*, sehingga total hama *O. rhinoceros* yang dibutuhkan adalah 75 hama (lampiran 1).

#### **D. Cara penelitian**

##### **Tahap 1. Pembuatan Kompos Dari Limbah Perkebunan Kelapa**

1. Bahan organik (lampiran 4.b) yaitu daun kelapa, Serbuk gergaji batang kelapa dan sabut kelapa masing – masing sebanyak 20 Kg dibuat berukuran kecil dengan cara pemotongan atau mencacah sehalus mungkin (lampiran 4.a).
2. Mencampur larutan molase sebanyak 67 ml dengan larutan EM-4 sebanyak 67 ml.
3. Bahan Organik, 3,3 kg pupuk kandang, 6,6 kg arang sekam, dan 10 kg dedak dicampur merata kemudian disiram dengan larutan molase + EM-4 dan diaduk hingga rata (lampiran 4.c), dan ditambahkan air secukupnya hingga kadar airnya 30%, dengan ciri apabila dikepalkan menggumpal dan tidak hancur.

4. Adonan yang sudah jadi kemudian dimasukan kedalam karung setelah itu ditutup rapat dan karung pada sisi sampingnya dilubangi untuk aerasi (lampiran 4.d).
5. Membolak – balik adonan apabila suhunya lebih dari 50<sup>0</sup>C.
6. Setelah 30 hari kompos siap digunakan.
7. Pengamatan yang dilakukan pada kompos meliputi pengamatan suhu, warna, kadar air, nisbah C/N, dan pH.
  - a. Suhu

Pengamatan suhu dilakukan selama 4 minggu, pada minggu pertama pengamatan suhu dilakukan setiap hari, pada minggu ke dua hingga ke empat pengamatan suhu dilakukan satu minggu sekali. Pengukuran suhu dilakukan menggunakan alat *Thermometer* derajat Celcius (<sup>0</sup>C) dengan melihat skala yang ditunjukkan pada alat tersebut. Pengamatan suhu pada kompos dilakukan dengan cara menancapkan *thermometer* pada lapisan bahan kompos.

- b. Warna

Pengamatan perubahan warna kompos menggunakan *Munsell Soil Color Chart*. Perubahan warna diamati setelah kompos berumur satu minggu, dengan pengamatan tiap seminggu sekali hingga minggu ke empat. Pengamatan warna pada bahan kompos dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak  $\pm 3$  gram (pada lapisan atas, tengah, dan bawah) kemudian diletakkan dibawah kertas *munsell* menggunakan jari.

Kemudian warna kompos tersebut dicocokkan dengan warna – warna yang terdapat dalam lembaran buku *Munsell Soil Color Chart*.

c. Kadar air

Pengukuran kadar air bahan kompos dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 10 gram. Cawan kosong ditimbang terlebih dahulu untuk mendapatkan berat awal, kemudian cawan diberi bahan seberat 10 gram, hasil timbangan cawan + bahan dicatat. Setelah itu cawan beserta bahan di oven hingga kadar airnya konstan.

d. pH

Pengukuran derajat kemasaman menggunakan pH universal dan dilakukan seminggu satu kali, yaitu dengan mengambil 2,5 g sampel yang dilarutkan dalam 25 ml aquades dan ditunggu hingga 1 menit. Kertas pH universal dicelupkan hingga batas warna kemudian dicocokkan dengan kotak pH.

e. Nisbah C/N

Nisbah C/N merupakan parameter yang digunakan untuk menentukan tingkat kematangan suatu kompos. Kompos yang sudah memenuhi syarat untuk diaplikasikan pada tanaman harus sudah mencapai tingkat kematangan, dengan nisbah C/N kurang dari 20%.

## **Tahap 2. Perbanyak *M.anisopliae* Pada Berbagai Kompos Limbah Perkebunan Kelapa**

1. Karakterisasi starter *Metarhizium anisopliae*
  - a. Menyiapkan alat seperti petridish, tabung reaksi, Bunsen, dan ose. Bahan yang disiapkan adalah media PDA, dan kultur murni *M. anisopliae*.
  - b. Media PDA dituangkan pada petridish dan tabung reaksi sebagai media miring.
  - c. Kultur murni *M. anisopliae* di inokulasikan pada petridish dan tabung reaksi
  - d. Inkubasi selama 2-3 hari
  - e. Mengamati perumbuhan jamur *Metarhizium anisopliae* yang diinokulasi pada petridish (lampiran 5.a) dengan mikroskop (lampiran 5.b).
2. Pembuatan media inokulum *M. anisopliae*
  - a. Media inokulum yang akan digunakan untuk perbanyak jamur *M.anisopliae* yaitu kompos daun kelapa, kompos sabut kelapa dan kompos serbuk gergaji kelapa.
  - b. Masing – masing media diberi *chloramphenicol* 10% dan diaduk hingga merata.
  - c. Media yang telah diberikan *Chloramphenicol* 10 % dimasukkan dalam kantong plastik berukuran 5 Kg sebanyak 500 g/kantong plastik , kemudian dilipat.

- d. Media yang telah terbungkus plastik dimasukkan pada autoclave untuk disterilkan selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm dan suhu 121 °C. Setelah disterilkan
  - e. Setelah steril diinkubasi selama 24 jam.
3. Pengembangan *Metarhizium anisopliae* pada media kompos daun kelapa, kompos sabut kelapa, dan kompos serbuk gergaji batang kelapa

Media kompos yang telah diinkubasi kemudian dicampurkan dengan biakan starter jamur *M. anisopliae* (lampiran 5.c) dengan dosis 40 g setiap ulangan. Starter *M. anisopliae* juga diuji viabilitasnya pada pengenceran  $10^7$ (lampiran 5.d),  $10^8$ (lampiran 5.e), dan  $10^9$ (lampiran 5.f). Setelah tercampur kantong plastik dilipat dengan menyediakan ruang udara pada kantong plastik dan disteples lalu diinkubasi selama 21 hari(lampiran 5.g) serta diamati berat volume, viabilitas, dan cek preparat.

#### 4. Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan pada media kompos yang sudah diinokulasi dengan jamur *M. anisopliae* meliputi Pertumbuhan miselia jamur dan Perhitungan Jumlah spora.

##### a. Pertumbuhan miselia jamur (g)

Pertumbuhan miselia diamati dengan pengukuran biomassa jamur *Metarhizium anisopliae*. Berat biomassa diperoleh dari penimbangan media inokulum jamur pada

akhir pengamatan dikurangi dengan penimbangan media inokulum pada awal pengamatan .

b. Viabilitas

Viabilitas (populasi mikroba yang hidup) ditentukan dengan metode *plate count* pada media PDA. Dasarnya adalah dengan membuat seri pengenceran  $10^2$  - $10^7$  (lampiran 5.h) dengan 99 ml aquades dalam botol suntik, kemudian mengambil 1 ml seri pengenceran  $10^6$  dan  $10^7$  menggunakan mikropipet dan menginokulasikan suspensi ke media PDA dalam cawan petri atau menjadi pengenceran  $10^7$  (lampiran 5.i) dan  $10^8$  (lampiran 6.j), selanjutnya diinkubasikan selama 3 hari, Setelah itu mengitung jumlah koloni yang hidup pada setiap cawan petri (lampiran 5.k).

**Tahap 3. Aplikasi Kompos Aktif Daun Kelapa, Kompos Aktif Sabut Kelapa, Dan Kompos Aktif Serbuk Gergaji Batang Kelapa Terhadap Kumbang Badak**

1. Aplikasi Kompos Aktif

Sebelum aplikasi jamur, toples yang akan digunakan untuk memelihara larva disterilkan dengan menggunakan alkohol 96 % kemudian 5 larva instar III dengan panjang 7-10 cm (lampiran 6.a) dimasukkan ke dalam toples yang berisi kompos aktif sebanyak 100 gram (lampiran 6.b). Dengan perlakuan :

- A. Kompos Aktif Daun Kelapa
- B. Kompos Aktif Sabut Kelapa
- C. Kompos Aktif Serbuk Gergaji Kelapa



D. Serbuk Gergaji Batang Kelapa Sebagai Kontrol

E. Serbuk Gergaji Batang Kelapa+Starter *Metarhizium anisopliae*

Masing – masing diulang 3 kali dan diamati kecepatan kematian dan efikasi.

## 2. Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan dalam aplikasi kompos aktif terhadap hama kumbang badak meliputi bobot hama dan kematian hama.

### a. Bobot hama

Pengamatan bobot hama dilakukan dengan cara menimbang bobot 5 hama *O. rhinoceros* pada hari ke-0 dan pada hari terakhir pengamatan. Alat yang digunakan yaitu timbangan yang dinyatakan dalam *gram*. Data hasil pengamatan bobot hama digunakan untuk menghitung susut bobot hama.

### b. Kematian hama

Pengamatan kematian hama dilakukan dengan cara menghitung jumlah hama *O. rhinoceros* yang mati. Pengamatan dilakukan secara manual dan dilakukan setiap hari selama 30 hari. Data yang didapatkan akan digunakan untuk menghitung tingkat mortalitas, kecepatan kematian, dan tingkat efikasi.

## E. Parameter yang diamati

Pengamatan dilakukan pada tahap pembuatan kompos hingga tahap aplikasi kompos aktif. Pengamatan yang dilakukan adalah :

## Tahap 1. Pengomposan Limbah Perkebunan Kelapa

Pada tahap ini pengamatan yang dilakukan meliputi :

### a. Pengamatan Fisik kompos

Pengamatan fisik kompos ini terbagi menjadi beberapa pengamatan yaitu :

#### 1. Suhu ( $^{\circ}\text{C}$ )

Pengamatan suhu dilakukan selama 6 minggu, pada minggu pertama pengamatan suhu dilakukan setiap hari, pada minggu ke dua hingga ke empat pengamatan suhu dilakukan satu minggu sekali. Pengukuran suhu dilakukan menggunakan alat *Thermometer* derajat Celcius ( $^{\circ}\text{C}$ ) dengan melihat skala yang ditunjukkan pada alat tersebut.

#### 2. Warna (%)

Perubahan warna diamati setelah kompos berumur satu minggu, dengan pengamatan tiap seminggu sekali hingga minggu keenam. Metode yang digunakan adalah metode skoring dan dinyatakan dengan persentase. Penelitian Zainal, M (2011) dalam Syaifullah (2016) menggunakan rumus

Tabel 2. Skoring warna

Skor	Warna Kompos
1	7,5 YR 4/6-5/8
2	7,5 YR 4/2-4/4
3	7,5 YR 3/2-3/4
4	7,5 YR 2,5/2-2,5/3

$$\text{Persentase warna kompos} = \frac{\sum(n \times v)}{z \times N} \times 100\%$$

Keterangan : n = Jumlah sampel yang memiliki nilai skor sama  
 v = Nilai skor yang menunjukkan intensitas warna  
 z = Skor yang tertinggi  
 N = Jumlah sampel yang diamati

### 3. Kadar Air (%)

Pengukuran kadar air bahan kompos dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 10 gram. Cawan kosong ditimbang terlebih dahulu untuk mendapatkan berat awal, kemudian cawan diberi bahan seberat 10 gram, hasil timbangan cawan + bahan dicatat. Setelah itu cawan beserta bahan di oven hingga kadar airnya konstan. Tujuan pengukuran kadar air adalah untuk mengetahui jumlah air yang terkandung dalam bahan. Kadar air pada bahan kompos dinyatakan dalam basis basah dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(b - c)}{(b - a)} \times 100\%$$

Keterangan : a = Berat cawan timbang kosong (g)  
 b = Berat cawan + sampel sebelum di oven (g)  
 c = Berat cawan + sampel setelah di oven (g)

#### b. Pengamatan Kimia Kompos

Pengamatan kimia kompos yang dilakukan adalah sebagai berikut :

##### 1. Pengukuran pH

Pengukuran derajat kemasaman menggunakan pH universal, yaitu dengan mengambil 2,5 g sample yang dilarutkan dalam 25 ml aquades dan ditunggu hingga 1

menit. Kertas pH universal dicelupkan hingga batas warna kemudian dicocokkan dengan kotak pH.

## 2. Nisbah C/N

Nisbah C/N merupakan parameter yang digunakan untuk menentukan tingkat kematangan suatu kompos. Kompos yang sudah memenuhi syarat untuk diaplikasikan pada tanaman harus sudah mencapai tingkat kematangan, dengan nisbah C/N kurang dari 20%.

### **Tahap 2. Perbanyak *M.anisopliae* Pada Kompos Daun kelapa, Kompos Sabut Kelapa, Dan Kompos Serbuk Gergaji Batang Kelapa**

#### 1. Pertumbuhan miselia jamur (%)

Pertumbuhan miselia diamati dengan pengukuran biomassa jamur *M.anisopliae*. Berat biomassa diperoleh dari penimbangan media inokulum jamur pada awal pengamatan dikurangi dengan penimbangan akhir media inokulum pada akhir pengamatan. Dengan menggunakan rumus :

$$\text{Persentase pertumbuhan miselia jamur} = \frac{(b - a)}{b} \times 100\%$$

Keterangan :     a = Berat awal media inokulum  
                          b = Berat akhir media inokulum

#### 2. Viabilitas (CFU/ml)

Penghitungan viabilitas harus memenuhi syarat sbagai berikut;

- a. Jumlah koloni dalam cawan petri antara 30-300 koloni

- b. Tidak ada koloni yang menutupi lebih besar dari setengah luas cawan petri (*Spreader*)
- c. Perbandingan jumlah koloni dan pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya. Jika sama atau lebih kecil dari 2 maka hasil dirata-rata, dan jika lebih besar dari 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari hasil pengenceran sebelumnya
- d. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata

**Tahap 3. Aplikasi Kompos Aktif Daun Kelapa, Kompos Aktif Sabut Kelapa, Kompos Aktif Serbuk Gergaji Batang Kelapa Terhadap Kumbang Badak**

**1. Bobot hama**

Pengamatan bobot hama dilakukan dengan cara menimbang hama sebelum dan sesudah aplikasi, yang dinyatakan dalam satuan gram. Data hasil pengamatan selanjutnya digunakan untuk menghitung susut bobot hama dengan rumus (Nuraeni, 2015) :

$$\text{Susut bobot hama} = \frac{\text{Bobot awal hama} - \text{Bobot akhir hama}}{\text{Bobot awal hama}} \times 100\%$$

**2. Kematian hama**

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah hama yang mati. Hasil pengamatan digunakan untuk menghitung :

**a. Tingkat mortalitas (%)**

Tingkat mortalitas menunjukkan toksisitas jamur *M. anisopliae* terhadap hama *O. rhinoceros*. Perhitungan tingkat mortalitas menggunakan rumus :

$$\frac{X0 - X1}{X0} \times 100\%$$

Keterangan : X0 = Populasi hama sebelum aplikasi  
X1 = Populasi hama hidup setelah aplikasi pada hari ke 4

**b. Kecepatan kematian**

Penghitungan kecepatan mortalitas menggunakan rumus :

$$V = \frac{m}{n}$$

Keterangan : V : Kecepatan mortalitas perhari  
m : Jumlah Larva yang mati  
n : Hari

**c. Tingkat efikasi (%)**

Perhitungan tingkat efikasi menggunakan rumus Henderson-Tilton yaitu :

$$\text{Efikasi} = \left( 1 - \frac{Ta}{Ca} \times \frac{Cb}{Tb} \right) \times 100\%$$

Keterangan :

Tb = Jumlah *O. rhinoceros* yang hidup dalam toples sebelum aplikasi  
Ta = Jumlah *O. rhinoceros* yang hidup dalam toples setelah aplikasi  
Cb = Jumlah *O. rhinoceros* yang hidup dalam toples kontrol sebelum aplikasi  
Ca = Jumlah *O. rhinoceros* yang hidup dalam toples kontrol setelah aplikasi

## **F. Analisis Data**

Data hasil pengamatan dianalisis dengan sidik ragam pada tingkat 5%. Apabila ada beda nyata antar perlakuan dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan tingkat kesalahan 5%. Data disajikan dalam bentuk gambar, grafik, dan tabel.