

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

#### **A. Tempat dan Waktu**

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus hingga November 2017.

#### **B. Bahan dan Alat**

Bahan yang digunakan diantaranya biakan murni jamur *Metarhizium anisopliae* koleksi dari Laboratorium Agrobioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Media PDA, Air steril, *Alcohol* 70%, kompos, larva kumbang badak instar III.

Alat-alat yang digunakan terdiri atas *glass ware* (*petridish*, gelas ukur, *Erlenmayer*, *beaker glass*, botol suntik 100 ml), kompor gas, *sprayer*, mikroskop, lampu bunsen, *autoclaf*, kertas pH, plastik 1 kg, kertas label 17 x 58 mm, timbangan analitik, pipet ukur dan kamera digital.

#### **C. Metode Penelitian**

Penelitian eksperimen ini dilaksanakan dalam 2 tahap yaitu;

Tahap I Formulasi *Metarhizium anisopliae* pada berbagai macam media yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rancangan percobaan faktor tunggal yang terdiri dari 3 perlakuan. Adapun perlakuan yang diujikan pada penelitian ini yaitu sebagai berikut:

A. *Metarhizium anisopliae* dengan *Carrier* Ampas Tahu

B. *Metarhizium anisopliae* dengan *Carrier* Tongkol Jagung

C. *Metarhizium anisopliae* dengan Carrier Ampas tahu (50 %) + Tongkol Jagung (50 %)

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga didapat 9 unit percobaan (*Layout* Lampiran 1).

Tahap II Aplikasi Berbagai Formulasi *Metarhizium anisopliae* pada larva Kumbang badak yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rancangan percobaan faktor tunggal yang terdiri dari 3 perlakuan. Adapun perlakuan yang diujikan pada penelitian ini yaitu sebagai berikut:

- P. Formula *M. anisopliae* Ampas Tahu pada Larva Kumbang Badak dalam Media Pertumbuhan Kompos
- Q. Formula *M. anisopliae* Tongkol Jagung pada Larva Kumbang Badak dalam Media Pertumbuhan Kompos
- R. Formula *M. anisopliae* Ampas tahu (50 %) + Tongkol Jagung (50 %) pada Larva Kumbang Badak dalam Media Pertumbuhan Kompos
- S. Kontrol (Kumbang Badak Dalam Media Pertumbuhan Kompos Disemprot Air)

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga didapat 12 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdapat 5 larva kumbang badak instar III dengan berat rata-rata 10 - 13 g, sehingga total larva yang diuji yaitu sebanyak 60 larva (*Layout* Lampiran 2).

## D. Tata Laksana Penelitian

### 1. Sterilisasi Alat

- a. Alat yang terbuat dari logam dan gelas direbus dengan air dan deterjen selama 10 menit, kemudian dibilas bersih dan dibungkus dengan kertas kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan temperatur 121 °C tekanan 1 atm selama 30 menit. Sebelum dipakai alat disemprot *Alcohol* 70%.
- b. Media PDA disterilkan dengan autoklaf dengan temperatur 121 °C selama 15 menit. Sedangkan untuk air steril disterilisasi dalam autoklaf temperatur 121 °C selama 15 menit.

### 2. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Kentang yang telah dikupas dan dipotong-potong dengan ukuran  $\pm 1$  cm sebanyak 200 gram di rebus dalam 500 ml Aquades sampai cukup empuk. Hal ini dapat diketahui dengan menusuk kentang dengan garpu. Jika di tusuk terasa mudah, berarti kentang telah mengeluarkan sarinya. Kemudian ekstrak kentang disaring campuran dengan kain tipis sehingga diperoleh cairan ekstrak kentang yang bening. Setelah itu 20 gram agar-agar dan dekstrosa sebanyak 15 gram dimasukkan ke dalam ekstrak kentang dan ditambahkan air steril sampai volumenya menjadi 1.000 ml, larutan campuran kemudian diaduk sampai homogen diatas api kecil dan diukur pH 6-7 dengan kertas pH. Setelah mendidih, larutan PDA dimasukkan ke dalam *erlenmayer* kemudian ditutup dengan kapas steril dan ditutup lagi dengan menggunakan aluminium foil. Kemudian di sterilkan di dalam autoklaf selama kurang lebih 15 menit dengan suhu 121<sup>0</sup>C pada tekanan 1,5 atm. Setelah itu PDA dikeluarkan dan dibiarkan hingga dingin

(10-20<sup>0</sup>C), kemudian di tuangkan kedalam cawan petri dan tabung reaksi (miring).

### **3. Identifikasi dan Karakterisasi**

Biakan murni jamur *Metarhizium anisopliae* yang didapat dari Laboratorium Agrobioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta di inokulasi pada media PDA di petridish sebanyak 3 ose, kemudian diinkubasi selama 5 hari. Kemudian jamur *M. anisopliae* yang telah tumbuh diinokulasi pada media PDA pada kaca preparat dan diinkubasi selama 3 hari. Selanjutnya jamur *M. anisopliae* pada kaca preparat diamati bentuknya menggunakan mikroskop (Lampiran 5.a.b.c.d).

### **4. Perbanyak Inokulum *Metarhizium anisopliae***

Biakan murni jamur *Metarhizium anisopliae* yang didapat dari Laboratorium Agrobioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta diperbanyak dengan menginokulasi *Metarhizium anisopliae* dalam medium PDA tabung reaksi miring secara goresan, Kemudian diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu ruang (Lampiran 5.d). Diharapkan dalam media PDA hanya terdapat satu jenis mikroba saja.

### **5. Formulasi *Metarhizium anisopliae* Pada Berbagai Bahan Pembawa**

Proses formulasi spora *Metarhizium anisopliae* pada berbagai media didapat setelah dilakukan uji pendahuluan. Uji pendahuluan dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan kombinasi bahan dan kadar air yang pas. Pada media ampas tahu tidak diberi air tambahan melainkan dikurangi kadar airnya dengan

cara disaring. Sedangkan media tongkol jagung diberi perlakuan air 100 ml/100 g dan 200 ml/100 g. Perlakuan penambahan air 200 ml pada 100 g tongkol jagung menghasilkan kombinasi terbaik dan kelembaban terbaik. Sedangkan perlakuan campuran ampas tahu + tongkol jagung diberi air sebanyak 100 ml/100 g ampas tahu + tongkol jagung.

#### **a. Formulasi *Metarhizium anisopliae* Pada Ampas tahu**

Proses formulasi *M. anisopliae* pada ampas tahu menggunakan prosedur pembuatan tempe gembus (Gandjar, 1972) dengan beberapa modifikasi. Tahap pertama memasukan ampas tahu segar (basah) kedalam kain saring dan diperas dengan tangan untuk menghilangkan sebagian besar dari air yang terkandung didalamnya, kemudian mengukus ampas tahu selama  $\pm 45$  menit lalu diangkat dan diangin-anginkan hingga suhu 30-35 °C. Kemudian ampas tahu diberi *Chloramphenicol* 200 ml/kg (0,1%) dan diaduk hingga homogen, Setelah itu ampas tahu dan tongkol jagung dimasukan kedalam plastik (anti panas) 1 kg sebanyak 100 g/kantong plastik dan dibentuk segitiga kemudian pangkal plastik dilipat dan disteples. Kemudian masukan media pembawa kedalam autoklaf untuk disterilkan selama 15 menit dengan suhu 121-124 °C pada tekanan 1,5 atm. Media yang sudah disterilkan dibiarkan dalam autoklaf dan diinkubasi satu malam (24 jam). Kemudian media di sterilkan lagi dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121-124 °C pada tekanan 1,5 atm. Setelah itu media pembawa dikeluarkan dari autoklaf dan didinginkan dalam ruang inokulasi. Setelah dingin media pembawa diinokulasikan dengan spora *Metarhizium anisopliae* dari Inokulum murni dengan

menggunakan ose sebanyak 3 kalidan diinkubasi dengan suhu ruang hingga 21 hari (Lampiran 4).

#### **b. Formulasi *Metarhizium anisopliae* Pada Tongkol Jagung**

Formulasi *M.anisopliae* pada tongkol jagung dilakukan dengan cara mencacah tongkol jagung kering menggunakan alat giling, setelah itu disaring menggunakan saringan hingga berbentuk serbuk, kemudian tongkol jagung diberi air 200 ml/100 g dan diremas hingga basahdan homogen, kemudian dikukus selama 15 menit lalu diangkat dan diangin-anginkan. Kemudian tongkol jagung diberi *Chlorampenicol* 200 ml/kg (0,1%) dan dicampur hingga homogen, Setelah itu tongkol jagung dimasukan kedalam plastik (anti panas) 1 kg sebanyak 100 g/kantong plastik dan dibentuk segitiga kemudian pangkal plastik dilipat dan disteples. Kemudian masukan media pembawa kedalam autoklaf untuk disterilkan selama 15 menit dengan suhu 121-124 °C pada tekanan 1,5 atm. Media yang sudah disterilkan dibiarkan dalam autoklaf dan diinkubasi satu malam (24 jam). Kemudian media di sterilkan lagi dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121-124 °C pada tekanan 1,5 atm. Setelah itu media pembawa dikeluarkan dari autoklaf dan didinginkan dalam ruang inokulasi. Setelah dingin media pembawa diinokulasikan dengan spora *M. anisopliae* dari Inokulum murni menggunakan ose sebanyak 3 kali dan diinkubasi dengan suhu ruang hingga 21 hari (Lampiran 4).

#### **c. Formulasi *Metarhizium anisopliae* Pada Ampas Tahu dan Tongkol Jagung**

Formulasi *M. anisopliae* dengan ampas tahu dan tongkol jagung dilakukan dengan cara memasukan ampas tahu segar (basah) kedalam kain saring dan

diperas dengan tangan untuk menghilangkan sebagian besar dari air yang terkandung didalamnya, sedangkan tongkol jagung dicacah dengan penggiling hingga membentuk serbuk. Setelah itu campurkan 50 g ampas tahu dan 50 g tongkol jagung dalam wadah nampan, kemudian diberi air 100 ml/ 100 g dan diremas hingga basah dan homogen, kemudian mengukus ampas tahu dan tongkol jagung selama  $\pm$  45 menit lalu diangkat dan diangin-anginkan hingga suhu 30-35 °C. Kemudian media pembawa diberi *Chloramphenicol* 200 ml/kg (0,1%) dan dicampur hingga homogen, Setelah itu ampas tahu dan tongkol jagung dimasukan kedalam plastik (anti panas) 1 kg sebanyak 100 g/kantong plastik dan dibentuk segitiga kemudian pangkal plastik dilipat dan disteples. Kemudian masukan media pembawa kedalam autoklaf untuk disterilkan selama 15 menit dengan suhu 121-124 °C pada tekanan 1,5 atm. Media yang sudah disterilkan dibiarkan dalam autoklaf dan diinkubasi satu malam (24 jam). Kemudian media di sterilkan lagi dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121-124 °C pada tekanan 1,5 atm. Setelah itu media pembawa dikeluarkan dari autoklaf dan didinginkan dalam ruang inokulasi. Setelah dingin media pembawa diinokulasikan dengan spora *M. anisopliae* dari Inokulum murni menggunakan ose sebanyak 3 kali dan diinkubasi dengan suhu ruang hingga 21 hari (Lampiran 4).

## **6. Aplikasi Formula *Metarhizium anisopliae* Pada Larva Kumbang Badak**

Jumlah spora *Metarhizium anisopliae* yang didapat pada penelitian ini yaitu sebesar  $10^{10}$  pada setiap perlakuan (Tabel 2). Menurut penelitian Erawati (2016) penetapan konsentrasi pengendalian hayati *M. anisopliae* untuk aplikasi dilapangan sebesar  $10^9$  spora/ml. Larva kumbang badak yang digunakan adalah

larva kumbang badak instar III dengan berat rata-rata 10-13 gram dan panjang 7-10 cm. Media aplikasi yang digunakan yaitu Kompos sebanyak 100 g yang dimasukkan dalam toples plastik sebagai media aplikasi (Lampiran 9.b). Kemudian memasukan larva kumbang badak dalam toples. Larva kumbang badak bersifat kanibal sehingga dalam satu toples hanya terdapat 1 larva, larva dibiarkan dalam toples selama satu malam untuk beradaptasi. Aplikasi jamur *M. anisopliae* dilakukan dengan cara mengambil 5 g (Lampiran 7.a) formula *M. anisopliae* pada masing-masing perlakuan dan dicampur dengan air 100 ml, remas-remas larutan tersebut hingga jamur terpisah dari media dan dishaker selama 15 menit, selanjutnya larutan cair dimasukkan kedalam botol *sprayer* dan ditambah detergen 1 % hingga semprotan berkabut, setelah itu aplikasikan larutan dengan cara menyemprotkan larutan ke larva kumbang badak (Lampiran 9.c) dan diinkubasi di suhu ruang selama 21 hari (Lampiran 9.d).

## **7. Pengamatan**

Pengamatan yang dilakukan diantaranya pertumbuhan miselium, jumlah spora, viabilitas spora, mortalitas, kecepatan kematian, dan efikasi.

### **1. Tahap I. Formulasi *Metarhizium anisopliae* Pada Berbagai Macam Media**

#### **a. Pertumbuhan Miselium**

Miselium adalah kumpulan hifa jamur. Penghitungan miselium bertujuan untuk mengetahui jumlah miselium yang dihasilkan oleh jamur. Pertumbuhan miselium dilihat dari berat miselium pada inokulum setelah diinkubasi yang ditimbang 3 hari sekali selama 21 hari.



**b. Jumlah spora**

Jumlah spora dihitung dengan bantuan alat *Haemocytometer* yaitu mengambil 1 g formula padat dari masing-masing perlakuan dan dimasukkan ke dalam 99 ml *aquades* ( $10^2$ ). Setelah itu dihomogenkan dengan *shaker* hingga spora terpisah dari *carrier*, kemudian mengambil 1 ml pada pengenceran  $10^2$  dan dimasukkan ke dalam 99 ml *aquades* untuk pengenceran  $10^4$ . Kemudian jumlah spora dihitung dengan cara meneteskan suspensi *Metarhizium anisopliae*  $10^4$  ke atas permukaan *Haemocytometer* menggunakan mikropipet dan ditambah *metilen blue*, kemudian permukaan *Haemocytometer* ditutup dengan gelas objek, sehingga suspensi mengalir kebawah kaca objek dan mengisi ruang hitung. Lalu jumlah spora dihitung dalam 16 kotak ukuran sedang. Semua pekerjaan perhitungan dilakukan di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran  $10 \times 40$ .

**c. Viabilitas**

Viabilitas (populasi mikroba yang hidup) ditentukan dengan metode *plate count* pada media PDA. Dasarnya adalah dengan membuat seri pengenceran  $10^5$ - $10^7$  dengan 99 ml *aquades* dalam botol suntik, kemudian mengambil 0,1 ml seri pengenceran  $10^5$ - $10^7$  menggunakan mikropipet dan menginokulasikan suspensi ke media PDA dalam cawan petri, selanjutnya diinkubasikan selama 3 hari, Setelah itu menghitung jumlah koloni yang hidup pada setiap cawan petri.

## 2. Tahap II. Aplikasi Berbagai Formula *Metarhizium anisopliae* pada Larva Kumbang Badak

### a. Mortalitas

Mortalitas dihitung dengan cara menghitung larva kumbang badak yang mati setelah pengaplikasian jamur *Metarhizium anisopliae* dari berbagai media pebanyakan. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 21 hari.

### b. Kecepatan Kematian Larva Kumbang Badak

Pengamatan dilakukan untuk mengetahui kecepatan kematian larva kumbang badak setelah diaplikasikan dengan jamur *Metarhizium anisopliae* yang ditumbuhkan pada berbagai macam media.

### c. Efikasi

Pengamatan dilakukan dengan membandingkan jumlah hama sebelum dan sesudah diaplikasikan dengan *Metarhizium anisopliae* yaitu dengan cara menghitung hama yang mati.

## E. Parameter Pengamatan

### 1. Tahap I. Formulasi *Metarhizium Anisopliae* Pada Berbagai Macam Media

#### a. Pertumbuhan Miselium ( g )

Pertumbuhan miselia dihitung dengan rumus (Agus, 2004);

$$M = \text{berat akhir inokulum} - \text{berat awal inokulum}$$

#### b. Jumlah Spora ( spora/ml )

Jumlah spora dapat dihitung dengan rumus (Agus, 2004);

$$S = \frac{t \cdot d}{(n \times 0,25)} \times 10^6$$

Keterangan :

S : Jumlah spora

t : Jumlah totalspora dalam kotak sampel yang diamati

- d : Jingkat pengenceran (ml)  
 n : Jumlah kotak sampel  
 0,25 : Ukuran standar *haemocytometer* kecil (mm)

**c. Viabilitas ( cfu/ml )**

Penghitunganviabilitas harus memenuhi syarat sbagai berikut;

- i. Jumlah koloni dalam cawan petri antara 30-300 koloni
- ii. Tidak ada kolooni yang menutupi lebih besar dari setengah luas cawan petri (*Spreader*)
- iii. 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
- iv. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata

**2. Tahap II. Aplikasi Berbagai Formula *Metarhizium anisopliae* pada Larva Kumbang Badak**

**a. Mortalitas ( % )**

Mortalitas dihitung dengan rumus :

$$V = \frac{T}{n} \times 100\%$$

Keterangan :

- V : Kecepatan mortalitas  
 T : Jumlah Larva yang mati  
 n : Jumlah Serangga yang diujikan

**b. Kecepataan Kematian ( larva/hari )**

Kecepataan kematian larva kumbang badak dihitung dengan rumus :

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

Keterangan :

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

**c. Efikasi ( % )**

Efikasi dihitung dengan rumus (Agus, 2004);

$$Efikasi = 1 - \left[ \frac{T_a}{C_a} \times \frac{C_b}{T_b} \right] \times 100 \%$$

Keterangan :

Tb = Jumlah hama yang hidup dalam media sebelum aplikasi  
 Ta = Jumlah hama yang hidup dalam media sesudah aplikasi  
 Cb = Jumlah hama yang hidup dalam media kontrol sebelum aplikasi  
 Ca = Jumlah hama yang hidup dalam media kontrol sesudah aplikasi

**F. Analisis Data**

Data yang diperoleh dari pengamatan dalam penelitian ini dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (*Analysis Of Variance = ANOVA*) dengan taraf  $\alpha$  5 %. Apabila terdapat bedanyata dari perlakuan yang dicobakan maka akan dilakukan uji lanjutan menggunakan *Duncan's Multiple Range Test (DMRT)* dengan taraf  $\alpha$  5 %. Data yang didapat ditampilkan dalam bentuk Tabel dan Grafik.