

IV. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Kegiatan penelitian ini dilaksanakan di rumah kaca laboratorium Pengamatan Hama dan Peramalan Hama Penyakit Tanaman Pangan Wilayah Kedu di Desa Sawahan Kecamatan Kedu, Kabupaten Temanggung.
2. Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus - Oktober 1994.

B. Bahan dan Alat Penelitian

B.1. Bahan penelitian :

- Kumbang daun (*Aulacophora similis*)
- Tanaman semangka varietas Golden Dragons
- Larutan suspensi konidia *Metarrhizium anisopliae*
- Pupuk KCL, TSP, ZA dan UREA
- Pupuk kandang
- Tanah steril
- Media beras pecah
- Alkohol 70 %
- Medium PDA (Potato Dekstroso Agar)
- Medium Agar Emerson's YpSs

B.2. Alat penelitian :

- Polibag dengan ukuran diameter 20 cm, tinggi 20 cm.
- Kain kasa sebagai sungkup (kurungan)
- Alat semprot tangan (mikro sprayer)

- Haemositometer
- Autoclave
- Erlemeyer
- Inkubator
- Timbangan halus
- Saringan
- Pipet
- Kertas pH
- Panci
- Shaker

C. Cara Kerja

1. Persiapan biakan murni *Metarrhizium anisopliae*

- Mendidihkan air steril sebanyak 500 ml untuk melunakkan beras sebanyak 1kg yang akan digunakan sebagai media biakan. Caranya adalah sebagai berikut : beras sebanyak 1 kg dicuci kemudian dimasukkan ke dalam 500 ml air mendidih, dimasak setengah matang (beras pecah) sebagai medium biakan *M. anisopliae*.
- Isolat *M. anisopliae* yang ditumbuhkan pada medium PDA selanjutnya ditumbuhkan pada medium beras pecah dengan cara sebagai berikut :
Beras pecah yang telah disiapkan dibagi dalam 10 kantong plastik yang berukuran 20 x 10 cm, tiap kantong diisi sampai sepertiga bagian, kemudian dilipat baik-baik dan disusun dalam kantong yang lebih besar untuk disterilkan dalam autoclave

121°C selama 40 menit. Setelah steril dibiarkan dingin lalu dimasukkan dalam inkas. Jamur *M. anisopliae* pada medium PDA dalam tabung reaksi diinokulasikan ke dalam media beras tadi secara aseptik dengan menggunakan ose steril diatas api spirtus. Kemudian kantong diremas-remas atau dikocok hati-hati agar konidia menyebar keseluruh bagian beras. Kantong dilipat dengan menyisakan ruang kosong, bagian tepi dikancing (stapler) 2-3 tempat. Setelah itu disimpan dalam inkubator, dibiarkan tumbuh selama 3 minggu pada suhu 26°C (Michelia dan Sitepu, 1989).

2. Pembuatan Inokulum

Biakan *M. anisopliae* yang telah ditumbuhkan selama 3 minggu dimasukkan dalam air steril dengan cara sebagai berikut :

- Diambil 10 gr jamur *M. anisopliae* dari media biakan dilarutkan dalam 90 ml air steril dan dikocok di atas shaker hingga homogen dan konidianya terlepas dari butiran beras.
- Diambil bagian tengah larutan dengan menggunakan pipet dan dimasukkan dalam Haemocytometer.

- Mengamati di bawah mikroskop kemudian dihitung jumlah konidia dengan rumus sebagai berikut :

$$j = \frac{(t \times d)}{(n \times 0,25)} \times \text{juta konidia} \times 100$$

Keterangan : j : Jumlah konidia
 t : Jumlah konidia di dalam semua kotak yang dihitung
 d : Faktor pengenceran
 n : Jumlah semua kotak kecil yang dihitung

(Riyatno, 1981)

Dari rumus di atas dibuat suspensi dengan berbagai tingkat konsentrasi konidia sebagai perlakuan, sebagai berikut :

K I = $1,45 \times 10^6$ konidia/100ml
 K II = $1,04 \times 10^8$ konidia/100 ml
 K III = $6,11 \times 10^{10}$ konidia/100 ml dan
 K O = Tanpa konidia sebagai kontrol

3. Persiapan Bibit Tanaman Semangka

- Biji semangka direndam dalam air steril selama 6 jam. Kemudian ditiriskan untuk selanjutnya direndam dalam fungisida Ban late selama 15 menit dengan konsentrasi 1 gr/lt air.
- Biji dimasukkan dalam petridish yang dilapisi koran steril, ditutup dengan lakban hingga tidak ada uap air yang keluar. Kemudian diinkubasi hingga berkecambah (36 jam, suhu 33°C)
- Disiapkan polibag yang telah siap untuk media semai yang terdiri dari 50% volume pupuk kandang

dan 50% volume tanah, sebelumnya tanah disterilkan terlebih dahulu. Setiap polibag diisi dengan 5 kg campuran pupuk kandang dan tanah.

- Dibuat lubang 2 cm, kecambah dimasukkan/ditanam lalu ditutupi dengan tanah sejenis, dimasukkan gudang. Setelah 2-4 hari kecambah muncul dari permukaan tanah dan kemudian polibag dikeluarkan dari gudang, dimasukkan dalam Green House, setiap hari disirami 2 kali.

4. Pembuatan Media Tanah Untuk Tanaman Semangka

- Menyiapkan 120 kg media campuran tanah dan pupuk kandang masing-masing 50% dicampur homogen. Penyiapan ini dilakukan di ruang (gudang) penyimpanan tanah dan pupuk.
- Ditambahkan pupuk KCL 40 gr, Urea 40 gr dan ZA 40 gr diaduk sampai rata kemudian disiram dengan air secukupnya.
- Setelah 12-15 hari bibit semangka ditanam.

5. Persiapan Biakan masal *Aulacophora similis*

- Imago *Aulacophora similis* dikumpulkan dari lapangan, dipelihara dalam medium yang berisi tanaman semangka (sebagai sumber pakan), sebelumnya dilakukan pembedaan jenis kelamin, lalu media ditutup dengan kain kasa. Kumbang dibiarkan kawin dan setelah kawin induk bertelur. Sementara telur dipelihara sampai menetas, larva dipelihara sampai imago lagi dan imago inilah yang digunakan (diinvestasikan) pada tanaman yang telah

disiapkan. Setiap polibag diberi 10 ekor imago.

6. Aplikasi *M. anisopliae*

- Menyiapkan tanaman inang yang berumur 12 hari setelah tanam.
- Aplikasi di lapangan dilakukan dengan cara penyemprotan. Setiap unit percobaan diberi 10 ml suspensi konidia *M. anisopliae*. Ada dua cara aplikasi yaitu :
 1. W1 : Inokulum yang berupa suspensi konidia *M. anisopliae* disemprotkan langsung pada tubuh serangga
 2. W2 : Inokulum disemprotkan pada tanaman semangka.

D. Kegiatan Pengamatan

Pengamatan dilakukan setiap hari (siang) selama tiga minggu, dicatat faktor-faktor lingkungan yang mendukung misalnya suhu, kelembaban, curah hujan, dan tingkat kematian *Aulacophora similis*.

E. Parameter Yang Diamati

1. Tingkat mortalitas (kematian) *A. similis*
2. Lama waktu kematian (hari)

F. Model Analisa Data

Model percobaan ini disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL), dengan 8 kombinasi perlakuan antara cara aplikasi dengan konsentrasi konidia yang diberikan,

masing-masing dengan tiga kali ulangan.

Data yang diperoleh ditransformasi ke $\arcsin \sqrt{x}$, bila ada data nol ditransformasi lagi ke $\sqrt{x-0,5}$.

Data yang diperoleh dianalisa dengan analisa Varians yang dilanjutkan dengan uji lanjut Wilayah Ganda (Analisa Duncan) dengan tingkat kepercayaan 5%.

Uji lanjut pada lama waktu kematian uji Beda Nyata terkecil (BNT) dengan taraf kepercayaan 5%.

G. Pendugaan LD_{50} untuk menguji toksisitas *M. amisopliae*

Pendugaan LD_{50} (Lethal Dosis 50) dengan menggunakan Analisa Probits menurut teori Busvine. Nash and Heinrichs, dalam Koestoni (1993).

Cara analisis probits yang dilakukan yaitu dengan cara grafik.

Tahapan pelaksanaan perhitungan nilai LD_{50} cara grafik adalah sebagai berikut :

1. Membuat tabel Analisa Probits seperti pada Lampiran.04
2. Menggambar nilai Log. konsentrasi (kolom II) pada sumbu x dan nilai Probits Empirik (kolom VII) pada sumbu y (Gambar 07)
3. Menarik garis regresi probits melalui titik hubungan antara nilai log. Konsentrasi dengan nilai Probits Empirik.
4. Memproyeksikan nilai Probits Empirik 5 (lima) pada sumbu x melalui garis regresi probits, maka akan didapatkan nilai x (Log. Konsentrasi)

toluh

5. Nilai x yang didapat diantilogkan sehingga didapatlah nilai LD_{50} yang dicari.

Untuk mengetahui kematian terkoreksi dilakukan dengan mempergunakan rumus Abbots. Rumus Abbots adalah sebagai berikut :

$$Pt (\%) = \frac{Po - Pc}{100 - Pc} \times 100$$

Keterangan :

Pt = Persentase mortalitas yang telah terkoreksi
Po = Persentase mortalitas pada perlakuan
Pc = Persentase mortalitas pada kontrol

