

IV. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian : Laboratorium Lapangan Dinas
Perkebunan Propinsi Jawa Tengah

Waktu Penelitian : Bulan Januari sampai bulan
Maret 1995

B. Bahan

- Larva *Oryctes rhinoceros*
yang terinfeksi oleh jamur
Metarrhizium anisopliae

- Beras giling

- Jagung giling

- Potato Dextrosa Agar (PDA)

- Emerson Ypss tanpa agar

- Alkohol 90 %

- Aquades

- Kapas

- Natrium hipoclorid

- Metylen Blue

Alat

- Autoclave

- Cawan petri

- Timbangan halus

- Kertas pH

- Panci baskom

- Jarum ose
- Pinset
- "Enkas" ber- U. V
- Transformator
- Lampu bunsen
- Beker glass
- Kertas tissue
- Pompa vakum
- "Shaker"
- Mikroskop
- Obyek glass
- Oven
- Erlenmeyer
- Alumunium foil
- Saringan
- Kertas saring
- Hemositometer
- Penyaring Seizt
- Pipet Pasteur

C. Cara Kerja

1. Penyiapan Perbanyakkan inokulum jamur *Metarrhizium anisopliae*
 - Dipanaskan medium Potato Dextrosa Agar (PDA) sebanyak 3,9 gr dalam aquades 100 ml dengan menggunakan erlenmeyer.

- Disterilkan dengan autoclave selama 15 menit pada tekanan 15 psi
- Dituangkan dalam beberapa petri
- Setelah dingin, kemudian diinokulasikan jamur *Metarrhizium anisopliae* yang diambil dari larva *Oryctes rhinoceros* yang terinfeksi oleh jamur ini dengan merendam larva yang telah terinfeksi dalam Natrium hipoclorid 1 % selama lebih kurang 10 menit, baru kemudian diangkat kemudian diletakkan dalam cawan petri steril. Dengan menggunakan pinset diambil sedikit bagian larva yang terinfeksi oleh jamur *M. anisopliae* dan diletakkan kedalam PDA yang telah disediakan, pekerjaan ini dilakukan didalam " enkas "
- Diinkubasikan pada suhu kamar selama 5 hari
- Dimurnikan sehingga didapat biakkan murni jamur *Metarrhizium anisopliae* dengan jalan memilih dan mengambil biakkan jamur ini dari petridish dan ditumbuhkan dalam PDA yang baru.

2. Cara Pembuatan Medium

- Disiapkan beras giling sebanyak 900 gr kemudian dicampur dengan aquades sebanyak 4500 ml dalam suatu panci, jagung pecah giling sebanyak 900 gr kemudian ditambah dengan aquades sebanyak 4500 ml dan Emerson Ypss tanpa agar sebanyak 20,5 gr

ditambah 1000 ml aquades dalam erlenmeyer (Michelia dan Sitepu, 1989)., (Rombach, 1988).

- Panci-panci dan erlen meyer tersebut dipanaskan sampai mendidih.
- Dari panci-panci dan erlenmeyer tersebut diambil airnya (tajin) yaitu dengan memnyaring dengan penyaring. Untuk medium Emerson YpSs langsung dimasukkan kedalam erlenmeyer sebanyak 9 erlenmeyer masing-masing erlenmeyer 100 ml
- Dari tajin beras dan tajin jagung yang telah didapatkan kemudian masing-masing medium dimasukkan dalam erlenmeyer yang berbeda sebanyak 9 erlenmeyer (9 erelenmeyer untuk medium tajin beras dan 9 erlenmeyer untuk tajin jagung), tiap erlenmeyer berisi 100 ml air tajin beras dan tajin jagung.
- Untuk medium campuran disediakan 9 erlenmeyer kemudian masing-masing erlenmeyer diisi 50 ml tajin jagung dan 50 ml tajin beras, kemudian digojok supaya homogen. Disamping itu untuk analisa proksimat, digunakan masing-masing 1000 ml untuk medium tajin jagung dan tajin beras
- pH medium diukur dengan pH indikator
- Masing-masing medium ditutup dengan kapas dan Alumunium foil dan disterilkan dengan autoclave

pada tekanan 15 psi selama 15 menit.

- Dimasukkan "Enkas" ber-u.v selama dua jam dan blower dihidupkan.

3. Pembuatan stater jamur *Metarrhizium anisopliae*

- Pertama-tama menghitung jumlah konidia yaitu dengan cara menimbang 5 gr biakan jamur *Metarrhizium anisopliae* bersama media kemudian diletakkan (dimasukkan) kedalam 45 ml aquades steril dalam suatu erlenmeyer berarti tingkat pengenceran 10^{-4} . Kemudian digojok hingga terjadi larutan yang homogen. Setelah larutan homogen dimasukkan beberapa tetes suspensi dalam hemositometer untuk dihitung jumlah konidinya. Pekerjaan ini diulang 3 kali. Cara perhitungan konidia yaitu dengan cara : satu kotak kecil mempunyai sisi 0,05 mm, kedalaman kotak kecil 0,1 mm. Jadi volume satu kotak kecil $0,00025 \text{ mm}^3$. Untuk volume 80 kotak kecil = $80 \times 0,00025 = 0,02 \text{ mm}^3$.
 Faktor koreksi yaitu volume : volume sel yang dihitung (80 kotak) yaitu $0,02 \text{ mm}^3$
 volume yang diinginkan = 1 mm^3
 Jadi vaktor koreksi volume yaitu $1 : 0,02 = 50$
 Bila jumlah konida pada 80 kotak kecil = E
 Faktor pengenceran = F

Jumlah konidia = $E \times 50 \times F / \text{mm}^3$ (Ratna Siri, 1985).

Setelah dilakukan perhitungan didapatkan jumlah spora pada 80 kotak = 148

Maka jumlah konidia = $148 \times 50 \times 10 / \text{mm}^3$
 $= 74. 10^3 / \text{mm}^3$

Jika diketahui 1 ml = 1000 mm^3

Maka jumlah konidia tiap 1 ml = $74. 10^6$

- Diinokulasikan suspensi konidia sebanyak 10 ml pada semua medium
- Diletakkan dalam alat penggojok dengan kecepatan 95 rpm
- Dilakukan pengamatan terhadap biomassa, jumlah konidia (kerapatan konidia) dan viabilitas pada hari ke- 5, ke-10 dan ke- 15

4. Cara Menghitung Biomassa Jamur *Metarrhizium anisopliae*

Pada saat dilakukan pengamatan, cara menghitung atau mengukur biomasa jamur *Metarrhizium anisopliae* yaitu dengan cara : Dari erlenmeyer yang dipakai untuk menumbuhkan jamur ini dituangkan bersama mediumnya kedalam penyaring Seitz yang telah diberi kertas saring, untuk mempercepat keluarnya air tajin maka dipakai pompa vakum. Setelah airnya hilang kemudian diletakkan dalam kertas saring yang masih kering, kemudian dimasukkan kedalam oven yang bersuhu 45°C , sampai mencapai berat konstan, baru

dilakukan penimbangan.

5. Cara menghitung kerapatan konidia (jumlah konidia) jamur *Metarrhizium anisopliae*

Dari biomassa yang telah didapatkan kemudian dibuat suspensi untuk dihitung kerapatannya yaitu dengan cara : biomasa jamur seberat 0,050 mg dilarutkan dalam 9,95 ml aquades steril dalam erlenmeyer, kemudian digojok sampai larutan menjadi homogen, dengan menggunakan pipet secara aseptis suspensi dan diletakkan dalam hemositometer. Dihitung pada 80 kotak kecil dan hasilnya dimasukkan pada rumus $E \times 50 \times F / \text{mm}^3$.

6. Pengujian viabilitas jamur *Metarrhizium anisopliae*

- Disiapkan media PDA seberat 3,9 gr dalam 100 ml aquades dengan menggunakan erlenmeyer, kemudian dipanaskan sampai mendidih
- Dituangkan media PDA tersebut pada permukaan luar petridish dan digoyang-goyang supaya rata sehingga membentuk lapisan tipis dan dibiarkan sampai dingin. Selanjutnya lapisan media tersebut dipotong-potong dengan silet steril kira-kira berukuran 1 cm^2 .
- Dipindahkan potongan agar tersebut kedalam gelas obyek
- Dari hasil pengenceran yang digunakan untuk menghitung kerapatan konidia, sisanya digunakan

untuk uji ini (pada setiap perlakuan), yaitu dengan cara : diteteskan suspensi pada obyek glass yang berisi potongan PDA satu tetes pipet Pasteur, selanjutnya dilakukan penghitungan awal Sesudah dilakukan perhitungan kemudian dimasukkan kedalam pertidish yang berukuran besar yang telah diisi dengan kapas basah dan diinkubasikan selama kurang lebih 15 jam.

- Diamati dibawah mikroskop, kemudian dihitung banyaknya konidia yang berkecambah
- Viabilitas konidia dapat dihitung dengan rumus :

$$V = \frac{G}{G + U} \times 100 \%$$

(Subandrio, 1984)

keterangan :

V = viabilitas

G = Banyaknya konidia yang tumbuh

U = Banyaknya konidia yang tidak tumbuh

- Hal ini diulang dua kali
- Untuk membuktikan apakah yang tumbuh pada masing-masing medium itu jamur *Metarrhizium anisopliae* juga dilakukan uji biologi yaitu dengan cara : dari biomasa yang telah dihitung dan sisa dari perhitungan konidiadan juga uji viabilitas dengan menggunakan kuas halus, kuas ini dicelupkan

pada suspensi jamur ini dan dioleskan pada larva *Oryctes rhinoceros*

- Larva *Oryctes rhinoceros* yang telah diolesi dengan suspensi jamur kemudian dimasukkan kedalam medium untuk memelihara larva ini yaitu berupa campuran pupuk kandang dengan serbuk gergaji.
- Ditunggu (dibiarkan) sampai mati untuk dilihat penyebab kematiannya.

7. Rancangan Percobaan dan Analisa Data

Untuk menganalisa data digunakan pola faktorial 4 x 3 dengan rancangan dasar acak lengkap faktorial. Kombinasi perlakuan dapat disajikan sebagai berikut :

Dot1	D1t1	D2t1	D3t1
Dot2	D1t2	D2t2	D3t2
Dot3	D1t3	D2t3	D3t3

Keterangan :

- D0 = Medium tajin jagung
- D1 = Medium tajin beras
- D2 = Medium campuran tajin beras dan tajin jagung
- D3 = Medium sintetis (Emerson Ypss) tanpa agar
- t1 = pengamatan pada hari ke- 5
- t2 = pengamatan pada hari ke-10
- t3 = pengamatan pada hari ke-15

Model analisa datanya yaitu digunakan :

$$Y_{tdk} = \mu + \alpha d + \beta t + \alpha d \beta t + \epsilon_{tdk}$$

dimana :

Y_{tdk} = hasil dari ulangan ke-k pada perlakuan jenis

medium (d) dan waktu (t)

μ = rata-rata nilai tengah

αd = pengaruh jenis medium

βt = pengaruh waktu inkubasi

$\alpha\beta$ = interaksi antara waktu inkubasi dengan jenis medium

ϵ tdk = kesalahan percobaan

Untuk menunjukkan perlakuan yang berbeda nyata dipergunakan uji lanjut BNJ :

$$BNJ_{\alpha} \text{ waktu (t)} = Q_{\alpha} \cdot db \cdot S_{\bar{y}}$$

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{KTG}{D \cdot r}}$$

$$BNJ_{\alpha} \text{ medium (D)} = Q_{\alpha} \cdot db \cdot S_{\bar{y}}$$

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{KTG}{t \cdot r}}$$

$$BNJ_{\alpha} \text{ int (dt)} = Q_{\alpha} \cdot db \cdot S_{\bar{y}}$$

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{KTG}{r}}$$

Keterangan :

D = jumlah perlakuan medium

t = jumlah perlakuan waktu

r = ulangan