

BAB IV

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Taksonomi dan Laboratorium Mikrobiogenetika, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Diponegoro. Penelitian dilakukan antara bulan Maret sampai dengan Juli 1997.

A. Bahan Penelitian

1. Isolat murni kapang *B. bassiana* dari Laboratorium Mikrobiologi dan Bioproses Jurusan Teknik Kimia, Institut Teknologi Bandung.
2. Hewan uji yang berupa larva *P. xylostella* hasil pembiakan massal di laboratorium.
3. Tanaman kubis (*Brassica oleracea*).
4. Medium agar miring TEA (Tauge Ekstrak Agar).
5. Medium jagung giling.
6. Tween 80

B. Alat Penelitian.

Kandang kassa berukuran 120x 60 x 40 cm, Toples kecil berdiameter 10 cm dan tinggi 5 cm, Pot plastik berdiameter 10 cm dan tinggi 12 cm, Tabung reaksi, Tabung erlenmeyer 100 ml, Jarum ose, Lampu spiritus/bunsen, Haemocytometer, Mikroskop cahaya.

C. Cara Kerja

Cara kerja dalam penelitian ini dibagi dalam beberapa tahap yaitu :

1. Pembiakan massal *P. xylostella*.
2. Perbanyak isolat kapang pada agar miring dan media jagung giling.
3. Perhitungan konidia kapang *B. bassiana*.
4. Pengujian konidia kapang *B. bassiana* terhadap mortalitas larva *P. xylostella*.
5. Analisis data

1. Pembiakan Massal *P. xylostella*.

- Larva *P. xylostella* yang akan dibiakan secara massal didapatkan dari lapangan yaitu kebun kubis di daerah Bandungan.
- Larva *P. xylostella* tersebut kemudian dipelihara dengan menggunakan tanaman kubis yang ditanam dalam pot-pot plastik dan diletakkan di dalam kandang kassa (Lampiran 01. Gambar 11.).
- Rearing ini dilakukan sampai mendapatkan jumlah larva *P. xylostella* yang mencukupi. Larva yang digunakan sebagai hewan uji adalah larva instar ke-3, yaitu larva yang berumur kira-kira 7-9 hari sejak menetas.

2. Perbanyak biakan kapang dalam media agar miring dan media jagung giling.

- Isolat murni kapang *B. bassiana* diperbanyak dalam media agar miring TEA dengan cara memindahkan satu ose biakan kapang dalam media agar miring secara aseptik.

- Setelah biakan kapang berumur 7 hari, kemudian dipindahkan dalam media jagung giling (Lampiran 01. Gambar 08.).
- Pembuatan media jagung giling :
jagung giling dicuci bersih, direndam dalam air panas selama lebih kurang 30 menit, kemudian dikukus selama 15 menit. Setelah dingin dimasukkan dalam tabung erlenmeyer, tiap-tiap tabung erlenmeyer diisi dengan 20 gram jagung giling. Jagung giling selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, setelah dingin siap diinokulasi.
- Inokulasi dilakukan dengan cara aseptik, setiap erlenmeyer media jagung giling diinokulasi dengan satu ose biakan *B. bassiana*, kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 7 hari.
- Setelah biakan berumur 7 hari, kemudian diaduk secara aseptik dengan menggunakan spatula supaya konidia kapang yang mulai tumbuh dapat tersebar secara merata dalam media jagung giling. Biakan siap digunakan setelah berumur 10 hari setelah pengadukkan (Lampiran 01. Gambar 07.).

3. Perhitungan konidia kapang.

- Sebelum dilakukan perhitungan dibuat suspensi konidia dengan cara menambahkan 100 ml aquades pada biakan kapang jagung giling pada erlenmeyer, kemudian diaduk dengan menggunakan spatula secara aseptik dan dikocok sampai konidia terlepas dari miseliana (Anonim, 1993)
- Diambil sedikit suspensi dengan menggunakan pipet dan dilakukan perhitungan konidia dengan menggunakan haemocytometer. Perhitungan

konidia dengan menggunakan rumus dari Bibiana dan Hastowo (1992), yaitu :

$$\text{Jumlah konidia} = E \times 50 \times 10^3 \times F$$

E : Jumlah sel konidia

F : Faktor pengenceran

- Setelah dilakukan perhitungan dibuat 3 macam

konsentrasi suspensi konidia yaitu :

$$K_1 : 2,45 \times 10^7 / 50 \text{ ml}$$

$$K_2 : 1,75 \times 10^8 / 50 \text{ ml}$$

$$K_3 : 1,1 \times 10^9 / 50 \text{ ml}$$

Masing-masing konsentrasi suspensi konidia diberi 1 tetes larutan Tween 80 yang berfungsi sebagai penurun tegangan permukaan.

4. Pengujian konidia kapang terhadap mortalitas larva *P. xylostella*.

- Pengujian konidia kapang terhadap mortalitas larva *P. xylostella* dilakukan dengan dua cara, yaitu disemprotkan pada tubuh hewan uji (A_1) dan disemprotkan pada makanan (A_2).
- Masing-masing unit percobaan diisi dengan 10 ekor larva. Perlakuan A_1 dan A_2 masing-masing mendapat 4 tingkatan konsentrasi perlakuan yaitu K_1 ($2,45 \times 10^7 / 50 \text{ ml}$), K_2 ($1,75 \times 10^8 / 50 \text{ ml}$), K_3 ($1,1 \times 10^9 / 50 \text{ ml}$), dan K_0 (aquades ditambah 1 tetes Tween 80) sebagai kontrol. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali (Lampiran 01. Gambar 12).

- Penyemprotan suspensi spora dengan menggunakan sprayer dilakukan pada sore hari antara pukul 16.00-18.00. Setiap unit percobaan disemprot sebanyak 3 kali ($\pm 0,75$ ml).
- Pengamatan dilakukan setiap pagi dan sore dengan mencatat jumlah larva yang mati dan terinfeksi kapang *B. bassiana*, selain itu dicatat juga faktor lingkungan yang berupa temperatur dan kelembaban udara pada saat pengamatan.

5. Analisis Data

Data yang didapatkan dari pengamatan terhadap mortalitas larva *P. xylostella* dianalisis dengan menggunakan Anova. Rancangan yang digunakan adalah Percobaan Faktorial dengan didasari Rancangan Acak Lengkap untuk mengetahui ada atau tidaknya interaksi antar perlakuan. Kemudian dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Duncan Wilayah Berganda (DMRT) dengan menggunakan taraf kepercayaan sebesar 95% ($\alpha : 0,05$). Sebelum data dianalisis dengan Anova, dilakukan Uji Normalitas (Gaspersz, 1991).

6. Parameter

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- jumlah larva yang mati
- lama waktu kematian larva