

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hama Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau Kampus Bina Widya Jln. Bina Widya Km 12,5 Kelurahan Simpang Baru, Panam-Pekanbaru. Lama penelitian sekitar 4 bulan yaitu dari bulan September 2009 sampai dengan Desember 2009.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Nimfa *Helopeltis* spp yang diperoleh dari pertanaman kakao masyarakat di Kecamatan Ujungbatu, Kab. Rokan Hulu-Riau, isolat *B. bassiana* Lokal Riau koleksi Laboratorium Hama Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau, PDA (*Potato Dextrose Agar*), daun mimba yang diperoleh dari halaman Fakultas Pertanian Universitas Riau, buah kakao, jagung pecah, tisu gulung, plastik kaca ukuran ½ kg, plastik mika, alkohol 70% dan aquades steril.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan, alat semprot (*hand sprayer*) ukuran 1 liter, gelas ukur ukuran 50 ml dan 100 ml, kain kasa, gelas piala, batang pengaduk, kertas label, *blender*, kompor, dandang, sendok, mikroskop, loupe, jarum ose, *scaple*, *shaker*, cawan petri, lampu bunsen, *laminar air flow*, *termohyrometer*, *haemocytometer* pipet tetes, busa, kaleng dengan diameter 6 cm dan tinggi 2,5 cm, *doubletip*, dan stoples plastik dengan diameter 16 cm dan tinggi 20 cm dan alat tulis.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari 2 faktor yaitu; faktor I (konsentrasi *B. bassiana*) dan faktor II (konsentrasi ekstrak daun mimba).

Faktor I (konsentrasi *B. bassiana*)

Taraf : B₀ : Tanpa *B. bassiana*

B₁ : konsentrasi *B. bassiana* 80 g/l air

B₂ : konsentrasi *B. bassiana* 85 g/l air

Faktor II (konsentrasi Ekstrak Daun Mimba)

Taraf : M_0 : Tanpa ekstrak daun mimba

M_1 : konsentrasi ekstrak daun mimba 5% (50 ml/l air)

M_2 : konsentrasi ekstrak daun mimba 10% (100 ml/l air)

Dari perlakuan diatas, maka diperoleh 9 kombinasi perlakuan dengan ulangan sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 27 unit percobaan. Data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik dengan menggunakan sidik ragam. Model linear dari analisis statistik rancangan yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan :

Y_{ijk} = Hasil pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang mendapat kombinasi perlakuan taraf ke-i dari faktor *B. bassiana* dan taraf ke-j dari faktor ekstrak daun mimba.

μ = Rata-rata nilai tengah

α_i = Pengaruh perlakuan pemberian *B. bassiana* terhadap taraf ke-j

β_j = Pengaruh perlakuan pemberian ekstrak daun mimba terhadap taraf ke-i

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Pengaruh interaksi kedua faktor

ε_{ijk} = Pengaruh galat satuan percobaan faktor *B. bassiana* pada taraf ke-i dan faktor ekstrak daun mimba pada taraf ke-j pada ulangan ke-k.

Pengujian lanjutan dilakukan dengan uji DNMRT (*Duncan's New Multiple Range Test*) pada taraf 5%.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

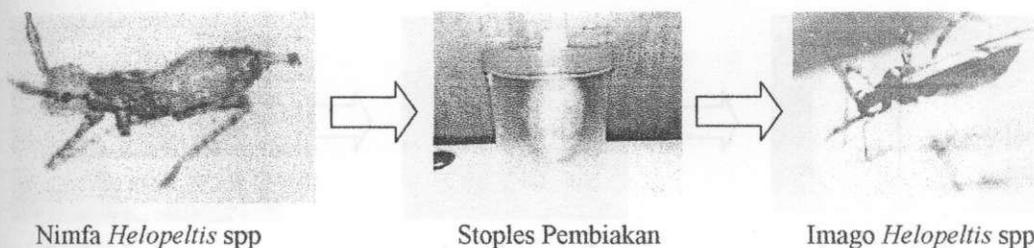
3.4.1. Pemiakkan *Helopeltis* spp

Nimfa *Helopeltis* spp instar 5 (lima) masing-masing sebanyak 10 ekor (lima jantan dan lima betina) dimasukkan ke dalam stoples dengan ukuran diameter 16 cm dan tinggi 20 cm. Buah yang digunakan sebagai pakan hama adalah buah kakao. Buah kakao dimasukkan ke dalam stoples dengan posisi tegak



dan diberi alas berupa kaleng yang diletakkan di dasar stoples. Pada bagian tengah tutup toples dilubangi dan ditutup dengan kain kasa, selanjutnya diatas kain kasa tersebut diletakkan busa basah.

Nimfa *Helopeltis* spp yang diinfestasikan dipelihara hingga menjadi imago. Jumlah stoples pembiakan sebanyak 30 stoples, dimana jumlah stoples disesuaikan dengan kebutuhan populasi imago sebagai serangga uji agar cukup untuk perlakuan.

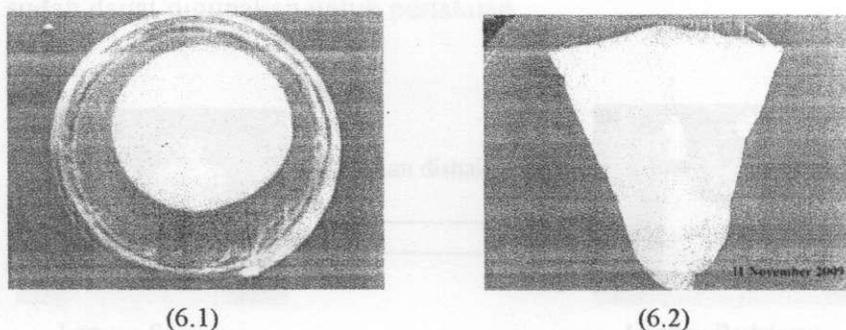


Gambar 5. Pembiakan nimfa *Helopeltis* spp instar 5 hingga menjadi Imago.

3.4.2. Reisolasi dan Perbanyakan Cendawan Entomopatogen *Beauveria bassiana*

Cendawan entomopatogen *B. bassiana* Lokal Riau yang diperoleh dari Laboratorium Hama Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau. Sebelum perbanyakan perlu dilakukan reisolasi pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) supaya tingkat patogenesis *B. bassiana* tetap terjaga.

Isolat *B. bassiana* dari media PDA (*Potato Dextrose Agar*) diperbanyak pada media jagung pecah. Cendawan *B. bassiana* diinokulasikan pada media jagung kemudian diinkubasikan selama 5–10 hari, selanjutnya cendawan *B. bassiana* sudah dapat digunakan untuk perlakuan.



Gambar 6. Cendawan *B. bassiana* pada medium PDA (6.1), Starter *B. bassiana* pada media jagung (6.2)

3.4.3. Pembuatan Larutan Sediaan Cendawan *Beauveria bassiana*

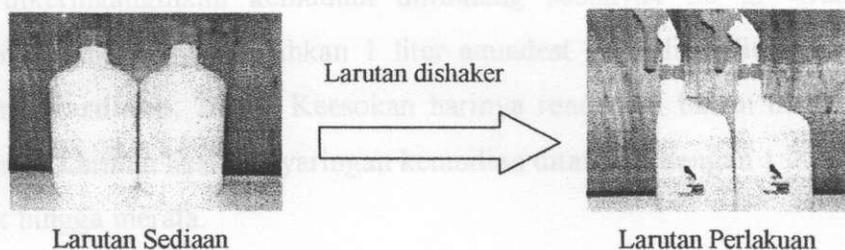
Pembuatan larutan sediaan diperoleh dari cendawan entomopatogen *B. bassiana* yang telah diperbanyak pada media jagung pecah dilakukan dengan mengambil sebanyak 80 gr dan 85 gr sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Cendawan *B. bassiana* tersebut dicampur dengan aquades steril masing-masing sebanyak satu liter lalu diaduk hingga merata, selanjutnya larutan disaring dengan kain kasa.



Gambar 7. Pembuatan Larutan Sediaan *B. Bassiana*

3.4.5. Pembuatan Larutan Perlakuan Cendawan *Beauveria bassiana*

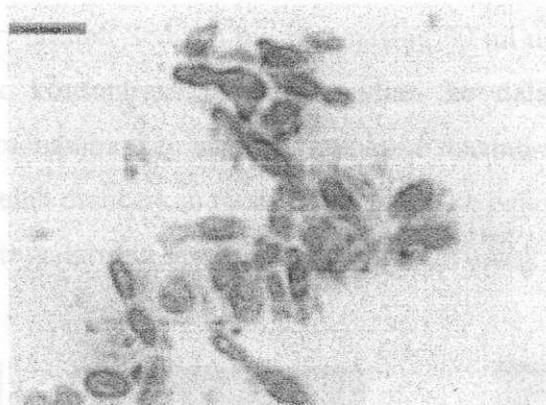
Pembuatan larutan cendawan *B. bassiana* untuk perlakuan diambil dari larutan sediaan masing-masing sebanyak satu liter untuk setiap konsentrasi. Selanjutnya ke dalam masing-masing larutan ditambahkan gula pasir 35 gr untuk konsentrasi 80 gr/l air dan 45 gr untuk konsentrasi 85 gr/l air. Gula pasir berfungsi sebagai cadangan makanan bagi konidia *B. bassiana* sebelum berhasil menginfeksi inang. Larutan cendawan *B. bassiana* tersebut kemudian diaduk dengan alat *shaker* selama 24 jam untuk mempercepat pembelahan sel dan dimasukkan ke dalam stoples dan diberi label sesuai konsentrasi, selanjutnya larutan sudah dapat digunakan untuk perlakuan.



Gambar 8. Pembuatan larutan perlakuan *B. bassiana*

3.4.6. Penghitungan Kerapatan Konidia

Cendawan entomopatogen *B. bassiana* yang telah diperbanyak pada media jagung pecah yang telah berumur 2 minggu diambil sebanyak 80g dan 85g sesuai dengan konsentrasi perlakuan dengan menggunakan timbangan. Masing-masing perlakuan dicampur dengan 1 liter aquades dan remas-remas sampai cendawan terpisah dari jagung kemudian disaring dengan menggunakan kain tile warna hitam. Pengenceran dilakukan dengan mengambil 1 ml larutan tersebut, kemudian dimasukkan dalam 9 ml aquades sehingga pengenceran 10^6 . Suspensi konidia dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* di bawah mikroskop.



Gambar 9. Konidia *Beauveria bassiana* pada Mikroskop
Pembesaran 100 x 10

3.4.7. Pembuatan Larutan Sediaan Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss).

Daun mimba diperoleh dari kebun Fakultas Pertanian Universitas Riau. Daun mimba yang digunakan adalah daun yang berada di posisi 3, 4 dan 5 dari setiap tangkai daun dengan warna daun hijau tua. Daun mimba yang masih segar diambil dan dikeringanginkan terlebih dahulu selama 15 menit. Daun mimba yang telah dikeringanginkan kemudian ditimbang sebanyak 50 gr. Daun mimba diblender dengan menambahkan 1 liter aquadest kemudian diendapkan selama 12 jam (Kardinan, 2000). Keesokan harinya rendaman bahan disaring dengan kain kasa. Larutan hasil penyaringan kemudian ditambah dengan 1 gr deterjen dan diaduk hingga merata.



Daun Mimba ditimbang

Daun Mimba diblender

Larutan Sediaan

Gambar 10. Langkah-langkah Pembuatan Larutan Sediaan Ekstrak Daun Mimba.

3.4.8. Pembuatan Larutan Perlakuan Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss)

Pembuatan larutan perlakuan ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) diambil dari larutan Sediaan masing-masing 50 ml untuk konsentrasi 5% dan 100 ml untuk konsentrasi 10%. Kemudian ke dalam larutan tersebut diencerkan dengan menambahkan air hingga volume masing-masing menjadi satu liter. Larutan yang telah diencerkan tersebut disimpan ke dalam wadah plastik dan diberi label. Selanjutnya larutan sudah dapat digunakan untuk perlakuan.



Larutan Sediaan

Aquadest steril

Larutan Perlakuan

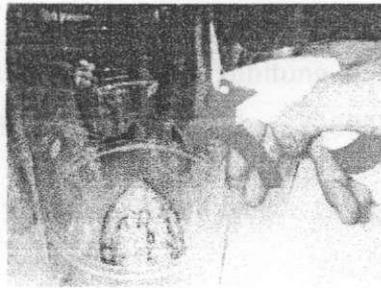
Gambar 11. Pembuatan Larutan Perlakuan Ekstrak Daun Mimba

3.4.9. Infestasi Hama Uji

Imago *Helopeltis* spp yang berumur 4 hari diinfestasikan ke dalam sungkup percobaan yang telah berisi masing-masing 1 buah kakao segar. Jumlah imago yang diinfestasikan ke dalam sungkup percobaan sebanyak 10 ekor/unit. Infestasi imago *Helopeltis* spp dilakukan dengan cara memindahkan langsung imago *Helopeltis* spp yang sebelumnya dipuasakan (tidak diberi makan) selama satu hari.

3.4.8. Pemberian Perlakuan (Jam)

Pemberian perlakuan dilaksanakan satu hari setelah imago *Helopeltis* spp diinfestasikan ke sungkup percobaan. Penyemprotan dilakukan menggunakan *hand sprayer*. Volume semprot masing-masing perlakuan setelah dikalibrasikan sebanyak 9 ml untuk setiap perlakuan. Pemberian perlakuan dilakukan dengan cara menyemprotkan larutan *B. bassiana* dan larutan Ekstrak Daun Mimba pada buah dan tubuh imago *Helopeltis* spp. Waktu penyemprotan larutan dilakukan pada sore hari sekitar pukul 17.00 WIB.



Gambar 12. Pemberian Perlakuan

3.5. Pengamatan

3.5.1. Waktu Muncul Gejala Awal (Jam)

Pengamatan dilakukan dengan cara melihat gejala awal yang terlihat dari imago *Helopeltis* spp. Pengamatan dilakukan setiap 12 jam setelah aplikasi sampai terlihat gejala awal.

3.5.2. Waktu Gejala Awal sampai Imago Mati (Jam)

Pengamatan dilakukan dengan menghitung waktu yang dibutuhkan sejak imago memperlihatkan gejala awal sampai imago mati, pengamatan dilakukan setiap 12 jam.

3.5.3. Lethal Concentration 50% (LC₅₀) %

Pengamatan dilakukan dengan menghitung imago uji yang mati sebanyak 50% pada tiap perlakuan setelah aplikasi. Pengamatan dilakukan setiap 12 jam.

3.5.4. *Lethal Time 50%* (LT_{50}) (Jam)

Pengamatan dilakukan dengan menghitung waktu yang dibutuhkan dari perlakuan yang ada untuk mematikan 50% imago uji. Pengamatan dilakukan setiap 12 jam.

3.5.5. Persentase Mortalitas Imago Harian (%)

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah imago yang mati setiap hari setelah diberikan perlakuan. Pengamatan dilakukan setiap 12 jam selama 10 hari.

Persentase mortalitas imago harian dihitung dengan rumus sebagai berikut Magguran (1988) dalam Kusrudi dan Sanjaya (2003):

$$MH = \frac{x - y}{x} \times 100\%$$

MH = persentase mortalitas harian

x = jumlah imago yang diuji

y = jumlah imago yang masih hidup

3.5.6. Persentase Mortalitas Imago Kumulatif (%)

Persentase mortalitas imago kumulatif dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$MK = \frac{y}{x} \times 100\%$$

MK = persentase mortalitas kumulatif

x = jumlah imago sebelum aplikasi

y = jumlah imago sesudah aplikasi

3.5.7. Pengamatan Pendukung (Tanpa Analisis)

3.5.7.1. Suhu dan Kelembaban Udara Tempat Penelitian

Suhu ($^{\circ}C$) dan kelembaban udara (%) ditempat penelitian dilakukan dengan meletakkan *termohyrometer* ditempat penelitian. Suhu dan kelembaban akan diamati dan dicatat setiap harinya pada setiap pengamatan. Data pengamatan disajikan dalam bentuk tabel.



3.5.7.2. Perubahan Tingkah Laku dan Morfologi

Perubahan tingkah laku dan morfologi imago *Helopeltis* spp diamati setelah disemprot dengan cendawan *B. bassiana*. Perubahan tingkah laku dan morfologi imago *Helopeltis* spp diamati setiap hari.

4.3. Waktu Muncul Gejala Awal Terinfeksi *Beauveria bassiana* (Jam)

Hasil pengamatan waktu muncul gejala awal terhadap imago *Helopeltis* spp setelah dianalisis ragam tidak berbeda nyata terhadap interaksi konsentrasi *B. bassiana* dengan konsentrasi Ekstrak Daun Mimba (lampiran 1a) dan hasil uji lanjut DNMRT pada taraf 5% dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Waktu Muncul Gejala Awal dengan Perilaku Kombinasi Perlakuan Konsentrasi *Beauveria bassiana* dengan Konsentrasi Ekstrak Daun Mimba (Jam)

Perlakuan A <i>B. bassiana</i>	Perlakuan B Ekstrak Daun Mimba			Rerata A
	M ₀ (0 ml/l)	M ₁ (50 ml/l)	M ₂ (100 ml/l)	
B ₀ (0 g/l)	128 ^a	68 ^b	56 ^{bc}	84,00 ^a
B ₁ (80 g/l)	44 ^{cd}	40 ^{cd}	28 ^{cd}	37,33 ^b
B ₂ (85 g/l)	32 ^{de}	20 ^f	20 ^f	24,00 ^b
Rerata B	68,00 ^a	42,66 ^b	34,66 ^b	

SE = 6,54%

Angka-angka pada garis yang diikuti oleh huruf kecil berbeda nyata menurut uji DNMRT pada taraf 5% setelah transformasi Log Y

Tabel 1 menunjukkan bahwa interaksi antara *B. bassiana* dan Ekstrak daun mimba tidak berbeda nyata terhadap munculnya gejala awal imago. Hal ini terlihat dari kombinasi perlakuan *B. bassiana* 85 g/l air dengan Ekstrak Daun Mimba 100 ml/l air dan kombinasi perlakuan *B. bassiana* 85 g/l air dengan Ekstrak Daun Mimba 50 ml/l air yang memberikan waktu tercepat muncul gejala awal yaitu masing-masing 12 jam, tidak berbeda nyata dengan kombinasi perlakuan *B. bassiana* 80 g/l air dengan Ekstrak Daun Mimba 100 ml/l air yaitu 28 jam.

Hasil pengamatan waktu muncul gejala awal terhadap imago *Helopeltis* spp setelah dianalisis ragam berbeda nyata terhadap faktor tunggal pemberian konsentrasi *B. bassiana* (lampiran 1a). Tabel 1 diatas menunjukkan bahwa

