

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Hama Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau. Pelaksanaannya dilakukan selama 4 bulan yaitu bulan Agustus sampai Nopember 2007

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva *Tenebrio molitor*, Tanah dipertanaman pisang, kelapa sawit, sawi dan jagung. aquades steril, natrium hipoklorit ( NaClO) 1%, alkohol 70%, pewarna fuchsin dan PDA (Potato Dextrose Agar).

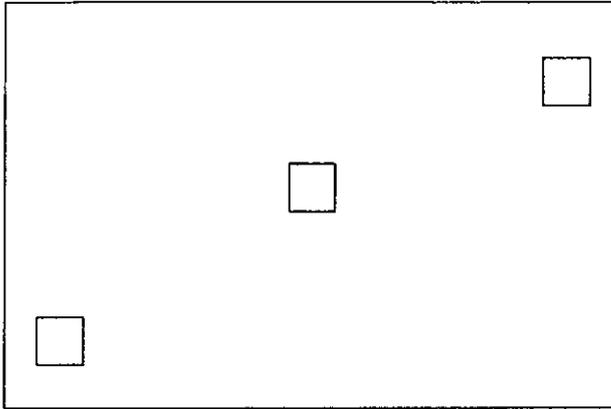
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop stereo dan monokuler, kantong plastic 2 kg dan  $\frac{1}{2}$  kg, label, stoples dengan diameter 14 cm, kain tile warna hitam, kertas saring, cawan petri berukuran 9 cm, tissue, kapas, jarum ose, lampu bunsen, alumunium foil, plastik wrap, tabung erlemeyer 250 ml, alat tulis. gunting, pingset, timbangan analitik, pengaduk, skop, objek glass, *haemocytometer*, kompor gas, oven, *hand sprayer*, *autoclave*, inkubator dan ruang isolasi.

#### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian dirancang dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 kali ulangan sehingga diperoleh 20 unit percobaan. Perlakuannya sebagai berikut:

- T1 : Tanah dari pertanaman pisang
- T2 : Tanah dari pertanaman kelapa Sawit
- T3 : Tanah dari pertanaman sawi
- T4 : Tanah dari pertanaman Jagung

Lokasi pengambilan contoh tanah ditentukan secara purposif yaitu kecamatan Tampan, kecamatan Marpoyan Damai dan kecamatan Rumbai Pesisir yang ada di kota Pekanbaru. Contoh tanah diambil dengan cara menentukan 3 titik pengambilan contoh secara diagonal pada petakan tanaman, luas satu petakan tanaman pertanian sebagai contoh sekitar 5000 meter. Tanah diambil sebanyak 2 kg dengan menggunakan sekop, kemudian dimasukkan kedalam plastik berukuran 2 kg dan diberi label asal tanah, tanggal pengambilan dan lokasi pengambilan tanah.



Data- data yang diperoleh dianalisis secara statistik yang menggunakan sidik ragam dengan model linier sebagai berikut:

$$Y = \mu + \tau_i + \alpha + \epsilon_{ij}$$

Dimana :

$Y_{ij}$  = Hasil pengamatan dari perlakuan ke- $i$  pada ulangan ke- $j$

$\mu$  = Nilai Tengah

$\tau_i$  = Efek perlakuan ke- $i$

$\alpha$  = Pengaruh faktor tanah pada pertanaman yang berbeda.

$\epsilon_{ij}$  = Efek eror dari perlakuan ke- $i$  pada ulangan ke- $j$ .

Apabila hasil analisis statistik menunjukkan pengaruh yang nyata, dilanjutkan dengan uji lanjut BNT taraf 5 %.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 pengadaan contoh tanah

Tanah sumber inokulum *B.bassiana* diambil dari tiga kecamatan di kota Pekanbaru yaitu Kecamatan tampan asal tanah pertanaman pisang dan jaguna, Marpoyan damai asal tanah sawi dan Rumbai pesisir asal tanah pertanaman kelapa sawit. Tanah diambil dengan cara menentukan tiga titik, pengambilan contoh secara diagonal pada petakan tanaman, luas satu petakan tanaman pertanian sebagai contoh sekitar 5000 meter. Tanah diambil sebanyak 2 kg dengan menggunakan sekop, kemudian dimasukkan kedalam plastik berukuran 2 kg dan diberi label asal tanah, tanggal pengambilan dan lokasi pengambilan tanah. Menurut Badan Pusat Statistik (BPS) Propinsi Riau (2004), di Indonesia total sebaran Podzolik Merah Kuning (PMK) seluas 30.401.000 Ha dan di Propinsi Riau seluas 3.162.773 Ha.

Tanah PMK merupakan salah satu jenis tanah yang ketersediaan unsur haranya rendah (miskin hara), tanah PMK memiliki struktur gumpal, teksturnya lempung berpasir hingga liat, konsistensinya adalah gembur dibagian atas dan teguh dilapisan tanah bawah. Tanah PMK memiliki kandungan bahan organik, pH yang rendah (3,5-5,5), dan miskin unsur N, P, K, Ca, Mg, S, dan Cu (Hakim, dkk., 1986)

#### 3.4.2 Pembiakkan larva *T. molitor*

Larva *Tenebrio molitor* dibeli di pasar Palapa Labuh baru kota Pekanbaru kemudian dibiakkan di Laboratorium Hama Tumbuhan sampai menjadi imago. Telur yang menetas menjadi larva, larva pada instar 6 itulah yang akan digunakan sebagai larva uji. Panjang larva yang digunakan yaitu 2-3 cm dan warna keputihan sebagai larva uji. Setiap perlakuan diberi larva *T. molitor* sebanyak 10 ekor, jumlah seluruh larva uji adalah 200 ekor.

#### 3.4.3 Cara mendapatkan isolat *B. bassiana*

Tanah yang telah diambil ditimbang sebanyak 400 gr dan dimasukkan ke dalam masing-masing stoples. Larva uji *Tenebrio molitor* sebagai umpan dimasukkan ke dalam stoples masing-masing berjumlah 10 ekor, kemudian ditutup dengan selapis tipis tanah dan disemprot dengan aquades steril agar kelembaban dapat dipertahankan. Penyemprotan ini menggunakan *hand sprayer* dengan volume semprot 1 liter dan dilakukan penyemprotan setiap hari, selanjutnya stoples ditutup dengan kain tile warna hitam. Pengamatan pada larva uji dimulai pada hari ketujuh setelah pemberian perlakuan, kemudian selanjutnya diamati setiap hari untuk mengetahui apakah ada larva yang terserang cendawan *B. bassiana*.

#### 3.4.4 Menumbuhkan cendawan *B. bassiana* di kertas saring

Larva yang terinfeksi cendawan *B. bassiana* terlebih dahulu disterilisasi permukaan dengan Natrium hipoklorit 1% selama 3 menit. Kemudian dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali dan dikering anginkan diatas kertas saring. Selanjutnya larva yang telah disterilisasi diletakkan pada cawan petri yang telah dialas dengan kertas saring yang telah dilembabkan dan ditutup rapat, lalu diinkubasi selama tujuh hari untuk mempercepat pertumbuhan cendawan *B. bassiana*.

Setelah terjadi pertumbuhan cendawan *B. bassiana* pada larva uji dilakukan pengamatan dibawah mikroskop stereo untuk melihat ciri-ciri cendawan *B. bassiana* seperti warna cendawan, bentuk koloni dan bentuk misellium. Apabila hasil pengamatan menunjukkan cendawan tersebut adalah *B. bassiana*, maka misellium yang keluar dari tubuh larva kemudian diambil menggunakan jarum ose dan dibiakkan pada medium PDA (Potato Dextrose Agar) dan diinkubasi selama 7 hari (Hasyim A, 2006).

#### 3.4.5 Pembuatan media tumbuh dan pemurnian isolat *B.bassiana*

Bahan yang dibutuhkan untuk memperoleh satu liter media padat adalah air suling (aquades) 1 liter dan medium PDA sebanyak 39 gr. Kedua bahan tersebut dimasukkan ke dalam tabung erlemeyer dan dimasak di atas kompor gas sampai mendidih dan didinginkan sampai kondisi menjadi hangat.

Cawan petri yang akan digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu dengan cara mencuci semua peralatan dan direndam dalam natrium hipoklorit 1% selama 5 menit, kemudian dimasukkan ke dalam oven selama setengah jam dengan suhu 115<sup>o</sup> C.

Media steril selanjutnya dituang ke dalam cawan petri secara aseptik (bebas hama) dan dilakukan dekat lampu bunsen pada ruang isolasi. Setiap cawan petri diisi kira-kira 10 ml, media dibungkus dengan plastik dan diikat dengan karet, disterilisasi lagi menggunakan *autoclave* selama setengah jam dengan tekanan 115<sup>o</sup> C dan dikeluarkan dari *autoclave* dibiarkan sampai padat. Misellium cendawan dari serangga terinfeksi diinokulasi pada medium dalam cawan petri dan dibiarkan selama kira-kira 1 minggu di ruang inkubasi.

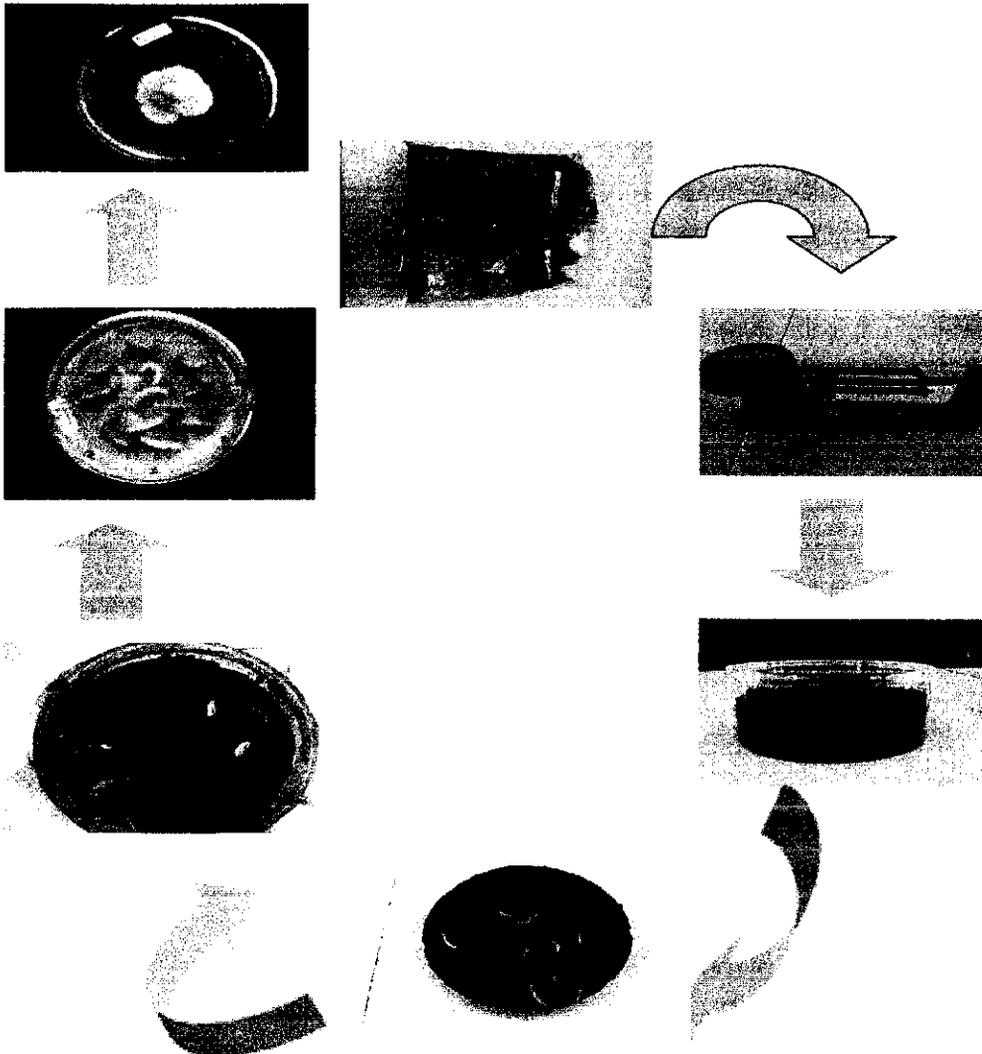
#### 3.4.5 Pembuatan suspensi cendawan entomopatogen *B.bassiana* untuk penghitungan kerapatan konidia.

Cara perbanyakkan *B.bassiana* adalah sebagai berikut :

- Kacang hijau dicuci bersih, selanjutnya direbus dengan menggunakan rebus selama 30 menit/ ½ matang. Kemudian di letakkan di atas baki dan dibiarkan sampai dingin.
- Masukkan masing-masing 100 gram ke dalam kantong plastik yang berukuran ½ kg, selanjutnya diinokulasi isolat *B.bassiana* dengan menggunakan jarum ose, dilakukan didalam ruang isolasi secara aseptis (bebas hama).
- Plastik ditutup dan dihektet kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 1 minggu.

Biakan cendawan *B. bassiana* yang telah berumur 2 minggu dapat digunakan, caranya dengan mengambil 10 gr isolat cendawan *B.bassiana* dan dicampur dengan 100 ml aquades di blender dan disaring dengan menggunakan kain tile warna hitam. Pengenceran dilakukan dengan mengambil 1 ml larutan tersebut, kemudian dimasukkan dalam 9 ml aquades sehingga pengenceran 10<sup>6</sup>. Suspensi konidia dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* di bawah mikroskop.

## Tahapan Pelaksanaan



**Gambar : Pelaksanaan Penelitian**

### 3.5 Pengamatan (hari)

- Waktu yang diperlukan untuk menumbuhkan cendawan *B. bassiana* pada larva *T. molitor* di media tanah dan diamati setiap hari. (hari) (Dianalisis)

Dengan cara mengamati larva yang terinfeksi ditandai dengan tumbuhnya hifa yang berwarna putih diantar segmen.

- Waktu yang dibutuhkan cendawan untuk tumbuh pada larva uji di kertas saring (hari) (Dianalisis)  
Dengan cara mengamati larva yang terinfeksi ditandai dengan tumbuhnya misellium yang berwarna putih diantar segmen
- Waktu yang diperlukan untuk menumbuhkan cendawan *B. bassiana* pada medium PDA. (hari) (Dianalisis)  
Dengan cara mengamati hifa yang berwarna putih pada media PDA setiap hari
- Pengamatan bentuk misellium pada medium PDA.  
Dengan membuat slide yang diberi pewarna *fuchsin* dan diamati dengan mikroskop monokuler dengan pembesaran 40x10.
- Pengamatan bentuk koloni pada medium PDA  
Dengan mengamati bentuk koloni pada medium PDA setiap hari.
- Pengamatan warna koloni pada medium PDA.  
Dengan mengamati warna koloni cendawan *B.bassiana* pada medium PDA
  
- Pengamatan bentuk konidia  
Dengan cara membuat slide diberi pewarna *fuchsin* dan diamati dengan mikroskop monokuler dengan pembesaran 40 x 10
- Pengamatan kerapatan konidia cendawan *B. bassiana* (cfu/ml) (Dianalisis)  
Dengan cara memakai alat *haemocytometer* pada pengenceran  $10^6$  dengan mikroskop.