**Metodologi Penelitian**

1. **Bahan dan Alat**

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah isolat *M. anisopliae* dari PT. First and Resource, Kubang, Pekanbaru, PDA (*Potato Dextrose* *Agar*), kentang, dekstrosa, agar, amoxilin, larva *O. rhinoceros* instar II, TKKS, pupuk kandang, dolomit, serbuk gergaji, EM4, jagung cacah, alkohol 70%, aquades steril gula pasir, dan gula merah.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop, jarum ose, dandang, sendok, panci, aluminium foil, lampu bunsen, *encase*, *cover glass,* tabung reaksi, *loupe*, cawan petri, *moist chamber*, timbangan analitik, *termohygrometer*, *haemocytometer*, batang pengaduk, gelas ukur, gunting, kain kasa, *rotary shaker*, kompor, plastik kaca, kertas label, plastik wrap, *handsprayer*, stoples, kain hitam, tisu, spatula, blender, terpal plastik, erlenmeyer, ember plastik, saringan, nampan, kamera, pipet tetes, *autoclave*, oven, dan alat tulis.

1. **Metode Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimen menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 4 ulangan sehingga diperoleh 20 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdiri dari 10 larva *O. rhinoceros*. Perlakuan yang digunakan adalah peningkatan konsentrasi *M. anisopliae*, sebagai berikut :

M1 = *M. anisopliae* pada media kompos konsentrasi 55 g.

M2 = *M. anisopliae* pada media kompos konsentrasi 65 g.

M3 = *M. anisopliae* pada media kompos konsentrasi 75g.

M4 = *M. anisopliae* pada media kompos konsentrasi 85 g.

M5 = *M. anisopliae* pada media kompos konsentrasi 95 g.

1. **Pelaksanaan Penelitian**
   1. **Penyediaan media kompos**

Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) diperoleh dari kebun sawit PT. ADEI *Plantation and Industry*, Kecamatan Pinggir, Kabupaten Bengkalis, Riau. TKKS dicacah menggunakan mesin pencacah. Bahan serbuk gergaji diambil dari pengrajin perabot di Jalan Cipta Karya, Kecamatan Tampan, Kota Pekanbaru. Bahan kompos TKKS dan serbuk gergaji disajikan pada Gambar 1.



b

a

Gambar 1. Penyediaan media kompos (a) penyediaan serbuk gergaji, (b) TKKS

yang telah dicacah (Dokumentasi Penelitian, 2021)

* 1. **Pembuatan kompos**

Pembuatan kompos dilakukan dengan mencampurkan TKKS dan serbuk gergaji secara merata di atas terpal plastik, ditambahkan pupuk kandang ayam dan dolomit. Perbandingan TKKS : serbuk gergaji : pupuk kandang 9:9:6. Sebanyak 100 ml EM4 dilarutkan dalam 50 liter air, ditambah 2 kg gula merah dan disiram ke media, diaduk dan ditutup dengan terpal plastik. Media tersebut dibolak-balik setiap minggunya, dan ditutup kembali. Inkubasi dilakukan selama 3 bulan. Pembuatan kompos disajikan pada Gambar 2.





c

b

a



d

e

Gambar 2. Pembuatan kompos (a) pencampuran TKKS, serbuk gergaji, dolomit dan pupuk kandang, (b) pengaktifan EM4, (c) penyiraman EM4 pada bahan kompos, (d) pembalikan kompos, (e) kompos ditutup terpal dan dibalik satu minggu sekali (Dokumentasi Penelitian, 2021)

* 1. **Sterilisasi kompos**

Kompos dilakukan sterilisasi dengan metode tyndallisasi. Kompos dilakukan 3 kali pemanasan dengan dandang masing-masing selama 1 jam. Sterilisasi kompos disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Sterilisasi kompos (Dokumentasi Penelitian, 2021)

* 1. **Isolasi *Metarhizium anisopliae***

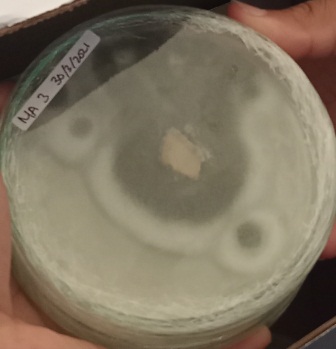
Isolat entomopatogen *M. anisopliae* diperoleh dari PT. *First resource* Kubang Raya, Kampar. Isolasi *M. anisopliae* ke media PDA dilakukan dengan cara media PDA dituang ke cawan petri yang sudah disterilisasi secara aseptik. Setiap cawan petri diisi ± 2 ml PDA dan dibiarkan hingga dingin. Isolat *M. anisopliae* diambil menggunakan jarum ose dan diletakkan di media PDA di ruang isolasi. Cawan petri ditutup rapat menggunakan plastik wrap dan diinkubasi selama tujuh hari. Isolasi *M. anisopliae* disajikan pada Gambar 4.





b

a



d



c

Gambar 4. Isolasi *M. anisopliae* (a) pembuatan PDA, (b) inokulasi isolat *M. anisopliae* pada media PDA, (c) cawan petri ditutup menggunakan plastik wrap, (d) cawan petri yang telah dipenuhi *M. anisopliae* (Dokumentasi Penelitian, 2021)

* 1. **Perbanyakan entomopatogen *M. anisopliae***

Perbanyakan *M. anisopliae* dilakukan pada media jagung pecah. Jagung pecah dicuci hingga bersih kemudian dikukus dalam dandang hingga sepertiga matang. Setelah dingin, jagung dimasukkan ke dalam plastik kaca. Inokulum *M. anisoliae* diinokulasi pada media jagung pecah di ruang isolasi. *M. anisopliae* diinkubasi selama 8 hari hingga seluruh media dipenuhi koloni jamur. Perbanyakan entomopatogen *M. anisopliae* disajikan pada Gambar 5.





c

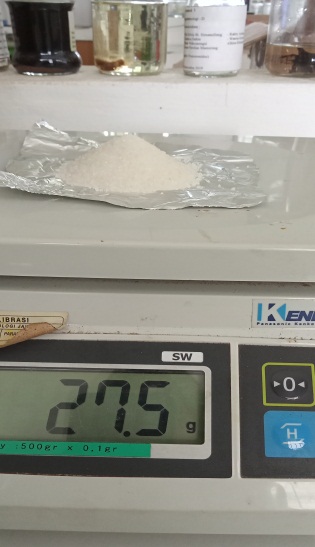
b

a

Gambar 5. Perbanyakan entomopatogen *M. anisopliae*, (a) jagung pecah dikukus hingga sepertiga matang, (b) jagung pecah dimasukkan dalam plastik kaca dan diberi isolat *M. anisopliae*, (c) media jagung pecah yang telah dipenuhi *M. anisopliae* (Dokumentasi Penelitian, 2021)

* 1. **Pembuatan suspensi**

*Metarhizium anisopliae* pada jagung pecah ditimbang sebanyak 55 g, 65 g, 75 g, 85 g dan 95 g menggunakan timbangan analitik dan masing-masing dicampur dengan 1 liter aquades. Suspensi *M. anisopliae* dimasukkan ke dalam botol, ditambahkan gula sebnyak 1% dan dikocok menggunakan *rotary shaker* selama 24 jam untuk mempercepat pembelahan sel. Pembuatan suspensi disajikan pada Gambar 6.



c

b

a





d

e

Gambar 6. Pembuatan suspensi (a) isolat *M. anisopliae* ditimbang, (b) gula ditimbang, (c) isolat *M. anisopliae* dan gula dilarutkan 1L aquades, larutan diaduk dan diremas, (d) suspensi di *shake*r selama 24 jam, (e) Suspensi yang telah di *shaker* (Dokumentasi Penelitian, 2021)

* 1. **Perhitungan konidia jamur**

Jamur *M. anisopliae* dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan metode *serial dilution* untuk mendapatkan kerapatan spora hingga . Suspensi sebanyak 1 ml larutan diencerkan dengan 9 ml air, diaduk. Suspensi tersebut sebanyak 1 ml diambil dan diencerkan dengan 9 ml air, diaduk dan begitu selanjutnya hingga mendapatkan pengenceran . Kerapatan konidia dihitung dengan *haemocytometer* di bawah mikroskop cahaya. Kerapatan konidia dihitung menggunakan rumus Nuryanti *et al.* (2012), sebagai berikut :

x 106

Dimana :

J : Kerapatan konidia dalam 1 g media

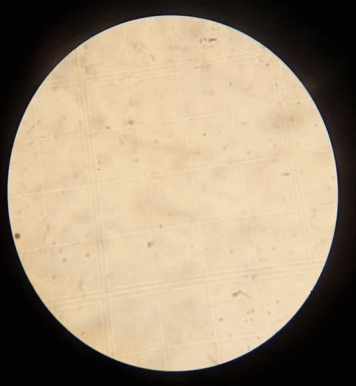
t : Kerapatan konidia dalam semua kotak bujur sangkar yang dihitung

n : Jumlah kotak bujur sangkar yang dihitung

d : Faktor pengenceran 108

0,25 : Konstanta

Perhitungan konidia jamur disajikan pada Gambar 7.



a

c

b

Gambar 7. Perhitungan konidia jamur (a) pengenceran suspensi hingga , (b) Larutan diletakkan pada *haemocytometer*, (c) konidia *M. anisopliae* dalam kotak bujur sangkar (Dokumentasi Penelitian, 2021)

* 1. **Infestasi larva *O. rhinoceros* L.**

Larva *O. rhinoceros* L. instar II diambil dari kebun masyarakat Kecamatan Tapung, Kabupaten Kampar, Riau sebanyak 200 ekor. Ciri-ciri larva *O. rhinoceros* instar II ukuran larva panjang 3-6 cm, lebar 0,6-1,5 cm, kepala 0,6-0,8 cm, warna integumen masih bening seperti instar I (Susanto *et al*., 2011). Infestasi larva *O. rhinoceros* disajikan pada Gambar 8.



a

b

Gambar 8. Infestasi larva *O. rhinoceros* (a) larva *O. rhinoceros* instar II, (b) larva diinfestasikan dalam ember perlakuan (Dokumentasi Penelitian, 2021)

* 1. **Aplikasi**

Aplikasi dilakukan dengan metode penyiraman. Suspensi *M. anisopliae* disiramkanpada setiap ember perlakuan sesuai konsentrasi perlakuan dengan volume siram 500 ml (Fauzana *et al*., 2020b) dan diinkubasi selama satu minggu. Setelah itu, setiap media perlakuan dimasukkan masing-masing 10 ekor larva *O. rhinoceros* L. pada kedalaman 10 cm. Seluruh media perlakuan ditutup dengan kain kasa dan disusun sesuai rancangan yang digunakan. Aplikasi disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Aplikasi (a) kompos ditimbang seberat 4kg setara dengan kedalaman 20 cm pada ember, (b) suspensi disemprotkan pada media kompos sesuai konsentrasi perlakuan, (c) perlakuan disusun sesuai rancangan (Dokumentasi Penelitian, 2021).

**Data Suhu dan Kelembaban**

1. Suhu (0C)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| No | Tanggal | Suhu (0C) | | |  |
| 07.00 wib | 12.00 wib | 17.00 wib | Suhu  rata-rata |
| 1  2  3  4  5  6  7  8  9  10  11  12  13  14 | 28 April 2021  29 April 2021  30 April 2021  01 Mei 2021  02 Mei 2021  03 Mei 2021  04 Mei 2021  05 Mei 2021  06 Mei 2021  07 Mei 2021  08 Mei 2021  09 Mei 2021  10 Mei 2021  11 Mei 2021 | 26,5  27,0  27,3  26,8  27,4  28,3  28,8  26,0  27,1  26,9  29,7  27,6  29,1  26,1 | 30,4  28,7  29,2  30,4  29,8  31,8  30,1  30,4  30,8  30,2  32,0  30,2  31,8  28,6 | 28,7  29,5  29,6  30,0  26,3  29,6  29,7  28,3  30,0  29,3  31,0  29,4  31,0  28,2 | 28,0  28,0  28,4  28,5  27,7  29,5  29,4  27,7  28,8  28,3  30,6  28,7  30,3  27,3 |
| Suhu rata-rata harian | |  |  |  | 28,7 |

1. Kelembaban (%)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| No | Tanggal | Kelembaban (%) | | |  |
| 07.00 wib | 12.00 wib | 17.00 wib | Kelembaban rata-rata |
| 1  2  3  4  5  6  7  8  9  10  11  12  13  14 | 28 April 2021  29 April 2021  30 April 2021  01 Mei 2021  02 Mei 2021  03 Mei 2021  04 Mei 2021  05 Mei 2021  06 Mei 2021  07 Mei 2021  08 Mei 2021  09 Mei 2021  10 Mei 2021  11 Mei 2021 | 82  80  79  81  78  73  73  82  79  80  72  73  72  83 | 66  74  72  67  70  65  67  66  66  67  66  67  66  74 | 74  72  72  67  81  70  79  75  67  73  66  72  66  75 | 76,0  76,5  75,5  74,0  76,8  70,3  73,0  76,3  72,8  75,0  69,0  71,3  69,0  78,8 |
| Kelembaban rata-rata harian | |  |  |  | 73,9 |

**Data Hasil Sidik Ragam**

1. Waktu Awal Kematian (Jam)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SK | DB | JK | KT | F-hitung | F-tabel |
| Perlakuan  Galat | 4  15 | 1324,80  5436,00 | 331,20  362,40 | 0,91 | 3,06 |
| Total | 19 | 6760,80 |  |  |  |

KK = 4,20 %

1. *Lethal Time* 50%
2. Sebelum transformasi

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SK | DB | JK | KT | F-hitung | F-tabel |
| Perlakuan  Galat | 4  15 | 11635,20  18396,00 | 2908,80  1226,40 | 2,37 | 3,06 |
| Total | 19 | 30031,20 |  |  |  |

KK = 2,90 %

1. Setelah transfromasi

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1. SK | DB | JK | KT | F-hitung | F-tabel |
| Perlakuan  Galat | 4  15 | 11,22  18,08 | 2,81  1,21 | 2,33 | 3,06 |
| Total | 19 | 29,30 |  |  |  |

KK =0,07 %

1. Mortalitas Total
2. Sebelum transformasi

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SK | DB | JK | KT | F-hitung | F-tabel |
| Perlakuan  Galat | 4  15 | 1830,00  1025,00 | 457,50  68,33 | 6,70\* | 3,06 |
| Total | 19 | 2855,00 |  |  |  |

KK = 2,25 %

\*= signifikan

b. Setelah transformasi Arc sin

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SK | DB | JK | KT | F-hitung | F-tabel |
| Perlakuan  Galat | 4  15 | 1052,514  757,842 | 263,128  50,523 | 5,21\* | 3,06 |
| Total | 19 | 1810,356 |  |  |  |

KK = 0,12%

\* = signifikan