

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen laboratorium dengan pendekatan kuantitatif, yaitu melakukan kontrol dan observasi pada subyek untuk melihat pengaruh perlakuan tertentu terhadap variabel yang diamati. Metode eksperimen dalam penelitian kuantitatif bertujuan mengkaji hubungan sebab akibat melalui manipulasi variabel pada kelompok eksperimen dan membandingkannya dengan kelompok kontrol yang tidak dimanipulasi (Jayantika, 2018). Pendekatan kuantitatif melibatkan data numerik yang memungkinkan prediksi tren populasi yang memungkinkan generalisasi hasil melalui analisis statistik (Mukhid, 2021).

### 3.2 Desain Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial, yaitu terdiri dari empat faktor dengan kombinasi perlakuan perbedaan konsentrasi isolat jamur *Metarhizium* sp. ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ), *Beauveria* sp. ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ), *Aspergillus* sp. ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ), dan *Penicillium* sp. ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ), serta perlakuan kontrol tanpa inokulasi jamur menggunakan akuades steril. Penentuan jumlah pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini dihitung menggunakan rumus pengulangan Federer (Rozi *et al.*, 2018) yaitu:

$$\begin{aligned}(r-1)(t-1) &\geq 15 \\(r-1)(13-1) &\geq 15 \\(r-1)(12) &\geq 15 \\12r - 12 &\geq 15 \\12r &\geq 27 \\r &\geq 2,25 = 3\end{aligned}$$

Keterangan:

- t : Jumlah kelompok perlakuan,
- r : Jumlah pengulangan,
- 15 : Derajat kebebasan umum.

Hasil perhitungan menggunakan rumus tersebut, diperoleh setiap perlakuan dilakukan pengulangan adalah tiga kali, maka total pengulangan keseluruhan sampel sebanyak 39 (tiga puluh sembilan) kali pengulangan. Kombinasi perlakuan dan pengulangan digambarkan pada Tabel 3.1.

**Tabel 3.1** Perlakuan dan Pengulangan.

Perlakuan	Pengulangan		
	1	2	3
Ko	Ko – 1	Ko – 2	Ko – 3
MeA	MeA – 1	MeA – 2	MeA – 3
MeB	MeB – 1	MeB – 2	MeB – 3
MeC	MeC – 1	MeC – 2	MeC – 3
BeA	BeA – 1	BeA – 2	BeA – 3
BeB	BeB – 1	BeB – 2	BeB – 3
BeC	BeC – 1	BeC – 2	BeC – 3
AsA	AsA – 1	AsA – 2	AsA – 3
AsB	AsB – 1	AsB – 2	AsB – 3
AsC	AsC – 1	AsC – 2	AsC – 3
PeA	PeA – 1	PeA – 2	PeA – 3
PeB	PeB – 1	PeB – 2	PeB – 3
PeC	PeC – 1	PeC – 2	PeC – 3

Keterangan: Ko = Kontrol (akuades steril); MeA = *Metarhizium* sp. 10<sup>6</sup>; MeB = *Metarhizium* sp. 10<sup>7</sup>; MeC = *Metarhizium* sp. 10<sup>8</sup>; BeA = *Beauveria* sp. 10<sup>6</sup>; BeB = *Beauveria* sp. 10<sup>7</sup>; BeC = *Beauveria* sp. 10<sup>8</sup>; AsA = *Aspergillus* sp. 10<sup>6</sup>; AsB = *Aspergillus* sp. 10<sup>7</sup>; AsC = *Aspergillus* sp. 10<sup>8</sup>; PeA = *Penicillium* sp. 10<sup>6</sup>; PeB = *Penicillium* sp. 10<sup>7</sup>; PeC = *Penicillium* sp. 10<sup>8</sup>.

### 3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan kurang lebih selama empat bulan, yaitu pada bulan Desember 2024 – Maret 2025. Penelitian dan pengamatan dilakukan di Laboratorium Riset dan Bioteknologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA), Universitas Pendidikan Indonesia (UPI), Bandung.

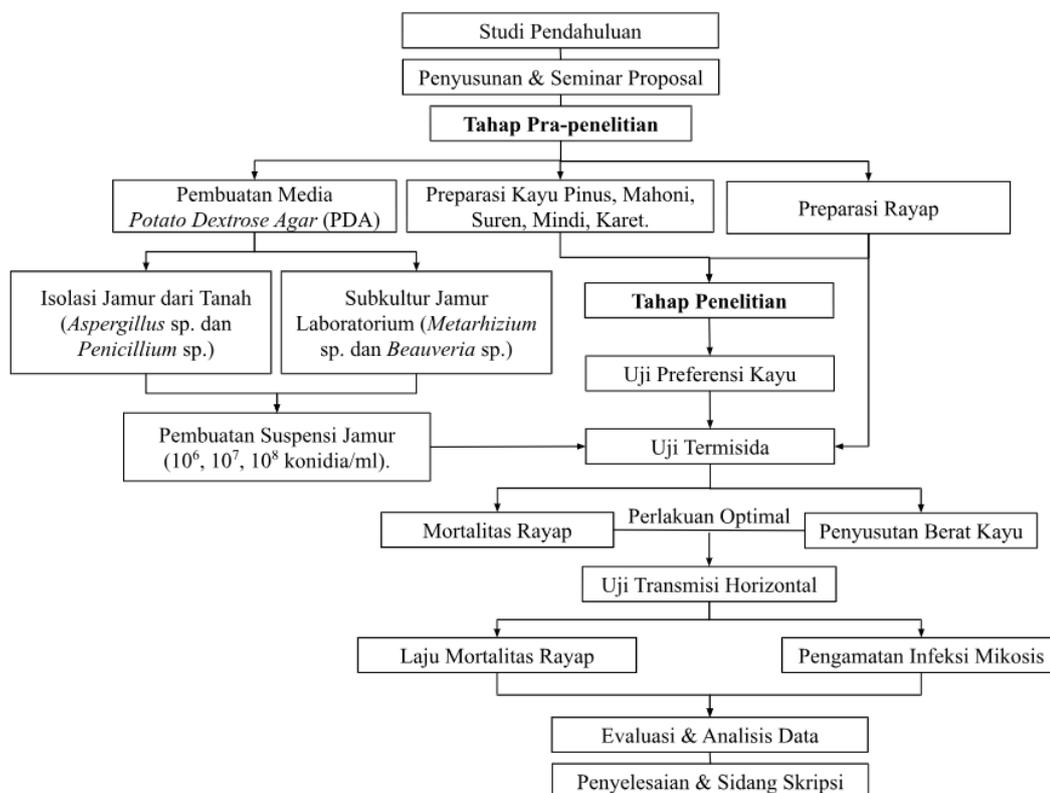
### 3.4 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah 20 rayap tanah *Macrotermes gilvus* dari kasta prajurit dan pekerja pada setiap sampel uji, mencakup rayap dalam kondisi hidup dan masih aktif bergerak. Sampel penelitian berupa rayap *M. gilvus* yang diberi beberapa jenis perlakuan, rayap diperoleh dari sarang rayap PT. Orkin Indonesia, Bekasi.

Isolat jamur *Metarhizium* sp. dan *Beauveria* sp. yang digunakan dalam percobaan diperoleh dari subkultur Laboratorium Badan Standardisasi Instrumen Pertanian (BSIP), Lembang, sedangkan isolat jamur *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. diperoleh dari hasil isolasi menggunakan umpan ulat hongkong dari tanah rizosfer pertanaman kubis di lahan organik bebas pestisida di BSIP, Lembang.

### 3.5 Alur Penelitian

Tahapan penelitian dalam pengendalian rayap menggunakan jamur entomopatogen dapat diuraikan pada Gambar 3.1 Diagram alir penelitian.



Gambar 3.1 Alur Penelitian.

### 3.6 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini terdiri dari dua tahap kegiatan yang meliputi tahap persiapan dan tahap penelitian, diuraikan sebagai berikut:

#### 3.6.1 Tahap Pra-penelitian

##### 1. Persiapan Alat dan Bahan

Peralatan dan bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini disiapkan. Alat dan bahan yang digunakan secara rinci dapat dilihat pada Lampiran 1. Sterilisasi dilakukan untuk memastikan kebersihan alat dan bahan serta menghindari kontaminasi. Proses sterilisasi dilakukan dengan membungkus peralatan menggunakan kertas, lalu dimasukkan ke dalam plastik tahan panas, kemudian ditempatkan ke dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm. Sampel kayu dipotong berbentuk kubus 2×2×2 cm menggunakan mesin pemotong, lalu dikeringkan dalam oven selama 1 jam.

## 2. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Pembuatan media *potato dextrose agar* (PDA) diawali dengan 36,5 g PDA yang dicampur dengan akuades steril hingga mencapai 1 Liter dalam gelas Beaker, kemudian dihomogenkan secara merata menggunakan *magnetic stirrer*. Campuran disterilisasi dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C (Yastanto, 2020). Selanjutnya, sebanyak 500 mg *antibiotic chloramphenicol* ditambahkan ke labu Erlenmeyer berisi media PDA dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*, kemudian ditutup dengan aluminium foil. Sekitar 25 ml media PDA dimasukkan ke dalam beberapa *petridish* dan dibiarkan hingga mengeras (Subekti *et al.*, 2024).

## 3. Isolasi dan Subkultur Biakan Murni Jamur

Metode kultur isolasi jamur *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp, mengacu pada metode Nuraida & Hasyim (2009) dan Sudiarta *et al.* (2024). Jamur diambil dari tanah (rizosfer) pertanaman kubis bebas pesitida, Lembang. Sampel tanah diambil dengan menggali pada kedalaman 5 – 10 cm di sekitar zona perakaran tanaman kubis pada tiga titik yang ditentukan. Setiap sampel sebanyak 400 g dimasukkan ke dalam kantong plastik, kemudian diayak menggunakan *sieve* 600 mesh. Sampel tanah sebanyak 400 g dimasukkan ke dalam jar plastik, dilembabkan dengan akuades steril hingga tanah nampak basah, lalu ditambahkan 10 ekor larva Ulat Hongkong (*Tenebrio molitor*) yang masih berwarna putih. Wadah jar ditutup dengan kain kasa yang telah dilembabkan. Pengamatan infeksi jamur pada larva dilakukan selama 3 – 7 hari.

Jamur yang tumbuh dipermukaan larva diisolasi dan dikultur sebagai sumber isolat. Larva yang terinfeksi jamur disterilisasi menggunakan larutan natrium hipoklorit 1% selama 3 menit, kemudian dibilas tiga kali dengan akuades steril dan dikeringkan di atas kertas saring steril. Selanjutnya, larva diletakkan pada *petridish* berisi media PDA, jamur isolat yang telah didiamkan selama lima hari dipindahkan ke dalam *laminar air flow*, isolat yang tumbuh di tubuh larva diambil menggunakan kawat ose dan diisolasi pada *petridish* baru berisi media PDA. Jamur hasil isolasi kemudian dimurnikan pada media PDA. Isolat jamur yang telah bebas kontaminasi dikultivasi pada media PDA untuk diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi makroskopis (pengamatan visual

terhadap koloni) dan mikroskopis (analisis struktur hifa/miselium, konidiofor, dan konidia menggunakan mikroskop). Hasil karakterisasi tersebut dibandingkan dengan literatur untuk memastikan identifikasi sesuai dengan genus *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp.

Selanjutnya, media PDA dari *petridish* yang mengandung isolat jamur *Beauveria* sp. dan *Metarhizium* sp. dari laboratorium BSIP diambil menggunakan kawat ose dan dipindahkan ke media padat baru sebagai subkultur, *petridish* ditutup, dibungkus, dan disegel rapat untuk memungkinkan pertumbuhan fungi optimal kemudian disimpan selama 14 hari pada suhu 28°C (suhu ruang) untuk proses konidiasi (Subekti *et al.*, 2024). Pengamatan pertumbuhan miselia jamur pada media PDA dan karakterisasi konidia dilakukan dengan diamati secara langsung serta menggunakan mikroskop dengan perbesaran  $\times 100$  (Yastanto, 2020). Biakan murni makroskopis pengamatan visual dapat dilihat pada Lampiran 8.

#### 4. Pembuatan Suspensi Jamur

Pembuatan suspensi jamur menggunakan prosedur Ihsan *et al.* (2023). Biakan jamur berumur 21 hari yang tumbuh pada media PDA dipanen dengan menimbang 10 g cendawan menggunakan timbangan analitik, kemudian dilarutkan dengan 100 ml akuades steril dalam Erlenmeyer dan dihomogenkan menggunakan *shaker* selama 15 menit. Kerapatan konidia dilakukan dengan meneteskan 0,2 ml suspensi ke dalam area perhitungan *haemocytometer*, mencakup lima kotak dalam pola zigzag terhitung mulai sisi kanan ke kiri (Ihsan *et al.*, 2023). Jumlah konidia dihitung dengan mikroskop binokuler perbesaran  $\times 400$  dengan rumus:

$$S = R \times P \times 10^4$$

Keterangan:

- S : Kerapatan spora
- R : Jumlah spora rata-rata dalam lima bidang pandang hemocytometer
- P : Faktor pengenceran
- $10^4$  : Konstanta *haemocytometer*

Sebanyak 1 ml cendawan tersebut diambil menggunakan *micropipette*, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu disuspensikan dalam 9 ml akuades steril dan dihomogenkan dengan *vortex* selama 3 menit untuk mencapai

suspensi kerapatan spora yang diinginkan ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  konidia/ml) melalui pengenceran bertahap pada setiap jenis jamur. Hasil perhitungan suspensi masing-masing isolat jamur secara rinci dapat dilihat pada Lampiran 4.

## 5. Preparasi Rayap

Species rayap yang digunakan pada penelitian ini adalah rayap tanah (*Macrotermes gilvus* Hagen) yang diperoleh dari koleksi koloni laboratorium. Koloni rayap ditempatkan pada tanah yang disterilkan di dalam jar plastik, kemudian dipindahkan ke dalam wadah dengan suhu  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  dan kelembaban relatif  $75 \pm 5\%$  dalam kondisi gelap dan dibiarkan selama 1 jam untuk proses aklimatisasi sebelum digunakan dalam uji termisida (Ambele *et al.*, 2020).

### 3.6.2 Tahap Penelitian

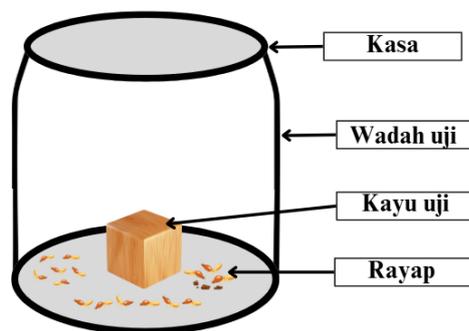
#### 1. Uji Preferensi Kayu

Pengujian preferensi kayu mengacu pada metode Suhasman *et al.* (2008) dengan modifikasi. Sampel uji terdiri dari lima jenis kayu yang berbeda, yaitu pinus, mahoni, karet, suren, dan mindi. Pengujian preferensi kayu dilakukan dengan terlebih dahulu memotong kayu sampel uji menjadi berbentuk balok berukuran  $2 \times 2 \times 2$  cm, kemudian mengukur berat awal sampel uji. Sampel uji tersebut dimasukkan ke dalam wadah tabung uji. Setiap sampel uji dilakukan lima kali pengulangan. Sejumlah 20 ekor rayap tanah *Macrotermes gilvus* (18 rayap pekerja dan 2 rayap prajurit sebagai stabilisator koloni) yang aktif dan sehat dimasukkan ke dalam masing-masing tabung akrilik tersebut, yang kemudian ditutup dengan kain kasa dan diletakkan di ruang gelap (suhu  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Jenis kayu yang paling disukai rayap dari uji ini selanjutnya digunakan pada uji termisida.

#### 2. Uji Termisida

Metode pengujian yang dilakukan mengacu pada Ohmura *et al.* (2000) dan Subekti, (2012) yaitu pengujian *no choice*. Pada wadah tabung uji (Gambar 3.2) diletakkan satu balok uji kayu berukuran  $2 \times 2 \times 2$  cm yang sebelumnya telah ditimbang beratnya, serta telah disemprotkan sebanyak 0,5 ml formulasi jamur entomopatogen *Metarhizium* sp., *Beauveria* sp., *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp., serta akuades sebagai kontrol pada setiap perlakuan lalu dikeringkan pada suhu ruang. Sebanyak 20 ekor rayap *Macrotermes gilvus* (18 rayap pekerja dan 2 rayap prajurit sebagai stabilisator koloni) yang aktif dan sehat dimasukkan ke dalam

wadah uji untuk menguji respons masing-masing perlakuan. Semua perlakuan diinkubasi di ruangan yang gelap (suhu  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ).



**Gambar 3.2** Wadah Uji Termisida (Subekti, 2012).

### 3. Uji Transmisi Horizontal

Pengujian transmisi horizontal rayap mengacu pada metode Ihsan *et al.* (2023). Sebanyak 45 rayap dicelupkan dalam 3 ml pada suspensi inokulum reaktivasi berdasarkan konsentrasi optimum pada pengujian sebelumnya selama 30 detik dalam *petridish*. Kemudian rayap diisolasi dalam wadah tabung uji yang berisi balok kayu  $2 \times 2 \times 2$  cm sebanyak 5 kadaver rayap dan rayap yang bersih dimasukkan dengan tiga perbandingan: 1:1 (5 rayap kadaver dan 5 rayap bersih), 1:2 (5 rayap kadaver dan 10 rayap bersih), dan 1:3 (5 rayap kadaver dan 15 rayap bersih), serta 20 rayap bersih sebagai kontrol. Setiap perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan. dan dipelihara di ruang gelap (suhu  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

### 4. Pengamatan Mikosis

Pengamatan terhadap gejala infeksi jamur mikosis pada rayap dilakukan melalui serangkaian tahapan observasi yang dimulai dengan pengambilan sampel rayap yang telah mati akibat infeksi jamur entomopatogen, serta rayap yang mati pada perlakuan kontrol sebagai pembanding. Selanjutnya, masing-masing sampel diamati untuk mengidentifikasi gejala infeksi mikosis secara morfologis melalui pengamatan makroskopis, seperti perubahan warna, munculnya miselium, dan tekstur tubuh. Untuk mendapatkan data yang lebih rinci dan akurat, pengamatan lanjutan dilakukan menggunakan mikroskop stereo dan/atau mikroskop binokuler. Pendekatan ini bertujuan untuk memastikan adanya indikasi infeksi khas mikosis serta membedakan dengan kematian akibat faktor lain.

## 5. Pengambilan Data

Pengambilan data setiap 6 jam dimulai setelah pemberian perlakuan hingga mencapai mortalitas 100% pada semua pengulangan. Observasi harian dilakukan untuk mencatat mortalitas rayap akibat infeksi jamur entomopatogen. Rayap yang mati segera diambil untuk mencegah kontaminasi pada rayap hidup. Uji preferensi kayu dilakukan sebagai uji pendahuluan untuk mengidentifikasi preferensi konsumsi rayap *Macrotermes gilvus* terhadap berbagai jenis kayu, dilanjutkan uji termisida untuk menentukan konsentrasi optimal pada setiap jamur, hasil uji ini akan diketahui mortalitas rayap dan penyusutan sampel kayu. Selanjutnya, dilakukan uji lanjutan, yaitu uji transmisi horizontal untuk mengevaluasi penyebaran infeksi dari rayap yang terinfeksi ke individu lain dalam koloni. Pengamatan morfologis rayap dilakukan untuk memahami gejala infeksi mikosis pada tubuh rayap akibat inokulasi jamur. Selain itu, data faktor abiotik (suhu, kelembaban, dan intensitas cahaya) dikumpulkan sebagai data pendukung. Pengukuran faktor abiotik dilakukan tiga kali selama perlakuan.

### 3.7 Teknik Pengumpulan Data

#### 1. Pengukuran Mortalitas Rayap

Mortalitas rayap dilakukan dengan menghitung banyaknya rayap yang mati akibat terinfeksi sebagai kriteria daya racun. Waktu kematian dilihat dari berapa hari yang dibutuhkan untuk membunuh *Macrotermes gilvus* pada kematian pertama dan mortalitas mencapai nilai 100% (Ohmura *et al.*, 2000). Perhitungan persentase mortalitas rayap dengan menggunakan rumus berdasarkan JIS (2010) sebagai berikut:

$$\text{Mortalitas (\%)} = \frac{N_1}{N_2} \times 100\%$$

Keterangan:

$N_1$  = Jumlah rayap yang mati

$N_2$  = Jumlah rayap keseluruhan yang diamati

#### 2. Pengukuran Penyusutan Berat Sampel Kayu

Kayu diukur melalui besarnya persentase penyusutan berat sampel kayu uji akibat konsumsi makan rayap setelah diberikan sampel uji. Sebelum dan sesudah perlakuan kayu dibersihkan dan ditimbang berat keringnya. Uji penurunan berat kayu mencerminkan aktivitas makan rayap dan dampak infeksi pada populasi

rayap. Jika inokulasi jamur efektif sebagai patogen, maka infeksi pada rayap *Macrotermes gilvus* akan mengurangi aktivitas makan mereka, yang nampak dari penurunan yang lebih kecil pada berat kayu. Rayap yang terinfeksi cenderung lebih lemah atau mati, sehingga konsumsi kayu berkurang. Persentase penyusutan berat sampel uji dihitung dengan menggunakan rumus JIS (2010) sebagai berikut:

$$\text{Penyusutan berat kayu (\%)} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan:

$W_1$  = Berat kering kayu sebelum pengujian

$W_2$  = Berat kering kayu setelah pengujian

### 3. Pengamatan Transmisi Horizontal Infeksi Mikosis Rayap

Kematian rayap akibat jamur pada transmisi horizontal dicatat dan diukur laju persentase mortalitasnya. Gejala infeksi rayap dikonfirmasi melalui pemeriksaan mikroskopis terhadap hifa dan spora pada permukaan bangkai rayap (Dimbi *et al.*, 2004). Dilakukan juga pengamatan morfologis terhadap rayap kontrol. Pengamatan ini dilakukan untuk mengamati infeksi mikosis pada kadaver rayap *Macrotermes gilvus* yang terinfeksi menggunakan mikroskop.

#### 3.8 Analisis Data

Data dianalisis dengan membandingkan tingkat mortalitas rayap yang diberikan berbagai konsentrasi jamur, penyusutan berat sampel kayu, dan uji transmisi horizontal, serta pengamatan gejala infeksi mikosis. Data diolah dan dianalisis menggunakan program SPSS 16.0 *for Windows*. Data untuk setiap perlakuan dianalisis dengan uji *One-Way* ANOVA atau uji Kruskal-Wallis pada tingkat kepercayaan 95% ( $p < 0,05$ ). Uji Tukey-Kramer *multiple comparison* atau uji Mann-Whitney diterapkan untuk menilai perbedaan efek konsentrasi jamur ketika terdapat signifikansi. Efek dianggap tidak signifikan secara statistik apabila nilai  $p$  melebihi 0,05 pada tingkat kepercayaan 95% (Chin *et al.*, 2021). Hasil analisis ini akan dipadukan dengan data pendukung lainnya dan diidentifikasi lebih lanjut melalui studi literatur. Kesimpulan ditarik berdasarkan temuan dan pembahasan dari parameter yang telah diuji.