

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental. Eksperimen dilakukan untuk mengetahui entomopatogen manakah yang terbaik untuk dijadikan nanopartikel perak (NPP) dan efektif dalam mempengaruhi mortalitas *Spodoptera exigua*.

#### **3.2 Desain Penelitian**

Desain penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pada rancangan acak lengkap, setiap perlakuan dalam percobaan dirancang dengan kondisi yang bervariasi dengan keadaan masih homogen (Litaay, 2013).

Pada penelitian ini variabel yang digunakan adalah:

1. Variabel bebas: NPP yang disintesis dari beberapa entomopatogen.
2. Variabel terikat: NPP yang efektif dalam mempengaruhi mortalitas *S. exigua*.

#### **3.3 Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah hama penyerang tanaman bawang daun. Sampel yang digunakan merupakan larva instar III *S. exigua* yang didapatkan dari tanaman bawang.

#### **3.4 Instrumen Penelitian**

##### **3.4.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari hingga Mei 2020 yang berlokasi di Laboratorium Riset Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

##### **3.4.2 Alat dan Bahan Penelitian**

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan alat dan bahan didapatkan dari Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, FPMIPA UPI dan Balitsa yang secara lengkap terlampir pada lampiran I.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

Pada tahap persiapan, alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian dipersiapkan secara aseptik. Seluruh alat dibersihkan terlebih dahulu dan beberapa alat disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm. Bahan yang digunakan ditimbang dan diukur sesuai dengan kebutuhan.

#### 3.5.2 Pemeliharaan (*Rearing*) Ulat Grayak Bawang (*Spodoptera exigua*)

Sebanyak  $\pm 20$  koloni telur *S. exigua* diambil dari tempat melekatnya yaitu tanaman bawang daun yang didapatkan dari kebun Balai Penelitian Tanaman dan Sayuran (Balitsa). Koloni telur tersebut kemudian ditempatkan pada wadah plastik berukuran 35 x 25 x 10 cm yang telah diberi tanah dan ditanami bawang daun. Hal tersebut dilakukan agar memberikan suasana yang tidak jauh berbeda dari tempat asalnya. Ketika sudah ada telur yang menetas, setiap harinya ulat diberi pakan berupa potongan-potongan daun bawang, selain itu wadah dibersihkan dari pakan yang telah membusuk atau berjamur agar tidak mengkontaminasi ulat.

Saat ulat sudah mencapai instar V, ulat dipindahkan ke dalam wadah plastik tabung berdiameter 10 cm dengan tinggi 8 cm. Wadah tersebut diberi tanah dan ditutupi oleh kain kelambu yang direkatkan menggunakan karet. Hal tersebut dilakukan agar memudahkan pemindahan pupa. Pupa dipindahkan ke dalam wadah plastik tabung berdiameter 16 cm dengan tinggi 19 cm yang pada bagian dalamnya telah diselubungi *paper towel* sebagai media untuk bertelur. Wadah tersebut ditutupi oleh kain kelambu yang direkatkan menggunakan karet. Ketika *S. exigua* telah mencapai tahap dewasa (imago), setiap harinya diberi pakan berupa madu 1% yang diteteskan di atas kain kelambu penutup wadah. Telur-telur baru yang melekat di *paper towel* dipindahkan ke dalam wadah plastik tabung berdiameter 10 cm dengan tinggi 8 cm. Wadah tersebut ditutupi kain kelambu yang direkatkan menggunakan karet. Setiap hari ulat diberi pakan. Ulat diberi perlakuan ketika telah mencapai instar III.

### 3.5.2 Pengkulturan Jamur dan Bakteri Entomopatogen

Dua isolat dari jamur *Metarhizium* dan *Trichoderma* dikulturisasi kembali pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Sabbour, 2015; Vahabi et al., 2011). Kedua isolat jamur tersebut diinkubasi selama tiga hari dengan suhu  $\pm 35$  °C. Isolat bakteri *Bacillus* dikulturisasi kembali dengan medium *Nutrient Agar* (NA) dalam inkubator dengan suhu 37 °C (Mirzajani et al., 2014). Isolat jamur dan bakteri didapatkan dari Balai penelitian tanaman dan sayuran (Balitsa).

### 3.5.3 Persiapan Ekstrak Kultur Jamur dan Bakteri

Kultur jamur *Metarhizium* dan *Trichoderma* ditanam secara aerob di dalam botol kaca 250 ml yang berisi medium *Potato Dextrose Broth* (PDB) secara terpisah pada suhu 25 °C dan 150 rpm selama 72 jam. Kultur jamur *Metarhizium* dan *Trichoderma* yang ditanam disentrifugasi pada 12000 rpm selama 30 menit pada 25 °C dan supernatan digunakan untuk sintesis nanopartikel perak (Kamil et al., 2017). Bakteri *Bacillus* dikultur kembali di dalam botol kaca 250 ml yang berisi medium *Nutrient broth* (NB) pada suhu 37 °C dan 150 rpm selama 36 jam. Selanjutnya, kultur bakteri disentrifugasi dengan kecepatan putaran 5000 rpm selama 10 menit dan supernatan digunakan untuk sintesis nanopartikel perak (Banu et al., 2014).

### 3.5.4 Pensintesis Nanopartikel Perak

Masing-masing ekstrak jamur *Metarhizium* dan *Trichoderma* juga ekstrak dari bakteri *Bacillus* sebanyak 50 mL ditambahkan dengan larutan  $Ag^+$  60 ppm sebanyak 50 mL dalam tabung kaca berukuran 250 mL. Campuran ekstrak jamur *Metarhizium* dengan larutan  $Ag^+$  60 ppm maupun jamur *Trichoderma* dengan larutan  $Ag^+$  60 ppm diinkubasi pada suhu 40 °C dengan kecepatan putaran 200 rpm selama 5 hari dalam kondisi gelap (Kamil et al., 2017). Untuk campuran ekstrak bakteri dengan larutan  $Ag^+$  60 ppm diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan putaran 150 rpm selama 3 hari (Banu et al., 2014). Perubahan warna pada campuran merupakan indikator pertama bahwa nanopartikel telah berhasil terbentuk. Campuran akan berubah warna menjadi coklat (Tyagi et al., 2019).

### 3.5.5 Analisis Pengaruh NPP terhadap kematian *S. exigua*

Larva instar III *S. exigua* dicelupkan selama 30 detik ke dalam masing-masing perlakuan *Metarhizium*, *Trichoderma*, *Bacillus*, NPP-*Metarhizium*, NPP-

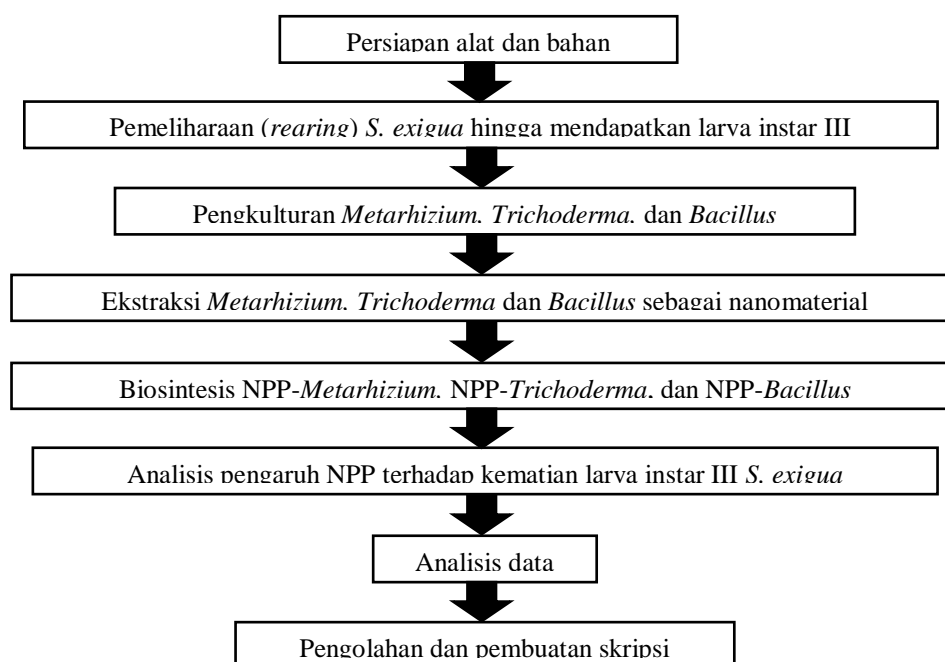
*Trichoderma*, NPP-*Bacillus*, NPP, dan air suling sebagai kontrol (Cetin et al., 2006). Setelah dilakukan pencelupan, larva ditempatkan pada cawan petri steril yang telah diberikan kertas saring steril dan pakan ulat. Kematian ulat dicatat pada jam ke-2, 4, 6, 9, 24, 48, 64, 72, 96, dan 108 setelah perlakuan. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

### 3.6 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji *Kruskal-Wallis*. Analisis data dilakukan menggunakan aplikasi IBM SPSS *Statistics* 24. Uji *Kruskal-Wallis* merupakan uji statistika non parametrik untuk mengetahui apakah data yang telah didapatkan memiliki perbedaan yang signifikan secara statistik.

### 3.8 Alur Penelitian

Penelitian ini dimulai dengan tahap persiapan, pemeliharaan (*rearing*) *S. exigua*, kultur jamur dan bakteri entomopatogen, ekstraksi nanomaterial, biosintesis nanopartikel perak (NPP), analisis pengaruh nanopartikel perak terhadap kematian ulat, dan analisis data yang dilanjutkan dengan pengolahan serta pembuatan skripsi. Alur penelitian ini dapat dilihat pada gambar 3.1 di bawah ini.



**Gambar 3.1** Alur penelitian