

III. METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Tanah diambil dari rizosfir pertanaman tomat di Kota Batu dan Kota Malang. Isolasi, identifikasi dan uji virulensi jamur patogen serangga dilakukan di Laboratorium Mikologi dan Laboratorium Nematologi, Jurusan HPT, FP, UB, Malang. Perbanyakan tungau *P. latus* dilakukan di Rumah Kawat, Jurusan HPT, FP, UB, Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2014 sampai dengan Juli 2014.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian adalah sekop tangan kecil, penggaris, meteran, kotak kedap udara ($p = 30$ cm; $l = 30$ cm; $t = 60$ cm) untuk pengambilan contoh tanah; autoklaf untuk sterilisasi alat dan media tumbuh; kotak plastik berukuran ($p = 13$ cm; $l = 13$ cm; $t = 10$ cm), *laminar air flow*, pinset dan jarum Ose untuk isolasi jamur patogen serangga; cawan Petri kaca ($d = 9$ cm) sebagai tempat media tumbuh jamur; gelas objek dan gelas penutup untuk pengamatan jamur secara mikroskopis, kamera digital untuk dokumentasi pengamatan ciri makroskopis jamur untuk identifikasi jamur patogen serangga; termohigrometer untuk mengukur suhu dan kelembaban udara; gunting, cawan Petri plastik ($d = 9$ cm) sebagai arena percobaan; kuas halus ukuran 00 untuk pengambilan dan pemindahan tungau, mikroskop stereo untuk pengamatan tungau; *L stick* untuk meratakan suspensi pada cawan Petri, mikropipet untuk pengambilan suspensi konidia, alat penghitung tangan (*hand counter*), mikroskop binokuler, *haemocytometer* untuk perhitungan kerapatan konidia dan viabilitas jamur patogen serangga; botol semprot 5 ml untuk menyemprotkan suspensi jamur patogen serangga.

Bahan yang digunakan adalah alkohol 70% dan NaOCl 2% untuk sterilisasi serangga; dextrosa 40 gr, pepton 10 gr, agar 15 gr, ekstrak khamir 2,5 gr, kloramfenikol 0,5 gr dan akuades 1 l bahan untuk pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar Yeast* (SDAY); tunas daun jeruk, spons ukuran ($p = 5$ cm; $l = 7$ cm), tisu ukuran ($p = 5$ cm; $l = 8$ cm) untuk arena percobaan; kertas saring ($d = 5$ cm) untuk menyaring suspensi jamur; 0,02% minyak Tween 80

sebagai bahan perekat, larva *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionida) instar 3 sebagai serangga umpan dan *P. latus* untuk pengujian, plastik *wrapping* untuk merekatkan cawan Petri kaca dan kertas aluminium foil untuk membungkus botol media.

Metode Penelitian

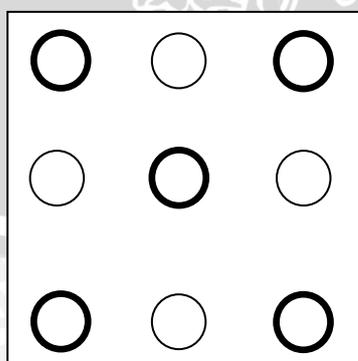
Lokasi Pengambilan Contoh Tanah Rizosfir Tomat. Jamur patogen serangga diisolasi dari rizosfir pertanaman tomat pada empat lokasi di Kota Batu dan Kota Malang. Penentuan lokasi berdasarkan ketinggian tempat dan aplikasi pestisida (Tabel 1).

Tabel 1. Lokasi pengambilan contoh tanah pada ketinggian tempat dan aplikasi pestisida di rizosfir tomat

Lokasi	Ketinggian Di Atas Permukaan Laut (m)	Intensitas Aplikasi Pestisida (bulan)
Desa Merjosari, Kec. Lowokwaru, Kota Malang	648	4 kali
Desa Sumberejo, Kec. Batu, Kota Batu	905	2 kali
Desa Songgokerto, Kec. Batu, Kota Batu	921	3 kali
Desa Sumber Gondo, Kec. Bumiaji, Kota Batu	1072	*

Keterangan: tanda * = aplikasi pestisida oleh petani jika ada serangan hama

Contoh tanah diambil lima titik dengan pola garis diagonal pada setiap lahan, sehingga diperoleh 5 contoh rizosfir tomat (Gambar 5).



● Titik Pengambilan Contoh Rizosfir Tomat

Gambar 6. Denah Pengambilan Contoh Rizosfir Tomat

Pengambilan contoh tanah dilakukan pada daerah sekitar perakaran tanaman tomat, dengan cara menggali tanah pada kedalaman 10-15 cm dan menggunakan sekop tangan kecil. Pada masing-masing lokasi contoh tanah diambil sebanyak 500 gram. Contoh tanah dimasukkan ke dalam kantong plastik yang diberi label berdasarkan lokasi, jenis komoditas dan tanggal pengambilan, kemudian disimpan pada kotak kedap udara. Selanjutnya contoh tanah dibawa ke Laboratorium untuk diproses isolasi dan identifikasi jamur (Trizelia *et al.*, 2010).

Isolasi dan Identifikasi Jamur. Isolasi jamur patogen serangga dari rizosfir tomat dilakukan dengan metode perangkap serangga (*insect bait method*) menggunakan larva *T. molitor*. Contoh tanah dari masing-masing lokasi dibersihkan dari perakaran tanaman, kemudian ditimbang sebanyak 500 gram dan dimasukkan ke dalam kotak plastik. Setiap kotak plastik diberi label sesuai dengan daerahnya. Tanah yang telah dimasukkan ke dalam kotak plastik dilembabkan dengan akuades steril sampai tanah kelihatan agak basah, kemudian dimasukkan 30 ekor larva *T. molitor* instar 3 yang baru berganti kulit ke dalam kotak yang berisi sampel tanah. Larva tersebut kemudian ditutup dengan selapis tanah dan permukaan bagian atas dilembabkan dengan menyemprotkan akuades steril. Selanjutnya kotak ditutup dengan potongan kain kasa berwarna hitam yang juga telah dilembabkan. Larva *T. molitor* yang diduga terserang jamur patogen serangga diamati 3 hari setelah perlakuan dan selanjutnya diamati setiap hari. Larva yang mati diambil, kemudian disterilisasi dengan NaOCl selama 3 menit. Setelah itu, disterilkan dengan alkohol selama 3 menit, kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali dan dikeringanginkan di atas tisu steril. Larva tersebut diambil dengan jarum Ose dan dipindahkan pada medium SDAY. Selanjutnya dilakukan proses identifikasi (Trizelia *et al.*, 2010).

Langkah awal untuk identifikasi adalah pemurnian (purifikasi). Pada setiap koloni jamur yang dianggap berbeda berdasarkan morfologi makroskopis meliputi warna dan bentuk koloni dilakukan pemurnian. Masing-masing mikroorganisme tersebut diambil dengan jarum Ose, kemudian ditumbuhkan lagi pada cawan Petri yang berisi SDAY. Dari beberapa koloni jamur yang tumbuh pada cawan Petri, jika terdapat koloni yang memiliki ciri makroskopis sama maka

diambil salah satu koloni untuk dipurifikasi. Tahapan kedua adalah pembuatan preparat jamur, dengan menyiapkan jarum Ose, gelas objek, gelas penutup, dan tissue. Jamur yang telah diisolasi dan murni pada media SDAY diambil sebagian dengan jarum Ose, kemudian diletakkan di tengah gelas objek lalu ditetesi sedikit akuades atau pewarna dan ditutup menggunakan gelas penutup. Preparat diletakkan pada wadah yang telah dialasi tisu lembab dan inkubasi selama 2-3 hari, inkubasi bertujuan untuk menumbuhkan miselium jamur dan sporulasi.

Identifikasi jamur patogen serangga pada rizosfir tanaman tomat berdasarkan panduan kunci identifikasi jamur. Kunci identifikasi jamur yang digunakan adalah Barnett dan Hunter (1972). Pengamatan makroskopis berdasarkan warna koloni dan pola persebaran koloni jamur dalam cawan Petri. Pengamatan warna koloni dilakukan dengan mengamati perubahan warna koloni pada bagian permukaan dan dasar koloni. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop berdasarkan septa pada hifa, bentuk konidia dan pola persebaran konidia. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan perbesaran 400 kali. Bentuk konidia dapat berupa bulat, lonjong, elips, oval atau tidak beraturan. Pola persebaran konidia dapat dikategorikan seperti bergerombol diujung konidiofor atau bergerombol di sekitar hifa, menyebar, tunggal, berantai atau tidak berantai, serta bentuk kumpulan konidia. (Arif *et al.*, 2009).

Perbanyak Massal dan Pemeliharaan *P. latus*. Imago *P. latus* dikumpulkan dari pertanaman jeruk di lapangan. Imago yang didapatkan kemudian dipindahkan dengan menggunakan kuas halus ke tunas daun keempat pada bibit tanaman jeruk yang berumur 1-2 tahun di rumah kaca. Sebelum pemindahan imago *P. latus*, tunas jeruk yang akan diinfestasikan harus dibersihkan terlebih dahulu dari hama atau predator yang mungkin ada pada tunas dengan menggunakan kuas atau tisu basah. Setelah 7 hari, imago dipindahkan ke arena percobaan.

Arena percobaan dilakukan pada cawan Petri yang di dalamnya terdapat spons basah. Di atas spons dilapisi tisu sebagai alas daun, kemudian daun jeruk keprok berumur 10-20 hari diletakkan di atas tisu dengan posisi permukaan daun

bagian bawah berada di atas. Tisu yang sudah dilubangi sesuai bentuk dan ukuran daun diletakkan di atas daun untuk mencegah imago *P. latus* keluar dari daun.

Pembuatan Suspensi Jamur Patogen Serangga. Konidia dipanen dengan cara menambahkan 20 ml akuades steril ke dalam cawan Petri yang berisi biakan murni dan diratakan dengan menggunakan L stick hingga terbentuk suspensi massa konidia. Setelah tercampur rata, diambil 10 ml dengan ditambahkan 2% tween 80 steril (Trizelia *et al.*, 2011). Suspensi yang telah ditambahkan 2% tween 80 steril, kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring.

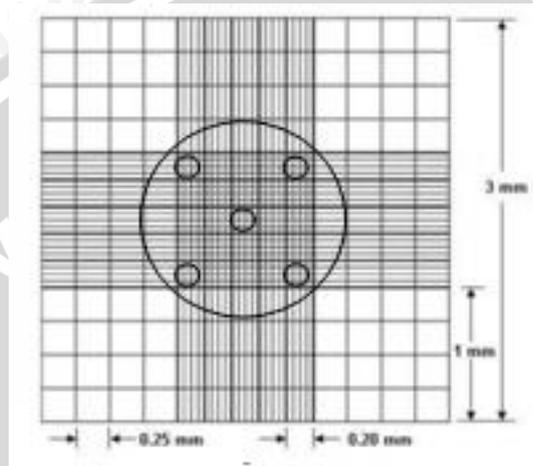
Suspensi jamur patogen serangga yang telah diperoleh dihitung kerapatannya dengan menggunakan *haemocytometer*. Suspensi jamur diambil 1 ml kemudian diteteskan di atas *haemocytometer*. Kerapatan konidia dihitung di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 40 kali. Konidia jamur dihitung pada kotak bagian tengah (Gambar 6, yang dilingkari), dalam kotak tersebut ditentukan 5 kotak contoh secara diagonal. Selanjutnya dari 5 kotak contoh yang telah ditentukan, dihitung jumlah konidia yang ada pada kotak contoh dengan menggunakan *hand counter*. Dalam satu kotak contoh terdapat 16 kotak kecil, sehingga terdapat 80 kotak kecil yang diamati. Jumlah konidia yang telah diketahui dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$C = \frac{t}{n \times 0,25} \times 10^6$$

yang C adalah kerapatan konidia per ml larutan, t adalah jumlah konidia dalam kotak contoh yang diamati, n adalah jumlah kotak contoh yang diamati dan angka 0,25 adalah faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada hemositometer (Gabriel dan Riyatno, 1989 dalam Herlinda *et al.*, 2006).

Jumlah kerapatan yang digunakan dalam uji virulensi jamur patogen serangga terhadap tungau *P. latus* adalah 10^6 konidia/ml. Jika kerapatan konidia mencapai lebih dari 10^6 misalnya kerapatan konidia 10^7 , maka membuat suspensi jamur patogen serangga kerapatan 10^6 dengan pengenceran berseri. Teknik pengenceran berseri dilakukan dengan cara mengambil 1 ml suspensi konidia

kerapatan 10^7 kemudian ditambahkan 9 ml akuades steril sehingga mencapai kerapatan 10^6 . Apabila hasil perhitungan kerapatan kurang dari 10^6 , maka jumlah konidia jamur patogen serangga perlu ditingkatkan lagi, salah satunya dengan cara menambah waktu inkubasi lebih kurang selama 7 hari. Setelah itu, konidia jamur patogen serangga dihitung kembali kerapatannya dengan cara yang sama.



Gambar 7. Bidang pandang haemocytometer (Anonim, 2014)

Uji Viabilitas Konidia Jamur Patogen Serangga. Viabilitas konidia ditentukan setelah suspensi konidia diinkubasikan selama 24 jam. Satu tetes suspensi diteteskan pada kaca preparat dan ditutup dengan gelas penutup, lalu jumlah konidia yang berkecambah dihitung, demikian pula yang tidak berkecambah. Perhitungannya dilakukan pada bidang pandang di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 kali, dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$V = g/(g + u) \times 100 \%$$

yang V adalah perkecambahan konidia (viabilitas), g adalah jumlah spora yang berkecambah dan u adalah jumlah spora yang tidak berkecambah (Gabriel dan Riyatno, 1989 dalam Herlinda *et al.*, 2006).

Uji Virulensi Jamur Patogen Serangga. Isolat yang digunakan untuk uji virulensi adalah isolat jamur yang bersifat entomopatogenik. Tujuan dari uji virulensi adalah untuk mengetahui perbedaan virulensi isolat jamur terhadap mortalitas imago tungau *P. latus*. Uji virulensi dilakukan dengan cara

menyemprotkan 1 ml suspensi dengan kerapatan 1×10^6 konidia/ml pada imago tungau *P. latus*. Percobaan ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 9 ulangan. Isolat yang diujikan adalah isolat *Metarrhizium* sp. 1 (SG-Met₁), isolat *Metarrhizium* sp. 2 (SG-Met₂) dan akuades sebagai kontrol. Setiap isolat diinokulasikan pada 10 imago uji pada masing-masing arena percobaan. Suspensi perlakuan tersebut disemprotkan ke arena percobaan dengan menggunakan *handsprayer* dengan jarak semprot kurang lebih 15 cm. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk mencatat jumlah imago yang mati, imago yang sehat dan yang bergejala. Perhitungan lama waktu kematian menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Waktu kematian} = \frac{(X_1 y_1 + X_2 y_2 + \dots + X_n y_n)}{(\text{Jumlah mortalitas } x)}$$

yang x_n adalah jumlah mortalitas imago *P. latus* pada hari ke-, $y_{1,2,3,\dots}$ adalah *P. latus* yang mati karena aplikasi pathogen pada hari ke-, dan x adalah jumlah tungau *P. latus* yang mati dalam keseluruhan hari pengamatan (Ede dan Amatobi, 2003 dalam El-Hawary dan El-Salam, 2009).

Persentase mortalitas yang diperoleh kemudian dikoreksi dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Mortalitas larva} = \frac{\text{Jumlah imago mati}}{\text{Jumlah imago uji}} \times 100 \%$$

Perhitungan mortalitas digunakan untuk mengetahui virulensi jamur pada masing-masing perlakuan (Thungrabeab *et al.*, 2006)

Analisis Data. Data mortalitas dan lama hidup imago tungau *P. latus* dianalisis dengan menggunakan analisis sidik ragam, apabila hasil menunjukkan pengaruh yang nyata maka dilakukan uji lanjutan menggunakan Uji BNT pada taraf 5%. Gejala infeksi isolat jamur serangga pada tungau *P. latus* dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan melalui foto dokumentasi.

