

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Nematologi dan Bakteriologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang mulai bulan Maret sampai dengan Desember 2014. Tanah gambut berasal dari Palangkaraya, Kalimantan Tengah yang diambil oleh Bapak Ici Peter Kulu dari tanah dengan dua sistem pola tanam yaitu polikultur (sawi dan jagung) dan monokultur (sawi) pada tanah dengan ketinggian 25 mdpl dan 28 mdpl.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah cuvet, tabung reaksi, cawan petri, bunsen, jarum ose, scalpel, pinset, botol media, gunting, mikropipet, *apendorf*, sprayer, *laminar air flow cabinet* (L AFC), pipet tetes, gelas beaker, kertas label, autoclave, kapas, tisu steril, alumunium foil, penggaris, toples, kamera, fial film, *hand counter*, kasa, *haemocytometer*, preparat, ayakan, *cover glass*, karet gelang, mikroskop, toples, *water bath* dan ATK lainnya.

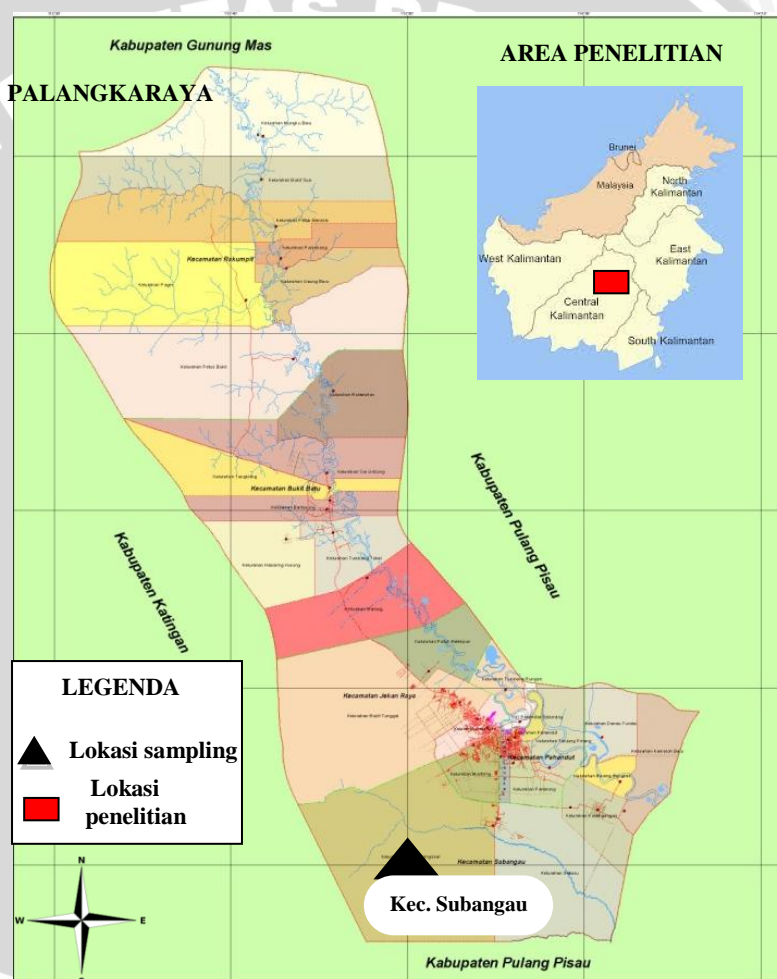
Bahan-bahan yang digunakan ialah tanah gambut, ulat hongkong (*T. molitor*), media Natrium Agar (NA), media *sabauraud dextrose agar yeast extract* (SDAY) spiritus, alkohol 70%, aquades, aquades steril, dan dedak. Bahan yang digunakan uji fisiologis diantaranya media kristal violet, iodin, safranin, KOH 3%, H₂O₂, galaktosa 5%, mannitol 5%, arabinosa 5%, maltosa 5%, sukrosa 5%, dan laktosa 5%.

3.3 Metode Penelitian

Pengambilan Sampel Tanah Gambut

Pengambilan sampel tanah dilakukan oleh Bapak Ici Peter Kulu pada daerah dengan ketinggian 25 mdpl dan 28 mdpl yaitu di Kelurahan Kalampangan, Kecamatan Sabangau, Kota Palangkaraya, Kalimantan Tengah (Gambar 9). Pengambilan sampel tanah dilakukan dari tanah yang telah ditanami sawi (monokultur) dan polikultur (jagung dan sawi). Tanah yang akan diteliti ialah tanah pada titik T3M dan T3P pada dataran rendah dan T6M dan T6P pada

dataran tinggi. Terdapat 20 sampel tanah yang diamati, terdiri dari 10 sampel polikultur (T3P1, T3P2, T3P3, T3P4, T3P5, T6P1, T6P2, T6P3, T6P4, T6P5) dan 10 sampel monokultur (T3M1, T3M2, T3M3, T3M4, T3M5, T6M1, T6M2, T6M3, T6M4, T6M5). Tanah gambut diambil dengan kedalaman 5-10 cm secara acak pada perpotongan diagonal di dekat perakaran (Purwantisari dan Rini, 2009). Tanah kemudian dimasukkan ke dalam plastik dan diberi label. Sampel tanah disimpan di dalam *cool box* pada suhu 4°C sebelum dilakukan isolasi (Muhamat, 2010) yang bertujuan untuk menjaga tanah gambut agar tidak rusak.



Gambar 9. Peta Pengambilan Sampel Tanah Gambut – Desa Kalampangan Kecamatan Sabangau - Palangkaraya

Isolasi Patogen Serangga

Isolasi bertujuan untuk mendapatkan kultur murni bakteri dan jamur patogen serangga. Isolasi bakteri dan jamur dilakukan dengan metode umpan

serangga (*insect bait method*). Isolasi jamur merupakan modifikasi dari Hasyim dan dan Azwana (2003) dengan menggunakan ulat hongkong sebagai media umpan patogen serangga.

Langkah yang dilakukan ialah dengan memasukkan tanah ke dalam toples dan memasukkan ulat *T. molitor* sebanyak 20 ekor. Toples dilapisi koran untuk membuat ruangan menjadi gelap. Proses inkubasi dilakukan hingga 14 hari. Ketika permukaan tubuh ulat telah diselimuti oleh jamur maka ulat diambil dan disterilisasi dengan menggunakan NaOCl 1 % dan alkohol 70% masing-masing selama 1 menit dengan tujuan untuk membersihkan kotoran dan mikroorganisme yang tidak diinginkan pada permukaan tubuh larva terinfeksi. Langkah selanjutnya ialah ulat dibilas dengan menggunakan aquades steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan pada tisu steril (Sun dan Xing-Zhong, 2008). Ulat yang telah steril kemudian ditanam pada media SDAY dan NA dan diinkubasi selama tiga hari. Jamur patogen serangga kemudian dipurifikasi pada media NA untuk ulat bergejala akibat bakteri dan SDAY untuk ulat bergejala akibat jamur.

Identifikasi Bakteri dan Jamur Patogen Serangga

a) Identifikasi Bakteri Patogen Serangga

Identifikasi bakteri yang didapatkan dilakukan dengan dua tahapan yaitu secara morfologis dan biokimia. Identifikasi secara morfologis dilakukan dengan pengamatan koloni. Widiyanti *et al.* (2011) menyatakan parameter karakter koloni meliputi:

- a. Bentuk koloni (dilihat dari atas): berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, serupa kumparan
 - b. Permukaan koloni (dilihat dari samping): rata, timbul-datar, melengkung, membukit, serupa kawah
 - c. Tepi koloni (dilihat dari atas): utuh, berombak, berbedah, bergerigi, berbenang
 - d. Warna koloni : keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.
- Sementara itu, identifikasi secara biokimia untuk mengetahui Gram bakteri dilakukan menurut Schaad (1998) meliputi uji KOH 3% dan pengecatan Gram.

1) Uji reaksi Gram dengan KOH 3%

Biakan murni hasil isolasi bakteri patogen serangga yang berumur 2x24 jam disuspensikan pada obyek glass yang telah ditetesi dengan KOH 3%. Kemudian suspensi di tarik-tarik ke atas dengan menggunakan jarum ose. Reaksi positif terjadi jika suspensi bakteri tidak membentuk benang dan reaksi negatif terjadi jika suspensi bakteri membentuk benang (Kerr, 1980).

2) Pengecatan Gram

Satu lup jarum ose biakan murni bakteri patogen serangga berumur 1x24 jam dibuat suspensi dengan aquadest steril di atas gelas obyek yang disterilkan dan difiksasi di atas bunsen. Kemudian dilakukan dengan kristal violet sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama satu menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di atas bunsen. Selanjutnya ditetesi dengan larutan iodine selama satu menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan peluntur (alkohol) selama satu menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan

Pengecatan selanjutnya menggunakan safranin dan didiamkan selama satu menit. Proses selanjutnya ialah mencucinya dengan air mengalir dan mengeringkannya. Kemudian objek glass diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Bakteri Gram positif akan menunjukkan warna biru keunguan dan bakteri yang termasuk ke dalam Gram negatif akan berwarna merah (Kerr, 1980).

3) Pengujian Biokimia

Bakteri dengan kemampuan mortalitas terbaik setelah dilakukan penentuan Gram bakteri dengan pengujian KOH dan pengecatan Gram maka dilakukan uji biokimia. Pengujian biokimia dengan memberikan sampel isolat terbaik ke Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui jenis dari bakteri tersebut hingga tingkat spesies.

b) Karakterisasi Jamur Patogen Serangga

1) Identifikasi Jamur Patogen Serangga

Isolat jamur patogen serangga yang telah dimurnikan dan dipreparasi kemudian dilakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis yang

selanjutnya diidentifikasi berdasarkan panduan identifikasi jamur, Barnett dan Hunter (1998). Pengamatan makroskopis dilakukan dengan cara mengamati kenampakan morfologi koloni jamur secara makroskopis yang meliputi warna koloni, pola persebaran koloni dalam cawan petri (konsentris dan tidak konsentris). Pengamatan warna koloni dilakukan dengan mengamati perubahan warna koloni pada saat koloni tua pada bagian permukaan dan dasar koloni karena seringkali terdapat perbedaan antara warna permukaan dan warna dasar koloni.

Pengamatan pola persebaran koloni dilakukan dengan mengamati bentuk koloni dalam cawan Petri. Pola persebaran dapat berupa konsentris maupun non konsentris. Pola persebaran konsentris apabila terdapat gelombang-gelombang lingkaran konsentris yang dapat dilihat dari permukaan maupun dasar koloni. Pola persebaran non konsentris dapat berupa bentuk radial (tidak beraturan), menggunung, atau menyamping.

Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan cara mengamati kenampakan morfologi koloni jamur dengan menggunakan mikroskop yang meliputi ada atau tidaknya septa pada hifa, pertumbuhan hifa, warna hifa, ada atau tidaknya konidia, warna konidia, bentuk konidia, serta pola persebaran konidia. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400 x (40 x 10). Pengamatan ada atau tidaknya septa pada hifa dilakukan dengan mengamati ada atau tidaknya sekat (garis melintang). Sekat pada hifa dapat terlihat rapat maupun jarang. Pengamatan pertumbuhan hifa dapat dilihat dengan mengamati percabangan hifa (bercabang atau tidak bercabang). Pengamatan warna hifa dan konidia dapat dilihat dari kenampakan warna yaitu gelap atau hialin. Warna hialin adalah ketika hifa atau konidia tidak berwarna dan terlihat transparan. 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. Kumpulan konidia seringkali terlihat bermacam-macam bentuk, seperti bulat, radial (tidak beraturan), menyerupai bentuk bunga, dan sebagainya.

Pengamatan mikroskopis juga dilakukan terhadap kenampakan konidiofor, yaitu hifa khusus yang merupakan tangkai dari konidia serta ciri lain yang

ditemukan. Pengamatan konidiofor meliputi bentuk konidiofor (bulat, segi tiga, atau segi empat), warna konidiofor (gelap atau hialin), ada atau tidaknya septa pada konidiofor (bersekat atau tidak bersekat), dan pertumbuhan konidiofor (bercabang atau tidak bercabang, panjang atau pendek).

2) Perhitungan Kerapatan Konidia Jamur Patogen Serangga

Perhitungan kerapatan konidia dilakukan setelah jamur dibiakkan selama 15 hari pada media EKD dengan suhu 27,5^o C dan kelembaban 80%. Suspensi konidia dari perlakuan perbanyak isolat diambil sebanyak 0,01 ml, kemudian ditetaskan pada *haemocytometer*. Kerapatan konidia dihitung di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x dan dihitung kerapatan konidianya pada lima kotak kedua terbesar dan dihitung dengan menggunakan rumus Gabriel dan Riyatno (1989) dalam Effendy *et al.* (2010) sebagai berikut:

$$C = t/(n.x) \times 10^6$$

konstanta C menunjukkan kerapatan spora per ml larutan, t menunjukkan jumlah total spora dalam kotak sampel yang diamati, n menunjukkan jumlah kotak sampel (5 kotak besar x 16 kotak kecil) dan x merupakan faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada *haemocytometer* sebesar 0,25.

3) Perhitungan Viabilitas Konidia Jamur Patogen Serangga

Viabilitas konidia ditentukan setelah jamur dibiakkan selama 15 hari pada media EKD dengan kondisi statis pada suhu 27,5^o C dan kelembaban 80%. Sebelum dihitung biakan jamur didiamkan selama 24 jam terlebih dahulu di dalam Falcon. Kemudian melakukan perhitungan jumlah konidia yang berkecambah dan tidak berkecambah di atas kaca preparat. Pengamatan viabilitas konidia dilakukan pada bidang pandang di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x, dengan menggunakan rumus Gabriel dan Riyatno (1989) dalam Effendy *et al.* (2010) sebagai berikut:

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

konstanta V menunjukkan perkecambahan spora (viabilitas), g menunjukkan jumlah spora yang berkecambah dan u merupakan jumlah spora yang tidak berkecambah.

Virulensi

Serangga uji yang digunakan pada uji virulensi adalah *S. litura*. Hal ini disebabkan *S. litura* merupakan salah satu hama yang keberadaannya mengganggu tanaman budidaya dan menimbulkan kerugian khususnya pada tanaman sawi di Kalimantan Tengah.

Penyediaan Larva *S. litura*. Larva *S. litura* diperoleh dari lapang diperbanyak di dalam toples yang sudah dilubangi bagian atasnya dan diberi kain kasa. Perbanyakan dilakukan dengan pemberian pakan berupa daun sawi pada stadia larva dan madu pada stadia imago. Penggantian pakan dilakukan setiap hari sampai larva menjadi imago. Daun sawi tetap diberikan pada saat imago, hal ini disebabkan daun sawi berfungsi sebagai tempat peletakkan telur. Imago (ngengat) diberikan pakan berupa larutan madu 10% yang diteteskan pada kapas dan diletakkan di atas kasa toples. Kapas madu diganti setiap hari. Daun sawi yang telah berisi sejumlah telur diambil dan diletakkan pada toples lain. Kemudian telur yang menetas menjadi larva ditunggu hingga instar ketiga yang selanjutnya larva tersebut diseleksi untuk dijadikan serangga uji.

Virulensi pada Larva *S. litura*. Isolat bakteri patogen serangga yang telah dibiakkan selama 1 x 24 jam pada media NA dipanen dengan menambahkan 5 ml aquades steril ke dalam cawan dan koloni bakteri diluruhkan dengan menggunakan *glass L*. Suspensi diukur Optical Density (OD)=1 dengan menggunakan spektrofotometer, hal ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kekeruhan dan kandungan koloni bakteri. Suspensi bakteri patogen serangga dengan OD=1, diambil sebanyak 0,01 ml dan dengan menggunakan metode *spread plate* diratakan pada media NA dengan menggunakan *glass L*. Setelah diketahui kerapatan konidia OD=1, maka suspensi diaplikasikan dengan kerapatan 1×10^6 cfu/ml.

Isolat jamur patogen serangga yang telah dibiakkan pada media SDAY dipanen dan dimasukkan pada media EKD. Sebanyak 50 ml media EKD berisi jamur patogen serangga digojok selama 1 x 24 jam pada kecepatan 100 rpm. Hal ini bertujuan agar miselia dapat tumbuh dengan cepat dan banyak sehingga konidia yang dihasilkan juga banyak. Setelah penggojokan selama 1 x 24 jam, botol yang berisi jamur patogen serangga didiamkan selama 1-2 minggu agar

jamur menghasilkan konidia, yang ditandai dengan miselia tumbuh padat dan konidia memenuhi permukaan EKG. Sebelum dihitung kerapatan dan viabilitas, sebanyak 10 ml dan digojok pada 3000 rpm selama 5 menit. Setelah sentrifugasi, supernatan dibuang dan pelet diberi aquades steril sebanyak 5 ml. Suspensi jamur kemudian dihomogenkan. Kerapatan konidia yang digunakan untuk pengujian terhadap *S. litura* adalah 1×10^6 konidia/ml aquades.

Aplikasi antara jamur dan bakteri patogen serangga menggunakan metode celup, untuk bakteri metode yang digunakan adalah pencelupan pakan (*food dipping*) sedangkan untuk jamur dengan pencelupan larva *S. litura* instar tiga pada suspensi. Perbedaan pencelupan ini berdasarkan sifat patogenik dari bakteri dan jamur patogen yang berbeda, bakteri akan menginfeksi melalui sistem pencernaan sedangkan jamur melalui kutikula serangga.

Aplikasi jamur patogen serangga dilakukan menurut metode Goettel dan Inglis (1997) yaitu dengan mencelupkan 20 ekor larva instar tiga *S. litura* ke dalam suspensi jamur patogen serangga selama lima detik kemudian dikeringanginkan di atas tisu steril. Pemberian pakan dilakukan dengan memotong daun bayam dengan ukuran 5 x 5 cm sebanyak enam lembar (modifikasi metode Ramadhan dan Kuku, 2012). Pemberian pakan pada aplikasi bakteri dan jamur patogen serangga dilakukan dan diganti setiap hari. Percobaan diulang sebanyak tiga kali. Mortalitas diamati setiap hari hingga hari ketujuh setelah aplikasi bakteri dan jamur patogen serangga.

Variabel Pengamatan

Mortalitas. Mortalitas larva ialah tingkat kematian larva yang disebabkan oleh pemberian perlakuan patogen serangga. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai hari ke tujuh setelah aplikasi (HSA). Adapun cara perhitungan persentase mortalitas larva menurut Hasyim *et al.* (2009) ialah sebagai berikut.

$$M = \frac{m}{n} \times 100\%$$

konstanta M menyatakan persentase larva yang mati, m menyatakan larva uji yang mati, dan n = larva uji secara keseluruhan.

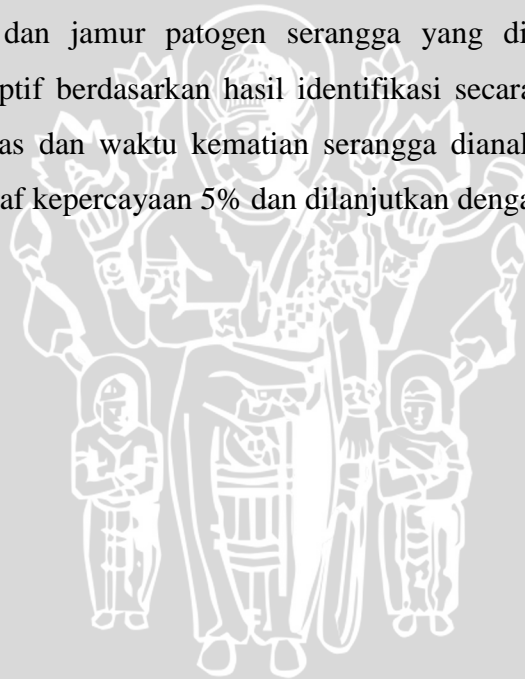
Waktu Kematian. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui rerata waktu yang digunakan bakteri dan jamur patogen serangga untuk mematikan serangga. Pengamatan dilakukan setiap hari selama tujuh hari. Adapun cara perhitungan rerata jumlah hari untuk mematikan serangga uji menurut Edde dan Amatobi (2003) dalam El-Hawary dan Abd El-Salam (2009) adalah sebagai berikut:

$$\text{Rerata waktu kematian (hari)} = \frac{X_1Y_1 + X_2Y_2 + X_nY_n}{\text{Jumlah total larva mati}}$$

konstanta x menyatakan jumlah kematian larva yang terjadi pada hari tertentu dan y menyatakan jumlah hari saat pengamatan.

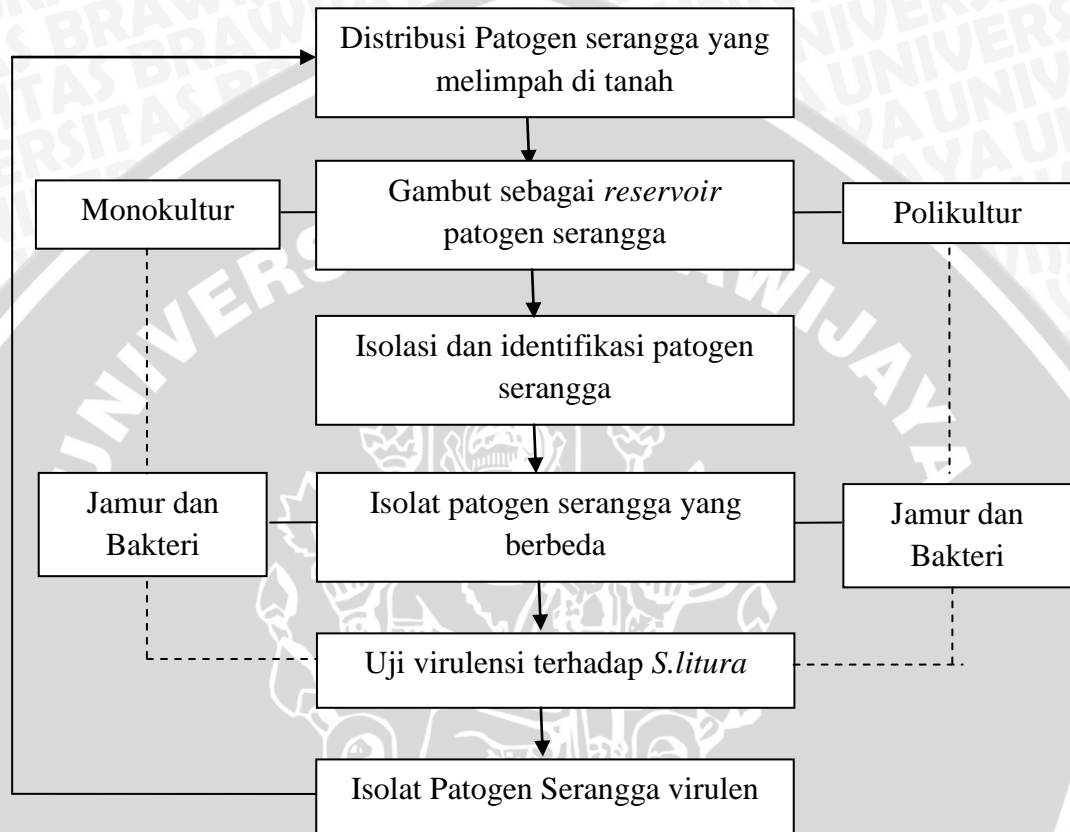
3.4 Analisis Data

Isolat bakteri dan jamur patogen serangga yang diperoleh dianalisis dengan metode deskriptif berdasarkan hasil identifikasi secara mikroskopis dan makroskopis. Mortalitas dan waktu kematian serangga dianalisis menggunakan sidik ragam dengan taraf kepercayaan 5% dan dilanjutkan dengan uji Duncan.



A) Kerangka Konseptual

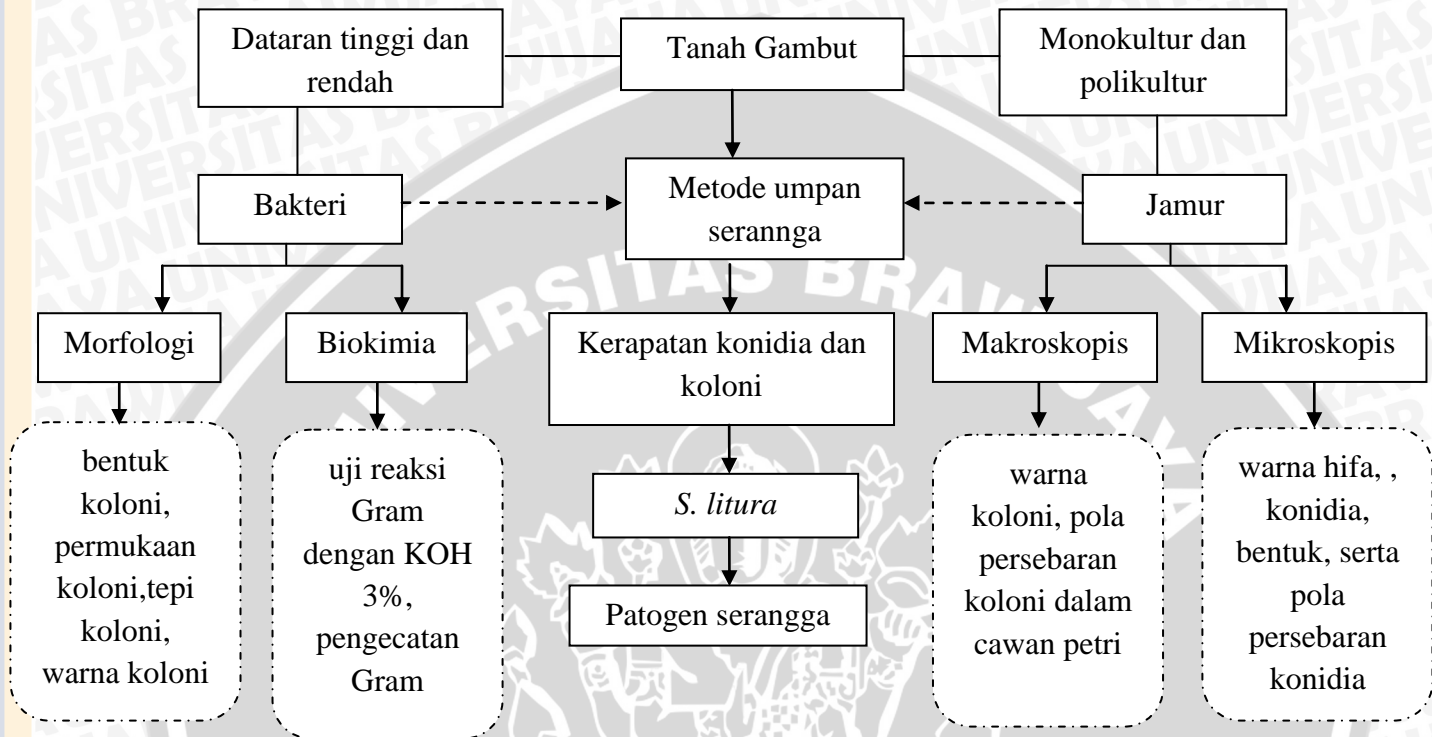
Kerangka konseptual menjelaskan bagaimana bangunan logika ilmiah dari penelitian isolasi dan identifikasi patogen serangga dari tanah monokultur dan polikultur di tanah gambut ini dibangun. Kerangka konseptual secara skematis disajikan dalam gambar 10.



Gambar 10. Kerangka Konseptual Penelitian

B) Kerangka Operasional

Kerangka operasional menunjukkan langkah-langkah teknis yang digunakan sehingga penelitian telah dapat dilakukan secara bertahap dan sistematis. Kerangka operasional secara skematis disajikan dalam gambar 11.



Gambar 11. Kerangka Operasional Penelitian