

3. METODOLOGI PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi PT. Astra Agro Lestari, dan Laboratorium Jurusan HPT FP-UB. Pengambilan contoh tanah dilakukan di beberapa anak perkebunan kelapa sawit milik PT. Astra Agro Lestari yaitu PT. Agro Menara Rahmat (AMR), PT. Gunung Sejahtera Yoli Makmur (GSYM), PT. Gunung Sejahtera Dua Indah (GSDI), dan PT. Gunung Sejahtera Puti Pesona (GSPP). Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Januari-Oktober 2017.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu sekop kecil, penggaris, kantong plastik, cawan Petri, Bunsen, jarum ose, botol media, botol kaca berukuran 125mL, gelas beker, gelas ukur, pinset, gunting, *hand counter*, mikropipet, *micro tube*, sprayer, *Laminating Air Flow Cabinet* (L AFC), *shaker*, tabung Falcon, spatula, gelas objek, kaca penutup, *autoclave*, kapas steril, tisu, aluminium foil, plastik wrap, toples, kain kassa, *haemocytometer*, *thermohyrometer*, karet gelang, kertas label, mikroskop, kamera, dan alat tulis lainnya.

Bahan yang digunakan ialah tanah contoh, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), media PDA (*Potato Dextrose Agar*), antibiotik kloramfenikol, spiritus, alkohol 70%, dan akuades steril.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode umpan serangga dan plot pengamatan ditentukan secara *purposive sampling* yaitu perkebunan kelapa sawit yang telah menghasilkan dan memiliki umur ± 10 tahun (Tabel 1). Perlakuan yang diberikan dengan membandingkan pengaruh lokasi lahan perkebunan kelapa sawit sehingga terbentuk 3 plot pengamatan berdasarkan jarak yaitu, dekat (< 200 m), sedang (sekitar 2 km) dan jauh (sekitar 5 km) dari habitat alami. Pengambilan sampel dilakukan pada empat lokasi habitat alami yang berbeda. Lokasi habitat alami yang digunakan merupakan habitat alami yang berada di beberapa anak perusahaan PT. Astra Agro Lestari, Tbk yaitu PT. Agro Menara Rahmat (AMR),

PT. Gunung Sejahtera Yoli Makmur (GSYM), PT. Gunung Sejahtera Dua Indah (GSDI), dan PT. Gunung Sejahtera Puti Pesona (GSPP) (Tabel 1) .

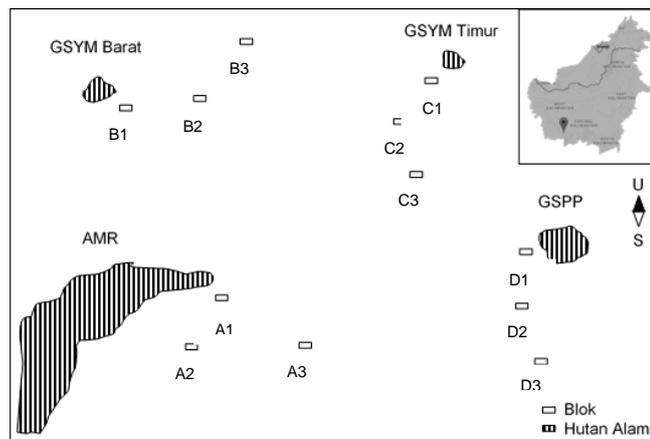
Tabel 1. Plot Pengambilan Sampel Keanekaragaman Jamur Entomopatogen

Kriteria Jarak dari Habitat Alami	Plot	Lokasi Habitat Alami	Blok
Dekat	A1	Agro Menara Rahmat (AMR)	B21
	B1	Gunung Sejahtera Yoli Makmur Barat (GSYM Barat)	B10
	C1	Gunung Sejahtera Yoli Makmur Timur (GSYM Timur)	C10A
	D1	Gunung Sejahtera Puti Pesona (GSPP)	B5
Sedang	A2	Agro Menara Rahmat (AMR)	A21
	B2	Gunung Sejahtera Yoli Makmur Barat (GSYM Barat)	B6
	C2	Gunung Sejahtera Yoli Makmur Timur (GSYM Timur)	C17
	D2	Gunung Sejahtera Puti Pesona (GSPP)	C4
Jauh	A3	Agro Menara Rahmat (AMR)	C12
	B3	Gunung Sejahtera Yoli Makmur Barat (GSYM Barat)	A23
	C3	Gunung Sejahtera Yoli Makmur Timur (GSYM Timur)	B3
	D3	Gunung Sejahtera Puti Pesona (GSPP)	C13

Persiapan penelitian

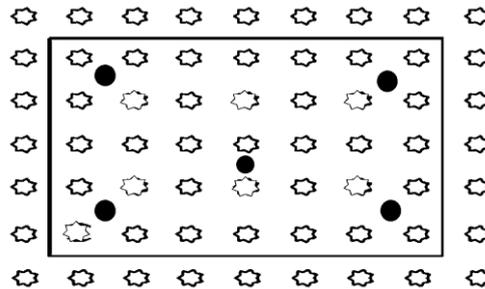
Penentuan Plot Penelitian. Plot terdapat pada perkebunan kelapa sawit milik PT. Astra Agro Lestari di Kalimantan Tengah. Terdapat 12 plot pengamatan yang terdiri dari 4 lokasi habitat alami berbeda diantaranya adalah AMR (536, 95 Ha), GSYM Barat (18,10 Ha), GSYM Timur (12,5 Ha) dan GSPP (62,83 Ha) pada masing-masing plot memiliki tiga jarak yaitu dekat, sedang, dan jauh dari habitat alami (Gambar 8).

A1



Gambar 8. Peta penentuan keanekaragaman jamur entomopatogen dengan berbagai jarak pada setiap habitat alami

Setiap plot adalah berupa lahan kelapa sawit berukuran 120 m x 70 m (8400 m²). Subplot untuk studi keanekaragaman jamur entomopatogen berupa petak lahan berukuran 5 pohon x 7 pohon (35 pohon) dengan 5 titik diagonal dipilih sebagai unit sampling (Gambar 9).



Gambar 9. Denah plot pengambilan tanah contoh

Sterilisasi alat Sterilisasi alat dilakukan pada alat-alat yang digunakan sebagai tempat perbanyakan jamur atau media, yaitu cawan petri, tabung reaksi, botol media. alat tersebut dicuci sampai bersih kemudian direndam dalam larutan kloroks selama 24 jam. Setelah 24 jam, diangkat dan dikeringkan. setelah kering cawan Petri dibungkus dengan kertas dan dimasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 20 atm selama 90 menit.

Pembuatan media *Potato Dextrose Agar* Isolasi jamur menggunakan medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang dibuat sendiri. Sebanyak 200 g kentang yang telah dikupas dan dibersihkan kemudian diiris tipis-tipis. Kentang direbus selama 15-20 menit dengan aquades secukupnya, kemudian disaring dengan kain. Filtrat yang dihasilkan kemudian ditambahkan 20g dekstrosa dan volumenya dijadikan satu liter. Medium padat dibuat dengan menambahkan 20g agar. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 120°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit (Saryono *et al.*, 2002).

Pelaksanaan Penelitian

Isolasi Jamur Patogen Serangga

Metode Umpan Serangga (*Insect Bait Method*) Metode isolasi jamur patogen serangga yang digunakan adalah metode umpan serangga (*insect bait method*) ulat hongkong (*T. molitor*) yang baru ganti kulit. Hal pertama yang dilakukan adalah pengambilan contoh tanah dilakukan dengan metode survei

lokasi di lahan perkebunan sawit yang dikelola oleh PT. Astra Agro Lestari yang terletak di Kalimantan Tengah. Terdapat 60 sampel tanah yang diamati, yang didapat dari 4 lokasi pengambilan sampel dengan 3 variasi jarak disetiap lokasinya. Sampel tanah sebanyak 400 g diambil pada setiap titik pengambilan dengan cara menggali lapisan tanah atas pada kedalaman 5 cm dengan menggunakan sekop kecil. Tanah dimasukkan kedalam plastik yang kemudian diberi label dan disimpan didalam kotak kedap udara. Kelembaban tanah harus tetap terjaga selama masa penyimpanan.

Sampel tanah dimasukkan ke dalam toples bening sebanyak 200 g kemudian pada masing-masing toples dimasukkan 10 ekor larva *T.molitor* hingga kedalaman 0,5 cm. Tanah dilembabakan dengan akuades steril dan ditutup dengan kain kassa. Setiap toples diberi label sesuai lokasi dan diinkubasi pada suhu kamar. Pengamatan *T. molitor* dimulai pada hari ke-3 hingga hari ke-14 setelah *T. molitor* dibenamkan dengan memeriksa toples apakah ada *T. molitor* yang terinfeksi. Permukaan *T. molitor* yang terinfeksi disterilkan dengan alkohol selama 1 menit kemudian dibilas dengan akuades dan ditiriskan diatas tisu kering. Larva yang diduga terserang cendawan diambil dan disterilisasi permukaan dengan cara sterilisasi basah dan dilanjutkan dengan *moist chamber*. Pertama larva dibilas dengan aquadest selama 3 menit, kemudian dibilas dengan Alkohol 70% selama 3 menit, dan setelah itu dibilas lagi dengan aquadest selama 3 menit (Trizelia *et al.*, 2015). Setelah sterilisasi sebaiknya dilakukan penanaman cairan dari bilasan terakhir untuk memastikan keberhasilan proses sterilisasi. *T. molitor* diisolasi pada cawan petri yang berisi media PDA dan diinkubasi selama 7-14 hari di laboratorium. Apabila terdapat lebih dari satu koloni jamur yang tumbuh pada satu cawan Petri, maka dilakukan purifikasi untuk memisahkan koloni yang berbeda secara makroskopis. Purifikasi dilakukan dengan mengambil koloni yang berbeda menggunakan jarum ose dan dibiakkan lagi pada cawan Petri yang berisi media PDA.

Identifikasi

Identifikasi. Isolat jamur entomopatogen yang telah dimurnikan dan dipreparasi kemudian dilakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis yang selanjutnya diidentifikasi berdasarkan panduan identifikasi jamur, Barnett dan Hunter (1998) dan Watanabe (2002). Identifikasi morfologi makroskopis dilakukan dengan cara mengamati perkembangan jamur yang

ditumbuhkan dalam media PDA pada cawan Petri. Identifikasi morfologi mikroskopis dilakukan dengan cara membuat preparat jamur. Jamur yang telah tumbuh membentuk miselium diambil dengan jarum ose kemudian diletakkan pada kaca objek dan ditutup dengan kaca penutup. Preparat diinkubasi selama 2-3 hari pada nampan yang diberi alas tisu lembab dan ditutup dengan plastik wrap. Pengamatan dilakukan dengan mengamati morfologi mikroskopis menggunakan mikroskop perbesaran 400 x.

Variabel Pengamatan. Variabel pengamatan yang diamati berupa hasil identifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis. Ciri-ciri makroskopis yang diamati meliputi warna koloni, tekstur permukaan koloni, diameter, dan bentuk koloni. ciri-ciri mikroskopis yang diamati meliputi bentuk miselium, ukuran konidia, konidiofor, fialid dan bentuk spora.

Indeks Keanekaragaman

Indeks keanekaragaman digunakan untuk menghitung keanekaragaman jenis jamur entomopatogen pada variasi berbagai jarak dengan rumus indeks keanekaragaman menurut Shannon- Wiener (Odum, 1993) adalah :

$$H' = - \sum_{i=1} \frac{[(ni)}{n} \text{Ln} \frac{(ni)}{n}]$$

Keterangan: H' = Indeks Shannon-Wiener
 n_i = Jumlah Spesies (i)
 N = Total Jumlah Individu

Indeks keanekaragaman ditentukan dengan kriteria menurut Shannon-Wiener sebagai berikut (Tabel 2).

Tabel 2. Kriteria Indeks Keanekaragaman Shannon-Wiener

Nilai Indeks	Kriteria
<1	Keanekaragaman rendah, penyebaran jumlah individu tiap jenis rendah
1-3	Keanekaragaman sedang, Penyebaran jumlah individu tiap jenis sedang
>3	Keanekaragaman tinggi, penyebaran jumlah individu tiap jenis tinggi

Uji Kerapatan Konidia Jamur Entomopatogen

Perhitungan kerapatan konidia dilakukan setelah jamur dibiakkan selama 15 hari pada media ekstrak kentang dextrose (EKD) dengan suhu 27,5 °C dan kelembaban 80%. Suspensi konidia dari perlakuan perbanyak isolat diambil sebanyak 0,01 ml, kemudian diteteskan pada hemositometer. Kerapatan konidia

dihitung di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 x. Jumlah konidia yang terdapat pada lima kotak kedua terbesar dihitung untuk mengetahui kerapatan konidia pada suspensi isolat tersebut kemudian dihitung dengan menggunakan rumus Gabriel dan Riyatno (1998) dalam Effendy *et al.* (2010) sebagai berikut:

$$C = \frac{t}{(n \cdot x)} \times 10^6$$

Keterangan: C = kerapatan spora per ml larutan
 t = jumlah total spora dalam kotak contoh yang diamati
 n = jumlah kotak contoh (5 kotak besar x 16 kotak kecil)
 x = 0,25 faktor koreksi penggunaan kotak contoh skala kecil pada hemositometer.

Uji Viabilitas Konidia

Perhitungan viabilitas konidia ditentukan setelah suspensi konidia diinkubasi selama 24 jam. Suspensi diambil dengan mikropipet kemudian diteteskan pada gelas objek dan ditutup dengan kaca penutup. Jumlah konidia yang berkecambah maupun yang tidak berkecambah dihitung. Perhitungan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x, dengan menggunakan rumus Gabriel dan Riyatno (1989) dalam Herlinda *et al.* (2006) sebagai berikut:

$$V = \frac{g}{(g + u)} \times 100\%$$

Keterangan : V = Perkecambahan spora (viabilitas)
 g = jumlah spora yang berkecambah
 u = jumlah spora yang tidak berkecambah

Uji Virulensi Jamur Entomopatogen

Uji patogenesitas jamur patogen serangga dilakukan dengan metode penyemprotan secara langsung ke serangga uji. Isolat jamur yang diperoleh dilakukan uji virulensi terhadap larva *T. molitor*. Setiap isolat diinokulasikan pada 20 larva *T. molitor* instar 3. Inokulasi dilakukan dengan cara menyemprotkan 20 ekor larva *T. molitor* instar 3 dengan suspensi isolat jamur entomopatogen yang mengandung 10^7 konidia/ml kemudian larva dидiamkan diatas petri selama 10 menit. Penyemprotan isolat dilakukan di sore hari. Larva *T. molitor* yang telah disemprotkan dipindahkan ke toples plastik yang sudah berisi pakan campuran dedak dan jagung dengan perbandingan dedak dan beras jagung (3:1). Toples berisi pakan dan larva *T. molitor* yang telah disemprot kemudian ditutup kain kassa. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai 14 hari setelah inokulasi (HSI).

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah larva yang mati terserang isolat jamur entomopatogen. Persentase mortalitas larva dihitung menggunakan rumus :

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

Keterangan : M = persentase larva yang mati
m = larva uji yang mati
n = larva uji secara keseluruhan

Analisis Data

Untuk mengetahui perbandingan perbedaan keanekaragaman jamur patogen serangga yang diperoleh dari berbagai jarak dari habitat alami diketahui dari perhitungan keanekaragaman Shannon dan Wiener. Data virulensi jamur terhadap *T.molitor* dianalisis dengan menggunakan sidik ragam, apabila hasil menunjukkan pengaruh yang nyata maka dilakukan uji lanjut menggunakan Beda Nyata Jujur pada taraf 5%.