III. METODOLOGI PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Februari-November 2014 di Laboratorium Nematologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan Petri, Bunsen, jarum ose, botol media, botol kaca berukuran 125 ml, gelas beker, gelas ukur, pinset, gunting, handcounter, mikropipet, micro tube, sprayer, Laminar Air Flow Cabinet (LAFC), centrifuge, shaker, tabung Falcon, spatula, gelas objek, kaca penutup, autoclave, kapas steril, tisu, alumunium foil, plastik wrap, toples, kain kasa, haemacytometer, thermohygrometer, karet gelang, kertas label, penggaris, mikroskop, kamera dan alat tulis lainnya.

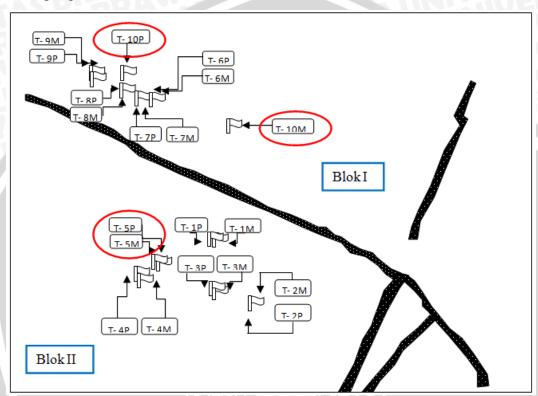
Bahan-bahan yang digunakan ialah tanah gambut, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), *Plutella xylostella* Linnaeus (Lepidoptera: Plutellidae), daun sawi, madu, media SDAY (*Sabouraud Dextrose Agar Yeast*), media EKD (Ekstrak Kentang Dekstrose), spiritus, alkohol 70%, NaOCl 1%, dan akuades steril.

Metode Penelitian

Isolasi Jamur Patogen Serangga

Koleksi Sampel Tanah. Sampel tanah gambut diperoleh dari lahan gambut pedalaman di Kelurahan Kalampangan, Kecamatan Sabangau, Kota Palangka Raya, Kalimantan Tengah (kegiatan pengambilan sampel dilakukan oleh Bapak Ici Peter Kulu). Pada pertanaman polikultur, komoditas tanaman adalah sawi dan jagung. Sedangkan pada pertanaman monokultur komoditas tanaman adalah sawi. Terdapat sebanyak 20 sampel tanah yang diamati, terdiri dari 10 sampel tanah polikultur (T5PS1, T5PS2, T5PS3, T5PS4, T5PS5 dan T10PS1, T10PS2, T10PS3, T10PS4, T10PS5) dan 10 sampel tanah monokultur (T5MS1, T5MS2, T5MS3, T5MS4, T5MS5, dan T10MS1, T10MS2, T10MS3, T10MS4, T10MS5). Dari sampel tanah polikultur dan monokultur tersebut masing-masing

diambil 5 sampel dari daerah ketinggian yang berbeda yaitu 25 mdpl dan 28 mdpl (Tabel 1). Sampel tanah diambil secara acak pada perpotongan diagonal dengan kedalaman 5-10 cm. Kemudian setiap sampel tanah dimasukkan ke dalam kantong plastik yang sudah diberi label dan ditutup rapat. Sampel tanah yang sudah dikemas selanjutnya disimpan dalam cooler box (kotak pendingin) untuk dibawa dari lapang ke laboratorium.



Gambar 8. Denah pengambilan sampel

Tabel 1 Titik Pengambilan Sampel

Tuest i itali i digamenan samper		
No.titik	Blok / Ketinggian	Pertanaman
T10	I / 28 mdpl	Polikultur dan monokultur
T5	II / 25 mdpl	Polikultur dan monokultur

Koleksi Isolat. Metode isolasi jamur patogen serangga yang digunakan adalah metode umpan serangga (insect bait method) menurut Nuraida dan Hasyim (2009) yaitu menggunakan ulat hongkong (*T. molitor*). Tanah gambut dimasukkan ke dalam toples masing-masing sebanyak 250 gram. Selanjutnya T. molitor stadia instar tiga yang telah berganti kulit (kulit berwarna putih) dimasukkan ke dalam toples yang berisi tanah masing-masing sebanyak 20 ekor larva. Kemudian larva

ditutup dengan selapis tanah dan permukaan bagian atas dilembabkan dengan menyemprotkan akuades steril. Selanjutnya toples ditutup dengan potongan kain kasa yang telah dilembabkan dan disimpan di tempat yang gelap. Pengamatan dilakukan kurang lebih selama dua minggu hingga larva mati dan ditumbuhi jamur pada permukaan tubuhnya. Larva yang terinfeksi jamur kemudian disterilisasi dengan natrium hipoklorit (NaOCl) 1%, alkohol 70% dan dicuci dengan akuades sebanyak tiga kali dan dikeringkan dengan menggunakan tisu steril. Selanjutnya larva ditanam pada media SDAY dengan komposisi dextrose 40 g, pepton 10 g, ekstrak khamir 2,5 g, agar 15 g, kloramfenikol 0,5 g dan akuades 1 liter. Setelah 2-3 hari jamur tumbuh selanjutnya dilakukan purifikasi. Proses purifikasi ini bertujuan untuk mendapatkan koloni tunggal jamur. Setelah mendapatkan koloni tunggal, maka dilakukan identifikasi.

Identifikasi Jamur Patogen Serangga

Identifikasi morfologi makroskopis. Identifikasi makroskopis dilakukan dengan cara mengamati perkembangan jamur yang ditumbuhkan dalam media SDAY pada cawan Petri. Ciri-ciri makroskopis yang diamati meliputi warna koloni, tekstur permukaan koloni, diameter dan bentuk koloni.

Identifikasi morfologi mikroskopis. Identifikasi mikroskopis dilakukan dengan cara membuat preparat jamur. Preparat dibuat dengan cara mengambil sedikit biakan jamur dengan jarum ose dan diletakkan di atas gelas objek, kemudian ditambahkan sedikit media SDAY dan ditutup dengan kaca penutup. Preparat jamur selanjutnya disimpan dalam wadah tertutup untuk diinkubasi selama 3 hari agar jamur tumbuh dapat diamati dengan jelas ciri mikroskopisnya. Pengamatan preparat jamur dilakukan dengan menggunakan mikroskop. Ciri-ciri mikroskopis yang diamati meliputi bentuk miselium, ukuran konidia, konidiofor, fialid dan bentuk spora. Identifikasi dilakukan berdasarkan buku identifikasi, yaitu Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett dan Hunter, 1998), Entomopathogenic Fungal Identification (Humber, 2005) dan buku identifikasi lain yang relevan.

Perhitungan kerapatan konidia dilakukan dengan cara suspensi konidia diambil sebanyak 0,01 ml, kemudian diteteskan pada *haemacytometer*. Kerapatan konidia dihitung di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x dan dihitung kerapatan konidianya pada lima kotak terbesar kedua dan dihitung dengan menggunakan rumus Gabriel dan Riyatno (1989) dalam Effendy et al. (2010) sebagai berikut:

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

C : kerapatan konidia per ml larutan

: jumlah total konidia dalam kotak sampel yang diamati

: jumlah kotak sampel (5 kotak besar x 16 kotak kecil) n

: 0,25 (faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada *haemacytometer*)

Perhitungan Viabilitas Konidia Jamur Patogen Serangga

Viabilitas konidia ditentukan setelah jamur dibiakkan umur 15 hari pada media EKG. Sebelum dihitung biakan jamur dibiarkan selama 24 jam terlebih dahulu dalam tabung Falcon, kemudian dihitung 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:

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

V : perkecambahan spora (viabilitas)

: jumlah spora yang berkecambah g

: jumlah spora yang tidak berkecambah u

Uji Virulensi

Pada uji virulensi, serangga uji yang digunakan adalah larva P. xylostella. Hal ini dikarenakan P. xylostella merupakan hama utama yang keberadaannya mengganggu tanaman budidaya dan menimbulkan kerugian yang cukup besar pada pertanaman sawi di lokasi pengambilan sampel tanah, yaitu di Palangka Raya, Kalimantan Tengah.

Penyediaan Larva P. xylostella untuk Serangga Uji. Larva P. xylostella yang diperoleh dari lapang diperbanyak dan dipelihara di dalam toples-toples yang sudah dilubangi bagian atasnya dan diberi dengan 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. Pada saat stadia imago juga diberikan daun sawi sebagai tempat meletakkan telur bagi serangga imago (ngengat). Ngengat diberi pakan larutan madu 10% yang dioleskan pada kapas yang diletakkan di atas kasa. Pemberian madu diberikan setiap hari. Setelah ngengat menghasilkan sejumlah telur pada daun-daun sawi, ngengat dapat dipindahkan ke dalam toples lain. Kemudian ditunggu hingga telur menetas dan larva berkembang menjadi instar tiga. Selanjutnya larva-larva diseleksi untuk mendapatkan larva yang homogen dari segi ukuran dan stadia yang akan dipakai sebagai serangga uji.

Uji Virulensi pada Larva P. xylostella. Dalam uji virulensi, tidak semua isolat jamur diujikan pada larva P. xylostella. Isolat jamur yang digunakan dalam uji hayati adalah isolat hasil seleksi berdasarkan viabilitas. Isolat jamur patogen serangga yang berumur 15 hari pada media SDAY kemudian dibiakkan pada media EKD yang diletakkan di dalam botol kaca berukuran 125 ml untuk aplikasi. 50 ml media EKD yang berisi jamur patogen serangga kemudian di shaker selama 1 x 24 jam dengan kecepatan 100 rpm agar miselia jamur tumbuh dengan cepat dan banyak, sehingga dapat menghasilkan konidia yang banyak pula. Setelah 1 x 24 jam, botol-botol yang berisi biakan jamur patogen serangga dalam media EKD tersebut didiamkan selama kurang lebih 1-2 minggu agar jamur tumbuh menghasilkan konidia. Setelah jamur siap untuk diaplikasikan dengan ciri miselia tumbuh padat dan konidia memenuhi permukaan atas media EKG. Sebelum dihitung kerapatannya, sebanyak 10 ml suspensi jamur kemudian disentrifugasi, mengacu pada metode menurut Ahmed dan El-Katatny (2007) dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifugasi supernatan pada tabung Falcon

dibuang kemudian pelet ditambahkan akuades steril sebanyak 5 ml, sehingga diperoleh suspensi yang berisi konidia dan akuades murni tanpa adanya campuran media. Suspensi jamur kemudian dihomogenkan.

Kerapatan konidia jamur patogen serangga yang digunakan untuk pengujian terhadap P. xylostella adalah 1x10⁶ konidia/ml akuades. Aplikasi jamur patogen serangga dilakukan menurut metode Goettel dan Inglis (1997), yaitu metode pencelupan. Metode ini dilakukan dengan cara mencelupkan P. xylostella ke dalam suspensi jamur patogen serangga yang telah disiapkan selama 5 detik, kemudian dikeringanginkan di atas tisu steril. Sedangkan untuk kontrol P. xylostella dicelupkan dalam akuades steril. Pengujian dilakukan pada 20 ekor P. xylostella instar tiga di dalam wadah berukuran 4x4x5 cm. P. xylostella diberi pakan daun sawi segar yang dipotong-potong ukuran 3x3 cm. Pemberian pakan dilakukan sebanyak 4 buah tiap perlakuan dan diganti setiap hari

Percobaan diulang sebanyak 3 kali. Mortalitas diamati setiap hari hingga tujuh hari setelah aplikasi jamur patogen serangga.

Variabel Pengamatan

Mortalitas. Mortalitas larva ialah tingkat kematian larva yang disebabkan oleh pemberian jamur patogen serangga. Adapun cara perhitungan mortalitas larva menurut Hasyim et al. (2009) ialah sebagai berikut.

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

Keterangan: M = persentase larva yang mati

m = larva uji yang mati

n = larva uji secara keseluruhan

Waktu Kematian. Pengamatan dilakukan untuk melihat waktu yang dibutuhkan jamur patogen serangga untuk mematikan serangga uji. Waktu kematian diamati setiap hari, yaitu setelah aplikasi jamur patogen serangga 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:

Rerata waktu kematian (hari) = $\frac{X1Y1+X2Y2+XnYn}{Jumlah total larva mati}$

Keterangan: x = jumlah kematian larva yang terjadi pada hari tertentu y = jumlah hari saat pengamatan

Analisis Data

Isolat jamur patogen serangga yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk gambar berdasarkan hasil identifikasi makroskopis dan mikroskopis menurut Barnett and Hunter (1972). Mortalitas dan waktu kematian serangga uji dianalisis menggunakan ANOVA taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan uji Duncan taraf kepercayaan 95%.

