

III. METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Nematologi dan Mikologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang mulai bulan Februari 2015 sampai dengan September 2015.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf untuk sterilisasi alat dan media tumbuh jamur, *laminar air flow cabinet* (LAFC) untuk ruang steril isolasi, cawan Petri (diameter 9 cm) sebagai tempat media tumbuh jamur, *beaker glass* sebagai wadah untuk pembuatan media tumbuh, jarum ose sebagai alat untuk isolasi jamur, api bunsen, spatula sebagai pengaduk pembuatan media labu erlenmeyer, mikropipet untuk pengenceran suspensi, *shaker* alat untuk perbanyak konidia jamur, *sentrifuge* alat untuk memisahkan konidia jamur dengan media cair, pipet, pinset, mikroskop binokuler dan mikroskop berkamera untuk pengamatan jamur secara mikroskopis, *haemocytometer* sebagai alat untuk perhitungan kerapatan konidia jamur, kaca preparat dan kaca penutup alat bantu untuk pengamatan jamur secara mikroskopis dan perhitungan viabilitas, *hand counter* sebagai alat penghitung tangan untuk menghitung jumlah konidia, *cork borer*, timbangan, kompor listrik, kamera digital dokumentasi pengamatan makroskopis jamur, rak tabung, wadah plastik/toples sebagai wadah perbanyak larva *T. Mollitor* instar 10-11, botol kaca vial (diameter 2 cm dan tinggi 5 cm), kapas steril, aluminium foil, kain kasa, tisu steril, plastik wrap dan karet gelang.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 14 koleksi isolat jamur daritanah gambut di Kalimantan Tengah. Isolat jamur dari tanah gambut Kalimantan Tengah (Risbianti, 2015; Serdani, 2015) antara lain isolat GP-Fus1, GP-Fus2, GP-Fus4, GP-Tril, GP-Tri2, GP-Asp3, GM-Asp, GP-Mor2, GP-Asp, GM-Acr, GM-Mor1, GM-Mor3, GM-Fus (morfologi dapat dilihat di Lampiran 4); media *potato dextrose agar* (PDA): kentang 200 gr, agar 20 gr, dextrose 20 gr, kloramfenikol 1 gr dan akuades steril 1 lt, media cair ekstrak kentang dextrose

(EKD): kentang 200 g, dekstrose 20 g, kloramfenikol 1 g, akuades steril 1 lt, akuades steril, spirtus, alkohol 70 % untuk sterilisasi tangan dan alat dan serangga uji larva *T. molitor*.

Persiapan Penelitian

Isolasi dan Identifikasi Jamur Serangga

Kegiatan isolasi jamur di tanah gambut Kalimantan Tengah telah dilakukan oleh Risbianti (2015) dan Serdani (2015) dengan menggunakan metode umpan *T. molitor*. Identifikasi jamur secara makroskopis maupun mikroskopis juga telah dilakukan oleh kedua peneliti.

Penyiapan Inokulum

Penyiapan inokulum terdiri dari produksi isolat jamur, penyiapan suspensi, penghitungan konsentrasi konidia dan penghitungan viabilitas konidia.

Produksi isolat jamur. Isolat jamur ditumbuhkan dan diperbanyak di media PDA dengan komposisi 200 gram kentang, 20 gram dekstrose, 20 gram agar dan akuades 1 liter yang diaduk rata. Kemudian media ditambahkan 1 gram kloramfenikol lalu dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan disterilkan menggunakan autoklaf. Media dituang ke dalam cawan Petri steril dan ditunggu hingga media menjadi padat. Isolat jamur diambil dengan jarum ose lalu ditumbuhkan pada media PDA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 21 hari (Effendy et al., 2010). Setelah jamur tumbuh pada media PDA, selanjutnya di produksi pada media cair EKD untuk memudahkan dalam perhitungan kerapatan dan viabilitas konidia. Komposisi media EKD 200 gram kentang, 20 gram dekstrose, 10 gram pepton dan akuades 1 liter, aduk hingga larut. Setelah didinginkan selama 3 menit, tambahkan kloramfenikol 1 gram. Lalu di pindahkan ke labu erlenmeyer 500 ml untuk disterilisasi. Setelah disterilisasi, media cair dipindahkan ke labu erlenmeyer 250 ml. Perbanyak isolat jamur pada media cair EKD dilakukan dengan cara mengambil 10 plong dari koleksi isolat jamur yang sudah diperbanyak pada media PDA kemudian diinkubasikan selama 7 hari dengan menggunakan *cork borer*, lalu dimasukkan pada 100 ml media cair EKD yang selanjutnya dilakukan penggojokan menggunakan *shaker* selama 24 jam,

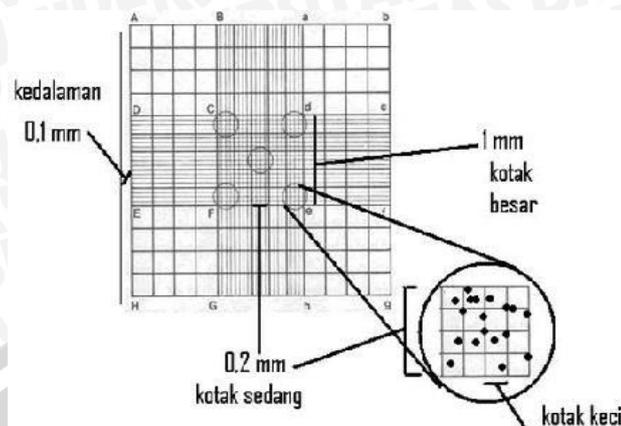
setelah itu diinkubasikan pada suhu ruang selama 14 hari agar konidia jamur berkembang.

Pembuatan suspensi konidia. Panen konidia jamur dilakukan dengan memodifikasi metode Trizelia et al. (2011) yaitu dengan menambahkan 20 ml akuades steril dan 0,02% Tween 80 dilakukan dengan cara mengambil biakan isolat jamur pada media cair EKD yang telah diinkubasi selama 14 hari. Dari larutan suspensi konidia di media cair EKD dikocok dengan tangan, kemudian diambil 10 ml dan dimasukkan ke *falcon tube* dengan menggunakan mikropipet, selanjutnya untuk memisahkan supernatan dan konidia digunakan *sentrifuse* dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang berada di atas permukaan mikropipet dipisahkan dari konidia yang berada di bawah permukaan mikropipet. Konidia kemudian ditambahkan akuades steril hingga 20 ml, selanjutnya dikocok dengan menggunakan tangan, sehingga diperoleh suspensi konidia. Suspensi konidia kemudian dapat digunakan untuk perhitungan kerapatan dan viabilitas konidia sebelum diuji ke larva *T. molitor*.

Penghitungan konsentrasi konidia. Kerapatan konidia dihitung setelah jamur dibiakkan selama 14 hari pada media EKD. Suspensi konidia dari produksi isolat diambil sebanyak 0,1 ml dengan menggunakan mikropipet. Suspensi isolat jamur diteteskan pada *haemocytometer*. Konidia jamur dihitung pada kotak bagian tengah (kotak yang dilingkari) (Gambar 5), 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 alat penghitung tangan (*hand counter*), dalam satu kotak contoh terdapat 16 kotak kecil, sehingga total terdapat 80 kotak kecil yang diamati. Kerapatan konidia dihitung dengan menggunakan rumus Gabriel dan Riyatno (1989) sebagai berikut:

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

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



Gambar 5. Bidang pandang *haemocytometer* (Anonim, 2011)

Kerapatan konidia yang digunakan untuk pengujian pada larva *T. molitor* adalah 10^7 konidia/ml. Jika kerapatan konidia mencapai lebih dari 10^7 misalnya kerapatan 10^9 , maka dari suspensi jamur kerapatan 10^9 dilakukan pengenceran berseri. Teknik pengenceran berseri dilakukan dengan cara mengambil 1 ml suspensi konidia kerapatan 10^9 kemudian ditambahkan 9 ml akuades steril sehingga mencapai kerapatan 10^8 , selanjutnya dari kerapatan konidia 10^8 diambil 1 ml suspensi konidia dan ditambahkan 9 ml akuades steril sehingga mencapai kerapatan 10^7 . Apabila hasil perhitungan konidia kurang dari 10^7 , maka jumlah kerapatan konidia perlu ditingkatkan lagi, yaitu dengan cara menambah waktu inkubasi kurang lebih selama 7 hari. Selanjutnya, konidia jamur dihitung kembali kerapatannya dengan menggunakan rumus yang sama.

Penghitungan viabilitas spora. Viabilitas konidia ditentukan setelah jamur dibiakkan selama 14 hari pada media EKD. Sebelum dihitung suspensi konidia didiamkan selama 48 jam terlebih dahulu dalam *Falcon*. Kemudian melakukan perhitungan jumlah konidia yang berkecambah dan tidak berkecambah dengan mengambil 1 tetes dengan pipet dan di atas kaca preparat dan ditutup dengan *cover glass*. Perhitungan dilakukan pada bidang pandang di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Viabilitas spora dihitung dengan menggunakan rumus Gabriel dan Riyatno (1989) sebagai berikut:

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

V adalah perkecambahan spora (viabilitas), g adalah jumlah spora yang berkecambah dan u adalah jumlah spora yang tidak berkecambah.

Penyiapan Serangga Uji

Penyiapan larva *T. molitor* dilakukan dengan tujuan untuk memenuhi kebutuhan larva yang akan dijadikan serangga uji pada saat uji patogenesis 14 isolat jamur. Larva *T. molitor* diperoleh dari Pasar Burung Splendid Malang yang kemudian dipelihara di dalam toples yang sudah dilubangi bagian atasnya dan diberi kain kasa. Larva diberi pakan dedak halus atau polard. Dedak yang telah tercampur kulit larva sebagai hasil molting segera diganti dengan dedak yang baru (Gambar 6). Larva yang akan digunakan adalah larva instar 10 (panjang tubuh $1,34 \pm 0,19$ cm) – 11 (panjang tubuh $1,55 \pm 0,16$ cm) (Park *et al.*, 2014).



Gambar 6. Kulit sebagai hasil proses *molting* (Budiantami *et al.*, 2012)

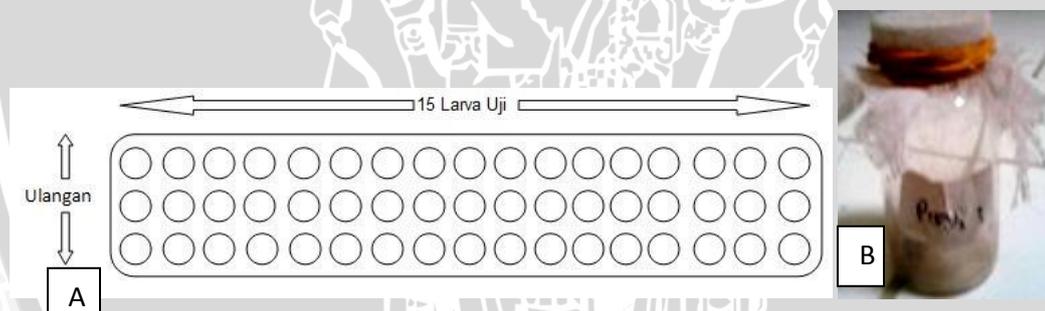
Pelaksanaan Penelitian

Uji Patogenesis

Penelitian dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap. Perlakuan terdiri dari 14 isolat jamur koleksi Risbianti (2015) dan Serdani (2015) yang telah diperbanyak dan kontrol sebagai pembanding. Inokulasi dilakukan dengan memodifikasi metode Sun dan Liu (2008) yaitu setiap perlakuan menggunakan 15 ekor larva *T. molitor* instar 10-11 ke dalam 14 suspensi isolat jamur yang mengandung 10^7 konidia/ml selama 5 detik. Inokulasi dilakukan pada sore hari. Perlakuan kontrol adalah larva *T. molitor* instar 10-11 yang dicelupkan ke dalam akuades steril. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali.

Setiap larva dimasukkan ke dalam botol kaca vial dan ditutup dengan menggunakan kain kasa steril yang telah dipotong berbentuk persegi empat lalu diikat dengan menggunakan karet. Setiap satu larva larva uji dimasukkan ke dalam satu botol kaca fial, sehingga terdapat $15 \times 15 \times 3 = 675$ botol kaca fial. Botol kaca vial yang telah berisi larva *T. molitor* selanjutnya ditaruh dan ditata rapi sesuai perlakuan dan ulangan serta urutan larva ke dalam nampan yang telah diisi air seperempat nampan. Kemudian diinkubasi pada area yang gelap untuk menjaga kelembaban (Gambar 7).

Pemberian air hingga seperempat nampan, penginkubasian pada area gelap, dan dipuaskan selama pengujian dilakukan untuk menciptakan kondisi yang mempengaruhi imun serangga *T. molitor*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Scheffer (1991) dalam Scully dan Bidochka (2006) bahwa jamur oportunist mampu menyerang serangga inang bila imunitas serangga rendah akibat malnutrisi dan kondisi lingkungan.



Gambar 7. Uji Patogenisitas: (a) Arah pengujian untuk tiap perlakuan, (b) botol kaca vial tempat uji

Pengamatan

Terdapat dua pengamatan larva *T. molitor* setelah diinokulasikan 14 isolat jamur diantaranya waktu pengamatan dan mortalitas larva *T. molitor*.

Waktu pengamatan. Waktu pengamatan larva *T. molitor* oleh 14 isolat jamur dilakukan pagi hari selama 24 jam sekali selama 7 (tujuh) hari setelah inokulasi. Kasumbogo (2006) menyatakan bahwa perkembangan jamur dalam tubuh serangga inang hingga mati berlangsung sekitar 7 hari.

Mortalitas (%).Mortalitas larva *T. molitor* dihitung dengan menggunakan rumus Hasyim *et al.* (2009) sebagai berikut:

$$M = \frac{A}{D} \times 100\%$$

M adalah persentase mortalitas larva *T. molitor*, A adalah banyak larva *T. molitor* yang mati karena aplikasi isolat jamur dan D adalah banyak larva *T. molitor* yang diamati.

Data yang diperoleh dari mortalitas larva *T. molitor* dianalisis menggunakan uji F pada taraf nyata 5%. Bila terdapat perbedaan yang nyata, analisis dilanjutkan dengan Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.

Pengelompokan Jamur Serangga

Isolat jamur yang serangga dibagi menjadi 3 (tiga) kelompok berdasarkan mortalitas yaitu patogen serangga, patogen oportunistis dan koloniser sekunder (Sundan Liu, 2008). Pengelompokan ini, ditujukan untuk isolat jamur yang belum diketahui atau dilaporkan sebagai patogen serangga sebelumnya sehingga perlu diketahui asosiasinya berdasarkan mortalitas.

1. Patogen serangga. Isolat jamur yang menunjukkan mortalitas sebesar 100% pada larva *G. mellonella* dikelompokkan sebagai patogen serangga.
2. Patogen oportunistis. Isolat jamur yang menunjukkan mortalitas 1-90% pada larva *G. mellonella* dikelompokkan sebagai patogen oportunistis.
3. Koloniser sekunder. Isolat jamur tidak menunjukkan angka mortalitas dan tidak mengakibatkan kematian pada larva *G. mellonella* dikelompokkan sebagai koloniser sekunder