

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hama dan Penyakit Bidang Proteksi Tanaman, serta Laboratorium Lapang Terpadu, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada bulan Maret sampai dengan September 2015.

3.2 Bahan dan Alat

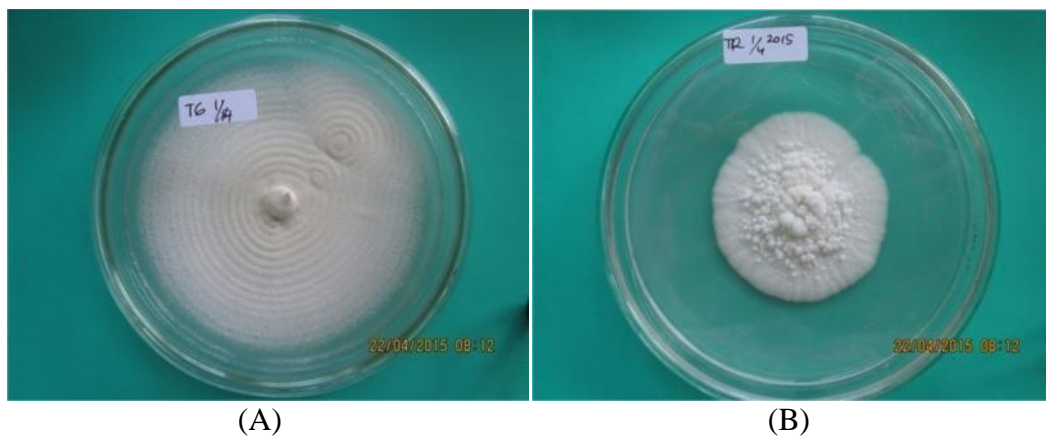
Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu serangga uji *R. linearis*, kacang panjang sebagai pakan, media PDA (*Potato Dextrose Agar*), isolat *Aspergillus* sp., akuades steril, tisu, dan alkohol 70%.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu stoples plastik untuk pemeliharaan serangga uji, *sprayer*, kain kasa, kain strimin, cawan Petri, plastik tahan panas, karet gelang, jarum ose, bor gabus, mikropipet, tabung reaksi, bunsen, erlenmeyer, *haemocytometer*, autoklaf, *laminar air flow*, mikroskop majemuk, mikroskop stereo, neraca, kamera, dan alat tulis.

3.3 Uji Pendahuluan

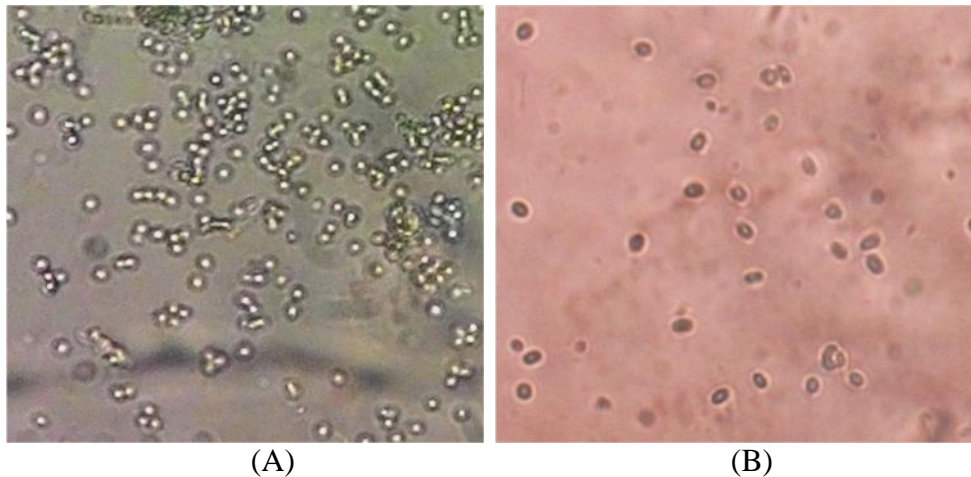
Penelitian pendahuluan sebelumnya akan menggunakan 2 isolat lokal jamur entomopatogen *Beauveria bassiana* asal Tegineneng dan Trimurjo. Namun secara makroskopis, bentuk dan warna koloni kedua isolat tersebut di media PDA

sangat berbeda. Isolat dari Tegineneng berwarna putih kekuningan dengan pola koloni berbentuk lingkaran-lingkaran teratur, sedangkan isolat Trimurjo berwarna putih dengan bentuk koloni seperti kapas dan ada pola berbentuk bunga. Selain itu, pertumbuhan isolat Trimurjo sangat lambat jika dibandingkan dengan isolat Tegineneng (Gambar 3).



Gambar 3. Perbedaan bentuk koloni jamur umur 3 minggu di media PDA dalam cawan Petri berdiameter 9 cm (A) Isolat Tegineneng (B) Isolat Trimurjo.

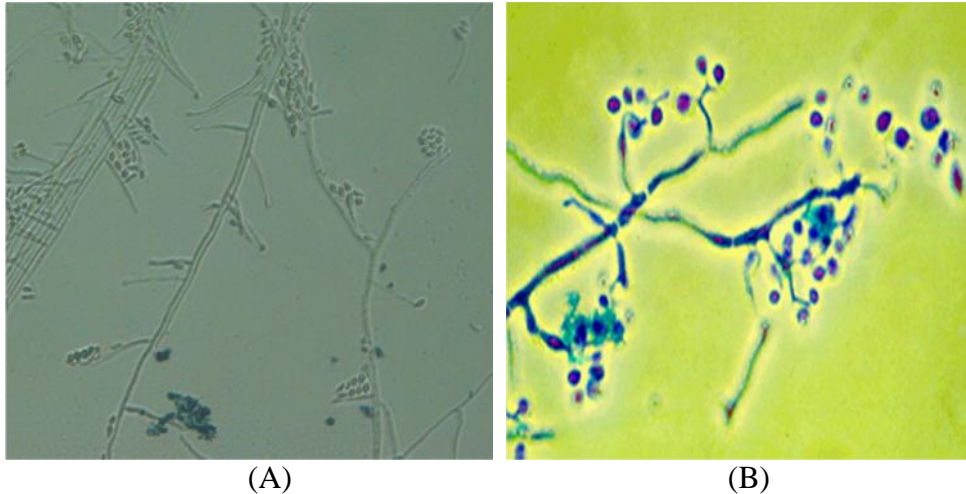
Setelah diamati dengan mikroskop menggunakan perbesaran 400 kali pada 12 Maret 2015, tampak bahwa spora jamur tersebut juga berbeda. Spora isolat Tegineneng berbentuk bulat, sedangkan spora isolat Trimurjo berbentuk lonjong (oval) (Gambar 4). Namun, terjadi kesulitan untuk mengamati struktur jamur secara utuh.



Gambar 4. Perbedaan spora jamur isolat Tegineneng dan Trimurjo secara mikroskopik (A) Spora isolat Tegineneng (B) Spora isolat Trimurjo.

Perbedaan kedua isolat ini menyebabkan dilakukannya identifikasi ulang terhadap kedua isolat yang dimiliki dan pengujian daya infeksi jamur tersebut terhadap *R. linearis*. Identifikasi jamur dilakukan di Balai Veteriner Lampung pada 17 Maret–13 April 2015 dan pengujian daya infeksi jamur dilakukan di Laboratorium Hama dan Penyakit Fakultas Pertanian UNILA pada 7–14 April 2015.

Identifikasi 2 isolat jamur di Balai Veteriner Lampung dilakukan untuk menyatakan isolat yang merupakan jamur *Beauveria* sp. Penguji menyatakan bahwa isolat Trimurjo merupakan jamur *Beauveria* sp., sedangkan isolat Tegineneng bukan *Beauveria* sp. Namun, dokumentasi hasil uji yang menunjukkan isolat Trimurjo adalah *Beauveria* sp. kurang mendekati bentuk struktur jamur *Beauveria* sp. di literatur (Gambar 5).



Gambar 5. Perbandingan hasil pengamatan struktur jamur isolat Trimurjo dengan literatur (A) Struktur jamur isolat Trimurjo (Balai Veteriner, 2015) (B) Struktur jamur *B. bassiana* (Ellis, 2015).

Pengujian daya infeksi jamur terhadap *R. linearis* menggunakan 10 ekor *R. linearis*, sehingga setiap isolat diujikan pada 5 ekor serangga uji. Serangga uji yang digunakan tidak berumur sama untuk mengetahui tingkat kerentanan serangga uji, yaitu 2 ekor larva instar II, 1 ekor larva instar V, dan 2 ekor imago. Suspensi jamur yang diaplikasikan adalah suspensi pekat dari biakan jamur yang telah diinkubasi selama 1 bulan dan diaplikasikan pada serangga uji serta makanannya. Suspensi dibuat dengan memanen spora jamur dan melarutkannya pada 10 ml akuades serta dihomogenkan dengan *rotamixer*. Pengamatan setelah aplikasi dilakukan setiap hari sampai 7 HSA (Hari Setelah Aplikasi). Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Mortalitas *R. linearis* setelah aplikasi isolat jamur Tegineneng dan Trimurjo.

No.	Waktu Pengamatan	Perlakuan Jamur		Keterangan
		Tegineneng (TG)	Trimurjo (TR)	
1	1 HSA (8 April 2015)	0	0	-
2	2 HSA (9 April 2015)	0	0	-
3	3 HSA (10 April 2015)	2 (instar II)	1 (instar V)	• TR : 1 instar V yang mati gagal molting
4	4 HSA (11 April 2015)	0	1 (instar II)	• TR : instar II yang mati gagal molting
5	5 HSA (12 April 2015)	0	0	-
6	6 HSA (13 April 2015)	0	0	-
7	7 HSA (14 April 2015)	0	0	-

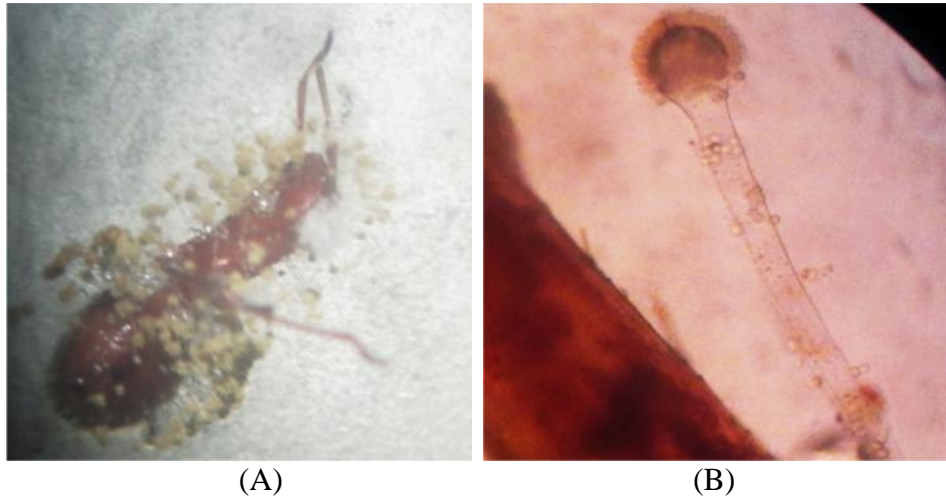
Serangga mati (*cadaver*) dikumpulkan dan diletakkan di dalam cawan Petri untuk membuktikan bahwa serangga mati akibat infeksi jamur. Pada tutup cawan diberi kertas tisu yang ditetesi akuades agar lembab dan mendukung pertumbuhan jamur. Jika kematian disebabkan oleh jamur, biasanya jamur terlihat pada serangga mati beberapa waktu kemudian. Pada uji pendahuluan ini, jamur didapati tumbuh di serangga mati. Waktu munculnya jamur dapat dilihat pada

Tabel 2.

Tabel 2. Waktu munculnya jamur pada *cadaver R. linearis* setelah aplikasi isolat jamur Tegineneng dan Trimurjo.

Perlakuan	Waktu Muncul Jamur	Keterangan
Tegineneng	4 HSA (11 April 2015)	• Jamur tampak tumbuh pada semua nimfa yang mati, koloni kekuningan
Trimurjo	5 HSA (12 April 2015)	• Hanya nimfa instar II yang tampak ditumbuhi jamur, koloni jamur putih kekuningan • Nimfa instar V busuk

Hasil pengamatan di mikroskop menunjukkan bahwa koloni jamur yang hidup pada *cadaver* sangat berbeda dengan koloni *B. bassiana*. Jamur yang tumbuh tampak memiliki konidiofor dan vesikel yang merupakan ciri khas jamur genus *Aspergillus* (Gambar 6).



Gambar 6. Hasil pengamatan jamur pada *cadaver R. linearis* pada uji pendahuluan (A) Koloni jamur tumbuh pada *cadaver* (B) Struktur jamur dengan konidiofor dan vesikel.

Berdasarkan hasil uji pendahuluan ini, maka jamur entomopatogen yang menyerang hama pengisap polong kedelai adalah *Aspergillus*. Dengan demikian jamur entomopatogen yang akan diteliti lebih lanjut adalah *Aspergillus* sp.

3.4 Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri atas beberapa kegiatan yaitu pembiakan jamur *Aspergillus* sp., pengujian kerapatan dan viabilitas spora jamur, aplikasi jamur, serta pengamatan dan perhitungan peubah patogenesis. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Kelompok (RK). Pengelompokan dilakukan berdasarkan waktu aplikasi suspensi *Aspergillus* sp. ke serangga uji .

Perlakuan yang diuji terdiri atas isolat *Aspergillus* sp. dengan kerapatan 10^5 , 10^6 , 10^7 , dan 10^8 spora/ml yang dibandingkan dengan kontrol. Setiap satuan percobaan terdapat 10 ekor serangga uji.

3.5 Persiapan Penelitian

Persiapan penelitian terdiri atas perbanyak serangga uji (*R. linearis*), pembuatan media PDA, penyiapan isolat *Aspergillus* sp., pembuatan suspensi *Aspergillus* sp., dan penghitungan kerapatan spora *Aspergillus* sp.

3.5.1 Perbanyak serangga uji (*R. linearis*)

Untuk memperoleh serangga uji, dilakukan penanaman tanaman kedelai yang menjadi inang hama *R. linearis* dan kacang panjang sebagai pakan hama pada lahan Laboratorium Lapang Terpadu Universitas Lampung. Pemeliharaan tanaman dilakukan tanpa penggunaan insektisida kimia.

Tanaman kedelai yang memasuki masa pembungaan dan pembentukan polong akan mengundang datangnya serangga *R. linearis* dan dilakukan penangkapan serangga menggunakan alat *sweep net*. Serangga yang tertangkap kemudian dipelihara untuk memperbanyak stok serangga uji.

Serangga yang tertangkap dipelihara di laboratorium berdasarkan metode yang digunakan Mawan & Amalia (2011) dengan sedikit modifikasi. Imago betina *R. linearis* siap bertelur yang diperoleh dari lahan kacang panjang disimpan dalam stoples berdiameter 16 cm dan tinggi 17 cm yang ditutup dengan kain strimin. Imago diberi pakan berupa kacang panjang dan diletakkan juga serabut kain kasa sebagai tempat peletakan telur. Dalam satu kurungan dipelihara 5 ekor serangga

dan pakannya diganti setiap 2 hari sekali. Telur-telur diambil saat penggantian makanan, kemudian dipindahkan ke wadah lain sampai menetas. Nimfa akan dipelihara sebagai stok serangga uji.

3.5.2 Pembuatan media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Media PDA dibuat dengan pencampuran ekstrak kentang dengan dekstrosa dan agar. Satu liter media PDA membutuhkan 200 g kentang, 20 g dekstrosa, dan 20 g agar. Sebanyak 200 g kentang dipotong kecil sampai ukurannya ± 1 mm dan kemudian direbus dalam 1 L akuades selama 20 menit. Ekstrak hasil perebusan kemudian disaring dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1.000 ml yang telah berisi dekstrosa dan agar, lalu ditambahkan akuades sampai volumenya 1.000 ml. Tabung erlenmeyer kemudian ditutup dengan aluminium foil dan karet gelang. Selanjutnya, erlenmeyer berisi bahan media dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diautoklaf selama 15 menit dalam suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Selanjutnya, media diangkat dan didiamkan sampai media bersuhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ lalu dituang ke dalam cawan Petri secara aseptik di *laminar air flow*.

3.5.3 Penyiapan isolat *Aspergillus* sp.

Isolat *Aspergillus* sp. yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil isolasi dari *cadaver R. linearis* di Laboratorium Hama dan Penyakit Fakultas Pertanian Universitas Lampung, Lampung. Isolasi dilakukan dengan cara mengambil miselium atau spora jamur dan menumbuhkannya pada media PDA, kemudian dimurnikan kembali. Isolat murni ini kemudian diinkubasi selama 15 hari dan kemudian siap diaplikasikan ke serangga uji. Untuk memperoleh umur isolat

yang sama, isolat diremajakan pada setiap kelompok aplikasi sehingga dalam penelitian ini digunakan subkultur ke-2, ke-3, dan ke-4.

3.5.4 Pembuatan suspensi *Aspergillus* sp.

Suspensi jamur dibuat dengan menambahkan 10 ml akuades ke dalam biakan jamur. Spora jamur kemudian dilepaskan dari biakan dengan menyapukan kuas halus di permukaan biakan. Larutan yang didapatkan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan dengan *rotamixer*, sehingga didapatkan larutan dasar. Larutan dasar ini harus diencerkan lagi dengan pengenceran berseri. Pengenceran berseri dilakukan dengan mengambil 1 ml larutan dasar yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 9 ml akuades. Larutan ini dihomogenkan kembali selama 1 menit, sehingga didapatkan pengenceran tingkat satu. Pengenceran ini dilanjutkan sampai pengenceran tingkat empat.

3.5.5 Perhitungan kerapatan spora *Aspergillus* sp.

Kerapatan spora dalam penelitian ini digunakan sebagai perlakuan yang diuji. Kerapatan spora dalam larutan dihitung dengan *haemocytometer* di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Spora dalam bidang pengamatan *haemocytometer* dihitung secara langsung dengan bantuan *counter*. Terdapat tiga ukuran bidang pengamatan dalam *haemocytometer*, yaitu kotak besar, sedang, dan kecil. Dalam penelitian ini, bidang pengamatan yang digunakan adalah kotak kecil.

Perhitungan kerapatan menggunakan rumus (Hadioetomo, 1993 dalam Budi *et al.*, 2013) sebagai berikut:

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

Keterangan:

K = kerapatan spora (spora/ml)
 t = jumlah spora dalam kotak sampel
 d = faktor pengenceran
 n = jumlah kotak sampel yang diamati
 0,25 = faktor koreksi

3.6 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian terdiri atas uji viabilitas *Aspergillus* sp. dan uji patogenisitas *Aspergillus* sp.

3.6.1 Uji viabilitas *Aspergillus* sp.

Daya berkecambah (viabilitas) spora jamur *Aspergillus* sp. diuji dengan inkubasi spora yang disuspensikan dengan akuades pada kaca preparat selama 48 jam. Inkubasi selama 48 jam bertujuan untuk melihat jumlah spora berkecambah yang paling maksimal. Selain itu inkubasi selama 48 jam masih termasuk waktu standard dalam pengujian viabilitas spora jamur (Neill & Tang, 2007), dengan catatan bahwa jumlah spora berkecambah dan tidak berkecambah masih mudah untuk dihitung.

Sebanyak 1 tetes suspensi jamur diambil dengan pipet tetes dan diteteskan pada preparat, kemudian ditutup dengan kaca penutup. Preparat ini selanjutnya diletakkan di dalam cawan Petri yang diberi tisu basah untuk menjaga

kelembaban. Empat puluh delapan jam kemudian diamati jumlah spora yang berkecambah dengan bantuan mikroskop. Perhitungan diulang sebanyak 3 kali.

3.6.2 Uji patogenesis *Aspergillus* sp.

Serangga uji yang digunakan adalah nimfa *R. linearis* instar ke-2. Volume semprot suspensi *Aspergillus* sp. untuk aplikasi ke serangga uji sebanyak 2 ml/10 ekor serangga. Selain itu, suspensi juga disemprotkan ke polong kacang panjang sebanyak 8 ml/5 potong polong kacang panjang berukuran 15 cm. Polong yang telah disemprot suspensi jamur dikeringanginkan dan dimasukkan ke dalam toples berisi serangga uji yang telah disemprot suspensi jamur. Makanan ini diganti setiap 2 hari sekali tanpa pengulangan penyemprotan suspensi jamur. Perlakuan kontrol hanya disemprot dengan akuades steril, dengan volume semprot yang sama. Setelah dilakukan aplikasi suspensi *Aspergillus* sp., maka dilakukan pengamatan dan pengumpulan data.

3.6.2.1 *Pengamatan gejala infeksi Aspergillus* sp. *pada R. linearis* dan waktu kemunculan koloni jamur pada cadaver.

Gejala infeksi jamur *Aspergillus* sp. pada serangga uji diamati dengan melihat warna koloni jamur yang tumbuh pada tubuh *R. linearis* yang mati akibat infeksi jamur entomopatogen. Waktu kemunculan koloni jamur di *cadaver* juga dicatat.

3.6.2.2 *Reisolasi Aspergillus* sp. *dari cadaver*

Koloni jamur yang tumbuh pada serangga mati diisolasi kembali untuk membuktikan bahwa patogen yang menyerang dan menimbulkan kematian adalah *Aspergillus* sp.

3.6.2.3 *Persentase mortalitas R. linearis*

Pengamatan terhadap mortalitas *R. linearis* dilakukan setiap hari sampai 14 hari setelah aplikasi. Persentase mortalitas nimfa dihitung dengan rumus sebagai berikut (Budi *et al.*, 2013):

$$P = \frac{X}{Y} \times 100\%$$

Keterangan:

P = persentase kematian *R. linearis*
X = jumlah *R. linearis* yang mati
Y = jumlah *R. linearis* yang diuji

3.7 Analisis Data

Data persentase kematian *R. linearis* dianalisis dengan sidik ragam. Apabila sidik ragam menunjukkan pengaruh nyata pada perlakuan, maka dilakukan uji lanjutan dengan Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada taraf 5%.