

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret – September 2001 di Laboratorium Kelompok Pengendalian Hama bidang Pertanian, Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Atom Nasional, Pasar Jumat, Jakarta.

3.2. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah : seperangkat alat untuk isolasi bakteri (yaitu berupa : Laminar Air Flow, jarum ose, pinset, cawan petri, tabung reaksi, dan lampu bunsen), seperangkat alat untuk perbanyakan nematoda berupa : cawan petri, kertas saring, dan pembungkus plastik, seperangkat alat untuk pembuatan media (berupa : blender, neraca analitik, pH meter, gelas ukur, pipet, penangas, dan gunting), seperangkat alat untuk sterilisasi media yaitu berupa autoclave, seperangkat alat untuk pemanenan nematoda (berupa : cawan petri, kain kassa, wadah dari plastik, dan gelas ukur), serta seperangkat alat untuk penghitungan nematoda berupa mikroskop binokuler dan “hand counter”.

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Juvenil Infektif nematoda Heterorhabditis, Larva Tenebrio, Usus Ayam, Hati Ayam, Putih telur, “Dog food”, Lemak sapi, Alkohol 95%, Medium NBTA, Medium NA Broth, Spons Polyurythane, dan Aquadest steril.

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Persiapan Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dicuci dengan menggunakan sabun dan dicuci kembali dengan air bersih yang mengalir. Adapun peralatan yang akan digunakan dalam isolasi bakteri disterilisasi dengan pengoponan pada suhu 180°C selama 3 jam.

Isolat nematoda *Heterorhabditis* sp. diperoleh dari Laboratorium Kelompok Pengendali Hama, P3TIR, BATAN, Pasar Jumat, Jakarta. Perbanyakan isolat nematoda dilakukan secara *in vivo* dengan modifikasi teknik Woodring dan Kaya (1988) yaitu menggunakan larva *Tenebrio* sp. sebagai inangnya.

3.3.2. Isolasi Bakteri

Tahapan ini dilakukan secara aseptis pada Laminar Air Flow.

Isolasi bakteri asosiatik nematoda dilakukan dengan cara mengisolasinya dari larva serangga *Tenebrio* sp. yang terinfeksi nematoda. Larva *Tenebrio* sp. disterilisasi permukaannya dengan alkohol 70 % dengan cara dikuas, kemudian larva tersebut diinokulasi dengan nematoda. Setelah terinfeksi selama 48 jam, permukaan larva tersebut disterilisasi dengan alkohol 95% selama 15 menit, kemudian dicuci 3 kali dengan aquadest steril dan dikeringkan dengan kertas saring steril. Tubuh larva tersebut kemudian dipotong dan hemolimfanya digoreskan pada medium NBTA dengan menggunakan pinset, kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu 27°C. Bakteri kemudian dimurnikan hingga diperoleh fase primernya yang ditandai dengan warna hijau biru dengan zona jernih disekitar koloni bakteri. Satu hari sebelum bakteri diperlakukan ke media

pebiakan nematoda, fase primer bakteri tersebut di inokulasi pada medium NA Broth di dalam tabung reaksi, kemudian di inkubasi pada 27°C.

3.3.3. Pembuatan Media untuk Pebiakan Nematoda

Media yang digunakan sebagai media standar adalah media campuran usus ayam menurut Bedding (1984) yang telah dimodifikasi oleh Chaerani, dkk. (1995) dengan komposisi media: 70 % usus ayam, 20 % lemak sapi dan 10 % air, kemudian dibuat 3 modifikasi media dengan menggunakan hati ayam, putih telur dan dog food.

Adapun cara pembuatan media adalah sebagai berikut:

Usus ayam, hati ayam, putih telur dan dog food dimasak secara terpisah dalam autoclave selama 10 menit (121°C, 1,5 atm) kemudian masing-masing digiling dengan menggunakan blender. Sementara itu lemak sapi dicairkan menjadi minyak dengan cara dipanaskan.

Selanjutnya dibuat komposisi media sebagai berikut:

Media 1: 70 % usus ayam, 20 % lemak sapi, dan 10 % air

Media 2: 70 % hati ayam, 20 % lemak sapi, dan 10 % air

Media 3: 70 % putih telur, 20 % lemak sapi, dan 10 % air

Media 4: 70 % dog food, 20 % lemak sapi, dan 10 % air

Media tersebut kemudian dicampur dengan potongan spons polyurethane dengan ukuran 1x1x1 cm dengan perbandingan berat: media : spons polyurethane = 12,5 : 1 (Bedding, 1984)

Kemudian 10,8 g media dimasukkan ke dalam botol kultur (erlenmeyer 250 ml), mulut botol ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Botol kultur yang

berisi media kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoclave selama 1 jam (121°C, 1,5 atm).

3.3.4. Inokulasi Media dengan Bakteri dan Nematoda

Sebanyak 5 ml bakteri dari kultur bakteri dalam NA Broth diinokulasikan pada media dengan menggunakan pipet steril, botol ditutup dengan kapas dan aluminium foil kemudian dikocok secara vertikal untuk meratakan bakteri ke seluruh media, kemudian diinkubasi selama 48 jam.

Setelah inkubasi, media diinokulasi dengan Juvenil Infektif (JI) nematoda sebanyak 300 ekor tiap botol, botol ditutup kembali dengan kapas dan aluminium foil, kemudian media diinkubasi kembali selama 21 hari (Lampiran 1, Gambar 5).

3.3.5. Pemanenan Nematoda Hasil Pembiakan dengan Media Buatan

Pemanenan Nematoda dilakukan dengan metode corong Baerman (Chaerani, dkk (1995); Gorny and Grum (1993), yaitu pada cawan petri besar berisi air diletakkan wadah dari plastik yang berlubang yang dilapisi kain kasa (volume 200 ml). Media ditaruh pada wadah plastik dengan ketebalan tidak lebih dari 5 cm dan separuh tergenang air (Lampiran 1, Gambar 6). Media tersebut kemudian didiamkan selama semalam, setelah itu JI nematoda yang terperangkap (tersedimen) di air diambil dan dicuci dengan cara dekantasi-sedimentasi (nematoda dibiarkan mengendap, air yang berada di atasnya dibuang dengan cara menuangnya dengan hati-hati).

3.3.6. Penghitungan Jumlah JI Nematoda Hasil Pembiakan

Penghitungan JI nematoda dilakukan dengan metode pengenceran (Woodring dan Kaya, 1988). Penghitungan dilakukan pada semua unit percobaan dan dilakukan setiap hari, yaitu dimulai dari hari panen sampai dengan JI nematoda tidak muncul lagi di perangkap air pada setiap 24 jam. Cara penghitungannya adalah sebagai berikut: Larutan yang berisi JI nematoda diencerkan dengan aquadest steril sampai volume tertentu (misalnya 200 ml), kemudian campuran aquadest dan JI nematoda tersebut dihomogenkan dengan cara diaduk, dalam keadaan homogen diambil 1 ml larutan, kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop binokuler, apabila kepadatan dari JI nematoda dalam 1 ml larutan tersebut terlalu padat dan sukar untuk dihitung, maka ditambahkan aquadest dengan volume tertentu sampai kepadatan JI nematoda kecil dan mudah untuk dihitung, setelah itu dari larutan hasil penambahan tersebut diambil sebanyak 1 ml dan diamati kembali dengan mikroskop binokuler dan dilakukan penghitungan jumlah JI nematoda yang terdapat pada larutan tersebut.

Jumlah JI nematoda keseluruhan dari hasil panen satu unit percobaan pada satu hari pemanenan diketahui dari rumus sebagai berikut (Woodring dan Kaya,

$$1980): N \times \frac{1}{M} \times (X + 1) = S$$

N = jumlah JI nematoda hasil penghitungan

M = jumlah ml air yang dihitung jumlah JI nematodanya (1 ml)

X = jumlah ml aquadest yang ditambahkan

S = konsentrasi JI nematoda per ml larutan awal.

Jumlah total JI nematoda diperoleh dengan cara menjumlahkan hasil penghitungan JI nematoda hasil panen setiap hari. Jumlah JI nematoda yang

dihasilkan tiap 1 g media diperoleh dari pembagian jumlah total JI nematoda dengan berat media awal (10,8 g).

3.4. Parameter yang Diamati

Parameter utama pada penelitian ini adalah jumlah total juvenil infeksi (JI) nematoda hasil pembiakan per gram media. Disamping itu juga dilakukan pengukuran suhu dan kelembaban ruangan pembiakan JI nematoda sebagai parameter pendukung.

3.5. Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan perbedaan komponen media sebagai perlakuannya dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak 6 kali.

Adapun komponen media tersebut adalah sebagai berikut:

Media 1: 70 % usus ayam, 20 % lemak sapi, dan 10 % air

Media 2: 70 % hati ayam, 20 % lemak sapi, dan 10 % air

Media 3: 70 % putih telur, 20 % lemak sapi, dan 10 % air

Media 4: 70 % dog food, 20 % lemak sapi, dan 10 % air

3.6. Analisa Data

Data jumlah JI nematoda yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan uji F (ANOVA) dengan taraf signifikansi 5 %, bila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan,