



**UJI PERSISTENSI NEMATODA ENTOMOPATOGEN HASIL
REISOLASI DARI LAHAN TANAMAN PADI, SAYURAN, DAN TEBU
TERHADAP LARVA *Galleria melonella* Linnaeus**

SKRIPSI

**Oleh :
ADETYAS IIN TIANANDA
NIM. 111510501172**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**UJI PERSISTENSI NEMATODA ENTOMOPATOGEN HASIL
REISOLASI DARI LAHAN TANAMAN PADI, SAYURAN, DAN TEBU
TERHADAP LARVA *Galleria melonella* Linnaeus**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Pendidikan pada Program Studi Agroteknologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Pertanian

Oleh :
ADETYAS IIN TIANANDA
NIM. 111510501172

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Karya tulis ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Suminah dan Ayahanda Imam Sodik yang selalu memberikan doa serta dukungan berupa kasih sayang, waktu, serta materi yang tak terhingga selama ini;
2. Segenap keluarga besar bapak Miskan yang telah memberikan semangat dan doa kepada saya untuk melanjutkan jenjang pendidikan S1;
3. Bapak dan Ibu Guru sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
4. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

Barang siapa yang menginginkan dunia, hendaklah ia berilmu. Barang siapa
menginginkan akhirat, hendaklah ia berilmu. Barang siapa
menginginkan keduanya, ia pun harus berilmu.

(HR. Bukhori dan Muslim) *)

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah
selesai (dari suatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain).

Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.

(QS. *Al-Insyirah*, ayat 6-8) **)

*) Nureka, Rosyid. 2013. Kumpulan Moto dari Al-Quran dan Hadist. <http://rosyidnureka.blogspot.com/2013-09-01/kumpulan-moto.html>. Diakses pada tanggal 28 Agustus 2015.

**) Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. Al-Qur'an dan Terjemahnya. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Adetyas Iin Tiananda

NIM : 111510501072

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “Uji Persistensi Nematoda Entomopatogen Hasil Reisolasi dari Lahan Tanaman Padi, Sayuran, dan Tebu terhadap Larva *Galleria melonella* Linnaeus” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus saya junjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 29 Oktober 2015

Yang menyatakan,

Adetyas Iin Tiananda
NIM. 111510501072

SKRIPSI

UJI PERSISTENSI NEMATODA ENTOMOPATOGEN HASIL REISOLASI
DARI LAHAN TANAMAN PADI, SAYURAN, DAN TEBU TERHADAP
LARVA *Galleria melonella* Linnaeus

Oleh :

Adetyas Iin Tiananda
NIM. 111510501172

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Prof.Dr.Ir. Didik Sulistyanto, M.Ag.Sc.
NIP : 1964032 6198803 1 001

Dosen Pembimbing Anggota : Ir. Wagiyana, MP.
NIP : 1961080 6198802 1 001

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Uji Persistensi Nematoda Entomopatogen Hasil Reisolasi dari Lahan Tanaman Padi, Sayuran, dan Tebu terhadap Larva *Galleria melonella* Linnaeus**” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Kamis, 29 Oktober 2015

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Prof. Dr. Ir. Didik Sulistyanto, M.Ag.Sc.

NIP. 196403261988031001

Dosen Pembimbing Anggota,

Ir. Wagivana, MP.

NIP. 196108061988021001

Penguji Utama,

Ir. Sutjipto, MS.

NIP. 195211021978011001

Penguji Anggota,

Ir. Soekarto, MS

NIP. 195210211982031001

Mengesahkan
Dekan,

Dr. Ir. Jani Januar, M.T.

NIP. 19590102 198803 1 002

**Uji Persistensi Nematoda Entomopatogen Hasil Reisolasi Dari Lahan
Tanaman Padi, Sayuran, Dan Tebu Terhadap
Larva *Galleria melonella* Linnaeus**

Adetyas Iin Tiananda

Program Studi Agroteknologi – Fakultas Pertanian – Universitas Jember
email : *didik_nemadic@yahoo.com*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui persistensi Nematoda Entomopatogen (NEP) hasil reisolasi dari lahan tanaman padi, sayuran, dan tebu serta efektivitasnya terhadap larva *Galleria melonella*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Pengendalian Hayati, Jurusan Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Jember. Penelitian ini dimulai pada bulan Maret sampai Mei 2015. Agen Pengendali Hayati berupa NEP telah digunakan untuk mengendalikan OPT pada berbagai tanaman diantaranya: tanaman padi, sayuran, dan tebu. Dalam kondisi lingkungan yang mendukung NEP mampu bertahan didalam tanah hingga 23 bulan setelah aplikasi. Metode penelitian dilakukan dengan cara mengambil sampel tanah dilahan tanaman padi, sayuran, dan tebu yang telah diaplikasi NEP, reisolasi NEP, identifikasi NEP, perbanyakkan NEP pada larva *G. mellonella*, dan Bioassay (Uji Patogenesitas). Hasil penelitian menunjukkan bahwa aplikasi NEP pada lahan tanaman padi, sayuran, dan tebu pada waktu lebih dari 10 bulan yang lalu masih mengandung NEP walaupun memiliki kondisi cuaca maupun iklim yang berbeda. Jenis yang berhasil diidentifikasi dari ketiga lokasi tersebut adalah *Heterorhabditis* sp., yaitu sesuai dengan jenis NEP yang telah diaplikasikan disetiap lokasi tersebut. Rata-rata populasi NEP tertinggi terdapat pada sampel tanah sayuran (kentang dan bawang daun) yang mencapai 1311,17 juvenil/4 m² dan terendah terdapat pada sampel tanah tanaman tebu yang mencapai 359 Juvenil/4 m². Patogenesitas NEP terhadap larva *G. melonella* yang tertinggi terdapat pada sampel tanah dari tanaman sayuran yang mencapai 100% setelah 16 bulan aplikasi dilapang, dan terendah terjadi pada NEP pada sampel tanah dari tanaman tebu yang mencapai 11,7% setelah 10 bulan aplikasi dilapang.

Kata Kunci : Nematoda Entomopatogen, Reisolasi, Persistensi.

RINGKASAN

Uji Persistensi Nematoda Entomopatogen Hasil Reisolasi dari Tanaman Padi, Sayuran, dan Tebu terhadap Larva *Galleria melonella* Linnaeus; Adetyas Iin Tiananda, 111510501072; 2015: 35 halaman; Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Dalam budidaya pertanian tidak pernah terlepas dari gangguan Organisme Pengganggu Tanaman (OPT) yang dapat menurunkan hasil produksi. Dalam konsep Pengendalian Hama Terpadu (PHT), Agen Pengendali Hayati memegang peranan yang penting Pemanfaatan agen hayati berupa Nematoda Entomopatogen (NEP) telah terbukti efektif dalam mengendalikan OPT pada berbagai tanaman dan tidak memiliki dampak negatif. Beberapa jenis NEP mampu bertahan hidup dalam jangka waktu yang lama pada kondisi lingkungan yang mendukung. Pada saat ini kondisi cuaca dilapang sangat sulit diprediksikan sehingga dapat berpengaruh terhadap kelangsungan hidup NEP pada suatu lahan. Oleh karena itu, diperlukan adanya suatu uji persistensi NEP yang telah di isolasi kembali (reisolasi) pada lahan pertanaman padi, sayuran, dan tebu yang pernah diaplikasikan NEP pada serangga uji berupa larva *Galleria melonella*.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengendalian Hayati, Fakultas Pertanian Universitas Jember, dalam bulan Maret sampai Mei 2015. Metode penelitian diantaranya: melakukan pengambilan sampel tanah dilahan tanaman padi, sayuran, dan tebu yang telah diapikasi NEP, reisolasi NEP dengan metode *baiting*, perhitungan populasi NEP pada masing-masing petak sampel tanah, uji patogenesis, *White Trap*, dan Uji Bioassay. Parameter penelitian meliputi: populasi NEP yang ditemukan dan mortalitas larva uji *G.melonella*. Data hasil pengamatan akan dianalisis menggunakan Analisis Varian (ANOVA). Apabila antar perlakuan terdapat perbedaan nyata, maka akan dilakukan Uji Kisaran Jarak Berganda Duncan pada taraf 5%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa NEP yang berhasil ditemukan pada sampel tanah hasil reisolasi pada lahan tanaman padi, sayuran, dan tebu adalah jenis *Heterorhabditis* sp. Hal ini sesuai dengan jenis NEP yang telah diaplikasikan

pada masing-masing lahan tersebut. Dalam hal ini, populasi NEP yang paling tinggi diperoleh dari sampel tanah sayuran (bawang daun) yang mencapai 1311,17 Juvenil/4 m². Sedangkan populasi nematoda terendah terdapat pada sampel tanah tebu yang 359,00 Juvenil/4 m². Perbedaan waktu aplikasi tidak berpengaruh terhadap tingkat persistensi NEP dilapang. Sebagai agen hayati yang telah diaplikasikan dalam jangka waktu lebih dari 10 (sepuluh) bulan dilapang, NEP yang ditemukan pada sampel tanah padi dan sayuran memiliki tingkat patogenesis yang tinggi yang mencapai 70% dan 100%, sedangkan NEP yang ditemukan pada sampel tanah tebu memiliki tingkat patogenesis yang rendah yaitu mencapai 11,7%.

SUMMARY

The Persistency Test of Re-isolated Entomopathogenic Nematode from Paddy, Vegetables, and Sugarcane on *Galeria melonella* Linnaeus Larvae; Adetyas In Tiananda, 111510501072; 2015; 35 pages; Study Program of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, University of Jember.

Agriculture cultivation is related with biotic interference which able to decrease the yield. On Integrated Pest Management (IPM) concept, biocontrol agent play important role. The use of biocontrol agent such as Entomopathogenic Nematode (EPN) was broadly known effectively controlling pest on the plant and also eco-friendly. Some EPNs are able to survive in long period with suitable environment. Recently, the climate is so unstable and unpredictable, so that can affect the life of EPN in the field. Thus, an observation and test of persistency of re-isolated EPN which has been applied on paddy, vegetables, and sugarcane field to host-target *Galeria melonella* is needed.

The research was conducted in Biological Control Laboratory, Faculty of Agriculture, University of Jember on March to May 2015. The research method was consist of: Soil sampling in the paddy, vegetables, and sugarcane field which has been applied with EPN; re-isolated the EPN using *baiting* method; EPN population calculation on each plot sample; pathogenicity test; *white trap*; and bioassay test. The variables were consist of: Number of EPN population and *G. melonella* larvae mortality. Data was recorded and analyzed using Analysis of Variants (ANOVA). Thus, the significant result was continued with Duncan Multiple Range Test with 5% error level.

The result shown that EPN which successfully identified on paddy, vegetables, and sugarcane field was *Heterohabditis* sp. This result was suitable according to the applied EPN to the field respectively. The highest amount of EPN was identified in the vegetables field that reached up to 1311,17 juvenile/4 m² compared with the lowest population in sugarcane field that only reach 359,00 juvenile/ 4 m². The application timewas not significantly affected on the persistency of EPN in the field. As the biocontrol agent which applied for 10

months in the field, EPN in the paddy and sugarcane field had high pathogenicity which reach up to 100% and 70%, respectively. Meanwhile, re-isolated EPN from sugarcane field found low on its pathogenicity with only 11,7%.



PRAKATA

Alhamdulillahirobil'alamin, Segala puji dan syukur Allah SWT atas segala petunjuk, karunia, dan jalan yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah yang berjudul “Uji Persistensi Nematoda Entomopatogen Hasil Reisolasi dari Lahan Tanaman Padi, Sayuran, dan Tebu terhadap Larva *Galleria Melonella*” dengan sebaik-baiknya. Karya Tulis Ilmiah ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan Pendidikan Strata Satu (S1) pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya pada :

1. Dr. Ir. Jani Januar, MT. selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Jember,
2. Prof. Dr. Ir. Didik Sulistyanto, M.Ag.Sc. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ir. Wagiyana, MP. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah banyak mendidik saya, dan mengajarkan berbagai hal baik berupa bimbingan, nasehat, serta petunjuk hingga terselesaikannya penulisan skripsi ini.
3. Kemenkeu yang telah mendanai riset ini yaitu melalui Riset Inovatif Produktif (RISPRO)-LPDP-Kemenkeu dengan Nomor Kontrak: PRJ-1963/LPDP/2014.
4. Ir. Sutjipto, MS. selaku Dosen Penguji I dan Ir. Soekarto, MS. selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan bimbingan serta arahnya.
5. Ir. Martinus Harsanto Pandutama, M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, nasehat, serta motivasi yang diberikan hingga akhir semester.
6. Ir. Hari Purnomo, M.Si.,Ph.D.,DIC. selaku ketua Program Studi Agroteknologi,
7. Ir. Sigit Prastowo, MP. selaku ketua Jurusan Hama Penyakit Tanaman,
8. Seluruh Staf Perpustakaan Universitas Jember yang telah menyediakan fasilitas buku-buku referensi,

9. Ibunda Suminah dan Ayahanda Imam Sodik yang tidak pernah lelah memberikan doa, semangat, nasehat, kasih sayang, dan dukungan materi serta moril sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Tidak ada kata yang bisa mengungkapkan rasa terimakasihku atas apa yang telah kalian berikan.
10. Ibu Poniti dan seluruh keluarga besar Bapak Miskan yang senantiasa memberikan doa dan semangat dalam penyelesaian skripsi ini.
11. Roji Murtadho, S.Kom., yang tak pernah lelah mencurahkan semangat dan cinta mulai dari awal hingga akhir.
12. Erin Fiqrotul Hikmah, Dadang Cahyo, Abdul Rahmad, dan sahabat-sahabat di Laboratorium Pengendalian Hayati yang telah memberikan semangat dan tenaganya dalam pelaksanaan penelitian hingga terselesaikannya skripsi ini.
13. Siti Hajar, Ngida Zulfa, Putri Septiana, Amanah Fitria, Ira Anggraeni, dan saudara-saudaraku MAPENSA (Mahasiswa Pecinta Alam Semesta) yang telah memberikan kesan terbaik selama perkuliahan, mengisi hari-hari dengan tawa dan tangis, serta pengalaman hidup dan didikan yang luar biasa.
14. Teman-teman Agroteknologi 2011 yang telah memberikan begitu banyak kenangan manis dibangku perkuliahan. Semoga nantinya kita tetap diberikan waktu untuk bertemu kembali dalam keadaan yang lebih sukses.
15. Semua pihak yang telah membantu dalam pembuatan skripsi ini.

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan dan dukungan yang telah diberikan mendapatkan balasan dari Allah SWT. Dengan segala kerendahan hati penulis menyadari bahwa kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT, penulis senantiasa mengharapkan kritik dan saran konstruktif dari pembaca. Semoga Karya Tulis Ilmiah ini dapat bermanfaat bagi pembaca yang budiman.

Jember, 29 Oktober 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vii
ABSTRAK	viii
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xi
PRAKATA	xiii
DAFTAR ISIxv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Nematoda Entomopatogen	5
2.2 Klasifikasi dan Morfologi Nematoda Entomopatogen	8
2.2.1 <i>Steinernema</i> spp	8
2.2.1 <i>Heterorhabditis</i> spp.....	9
2.3 Persistensi Nematoda Entomopatogen	10
BAB 3. METODOLOGI	12
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	12
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	12

3.3 Metode Penelitian	12
3.4 Parameter Pengamatan	16
3.5 Analisis Data	17
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1 Hasil Penelitian	18
4.2 Pembahasan	22
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	31
5.1 Kesimpulan	31
5.2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul	Halaman
1.	Rangkuman Nilai Ragam pada Pengamatan Larva Mati (Terinfeksi NEP) Hasil Baiting Masing-masing Petak di Berbagai Lahan.....	18
2.	Hasil Uji Duncan 5% pada Perbandingan Rata-rata Jumlah Populasi NEP pada Masing-masing Lahan.....	19
3.	Hasil Uji Duncan 5% pada Perbandingan Rata-rata Jumlah Juvenil Invektif Hasil White Trap.....	21
4.	Hasil Uji Duncan 5% pada Perbandingan Rata-rata Pengamatan Bioassay selama 72 jam.....	21

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul	Halaman
1.	Gambar Siklus Hidup NEP <i>Steinernema</i> spp.....	6
2.	Gambar Denah Pengambilan Sampel Tanah di Lapang pada Masing- Masing Petak.....	13
3.	Gambar Bioassay	16
4.	Gambar Rangkuman Rata-rata Jumlah Larva Mati Hasil Baiting pada Masing- masing Lahan.....	18
5.	Perbandingan Rata-rata Hasil Patogenesitas NEP terhadap 5 Larva <i>Galleria melonella</i> Selama 24 dan 48 Jam.....	20
6.	Larva <i>T.molitor</i> yang Terserang NEP dari Lahan Tanaman Padi, Sayuran, dan Tebu.....	23
7.	NEP pada Sampel Tanah Tanaman Padi, Sayuran, dan Tebu	25
8.	Juvenil Invektif pada Sampel TanahTanaman Padi, Sayuran, dan Tebu.....	28
9.	hasil Bioassay NEP sampel tanah tanaman.....	29

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul	Halaman
1.	Hasil Baiting Sampel Tanah.....	36
2.	Hasil Jumlah Populasi NEP/Petak.....	45
3.	Hasil Pengamatan Patogenesitas NEP terhadap 5 Larva <i>G. melonella</i>	47
4.	Hasil Pengamatan <i>White Trap</i>	50
5.	Hasil Uji Bioassay.....	51
6.	Data Geografis, Iklim, dan Curah Hujan.....	54
7.	Foto-foto Kegiatan Penelitian.....	55

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dalam suatu budidaya tanaman tentunya tidak pernah terlepas dari gangguan Organisme Pengganggu Tumbuhan (OPT) yang dapat menyebabkan menurunnya kualitas maupun kuantitas dari produk yang akan dihasilkan, sehingga perlu adanya suatu pengendalian untuk mengurangi serangan tersebut. Selama ini, pengendalian hama masih sering bertumpu pada penggunaan pestisida kimia. Menurut Forum Hijau Indonesia (2012), hasil kajian dari Field Survey Indonesia tahun 2011 pada 306 petani di Klaten rata-rata menggunakan pestisida 5-7 kali per musim tanam. Suatu jumlah yang tinggi pada tanaman padi, hal ini didukung oleh peredaran pestisida yang semakin luas di Indonesia. Menurut Portal Nasional RI (2013) saat ini jumlah pestisida yang terdaftar untuk pertanian mencapai 2.628 formulasi. Berdasarkan data Komisi Pestisida di bawah Kementerian Pertanian sudah terdaftar fungisida sebanyak 350 merek, herbisida sebanyak 600 merek dan insektisida sebanyak 800 merek, dengan izin tetap. Jumlah tersebut belum termasuk produk yang ilegal.

Penggunaan pestisida kimia secara berlebih pada tanaman dapat menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan dan juga kesehatan manusia. Dalam hal ini, dampak negatif yang dimaksud antara lain kasus keracunan pada manusia, ternak, polusi lingkungan, resistensi hama dan sebagainya (Yuantari, 2009). Munculnya konsep PHT sejak tahun 1976 merupakan suatu solusi dalam berbudidaya tanaman yang lebih ramah lingkungan. Menurut Efendi (2009) pendekatan PHT tersebut mendorong berkembangnya teknologi pengendalian alternatif dengan cara memanfaatkan musuh alami, pestisida hayati, dan feromon.

Dalam konsep Pengendalian Hama Terpadu (PHT), pengendalian hayati memegang peranan yang sangat penting. Saat ini, peningkatan pemanfaatan sarana produksi pertanian yang menggunakan pupuk organik/hayati serta pemanfaatan Agen Pengendali Hayati (APH) sebagai pengganti pestisida kimia yang dapat mengendalikan serangan OPT mulai mendapat perhatian seiring dengan meningkatnya kesadaran masyarakat akan bahaya yang ditimbulkan oleh

pestisida kimia (Saraswati dkk., 1998). Menurut Sucipto (2008) beberapa mikrobia yang dapat digunakan sebagai agen hayati untuk mengendalikan serangan OPT di antaranya nematoda, bakteri, virus, maupun jamur entomopatogen, yang mana diantara beberapa agen hayati tersebut, penggunaan Nematoda Entomopatogen (NEP) dilapang masih tergolong baru. Dari 40 famili NEP yang berasosiasi dengan serangga, famili Steinernematidae dan Heterorhabditidae merupakan famili yang berpotensi untuk pengendalian hayati serangga (Ricci *et al.* 1996).

Indonesia memiliki potensi yang besar dalam mengembangkan agen hayati, terutama NEP tersebut. Hal ini dikarenakan biodeversity atau tingkat keragaman mengenai agen hayati tersebut sangat tinggi (Sulistyanto, 2009). Pemanfaatan agen hayati berupa NEP telah terbukti efektif dalam mengendalikan OPT pada berbagai tanaman, baik tanaman pangan, sayuran, perkebunan, maupun rumput pada lapangan golf (Prasetyo, 2012). Menurut Sulistyanto (1998), pemanfaatan NEP memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan agen hayati yang lain, diantaranya tidak berdampak buruk pada OPT bukan sasaran, tidak menyebabkan residu pada lingkungan, bersifat sinergis dengan beberapa teknik pengendalian yang lain, mudah didapatkan, mampu bertahan hidup dalam kurun waktu yang lama di dalam tanah, dan dapat berkembangbiak dalam tubuh serangga, serta dapat di gunakan kembali untuk mengendalikan OPT lainnya.

Di dalam tanah, nematoda hidup dengan cara memanfaatkan bahan-bahan organik atau serangga maupun organisme lain sebagai makanannya (Fadhilah, 2011). Menurut Kaya dan Gaugler (1993) NEP dapat bertahan didalam tanah dengan cara inaktif dalam waktu tertentu dan melakukan perpindahan ke tempat lain apabila tidak lagi terdapat nutrisi yang cukup di tempat tersebut yang mana perpindahannya dapat dilakukan secara pasif, yaitu dengan bantuan aliran air, angin, maupun melalui alat-alat pertanian. Gerakan NEP sangat lambat sehingga memerlukan waktu yang cukup lama untuk melakukan perpindahan.

Persistensi nematoda entomopatogen merupakan suatu kemampuan NEP untuk bertahan hidup (persisten) dan masih mampu menyerang serta menimbulkan kematian pada serangga sasaran dalam kurun waktu

tertentu (Sucipto, 2008). Menurut Susurluk dan Ehler (2008), persistensi nematoda dalam tanah dapat mencapai 23 bulan setelah diaplikasi pada lahan pertanaman kacang tanah. Persistensi tersebut di pengaruhi oleh faktor biotik maupun abiotik (Sucipto, 2008). Selain itu persistensi juga di pengaruhi oleh kemampuan nematoda untuk menyebar, mempertahankan diri, menemukan inang, dan bereproduksi di dalam tanah tergantung pada tipe, kelembaban, dan temperatur tanah (Kaya dan Gaugler, 1993). Kondisi cuaca di lapang sangat sulit di prediksi sehingga berpengaruh terhadap kelangsungan hidup NEP di suatu lahan. Diperlukan adanya suatu uji persistensi NEP yang telah di isolasi kembali (reisolasi) pada lahan yang telah diaplikasi dengan NEP, diantaranya lahan pertanaman padi, sayuran, dan tebu pada serangga uji berupa larva *Galleria melonella*.

1.2 Rumusan Masalah

Penggunaan Agen Pengendali Hayati berupa Nematoda Entomopatogen (NEP) telah terbukti efektif untuk mengendalikan hama pada tanaman padi, sayuran, dan tebu. Namun, pada saat ini kondisi cuaca dilapang sulit untuk diprediksi dan hal tersebut berpengaruh terhadap tingkat persistensi NEP dilapang. Reisolasi NEP dimaksudkan untuk mengetahui kemampuan NEP dilahan yang telah diaplikasikan lebih dari 10 bulan dilapang dan juga efektivitas Nematoda Entomopatogen hasil reisolasi dari lahan tersebut terhadap larva *G.melonella*.

1.3 Tujuan Penelitian

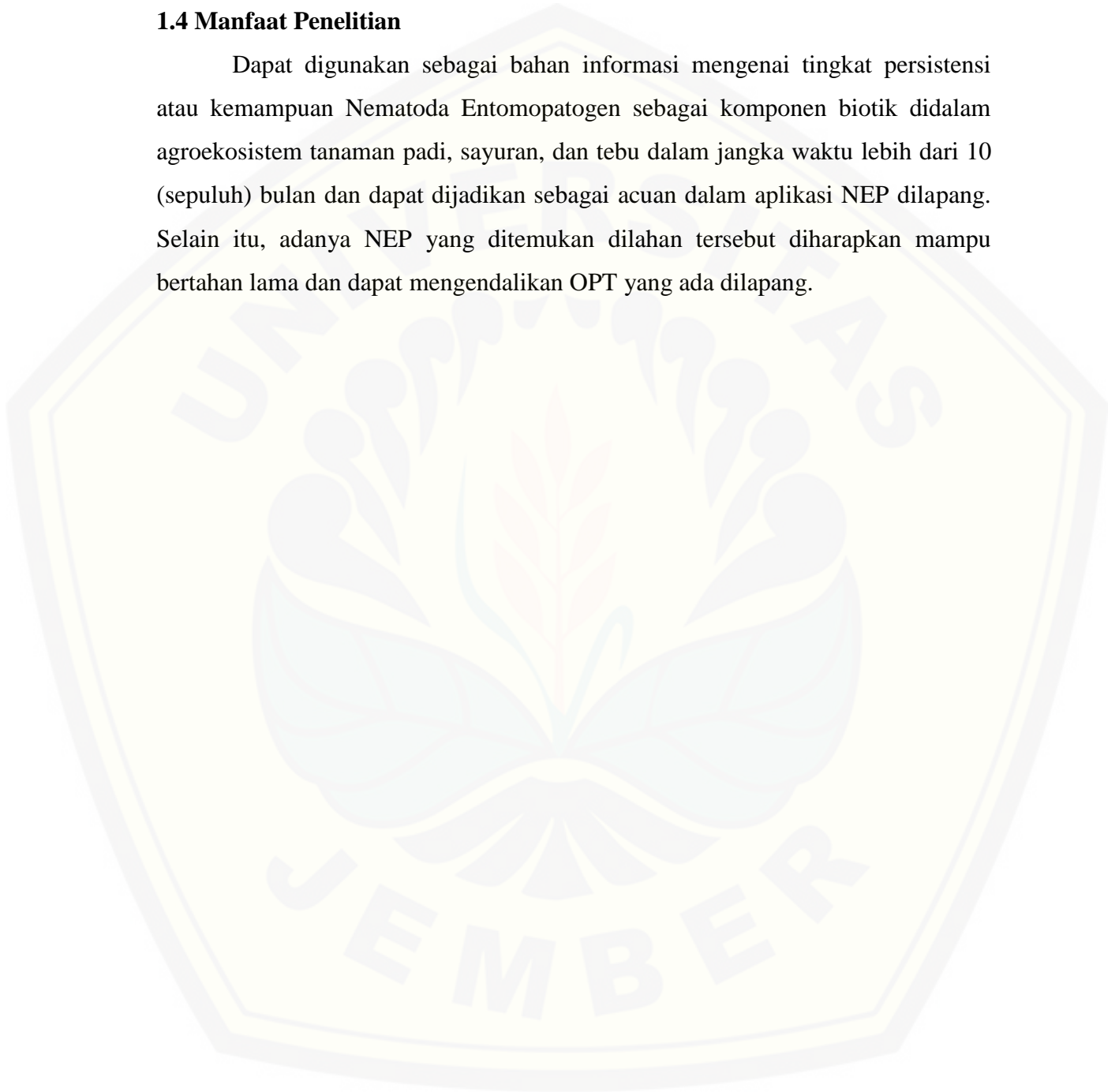
Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini yaitu:

1. Untuk mengetahui persistensi Nematoda Entomopatogen dilahan tanaman padi, sayuran, dan tebu yang telah diaplikasi NEP lebih dari 10 bulan dilapang.

2. Untuk mengetahui patogenesitas NEP hasil reisolasi dari lahan tanaman padi, sayuran, dan tebu terhadap larva *G.melonella*..

1.4 Manfaat Penelitian

Dapat digunakan sebagai bahan informasi mengenai tingkat persistensi atau kemampuan Nematoda Entomopatogen sebagai komponen biotik didalam agroekosistem tanaman padi, sayuran, dan tebu dalam jangka waktu lebih dari 10 (sepuluh) bulan dan dapat dijadikan sebagai acuan dalam aplikasi NEP dilapang. Selain itu, adanya NEP yang ditemukan dilahan tersebut diharapkan mampu bertahan lama dan dapat mengendalikan OPT yang ada dilapang.



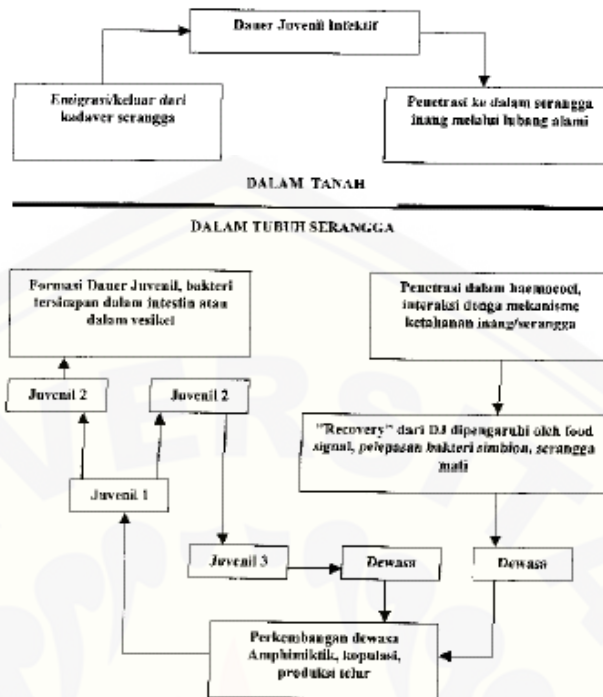
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Nematoda Entomopatogen

Nematoda Entomopatogen (NEP) pertama kali ditemukan oleh Gotthold Steiner di Jerman pada tahun 1923 yang diberi nama *Steinernema kraussei* (Hakim, 2012). Menurut Sulistyanto (1998), NEP memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan agen hayati lainnya, diantaranya tidak menimbulkan dampak buruk terhadap hama yang bukan sasaran, tidak meninggalkan residu terhadap lingkungan, sinergis dengan beberapa agen hayati lainnya, mudah di peroleh, murah, mampu bertahan lama dalam tanah, dan dapat berkembangbiak dalam tubuh serangga, serta dapat digunakan kembali untuk mengendalikan hama pada tumbuhan.

Nematoda yang sering diaplikasikan sebagai biopestisida adalah dari golongan *Steinernema* sp. dan *Heterorhabditis* sp. Kedua golongan NEP tersebut telah banyak terbukti efektif dalam mengendalikan OPT di lapang, terutama hama yang ada di dalam tanah (Kaya, 1990). Nematoda umumnya mempunyai habitat di dalam tanah, karena saat berada di dalam tanah nematoda akan terlindungi dari sinar matahari yang dapat menghambat perkembangbiakannya. Didalam tanah, nematoda hidup dengan cara memanfaatkan bahan-bahan organik atau serangga maupun organisme lain sebagai makanannya (Sucipto, 2008).

Menurut Kaya dan Gaugler (1993) beberapa kelebihan yang dimiliki famili Steinernematidae dan Heterorhabditidae adalah kisaran inang yang luas mempunyai reseptor kimia dan mobile, tidak berbahaya bagi mamalia, mempunyai komponen virulensi yang tinggi terhadap inang, mudah diperbanyak baik secara *in vivo* maupun *in vitro*, serta kompatibel dengan teknik pengendalian yang lain. Weiser (1991) juga mengemukakan bahwa Steinernematidae dan Heterorhabditidae merupakan parasit yang potensial bagi serangga-serangga yang hidup di dalam tanah atau di atas permukaan tanah. Adapun siklus hidup NEP menurut Ehlers dan Peters (1995) adalah sebagai berikut:



Gambar 2.1 Siklus Hidup NEP *Steinernema* sp. (Ehlers dan Peters, 1995).

Secara umum perkembangbiakan nematoda sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti keadaan suhu dan ketersediaan makanan. Suhu dan makanan yang kurang mendukung akan mempercepat berlangsungnya fase pada masing-masing stadia. Stadia Juvenil Infektif (JI) juga dapat terbentuk apabila nematoda mengalami kekurangan makanan. Di dalam kondisi ini nematoda dapat terbentuk tanpa melalui stadia juvenil 1 atau 2. Setelah stadia juvenil 4 terlewati, maka nematoda akan berkembang menjadi nematoda dewasa jantan atau betina. Pada fase ini nematoda akan sangat memerlukan inang baru sebagai pemenuhan kebutuhan makanannya (Ehlers dan Peters, 1995). Nematoda akan memproduksi satu sampai tiga generasi di dalam inang yang sama dan memproduksi generasi baru dalam waktu 7-10 hari. Setelah nutrisi habis JI akan keluar dari tubuh inang, dalam jumlah ratusan sampai ribuan untuk mencari inang yang baru. Biasanya JI *Steinernematidae* keluar dari tubuh inangnya dalam 8-10 hari setelah terinfeksi dan JI *Heterorhabditidae* keluar setelah 14-15 hari (Poinar, 1990).

Nematoda dapat bersifat entomopatogen karena adanya bakteri yang bersifat simbiosis mutualisme di dalam tubuh nematoda tersebut. Menurut Kaya

dan Gaugler (1993) nematoda *Steinernema* sp. ini bersimbiosis dengan bakteri dari genus *Xenorhabdus*. Sedangkan menurut Wiratno dan Rohimatun (2012), nematoda *Heterorhabditis* sp. hidup bersimbiose mutualisme dengan bakteri dari famili Enterobacteriaceae dan membawa satu spesies bakteri simbion yaitu *Photorhabdus luminescens*. Aktivitas enzimatik kedua bakteri itulah yang nantinya dapat menyebabkan hancurnya jaringan tubuh serangga inang hingga menjadi lunak, berair, dan hancur (Sucipto, 2008). Chaerani (1996) menyatakan bahwa serangga yang telah terbunuh oleh bakteri simbion *P. luminescens* akan dimanfaatkan nematoda sebagai makanan untuk hidup dan tempat untuk berkembangbiak serta menelan kembali sel-sel bakteri tersebut.

Apabila pH dalam tubuh serangga inang tidak mendukung perkembangan bakteri simbion NEP, maka pertumbuhan bakteri simbion dalam tubuh NEP akan terhambat. Terhambatnya bakteri simbion tersebut akan dapat memperlambat kematian serangga inang dan menghambat perkembangan NEP, karena tanpa adanya bakteri simbion tersebut, NEP tidak dapat berkembang dengan baik, begitu juga sebaliknya (Ehlers dan Peters, 1995).

Gejala yang muncul akibat serangan dari NEP adalah terjadinya perubahan warna tubuh inang, tubuh menjadi lembek, dan apabila tubuh di belah maka konstitusi jaringan tubuh inang menjadi lunak berair. Gejala serangan nematoda hanya muncul pada fase primer bakteri, yaitu pada saat awal nematoda masuk dalam tubuh inang dan mengeluarkan bakteri simbion dalam tubuh serangga hingga dua hari setelah terjadinya penetrasi (Simoes dan Rosa, 1996).

Untuk mendapatkan NEP isolat lokal diperlukan kegiatan eksplorasi yang dilanjutkan dengan isolasi dan identifikasi. Stadia infeksi juvenil (JI) mudah diisolasi dari tanah dengan cara mengumpulkan larva serangga, yang mana larva yang sering digunakan adalah larva dari *Galleria melonella* dan larva *Tenebrio molitor*. Dalam hal ini, telah banyak peneliti yang berhasil mengisolasi NEP dari berbagai tempat di dunia dengan menggunakan larva *G. melonella* dan *T. molitor* tersebut (Afifah dkk, 2013). Kegiatan isolasi NEP di laboratorium biasanya dilakukan untuk melakukan perbanyakan, melakukan pengujian patogenesis, pengujian persistensi, dan Bioassay (Ehler dan Peters 1995).

2.2 Klasifikasi dan Morfologi Nematoda Entomopatogen

2.2.1 *Steinernema* sp.

Morfologi pada *Steinernema* sp. jantan yaitu mempunyai panjang tubuh 1000-1900 μm , lebar tubuh 90-200 μm , panjang stoma 4,5-7 μm , lebar stoma 4-5 μm , panjang ekor 19-27 μm , panjang spikula 72-89 μm , gubernakulum 57-70 μm , panjang mucron 2,8-4,5 μm . Sedangkan morfologi dari *Steinernema* sp. betina, yaitu memiliki panjang tubuh 3020-3972 μm , lebar 153-192 μm , panjang stoma 7-12 μm , lebar stoma 5,0-8,5 μm , panjang ekor 30-47 μm , lebar vulva 49-54 μm . Pada stadia Juvenil Infektif (JI) panjang tubuh nematoda mencapai 500-570 μm , lebar 15-25 μm , panjang ekor 47-54 μm (Stock, 1993). *Steinernema* sp. dewasa mampu menghasilkan 1000 telur dalam satu periode (Weiser, 1991).

Nematoda *Steinernema* sp. bersifat amphigonous yaitu mempunyai individu jantan dan betina serta dapat kawin untuk menghasilkan generasi baru. Telur dapat diletakkan didalam lingkungan atau di dalam tubuh serangga inang. Sebelum menjadi dewasa, *Steinernema* sp. akan mengalami empat kali ganti kulit (stadia Juvenil 1, 2, 3, dan 4), baik yang terjadi di dalam telur, dalam lingkungan maupun di dalam tubuh inangnya. Stadia Juvenil 3 adalah stadia yang paling sering digunakan untuk mengendalikan serangga hama, dan dapat diisolasi dari semua jenis tanah di lingkungan sekitar larva serangga hama (Kaya, 1990). Menurut Bauer *et al.* (1995), nematoda dari spesies *Steinernema* sp. memiliki potensi yang besar untuk mengendalikan serangga hama dari beberapa ordo serangga, diantaranya ordo Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Orthoptera, dan Isoptera yang hidup di permukaan tanah maupun di dalam tanah.

2.2.2 *Heterorhabditis* sp.

Heterorhabditis sp. mempunyai bentuk tubuh silindris, dengan panjang tubuh betina mencapai 479-700 μm , tubuh jantan mencapai 479-685 μm , sedangkan tubuh Juvenil Infektif (JI) mencapai 479 - 573 μm . Tubuh nematoda simentris bilateral, tidak bersegmen, mempunyai kutikula sehingga tubuhnya

licin, gerakannya fleksibel dan tidak ada gerakan kontraktile memanjang. Pada nematoda *Heterorhabditis* sp. terdapat alat pencernaan berupa mulut, esofagus, intestinum, dan rektum (Ehlers dan Peters, 1995).

Dalam perkembangannya, *Heterorhabditis* sp. juga mempunyai siklus hidup yang dimulai dari fase telur, juvenil, dan dewasa, yang mana pada fase juvenil nematoda mengalami 4 kali pergantian kulit (Juvenil 1, 2, 3, dan 4). Pada stadia J2 nematoda dapat menjalani siklus reproduktif kembali atau memasuki siklus infeksi, hal ini bergantung pada kepadatan populasi dan nutrisi inang. Jika nutrisi inang mencukupi dan kepadatan populasi rendah maka J2 akan berkembang menjadi J3, dan memasuki siklus reproduktif. Sebaliknya bila kepadatan populasi tinggi dan nutrisi hanya sedikit, maka J2 akan berkembang menjadi J3 khusus yang bersifat infeksi yang mana stadia ini tidak melakukan aktivitas makan namun mampu hidup di luar tubuh inang serangga (Ehlers dan Peters, 1995). Menurut Sucipto (2008), *Heterorhabditis* sp. mampu bertahan hidup meskipun berada diluar inang (tidak makan) dalam beberapa periode yang lama, hal ini dikarenakan stadia juvenil infeksi dari nematoda memiliki cadangan makanan berupa energi karbohidrat, dalam hal ini yang terpenting adalah kondisi lingkungan yang mendukung (oksigen yang cukup, kelembaban dan temperatur tanah yang sesuai).

2.3 Persistensi Nematoda Entomopatogen

Persistensi NEP dalam tanah merupakan suatu kemampuan NEP untuk bertahan hidup (persisten) di dalam tanah serta masih mampu menyerang dan menimbulkan kematian pada serangga sasaran yang di pengaruhi oleh beberapa faktor (Sucipto, 2008). Faktor-faktor yang dimaksud tersebut di antaranya faktor biotik dan abiotik, yang mana kedua faktor tersebut memiliki pengaruh yang tinggi terhadap persistensi nematoda dalam mengendalikan serangga hama yang hidup di dalam tanah, daun, maupun habitat tersembunyi (Kaya, 1990). Persistensi juga dipengaruhi oleh kemampuan NEP dalam mempertahankan diri, menemukan inang, dan bereproduksi dalam tanah. Sedangkan, ke-4 hal tersebut dipengaruhi oleh tipe tanah dan kelembaban atau temperatur tanah. Hal

ini menjadikan NEP sangat berperan penting dalam proses pengendalian hayati (Sucipto, 2008).

Menurut Kaya (1990), faktor biotik yang dapat mempengaruhi persistensi NEP adalah ketersediaan makanan dan kemampuan untuk menemukan inang di dalam tanah. Sedangkan faktor abiotik yang berpengaruh terhadap persistensi NEP di dalam tanah di antaranya oksigen, pH tanah, kelembaban tanah, dan temperatur tanah. Faktor abiotik dan biotik juga sangat mempengaruhi efikasi dan persistensi dari NEP untuk mengendalikan serangga hama yang hidup di lingkungan tanah, permukaan daun, maupun habitat tersembunyi. Persistensi pada stadia JI yang digunakan sangat dipengaruhi faktor instrinsik (tingkah laku, fisiologi, karakteristik genetik) dan ekstrinsik yang meliputi faktor biotik dan abiotik (Hakim, 2012).

Suatu metode yang dapat digunakan untuk mengetahui persistensi NEP di dalam tanah adalah menggunakan metode perangkap atau *Baiting*. Masuknya NEP ke dalam tubuh serangga uji dapat ditandai dengan adanya kematian pada serangga uji. Kaya (1996) menyatakan bahwa hanya fase infeksi juvenil yang dapat bertahan hidup di luar inang. Dalam fase ini tidak makan dan bergantung sepenuhnya pada cadangan internal untuk sumber energinya. NEP dapat bertahan hidup (persisten) dalam lingkungan tanah yang ekstrim, hal ini disebabkan NEP memiliki kutikula yang tebal dan lubang alaminya tertutup (Campbell dan Gaugler, 1993). Pada stadia Juvenil 3 ini memiliki tingkat patogenesis tertinggi (Kaya, 1996).

Tingkat persistensi nematoda dapat diketahui dari mortalitas serangga inang yang di uji di dalam sampel tanah yang telah di ambil dari lapang yang mengandung nematoda. Namun, apabila di dalam sampel tanah mengandung NEP tetapi serangga uji tidak mati, maka nematoda tersebut sudah lemah atau mati akibat pengaruh lingkungan, misalnya kondisi tanah yang terlalu kering atau nematoda terlalu lama tidak menemukan makanan sehingga patogenesisnya berkurang (Sucipto, 2008). Tingkat patogenesis NEP juga dipengaruhi oleh efektivitas bakteri dalam membunuh serangga yang bergantung pada spesies, tingkat kekebalan, fisiologi serangga inang, dan spesies bakteri yang bersimbiosis

pada NEP tersebut (Wiratno dan Rohimatun, 2012). Menurut Susurluk dan Ehlers (2008), nematoda jenis *Heterorhabditis bacteriophora* mampu bertahan dan persisten didalam tanah hingga lebih dari 23 bulan setelah aplikasi dalam kondisi lingkungan yang sesuai.



BAB 3. METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian yang berjudul “Uji Persistensi NEP Hasil Reisolasi Dari Lahan Tanaman Padi, Sayuran, Dan Tebu Terhadap Larva *Galleria melonella* Linnaeus” dilaksanakan pada bulan Maret sampai Mei 2015, bertempat di Laboratorium Pengendalian Hayati, Jurusan Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: sampel tanah yang di ambil dari lahan tanaman padidi kecamatan Mayang-Jember (10 bulan setelah aplikasi), sampel tanah yang di ambil dari lahan tanaman sayuran (kentang dan bawang daun) di kecamatan Sukapura-Probolinggo (16 bulan setelah aplikasi); sampel tanah yang di ambil dari lahan tanaman tebu di kecamatan Tanaman-Bondowoso (12 bulan setelah aplikasi), larva *Tenebrio molitor*, larva *Galleria melonella*, aquades, larutan Ringer, pasir halus steril.

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: cangkul/cetok, gelas plastik volume 500 ml, kain kasa, cawan Petri, pinset, mikropipet 1000 μ , *beaker glass*, tabung reaksi, cawan penghitung (*counting dish*), *sentrifuge*, mikroskop cahaya, kotak bioassay, kamera.

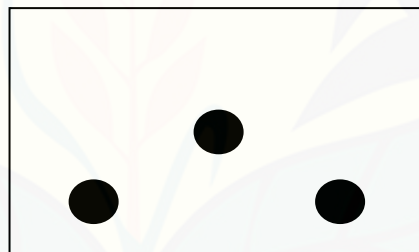
3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah dilakukan pada lahan pertanaman padi di Kecamatan Mayang (Jember), lahan pertanaman sayuran (kentang dan bawang daun) di Kecamatan Ngadisari (Probolinggo), dan lahan pertanaman tebu di

Kecamatan Tamanan (Bondowoso) sesuai dengan denah pengaplikasian NEP yang telah dilakukan.

Teknik pengambilan sampel tanah dilakukan pada masing-masing blok tanaman padi, sayuran, dan tebu dengan cara mengambil 6 petak lahan sesuai dengan denah aplikasi yang telah dilakukan sebelumnya. Pada setiap petak diambil 5 unit sampel tanah secara diagonal (1 titik pusat dan 4 titik diagonal) (Puslit Tanah dan Agroklimat, 2000). Tanah pada masing-masing unit sampel diambil sebanyak 300 gram pada kedalaman 5 sampai 10 cm dari permukaan tanah dengan menggunakan cangkul/cetok didaerah yang bervegetasi rimbun. Kemudian masing-masing sampel tanah tersebut dimasukkan kedalam wadah plastik yang berbeda, sehingga dalam 1 petak ada 5 unit sampel tanah. Pada masing-masing lahan diambil sebanyak 6 petak (30 unit sampel). Berikut merupakan gambar teknik pengambilan sampel tanah di lapang sebagai tahap persiapan:



Gambar 3.1 Denah pengambilan sampel tanah di lapang pada masing-masing lahan pertanaman.

3.3.2 Reisolasi Nematoda Entomopatogen

Reisolasi NEP dilakukan dengan metode *Baiting* yaitu dengan cara:

1. Sampel tanah masing-masing unit sampel dipindahkan ke dalam gelas plastik volume 500 ml, kurang lebih 3/4 dari ukuran gelas (300 gram) dalam kondisi lembab dan disimpan ditempat yang gelap.
2. Larva *T. molitor* dibungkus menggunakan kain kasa dan dimasukkan kedalam gelas yang berisi tanah (masing-masing sebanyak 10 ekor), kemudian gelas plastik diisi dengan menggunakan sampel tanah yang sama hingga

memenuhi gelas dan ditutup dengan menggunakan kertas dan karet gelang. Gelas yang telah berisi larva diinkubasi selama 7-10 hari.

3. Untuk menjaga kelembaban tanah didalam gelas dilakukan penyemprotan dengan air setiap hari. Kemudian kain kasa yang berisi larva *T. molitor* pada gelas dibuka setelah 7-10 hari (setelah menunjukkan gejala). Larva yang mati (terinfeksi oleh NEP) akan menunjukkan beberapa gejala diantaranya mengembung, tubuh menjadi lembek, jaringan tubuh inang menjadi lunak berair, dan berubah warna (apabila warna tubuh larva berubah menjadi coklat kehitaman maka di pastikan bahwa larva tersebut terinfeksi oleh *Steinernema* spp, namun apabila ulat berwarna merah atau merah tua maka larva tersebut terinfeksi oleh *Heterorhabditis* spp), sedangkan serangga yang tidak terinfeksi akan kempes dan berwarna hitam (Simoes *et al.*, 1996).

3.3.3 Identifikasi Nematoda Entomopatogen

Identifikasi NEP dilakukan dengan cara:

1. Larva *T. molitor* hasil reisolasi yang telah terinfeksi NEP diambil dan diamati berdasarkan masing-masing petak.
2. Identifikasi NEP dilakukan secara visual yaitu dengan cara mengamati gejala yang nampak pada tubuh larva *T. molitor* yang meliputi kondisi tubuh larva dan terjadinya perubahan warna pada tubuh larva (apabila warna tubuh larva berubah menjadi coklat kehitaman maka di pastikan bahwa larva tersebut terinfeksi oleh *Steinernema* spp, namun apabila ulat berwarna merah atau merah tua maka larva tersebut terinfeksi oleh *Heterorhabditis* spp).
3. Larva yang terinfeksi oleh *Steinernema* spp dan larva yang terinfeksi oleh *Heterorhabditis* spp dipisah (tetap dalam 1 petak) berdasarkan hasil pengamatan secara visual.

3.3.4 Uji Persistensi Nematoda Entomopatogen

Uji persistensi dilakukan dengan cara:

1. Tubuh larva *T. molitor* yang terinfeksi oleh NEP dibersihkan dari kotoran dan partikel-partikel tanah dengan menggunakan aquades dan di sterilisasi

dengan menggunakan larutan Ringers. Kemudian larva dibedah didalam cawan Petri yang berisi aquades 10 ml dengan menggunakan pinset dan gunting (masing-masing unit sampel). Dalam hal ini, uji persistensi dilakukan untuk mengetahui jumlah NEP yang masih aktif/petak.

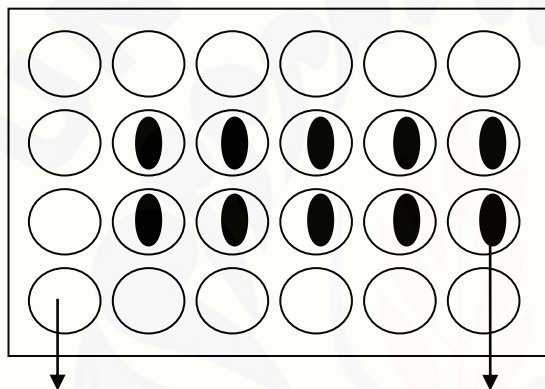
2. Permukaan kulit larva yang telah dibersihkan diangkat dan dipisahkan, kemudian NEP dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya sehingga dapat diketahui populasi NEP yang masih aktif per petaknya.
3. Setelah dihitung, suspensi yang berisi NEP dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian di sentrifuge pada kecepatan 2000 rpm selama 2 menit (Susurluk dan Ehlers, 2008).
4. Hasil suspensi NEP diambil menggunakan mikro pipet, kemudian di inokulasikan pada 5 ekor larva *G. melonella* dan diinkubasi selama 24-48 jam.
5. Dilakukan pengamatan patogenesis Larva *G. melonella* selama 24 jam dan 48 jam. Setelah 48 jam, larva yang mati (terinfeksi oleh NEP) langsung di *White Trap* untuk memperoleh Juvenil Invektif (JI) dari NEP tersebut. Hal ini dilakukan karena pada saat pembedahan larva *T. molitor*, NEP yang dihasilkan adalah dari berbagai stadia (Juvenil 1, Juvenil 2, Juvenil 3, dan dewasa), sedangkan stadia yang dibutuhkan untuk uji patogenesis adalah stadia yang paling efektif dalam menyerang larva yaitu stadia J3 (Juvenil Infektif).
6. Dilakukan perhitungan jumlah JI/ml hasil *White Trap* pada masing-masing sampel yang telah diisolasi.

3.3.5 Uji Bioassay NEP Hasil Reisolasi

Bioassay dilakukan untuk mengetahui patogenesis dari NEP hasil reisolasi dari masing-masing lahan pertanaman. Pengujian ini dilakukan pada serangga *Galleria melonella* dengan cara sebagai berikut:

1. Kotak Bioassay yang berukuran P= 12 cm, L= 8 cm, berisi 24 lubang yang masing-masing mempunyai diameter 1,5 cm dan tinggi 2 cm disiapkan dan dibersihkan terlebih dahulu.

2. Pada 10 lubang kotak Bioassay diisi dengan menggunakan pasir halus yang telah disterilkan pada suhu 121°C selama 35 menit dan tekan 1 atm (3/4 dari tinggi lubang).
3. Pada masing-masing lubang yang telah berisi pasir halus steril dimasukkan 1 larva *G. melonella* dan diinokulasikan 100 JI/ml NEP yang telah didapatkan dari hasil Baiting sebelumnya. Kemudian kotak diisi dengan pasir steril kembali hingga memenuhi lubang kotak Bioassay.
4. Kotak Bioassay diinkubasi selama 3 hari. Pengamatan dan perhitungan mortalitas larva *G. melonella* (%) dilakukan pada 24 jam, 48 jam, dan 72 jam setelah inokulasi NEP.



Lubang Bioassay

Larva *G. melonella*

Gambar 3.2 Uji Bioassay NEP hasil reisolasi terhadap larva *G. melonella*.

3.4 Parameter Pengamatan

Variabel yang diamati dalam penelitian ini antara lain:

3.4.1 Populasi Nematoda Entomopatogen yang masih aktif/petak

Populasi NEP yang masih aktif dihitung menggunakan *counting dish*, dengan cara menjumlahkan populasi NEP yang ditemukan pada masing-masing unit sampel.

3.4.2 Mortalitas larva *G. melonella*

Jumlah larva *G. melonella* yang digunakan dalam uji Bioassay sebanyak 10 ekor. Mortalitas hama dihitung berdasarkan jumlah larva *G. melonella* yang hidup atau berkembang dan jumlah larva yang mati. Adapun rumus perhitungan mortalitas larva *G. melonella* adalah sebagai berikut:

$$M = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Keterangan:

M = Mortalitas.

a = Jumlah larva *G. melonella* yang mati.

b = Jumlah total larva *G. melonella*.

3.6 Analisis Data

Data hasil pengamatan akan dianalisis menggunakan Analisis Varian (ANOVA). Apabila antar perlakuan terdapat perbedaan nyata (signifikan) maka akan dilakukan Uji Kisaran Jarak Berganda Duncan (UJD) pada taraf 5%.