

THE COMPARASION ISOLATION TECHNICAL OF NEMATODE BY BARLESS TULGREEN, EXTRACTION OF SOIL AND ROOTS IN SUBJECT INVERTEBRATE OF SYSTEMATIC PRACTISE

Dwi Setyo Astuti

Lecture in Biology Education Department, Faculty Of Training And Education
Muhammadiyah University Of Surakarta
dsa122@ums.ac.id

Abstract

The purpose of the research were to know the most effective isolatation technical of soil Nematode in courses of invertebrate systematic practise. The research used experimental methode descriptive qualitative, the sample are soil of chili, cabbage, and Collards from Mathesih. Design of Experiment use the Completely Randomized Design, 3 x 3 factorial with 3 replication. The results showed that the Nematode were most commonly found by isolatation technical of soil, the total number were 12 Nematodes. The second rank were technical by barless tulgreen, the total number were 8 Nematodes. The technical by extraction of root were got 4 Nematodes.

Key Words : the isolatation technical of Barless Tulgreen, the isolatation technical of soil, the isolatation technical of roots.

I. PENDAHULUAN

Praktikum Sistematika Invertebrata merupakan salah satu mata praktikum wajib yang ditempuh mahasiswa pendidikan Biologi semester 5. Matapraktikum ini mengkaji tentang tatacara penamaan dan pengklasifikasian spesies golongan invertebrata. Pada salah satu sub bab materi dalam praktikum adalah melakukan kegiatan identifikasi beberapa sesies dari Nematoda tanah.

Nematoda sebagai salah satu kelas dari Filum Nematelminthes memiliki persebaran yang sangat luas. Nematoda parasit pada manusia, vertebrata, dan tumbuhan. Nematoda yang menyerang tanaman dapat hidup di bagian dari tanaman seperti akar, batang, daun, buah, jaringan tumbuhan, bahkan di tanah sekitar tanaman tersebut. Untuk mendapatkan spesies dari kelas Nematoda tanah dapat dilakukan dengan isolasi dari tanah sekitar tanaman maupun dari bagian tanaman tersebut. Adapun metode yang dapat digunakan diantaranya ialah metode Barleens tulgreen, Baermann asli, dan Baermann termodifikasi.

Beberapa tahun isolasi Nematoda pada praktikum Sistematika Invertebrata dilakukan menggunakan metode Barless Tulgreen. Teknik isolasi dengan menggunakan media tanah ini jarang sekali berhasil. Oleh karena itu perlu dicoba beberapa teknik lain tentang isolasi Nematoda tanah dengan mempertimnangkan faktor efisiensi dalam pelaksanaannya.

II. KAJIAN LITERATUR

Menurut Sonja v.t lumowa 2014, Nematoda memiliki kutikula tubuh yang transparan, mempunyai mulut dan lubang ekskresi, alat reproduksi jantan dengan testis dan betina denga ovarium. Umur cacing pada umumnya mencapai 10 bulan. Nematoda dapat dijumpai di darat, air laut, air tawar, dari daerah kutub hingga tropis. Hidupnya ada yang bebas, namun ada pula yang bersifat parasit baik pada hewan maupun tumbuhan. Cacing ini tidak memiliki jantung tetapi tubuhnya mengandung cairan semacam darah yang dapat merembes ke bagian tubuh akibat kontraksi tubuh. Bentuk tubuhnya gilig panjang dengan simetri bilateral. Tubuhnya tidak bersilia dan tidak bersegmen.

Nematoda adalah binatang yang bergerak aktif, lentur, dan berbentuk seperti pipa, hidup pada permukaan yang lembab, pada tanah tanaman hospes tersebut. Nematoda tidak dapat memaksakan diri menembus tanah seperti yang dilakukan cacing tanah, tetapi harus berbelok-belok melalui rongga-rongga tanah yang telah tersedia (tuti rahayu, 2014)

Terdapat beberapa metode isolasi Nematoda yang dapat dilakukan (Victor hopkin, 1992) diantaranya ialah:

A. Ekstraksi dari jaringan tumbuhan

1. Pencelupan di dalam air

Pada metode ini, jaringan tumbuhan dibersihkan dari tanah dan dipotong-potong menjadi bagian yang kecil 5-10

cm. Potongan bagian tumbuhan ini kemudian ditempatkan ke dalam wadah yang dapat tertutup rapat. Menambahkan air hingga menutup bagian dari tumbuhan tersebut, kemudian menginkubasikan ke dalam suhu kamar. Nematoda endoparasitik yang berpindah akan meninggalkan akar dan dapat dikumpulkan menggunakan saringan kecil.

2. Maserasi mekanik
Potongan-potongan tanaman sepanjang 2-3 cm dimaserasi di dalam air dengan menggunakan pencincang listrik selama 15-30 detik akan menghasilkan Nematoda hidup dan bagian jaringan tanamannya. Cairan tersebut dapat dituangkan ke dalam saringan dan dibiarkan tetap di dalam air untuk menampung sisa-sisa jaringan tanaman. Nematoda yang bergerak akan menembus lubang saringan dan dapat dikumpulkan dari air yang berada di bawah saringan. Stadium Nematoda endoparasit sering hancur dengan metode ini, tetapi nematoda yang masih utuh dapat dijumpai di dalam sisa campuran tersebut dengan jalan diencerkan.
3. Enzim Maserasi
Enzim yang dapat memaserasi jaringan tumbuhan antara lain : pektinase, selulose, dan hemiselulose yang secara komersial dapat diperoleh, atau dari biakan bakteri dan jamur yang sudah membusuk dan lunak.
4. Agitasi di dalam penggojok
Nematoda dapat juga muncul dari jaringan tumbuhan ke dalam air dengan agitasi yang terus menerus dengan motor penggojok. Gerakan penggojok memberikan cukup agitasi untuk menjamin aerasi yang cukup dan maserasi. Sistem tersebut dapat dilakikan terus menerus sepanjang hari.
5. Pengabutan terputus
Bagian dari tanaman ditempatkan di atas kasa plastik kasar yang ditempatkan di atas corong yang dapat mengalirkan air ke dalam tabung reaksi besar atau penampung air yang lain. Rung antar corong dan tabung

reaksi diperlukan untuk menghindari luapan air dari corong. Air yang diberi tekanan mengalir dari lubang kecil dan menimbulkan kabut. Apabila Nematoda merayap mencapai permukaan tanaman maka air dari kabut akan menghempaskan Nematoda ke bawah corong. Air yang berupa kabut mengatur untuk menggerakkan Nematoda keluar tanpa mengekstraksi Nematoda keluar dari jaringan tanaman. Teknik ini dapat digunakan dalam beberapa hari untuk mengumpulkan banyak Nematoda dari bahan tanaman yang sesuai.

B. Ekstraksi dari tanah

1. Teknik Baermann

Langkah dari teknik ini adalah dengan membungkus 100 gr tanah ke dalam kertas tisu atau kain dan tempatkan di atas kasa plastik kasar di dalam corong yang dihubungkan dengan pipa karet yang diberi penjepit. Menuang air secara perlahan sampai pada permukaan tanah bagian bawah. Setelah 24 jam penjepit dibuka secara perlahan dan hati-hati untuk mengumpulkan kecil cairan dari corong ke gelas piala kecil. Cairan tersebut mengandung Nematoda yang dapat bergerak ke luar dari tanah dan tenggelam ke dasar corong.

2. Teknik Cobbs

Berat jenis Nematoda sedikit di atas berat jenis air, sehingga Nematoda dapat tenggelam dari suspensi lebih lambat dari pada partikel tanah. Pada metode atau teknik Cobbs, tanah disuspensikan ke dalam air dan berkesempatan mengendap dalam waktu yang singkat dan air yang mengandung Nematoda merembes menembus pori-pori saringan. Prosedur teknik Cobbs adalah sebagai berikut:

- a. Menempatkan sekitar 100 gr tanah ke dalam ember dan menambahkan 2 atau 3 liter air.
- b. Mengaduk dengan tongkat pengaduk sampai semua gumpalan tanah hancur. Membiarkan

- campuran tersebut mengendap selama 30-60 detik.
- c. Menuangkan campuran tersebut ke ember kedua melalui saringan kasar (diameter pori saringan antara 0.35-0.85 mm), maka partikel tanah yang berat tetap akan berada di ember pertama.
 - d. Mengulangi langkah (2) dan (3) dengan menggunakan air 1 liter. Kebanyakan Nematoda dalam sampel tanah sekarang berada di dalam ember kedua.
 - e. Mencuci residu dengan saringan kasar ke dalam ember kedua kemudian menambahkan air untuk mendapatkan Nematoda yang masih berada dalam saringan.
 - f. Residu yang ada dalam saringan kasar dan di dalam ember pertama dibuang
 - g. Air dalam ember kedua dituang ke dalam saringan dalam kondisi saringan miring untuk mengurangi efektif lubang saringan.
 - h. Saringan halus dimiringkan kemudian ditegakkan diatas tempat penampung.
 - i. Langkah (g) dan (h) harus diulangi dengan penampung air dari ember pertama.
 - j. Nematoda kemudian akan terkumpul dengan jalan mencuci bagian belakang saringan halus dan akan mengendap di dalam waktu 30 menit.
- (diameter 0,038 mm), kemudian membilas sisa kotoran yang ada di saringan tersebut.
- d. Mencuci sisa kotoran dan Nematoda dari saringan halus ke dalam gelas piala yaoncong berukuran 150 ml, menggoncangkan cairan tersebut dan menuangkan cairan dengan kandungannya ke dalam tabung sentrifus yang berukuran 50 ml
 - e. Menyeimbangkan tabung-tabung sentrifus pada rotor horizontal dan memutar sentrifus pada 400x g selama 5 menit.
 - f. Mendekantasi cairan tanpa mengganggu butiran-butiran tanah dan Nematoda yang terdapat pda dasar tabung sentrifus
 - g. Menambahkan larutan gula ke dalam tabung sampai separuhnya. Selanjutnya mensuspensikan lagi butiran-butiran tanah dengan gelas pengaduk dan menabahkan sukrosa lebih banyak lagi sampai mencapai 0.5 cm dari bagian atas tabung.
 - h. Memutar sentrifugus pada 400 x g selama 60 detik dan biarkan sampai tabung berhenti sendiri tanpa direm
 - i. Mendekantasikan larutan sukrosa dengan menggunakan saringan yang amat halus (diameter 0.028 mm) tanpa mengganggu sisa kotoran yang terdapat pada dasar tabung sentrifus. Membilas isi saringan dengan 30 ml air secara berhati-hati ke dalam gelas piala.
 - j.

Flotasi sentrifugal

Prinsip kerja ini ialah memisahkan Nematoda dari tanah di dalam air, yang dilanjutkan dengan sentrifugasi di dalam air dan akhirnya dengan sentrifugasi di dalam larutan dengan berat jenis yang cukup untuk dapat menyebabkan Nematoda terapung pada permukaan larutan. Langkah-langkah metode Flotasi sentrifugal adalah sebagai berikut:

- a. Mencampur tanah sebanyak 100 gr dengan air sampai mencapai 800 ml
- b. Mengaduk kuat-kuat dan membiarkan tanah mengendap selama 60 detik.
- c. Mendekantasi dengan menggunakan saringan kasar yang berukuran sedang

III. METODE PENELITIAN

- A. Waktu dan tempat penelitian
Penelitian ini dilakukan selama bulan November 2015 di Laboratorium Pendidikan Biologi, UMS.
- B. Sample penelitian
Sampel penelitian ialah tanah dan akar tanaman cabai, kubis, wortel, dan sawi yang diperoleh pada beberapa titik di daerah Mathesih, Karanganyar, Jawa Tengah.

C. Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan menggunakan RAK (Rancangan Acak Lengkap) faktorial 3 x 3 dengan 3 kali ulangan

D. Teknik Isolasi

Teknik isolasi yang digunakan meliputi Teknik Barless Tulgreen, Isolasi tanah, dan isolasi akar.

1. Metode Barless Tulgreen

- a. Memilih lokasi dengan ketinggian kurang lebih 1000 dpl untuk mengambil sampel tanah (dari tanaman wortel, kubis, cabai, dan sawi)
- b. Mengambil tanah sekitar 100 gr
- c. Menyiapkan alat Barlense tullgreen dan menyalakan lampunya
- d. Menyiapkan corong, menutupnya dengan kertas saring/kertas kassa kemudian mengisinya dengan tanah sampel
- e. Menghubungkan bagian bawah corong dengan tabung reaksi yang telah diisi dengan air, dengan posisi ujung corong menyentuh sedikit air dalam tabung reaksi tersebut
- f. Mengamati selama sekitar 24 sampai 48 jam, bila tanah terlihat kering, maka disemprot dengan air secukupnya.
- g. Mengambil air dalam tabung reaksi menggunakan pipet, meneteskan pada objek glass
- h. Mengamati menggunakan mikroskop

2. Metode Isolasi Tanah

- a. Memilih lokasi dengan ketinggian kurang lebih 1000 dpl untuk mengambil sampel tanah (dari tanaman wortel, kubis, cabai, dan sawi)
- b. Mengambil tanah sekitar 100 gr
- c. Meletakkan sampel tanah ke alam kain tipis kemudian mengikatnya dengan tali

- d. Memasukkan ikatan berisi tanah tersebut ke dalam mangkuk kecil
- e. Mengisi mangkuk kecil berisi tanah dengan air kurang lebih 150 ml
- f. Merendam sampel tanah tersebut sekitar 24 jam
- g. Mengambil air dalam mangkuk menggunakan pipet, meneteskan pada objek glass
- h. Mengamati menggunakan mikroskop

3. Metode Isolasi Akar

- a. Memilih lokasi dengan ketinggian kurang lebih 1000 dpl untuk diambil tanaman beserta akarnya (dari tanaman wortel, kubis, cabai, dan sawi)
- b. Setelah dicuci terlebih dahulu, akar tersebut dipotong-potong sepanjang kurang lebih 1 cm
- c. Memasukkan potongan akar tanaman tersebut ke dalam tabung reaksi hingga memenuhi sekitar setengah dari tabung reaksi
- d. Mengisi dengan air hingga akar dalam tabung reaksi terendam
- e. Merendam ekstraksi tanah tersebut sekitar 24 jam
- f. Mengambil air dalam tabung reaksi menggunakan pipet, meneteskan pada objek glass
- g. Mengamati menggunakan mikroskop

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Distribusi Nematoda tidak pernah seragam di dalam tanah. Nematoda pada umumnya lebih banyak terdapat di dekat tanaman. Selain itu juga terdapat beberapa di jaringan akar, batang, dan buah dari tanaman. Di tanah mereka menyukai tanah dengan kondisi lembab. Tanah yang terlalu kering akan menyebabkan Nematoda dehidrasi dan mati, sebab sebagian besar sekitar 75% tubuh Nematoda tersusun atas air.

Isolasi Nematoda dari tanah maupun akar dapat dilakukan dengan berbagai alat dan teknik, mulai dari yang sederhana hingga yang rumit dan sulit dilakukan. Alat dan teknik yang berbeda dipergunakan dengan mempertimbangkan ketepatannya mengatur jumlah aliran air untuk membawa Nematoda muncul dari tanah atau bagian tubuh tanaman yang diekstraksi.

Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan maka diperoleh hasil sebagai berikut:

Teknik Tanaman	Barless Tulgreen			Ekstraksi Tanah			Ekstraksi akar		
	I	I	II	I	I	II	I	I	II
Sawi	0	1	1	1	2	1	0	0	0
Kubis	0	2	2	0	3	2	0	1	0
Cabai	0	1	1	1	1	1	0	1	2
JUMLAH TOTAL	8			12			4		

Isolasi Nematoda menggunakan metode ekstraksi tanah ternyata menunjukkan hasil yang lebih efektif dibandingkan dengan teknik lain. Hal ini terlihat dari jumlah Nematoda yang diperoleh pada tiap-tiap teknik. Teknik isolasi tanah memungkinkan perpindahan Nematoda dari dalam kain ke luar kain. Kain yang digunakan memiliki pori-pori dengan diameter yang relatif besar sehingga Nematoda dapat dengan mudah berpindah.

Melalui teknik ini, memang banyak partikel tanah yang ikut larut atau keluar bersama Nematoda. Diameter kain yang besar memungkinkan Nematoda berbagai ukuran dapat melintasi pori tersebut. Dengan menggoyangkan tanah dalam kain tersebut diasumsikan akan membantu pergerakan Nematoda.

Barless Tulgreen merupakan teknik isolasi Nematoda yang telah lama dikenal dan banyak digunakan. Beberapa percobaan membuktikan bahwa metode ini efektif dalam isolasi nematoda dari tanah. Dalam beberapa percobaan lain justru

menunjukkan hasil yang sebaliknya. Penggunaan metode ini mengasumsikan bahwa nematoda tanah yang berada di dalam corong akan turun dan masuk ke dalam tabung reaksi yang berisi air. Nematoda akan menghindari panas yang dihasilkan oleh sinar lampu yang berada tepat di atas corong dan akan menuju ke suhu yang lebih rendah yakni ke arah tabung reaksi.

Pada percobaan yang telah dilakukan, penggunaan Barless tulgreen tidak lebih baik dibanding penggunaan teknik ekstraksi tanah. Beberapa faktor yang mempengaruhi diantaranya adalah kertas saring yang digunakan. Kertas saring memiliki diameter yang terlalu kecil, sehingga hanya nematoda berukuran kecil saja yang bisa melintasi kertas filter ini. Sedangkan nematoda yang berukuran lebih besar tidak dapat menembus pori-pori dari kertas filter. Pori-pori yang terlalu kecil akan dipenuhi oleh partikel-partikel tanah yang justru akan menyumbat dan menghalangi Nematoda menembus kertas.

Isolasi nematoda menggunakan akar menunjukkan hasil paling sedikit dibanding dua teknik lainnya. Hal ini disebabkan keberadaan Nematoda memang paling banyak berada di dalam tanah sekitar tanaman hospes. Tanaman yang digunakan sebagai sampel bukan merupakan tanaman terinfeksi Nematoda. Nematoda parasit tanaman jarang menghasilkan gejala khas. Sebagian besar gejala yang muncul adalah tidak jelas, tidak spesifik dan sering menyerupai yang disebabkan oleh faktor-faktor lain, seperti virus, kekurangan gizi, atau polusi udara.

V. KESIMPULAN

Nematoda dapat dipisahkan dari jaringan tumbuhan maupun dari tanah dengan berbagai cara. Setiap cara harus diuji secara seksama dan tetap memperhatikan dan mengutamakan efisiensi dari cara tersebut. Teknik isolasi nematoda dengan tanah menunjukkan hasil lebih baik daripada teknik barless tulgreen dan ekstraksi akar. Hal ini dipengaruhi diantaranya oleh kertas atau kain filter yang digunakan. Semakin besar diameter kain filter maka semakin banyak nematoda yang diperoleh dan semakin beragam dalam hal ukuran.

VI. REFERENSI

Dropkin Victor. 1992. Pengantar Nematologi Tumbuhan. Gadjah Mada University Press : Yogyakarta

Lumowa Sonja. 2014. Zoologi invertebrata. Kepel press : Yogyakarta
Rahayuti. 2012. Modul Praktikum Sistematika Invertebrata. MUP : Surakarta