

Perbanyak Nematoda Patogenik Serangga (Rhabditida: *Steinernema* dan *Heterorhabditis*) pada Media *In Vitro* Cair Statik

Chaerani*, M. Ace Suhendar, dan J. Harjosudarmo

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: chaeran1@yahoo.com

Diajukan: 16 Desember 2011; Diterima: 31 Maret 2012

ABSTRACT

***In Vitro* Culture of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: *Steinernema* and *Heterorhabditis*) in Static Liquid Media. Chaerani, M. Ace Suhendar, and J. Harjosudarmo.** Entomopathogenic nematodes belonging to genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* are potentially most effective and safe biological control agents for insect pests, especially for soil dwelling insects and those living in cryptic habitats. Field application of the nematodes is still hampered by supply of large number of infective juvenile (IJ) nematodes. Five published *in vitro* media along with its two modifications were tested for mass propagations of two indigenous nematodes (*H. indicus* PLR2 and *Steinernema* T96) and one commercial strain (*S. carpocapsae* #25). Varying levels of IJ yields were observed across the replications and experiments. Medium F that contained 1.0% yeast extract, 2.5% egg yolk, and 4.0% soy oil yielded the highest IJ numbers of *H. indicus* PLR2 (1.5×10^5 IJ ml⁻¹) and of *S. carpocapsae* #25 (2.9×10^5 IJ ml⁻¹), whereas the widely used medium B, which is based on homogenized chicken offal (40%), yielded the highest number of *Steinernema* T96 (5.8×10^4 IJ ml⁻¹). The IJ's quality, as measured by their morphometrics and pathogenicities, were generally impaired, indicating the lack of essential nutrient(s) in the media. Optimization of the propagation media is therefore still needed to increase IJ's quantity and quality to achieve the required standard for commercial scale of artificial propagation.

Keywords: Entomopathogenic nematodes, mass propagation, liquid culture media.

ABSTRAK

Perbanyak Nematoda Patogenik Serangga (Rhabditida: *Steinernema* dan *Heterorhabditis*) pada Media Cair *In Vitro* Statik. Chaerani, M. Ace Suhendar, dan J. Harjosudarmo. Nematoda patogenik serangga (NPS) dari genus *Steinernema* dan *Heterorhabditis* berpotensi menjadi pengendali hayati yang efektif dan aman untuk serangga-serangga hama, terutama yang hidup di dalam tanah dan di habitat tersembunyi. Aplikasi NPS di lapang masih terkendala oleh penyediaan nematoda juvenil infeksi (JI) dalam jumlah besar. Lima media *in vitro* baku dan dua

modifikasinya diuji untuk perbanyak massal dua NPS lokal (*H. indicus* PLR2 dan *Steinernema* T96) dan satu *strain* komersial (*S. carpocapsae* #25). Hasil JI yang diperoleh bervariasi antar ulangan dan percobaan. Media F yang dimodifikasi dari berbagai formula media dan mengandung 1,0% ekstrak khamir (*yeast extract*), 2,5% kuning telur, dan 4,0% minyak kedelai, menghasilkan jumlah JI *H. indicus* PLR2 dan *S. carpocapsae* #25 tertinggi, berturut-turut $1,5 \times 10^5$ dan $2,9 \times 10^5$ JI ml⁻¹ media, sedangkan media baku B, yang hanya mengandung 40% usus ayam, menghasilkan JI *Steinernema* T96 tertinggi ($5,8 \times 10^4$ JI ml⁻¹ media). Secara umum, kualitas JI yang diukur berdasarkan morfometrik dan patogenitasnya kurang baik, karena mendapat pengaruh negatif dari perlakuan media *in vitro*. Hal ini menunjukkan media yang digunakan kekurangan nutrisi esensial. Optimalisasi media buatan perlu dilakukan untuk meningkatkan kuantitas dan kualitas JI NPS yang diproduksi guna mencapai standar yang dibutuhkan untuk perbanyak skala komersial.

Kata kunci: Nematoda patogenik serangga, perbanyak massal, media cair.

PENDAHULUAN

Nematoda patogenik serangga (NPS) merupakan jasad alternatif untuk pengendalian serangga-serangga hama yang aman bagi lingkungan dan jasad bukan sasaran. NPS terutama efektif terhadap serangga-serangga yang hidup di dalam tanah dan habitat-habitat tersembunyi (Griffin *et al.*, 2005). Jika ketersediaan nutrisi dalam lingkungan tumbuhnya telah berkurang, juvenil instar ke-3 akan menghentikan stadia perkembangan ke instar selanjutnya dan memasuki stadia juvenil infeksi (JI) atau *dauer juvenile* yang mampu hidup di luar tubuh inangnya, tidak makan, dan aktif mencari sasaran serangga inang baru untuk melanjutkan siklus reproduksinya (Griffin *et al.*, 2005). Meskipun JI juga mampu mematikan serangga, patogenitasnya dipengaruhi oleh simbiosisnya dengan bakteri Enterobacteriaceae (*Xenorhabdus* spp. dan *Photorhabdus* spp.) yang terdapat di dalam saluran pencernaan JI dan bersifat patogenik terhadap serangga (Griffin *et al.*, 2005).

NPS tersebar luas di Indonesia (Griffin *et al.*, 2000; Chaerani *et al.*, 2007). Beberapa NPS lokal, yaitu *Heterorhabditis indicus* yang berasal dari Pelabuhan Ratu (Jawa Barat), Anyer (Banten), Bali, Ambon, dan Seram serta *Steinernema* spp. dari Bali, Waen (Ambon), dan Seram telah diuji patogenisitasnya di rumah kaca dan lapang terhadap hama lanas ubi jalar, kompleks penggerek batang padi, dan pengorok daun krisan dengan efektivitas 43-78% (Fallon, 1998; Yulensri *et al.*, 2001; Chaerani dan Nurbaeti, 2006a; 2006b; Chaerani dan Waluyo, 2006). Meskipun mudah dibiakkan secara *in vivo*, biasanya pada larva *Galleria melonella* (Lepidoptera: Pyralidae), biaya produksi massal NPS secara *in vivo* tidak kompetitif bila dibandingkan dengan aplikasi insektisida kimiawi. Hal ini menjadi kendala pemanfaatan NPS secara luas di lapangan.

Sistem pembiakan *in vitro* NPS pada media semi padat merupakan terobosan nyata dalam bioteknologi NPS setelah diketahui adanya simbiosis mutualistik antara NPS dengan bakteri untuk reproduksi NPS (Bedding, 1984). Setelah diperkenalkan teknik perbanyakan ini, penggunaan NPS secara komersial untuk pengendalian hama pada komoditas-komoditas yang bernilai ekonomi tinggi, seperti penggerek akar pada jeruk, trips, penggerek batang dan akar pada tanaman hortikultura di rumah kaca, lundi dan jangkrik pada rumput lapangan golf serta lalat pada budi daya jamur merang, di Eropa dan Amerika meningkat pesat (Georgis *et al.*, 2006). Akan tetapi, untuk skala massal dan komersial, perbanyakan NPS pada media semi padat tidak efisien dan ekonomis, karena peningkatan kapasitas produksi berbanding lurus dengan luas ruangan dan biaya operasional (Ehlers *et al.*, 2000). Perbanyakan pada media cair diharapkan dapat mengatasi kendala perbanyakan massal pada media semi padat yang tidak efisien dan tidak ekonomis. Kuantitas dan kualitas NPS yang dihasilkan secara *in vitro* sangat bergantung pada komposisi media, sehingga banyak penelitian produksi massal NPS diarahkan pada optimalisasi nutrisi media (Wouts, 1981; Bedding 1984; Buecher dan Popiel, 1989; Lunau *et al.*, 1993; Han *et al.*, 1993; Surrey dan Davies, 1996; Ehlers *et al.*, 2000).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan media cair yang sesuai untuk perbanyakan NPS lokal dan introduksi.

BAHAN DAN METODE

Penyiapan Inokulum Nematoda

Tiga isolat NPS yang digunakan dalam percobaan adalah *H. indicus* isolat PLR2 dari Pelabuhan Ratu, Jawa Barat (Chaerani *et al.*, 2007), *Steinernema* isolat T96 dari Waen, Ambon (Griffin *et al.*, 2000), dan *S. carpocapsae* #25 yang merupakan contoh produk komersial dari Biosys Inc., Amerika Serikat. Inokulum nematoda diperbanyak pada larva *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) instar ke-4 atau ke-5 menggunakan metode inokulasi kertas saring pada cawan petri berdiameter 9 cm (Woodring dan Kaya, 1988). JI disterilisasi permukaan dengan *hyamine-10*× (Sigma) 0,4% selama 15 menit, kemudian dibilas tiga kali dengan akuades steril.

Penyiapan Inokulum Bakteri Simbion

Larva *T. molitor* instar ke-4 atau ke-5 diinokulasi dengan 10-20 ekor JI menggunakan metode inokulasi kertas saring pada cawan petri (Woodring dan Kaya, 1988). Setelah 24-48 jam, hemolimfa serangga yang mati digoreskan pada media selektif Nutrient Bromothymol Blue Agar (NBTA) dengan komposisi 23 g *nutrient agar*; 0,25 g *bromothymol blue*; 0,04 g *triphenyl tetrazolium chloride*; dan 1,0 l akuades. Koloni bakteri fase primer yang berwarna hijau kebiruan dan dikelilingi zona bening pada media NBTA diambil dan diperbanyak pada media *nutrient broth* (NB) selama 48 jam di atas *rotary shaker* dengan kecepatan 170 rpm. Selanjutnya, biakan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3.500 rpm dan peletnya diresuspensi dalam larutan 0,5% NaCl steril. Kerapatan sel bakteri dihitung menggunakan hemotometer di bawah mikroskop.

Media Perlakuan

Lima media *in vitro* dari Wouts (1981), Bedding (1984), Han *et al.* (1993), Lunau *et al.* (1993), dan Surrey dan Davies (1996) yang secara berurutan diberi kode A, B, C, D, dan E, serta modifikasi media A, C, dan E (media F) dan media D (media G) dikaji untuk perbanyakan NPS (Tabel 1). Media A, B, dan C dirancang sebagai media semi padat yang dijerapkan dalam potongan-potongan spons poliuretan, tetapi karena penelitian ini bertujuan untuk mencari formula media yang sesuai maka ketiga media ini digunakan dalam bentuk cair tanpa spons. Media B, yang digunakan sebagai pembanding, memiliki komposisi yang sedikit berbeda untuk tiap genus NPS (Tabel 1). Setiap macam media dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer 500 ml, diotoklaf selama 15 menit (121°C; 1,5 atm) kemudian dituangkan ke dalam cawan petri ber-

Tabel 1. Komposisi media yang digunakan untuk perbanyak *Steinernema* dan *Heterorhabditis*.

Bahan ¹	Kode media							
	A	B ²		C	D	E	F	G
		<i>Heterorhabditis</i>	<i>Steinernema</i>					
Yeast extract ³	0,40	-	-	1,00	1,00	0,50	1,00	2,50
Pepton	-	-	-	1,00	-	-	-	-
Nutrient broth ³	1,00	-	-	-	-	-	-	-
NaCl ³	-	-	-	-	-	0,23	-	-
Usus ayam ³	-	35,00	40,00	-	10,00	-	-	3,50
Lemak sapi ³	-	10,00	-	1,00	-	-	-	-
Kuning telur ⁴	-	-	-	4,00	-	1,25	2,50	-
Susu bubuk ⁴	-	-	-	-	-	3,55	-	-
Tepung kedelai ³	5,00	-	-	3,00	-	-	-	-
Minyak kedelai ⁴	1,00	-	-	-	1,00	4,00	4,00	3,00
Akuades ⁴	92,60	55,00	60,00	90,00	88,00	90,47	93,00	91,00
Pustaka/keterangan	Wouts (1981)	Bedding (1984)		Han <i>et al.</i> (1993)	Lunau <i>et al.</i> (1993), dengan sedikit modifikasi	Surrey dan Davies (1996)	Modifikasi media A, C, dan E	Modifikasi medium D

¹Dalam persentase; ²media pembeding; ³perbandingan b/v; dan ⁴perbandingan v/v.

diameter 9 cm sebanyak 7-8 ml (kedalaman ≤ 4 mm). Pada kedalaman ini oksigen masih dapat berdifusi ke dalam media sehingga media tidak perlu diberi aerasi buatan (Buecher dan Popiel, 1989). Media diinokulasi dengan 0,1 ml NaCl 0,5% mengandung $0,6-150,0 \times 10^{10}$ CFU bakteri fase primer ml⁻¹ larutan. Cawan petri direkat dengan parafilm kemudian diinkubasi dalam keadaan gelap pada suhu kamar tanpa agitasi. Setelah 48 jam media diinfestasi dengan 0,5 ml akuades steril mengandung $0,5 \times 10^4$ JI ml⁻¹. Populasi JI diamati pada 21 hari setelah inokulasi (HSI) dari 5 sampel hitung yang masing-masing bervolume 0,2 ml. Sampel diencerkan hingga didapatkan kerapatan 50-200 JI ml⁻¹ untuk memudahkan penghitungan.

Percobaan dilaksanakan secara berseri dengan pengulangan (repetisi) dua kali untuk *H. indicus* PLR2 dan *S. carpocapsae* #25. Percobaan pada masing-masing nematoda dilakukan dengan tiga ulangan perlakuan. Pengulangan percobaan untuk kedua nematoda ini dilakukan, karena medianya terkontaminasi oleh larva *Drosophila* sp. Percobaan untuk *Steinernema* T96 dilakukan satu kali tetapi dengan enam ulangan perlakuan.

Pengukuran Morfometrik JI

Panjang tubuh JI diukur dari ujung anterior hingga posterior dan lebar tubuh diukur pada bagian tubuh yang terlebar dengan mikroskop menggunakan mikrometer. Jumlah individu yang diukur berkisar antara 30-90 ekor. Ukuran morfometrik JI hasil perbanyak *in vitro* dibandingkan dengan yang diperbanyak pada larva *T. molitor*.

Uji Patogenisitas JI terhadap Larva *T. molitor*

Pada akhir masa inkubasi (21 HSI), nematoda dipisahkan dari media menggunakan saringan berukuran lubang 150, 250, dan 500 mesh, kemudian dibersihkan menggunakan teknik sedimentasi dan dekantasi hingga diperoleh suspensi nematoda yang jernih. Patogenisitas JI terhadap larva *T. molitor* diuji dengan menggunakan metode kolom pasir dalam botol bekas selai (Chaerani *et al.*, 2007) dan metode infeksi kertas saring dalam cawan petri berdiameter 9 cm (Woodring dan Kaya, 1988). Nematoda JI dengan kerapatan air mengandung $0,5 \times 10^4$ ekor/1,4 ml diinokulasikan pada larva *T. molitor* instar ke-4 atau ke-5 ($n = 10$ ekor pada metode esei kolom pasir dan $n = 20$ ekor pada metode esei kertas saring). Setelah diinkubasi selama 5 hari dalam keadaan gelap jumlah larva *T. molitor* yang mati dihitung. Sebagai pembandingan adalah patogenisitas JI hasil perbanyak *in vivo* pada larva *T. molitor*. Pada setiap metode pengujian terdapat tiga ulangan perlakuan.

Analisis Data

Data populasi JI, patogenisitas, dan ukuran morfometrik dianalisis dengan Rancangan Acak Kelompok menggunakan prosedur GLM dari SPSS 12.0. Data populasi JI ditransformasi ke log ($Y+1$) untuk memperoleh sebaran galat yang homogen. Angka rata-rata antar perlakuan dibedakan menggunakan uji DMRT ($P = 0,05$). Apabila hasil analisis data gabungan dua percobaan menunjukkan pengaruh pengulangan percobaan yang signifikan, maka data percobaan dianalisis secara terpisah untuk masing-masing percobaan. Rata-rata perlakuan dari dua percobaan yang dianalisis secara terpisah dihitung dengan cara mem-

boboti rata-rata perlakuan tiap percobaan dengan nilai keragamannya (= rata-rata terboboti, *weighted mean*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Potensi Reproduksi JI

Repetisi percobaan tidak memengaruhi produksi JI *H. indicus* PLR2 ($P = 0,314$), sehingga data kedua percobaan digabung dan dianalisis bersama. Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan media berpengaruh nyata terhadap populasi JI *H. indicus* PLR2 ($P = 0,007$). Sementara itu, repetisi percobaan berpengaruh nyata terhadap produksi JI *S. carpocapsae* #25 ($P = 0,000$), sehingga data percobaan dianalisis secara terpisah untuk masing-masing percobaan. Perlakuan media tidak berpengaruh terhadap produksi JI *S. carpocapsae* #25, baik pada Percobaan 1 ($P = 0,115$) maupun 2 ($P = 0,293$). Demikian pula perlakuan media tidak memengaruhi hasil JI *Steinernema* T96 ($P = 0,183$).

Hasil tertinggi *H. indicus* PLR2 ($1,5 \times 10^5$ JI ml⁻¹ media) diperoleh pada media F, yang merupakan modifikasi dari media A, C, dan E (Tabel 2). Sementara itu meskipun perlakuan media tidak berpengaruh nyata terhadap potensi reproduksi kedua spesies *Steinernema*, perolehan JI *S. carpocapsae* #25 yang tertinggi juga cenderung terjadi pada media F ($2,9 \times 10^5$ JI ml⁻¹ media), sedangkan produksi *Steinernema* T96 terbanyak cenderung tetap terjadi pada media baku B ($5,8 \times 10^5$ JI ml⁻¹ media). Media F dapat memperbaiki tingkat perolehan JI *H. indicus* PLR2 dan *S. carpocapsae* #25, berturut-turut sebanyak 4x dan 7x lebih tinggi daripada hasil JI pada media baku B.

Ekstrak khamir dan minyak kedelai yang merupakan protein nabati dengan kandungan asam-asam amino yang sedikit berbeda dari protein hewani, tampaknya berperan dalam peningkatan produksi JI *H. indicus* PLR2 pada media D dan F. Media B dan C, yang tidak atau mengandung hanya salah satu dari kedua komponen tersebut, menghasilkan JI *H. indicus* PLR2 paling rendah. Akan tetapi, peningkatan kedua

Tabel 2. Potensi reproduksi *Steinernema* dan *Heterorhabditis* pada media cair dalam cawan petri.

Media	Percobaan 1	Percobaan 2	Percobaan 1 dan 2	Rata-rata terboboti ¹
<i>H. indicus</i> PLR2 ($\times 10^4$ JI ml ⁻¹ media) ^{2,3,4}				
A	2,0 (0,7-3,6)	8,0 (4,3-12,0)	4,0 abc	-
B	4,2 (2,8-6,1)	3,8 (1,7-14,2)	4,0 abc	-
C	1,1 (0,1-4,2)	4,3 (2,7-7,5)	2,2 bc	-
D	18,0 (10,6-29,3)	7,9 (3,8-26,8)	11,7 ab	-
E	0,4 (0,0-13,2)	1,2 (0,5-2,0)	0,8 c	-
F	18,9 (6,1-37,9)	11,8 (6,9-37,9)	15,0 a	-
G	1,8 (0,5-7,2)	3,1 (1,4-7,8)	2,4 bc	-
Nilai <i>P</i> media	0,185	0,087		
Nilai <i>P</i> percobaan	-	-	0,314	
<i>S. carpocapsae</i> #25 ($\times 10^4$ JI ml ⁻¹ media) ^{2,3,4}				
A	3,1 (1,4-5,5)	5,7 (1,5-14,6)	-	3,7
B	1,2 (0,4-5,9)	8,5 (3,3-24,6)	-	4,4
C	3,7 (2,7-5,2)	7,9 (6,7-9,0)	-	6,9
D	3,5 (2,8-4,2)	15,6 (4,9-40,7)	-	3,7
E	2,6 (1,9-4,9)	14,9 (7,5-43,0)	-	4,1
F	9,5 (7,1-12,2)	36,5 (33,8-40,9)	-	29,5
G	2,4 (1,5-4,4)	11,5 (5,3-17,1)	-	4,6
Nilai <i>P</i> media	0,115	0,293		
Nilai <i>P</i> percobaan	-	-	0,000	
<i>Steinernema</i> T96 ($\times 10^4$ JI ml ⁻¹ media) ^{2,4,5}				
A	5,1 (2,2-9,8)	-	-	-
B	5,8 (0,0-8,4)	-	-	-
C	5,1 (2,7-10,2)	-	-	-
D	0,6 (0,0-4,8)	-	-	-
E	1,5 (0,9-3,1)	-	-	-
F	4,5 (1,8-7,2)	-	-	-
G	4,9 (2,6-11,7)	-	-	-
Nilai <i>P</i>	0,183			

¹Rata-rata dari dua repetisi percobaan yang dianalisis statistik secara terpisah, dihitung menggunakan rumus: $\sum(Y/s^2)/\sum(1/s^2)$, di mana *Y* adalah rata-rata populasi JI dan *s*² adalah keragaman, ²Transformasi balik dari log (*Y*+1); Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji DMRT, ³Rata-rata dari tiga ulangan untuk masing-masing repetisi percobaan, ⁴Angka-angka dalam kurung menyatakan kisaran hasil, ⁵Rata-rata dari 6 ulangan.

unsur ini pada media G (berturut-turut menjadi 2,5% dan 3,0%), tidak berhasil meningkatkan produksi JI nematoda ini. Diduga konsentrasi sebesar ini untuk kedua komponen tersebut belum dapat melengkapi komponen protein asal hewani pada media G yang diberikan dalam bentuk usus ayam hanya sebesar 3,5%.

Potensi reproduksi ketiga nematoda ini pada semua perlakuan media masih lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan untuk berbagai spesies NPS (Bedding, 1984; Wouts, 1981; Han *et al.*, 1993; Lunau *et al.*, 1993; Surrey dan Davies, 1996; Ehlers *et al.*, 2000) serta bervariasi antar ulangan dan percobaan (Tabel 2). Variasi tingkat perolehan JI dapat diakibatkan oleh adanya poliksenisasi biakan (nematoda hidup bersama dengan lebih dari satu mikroorganisme). Boemare *et al.* (1983) dalam Lunau *et al.* (1993) melaporkan bahwa JI *S. carpocapsae* DD-136 membawa 8 spesies bakteri selain bakteri non simbiotik di dalam tubuhnya. Bakteri non simbiotik dapat mencemari media pembiakan, karena inokulum JI hanya disterilisasi permukaan (Lunau *et al.*, 1993). Selanjutnya Enright *et al.* (2003) melaporkan bahwa endospora bakteri *Paenibacillus nematophilus* ditemukan menempel pada ekor JI *Heterorhabditis* spp. dan resisten terhadap *hyamine* 0,4%. Bakteri ini tahan terhadap aktivitas senyawa-senyawa antibiotik yang diproduksi bakteri simbiotik dalam media. Bakteri-bakteri kontaminan ini mampu mengkoloni media perbanyak tetapi aktivitas pertumbuhannya tidak mampu menyediakan nutrisi esensial untuk perkembangbiakan nematoda. Lunau *et al.* (1993) menyarankan penggunaan inokulum stadia J1 *Steinernema* spp. yang aksenik (tanpa bakteri simbiotik) dan stadia J1 *Heterorhabditis* spp. yang ditumbuhkan bersama-sama bakteri simbiotiknya untuk mendapatkan biakan massal monoksenik sejati.

Inkonsistensi tingkat produksi JI pada media *in vitro* disebabkan oleh laju pemulihan (*recovery*) inokulum JI yang rendah dan tidak sinkron ke tahap perkembangan stadia selanjutnya (Yoo *et al.*, 2000). Di dalam tubuh serangga inang, tingkat pemulihan JI sebesar 95% dapat terjadi serempak dalam satu hari, sedangkan pada media *in vitro* pemulihan tersebar dalam beberapa hari dengan tingkat yang bervariasi, antara 0-81% (Strauch dan Ehlers, 1998 dalam Yoo *et al.*, 2000). Pada hemolimfa serangga terdapat sinyal makanan (*food signal*) berupa senyawa kimia yang berasal dari serangga maupun bakteri yang jauh lebih efektif mendorong pemulihan JI ke instar selanjutnya. Sementara itu aktivitas sinyal makanan pada media *in vitro* lebih rendah, karena hanya berasal dari bakteri dan diproduksi maksimum hanya pada akhir fase pertumbuhan eksponensial, sehingga hanya menstimulasi pemulihan sebagian populasi inokulum JI (Strauch dan Ehlers, 1998 dalam Yoo *et al.*, 2000).

Morfometrik JI

Perlakuan media perbanyak berpengaruh sangat signifikan terhadap ukuran tubuh ketiga spesies nematoda ($P = 0,000$, Tabel 3). Panjang dan lebar tubuh kedua spesies *Steinernema* yang dihasilkan pada media *in vitro* lebih pendek daripada yang dihasilkan pada larva *T. molitor*. JI *H. indicus* yang dihasilkan pada semua media *in vitro* juga mempunyai ukuran tubuh yang lebih pendek tetapi lebih lebar daripada yang dihasilkan secara *in vivo*. Morfometrik JI hasil perbanyak pada media *in vitro* yang lebih pendek, dibandingkan dengan yang dihasilkan secara *in vivo* menunjukkan bahwa media *in vitro* kahat unsur esensial untuk pertumbuhan nematoda (Nguyen dan Smart, 1995).

Tabel 3. Patogenisitas juvenil infeksi *Heterorhabditis indicus* PLR2, *Steinernema carpocapsae* #25 dan *Steinernema* T96 hasil perbanyak pada 7 media *in vitro* cair dalam cawan petri terhadap larva *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Media	<i>H. indicus</i> PLR2 ¹		<i>S. carpocapsae</i> #25 ¹		<i>Steinernema</i> T96 ¹	
	Pasir (%) ²	KS (%) ³	Pasir (%)	KS (%)	Pasir (%)	KS (%)
A	2,1	11,1 b	66,7	92,2 b	83,3 a	48,1
B	0,0	1,1 c	13,3	97,8 a	73,3 ab	75,8
C	0,0	2,2 c	40,0	98,9 a	70,0 abc	86,3
D	0,0	2,2 c	20,0	98,9 a	75,0 ab	95,0
E	0,0	2,2 c	20,0	93,3 b	40,0 c	70,6
F	1,5	3,3 c	53,3	97,8 a	85,0 a	71,7
G	0,0	15,6 b	33,3	98,9 a	80,0 ab	75,2
<i>T. molitor</i>	0,0	93,3 a	33,3	95,6 ab	50,0 bc	50,7
Nilai <i>P</i>	0,593	0,000	0,008	0,353	0,049	0,074

¹Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji DMRT, ²Metode uji kolom pasir dalam botol. Rata-rata dari tiga ulangan, ³Metode uji pada kertas saring dalam cawan petri. Rata-rata dari tiga ulangan.

Tabel 4. Ukuran morfometrik JI *H. indicus* PLR2, *S. carpocapsae* #25 dan *Steinernema* T96 hasil perbanyakan pada 7 media *in vitro* cair dalam cawan petri dibandingkan dengan yang diperbanyak pada larva *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Media	<i>H. indicus</i> PLR2 ¹			<i>S. carpocapsae</i> #25 ¹			<i>Steinernema</i> T96 ¹		
	<i>n</i>	Lebar (µm)	Panjang (µm)	<i>n</i>	Lebar (µm)	Panjang (µm)	<i>n</i>	Lebar (µm)	Panjang (µm)
A	90	23,0 a	500,0 b	90	23,5 d	428,5 g	60	37,3 bc	841,3 ab
B	76	23,6 a	511,2 ab	90	24,4 d	492,4 de	60	33,1 f	788,3 d
C	90	23,2 a	508,5 ab	90	21,8 e	465,6 f	60	35,4 de	808,8 cd
D	79	24,0 a	503,3 ab	90	26,2 c	482,5 ef	60	36,0 cd	819,6 bc
E	90	23,6 a	430,1 d	89	24,0 d	504,2 cd	60	34,0 ef	796,9 cd
F	45	23,1 a	465,3 c	82	23,4 d	512,7 c	60	30,3 g	731,3 e
G	55	24,2 a	461,4 c	90	28,0 b	553,2 b	60	38,5 b	865,0 b
<i>T. molitor</i>	30	19,0 b	521,3 a	30	29,8 a	578,7 a	30	42,5 a	982,5 a
Nilai <i>P</i>		0,000	0,000		0,000	0,000		0,000	0,000

¹Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji DMRT. Diukur pada hari ke-21 setelah inokulasi bakteri simbiosis; *n* = jumlah serangga uji (ekor).

Patogenisitas JI terhadap Larva *T. molitor*

Abnormalitas ukuran dalam tubuh JI yang dihasilkan secara *in vitro* diduga dapat berpengaruh negatif terhadap ketegaran dan kebugaran JI untuk mencari dan menginfeksi serangga. Hal ini terbukti dari sebagian hasil uji patogenisitas. Berdasarkan uji kolom pasir, perlakuan media hanya berpengaruh signifikan terhadap patogenisitas *Steinernema* T96 tetapi tidak berpengaruh terhadap kedua spesies NPS lainnya (Tabel 3). Pengujian patogenisitas pada kertas saring menunjukkan hasil sebaliknya, yaitu perlakuan media perbanyakan berpengaruh nyata terhadap patogenisitas JI *H. indicus* PLR2 dan *S. carpocapsae* #25, tetapi tidak nyata terhadap *Steinernema* T96 (Tabel 3). Perlakuan media *in vitro* terutama berpengaruh negatif terhadap patogenisitas *H. indicus* PLR2.

Jika kedua metode uji patogenisitas dibandingkan, terlihat bahwa patogenisitas nematoda, baik yang diproduksi secara *in vitro* maupun *in vivo*, pada umumnya lebih tinggi pada hasil uji kertas saring dibandingkan dengan patogenisitas pada kolom pasir (Tabel 3). Kedua metode pengujian berkorelasi negatif tetapi tidak signifikan ($r = -0,31$ untuk *H. indicus* PLR2; $-0,14$ untuk *S. carpocapsae* #25; dan $-0,02$ untuk *Steinernema* T96). Hasil pengujian pada metode esei kertas saring tidak menggambarkan kebugaran JI yang sesungguhnya karena serangga dibiarkan kontak secara terus menerus dan berada dekat dengan JI dalam arena infeksi yang sempit. Metode yang lebih akurat dibandingkan uji patogenisitas untuk mengetahui kualitas fisiologik yang dapat dijadikan petunjuk infektivitasnya adalah dengan mengukur kuantitas dan kualitas lipid dalam tubuh JI. Hal ini dikarenakan lipid merupakan cadangan energi utama bagi nematoda, baik yang patogenik terhadap serangga maupun yang parasitik terhadap tumbuhan, untuk proses metabolisme, daya bertahan, dan menjelajah dalam pencari-

an inang (Yoo *et al.*, 2000). Kandungan lipid pada JI dapat mencapai 40% berat tubuhnya (Griffin *et al.*, 2005).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa komposisi media *in vitro* sangat mempengaruhi kuantitas dan kualitas NPS sehingga perbaikan formula media masih diperlukan agar skala ekonomis untuk perbanyakan massal secara komersial dapat tercapai. Manipulasi kandungan dan kualitas lipid nematoda melalui penambahan komponen tertentu pada media *in vitro* telah banyak dilakukan. NPS terbatas kemampuannya dalam mensintesis lipid sehingga mengandalkan bakteri simbiosis untuk mendapatkan lipid esensial. Sementara itu profil lipid seluler bakteri simbiotik mirip dengan yang ada pada media tumbuhnya sehingga jika bakteri ditumbuhkan pada media mengandung lipid asal serangga maka sel-selnya juga akan mengakumulasi lipid dengan komposisi asam lemak yang menyerupai komposisi asam lemak pada serangga inang (Hatab dan Gaugler, 2001). Penambahan sumber lipid kaya asam oleat seperti minyak zaitun atau yang kaya sterol seperti ekstrak hati hewan pada media pembiakan dapat mengoptimalkan kadar total lipid seluler bakteri (Hatab dan Gaugler, 1999). Minyak kanola, yang juga kaya asam lemak jenuh, dapat mengoptimalkan pertumbuhan *H. bacteriophora* sehingga populasi $2,8 \times 10^5$ JI ml⁻¹ dapat dicapai hanya dalam waktu 8 hari (Yoo *et al.*, 2000). Penambahan komponen asal serangga juga akan meningkatkan potensi reproduksi NPS. *S. kushidai* misalnya, satu spesies endemik di Jepang yang sulit dibiakkan pada media *in vitro*, meningkat reproduksinya dari $<2 \times 10^5$ menjadi $>5 \times 10^5$ JI ml⁻¹ jika media perbanyakannya ditambah tepung kepompong ulat sutera (Ogura dan Haraguchi, 1994). Namun demikian keberhasilan media *in vitro* sangat bergantung pada spesies NPS sehingga media harus dioptimisasi untuk tiap spesies (Ehler dan Shapiro-Ilan, 2005).

KESIMPULAN

Media F yang memiliki komposisi ekstrak khamir 1,0%, kuning telur 2,5%, dan minyak kedelai 4,0% merupakan media terbaik untuk produksi *H. indicus* PLR2 dan *S. carpocapsae* #25 dengan produktivitas berturut-turut $1,5 \times 10^5$ dan $2,9 \times 10^5$ JI ml⁻¹ media. Media B yang mengandung usus ayam 40,0% menghasilkan $5,8 \times 10^5$ JI *Steinernema* T96 ml⁻¹ media. Secara umum, kualitas JI hasil perbanyak *in vitro*, berdasarkan pengukuran morfometrik dan patogenitasnya, lebih rendah daripada hasil perbanyak secara *in vivo*. Perbaikan media dan teknik perbanyak pada media cair masih diperlukan untuk meningkatkan kuantitas dan kualitas NPS dengan biaya ekonomis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian didanai APBN dengan nomor proyek 01.6320.C. Penghargaan yang sebesar-besarnya kami sampaikan kepada sdr. Yusuf dan Sujatmo yang telah membantu melaksanakan percobaan di laboratorium dan kepada para penelaah naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bedding, R.A. 1984. Large scale production, storage and transport of insect-parasitic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis* spp. Ann. Appl. Biol. 104(1):117-120.
- Buecher, E.J. and I. Popiel. 1989. Liquid culture of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont. J. Nematol. 21(4):500-504.
- Chaerani dan B. Nurbaeti. 2006a. Uji efektivitas nematoda entomopatogen (Rhabditida: *Steinernema* dan *Heterorhabditis*) sebagai musuh alami non-endemik penggerek batang padi kuning (*Scirpophaga incertulas*). JHPT Tropika 7(2):71-19.
- Chaerani dan B. Nurbaeti. 2006b. Efektivitas nematoda patogenik serangga (Rhabditida: *Steinernema* dan *Heterorhabditis*) terhadap penggerek batang padi putih (*Scirpophaga innotata*). J. Perlind. Tan. Indonesia 12(2):92-103.
- Chaerani dan Waluyo. 2006. Pencarian nematoda patogenik serangga (*Steinernema* dan *Heterorhabditis*) yang efektif untuk pengendalian hama lanas (*Cylas formicarius*) ubi jalar. Widyariset 9(3):19-28.
- Chaerani, Y. Suryadi, T.P. Priyatno, D. Koswanudin, U. Rahmat, Sujatmo, Yusuf, dan C.T. Griffin. 2007. Isolasi nematoda patogen serangga *Steinernema* dan *Heterorhabditis*. JHPT Tropika 7(1):1-9.
- Ehlers, R.-U., I. Niemann, S. Hollmer, O. Strauch, D. Jende, M. Shanmugasundaram, U.K. Mehta, S.K. Easwaramoorthy, and A. Burnell. 2000. Mass production potential of the bacto-helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica*-*Photorhabdus luminescens*. Biocontrol Sci. Tech. 10:607-616.
- Ehlers, R.-U. and D.I. Shapiro-Ilan. 2005. Mass production. In P.S. Grewal, R.-U. Ehlers, and D.I. Shapiro-Ilan (eds.) Nematodes as Biocontrol Agents. CAB International, Wallingford, U.K. p. 65-79.
- Enright, M.R., J.O. McInerney, and C.T. Griffin. 2003. Characterization of endospore-forming bacteria associated with entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp., and description of *Paenibacillus nematophilus* sp. nov. International J. Systematic Evol. Microbiol. 53:435-441.
- Fallon, D.F. 1998. The use of indigenous entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *Steinernema* spp. to control rice stem borer in West Java, Indonesia. Ph.D. Thesis, National University of Ireland. 171 p.
- Georgis, R., A.M. Koppenhöfer, L.A. Lacey, G. Bélair, L.W. Duncan, P.S. Grewal, M. Samish, L. Tan, P. Torr, and R.W.H.M. van Tol 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. Biological Control 38:103-123.
- Griffin, C.T., N.E. Boemare, and Z.E. Lewis. 2005. Biology and Behaviour. In P.S. Grewal, R.-U. Ehlers, and D.I. Shapiro-Ilan (eds.) Nematodes as Biocontrol Agents. CAB International, Wallingford, U.K. p. 47-64.
- Griffin, C.T., R. Chaerani, D. Fallon, A.P. Reid, and M.J. Downes. 2000. Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis indica* in Indonesia. J. Helminthol. 74:143-150.
- Han, R., L. Cao, and X. Liu. 1993. Effects of inoculum size, temperature and time on *in vitro* production of *Steinernema carpocapsae* Agriotos. Nematologica 39:366-375.
- Hatab, M.A.A. and R. Gaugler. 2001. Diet composition and lipids of *in vitro*-produced *Heterorhabditis bacteriophora*. Biological Control 20(1):1-7.
- Hatab, M.A.A. and R. Gaugler. 1999. Lipids of *in vivo* and *in vitro* cultured *Heterorhabditis bacteriophora*. Biological Control 15:113-118.
- Lunau, S., S. Stoessel, A.J. Schmidt-Peisker, and R.-U. Ehlers. 1993. Establishment of monoxenic inocula for scaling up *in vitro* culture of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. Nematologica 39:385-399.
- Nguyen, K.B. and G.C. Smart, Jr. 1995. Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). J. Nematol. 27(2):206-212.
- Ogura, N. and N. Haraguchi. 1994. Artificial media for xenic culture of *Steinernema kushidai* (Nematoda: Steinernematidae). Nematologica 40:613-616.
- Surrey, M.R. and R.J. Davies. 1996. Pilot-scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. J. Invertebr. Pathol. 67:92-99.

- Woodring, J.L. and H.K. Kaya. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas. 31 p.
- Wouts, W.M. 1981. Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on artificial media. J. Nematol. 13:467-469.
- Yoo, S.K., I. Brown, and R. Gaugler. 2000. Liquid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: lipid source and concentration. Appl. Microbiol. Biotech. 54:759-763.
- Yulensri, T. Santoso, A. Rauf, dan Chaerani. 2001. Uji keefektifan nematoda entomopatogen *Heterorhabditis indicus* dan *Steinernema riobravis* terhadap hama pengorok daun *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae). Simposium Pengendalian Hayati Serangga, Sukamandi, 14-15 Maret 2001.
-