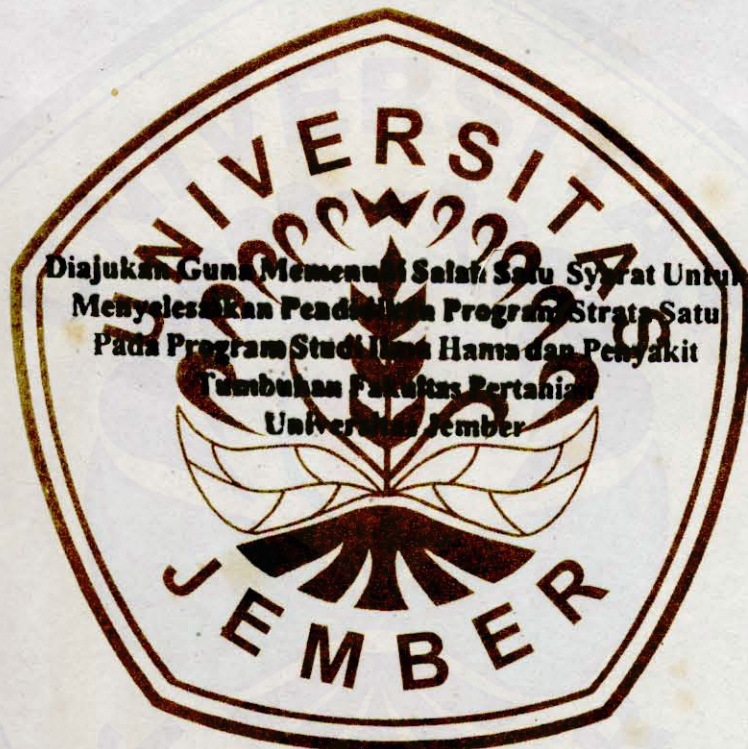


**DETERMINASI ISOLAT BAKTERI SIMBION NEMATODA  
*Steinernema* spp. DARI DAERAH JEMBER, BONDOWOSO,  
PROBOLINGGO DAN MALANG**

**KARYA ILMIAH TERTULIS  
SKRIPSI**



Oleh :

**DIAN EKOWATI**  
NIM : 961510401030

**UNIVERSITAS JEMBER - FAKULTAS PERTANIAN<sup>5</sup>  
MARET 2001**

Asal		Klass
Terima	01/04/01	632-9
No. Induk	002235 710	EKO
		d



DOSEN PEMBIMBING :

Ir. RACHMI MASNILAH, Msi (DPU)

Dr. Ir. WIWIK SRI WAHYUNI, MSc (DPA I)

Dr. sc. agr. Ir. DIDIK SULISTYANTO (DPA II)

Diterima Oleh :

**FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS JEMBER**

Sebagai Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi)

Dipertahankan pada :

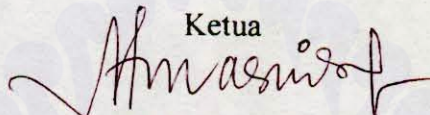
Hari : Rabu

Tanggal : 7 Maret 2001

Tempat : Fakultas Pertanian  
Universitas Jember

Tim Penguji

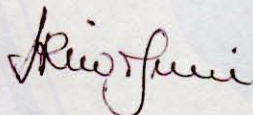
Ketua



Ir. RACHMI MASNILAH, Msi

NIP. 131 759 539

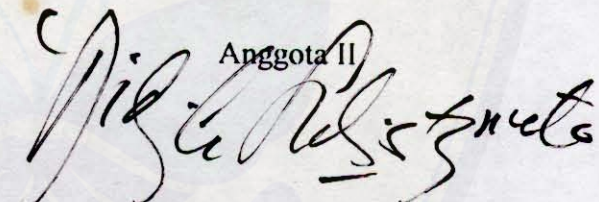
Anggota I



Dr. Ir. WIWIK SRI WAHYUNI, MSc

NIP. 130 875 933

Anggota II



Dr. sc. agr. Ir. DIDIK SULISTYANTO

NIP. 131 792 232

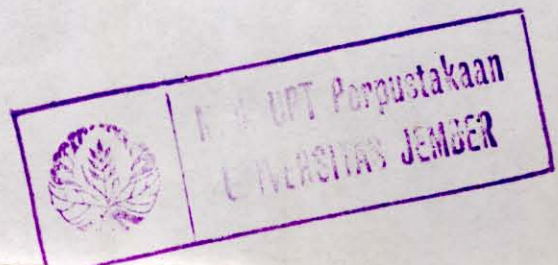
Mengesahkan

Dekan, Fakultas Pertanian



Ir. ARIE MUDJIHARJATI, MS

NIP. 130 609 808



Alhamdulillah penulis panjatkan puji syukur kehadirat Allah swt atas segala rahmat dan hidayah – Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan karya ilmiah tertulis dengan judul **Determinasi Isolat Bakteri Symbion Nematoda *Steinernema* spp. Dari Daerah Jember, Bondowoso, Probolinggo dan Malang.**

Pada penyusunan karya ilmiah tertulis ini, penulis telah banyak mendapat bantuan berupa saran dan penyempurnaan, untuk itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. **Ir. Rachmi Masnilah, Msi** selaku Dosen Pembimbing Utama, **Dr. Ir. Wiwik Sri Wahyuni, Msc** selaku Dosen Pembimbing Anggota I dan **Dr. sc. agr. Ir. Didik Sulistyanto** selaku Dosen Pembimbing Anggota II yang telah memberikan bimbingan dalam penelitian dan penulisan karya ilmiah tertulis.
2. **Ir. Arie Mudjiharjati, MS** selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
3. **Ir. Sutjipto, MS** selaku Ketua Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
4. Ayah dan ibu yang telah memberikan kasih sayang, pengorbanan dan doanya demi kesuksesan putra putrinya.
5. Adikku Andik atas dukungannya selama penelitian.
6. Mahasiswa IHPT dan semua pihak yang telah membantu selama penelitian ini berlangsung.

Harapan penulis semoga karya ilmiah tertulis ini dapat menambah wawasan serta informasi bagi pembaca.

Jember, Maret 2001

Penulis

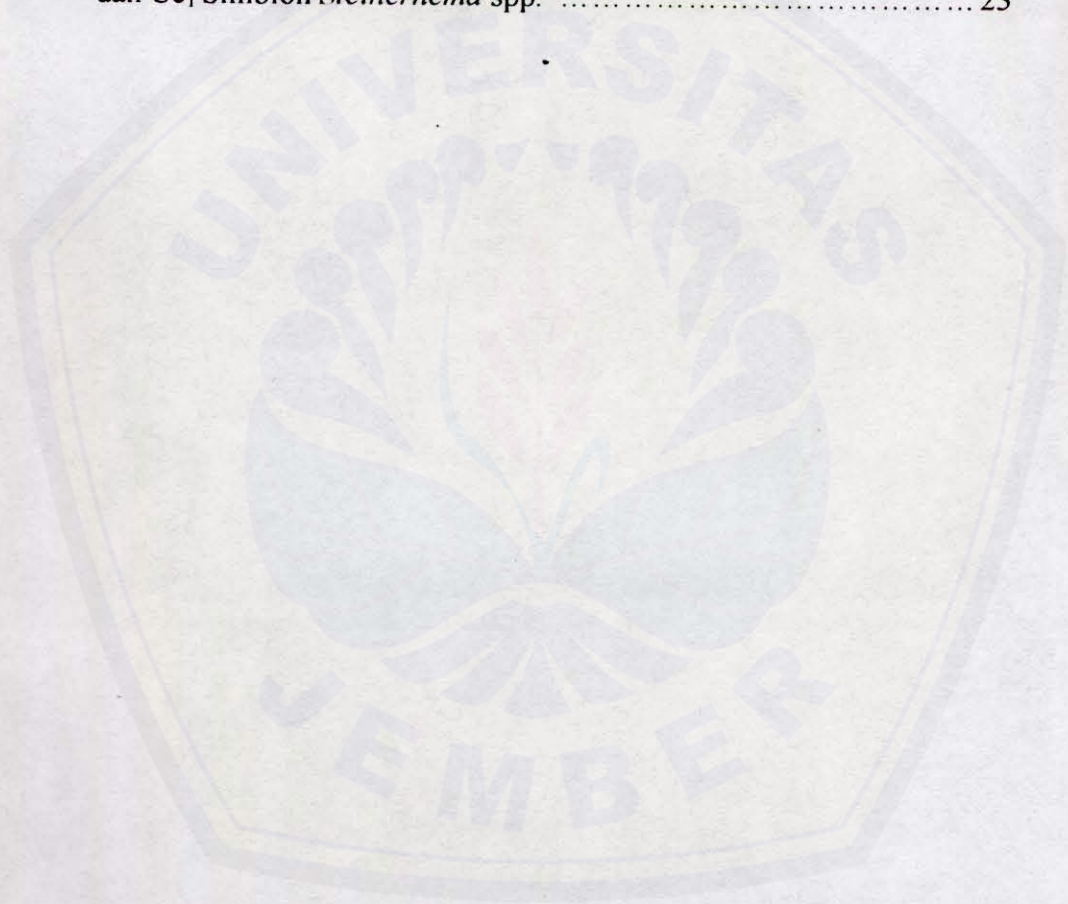
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
DOSEN PEMBIMBING .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
ABSTRAK .....	ix
RINGKASAN .....	x
I. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan .....	2
1.3 Kegunaan .....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	3
2.1 Nematoda Entomopatogen <i>Steinernema</i> spp. ....	3
2.2 Bakteri Simbion Nematoda Entomopatogen <i>Xenorhabdus</i> spp. ....	4
2.3 Hubungan <i>Steinernema</i> spp. Dan <i>Xenorhabdus</i> spp. Dalam Simbiose Mutualisme.....	6
2.4 Hipotesis .....	7
III. METODOLOGI PENELITIAN .....	8
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	8
3.2 Bahan Dan Alat .....	8
3.3 Metodologi Penelitian .....	8
3.3.1 Koleksi Tanah yang Terinfeksi Nematoda .....	8
3.3.2 Koleksi Nematoda Entomopatogen .....	9

3.3.3 Isolasi Bakteri .....	12
3.4 Determinasi Jenis Bakteri .....	12
IV.HASIL DAN PEMBAHASAN .....	17
4.1 Isolat Bakteri Simbion <i>Steinernema</i> spp. ....	17
4.2 Determinasi Isolat Bakteri Simbion <i>Steinernema</i> spp. ....	18
4.2.1 Karakteristik Morfologi .....	18
4.2.2 Karakteristik Fisiologis .....	22
V.KESIMPULAN DAN SARAN .....	31
5.1 Kesimpulan .....	31
5.2 Saran .....	31
DAFTAR PUSTAKA .....	32
LAMPIRAN .....	35

DAFTAR TABEL

Nomer	<u>Teks</u>	Halaman
1.	Asal Sampel Tanah Dan Pemberian Nama Isolat Bakteri .....	17
2.	Hasil Pengamatan Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Symbion <i>Steinernema</i> spp. ....	20
3.	Ukuran Sel Masing – Masing Isolat Bakteri .....	21
4.	Hasil Pengujian Sifat – Sifat Fisiologis Isolat Pa <sub>3</sub> , I <sub>1</sub> , Pu <sub>1</sub> dan Ce <sub>1</sub> Symbion <i>Steinernema</i> spp. ....	23



DAFTAR GAMBAR

Nomer	<u>Teks</u>	Halaman
1.	Perbanyak Nematoda Entomopatogen <i>Steinernema</i> spp. Secara In Vivo dengan Metode White Trap pada Larva Ulat Bambu .....	10
2.	Perbedaan Warna Kutikula Serangga Inang Terserang Nematoda Entomopatogen .....	10
3.	Bentuk Kepala <i>Steinernema</i> spp. ....	11
4.	Bentuk Ekor <i>Steinernema</i> spp. ....	11
5.	Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Simbion <i>Steinernema</i> spp. Pada Media NA, Mc Concéy dan NBTA .....	19
6.	Perbedaan Warna Koloni Bakteri Pada Fase Primer Dan Fase Sekunder .....	19
7.	Bentuk Sel Bakteri <i>Xenorhabdus</i> spp. ....	22
8.	Hasil Uji Oksidatif Fermentatif .....	25
9.	Hasil Uji Indol .....	25
10.	Hasil Uji Hidrolisa Pati .....	27
11.	Hasil Uji Fluorescens .....	27
12.	Hasil Uji Reduksi Nitrat .....	28
13.	Hasil Uji Bioluminenscens .....	28
14.	Hasil Uji Antibiotik .....	30



ABSTRACT

**Dian Ekowati. 961510401030. The Determination of Isolate Bacteria Symbion Nematode *Steinernema* spp. from Jember, Bondowoso, Probolinggo and Malang. Consulted by the head academic advisor Ir. Rachmi Masnilah, Msi and the member academic advisor Dr. Ir. Wiwik Sri Wahyuni, Msc.**

*Xenorhabdus* spp. is a bacteria associated with *Steinernema* spp., commonly has a function as a biocontrol agent for *Plutella xylostella* L. and *Crocidolomia binotalis* Zell. *Steinernema* spp. was isolated from cabbage plantations from Jember (Pa<sub>3</sub>), Bondowoso (I<sub>1</sub>), and isolated Ce<sub>1</sub> from Probolinggo and Pu<sub>1</sub> from Malang has been provided in the laboratory of Entomology of UNEJ. The bacteria was then isolated from these four isolates of *Steinernema* spp. and characterized. Based on the morphological and physiological test, these four isolates of bacteria (Pa<sub>3</sub>, I<sub>1</sub>, Ce<sub>1</sub> and Pu<sub>1</sub>) were determined as *Xenorhabdus* spp. This bacteria was tolerance at 18 – 37 °C and pH 5 – 7. It is considered that *Xenorhabdus* spp. and *Steinernema* spp. were broadly distribute in Jember, Bondowoso, Probolinggo and Malang.

**Keywords :** Determination, *Xenorhabdus* spp. , *Steinernema* spp.

ABSTRAK

Bakteri *Xenorhabdus* spp. berasosiasi dengan *Steinernema* spp., dan keduanya berfungsi sebagai agens pengendali hayati *Plutella xylostella* L. dan *Crocidolomia binotalis* Zell. *Steinernema* spp. diisolasi dari pertanaman kubis di daerah Jember (Pa<sub>3</sub>), Bondowoso (I<sub>1</sub>), dan isolat Ce<sub>1</sub> dari Probolinggo dan isolat Pu<sub>1</sub> dari Malang diperoleh dari laboratorium Entomologi UNEJ. Bakteri ini kemudian diisolasi dari keempat isolat *Steinernema* spp. tersebut dan dikarakterisasi. Berdasarkan uji morfologi dan fisiologi, keempat isolat bakteri (Pa<sub>3</sub>, I<sub>1</sub>, Ce<sub>1</sub> dan Pu<sub>1</sub>) dideterminasi sebagai *Xenorhabdus* spp. Bakteri ini toleran pada suhu 18 – 37 °C dan pH 5 – 7. *Xenorhabdus* spp. dan *Steinernema* spp. mempunyai daerah penyebaran yang luas di Jember, Bondowoso, Probolinggo dan Malang.

**Kata kunci :** Determinasi, *Xenorhabdus* spp. , *Steinernema* spp.

RINGKASAN

Dian Ekowati. 961510401030. Program Studi Ilmu Hama Dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember. Determinasi Isolat Bakteri Symbion Nematoda *Steinernema* spp. Dari Daerah Jember, Bondowoso, Probolinggo Dan Malang. Skripsi Strata Satu.

Bakteri *Xenorhabdus* spp. berasosiasi dengan nematoda *Steinernema* spp. Symbion tersebut terdapat di dalam intestine *Steinernema* spp. yang kemudian dilepaskan ke dalam tubuh serangga. Bakteri ini berperan dalam proses kematian serangga inang. Secara umum *Xenorhabdus* spp. merupakan agen hayati dalam pengendalian hayati hama *Plutella xylostella* L. dan *Crocidolomia binotalis* Zell.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui (1) karakteristik morfologi, (2) reaksi fisiologi setiap isolat bakteri yang diisolasi dari *Steinernema* spp. dari daerah Jember, Bondowoso, Probolinggo dan Malang, (3) mendeterminasi apakah isolat bakteri tersebut tergolong *Xenorhabdus* spp. dan (4) daerah – daerah sebaran *Xenorhabdus* spp dan *Steinernema* spp. Isolasi nematoda dilakukan dengan metode baiting dan white trap. Nematoda dideterminasi berdasarkan gejala serangan pada serangga dan ciri morfologinya. Isolasi bakteri dari *Steinernema* spp. dilakukan pada medium NA, Mc Concey dan NBTA. Determinasi bakteri dilakukan secara morfologi dan fisiologi.

Bakteri isolat Pa<sub>3</sub> (Jember), I<sub>1</sub> (Bondowoso), Ce<sub>1</sub> (Probolinggo) dan Pu<sub>1</sub> (Malang) yang bersimbiose dengan *Steinernema* spp. mempunyai karakteristik morfologi yang sama baik dari segi ukuran, bentuk maupun warna koloni pada berbagai media tersebut. Reaksi fisiologi dari keempat bakteri uji tersebut juga menunjukkan hasil yang sama. Berdasarkan hasil pengujian morfologi dan fisiologi tersebut maka bakteri yang diuji identik dengan *Xenorhabdus* spp. yang toleran pada suhu 18 – 37 °C dan pH 5 – 7. *Xenorhabdus* spp. dan *Steinernema* spp. mempunyai daerah sebaran yang cukup luas meliputi wilayah Jember, Bondowoso, Probolinggo dan Malang.

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pengendalian serangga hama kubis, *Plutella xylostella* L. dan *Crociodolomia binotalis* Zell. sampai saat ini dilakukan dengan menggunakan insektisida sintetik. Insektisida yang biasa digunakan oleh petani untuk mengendalikan hama *P. xylostella* dan *C. binotalis* diantaranya adalah profenofos, permetrin, deltametrin, diafenturon, derivad bensamid dan klor fluazuron (Udianto dan Sastrosiswojo, 1997). Insektisida sintetik tersebut merupakan bahan kimia sintetik yang efektif membunuh serangga hama kubis tetapi efek lainnya sangat berbahaya terhadap lingkungan, resistensi serangga, resurgensi, dan bahaya lainnya. Akibat pemakaian insektisida yang menimbulkan dampak negatif serta pembatasan pemakaian insektisida tertentu sebagai pengendali serangga hama, maka peluang pengendalian hayati akan semakin besar (Sulistyanto, 1998).

Pengendalian hayati di dalam konsep dasar Pengendalian Hama Terpadu (PHT) memegang peranan yang sangat penting. Penggunaan agensia pengendali hayati makin memperoleh perhatian yang sangat tinggi. Pemanfaatan agensia pengendali hayati dengan nematoda entomopatogen *Steinernema* spp. merupakan salah satu alternatifnya. Nematoda entomopatogen telah banyak dipergunakan untuk mengendalikan serangga hama baik pada tanaman perkebunan, pangan, rumput lapangan golf serta hortikultura (Sulistyanto, 1999).

*Steinernema* spp. telah banyak digunakan untuk pengendalian hama di beberapa negara di Eropa, Australia, Asia dan Cina, sedangkan di Indonesia masih belum dimanfaatkan (Sulistyanto, 1998). *Steinernema* spp. dapat mengendalikan hama – hama golongan Lepidoptera seperti *Galleria mellonella*, *Spodoptera exigua*, *Agrotis ipsilon*, *Ostrinia nubilalis* mencapai 72 – 100 persen, golongan Coleoptera seperti *Tenebrio molitor* mencapai 20 – 100 persen kematian dan golongan Diptera seperti *Liriomyza trifolli* 48 – 98 persen (Caroli *et al.*, 1996).

*Xenorhabdus* spp. merupakan bakteri famili Enterobacteriaceae yang berasosiasi secara spesifik dengan nematoda jenis *Steinernema* spp. (Boemare

*et al.*, 1996). Bakteri simbiosis tersebut terdapat dalam intestine nematoda *Steinernema* spp. yang kemudian dilepaskan di dalam tubuh serangga, dan berperan dalam proses terbunuhnya serangga inang (Jarosz, 1996).

*Xenorhabdus* spp. merupakan bakteri gram negatif, anaerob fakultatif dan berbentuk batang dengan flagella yang peritrih. *Xenorhabdus* spp. diketahui mengekskresikan beberapa senyawa metabolit di dalam medium nutrient broth. Penelitian lebih jauh melaporkan bahwa *Xenorhabdus* spp. tidak bersifat toksik bagi manusia (Boemare *et al.*, 1996).

Mengingat pentingnya peranan bakteri *Xenorhabdus* spp. dalam proses kematian serangga, maka perlu dilakukan penelitian yang hanya menggunakan bakteri secara terpisah dengan nematoda. Hal ini untuk mengetahui karakteristik morfologi dan fisiologi bakteri, sehingga *Steinernema* spp. dan *Xenorhabdus* spp. bisa dikembangkan sebagai agens pengendali hayati dalam PHT.

## 1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui :

1. Karakteristik morfologi setiap isolat bakteri dari *Steinernema* spp. dari daerah Jember, Bondowoso, Probolinggo dan Malang.
2. Reaksi fisiologi setiap isolat bakteri.
3. Apakah bakteri tersebut *Xenorhabdus* spp.
4. Sebaran *Steinernema* spp. dan *Xenorhabdus* spp.

## 1.3 Kegunaan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang karakteristik morfologi dan fisiologi *Xenorhabdus* spp. dan daerah sebaran *Steinernema* spp dan *Xenorhabdus* spp. dari daerah Jember, Bondowoso, Probolinggo dan Malang.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Nematoda Entomopatogen *Steinernema* spp.

Nematoda entomopatogen *Steinernema* spp. termasuk dalam ordo Rhabditidae dan famili Steinernematidae (Chaerani, 1996). *Steinernema* spp. mempunyai siklus hidup sederhana dan mempunyai stadia perkembangan yaitu telur, juvenil dan dewasa. Pada umumnya *Steinernema* spp. ini mengalami empat pergantian kulit sebelum mencapai dewasa dan pergantian kulit juga bisa terjadi di dalam telur, di lingkungan dan di dalam tubuh serangga inang. Siklus hidup dari *Steinernema* spp. terdiri atas empat stadia juvenil (J1 – J4). Stadium infektifnya adalah juvenil ke tiga atau disebut infektif juvenil yang mengandung sel bakteri *Xenorhabdus* spp. dalam intestine. Infektif juvenil dapat hidup bebas (di luar inang) karena mengandung cadangan energi karbohidrat, tidak makan dan bisa hidup dalam beberapa periode yang lama ketika kondisi baik (kelembaban dan temperatur baik, oksigen cukup tersedia) (Woodring dan Kaya, 1988).

Menurut Poinar (1979) saat kontak dengan serangga inang, infektif juvenil mempunyai berbagai cara untuk masuk ke dalam tubuh serangga inang. *Steinernema* spp. masuk ke dalam tubuh serangga inang melalui lubang – lubang alami seperti mulut, anus dan spirakel atau penetrasi langsung melalui integumen. Infektif juvenil kemudian aktif memenetrasi melalui dinding usus tengah atau trachea ke dalam haemocoel (Woodring dan Kaya, 1988). Jarosz (1996) melaporkan bahwa di dalam tubuh serangga, saluran pencernaan nematoda yang semula tertutup mulai aktif bekerja dan melepaskan bakteri dari intestine ke dalam haemolimpa serangga. Bakteri simbiosis tersebut berperan dalam kematian serangga inang dengan memproduksi toksin yang dihasilkan dalam waktu 24 – 48 jam dan menyebabkan septicemia (bakteri masuk hemocoel, multiplikasi, memproduksi racun dan diikuti kematian serangga) (Simoes dan Rosa, 1996).

Chaerani (1996) menyatakan bahwa jaringan tubuh serangga yang telah dibunuh oleh bakteri ini dimanfaatkan oleh nematoda untuk hidup dan berkembang biak sekaligus menelan kembali sel – sel bakteri. Dalam satu tubuh inang serangga nematoda dapat berkembang biak dua sampai tiga generasi (satu generasi berlangsung

10 – 14 hari). Nematoda yang belum dewasa memakan sel bakteri dan jaringan inang kemudian berkembang menjadi dewasa. Pada generasi pertama sampai berikutnya dari *Steinernema* spp. selalu berkembang menjadi dewasa betina dan jantan, dimana betina ukuran tubuhnya lebih besar daripada jantan (Woodring dan Kaya, 1988). Menurut Poinar (1990) *Steinernema* spp. betina dewasa dalam tubuh serangga inang pada stadium awal perkembangan bersifat ovipar, akan tetapi setelah perkembangan lebih lanjut akan menjadi ovovivipar. Dua sampai tiga minggu setelah berkembang dalam tubuh inang, juvenil infektif akan meninggalkan kadaver inang dan mencari inang baru (Kaya dan Stock, 1997).

Pada umumnya gejala serangga yang terserang oleh nematoda entomopatogen adalah adanya perubahan warna tubuh, tubuh menjadi lembek, dan bila dibedah konstitusi jaringan menjadi lunak berair, tetapi tidak berbau busuk. Gejala serangan muncul hanya pada fase primer bakteri yaitu awal nematoda masuk sekaligus mengeluarkan bakteri simbiosis dalam tubuh serangga sampai dua hari setelah penetrasi. Gejala serangan akibat *Steinernema* spp. ditandai dengan perubahan warna karamel (kuning kecoklatan) sampai coklat tua. Kutikula serangga menjadi transparan setelah lebih dari 48 jam terinfeksi nematoda, karena aktivitas enzimatis bakteri *Xenorhabdus nematophilus* yang menyebabkan hancurnya jaringan tubuh serangga inang menjadi lunak berair (Simoës dan Rosa, 1996).

## 2.2 Bakteri Simbiosis Nematoda Entomopatogen *Xenorhabdus* spp.

Ada dua spesies bakteri yang diketahui yaitu *X. nematophilus* dan *Photorhabdus luminiscens*. Akhurst (1980) membagi *X. nematophilus* menjadi empat subspecies yaitu *X. nematophilus*, *X. bovienii*, *X. poinarii* dan *X. beddingii*. Nematoda infektif juvenil menyimpan sekitar 0 - 250 sel bakteri simbiosis di bagian anterior usus yang disebut vesikula (Poinar, 1990 ; Sulistyanto, 1998).

Ehlers *et al.*(1990) menyatakan bahwa *Xenorhabdus* spp. mempunyai dua bentuk fase yang berbeda yaitu fase primer dan fase sekunder. Perbedaan koloni yang jelas terlihat pada media NBTA atau Mc Concey agar. Morfologi fase primer secara umum adalah granuler, lebih convex daripada fase sekunder, opak, sirkular dengan

tepi agak rata dan ukuran lebih kecil dibandingkan dengan koloni fase sekunder. Fase sekunder berbentuk flat, translusen dengan tepi tidak rata, mempunyai diameter lebih besar dibanding fase primer (Krasomil-Osterfelt, 1994; Woodring dan Kaya, 1988 ; Akhurst, 1980). Fase primer mayoritas mempunyai badan inklusi seperti empat persegi panjang, sedangkan pada fase sekunder tidak ditemukan ( Kaya dan Stock, 1997 ).

Krasomil-Osterfeld (1994) mengemukakan bahwa fase primer tidak dapat bertahan lama(tidak stabil) baik secara *in vivo* maupun *in vitro* dan akan segera berubah ke fase sekunder yang mempunyai kecenderungan stabil dan sel bakteri berbentuk batang panjang. Sel bakteri fase primer berbentuk batang pendek (Boemare *et al.*, 1996). Bakteri *Xenorhabdus* spp. mempunyai karakteristik fisiologi antara lain gram negatif, tidak memiliki enzim katalase, bioluminenscens negatif, memfermentasi laktosa, pencairan gelatin positif, mempunyai aktivitas antibiotik terhadap bakteri tertentu (Woodring dan Kaya, 1988), anaerob fakultatif dan nonfluorescens (Aguillera *et al.*, 1993). Bakteri simbion *Xenorhabdus* spp. fase primer menghasilkan senyawa antibiotik, lekhitinase serta menyerap bahan tertentu dari media pertumbuhan, sebaliknya pada fase sekunder hal tersebut tidak terjadi (Woodring dan Kaya, 1988).

*Xenorhabdus* spp. memproduksi substansi antibiotik pada agar, tetapi substansi tersebut tidak dikeluarkan oleh fase sekunder, kecuali beberapa strain dari *X. poinarii*. Antibiotik tersebut adalah derivat indol, trans-stileben derivat, xenorhabdins, xenocoumacins dan bakteriosin (Boemare *et al.*, 1993) yang di dalam tubuh serangga menciptakan suasana ideal bagi pertumbuhan dan perkembangan bakteri dan menghambat bakteri selain *Xenorhabdus* spp.

Jarosz (1996) mengungkapkan bahwa fase primer pada *X. nematophilus* dapat menghambat beberapa bakteri *Bacillus* spp. (*B. cereus*, *B. brevis*, *B. subtilis* dan *B. alvei*), *Escherecia coli*, *Micrococcus luteus* dan *Enterobacter cloacae*, tetapi fase sekunder tidak. Adanya aktivitas antibiotik dapat menghambat bakteri selain *Xenorhabdus* spp. dalam proses infeksi tetapi hal ini bukan merupakan mekanisme yang pasti. Bakteri *Xenorhabdus* spp. juga menghasilkan enzim lekhitinase, protease,

entomotoksin (eksotoksin dan endotoksin), DNase dan phosphatase yang mempengaruhi proses kematian serangga (Boemare *et al.*, 1996).

### 2.3 Hubungan *Steinernema* spp. dan *Xenorhabdus* spp. dalam simbiose mutualisme

Bakteri *Xenorhabdus* spp. bersimbiose mutualisme dengan *Steinernema* spp. (Boemare *et al.*, 1996). Mutualisme merupakan suatu bentuk simbiosis antara dua spesies, dan masing – masing berinteraksi untuk mendapatkan keuntungan. Jika terpisah, maka masing – masing individu tidak atau kurang dapat bertahan diri. Bakteri tidak dapat hidup dan tidak pernah ditemukan secara tersendiri di alam selain di dalam tubuh serangga terinfeksi dan nematoda. Nematoda bisa mendapatkan nutrisi dari bakteri, berperan memberi proteksi dan merupakan vektor dari bakteri dari satu inang ke inang lainnya, dan mematahkan mekanisme pertahanan serangga terhadap infeksi dan toksin yang dihasilkannya (Chaerani, 1996; Dwijiseputro, 1990). Tanpa adanya sel bakteri simbion dalam kadaver inang, maka nematoda tidak dapat berkembang biak dengan baik (Poinar dan Thomas, 1996 dalam Sulistyanto, 1998).

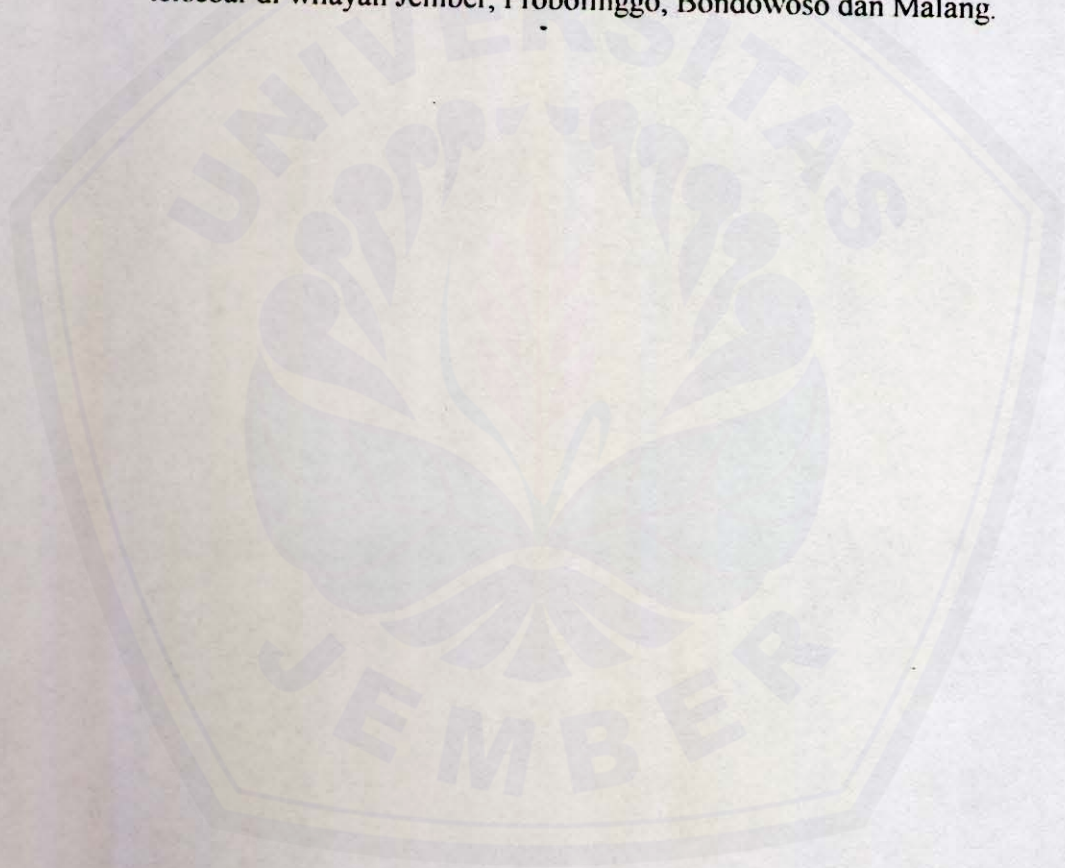
Boemare *et al.*(1996) menyatakan bahwa nematoda berinteraksi sangat spesifik hanya dengan satu spesies bakteri, tetapi bakteri dapat berinteraksi dengan lebih dari satu nematoda entomopatogen.

Nematoda entomopatogen melepas bakteri ke dalam haemocoel serangga inang dan bakteri memberikan beberapa keuntungan yaitu : (1) dapat membunuh inang dengan cepat (24 – 48 jam), (2) membuat suasana lingkungan yang sangat cocok bagi perkembangan nematoda dengan memproduksi antibiotik yang dapat menghambat mikroorganisme sekunder dan (3) menyediakan sumber nutrisi yang siap pakai untuk nematoda. Bakteri memerlukan nematoda untuk melindungi dari lingkungan eksternal yang merugikan dan melindungi bakteri dari kemungkinan adanya toxin yang dikeluarkan oleh serangga inang (Kaya dan Gaugler, 1993 dalam Sulistyanto, 1998).



#### 2.4 Hipotesis

1. Isolat bakteri yang diisolasi dari *Steinernema* spp. mempunyai karakteristik morfologi yang berbeda.
2. Apabila morfologi isolat bakteri tersebut berbeda kemungkinan reaksi fisiologinya juga berbeda.
3. Berdasarkan uji morfologi dan fisiologi isolat bakteri, diduga bahwa bakteri tersebut adalah *Xenorhabdus* spp.
4. Ada kemungkinan *Steinernema* spp. dan bakteri *Xenorhabdus* spp. tersebar di wilayah Jember, Probolinggo, Bondowoso dan Malang.



### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Perlindungan Tanaman, Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Jember mulai bulan Mei sampai Oktober 2000.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Steinernema* spp., bakteri (isolat Pa<sub>3</sub>, I<sub>1</sub>, Pu<sub>1</sub> dan Ce<sub>1</sub>), larva *T. molitor*, larva ulat bambu, air steril, 15 % gliserin, kertas filter Whatman no.1, 70 % alkohol, parafin dan kapas. Media yang digunakan adalah media YS (Yeast Salt), NBTA (Nutrient Bromothymol Blue Agar), Mc Concey, NA (Nutrient Agar), Nutrient broth, media uji hidrolisa pati, media uji reduksi nitrat, media uji oksidatif fermentatif, media uji indol, media uji levan sukrosa dan King's B. Di samping itu juga gram A, gram B, gram C, gram D, reagent kovac, 3 % KOH, 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, larutan iodium, iodium pati, NaOH 1 N, dan HCl 1 N (komposisi media dan reagent terdapat pada Lampiran 1).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas aqua, gunting, pipet, tabung penyimpanan, jarum ose, eppendorf tube, petridish, inkubator, lemari pendingin, gelas obyek, erlenmeyer, penggojok, mikroskop, bunsen, tabung reaksi, mikrometer, pH meter dan laminar air flow.

#### 3.3 Metodologi Penelitian

##### 3.3.1 Koleksi Tanah yang Terinfestasi Nematoda

Nematoda entomopatogen yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah berasal dari Jember (Panti), Bondowoso (Ijen), Probolinggo (Cemoro Lawang) dan Malang (Pujon). Nematoda entomopatogen yang berasal dari Probolinggo dan Malang sudah tersedia di laboratorium dan sudah diidentifikasi sebagai *Steinernema* spp. (Bahari, 1999). Metode yang digunakan adalah dengan mengambil sampel – sampel tanah dari berbagai wilayah endemik hama kubis *P. xylostella* dan *C. binotalis* yang diambil pada kedalaman 5 – 10 cm secara random. Pengambilan sampel tanah dari

daerah Jember dan Bondowoso dilakukan secara acak pada areal pertanaman kubis sebanyak lima kali per lokasi. Selanjutnya sampel dijadikan satu dan diaduk, kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik dan diberi label lokasi pengambilan sampel. Sampel tanah dibawa ke laboratorium.

### 3.3.2 Koleksi Nematoda Entomopatogen

#### a. Koleksi Nematoda Entomopatogen

Isolasi nematoda dilakukan dengan menggunakan metode baiting yaitu larva *T. molitor* dimasukkan dalam tanah (200 g per baiting) sebanyak 4 ekor, dengan 20 ulangan untuk masing – masing daerah. Setelah 7 hari larva yang mati kemudian diambil untuk mendapatkan nematoda. Hasil dari metode baiting, nematoda diinokulasikan pada ulat bambu. Apabila ulat bambu sudah mati, kemudian di white trap (Bedding dan Akhurst, 1975 dalam Kaya dan Stock, 1997) (Gambar 1) yaitu dengan cawan petri diisi air steril dan ulat bambu yang mati diletakkan melingkar diatas kertas saring Whatmann no.1, setelah 1 – 2 minggu infeksi juvenil dari nematoda sudah bisa dipanen dengan menyaring air yang berisi nematoda dengan saringan 30  $\mu\text{m}$  dan 15  $\mu\text{m}$  dan hasilnya disimpan dalam tabung penyimpanan yang berisi air steril pada suhu 5 °C.

#### b. Determinasi Nematoda

Determinasi nematoda dilaksanakan di laboratorium Pengendalian Hayati Universitas Jember dengan melihat gejala yang ditimbulkan pada serangga dan ciri-ciri morfologinya. Serangga yang terinfeksi oleh *Steinernema* spp. berwarna coklat karamel sampai kehitaman, tubuh serangga lunak dan tidak terlihat menyala dalam ruangan gelap (Gambar 2). Selain itu dari bentuk kutikula kepalanya yang halus (Gambar 3) dan ekornya yang tumpul (Gambar 4).



Gambar 1. Perbanyakkan *Steinernema* spp. secara *in vivo* dengan metode White trap pada larva ulat bambu.



Gambar 2. Perbedaan warna kutikula serangga inang terserang nematoda Entomopatogen. a. Kontrol, b. *Steinernema* spp. (coklat kehitaman), c. *Heterorhabditis* spp. (kemerahan).



Gambar 3. Bentuk kepala *Steinernema* spp.



Gambar 4. Bentuk ekor *Steinernema* spp.

### 3.3.3 Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri yang bersimbiose dengan *Steinernema* spp. dilakukan dengan cara menginokulasikan nematoda tersebut pada ulat bambu. Setelah 24 – 48 jam serangga mati, kemudian permukaan serangga disterilisasi dengan alkohol 70 % selama 10-15 menit, kemudian dibilas dengan air steril dan dikeringanginkan di atas kertas filter steril. Haemolimph diperoleh dengan memotong tungkai ulat bambu, kemudian digoreskan pada media Mc. Concey atau NBTA dan diinkubasikan dalam inkubator selama 24 jam untuk mendapatkan bakteri bentuk primer. Koloni merah muda diambil dari Mc Concey dan dimurnikan hingga diperoleh koloni tunggal. Kemudian dibiakkan pada media YS selama 24 jam dan digoyang. Setelah itu bakteri diberi 15 % glyserin dan disimpan dalam eppendorf tube yang berukuran 1,5 ml pada suhu – 20°C.

### 3.4 Determinasi Jenis Bakteri

#### I. Uji Karakteristik Morfologi Isolat Bakteri

Determinasi jenis bakteri nematoda entomopatogen isolat lokal dilakukan dengan melihat karakteristik morfologi bakteri yang ditumbuhkan pada beberapa media yang berbeda antara lain NA, Mc. Conkey, dan NBTA (Gerritsen dan Krasomil-Osterfeld, 1994) dan mengamati penyerapan warna, bentuk koloni dari masing – masing isolat. Untuk pengamatan bentuk dan ukuran sel secara mikroskopis digunakan pengecatan gram (Lay, 1994).

Gelas obyek yang telah dibersihkan dengan 70 % alkohol dipanaskan di atas nyala lampu bunsen. Bakteri yang telah ditumbuhkan 24 jam diambil sebanyak satu ose diletakkan pada gelas obyek, kemudian dikeringanginkan dan difiksasi di atas nyala lampu bunsen. Bila preparat sudah dingin ditetesi dengan cat gram A (Hucker's Crystal Violet) sebanyak 2-3 tetes selama satu menit, kemudian cuci dengan air mengalir. Tetesi dengan gram B (Lugol's iodine) selama satu menit, cuci dengan air mengalir dan keringanginkan. Sebagai peluntur cat, tetesi dengan gram C (Alkohol) selama 30 detik, cuci dengan air mengalir dan keringanginkan. Tetesi dengan gram D (Safranin) selama dua menit, cuci dengan air mengalir dan keringanginkan. Hasilnya

diamati dengan mikroskop pembesaran 1000 kali untuk membandingkan besar dan bentuk sel masing – masing bakteri.

## **II. Uji Fisiologis Isolat Bakteri**

### **a. Uji Gram**

Uji gram dengan menggunakan 3% KOH bertujuan untuk membedakan sifat reaksi gram bakteri. Pada pengujian ini digunakan biakan bakteri yang berumur 24 jam. Gelas obyek dibersihkan dengan 70% alkohol untuk menghilangkan kotoran atau lemak yang ada. Kemudian gelas obyek dikeringkan dengan cara dipanaskan diatas api bunsen. Pada gelas obyek tersebut diteteskan satu tetes 3% KOH, kemudian diletakkan satu ose isolat bakteri yang akan diuji, dicampur dan diaduk sampai merata. Setelah kurang lebih 10 detik, campuran isolat bakteri dengan 3% KOH tadi diangkat perlahan - lahan dengan menggunakan jarum ose. Jika campuran bersifat lengket setelah diangkat sekitar 1 cm, maka bakteri tersebut bersifat gram negatif (Fahy dan Hayward, 1983).

### **b. Uji Katalase**

Pada pengujian ini digunakan biakan bakteri yang berumur 24 jam. Gelas obyek dibersihkan dengan 70% alkohol kemudian dikeringkan dengan cara dipanaskan diatas api bunsen. Pada gelas obyek tersebut diteteskan satu tetes 3%  $H_2O_2$ , kemudian diletakkan satu ose bakteri yang akan diuji, dicampur dan diaduk sampai merata. Reaksi positif ditandai dengan terdapatnya gelembung - gelembung udara, karena bakteri menghasilkan enzim katalase yang menghidrolisis 3%  $H_2O_2$  menjadi air dan oksigen. Sedangkan reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung-gelembung udara (Hadioetomo, 1993).

### **c. Uji Hidrolisa Pati**

Isolat bakteri yang berumur 24 jam diinokulasikan pada cawan petri yang berisi medium pati kurang lebih 10 ml dan diinkubasikan selama 3 -5 hari pada suhu kamar. Setelah diinkubasikan biakan kemudian ditambah dengan larutan iodium sebanyak 2 - 3 tetes. Reaksi positif ditandai dengan warna kontras di koloni. Sedangkan reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya bagian berwarna kontras sekitar koloni dan seluruh medium berwarna hitam (Lay, 1994).

**d. Uji Reduksi Nitrat**

Isolat bakteri yang berumur 24 jam diinokulasikan pada cawan petri yang berisi medium pati kurang lebih 10 ml dan diinkubasikan selama 3 - 5 hari pada suhu kamar. Setelah diinkubasikan biakan kemudian ditambah dengan larutan iodium pati sebanyak 5 - 10 tetes. Reaksi positif ditandai dengan terjadinya warna biru pada medium setelah ditetesi reagent (Fahy dan Hayward, 1983).

**e. Uji Oksidatif - Fermentatif**

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui apakah karbohidrat tunggal (biasanya glukosa) dapat dimanfaatkan oleh bakteri pada proses fermentasi atau oksidasi. Uji ini dilakukan dengan menusukkan isolat bakteri pada kedua jenis media oksidatif - fermentatif yaitu media yang ditutup minyak parafin dan yang tanpa minyak parafin. Kemudian media tersebut diinkubasikan pada suhu kamar selama 14 hari. Terjadinya perubahan warna dari biru menjadi kuning, menunjukkan adanya produksi asam pada tabung yang tidak tertutup, akan tetapi pada tabung yang tertutup menunjukkan adanya metabolisme fermentatif dari glukosa (Fahy dan Hayward, 1983, Lelliot dan Stend, 1987).

**f. Uji Pencairan Gelatin**

Sebelum dilakukan pengujian terlebih dahulu dipersiapkan tabung reaksi yang berisi media nutrien yang telah ditambah 10 ml 12% gelatin tiap tabung. Selanjutnya disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media yang telah disterilisasikan tersebut kemudian diinokulasi dengan kultur bakteri yang diuji. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu kamar selama 14 hari. Untuk mengetahui reaksinya, tabung yang telah diinkubasikan terlebih dahulu disimpan pada suhu 5 °C selama 2 jam. Reaksi positif ditandai dengan pencairan gelatin pada tabung yang diinokulasi (Lelliot dan Stead, 1987).

**g. Uji Indol**

Bakteri yang berumur 24 jam ditumbuhkan pada medium indol dan diinkubasikan selama 2 - 5 hari pada suhu ruang. Setelah diinkubasikan, biakan ditetesi dengan reagen kovac sebanyak 10 - 12 tetes. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah pada medium setelah ditetesi reagent, yang berarti bakteri dapat membentuk indol (Lay, 1994).



#### **h. Uji Levan Sukrose**

Uji ini bertujuan untuk mengetahui pembentukan enzim levan sukrose. Bakteri ditumbuhkan pada cawan petri yang berisi 5 – 10 ml NA yang telah ditambahkan 5 % sukrose. Kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama dua hari. Bakteri yang membentuk enzim levan sukrose akan memperlihatkan karakter koloni yang transparan sampai buram, bercahaya, berlendir (mucoid) dengan bentuk cembung yang jelas (Fahy dan Hayward, 1983).

#### **i. Uji Fluorescens**

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui fluorescens, pijaran warna hijau atau biru. Bakteri yang akan diuji ditumbuhkan pada medium King's B dan diinkubasikan selama tiga hari pada suhu kamar. Bila dibawah sinar ultraviolet bakteri berpendar hijau kebiruan maka bakteri menghasilkan senyawa fluorescens dan uji ini bersifat positif (Lelliot dan Stead, 1987).

#### **j. Uji Pertumbuhan Pada Berbagai Suhu**

Tabung yang berisi kaldu nutrien broth ditandai dengan suhu inkubasi 5<sup>o</sup>C, 18<sup>o</sup>C, 25<sup>o</sup>C, 37<sup>o</sup>C dan 44<sup>o</sup>C. Kemudian menandai pula dengan nama biakan yang akan diinokulasikan. Bakteri diinokulasikan pada nutrient broth, kemudian meletakkan nutrient broth untuk suhu 5<sup>o</sup>C di dalam lemari es, 18<sup>o</sup>C, 25<sup>o</sup>C, 37<sup>o</sup>C dan 44<sup>o</sup>C di dalam inkubator. Setelah ditumbuhkan selama 48 jam, kocok keempat tabung dan bandingkan derajat kekeruhannya (Lay, 1994).

#### **k. Uji Antibiotik**

Bakteri *Bacillus pumilus* dibiakkan dalam media YS dan diinkubasi selama 24 jam dalam shaker 400-500 rpm. *B. pumilus* dituang ke petridish, kemudian NA dituangkan dan digoyang sampai *B. pumilus* tercampur. Kertas filter steril dengan ukuran ± 0,5 cm pada bakteri simbiose *Steinernema* spp. diletakkan pada media NA tersebut sebanyak empat titik dan kemudian diinkubasikan pada suhu kamar. Zona penghambatan disekitar bakteri simbiose *Steinernema* spp. diamati pada saat 24 dan 48 jam (Seeley dan Denmark, 1971).

#### **l. Uji Bioluminenscens**

Pengujian ini bertujuan untuk membedakan jenis bakteri dari golongan *Xenorhabdus* dan *Photorhabdus*. Nematoda entomopatogen dari golongan

*Heterorhabditis* bersimbiose dengan bakteri *Photorhabdus* yang menghasilkan bioluminenscens (Boemare, *et al.*, 1996). Bakteri yang diuji disuntikkan ke dalam tubuh serangga ulat bambu sebanyak 0,01 ml, dan setelah 24 jam serangga yang mati diamati perubahan warna tubuh serangga. Warna kemerahan pada tubuh serangga yang mati menunjukkan bahwa bakteri tersebut dari golongan *Photorhabdus*. Sedangkan warna coklat karamel pada tubuh serangga menunjukkan bakteri tersebut berasal dari golongan *Xenorhabdus*.

#### **m. Uji Pengaruh pH**

Membuat media nutrient broth dengan berbagai macam pH yaitu 4, 5, 6, 7, dan 8, dengan menambahkan NaOH 1 N untuk basa dan HCl 1 N untuk asam sampai diperoleh pH 4, 5, 6, 7 dan 8. Menginokulasikan bakteri simbion *Steinernema* spp. ke dalam media nutrient broth pada berbagai pH tersebut sebanyak satu ose. Diinkubasikan selama 24 – 48 jam pada suhu kamar, amati dan bandingkan derajat kekeruhannya (Lay, 1994).

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan pada hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Isolat bakteri Pa<sub>3</sub>, I<sub>1</sub>, Ce<sub>1</sub> dan Pu<sub>1</sub> yang diisolasi dari *Steinernema* spp. mempunyai karakteristik morfologi yang sama ditinjau dari segi ukuran, bentuk elevasi maupun koloni pada media NA, Mc Concey dan NBTA.
2. Isolat bakteri Pa<sub>3</sub>, I<sub>1</sub>, Ce<sub>1</sub> dan Pu<sub>1</sub> tersebut mempunyai reaksi fisiologis yang sama.
3. Berdasarkan ciri morfologi dan fisiologi maka isolat bakteri Pa<sub>3</sub>, I<sub>1</sub>, Ce<sub>1</sub> dan Pu<sub>1</sub> merupakan satu genus yaitu *Xenorhabdus* spp. yang toleran pada suhu 18 – 37 °C dan pH 5 – 7.
4. *Steinernema* spp. dan *Xenorhabdus* spp. mempunyai daerah sebaran di wilayah Jember, Bondowoso, Probolinggo dan Malang.

### 5.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut terhadap uji virulensi bakteri isolat Pa<sub>3</sub>, I<sub>1</sub>, Ce<sub>1</sub> dan Pu<sub>1</sub> terhadap serangga hama dengan konsentrasi tertentu sehingga diperoleh isolat bakteri yang mampu berperan sebagai agens pengendali hayati.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhurst, R.J., 1980, Morphological and Functional Dimorphism in *Xenorhabdus* spp. Bacteria symbiotically Associated with Insect Pathogenic Nematodes Neoplectana and Heterorhabditis, pp. 1- 2 in (Ehlers, R.U., S. Stoessel and V. Wyss, Eds), *The Influence of Phase Variants of Xenorhabdus spp. And Escherichia coli (Enterobacteriaceae) on The Propagation of Entomopathogenic Nematodes of The Genera Steinernema and Heterorhabditis?*, Institute für Phytopathologic, Federal Republic of Germany.
- Alcano, I. E., 1983, *Laboratory Fundamentals of Microbiology*, Addison-Wesley Publishing Company, New York.
- Aguillera, M.M, N.C. Hodge, R.E. Stall and G.C. Smart, Jr., 1993, Bacterial symbionts of *Steinernema scapterisci*, *Invert. Pathol.* 62 : 68 –72.
- Boemare, N.E., M.H. Boyer – Giglo, J.O. Thaler and R.J. Akhurst, 1993, The phages and bacteriocins of the nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp., *Nematodes and The Biological Control of Pests* 3 : 137 – 145.
- Boemare, N.E., E.A. Hernandez, Z. Bacek, 1994, *Steinernema Cubana* sp.n. (Nematoda : Rhabditida : Steinernematidae) and the binary characterization of its associated bacterium, *Invert. Pathol.* 64 : 88 – 89.
- Boemare, N.E., C. Laumond and H. Mauleon, 1996, The entomopathogenic nematode – bacterium complex, biology, life cycle and vertebrate safety, *Biocontrol. Sci Technol.* 6 : 333 – 346.
- Bahari, R., 1999, Inventarisasi, Isolasi dan Identifikasi Nematoda Entomopatogen *Steinernema* spp dan *Heterorhabditis* spp Pada Tanaman Hortikultura di Jawa Timur, *Skripsi, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember*, September 1999, Tidak Dipublikasikan.
- Chaerani, M., 1996, *Nematoda Patogen Serangga*, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor, Bogor.
- Dwidjoseputro, D., 1990, *Dasar – Dasar Mikrobiologi*, Djambatan, Jakarta.
- Ehlers, R.U., S. Stoessel and V. Wyss, 1990, The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp. and *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*, *Review. Nematol.* 4 : 417-424

- Fahy, P.C. dan A.C. Hayward, 1983, Media and Methods for Isolation Diagnostic Test, pp. 337 – 378, dalam (P.C. Fahy dan G.J.Persley, Eds), *Plant Bacterial Diseases : A Diagnostic Guide*, Academic Press, Sidney.
- Hadioetomo, R.S., 1993, Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium, Gramedia, Jakarta.
- Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun, Suhadi dan Susanto, 1972, *Dasar Dasar Mikrobiologi*, Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta.
- Jarosz, J., 1996, Do antibiotic compound produced in vitro by *Xenorhabdus nemathophilus* minimize the secondary invasion of insect carcasses by contaminating bacteria ?, *Nematologyca* 42 : 367 – 377.
- Kaya, H.K., and S.P.Stock, 1997, *Techniques in Insect Nematology*, Departement of Nematology, University of California USA and College of Natural Sciences and Museum, National University of La Plata Argentina.
- Krasomil-Osterfeld, K. C., 1994, Phase Variation in Photorhabdus, Xenorhabdus and Other Bacteria. A Review, pp. 194 – 203 in (A. M. Burnell, R. U. Ehlers and J. P. Masson, Eds), *Biotechnol : Genetics of Entomopatogenic Nematode-Bacterium Complex*, European Commision Directorate General XII, Science, Research and Development Environment Research Programme, Luxembourg.
- Lelliot, R.A. and D.E.Stead, 1987, *Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases on Plants*, 2<sup>nd</sup> Ed, Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Lay, B. W., 1994, *Analisis Mikroba di Laboratorium*, Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Nealson, K.H., T.M. Schmidt and B. Bleakley, 1990, *Physiology and Biochemistry of Xenorhabdus*, CRC Boca Raton, Florida.
- Poinar, G.O.Jr., 1979, *Nematodes for Biological Control of Insect*, CRC. Boca Raton, Florida.
- , 1990, Taxonomy and Biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae, pp.23-60, in (R. Gaugler and H.K.Kaya, eds) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, CRC Press Boca Raton, Florida.
- Seeley, H.W. and P.J.V. Denmark, 1971, *Selected Exercises from Microbes in Action*, W.H. Freeman and Company, San Francisco and London.

Simoës, N. and J.S. Rosa, 1996, Pathogenicity and host specificity of entomopathogenic nematodes, *Biocontrol. Sci. Technol.* 6 : 403 – 411.

Sulistiyanto, D., 1988, Biopestisida sebagai alternatif pengendali serangga hama yang berwawasan lingkungan, *Makalah Seminar Interdisipliner Universitas Jember*, 24 Agustus 1988.

—————, 1999, Prospek Aplikasi Nematoda Entomopatogen *Steinernema* spp. Isolat Lokal pada Serangga Hama *Plutella xylostella*, *Crocidolomia* sp., *Hypothenemus hampei* dan *Spodoptera litura*, *Makalah Seminar KIPNAS VII Puspiktek Serpong*, 9 – 11 September 1999.

Thomas, G.M and G.O. Jr. Poinar, 1979, *Xenorhabdus* gen. Nov., a genus of entomopathogenic, *Systematic Bacteriology*, 29 : 352 – 360.

Udiarto, B.K. dan S. Sastrosiswojo, 1997, Selektivitas beberapa jenis insektisida terhadap larva *Plutella xylostella* L. dan parasitoid Imago *Diadegma semiclausum* Hellen., *Hortikultura*, 4 : 810 – 817.

Woodring, J.L. and H.K. Kaya, 1988, Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes : A handbook of biology and techniques, *Bull.* 331: 1 - 12 , Arkansas Agriculture Experiment Station.

**LAMPIRAN 1. Komposisi Berbagai Mèdia dan Reagent**

1. King's B

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Protese Pepton	20 g
2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
3	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,2 g
4	Agar	15 g
5	Gliserol	10 g
6	Aquadest	1000 ml

2. Oksidatif – Fermentatif

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Pepton	1 g
2	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
3	KCL	0,2 g
4	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
5	BTB	0,08 g
6	Agar	3 g
7	Aquadest	1000 ml

3. Indol

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Tripton	10 g
2	Aquadest	1000 ml

4. Levan Sukrose

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Pepton	5 g
2	Beef Extrack	3 g
3	Glukose	2,5 g
4	Agar	15 g
5	Aquadest	1000 g
6	Ditambah 5 % Sukrosa	ml

5. Nutrient Broth

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Nutrient Broth	
2	H <sub>2</sub> O	1000 ml

## 6. Pencairan Gelatin

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Pepton	5 g
2	Yeast Extract	3 g
3	Gelatin	120 g
4	Aquadest	1000 ml

## 7. Hidrolisa Pati

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Agar	15 g
2	Pati	2 g
3	Pepton	5 g
4	Beef Extract	3 g
5	Aquadest	1000 ml

## 8. Reduksi Nitrat

No	Nama Bahan	Jumlah
1	KNO <sub>3</sub>	1 g
2	Yeast Extract	1 g
3	Pepton	10 g
4	Aquadest	1000 ml

## 9. Yeast Salt

No	Nama Bahan	Jumlah
1	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
3	NaCl	0,5 g
4	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
5	Yeast Extract	5 g
6	H <sub>2</sub> O	1000 ml

## 10. Mc Concey

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Mc Concey	50 g
2	H <sub>2</sub> O	1000 ml

## 11. Nutrient Agar

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Nutrient Agar	37 g
2	H <sub>2</sub> O	1000 ml



## 12. NBTA

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Nutrient Agar	37 g
2	Bromthymol Blue	25 g
3	H <sub>2</sub> O	1000 ml
4	TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride)	4 ml

## 13. Hucker's Crystal Violet (Gram A)

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Crystal violet	3 g
2	Alkohol 95 %	20 ml
3	Amonium oksalat cp	0,8 g
4	Aquadest	80 ml

## 14. Lugol's Iodine (Gram B)

No	Nama Bahan	Jumlah
1	I <sub>2</sub> cp	5 g
2	KJ cp	0,2 g
3	Aquadest	100 ml

## 15. Safranin (Gram D)

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Safranin	0,5 g
2	Alkohol 95 %	10 ml
3	Aquadest	100 ml