



**KARAKTERISTIK BAKTERI SIMBION NEMATODA  
ENTOMOPATOGEN *Heterorhabditis* spp.  
( *Dhotorhabdus luminenscens* )**

**KARYA ILMIAH TERTULIS  
( SKRIPSI )**

Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat Untuk  
Menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu (S1)  
Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan  
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh :

Muchlisin

961510401035

Asal : Hadiah  
Pembelian  
Terima : Tgl. 10 MAR 2001  
No. Induk : 102.335.440

Klass

632

MUL

k.

C-1

**PROGRAM STUDI ILMU HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN  
FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS JEMBER**

**FEBRUARI, 2001**

**PEMBIMBING :**

Ir. Rachmi Masnilah, MSi (DPU)

Ir. Abdul Majid, MP (DPA)

Diterima oleh :

**FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS JEMBER**

Sebagai Karya Ilmiah Tertulis •

Dipertahankan pada :

Hari : Jumat

Tanggal : 9 Februari 2001

Tempat : Fakultas Pertanian  
Universitas Jember

**Tim Penguji**

**Ketua**



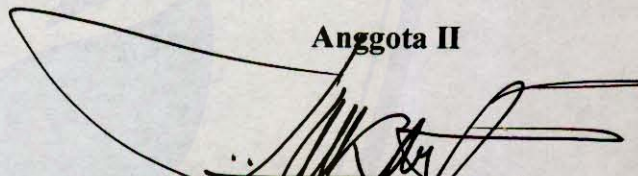
**Ir. Rachmi Masnilah, Msi**  
NIP. 131 797 672

**Anggota I**



**Ir. Abdul Majid, MP**  
NIP. 132 003 094

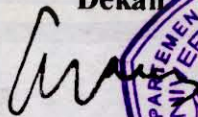
**Anggota II**



**Ir. Soekarto, MS**  
NIP. 131/125 972

**Mengetahui**

**Dekan**



**Ir. Arie Mudjiharjati, MS**  
NIP. 130 609 808



## KATA PENGANTAR

Puja dan puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang dengan segala rahmatnya sehingga Karya Ilmiah Tertulis yang berjudul “**Karakteristik Bakteri Simbion Nematoda Entomopatogen *Heterorhabditis* spp. (*Photorhabdus luminescens*),**” dapat terselesaikan.

Karya Ilmiah Tertulis disusun berdasarkan hasil penelitian yang dilaksanakan sejak April 2000 sampai dengan Oktober 2000 guna melengkapi persyaratan dalam menyelesaikan studi program Strata satu (S1) pada Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Keberhasilan penelitian tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, maka penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember
2. Ketua Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan
3. Ir. Rachmi Masnilah, MSi selaku dosen pembimbing utama, Ir. Abdul Majid, MP selaku dosen pembimbing anggota I dan Ir. Soekarto, MS sebagai dosen pembimbing anggota II yang telah memberikan bimbingan, dorongan dan koreksi sejak awal penelitian hingga terselesaikannya penulisan Karya Ilmiah Tertulis.
4. Serta semua pihak yang telah membantu dan tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis berharap semoga Karya Ilmiah Tertulis dapat memberikan pengetahuan dan bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Jember, Februari 2001

Penulis

## DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
PEMBIMBING .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
ABSTRAK.....	x
RINGKASAN .....	xii
I. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	2
1.3 Kegunaan .....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	3
2.1 Nematoda Entomopatogen .....	3
2.2 Hubungan Bakteri <i>P. luminescens</i> dengan Nematoda Entomopatogen <i>Heterorhabditis</i> spp. ....	3
2.3 Karakteristi Morfologi dan Fisiologi Bakteri <i>P. luminescens</i> .....	4
2.4 Hipotesis .....	5
III.METODOLOGI PENELITIAN .....	6
3.1 Tempat Penelitian .....	6
3.2 Bahan dan Alat .....	6
3.3 Metodologi Penelitian .....	6
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	14
4.1 Karakteristik Bakteri Nematoda Entomopatogen <i>Heterorhabditis</i> spp. ( <i>P. luminescens</i> ).....	14
4.1.1 Karakteristik Morfologi .....	14

# Digital Repository Universitas Jember

4.1.2 Karakteristik Fisiologi .....	18
4.1.3 Aktivitas Antibiotik Bakteri <i>P. luminescens</i> Pada <i>B. pumillus</i> .....	28
V. KESIMPULAN DAN SARAN .....	30
5.1 Kesimpulan .....	30
5.2 Saran .....	30
DAFTAR PUSTAKA .....	31
LAMPIRAN .....	34



DAFTAR TABEL

	halaman
1. Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Simbion Nematoda Entomopatogen <i>P. luminescens</i> .....	15
2. Pengamatan Bentuk dan Ukuran Bakteri Simbion Nematoda Entomopatogen <i>P. luminescens</i> .....	18
3. Hasil Pengujian Karakteristik Fisiologi Bakteri <i>P. luminescens</i> .....	18
4. Hasil Pengujian Pengaruh Suhu Pada Pertumbuhan Bakteri <i>P. luminescens</i> .....	26
5. Hasil Pengujian Pengaruh pH pada Pertumbuhan Bakteri <i>P. luminescens</i> .....	27
6. Hasil Pengukuran Aktivitas Antibiotik Bakteri <i>P. luminescens</i> terhadap <i>B.pumillus</i> .....	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Perbanyak Nematoda Entomopatogen Secara <i>In Vivo</i> .....	8
2. Gejala Infeksi Nematoda Entomopatogen Pada Ulat Bambu .....	9
3. Morfologi Koloni Bakteri <i>P. luminescens</i> Isolat Lokal .....	14
4. Koloni Sekunder Pada Media NBTA .....	16
5. Morfologi Sel Bakteri <i>P. luminescens</i> .....	17
6. Koloni Bakteri Pada Uji Pembentukan Indol .....	20
7. Koloni Bakteri Pada Uji Hidrolisa Pati .....	22
8. Koloni Bakteri Pada Media <i>King'B</i> .....	23
9. Koloni Bakteri Pada Uji Reduksi Nitrat .....	24
10. Gejala Bioluminiscens Akibat Infeksi Bakteri <i>P. luminescens</i> .....	25
11. Koloni Bakteri Pada Uji Oksidatif-Fermentatif.....	25
12. Aktivitas Antibiotik <i>P. luminescens</i> terhadap <i>B. Pumillus</i> .....	29



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Bahan Pertumbuhan dan Media Uji .....	34
2. Karakteristik Morfologi Nematoda <i>Heterorhabditis</i> spp. ....	37



KARAKTERISTIK BAKTERI SIMBION NEMATODA  
ENTOMOPATOGEN *Heterorhabditis* spp.  
(*Photorhabdus luminenscens*)

**MUCHLISIN**  
**961510401035**

ABSTRAK

*Photorhabdus luminenscens* adalah bakteri simbion nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* spp. famili *Enterobacteriaceae*. Bakteri *P. luminenscens* berperan dalam proses terbunuhnya serangga inang dengan memproduksi toksin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik bakteri simbion nematoda entomopatogen isolat lokal *Heterorhabditis* spp. dan mengetahui aktivitas antibiotik bakteri *P. luminenscens* terhadap *Bacillus pumillus* secara *in vitro*. Penelitian dilaksanakan di laboratorium Perlindungan Tanaman Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember mulai bulan April - Oktober 2000. Identifikasi dilakukan dengan melihat karakteristik morfologi dan fisiologi bakteri. Hasil pengamatan morfologi menunjukkan bahwa koloni bakteri fase primer menyerap warna *neutral red* pada media Mc. Conkey sedangkan pada fase sekunder hal tersebut tidak terjadi, Pada media *Nutrien Bromotymol Agar* (NBTA) fase primer menyerap *Bromotymol Blue* (BTB) pada media sedangkan pada fase sekunder hal tersebut juga tidak terjadi, pada media *Nutrien Agar* (NA) fase primer bakteri koloninya berwarna putih susu, cembung, dapat meneruskan cahaya, bulat mengkilat, serta tepi koloni rata, untuk fase sekunder koloni berwarna putih susu kekuningan, bulat agak cembung, tepi koloni rata. Pada pengamatan fisiologi bakteri memiliki sifat Gram (-), Indol (-), Levan Sukrose (+), Pencairan Gelatin (+), Katalase (+), Hidrolisa pati (+), Flourescens (-), Reduksi Nitrat (-), Bioluminenscens (+), dan mempunyai pertumbuhan yang optimum pada pH 7 dan suhu 25 °C pada media buatan. Bakteri *P. luminenscens* juga mempunyai antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan *B. pumillus* pada media buatan.

**Kata Kunci :** Karakteristik, *Photorhabdus luminenscens*, *Heterorhabditis* spp.

THE CHARACTERISTIC OF ENTOMOPATHOGENE NEMATODE  
SIMBION BACTERIA *Heterorhabditis* spp.  
(*Photorhabdus luminescens*)

MUCHLISIN  
961510401035

ABSTRACT

*Photorhabdus luminescens* is an entomopathogene nematode simbion bacteria *Heterorhabditis* spp. Family *Enterobacteriaceae*. *P. luminescens* penetrated into the body of the insect and roled in the process of the host's death by producing the toxyn. This study means to understand the morfological and physiological characteristic of the lokal isolate bacteria *P. luminescens*, and antibiotik aktivty *P. luminescens* to *B. pumillus* It was done in the Plant Protection Laboratory of Plant Pest and Disease study program of Agricultural Faculty in Jember University starting from April to Actober 2000 Identification was done by looking at the morphological and physiological characteristic of bacteria. The observation of morphology showed that the bacteria colony of primary phase absorbed the neutral colour in the *Mc. Conkey* medium while at secondary phase did not, in the *Nutrien Bromotymol Agar* medium (NBTA) the primary phase absorbed *Bromotymol Blue* (BTB), while the secondary phase did not, in the *Nutrien Agar* medium (NA) the primary phase of the colony bacteria was whity, chubby, pass the light, flashy, round shape, and the site of colony was equal, and for secondary phase, the colony was yellow whity, rather cubby, equal site. In the observation of physiological characteristic, bacteria has the character of Gram (-), Indol (-), Levan Sucrose (+), Gelatin solvent (+), Katalase (+), Starch hidrolisis (+), Flourescens (-), Nitrat Reduction (-), Bioluminenscens (+), Oxydatif-Fermentatif (+), Antibiotic (+), and has optimum growth at pH 7 and 25 0C temperature.

**Key Word** : Characteristic, *Photorhabdus luminescens*, *Heterorhabditis* spp.



## RINGKASAN

Muehlisin, 961510401035, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember, "Karakteristik Bakteri Simbion Nematoda Entomopatogen *Heterorhabditis* spp. (*Photorhabdus luminescens*)," Dibawah bimbingan Ir. Rachmi Masnilah, MSi dan Ir. Abdul Majid, MP.

Nematoda Entomopatogen *Heterorhabditis* spp. dapat diisolasi dari berbagai daerah di Indonesia. Nematoda tersebut bersimbiosis dengan bakteri *P. luminescens* dan mempunyai peranan yang sangat penting dalam membunuh serangga hama serta memiliki prospek sebagai bioinsektisida dimasa datang.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik bakteri simbion nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* spp. isolat lokal dan untuk mengetahui aktivitas antibiotik bakteri *P. luminescens* terhadap *B. pumillus*.

Karakteristik yang diamatai adalah karakteristik morfologi bakteri isolat Ngadas, Sumberejo, Panti, dan Ijen pada media pertumbuhan *Mc. Conkey*, *Nutrien Bromotymol Agar* (NBTA), dan *Nutrien Agar* (NA), karakteristik fisiologi meliputi Gram, Indol, Levan Sukrose, Pencairan Gelatin, Katalase, Hidrolisa Pati, Flourescens, Reduksi Nitrat, Bioluminenscens, Oksidatif-Fermentatif, Serta mengetahui pertumbuhan pada suhu dan pH optimum dari bakteri *P. luminescens*. Sedangkan aktifitas antibiotik diamati dengan melihat zona penghambatan bakteri *P. luminescens* terhadap *B. pumillus* pada media NA.

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa keempat isolat bakteri Ngadas, Sumberejo, Panti dan Ijen yang bersimbion dengan nematoda *Heterorhabditis* spp. adalah *P. luminescens*. Bakteri tersebut yang mempunyai karakteristik morfologi pada media *Mc. Conkey* yaitu pada fase primer terjadi penyerapan *neutral red* pada media sedangkan fase sekunder hal tersebut tidak terjadi, pada media NBTA fase primer menyerap BTB pada media dan hal tersebut juga tidak terjadi pada fase sekunder, pada media NA fase primer koloni bakteri berwarna putih susu, cembung, dapat meneruskan cahaya, bulat mengkilat, serta tepi koloni rata sedangkan fase sekunder koloni berwarna putih susu kekuningan, bulat agak cembung, tepi rata. Karakteristik fisiologi bakteri yaitu Gram (-), Indol (-),

## Digital Repository Universitas Jember

Levan Sukrose (+), Pencernan Gelatin (+), Katalase (+), Hidrolisa Pati (+), Flourescens (-), Reduksi nitrat (-), Bioluminenscens (+), Antibiotik (+), Oksidatif Fermentatif (+), dan tumbuh optimum pada pH 7, dan suhu 25 °C, serta menghasilkan senyawa antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan *B. pumillus* pada media NA.



## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pengendalian hayati di dalam konsep dasar Pengendalian Hama Terpadu (PHT) memegang peranan yang sangat penting. Penggunaan agensia pengendali hayati makin memperoleh perhatian yang sangat besar karena dampak negatif dari penggunaan pestisida kimiawi atau senyawa sintetik yang menimbulkan kekebalan serangga hama tanaman (resistensi), peledakan serangan hama sekunder (resurgensi) maupun pencemaran air minum serta makin tingginya kesadaran masyarakat akan lingkungan hidup (Untung, 1996).

Salah satu agensia hayati yang mendapatkan perhatian besar adalah Nematoda Entomopatogen yang bersimbiosis dengan bakteri *P. luminescens*. Bakteri simbiosis tersebut terdapat dalam intestine nematoda *Heterorhabditis* spp. yang kemudian akan dilepaskan kedalam tubuh serangga, didalam tubuh serangga serangga inang bakteri tersebut memproduksi toksin dan menyebabkan fatal septisemia (Jarosz, 1996). Strain bakteri simbiosis nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* spp. yang diketemukan di beberapa negara berbeda satu sama lain, tergantung Spesies nematodanya. Menurut Boemare *et al.* (1996) *P. luminescens* bersimbiosis dengan nematoda entomopatogen jenis *Heterorhabditis* spp.

Adanya asosiasi nematoda dengan bakteri yang menyebabkan serangga hama mati, maka beberapa peneliti mencoba menggunakan bakteri secara terpisah dengan nematoda entomopatogen (Yeh dan Alm, 1992). Hal tersebut penting untuk memproduksi bioinsektisida berbahan aktif bakteri simbiosis nematoda entomopatogen, *Xenorhabdus* spp. dan *P. luminescens* isolat asli Indonesia (lokal) dalam media cair (*liquid culture*) yang akan dikembangkan dalam sistem pengendalian hayati serangga hama yang murah, toksisitas yang tinggi, efektif, bebas residu senyawa-senyawa kimia sintetik, tidak mencemari air minum dan lingkungan. Pengendalian hayati serangga hama hortikultura dengan bakteri simbiosis nematoda entomopatogen ini sangatlah diharapkan dapat mengurangi dan mengatasi dampak negatif dari pemakaian insektisida sintetik yang selama ini dipakai untuk mengendalikan serangga hama (Yeh dan Alm, 1992).

Pada media *Nutrien Broth* bakteri simbion *Photorhabdus* diketahui mengeksresikan beberapa senyawa metabolit. Penelitian lebih jauh melaporkan bahwa bakteri simbion tidak bersifat toksik dan berisiko rendah bagi manusia terhadap alergi akibat reaksi melawan protein spesifik dari kompleksitas nematoda-bakteri (Boemare *et al.*, 1996).

Beberapa hasil penelitian telah mengetahui kemampuan bakteri simbion *P. luminescens* dan *Xenorhabdus nematophilus* dalam mengendalikan beberapa serangga seperti *Galleria mellonella*, *Popilia japonica*, dengan persentase kematian rata-rata diatas 60% (Yeh dan Alm, 1992).

Berdasarkan hal tersebut maka pengamatan secara morfologi, fisiologi, dan pengaruh lingkungan pada pertumbuhan bakteri simbion sangat diperlukan untuk diteliti sebagai dasar pengembangan bakteri *P. luminescens* sehingga dapat digunakan sebagai pengendali hayati hama tanaman (Gerritsen *et al.*, 1994).

## 1.2 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui karakteristik bakteri simbion nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* spp. isolat lokal.
2. Mengetahui aktivitas antibiotik bakteri *P. luminescens* terhadap *B. pumillus* secara in vitro.

## 1.3 Kegunaan

Isolat bakteri nematoda entomopatogen *P. luminescens* yang sudah diketahui karakteristik morfologi dan fisiologinya diharapkan dapat menjadi dasar untuk pengembangan bakteri tersebut, yang nantinya dapat dimanfaatkan sebagai agensia hayati dimasa datang.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Nematoda Entomopatogen

Nematoda patogen serangga dari famili *Rhabditidae* mempunyai dua genus antara lain *Steinernema* dan *Heterorhabditis*, nematoda entomopatogen ini telah banyak digunakan untuk mengendalikan serangga hama baik pada tanaman pangan, perkebunan, rumput lapangan golf serta tanaman hortikultura (Gaugler, 1993 dalam Ehlers, 1996).

Pada proses infeksi nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* spp. terhadap inangnya terdapat interaksi mutualisme antara nematoda entomopatogen dengan bakteri simbiotiknya. Setiap nematoda entomopatogen mempunyai interaksi yang sangat spesifik hanya dengan satu spesies bakteri *Xenorhabdus* atau *Photorhabdus*, (Akhurst dan Boemare, 1990). Di dalam tubuh serangga, nematoda melepaskan bakteri dari dalam intestin ke dalam haemolimpa serangga dan menyebabkan serangga mengalami fatal septisemia. Sel-sel bakteri kemudian mengalami multiplikasi dan menyediakan nutrisi nematoda sambil bereproduksi (Jarosz, 1996).

Nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* spp. terdapat di seluruh belahan dunia dan dapat mengendalikan serangga hama dari golongan Lepidoptera seperti *Galleria mellonella*, *Spodoptera exigua*, golongan Coleoptera seperti *Tenebrio molitor*, *Oryctes rhinoceros* mencapai 20 – 100%, dan golongan Diptera seperti *Liriomyza trifoli* mengalami kematian 48 – 98% (Yeh dan Alm, 1992).

### 2.2 Hubungan Bakteri *P. luminiscens* dengan Nematoda Entomopatogen *Heterorhabditis* spp.

Nematoda Entomopatogen *Heterorhabditis* spp. bersimbiosis mutualisme dengan bakteri *P. luminiscens* famili *Enterobacteriaceae* (Ehlers dan Hokkanen, 1996). Nematoda entomopatogen yang melepaskan bakteri kedalam tubuh serangga inang dan memperoleh keuntungan antara lain : membunuh inang secara cepat 24 – 48 jam, memproduksi antibiotik agar lingkungan cocok bagi perkembangan bakteri dan menghambat invasi dari mikroorganisme sekunder, dan menyediakan nutrisi dari nematoda, sedangkan nematoda dibutuhkan bakteri sebagai pelindung dari



kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan serta melindungi bakteri dari kemungkinan adanya protein anti bakteri yang dikeluarkan serangga inang ( Ehlers, 1996 ).

Nematoda entomopatogen dauer juveniles (DJs) dapat membawa 0 – 250 sel bakteri simbion pada bagian anterior usus yang disebut vesikula. Di dalam DJs, bakteri dilindungi dengan baik dari kondisi yang mengganggu di dalam tanah, sehingga bakteri simbion tersebut tidak pernah diisolasi dari lingkungan tanah (Sulistyanto, 1998).

Mekanisme kematian serangga inang terjadi melalui pelepasan bakteri oleh nematoda dalam haemolimpa setelah nematoda masuk kedalam tubuh serangga melalui lubang alami seperti mulut, anus, spirakel atau langsung menembus kutikula serangga. *Steinernema* spp. dapat diproduksi didalam media buatan tanpa bakteri simbion *Xenorhabdus* spp. tetapi hal ini tidak berhasil pada spesies *Heterorhabditis* spp. Nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* spp. tidak dapat berkembang biak tanpa adanya aktivitas metabolisme dari bakteri simbion *P. luminescens* (Lunau *et al.*, 1993 dalam Sulistyanto, 1999).

Pada tubuh serangga, bakteri dapat menghasilkan toksin yang dapat menyebabkan fatal septisemia pada tubuh serangga setelah 2 – 4 hari, jika mekanisme pertahanan tubuh serangga tidak sukses dalam mengatasi kompleksitas simbiose nematoda-bakteri (Ehlers, 1996). Serangga inang yang terbunuh tidak mengalami pembusukan sampai pada generasi berikutnya dari nematoda Invektif juvenil (IJs), hal ini berkaitan dengan senyawa yang dihasilkan oleh bakteri simbion (Jarosz, 1996).

### 2.3 Karakteristik Morfologi dan Fisiologi Bakteri *P. luminescens*

Bakteri *P. luminescens* mempunyai dua fase yang berbeda yaitu primer dan sekunder, hal ini menyebabkan adanya perbedaan diantara dua bentuk fase bakteri ini terutama pada pengamatan morfologi bakteri (Woodring dan Kaya, 1988).

Karakteristik morfologi dari bakteri *P. luminescens* sangat bervariasi pada fase primer (fase 1) dan fase sekunder (fase2). Fase primer dapat diperoleh dari larva serangga yang terinfeksi yang dikembangkan pada media buatan yang berumur 24

jam dan selalu diikuti oleh fase sekunder. Bakteri fase primer akan menghasilkan senyawa antibiotik lipase, protease dan pigmen yang terlihat pada media yang disebut *luminiscens*. Fase sekunder telah kehilangan dari kemampuan yang dimiliki oleh fase primer diatas dan tidak dapat mendukung pertumbuhan nematoda sebaik pada fase primer (Gerritsen *et al.*, 1994).

Menurut Boemore *et al.* (1996), bakteri fase pertama terdapat dalam bentuk yang tidak stabil dengan bentuk batang pendek dan batang panjang. Selain itu dalam bentuk primer bakteri simbiosis menghasilkan senyawa antibiotik lecitinase, bioluminiscens (Woodring dan Kaya, 1988), serta menyerap bahan tertentu dari media pertumbuhan. Sebaliknya, bentuk sekunder kurang baik dalam karakteristik ini. Oleh karena itu karakteristik ini dapat membedakan diantara dua bentuk yang berbeda dari morfologi koloni. Fase 1 tidak dapat bertahan lama dan akan segera berubah ke fase 2 yang mempunyai kecendungan stabil dan sel bakterinya berbentuk batang panjang (Krasomil-Osterfeld, 1994).

Karakteristik morfologi dari bakteri simbiosis *P. luminiscens* dapat dilihat dengan menumbuhkan pada berbagai media agar seperti *Mc. conkey*, NBTA, dan NA (*nutrien agar*). Pada media *Mc. conkey* terjadi penyerapan *neutral red*, sedangkan pada media NBTA menyerap BTB. Morfologi koloni primer secara umum adalah *granuler, convex, opaque, circulaire*, dengan tepi agak rata dan ukuran koloni lebih kecil dari pada fase sekunder (Woodring dan Kaya, 1998).

Bakteri *P. luminiscens* mempunyai karakteristik fisiologi antara lain gram negatif, katalase positif, bioluminiscens positif, pencairan gelatin positif, mempunyai aktifitas antibiotik terhadap bakteri tertentu, anaerob fakultatif dan non fluorescens (Woodring dan Kaya, 1998).

#### 2.4 Hipotesis

1. Bakteri simbiosis Nematoda Entomopatogen *Heterorhabditis* spp. isolat lokal adalah *P. luminiscens*.
2. *P. luminiscens* menghasilkan senyawa antibiotik terhadap *B. pumillus*.

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Perlindungan Tanaman Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember mulai bulan April sampai dengan Oktober 2000.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah dari berbagai daerah seperti Panti (Jember), Ijen (Bondowoso), dan untuk isolat Ngadas (Probolinggo) serta isolat Sumberejo (Malang) menggunakan isolat stok dari laboratorium yang telah teridentifikasi sebagai nematoda *Heterorhabditis* spp. media pertumbuhan dan uji bakteri seperti *Mc. Conkey*, *Nutrien Agar* (NA), *Nutrien Bromotimol Agar* (NBTA), *Nutrien Broth* (NB), *King's B*, Oksidatif-Fermentatif, Indol, Levan Sukrose, Gelatin, Hidrolisa pati, Reduksi Nitrat, dan bahan yang lain seperti alkohol 70 %, aquades, reagen kovack, larutan iodium, KOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ulat bambu dan *Tenebrio molitor*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, cawan petri, kertas saring, pinset, jarum ose, gunting, laminar air flow, lampu bunsen, autoklaf, hot-cold, pipet, pemanas.

#### 3.3 Metodologi Penelitian

Penelitian dilakukan melalui beberapa tahap percobaan yang antara lain :

##### **Tahap I. Isolasi Nematoda Entomopatogen**

##### **a. Pengambilan Sampel dan Isolasi Nematoda**

Nematoda entomopatogen yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah isolat lokal Panti (Jember), dan Ijen (Bondowoso) *Heterorhabditis* spp. (All strain) yang diperoleh dari pengambilan sampel dari masing-masing tempat tersebut dalam bentuk sampel tanah, kecuali daerah Ngadas (Probolinggo) dan Sumberejo (Malang) yang berasal dari stok laboratorium.



Metode isolasi nematoda entomopatogen dari dalam tanah menggunakan metode baiting dengan menggunakan serangga inang, yaitu dengan cara menggunakan larva *T. molitor* yang dibungkus dengan kain kasa, kemudian dimasukkan ke dalam gelas bekas minuman air mineral yang didalamnya terdapat sampel tanah dari keempat daerah seperti di atas, setelah 4 – 7 hari *T. molitor* yang terinfeksi di taruh di atas kertas saring yang lembab yang di bawahnya terdapat sedikit air (Metode *white trap*) setelah beberapa hari kemudian  $\pm$  7 hari dapat diambil nematoda yang telah keluar dari tubuh *T. molitor* tersebut.

### b. Perbanyak Nematoda

Perbanyak nematoda dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan ulat bambu dan dilakukan ke dalam metode *white trap* seperti pada tahap isolasi nematoda (Chaerani, 1996).

Pembiakan secara *in vivo* sangat mudah dilakukan, namun hanya terbatas pada keperluan percobaan laboratorium dan lapang skala kecil, karena memerlukan banyak tenaga kerja dan waktu. Pembiakan secara *in vitro* memerlukan ketrampilan yang lebih tinggi, dimana bakteri simbiosis terlebih dahulu harus diisolasi dari nematoda (Woodring dan Kaya, 1988).



Gambar 1. Perbanyak Nematoda Entomopatogen Secara *In Vivo*

### c. Identifikasi Nematoda

Identifikasi nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* spp. dapat dilakukan dengan pengamatan secara langsung pada serangga inang yang terinfeksi, apabila serangga inang yang terinfeksi berwarna coklat kemerah-merahan, maka serangga tersebut terinfeksi oleh *Heterorhabditis* spp. dan apabila berwarna hitam seperti karamel, maka nematoda tersebut terinfeksi *Steinernema* spp. seperti pada gambar 2.



**Gambar 2. Gejala Infeksi Nematoda Entomopatogen Pada Ulat Bambu**  
A. Ulat Bambu Sehat  
B. Ulat Bambu Terinfeksi *Steinernema* spp.  
C. Ulat Bambu Terinfeksi *Heterorhabditis* spp.

## Tahap II. Karakteristik Bakteri Nematoda Entomopatogen *Heterorhabditis* spp.

### a. Isolasi Bakteri

Nematoda yang telah diidentifikasi sebagai *Heterorhabditis* spp. dari keempat isolat kemudian diinokulasikan kepada larva serangga ulat bambu dalam cawan petri dan diinkubasi selama 24 – 48 jam. Serangga yang mati atau hampir mati disterilkan dengan alkohol 70% selama 2 – 3 menit dan setelah itu dibilas dengan menggunakan air steril dan dikeringkan. *Haemolymph* serangga diambil dengan memotong bagian tertentu pada tubuh serangga dan digoreskan pada media *Mc. Conkey*. Hasil goresan diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan bakteri fase primer. Koloni merah yang muncul diambil dengan jarum ose dan dibiakkan pada media YS selama 24 jam

yang digoyang 400 – 500 rpm dalam gelap. Setelah itu bakteri diberi gliserin 15% dan disimpan dalam *caps* berukuran 2 ml pada suhu -20°C.

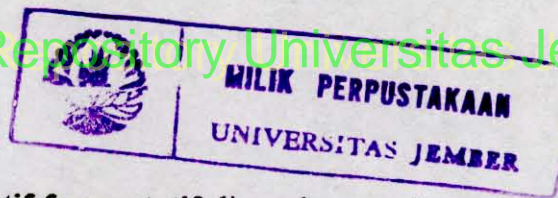
#### **b. Identifikasi Morfologi Bakteri**

Identifikasi bakteri nematoda entomopatogen isolat lokal dilakukan dengan melihat karakteristik morfologi bakteri yang ditumbuhkan pada beberapa media yang berbeda antara lain NA, *Mc. Conkey*, dan NBT/A (Garritsen *et al.*, 1994), dan mengamati penyerapan warna, besar koloni, dan bentuk koloni dari masing-masing isolat. Untuk pengamatan secara mikroskopis sel bakteri, menggunakan metode pengecatan gram menurut Hucker dan pewarnaan negatif dengan menggunakan tinta cina (Lay, 1994). Pewarnaan dengan tinta cina, pertama-tama gelas obyek dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70 % ditetesi dengan satu tetes tinta cina, bakteri yang berumur 24 jam diambil sebanyak satu ose, diletakkan pada tinta cina dan di campur, kemudian dengan gelas obyek yang lain campuran tersebut digesekkan ke kisi lain dari gelas obyek kemudian dikeringanginkan.

Pada pengecatan gram, menggunakan Larutan kristal violet, larutan lugol, larutan aseton, dan larutan safarin. Pertama-tama langkah yang harus dikerjakan adalah ambil biakan bakteri *P. luminescens* secara aseptis dengan menggunakan jarum ose yang berumur 24 jam, kemudian keringkan di atas api bunsen, setelah itu beri larutan kristal violet selama 1 menit dan cuci dengan air mengalir setelahnya, kemudian kering anginkan. Dan tambahkan larutan lugol selama 1 menit, kemudian cuci dan kering anginkan. Setelah itu beri larutan pemucat selama 10 – 20 detik, perhatikan waktu pemucatan karena pemucatan yang terlalu lama akan mengakibatkan penyimpangan hasil pewarnaan. Cuci dengan air mengalir dan beri larutan safarin selama 15 detik kemudian cuci dan kering anginkan. Hasil pengecatan tinta cina dan pengecatan gram diamati dengan mikroskop dengan pembesaran 1000x untuk membandingkan besar dan bentuk sel masing-masing bakteri (Lay, 1994).

#### **c. Identifikasi fisiologi Bakteri**

Identifikasi fisiologi bakteri menggunakan serangkaian uji yang antara lain Gram, Indol, Levan sukrose, Pencairan Gelatin, Katalase, Hidrolisa Pati, Fluorescens, Reduksi Nitrat, Bioluminenscens, dan Oksidatif-Fermentatif.



**Uji Oksidatif-fermentatif** digunakan untuk mengetahui apakah karbohidrat tunggal (biasanya glukosa) dapat dimanfaatkan oleh bakteri pada proses oksidasi atau fermentasi. Inokulasi bakteri yang diuji dilakukan secara tusuk pada dua buah medium dalam tabung. Pada salah satu tabung, di atas medium diberi parafin cair dan selanjutnya diinkubasi pada keadaan temperatur kamar. Pengamatan dilakukan sampai 14 hari. Terjadinya perubahan dari biru menjadi kuning, menunjukkan adanya produksi asam pada tabung yang tidak tertutup akan tetapi untuk tabung yang tertutup menunjukkan adanya metabolisme fermentatif dari glukosa (Fahy dan Hayward, 1983).

**Uji Reduksi nitrat** pertama-tama isolat bakteri yang berumur 24 jam ditumbuhkan pada medium yang mengandung nitrat dalam tabung. Kemudian diinkubasikan selama 3 – 7 hari pada suhu ruang. Setelah diinkubasi, ditetesi dengan reagent iodium pati sebanyak 5 – 10 tetes, reaksi positif ditandai dengan terjadinya warna biru pada medium setelah ditetesi reagent iodium pati (Lay, 1994).

**Uji Hidrolisa Pati** kultur bakteri yang berumur 24 jam diinokulasikan pada cawan petri yang berisi medium pati 5 – 10 ml dan selanjutnya diinkubasikan selama 3 – 6 hari pada suhu kamar. Setelah diinkubasikan, biakan kemudian ditambah dengan larutan iodium sebanyak 2 – 3 tetes. Reaksi negatif ditandai dengan terdapatnya bagian medium yang kontras pada sekitar koloni, dan seluruh medium berwarna hitam dan reaksi positif terdapat bagian yang transparan disekitar koloni bakteri (Lelliott dan Stead, 1987).

**Uji Pencairan Gelatin** media yang telah disterilkan diinokulasi dengan biakan bakteri yang berumur kurang lebih 24 jam dengan menggunakan jarum ose pada tabung biakan. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu kamar ( $27^{\circ}\text{C}$ ) selama 48 jam. Untuk mengetahui reaksinya, tabung yang telah diinkubasikan terlebih dahulu disimpan pada suhu  $5^{\circ}\text{C}$  selama kurang lebih 30 menit. Reaksi positif ditandai dengan pencairan gelatin pada tabung yang diinokulasi (Lelliott dan Stead, 1987).

**Uji Indol** kultur bakteri yang berumur 24 jam ditumbuhkan pada medium dan diinkubasi selama 2 – 5 hari pada suhu ruang. Setelah diinkubasi, biakan ditetesi dengan reagen kovac sebanyak 10 sampai 12 tetes. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah pada medium setelah ditetesi reagen, yang berarti bakteri dapat membentuk indol (Fahy dan Hayward, 1983).

**Uji Levan Sukrose** bertujuan untuk mengetahui pembentukan enzim levan sukroase, bakteri ditumbuhkan dalam cawan petri yang berisi 5 - 10 ml NA yang telah ditambahkan 5% sukrose. Kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 2 hari. Bakteri yang membentuk enzim levan sukrose akan memperlihatkan karakter koloni yang transparan sampai buram, bercahaya, berlendir (mucoid) dengan bentuk cembung yang jelas (Lay, 1994). Reaksi positif ditandai dengan tumbuhnya koloni yang konvek dan berlendir setelah diinkubasikan selama 3 – 5 hari.

**Pertumbuhan Pada Berbagai Suhu** pertama-tama yang harus dikerjakan adalah menumbuhkan biakan bakteri simbiosis nematoda entomopatogen yang berumur 24 jam pada media *Nutrien Broth* (NB), sebanyak 5 tabung yang kemudian masing-masing tabung tersebut diinkubasikan selama 24 – 48 jam pada suhu sesuai perlakuan yaitu 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. Setelah diinkubasikan selama 48 jam, kocok kelima tabung tersebut dan bandingkan derajat kekeruhannya (Lay, 1994)

**Pertumbuhan Pada Berbagai pH** seperti pada perlakuan suhu, disini biakan bakteri simbiosis yang berumur 24 jam dipindahkan kedalam tabung reaksi yang berisi media NB yang telah diukur pH medianya sesuai perlakuan yaitu 4, 5, 6, 7,8 dan setelah itu diinkubasikan pada suhu ruang kelima tabung tadi selama 24 – 48 jam, setelah itu tabung dikocok setelah biakan berumur 48 jam, dan amati derajat kekeruhannya (Akhurst, 1982).

### **Tahap III. Uji Antibiotik *P. luminescens* dengan *B. pumillus***

Pengujian aktivitas antibiotik bertujuan untuk mengetahui kemampuan antibiotik dari bakteri simbiosis nematoda entomopatogen terhadap *B. pumillus*. Bakteri *B. pumillus* dibiakkan dalam media YS dan diinkubasi selama 24 jam dalam *shaker* 400-500 rpm. Setelah itu dilakukan perbanyakan bakteri *P. luminescens* yang berumur 24 jam. Kemudian tuangkan biakan *B. pumillus* kedalam media NA



pada suhu  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ . Setelah itu letakkan pada media NA yang berisi *B. pumillus* bakteri *P. luminescens* yang berumur 24 jam pada 4 tempat dengan menggunakan kertas saring dan inkubasikan biakan tersebut selama  $\pm 24 - 48$  jam dan diamati zona penghambatan disekitar bakteri nematoda entomopatogen (Zone jernih pada media).



## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan pada hasil pengamatan dan pembahasan, maka dapat ditarik suatu kesimpulan yang antara lain :

1. Bakteri yang bersimbiosis dengan nematoda *Heterorhabditis* spp. adalah *P. luminescens* yang mempunyai karakteristik morfologi pada media *Mc. Conkey* yaitu pada fase primer terjadi penyerapan *neutral red* pada media sedangkan fase sekunder hal tersebut tidak terjadi, pada media NBTA fase primer menyerap BTB pada media hal tersebut juga tidak terjadi pada fase sekunder, untuk media NA fase primer koloni bakteri berwarna putih susu, cembung, dapat meneruskan cahaya, bulat mengkilat, serta tepi koloni rata sedangkan fase sekunder koloni berwarna putih susu kekuningan, bulat agak cembung, tepi rata. Karakteristik fisiologi bakteri yaitu Gram (-), Indol (-), Levan Sukrose (+), Pencairan Gelatin (+), Katalase (+), Hidrolisa Pati (+), Flourescens (-), Reduksi nitrat (-), Bioluminenscens (+), Antibiotik (+), Oksidatif Fermentatif (+), serta tumbuh optimum pada pH 7, dan suhu 25 °C.
2. Bakteri *P. luminescens* menghasilkan senyawa antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan *B. pumillus* pada media NA

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai virulensi bakteri *P. luminescens* isolat lokal terhadap beberapa serangga hama, terlepas dari nematoda *Heterorhabditis* spp. sehingga diperoleh isolat bakteri yang benar-benar mempunyai potensi yang besar dalam pengembangan bioinsektisida dimasa datang untuk mendukung konsep Pengelolaan Hama Terpadu yang ramah lingkungan. Selain itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk bagaimana memformulasikan dan membuat bakteri mampu bertahan dalam lingkungan terlepas dari simbiose nematodanya.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhurst R. J., 1980. *Morfological and Functional Dimorphism in Xenorhabdus spp. Bacteria Symbiotically Associated with Insect Patogenic Nematodes Neoplectana and Heterorhabditis in the Influence of Phase Variants of Xenorhabdus spp. and Escherichia coli (Enterobacteriaceae) on the Propagation of Entomopatogenic Nematodes of the Genera Steinernema and Heterorhabditis.* Rev Nematol 13 (4) : p 417 - 424.
- , and N.E. Boemare. 1990. *Biologi and Taxonomy of Xenorhabdus in Rntomopatogenic Nematoda in Biological control* (R. Gaugler and H.K. Kaya Eds) CRC. Press Boca Raton Florida. p 75 - 90.
- Boemare N. E. and Raymond J. Akhurst, 1988, *DNA Homology Between Xenorhabdus and Photorhabdus spp. Convergent evaluation of Two Different Genera.* European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research. CSIRO Division of Entomology. Canberra A. C. T. 2601. Australia. p 59 -69.
- , C. Laumond and H. Mauleon. 1996. *The entomopatogenic nematode-bacterium complex biologi live cycle and verterate safety.* Biocontr. Sci Technol. 6 (3) : 333 - 346.
- Chaerani, 1996, *Nematoda Patogen Serangga*, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor. p 3 - 5.
- Ehlers, R. U., 1996, *Curent and future use of nematodes in biocontrol : practise and commercial aspcts with regard to regulator policy issues*, *Biocontr. Sci Technol.* 6 (3) : p 304 - 315.
- , and H.M.T. Hokkanen. 1996. *Insect Biocontrol with Non Endemik Entomopatogenic Nematodes (Stenernema and Heterorhabditis spp) : Conclusion and Recommendation of a Combained OECD and COST Warkshop on Scientific and Regulatory Policy Issues.* Biocontr. Sci. Technol. 6 (3) : p 295 - 302.
- Fahy P. C., and A. C. Haywarad. 1983. *Media and Methods for Isolation Diagnostic Test.* Dalam P. C. Fahy and G. J. Persley Eds. *Plant Bacterial Deaseases : A Diagnostic Guide* Sidney Australia : Accademic Press p 337 - 378.
- Frobisher, 1962, *Fundamental of Mikrobiology*, W. B. Saunders Company, Philedelphia, London. p 45 - 56.

- Gerritsen L. M. J., J. M. Van der Wolf, J. W. L. Van Vuurde, R. U. Ehlers, K. C. Krasomil-Osterfeld, and P. H. Smits. *Polyclonal Antisera to Distinguish Strains and form Variants of Photorhabdus luminescens (Xenorhabdus luminescens)*. Research Institute for Plant Protection (IPO-DLO) Binenhoven 12. Cristian – Albrechts – University of Kiel. Klausdorfer Ralsdorf. Germany. p 28 – 36.
- Glazer I., 1991. *Invasion Rate as Measure of Infectivity of Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes Insect*. Department of Nematology. ARO. The Valconi Center. Bet Dagan Israel. p 90 – 94.
- Jarosz, J., 1996. *Do antibiotic compound produced in vitro by Xenorhabdus nematophilus minimize the secondary invasion of insect carcasses by contaminating bacteria*. *Nematologyca* p 367-377.
- Jutono, J. S. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun, Suhadi dan Susanto, 1972. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. p 28 - 30.
- Krasomil-Osterfeld K.C., 1994. *Phase Variation in Photorhabdus Xenorhabdus and Other bacteria a Riview*. *Biotechnol : Genetics of Entopatogenic Nematoda – Bacterium Complex*. European Commision. p 194 – 203.
- Lay, B. W., 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*, Raja Grafindo Persada Jakarta. p 52 -64.
- Lelliott, R. A. and D. E. Stead. 1987, *Methods for diagnosis of bacterial diseases on plant*, Second edition, Oxford : Blackwell Scientific Publication, p 204-216.
- Seeley H. W. and Paul J. VanDemark. 1987. *Mikrobes in Action A laboratory Manual of Microbiology*. W. H. Freeman and Compan. Cornell University San Francisco and London. p 128 - 146.
- Sulistyanto D., 1998. *Entomotoksin Kompleks Nematoda Entomopatogen*. *Dasar-Dasar Biologi Molekuler*. Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember. p 2 - 7.
- \_\_\_\_\_, 1999. *Prospek Aplikasi Nematoda Entomopatogen Steinernema sp. Isolat Lokal Pada Serangga Hama Plutella xylostella, Croccidolomia sp., Hypothenemus hampei, dan Spodoptera litura*. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian. Universitas Jember. p 4 - 7.
- Untung K., 1996. *Pengantar Pengelolaan Hama Terpadu*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. p 5 - 10.

Woodring J. L., and H. K. Kaya. 1988. *Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes : A Handbook of Biology and Techniques*. Southern Cooperative Series Bulletin 331. Aekansas Agriculture Experiment Station. Fayetteville. Arkansas. p 132 - 205.

Yeh, T., and S.R. Alm. 1992. *Effects of entomopatogenic nematode species, Rate, soil moisture, and bacteria on control of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae in the laboratory*. J. Econ. Entomol. p 2144 - 2147.



## LAMPIRAN BAHAN PERTUMBUHAN DAN MEDIA UJI

### 1. Mc. Conkey

Nama Bahan	Jumlah Bahan
Mc. Conkey Agar	25 g
Aquadest	500 ml

### 2. Nutrient Bromotimol Agar (NBTA)

Nama Bahan	Jumlah Bahan
Nutrien Agar	18,5 g
Bromotimol Blue	12,5 mg
Aquadest	500 ml

### 3. Nutrient Agar (NA)

Nama Bahan	Jumlah Bahan
Nutrien Agar	37 g
Aquadest	1000 ml

### 4. Indol

Nama Bahan	Jumlah Bahan
Tripton	10 g
Aquadest	1000 ml

### 5. Levan Sukrose

Nama Bahan	Jumlah Bahan
Pepton	5 g
Beef Extract	3 g
Glukose/ Sukrose	2,5 g / 5 %
Dextrose agar	15 g
Aquadest	1000 ml

**6. Pencairan Gelatin**

<b>Nama Bahan</b>	<b>Jumlah Bahan</b>
Pepton	5 g
Yeast Extract	3 g
Gelatin	120 g
Aquadest	1000 ml

**7. Hidrolisa Pati**

<b>Nama Bahan</b>	<b>Jumlah Bahan</b>
Pati	2 g
Pepton	5 g
Beef Extract	3 g
Dextrose Agar	15 g
Aquadest	1000 ml

**8. King'S B (Flourescens)**

<b>Nama Bahan</b>	<b>Jumlah Bahan</b>
Protease Pepton	20 g
$K_2HPO_4$	1,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,2 g
Dextrose Agar	15 g
Gliserol	10 g
Aquadest	1000 ml

**9. Reduksi Nitrat**

<b>Nama Bahan</b>	<b>Jumlah Bahan</b>
$KNO_3$	1 g
Yeast Extract	1 g
Pepton	10 g
Aquadest	1000 ml

**10. Oksidatif Fermentatif**

<b>Nama Bahan</b>	<b>Jumlah Bahan</b>
Pepton	1 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 g
KCl	0,2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Bromotimaol Blue	0,08 g
Dextrose Agar	3 g
pH	7-7,1
Aquadest	1000 ml

**11. Yeast Salt (YS)**

<b>Nama Bahan</b>	<b>Jumlah Bahan</b>
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,5 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
NaCl	5 g
Yeast Extract	5 g
Aquadest	1000 ml

**12. Nutrient Broth**

<b>Nama Bahan</b>	<b>Jumlah Bahan</b>
Nutrient Broth	8 g
Aquadest	1000 ml



**Lampiran 2. Karakteristik Morfologi Nematoda *Heterorhabditis* spp.**