



PERBANYAKAN NEMATODA PATOGEN SERANGGA (NPS)

Steirnernema sp. DENGAN MEDIA CAIR

SKRIPSI

Oleh:

Fitria Prastyan Dharma

NIM 101510501044

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



**PERBANYAKAN NEMATODA PATOGEN SERANGGA (NPS)
Steirnernema sp. DENGAN MEDIA CAIR**

SKRIPSI

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

Oleh:

Fitria Prastyan Dharma

NIM 101510501044

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

PERSEMBAHAN

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, kupersembahkan skripsi ini kepada :

1. Ayahanda Supeno, S.E. dan Ibunda Ninik Ayati tercinta, kuhaturkan banyak rasa terima kasih atas segala pengorbanan, kasih sayang, serta doa yang selalu dipanjatkan yang mungkin tidak dapat terbalas dengan apapun.
2. Adikku tersayang Aiska Pracilia Vairana, dan keluarga besar yang selalu memberi semangat dan doa.
3. Semua guru-guru sejak Taman Kanak-Kanak hingga Perguruan Tinggi yang telah mendidik dan memberikan ilmunya.
4. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha Mengetahui apa yang kamu kerjakan”

(terjemahan Surat Al-Mujadilah (58) ayat 11)

*Orang besar menempuh jalan kearah tujuannya melalui rintangan dan kesukaran yang hebat
(Rasullullah SAW)*



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fitria Prastyan Dharma

NIM : 101510501044

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul : **“Perbanyakan Nematoda Patogen Serangga (NPS) *Steinernema* sp. dengan Media Cair”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 24 Maret 2015

Yang menyatakan,

Fitria Prastyan Dharma
NIM. 101510501044

SKRIPSI

PERBANYAKAN NEMATODA PATOGEN SERANGGA (NPS)

Steirnernema sp. DENGAN MEDIA CAIR

Oleh:

Fitria Prastyan Dharma

NIM 101510501044

Pembimbing

Pembimbing Utama : Ir. Hari Purnomo, M.Si., Ph.D. DIC
NIP. 19660630 199003 1 002

Pembimbing Anggota : Nanang Tri Haryadi, S.P., M.Sc.
NIP. 19810515 200501 1 003

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Perbanyak Nematoda Patogen Serangga (NPS) *Steinernema sp.* dengan Media Cair**” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian pada :

Hari, tanggal : 24 Maret 2015

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji :

Penguji 1,

Ir. Hari Purnomo, M.Si., Ph.D., DIC
NIP 19660630 199003 1002

Penguji 2,

Penguji 3,

Nanang Tri Haryadi, S.P., M.Sc.
NIP. 19810515 200501 1003

Ir. Soekarto, M.P
NIP. 19610806 198802 1001

Mengesahkan
Dekan

Dr. Ir. Jani Januar M.T.
NIP. 19590102 198803 1 002

RINGKASAN

Perbanyak Nematoda Patogen Serangga (NPS) *Steinernema* sp. dengan Media Cair; Fitria Prastyana Dharma, 101510501044; 2015; 37 Halaman; Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Pengendalian secara hayati dengan nematoda patogen serangga (NPS) yaitu *Steinernema* sp. mulai banyak digunakan untuk mengendalikan hama. Namun aplikasi di lapangan terkendala oleh ketersediaan NPS yang dibutuhkan dalam jumlah yang sangat besar sehingga perlu adanya alternatif perbanyakan. Salah satu alternatif perbanyakan NPS adalah perbanyakan menggunakan media cair yang diketahui lebih mampu menghasilkan jumlah NPS lebih banyak dibandingkan dengan media padat. Penelitian ini bertujuan mengetahui jenis media cair yang menghasilkan jumlah nematoda terbanyak pada perbanyakan nematoda patogen serangga *Steinernema* sp., serta mengetahui tingkat virulensi nematoda patogen serangga hasil dari perbanyakan dengan media cair melalui uji patogenitas menggunakan larva *Tenebrio Molitor*.

Penelitian dilaksanakan selama lima bulan dimulai pada bulan September 2014 sampai dengan Januari 2015 di Laboratorium Hama Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan serta di Unit Produksi Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember. Penelitian dilakukan secara eksperimental dengan empat media cair yaitu Media A dengan komposisi 35% usus ayam, 10% lemak sapi, 55% akuades (Bedding, 1981), Media B dengan komposisi 4% telur ayam, 1% lemak sapi, 90% akuades, 1% *yeast extract*, 1% pepton, 3% tepung kedelai (Han *et al.*, 1993) Media C dengan komposisi 5% tepung kedelai, 92,6% akuades, 0,4% *yeast extract*, 1% *nutrient broth*, 1% minyak kedelai (Wouts, 1981) serta Media D dengan komposisi 20% dog food buatan pabrik dan 80% akuades (Hara *et al.*, 1981). Empat media cair tersebut dibuat sebanyak 50 ml dan diulang sebanyak lima kali. Penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada variabel pengamatan rata-rata jumlah NPS di minggu ke-1 dan minggu ke-2, media cair yang menghasilkan jumlah NPS terbanyak yaitu pada Media A sebesar 849,20 JI/56 ml dan 5216,20 JI/56 ml. Uji patogenitas yang dilakukan terhadap hasil NPS pada semua media cair menggunakan larva *T. molitor*, diperoleh hasil bahwa Media A memiliki virulensi tertinggi berdasarkan nilai mortalitas sebesar 99,33%. Media A merupakan media cair terbaik berdasarkan variabel pengamatan jumlah NPS dan uji patogenitas.

SUMMARY

Mass Production of Entomopathogenic Nematodes (EPNs) *Steinernema* sp. In Liquid Medium; Fitria Prastyan Dharma, 101510501044; 2015: 37 pages; Study Program Agrotechnology Faculty of Agriculture University of Jember.

Entomopathogenic Nematodes (EPNs) *Steinernema* sp. as biological control have been widely used to control pests. However, application EPNs on field was constrained by the availability of EPNs. EPNs was needed in large quantities so that necessary another alternative propagation. Another alternative propagation is using liquid medium that has known capable to produced EPNs in large number. This research aims to determine the type of liquid medium that generates the highest number of nematodes in the mass production of EPNs. As well as determine the virulence level of EPNs result in mass production in liquid medium through pathogenicity tests using larvae of *Tenebrio Molitor*.

The research was carried out experimentally with 4 liquid medium that Media A with composition 35% chicken intestine, 10% beef tallow, 55% distilled water (Bedding, 1981), Media B with composition 4% chicken eggs, 1% fat cows, 90% distilled water, 1% yeast extract, 1 % peptone, 3% soy flour(Han *et al.*, 1993), Media C with composition 5% soy flour, 92.6% distilled water, 0.4% yeast extract, 1% nutrient broth, 1% soybean oil (Wouts, 1981) and Media D with composition 20% dog food made in factory and 80% distilled water (Hara *et al.*, 1981). Four liquid medium is made of 50 ml in five replicates. This research was conducted during the five months starting on September 2014 to January 2015 in the Laboratory of Plant Pests and Diseases Department and Production Unit of Agrotechnology Studies Program Faculty of Agriculture, University of Jember. The study was conducted by using a Completely Randomized Design (CRD) with four treatments and five replications.

The results showed that the observation variable average number of NPS on the first week and second week, the liquid medium that generates the highest number of EPNs was in the Media A at 849.20 JI/56 ml and 5216.20 JI/56 ml .

Pathogenicity test performed on the results of the EPNs in all liquid media using *T. molitor* larvae, that Media A has the highest virulence based on the mortality rate of 99.33%. Media A was the best liquid medium based on observations of a variable number of EPNs and pathogenicity test.



PRAKATA

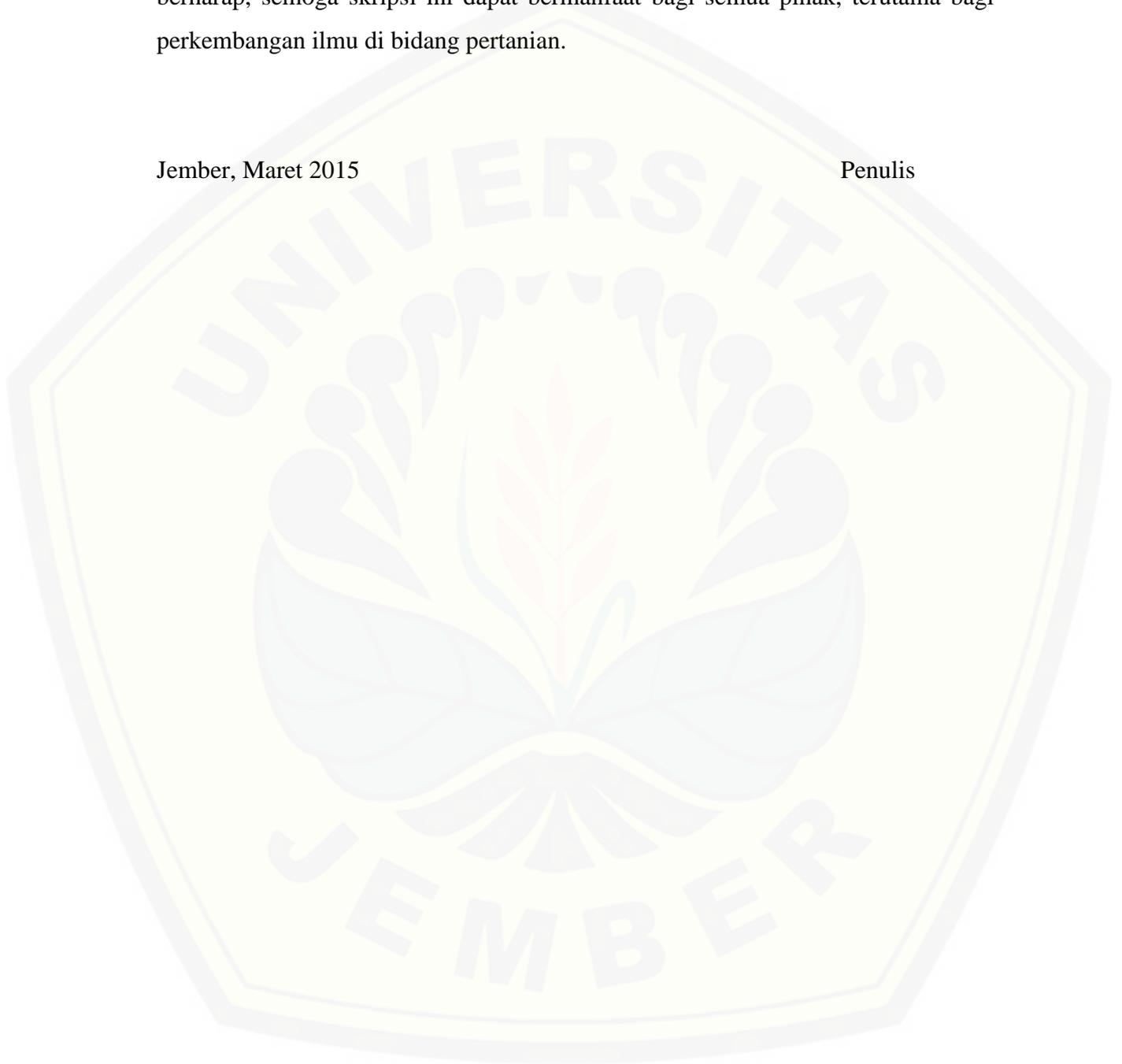
Puji syukur kepada Allah SWT karena hanya dengan limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Perbanyakan Nematoda Patogen Serangga *Steinernema* sp. dengan Media Cair ”**. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan Program Sarjana (S1) pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember. Penyusunan tugas akhir ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Jani Januar, M.T. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
2. Ir. Hari Purnomo, M. Si., Ph. D, DIC, selaku Dosen Pembimbing Utama dan, Nanang Tri Haryadi, S. P., M. Sc., selaku Dosen Pembimbing Anggota, yang memberikan perhatian, meluangkan waktu, dan pikiran sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
3. Ir. Soekarto M.P., selaku dosen penguji tiga yang telah membantu dan meluangkan pikiran untuk perbaikan skripsi ini.
4. Ir. Hari Purnomo, M. Si., Ph. D, DIC. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama menjadi mahasiswa.
5. Ayahanda Supeno, S.E, Ibunda Ninik Ayati, serta Adik Aiska Pracilia Vairana yang sudah memberikan doa, kasih sayang, pengorbanan dan motivasi kepada penulis untuk tetap bersemangat dalam menjalani kehidupan.
6. Segenap Dosen dan Tim Riset di Laboratorium Hama dan Laboratorium Penyakit yang selalu memberikan semangat dalam penulisan karya ilmiah ini.
7. Sahabat-sahabatku tercinta Sovia Salamah, Alm. Kurdiantoro, Samsul, Aisy, Nungky, Dhini terima kasih telah memberikan dukungan dan semangatnya.
8. Teman-teman Program Studi Agroteknologi angkatan 2010 dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terima kasih telah meluangkan pikiran dan memberikan semangat serta pengalaman hidup yang tidak terlupakan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini sangat jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis senantiasa mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, terutama bagi perkembangan ilmu di bidang pertanian.

Jember, Maret 2015

Penulis



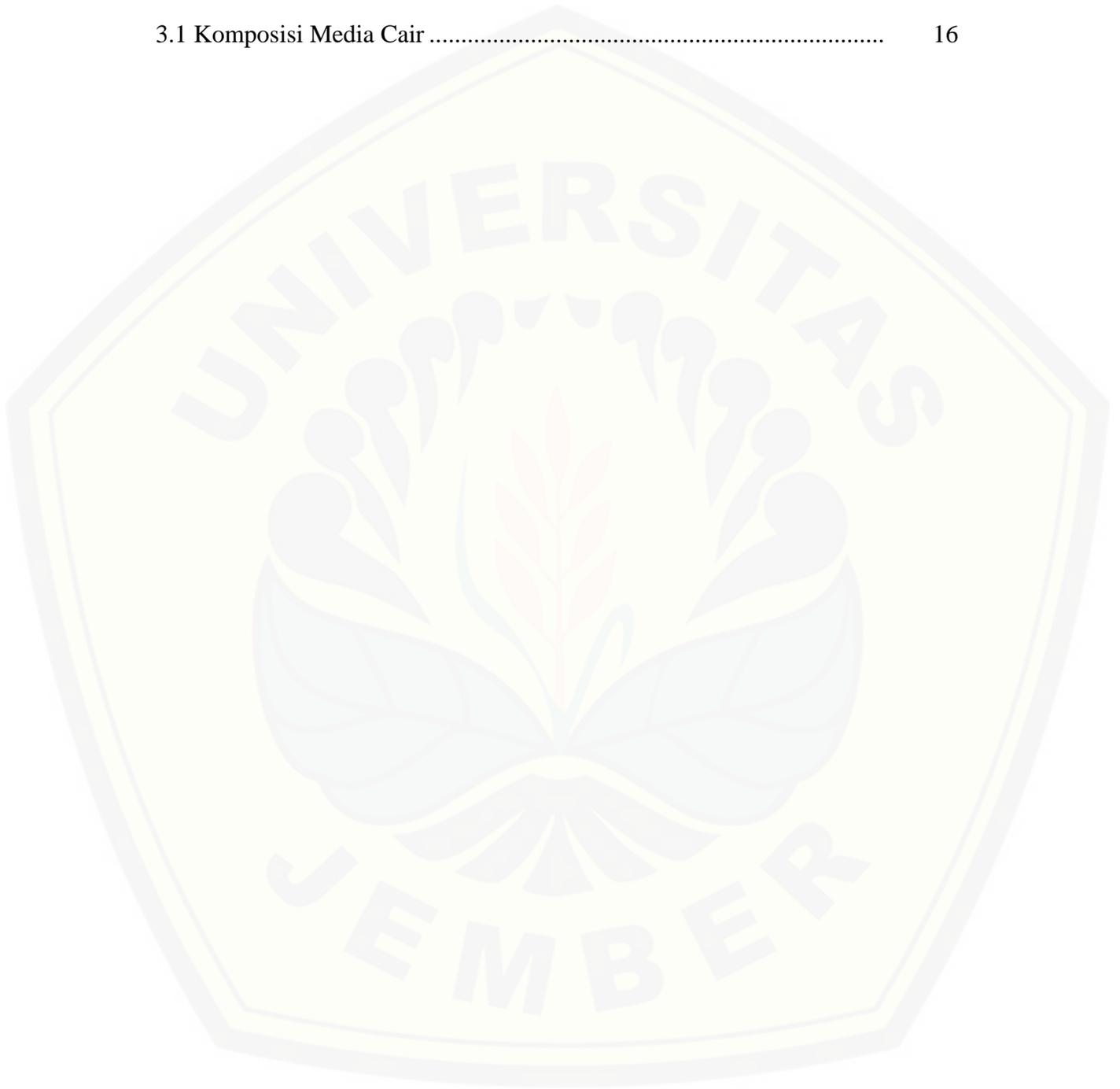
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	vii
SUMMARY	x
PRAKATA	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Nematoda Patogen Serangga	4
2.1 Morfologi dan Biologi Nematoda Patogen Serangga	5
2.3 Mekanisme Masuk dan Mekanisme Infeksi Nematoda	7
2.4 Bakteri Simbiotik Nematoda Patogen Serangga	8
2.5 Perbanyak Nematoda Patogen Serangga	10

2.6 Hipotesis	11
BAB 3. METODOLOGI	12
3.1 Tahap Penelitian	12
3.1.1 Perbanyak Isolat Nematoda secara <i>In Vivo</i>	12
3.1.2 Isolasi Bakteri Simbion	13
3.1.3 Pembuatan Media Cair	14
3.1.4 Inokulasi Bakteri dan Nematoda ke dalam Media Cair...	15
3.2 Variabel Pengamatan	15
3.2.1 Rata-Rata Jumlah Nematoda Patogen Serangga	15
3.2.2 Uji Patogenitas Nematoda Patogen Serangga Hasil Perbanyak	16
3.2.3 Analisis Data.....	16
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Hasil	17
4.1.1 Jumlah Nematoda Patogen Serangga <i>Steinernema</i> sp. pada Media Cair	17
4.1.2 Uji Patogenitas Nematoda Patogen Serangga <i>Steinernema</i> sp. dengan Media Cair pada Larva <i>Tenebrio molitor</i>	18
4.2 Pembahasan	20
BAB 5. PENUTUP	26
5.1 Kesimpulan.....	26
5.2 Saran	26
DAFTAR PUSTAKA	27
LAMPIRAN	31

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Komposisi Media Cair	16

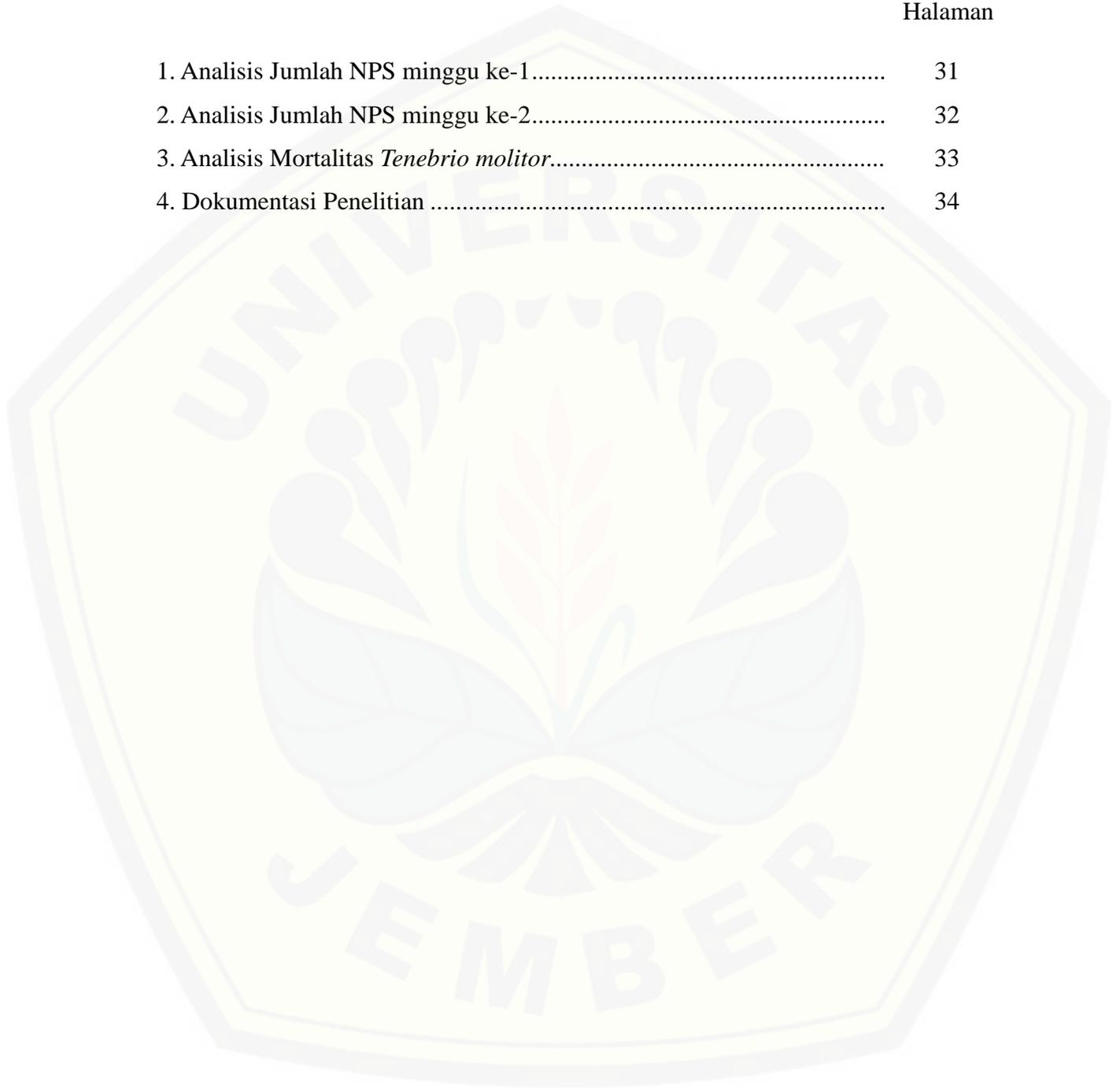


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Siklus hidup nematoda	5
2.2 Perilaku nematoda.....	6
2.3 (a) <i>T. molitor</i> sehat	8
2.3 (b) <i>T. molitor</i> yang terinfeksi NPS berubah warna menjadi kecoklatan	8
3.1 Koloni bakteri simbion fase primer	13
4.1 Grafik rata-rata jumlah NPS.....	17
4.2 Grafik mortalitas larva <i>T. molitor</i> pada Uji Patogenitas 24 jam.....	19
1. Media A.....	34
2. Media B.....	34
3. Media C.....	35
4. Media D.....	35
5. Proses shaker media cair	36
6. Pengamatan jumlah NPS pada media cair	36
7. Uji Patogenitas pada larva <i>T. molitor</i>	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Analisis Jumlah NPS minggu ke-1.....	31
2. Analisis Jumlah NPS minggu ke-2.....	32
3. Analisis Mortalitas <i>Tenebrio molitor</i>	33
4. Dokumentasi Penelitian	34



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan insektisida kimia sebagai salah satu cara pengendalian yang banyak digunakan petani berpotensi menimbulkan berbagai macam dampak negatif, seperti terjadinya resistensi hama, resurgensi, keracunan pada manusia dan pencemaran terhadap lingkungan. Dengan adanya dampak negatif yang ditimbulkan insektisida kimia, maka terbuka peluang untuk mengembangkan alternatif pengendalian hama yang ramah terhadap lingkungan. Alternatif pengendalian hama yang ramah lingkungan adalah pengendalian hama secara hayati. Telah banyak organisme yang digunakan sebagai agens pengendalian hayati yaitu adalah pemanfaatan patogen serangga, seperti: bakteri, jamur, virus, dan nematoda. Penggunaan nematoda patogen serangga telah banyak dikembangkan untuk pengendalian hayati beberapa serangga hama di berbagai jenis tanaman.

Menurut Sulistyanto (2000), salah satu genus nematoda patogen serangga (NPS) adalah *Steinernema* sp., yang mempunyai beberapa keunggulan sebagai agensia pengendalian serangga hama dibandingkan dengan musuh alami lain, yaitu daya bunuhnya sangat cepat, kisaran inangnya luas, aktif mencari inang sehingga efektif untuk mengendalikan serangga dalam jaringan, tidak menimbulkan resistensi, dan mudah diperbanyak. Pengendalian secara hayati dengan pemakaian Nematoda Patogen Serangga (NPS) telah dilaksanakan secara luas di beberapa Negara di Eropa, Australia, Asia, China, dan Amerika. Di Indonesia pemanfaatannya masih sangat kecil dan terbatas. Di Indonesia pemanfaatan agens pengendali secara hayati dengan NPS untuk mengendalikan serangga hama baik pada tanaman perkebunan, pangan, rumput lapangan golf serta hortikultura menggunakan nematoda *Steinernema* spp. dan *Heterorhabditis* spp. sebagai isolat asli Indonesia lebih mudah untuk diterapkan.

Pengendalian hayati dengan nematoda patogen serangga dalam jangka panjang dapat menghemat biaya produksi, sehingga meningkatkan keuntungan petani. Hambatan utama pemanfaatan NPS di lapang adalah memerlukan aplikasi

dalam jumlah banyak. Pemanfaatan NPS lokal secara luas di lapangan terkendala oleh produksi massalnya. Produksi massal secara *in vivo* mudah dilakukan tetapi tidak ekonomis untuk skala komersial dan hanya mampu untuk memenuhi kebutuhan bagi kegiatan penelitian maupun pengendalian skala kecil. Perbanyakannya secara *in vitro* pada media buatan sangat diperlukan.

Penyediaan NPS *Steinernema sp.* dalam jumlah banyak saat ini masih dilakukan dengan menggunakan perbanyakan media padat (*solid culture*). Wang dan Bedding (1997) melaporkan bahwa perbanyakan dengan menggunakan media padat menghasilkan nematoda sebanyak 25×10^6 JI per 500 gr. Penelitian menunjukkan bahwa perbanyakan nematoda dengan media padat memiliki beberapa kekurangan yaitu memerlukan banyak tenaga kerja, mudah kontaminasi dan membutuhkan waktu yang relatif lama. Sehingga saat ini beberapa perusahaan yang memproduksi nematoda *Steinernema spp.* dan *Heterorhabditis spp.* telah banyak beralih ke media cair (*liquid culture*). Alternatif pembiakan massal lainnya, yaitu dengan media cair yang diproduksi dalam Bioreaktor dengan volume dari 5, 10, 500 sampai 80.000 liter (Sulistyanto, 2000).

Perbanyakan NPS dengan media cair dianggap lebih menguntungkan dibandingkan perbanyakan menggunakan media padat jika di produksi dalam skala besar, sehingga banyak peneliti yang mengembangkan berbagai macam formulasi media cair yang selain mampu menghasilkan jumlah juvenil infektif lebih besar, juga dapat disimpan dalam jangka waktu lebih lama serta mudah dalam melakukan aplikasi di lapang. Berdasarkan penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Chaerani (2000), menunjukkan bahwa perbanyakan *in vitro* dengan media cair diketahui dapat menghasilkan jumlah NPS lebih besar dibandingkan dengan perbanyakan secara *in vivo*.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui jumlah nematoda terbanyak hasil perbanyakan nematoda patogen serangga (NPS) *Steinernema sp.* dengan beberapa jenis media cair. Empat media cair yang di uji Media A (Bedding, 1981), Media B (Han *et al.*, 1993), Media C (Wouts, 1981) dan Media D (Hara *et al.*, 1981). Hasil perbanyakan dengan media cair tersebut kemudian di uji patogenitas pada larva *Tenebrio molitor* untuk melihat tingkat virulensinya.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat dirumuskan beberapa masalah untuk dikaji, yaitu:

1. Jenis media cair apakah yang menghasilkan jumlah nematoda terbanyak dari hasil perbanyakan nematoda patogen serangga *Steinernema* sp.?
2. Apakah jumlah nematoda yang dihasilkan dari perbanyakan nematoda patogen serangga *Steinernema* sp. dengan media cair diikuti dengan tingkat virulensi yang tinggi berdasarkan uji patogenitas yang dilakukan pada larva *Tenebrio molitor*?

1.2 Tujuan

Tujuan dilaksanakannya penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis media cair yang menghasilkan jumlah nematoda terbanyak pada perbanyakan nematoda patogen serangga *Steinernema* sp., serta mengetahui tingkat virulensi nematoda patogen serangga hasil dari perbanyakan dengan media cair melalui uji patogenitas menggunakan larva *T. molitor*.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini yaitu memperoleh informasi mengenai jenis media cair yang menghasilkan jumlah nematoda terbanyak pada perbanyakan nematoda patogen serangga *Steinernema* sp., serta mengetahui tingkat virulensi nematoda patogen serangga hasil dari perbanyakan dengan media cair melalui uji patogenitas menggunakan larva *T. molitor*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Nematoda Patogen Serangga

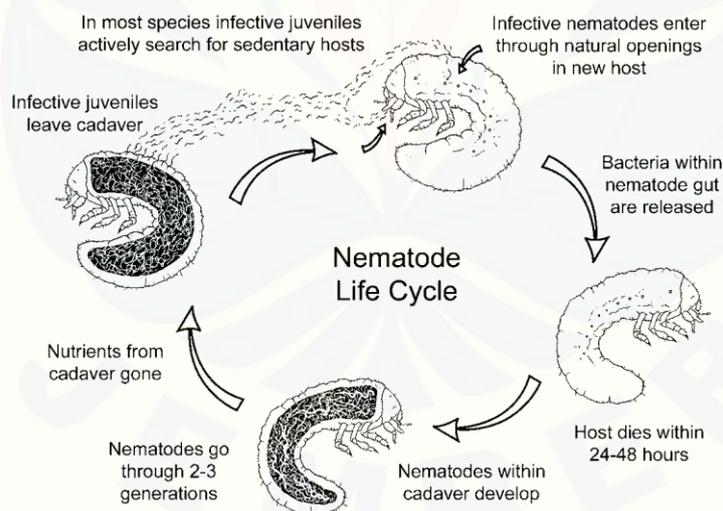
Nematoda patogen serangga mempunyai kemampuan mencari inang yang tinggi, menginfeksi dan membunuh serangga sasaran dengan cara meracuni hemolimfa dalam waktu singkat hanya 24-48 jam, mudah diperbanyak secara massal pada medium buatan, mempunyai kisaran inang yang luas (meliputi, Ordo Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera, dan Diptera dengan sasaran utama stadium larva), tidak berbahaya bagi mamalia dan vertebrata, tidak meracuni lingkungan, kompatibel dengan sebagian besar pestisida kimia, belum dilaporkan dapat menyebabkan kekebalan serangga (Gaugler dan Kaya, 1990). Keuntungan lain penggunaan nematoda adalah menghasilkan produk yang bebas residu bahan kimia, sehingga akan mampu memenuhi standar ISO 1400 (Nugrohorini dan Windriyanti, 2009).

Nematoda *Steinernema* sp., diklasifikasikan sebagai Kingdom Animalia, Phylum Nematoda, Class Secernentea, Ordo Rhabditida, Family Steinernematidae, Genus Steinernema dan Spesies *Steinernema* sp. Secara mikroskopis, ciri-ciri dari nematoda *Steinernema* sp. dengan pembesaran 400 kali adalah memiliki badan halus, dengan ukuran tubuh > 500 – 900 mikrometrikron, bentuk kepala halus dan tidak bertanduk, bentuk ekor tumpul. *Steinernema* sp. terbagi menjadi jantan dan betina, keduanya harus masuk ke dalam tubuh serangga inang agar dapat bereproduksi. *Steinernema* jantan mempunyai panjang tubuh 1000 – 1900 μm , lebar 90 – 200 μm , panjang stoma 4,5 – 7 μm , lebar stoma 4 – 5 μm , panjang ekor 19 – 27 μm , panjang spikula 72 – 89 μm , gubernakulum 57 – 70 μm , panjang mucron 2,8 – 4,5 μm . *Steinernema* betina, panjang tubuh 3020 – 3972 μm , lebar 153 – 192 μm , panjang stoma 7 – 12 μm , lebar stoma 5,0 – 8,5 μm , panjang ekor 30 – 47 μm , lebar vulva 49 – 54 μm . Untuk stadia Juvenil Infektif memiliki panjang tubuh 500 – 570 μm , lebar 15 – 25 μm , panjang ekor 47 – 54 μm (Stock, 1993; Poinar, 1990).

2.2 Morfologi dan Biologi Nematoda Patogen Serangga

Fase reproduktif pada generasi pertama Steinermatidae yang dihasilkan di dalam tubuh serangga inang terdiri dari nematoda betina dan jantan (Poinar, 1979; Kaya & Stock, 1997). Nematoda Patogen Serangga (NPS) menyelesaikan satu siklus hidup / generasi memerlukan waktu 1 minggu dengan perkembangan dari Telur - Juvenil I - Juvenil II - Juvenil III - Juvenil IV. Pada stadia telur, Juvenil I, Juvenil II dan dewasa, nematoda berada didalam tubuh inang. Pada Juvenil III dan Juvenil IV NPS keluar dari tubuh inangnya untuk memperoleh inang baru. Juvenil III merupakan Juvenil Infektif yang paling efektif untuk membunuh inang.

Siklus hidup nematoda entomopatogen biasanya terbagi dalam dua fase, yaitu fase infektif dan fase reproduktif. Fase infektif adalah Juvenil III atau disebut juvenil infektif (JI) yang dikenal sebagai dauer juvenil yang secara morfologi dan fisiologi teradaptasi untuk tetap hidup dalam jangka waktu yang lama di lingkungan luar sampai menemukan serangga inangnya, kemudian mencapai fase reproduksi di dalam tubuh serangga inangnya (Poinar, 1979; Wouts, 1991; Kaya & Stock, 1997).

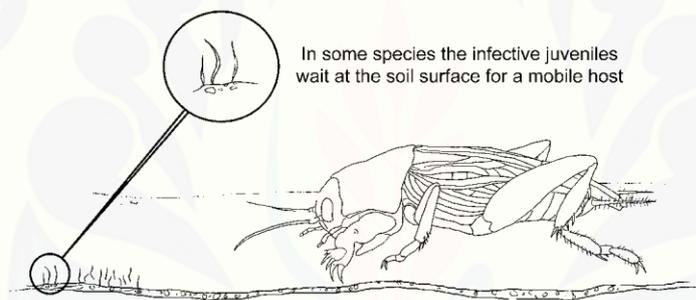


Gambar 2.1 Siklus hidup nematoda (Sumber : Purnomo *et al.*, 2012)

Tubuh JI masih terbungkus dalam kutikula Juvenil II yang berfungsi sebagai pelindung dari gangguan fisik, mikroorganisme dan invetebrata yang lain. Fase infektif ini merupakan fase yang paling penting, sebab JI dapat aktif mencari serangga inang. Setelah menemukan inang, nematoda akan masuk ke dalam tubuh

serangga inang dengan cara melakukan penetrasi melalui lubang alami (mulut, anus dan spirakel) atau kutikula yang tipis. Di dalam rongga tubuh serangga inang, nematoda melepaskan bakteri simbion dan akan menyebabkan kematian serangga inang dalam waktu 24-48 jam (Poinar, 1979).

Kepala (Anterior) terdapat Cephalosensor yaitu syaraf syaraf yang mampu mendeteksi secara kimiawi ekskresi serangga khusus, sehingga dapat menentukan inang spesifik. Cephalosensor dapat juga mendeteksi karbondioksida (CO₂) dari respirasi serangga inang spesifik. Dan hal ini berarti Nematoda Entomopatogen mampu membedakan mana yang inang serangga spesifik dan musuh alami. Perilaku Nematoda Patogen Serangga (NPS) untuk menemukan inang bermacam – macam. Nematoda *Steinernerma* sp. berperilaku “Ambuser“ adalah diam dan menunggu inang sampai berada didekatnya, kemudian menyerang.



Gambar 2.2 Perilaku nematoda (Sumber : Purnomo, 2012)

Penyebaran nematoda sangat diperlukan untuk menemukan inang. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap penyebaran dan menemukan inang di dalam tanah antara lain ukuran pori-pori tanah, kelembaban, temperatur dan akar tanaman (Kaya dan Gaugler, 1993). Nematoda hidup dalam tanah yang lembab, basah, daerah perakaran, vegetasi rimbun, kedalaman 0 – 10 cm dari permukaan tanah. Temperatur yang sesuai bagi nematoda adalah 19 derajat sampai 29 derajat celsius dan kelembaban 100 %. Hambatan terjadi di bawah 10 derajat Celsius dan diatas 33 derajat Celsius. Tipe tanah liat menghambat pergerakan nematoda, sehingga penyebaran didalam tanah liat sangat terbatas. Kelembaban 85 sampai 98 % dan suhu 30 derajat Celsius NPS akan mati setelah 102 jam. Kebutuhan oksigen NEP tergantung pada suhu yang ada. Nematoda masih infeksiif pada

temperatur tinggi jika terdapat jumlah oksigen yang banyak dan mampu bertahan selama 43 hari pada oksigen 0,5 % suhu 20 derajat Celsius (Sulistyanto, 2000) .

Nematoda *Steinernema spp* paling banyak terdapat di tanah. Selain itu, juga mampu hidup di tempat-tempat yang banyak mengandung bahan organik, air tawar, dan air laut. Di dalam tanah, nematoda hidup dengan memanfaatkan bahan organik atau memakan serangga-serangga atau organisme lain. Di dalam tubuh serangga, nematoda dapat berkembang biak dengan cepat hingga menghasilkan 2 sampai 3 generasi. Siklus hidup nematoda dari telur sampai menjadi dewasa memerlukan waktu kurang lebih 14 hari. Apabila terdapat nutrisi yang melimpah siklus hidupnya bisa lebih cepat lagi dan sebaliknya apabila tidak tersedia nutrisi yang cukup maka daur hidup nematoda bisa lebih lama (Gaugler dan Han, 2002).

Nematoda ini bisa bertahan di dalam tanah dengan cara inaktif dalam jangka waktu tertentu dan akan melakukan migrasi ke tempat lain apabila tidak ada persediaan makanan yang cukup. Perpindahan nematoda dari suatu tempat ke tempat lain bisa terjadi secara pasif yakni dengan bantuan air, angin, atau terbawa oleh alat-alat pertanian (Samsudin, 2011).

2.3 Mekanisme Masuk dan Mekanisme Infeksi Nematoda

Nematoda Patogen Serangga (NPS) merupakan nematoda yang bersifat vector dari bakteri yang memparasit serangga inang dengan penetrasi langsung melalui kutikula serangga dan lubang lubang alami seperti spiracle, mulut, dan anus. Nematoda Patogen Serangga (NPS) masuk ke tubuh serangga dengan menyerang aliran darah (hemocoel) dan masuk kedalam saluran pernapasan (vesikel). Jika masuk melalui mulut atau anus, nematoda menembus dinding saluran pencernaan untuk memperbanyak diri didalam hemocoel dan jika melalui spirakel, nematoda menembus melalui dinding trakea. Selanjutnya NPS mengeluarkan bakteri simbiosis yaitu bakteri yang bersifat simbiosis mutualisme dan tersimpan di instestinal dan lumen usus nematoda.

Ketika nematoda memperbanyak diri didalam hemocoel inang, mereka mengeluarkan bakteri yang akan memperbanyak diri dengan cepat dalam *haemolymph*. Walaupun bakteri berperan utama dalam kematian serangga inang,

nematoda juga menghasilkan toksin yang dapat mematikan serangga inang (Adnan dan Burhanuddin, 2007).

Pada umumnya gejala serangga hama yang terserang oleh Nematoda Patogen Serangga (NPS) adalah adanya perubahan warna, tubuh menjadi lembek, dan bila dibedah konstitusi jaringan menjadi cair tapi tidak berbau. Semua cadaver serangga yang terinfeksi nematoda akan memiliki karakteristik yang berbeda (keras dan elastis) dan tetap utuh selama lebih dari seminggu, sementara itu nematoda menyelesaikan siklus hidupnya. Serangga yang mati dari sesuatu yang bukan disebabkan oleh infeksi nematoda akan membusuk dan hancur dalam sehari atau dua hari setelah mati (Sulistyanto, 2001).



Gambar 2.3 (a) *T. molitor* sehat; (b) *T. molitor* yang terinfeksi NPS berubah warna menjadi kecoklatan

2.4 Bakteri Simbiotik Nematoda Patogen Serangga

Bakteri simbiotik pada *Steinernema* sp. adalah *Xenorhabdus* sp. yang virulen terhadap berbagai serangga inang. Nematoda dan bakteri bersifat mutualisme (saling menguntungkan) dimana nematoda mendapatkan nutrisi yang dihasilkan oleh bakteri yaitu protein sedangkan bakteri merasa terlindungi oleh nematoda (Poinar, 1979). Simbiosis tersebut terdapat didalam intestine nematoda dan berperan untuk mengendalikan serangan hama. Hubungan mutualistik ini

memberikan beberapa keuntungan bagi nematoda di antaranya yaitu dapat membunuh inang dengan cepat, serta menyediakan nutrisi dan lingkungan yang cocok bagi perkembangan nematoda. Bakteri simbiosis juga mampu memproduksi senyawa anti biotik yang dapat menghambat perkembangan mikro organisme sekunder yang ada dalam tubuh inang. Bagi bakteri simbiosis nematoda dapat melindungi bakteri dari kondisi ekstrim (Wartono dan Priatno, 2009) .

Setelah dilepaskan oleh nematoda, bakteri membunuh serangga inang melalui infeksi bakteri dan melepaskan berbagai senyawa yang bertindak untuk mempertahankan cadaver didalam tanah. Bakteri juga menyediakan sumber nutrisi untuk berkembangnya nematoda. Semua cadaver serangga yang terinfeksi nematoda akan memiliki karakteristik yang berbeda (keras dan elastis) dan tetap utuh selama lebih dari seminggu, sementara itu nematoda menyelesaikan siklus hidupnya. Serangga yang mati dari sesuatu yang bukan disebabkan oleh infeksi nematoda akan membusuk dan hancur dalam sehari atau dua hari setelah mati (Sulistyanto, 2001).

Bakteri simbiosis tersebut akan aktif dan berkembang biak pesat setelah nematoda menginfeksi tubuh inangnya. Setelah mencapai hemocoel dalam satu jam, nematoda mengaktifkan sistem pencernaannya dan melepaskan sel-sel bakteri simbiosis yang dibawanya kemudian berkembang biak dalam hemolimfa serangga sambil memproduksi racun untuk melawan sistem kekebalan tubuh inangnya. Dalam tujuh jam jaringan tubuh serangga mulai terdisintegrasikan dan melemah hingga mengalami kematian setelah 24-48 jam (Chaerani, 2000).

Bakteri simbiosis ini terdapat di dalam saluran pencernaan JI dan mengeluarkan protein antibiotik (bakteriosin), yaitu senyawa anti mikroba yang dapat menekan kolonisasi mikroba sekunder pada serangga inang (Poinar 1979). Biasanya sel bakteri mulai dilepaskan ke dalam hemolimfa serangga setelah nematoda entomopatogen masuk kedalam tubuh serangga. Saluran pencernaan nematoda yang semula tertutup mulai aktif bekerja. Sel-sel bakteri berkembang biak, kemudian mematikan serangga akibat toksin yang dihasilkannya dalam waktu 24-48 jam. Bersamaan dengan itu enzim-enzim yang dihasilkan bakteri memecah jaringan tubuh serangga menjadi nutrisi yang sesuai bagi nematoda.

Antibiotik/bakteriosin yang dihasilkan bakteri dapat mencegah pertumbuhan mikroorganisme sekunder yang kompetitif terhadap nematoda. Jaringan tubuh serangga yang telah dikonversi oleh bakteri ini dimanfaatkan oleh nematoda sebagai nutrisi untuk hidup dan berkembang biak (Wouts, 1991; Kaya, 1993).

2.5 Perbanyak Nematoda Patogen Serangga

Perbanyak secara *in vitro* dilakukan dengan padat atau media cair. Berbagai jenis media yang dapat digunakan untuk pembiakan nematoda entomopatogen terus ditemukan baik berbentuk padat maupun cair. Sejak awal tahun 1980, media cair untuk perbanyak nematoda telah aktif diteliti di beberapa lembaga penelitian dan perusahaan komersial (Davies, 1986; Pace *et al.*, 1986; Friedman *et al.*, 1989).

Bedding (1981) membuat suatu formula media untuk memperbanyak nematoda yang terdiri dari homogenat ginjal hewan (60%), lemak (20%) dan air (20%) yang ditempatkan dalam spon. Media untuk memproduksi nematoda entomopatogen yang dibuat sesuai dengan metode Bedding (1981) yaitu spon yang berisi media kaya protein. Wouts (Landcare Research New Zealand Ltd.) mengembangkan media cair untuk perbanyak NPS yang berbahan dasar telur ayam. Media ini mampu menghasilkan $1-2 \times 10^5$ IJ/ml dalam sekali proses *shaker*. Hal ini merupakan terobosan yang memungkinkan NPS di produksi menggunakan fermentor yang biasa digunakan di laboratorium (Surrey and Davis, 1996).

Kisaran suhu normal untuk pembiakan nematoda berkisar pada 19°C - 27°C atau sesuai dengan kehidupan di lingkungan aslinya. Suhu tinggi pada media pembiakan massal dapat menyebabkan bertambahnya tingkat kematian dalam kultur sedangkan pada suhu rendah akan menyebabkan bertambahnya waktu untuk pembiakan dan membutuhkan inokulum nematoda yang lebih banyak (Han *et al.*, 1993).

Menurut Ehlers dan Ilan (2005), perbanyak nematoda patogen serangga secara *in vitro* dengan media cair memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan media padat, yaitu nematoda patogen serangga lebih mudah

dikembangbiakkan dalam media buatan (*in vitro*) dalam skala besar (500-40.000 liter), dapat bertahan beberapa bulan bila disimpan pada suhu rendah, aplikasi menggunakan alat semprot yang biasa dipergunakan oleh petani, daya bunuh yang sangat cepat setelah di aplikasikan (24-48 jam), mudah diaplikasikan bersama-sama pestisida yang kompatibel lainnya.

Pembiakan massal dengan menggunakan media cair ini diproduksi dalam bioreaktor dengan volume dari 5, 10, 500 sampai 80.000 liter. Nematoda entomopatogen yang diproduksi pertama kali dalam bioreaktor adalah di Australia dalam volume 10 liter yang menghasilkan 90.000 JI/ml spesies *Steinernema* sp. (Sulistyanto, 2002). Beberapa perusahaan telah beralih dari media padat ke media cair karena media padat lebih banyak memakan tenaga kerja, mudah terkontaminasi dan membutuhkan waktu yang relatif lama. Perusahaan multi nasional Bioys (Palo Alto, CA, USA) adalah perusahaan yang pertama kali mengembangkan teknologi media cair dalam fermentor secara komersil dalam sekala besar (Ehlers dan Ilan, 2005).

Menurut Ehler *et al.* (1998), nematoda yang dihasilkan menggunakan bioreaktor adalah 41.000 JI/ml dalam waktu 20 hari, sedangkan dalam waktu 25 hari nematoda yang dihasilkan adalah 68.000 JI/ml-nya yang di perbanyak dalam media cair buatan. Sedangkan menurut Purnomo *et al* (1998) hasil perbanyakan massal menggunakan kultur cair *dog food pepton agar* menghasilkan 381816,67 JI/5ml media. Hasil tersebut lebih besar tiga kali dibandingkan menggunakan pembiakan secara *in vivo* dalam tubuh *Galleria mellonella* yang menghasilkan rata-rata 137707,2 per larva.

2.6 Hipotesis

Diduga terdapat satu jenis media perbanyakan terbaik yang memberi pengaruh nyata pada rata-rata jumlah NPS dan memiliki tingkat virulensi yang tinggi berdasarkan hasil uji patogenitas menggunakan larva *T. molitor* pada perbanyakan nematoda patogen serangga *Steinernema* sp.

BAB 3. METODOLOGI

Penelitian yang berjudul “Perbanyak Nematoda Patogen Serangga (NPS) *Steirnerema* sp. dengan Media Cair” dilaksanakan di Laboratorium Hama Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan serta di Unit Produksi Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember dengan waktu mulai bulan September 2014 sampai dengan bulan Januari 2015. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Dengan perlakuan atau taraf faktor yang terdiri dari Media A (Bedding, 1981), Media B (Han *et al.*, 1993), Media C (Wouts, 1981) dan Media D (Hara *et al.*, 1981). Tahap-tahap pelaksanaan penelitian ini adalah perbanyak isolat nematoda secara *in vivo*, isolasi bakteri simbiosis, pembuatan media cair, serta inokulasi bakteri dan nematoda ke dalam media cair. Variabel Pengamatan adalah rata-rata jumlah NPS dan uji patogenitas NPS hasil perbanyak.

3.1 Tahap Penelitian

3.1.1 Perbanyak Isolat Nematoda secara *In Vivo*

Perbanyak *Steirnerema* sp. (isolat koleksi Ir. Hari Purnomo, M.Si., PhD., DIC) secara *in vivo* menggunakan larva *Tenebrio molitor*. Masukkan Juvenil infektif (JI) dari *Steirnerema* sp. sebanyak 1 ml ke dalam cawan petri yang telah diberi kertas saring yang sebelumnya telah dilembabkan. Meletakkan ulat hongkong sebanyak 30 ekor. Setelah 48 jam kemudian, larva-larva yang mati diamati. Ulat hongkong yang mati dapat menunjukkan ciri-ciri dari infeksi nematoda. Ulat yang mati terdapat perubahan warna menjadi coklat tua dan tubuhnya menjadi lembek maka akibat infeksi dari *Steirnerema* sp.. Ulat yang mati kemudian di *white trap* dengan cara diletakkan pada cawan petri yang berisi 2 kertas saring lembab kemudian dimasukkan pada cawan petri yang lebih besar yang telah berisi akuades steril disekitarnya. Setelah 5-6 hari maka juvenil infektif akan terperangkap dalam air dan siap dipanen.

3.1.2 Isolasi Bakteri Simbion

Bakteri *Xenorhabdus* sp. diisolasi dari ulat hongkong (*T. molitor*) yang terinfeksi oleh nematoda patogen serangga *Steinernema* sp. (isolat koleksi dari Ir. Hari Purnomo, M.Si, Ph.D., DIC). Bakteri ini dibiakkan dalam media NBTA. Media NBTA dibuat dengan perbandingan bahan: NA 1000 ml + 0,025 g Bromothymol Blue + 0,04 g Triphenyl tetrazolium chloride (TTC). NA dan Bromothymol Blue dicampur sampai homogen, kemudian disterilisasi dalam autoklaf. TTC dicampur dengan bahan lain ketika sudah dingin.



Gambar 3.1 Koloni bakteri simbion fase primer

Sterilisasi permukaan larva yang terinfeksi nematoda dilakukan dengan menggunakan alkohol 95% selama 15 menit, lalu dibilas 3 kali dengan akuades steril, kemudian dikeringkan dengan kertas saring steril. Secara aseptis buka tubuh larva (jangan sampai usus terbuka), kemudian dengan menggunakan jarum ose *streak* cairan dari *haemolymph* ke dalam media NBTA (test fase primer bakteri simbion). Media diinkubasi pada suhu 25°C selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan pengamatan koloni bakteri yang muncul pada media (Gambar 3.1).

Tujuan dibiakkannya bakteri simbion dalam media NBTA adalah untuk memperbanyak nematoda dan untuk mengetahui bakteri simbion tersebut fase primer atau fase sekunder. Bakteri yang dibiakkan dalam media NBTA memiliki dua warna koloni biru tua (primer) dan merah (sekunder), dapat dipastikan bakteri tersebut merupakan bakteri simbion nematoda entomopatogen koloni bakteri fase

primer yang mampu menyerap bromthymol blue sehingga koloni berwarna biru. Koloni bakteri fase primer tersebut kemudian diperbanyak untuk dijadikan sumber inokulum. Inokulum diperbanyak pada media NB (*nutrient broth*) cair yang diinkubasi selama 48 jam dalam *rotary orbital shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruangan (28°C) dengan pH yang tidak terkontrol, sebelum diinokulasikan pada media perbanyakan massal (Purnomo, 1998).

3.1.3 Pembuatan Media Cair

Media cair yang digunakan dalam penelitian ini adalah media cair yang dibuat sebanyak 50 ml pada 4 perlakuan dan 5 ulangan. Dengan komposisi bahan sebagai berikut :

Tabel 3.1 Komposisi Media Cair

Perlakuan	Komposisi Media	Sumber
Media A	17,5 g usus ayam + 5 g lemak sapi + 27,5 ml akuades	Bedding (1981)
Media B	2 g telur ayam + 0,5 g lemak sapi + 45 ml akuades + 0,5 g <i>yeast extract</i> + 0,5 g <i>peptone</i> + 1,5 g tepung kedelai	Han <i>et al.</i> (1993)
Media C	2,5 g tepung kedelai + 46,3 ml akuades + 0,2 g <i>yeast extract</i> + 0,5 g nutrient broth + 0,5 ml minyak kedelai	Wouts (1981)
Media D	10 g <i>dog food</i> + 40 ml akuades	Hara <i>et al.</i> (1981)

Pembuatan media cair untuk perbanyakan *Steinernema* sp. menurut komposisi yang ada pada (Tabel 3.1). Media A yang dibuat dari 17,5 g usus ayam dan 5 g lemak sapi yang ditimbang, kemudian bahan tersebut dimasukkan ke dalam blender dan ditambahkan akuades sebanyak 27,5 ml dan diblender menjadi satu. Media cair kedua adalah Media B, yang dibuat dari 2 g telur ayam; 0,5 g lemak sapi; 0,5 g *yeast extract*; 0,5 g *peptone* dan 1,5 g tepung kedelai yang ditimbang, kemudian bahan tersebut dimasukkan ke dalam blender dan ditambahkan akuades sebanyak 45 ml dan diblender menjadi satu. Media cair

ketiga adalah Media C yang dibuat dari 2,5 g tepung kedelai; 0,2 g *yeast extract* dan 0,5 g *nutrient broth* yang ditimbang, kemudian bahan tersebut dimasukkan ke dalam blender lalu ditambahkan 0,5 ml minyak kedelai dan akuades sebanyak 46,3 ml dan diblender menjadi satu. Media cair keempat adalah Media D yang dibuat dari 10 g *dog food* yang ditimbang kemudian ditambahkan akuades sebanyak 40 ml lalu diblender. Masing-masing media cair yang telah dibuat tersebut di sterilisasi menggunakan autoklaf.

3.1.4 Inokulasi Bakteri dan Nematoda ke dalam Media Cair

Isolat bakteri pada media NBTA yang merupakan bakteri simbiosis nematoda di inokulasikan sebanyak 5 ml yaitu 10% dari inokulum yang telah tumbuh pada media *nutrient broth* ke dalam empat media cair dan di inkubasi selama 48 jam dengan cara di *shaker* menggunakan *rotary orbital shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruangan (28°C). Setelah bakteri di inkubasi selama 48 jam, kemudian nematoda di inokulasikan dalam media dengan konsentrasi 100 JI/56 ml pada tiap-tiap media cair dan di *shaker* selama 14 hari. Jumlah nematoda yang dihasilkan pada masing-masing media diamati pada minggu pertama dan minggu kedua.

3.2 Variabel Pengamatan

3.2.1 Rata-Rata Jumlah Nematoda Patogen Serangga

Setelah media cair di *shaker* selama 14 hari maka dilakukan perhitungan rata-rata jumlah nematoda pada minggu pertama dan minggu kedua, dengan menggunakan *counting dish*. Perhitungan dilakukan mengambil 1 ml suspensi media sebanyak 10% pada masing-masing unit percobaan. Total suspensi media pada masing-masing perlakuan di tiap ulangan dalam erlenmeyer adalah sebesar 56 ml, yaitu berasal dari media cair sebanyak 50 ml, ditambah 5 ml bakteri dan 1 ml NPS yang di inokulasi dalam media tersebut. Suspensi yang telah diletakkan pada *counting dish* dihitung dengan melihat tiap kotak yang ada di permukaan *counting dish* tersebut. Perhitungan nematoda dilakukan dengan mengambil 1 ml suspensi nematoda dan dimasukkan ke dalam *counting dish*, nematoda yang

berada dalam *counting dish* dihitung menggunakan *hand counter*. Perhitungan diulang sebanyak lima kali pada setiap unit percobaan.

3.2.2 Uji Patogenitas Nematoda Patogen Serangga Hasil Perbanyakan

Uji patogenitas dilakukan pada larva *T. molitor*. Konsentrasi yang digunakan pada ke empat media perbanyakan masing-masing 100 JI/56ml. Pengujian dilakukan dengan cara menyemprotkan 1 ml nematoda juvenile infeksi menggunakan mikro pipet ke dalam petridish (9 cm) yang telah berisi serangga uji *T. molitor* sebanyak 30 larva dalam petridish yang berbeda pada setiap ulangan. Pengamatan mortalitas dilakukan pada larva *T. molitor*. Parameter yang di amati adalah mortalitas larva *T. molitor* dalam waktu 24 jam setelah perlakuan dengan cara menghitung persentase kematian larva *T. molitor* pada setiap ulangan. Penentuan mortalitas ditentukan dengan rumus :

$$\text{Mortalitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah larva } T. \text{ molitor yang mati}}{\text{Jumlah larva } T. \text{ molitor yang di uji}} \times 100 \%$$

3.2.3 Analisis Data

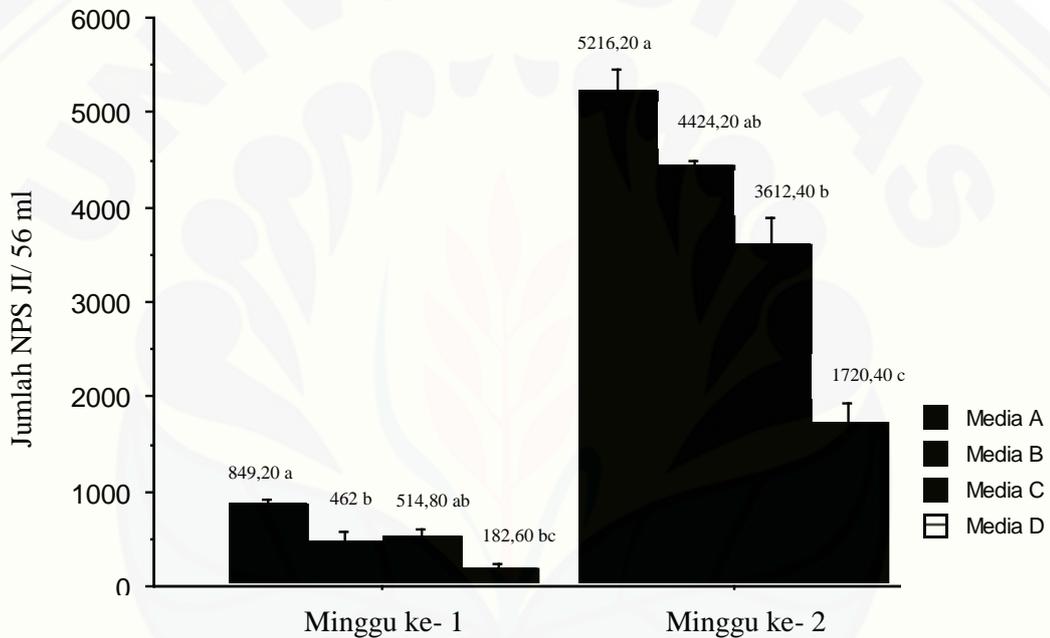
Rata-rata jumlah nematoda patogen serangga dan uji patogenitas pada hasil perbanyakan nematoda patogen serangga *Steinernema* sp. dengan media cair dianalisis menggunakan analisis sidik ragam dan dilakukan uji lanjut jika hasilnya berbeda nyata menggunakan uji Tukey taraf 5%. Semua uji di analisis menggunakan software *StatView version 5 (SAS 1998)*.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Jumlah Nematoda Patogen Serangga *Steinernema* sp. pada Media Cair

Hasil penelitian yang dilakukan di Laboratorium Hama Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan serta di Unit Produksi Program Studi Agroteknologi, diperoleh data rata-rata jumlah Nematoda Patogen Serangga (NPS) *Steinernema* sp. hasil perbanyakan dengan media cair sebagai berikut :



Gambar 4.1 Rata-rata jumlah NPS (angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada diagram batang menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji Tukey taraf 5%)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada pengamatan minggu ke-1 diperoleh rata-rata jumlah NPS terbanyak yaitu pada Media A sebanyak 849,20 JI/ 56 ml, jika dibandingkan dengan media perbanyakan yang lain yaitu Media C sebanyak 514,80 JI/56 ml, Media B dengan rata-rata jumlah NPS sebanyak 462 JI/ 56 ml dan Media D sebanyak 182,60 JI/56 ml. Selanjutnya dilakukan analisis dengan perbandingan rata-rata jumlah NPS antar media perbanyakan dengan hasil yaitu berbeda sangat nyata , berdasarkan analisis varian ($F_{(3;16)} = 10,380, P = 0,0004, \alpha 5\%$), sehingga dilakukan uji lanjut menggunakan Tukey taraf 5 %. Uji

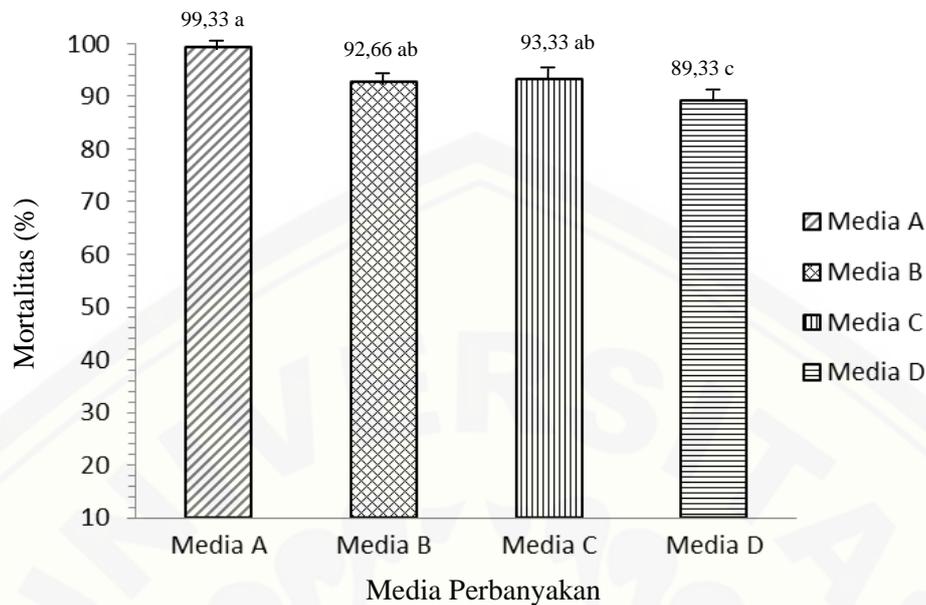
lanjut pada rata-rata jumlah NPS di minggu ke-1 menunjukkan hasil yang berbeda nyata antara perlakuan Media A dengan Media B, dan Media A dengan Media D.

Pengamatan minggu ke-2 menunjukkan bahwa rata-rata jumlah NPS terbanyak yaitu pada Media A sebanyak 5216,20 JI/56 ml, jika dibandingkan dengan media perbanyakan yang lain yaitu Media B dengan rata-rata jumlah NPS sebanyak 4424,20 JI/56 ml, Media C sebanyak 3612,40 JI/56 ml, dan Media D sebanyak 1720,40 JI/56 ml. Selanjutnya dilakukan analisis dengan perbandingan rata-rata jumlah NPS antar media perbanyakan dengan hasil yaitu berbeda sangat nyata, berdasarkan analisis varian nilai ($F_{(3;16)} = 52,107$, $P = 1,766$, $\alpha 5\%$), sehingga dilakukan uji lanjut menggunakan Tukey taraf 5%. Uji lanjut pada rata-rata jumlah NPS di minggu ke-1 menunjukkan hasil yang berbeda nyata antara perlakuan Media A dengan Media C, Media A dengan Media D, Media B dengan Media D dan Media C dengan Media D.

Hasil penelitian berdasarkan parameter rata-rata jumlah NPS secara keseluruhan berdasarkan waktu pengamatan pada minggu ke-1 dan minggu ke-2 yaitu Media A menghasilkan rata-rata jumlah NPS terbanyak pada pengamatan di minggu ke-1 dan minggu ke-2. Media C menghasilkan rata-rata jumlah NPS lebih banyak dibandingkan dengan Media B pada pengamatan di minggu ke-1, tetapi pada pengamatan di minggu ke-2 Media B memiliki rata-rata jumlah NPS lebih baik dari Media C. Sedangkan Media D menghasilkan rata-rata jumlah NPS terendah di bandingkan dengan media perbanyakan lainnya.

4.1.2 Uji Patogenitas Nematoda Patogen Serangga *Steinernema* sp. dengan Media Cair pada Larva *Tenebrio molitor*

Uji patogenitas dalam waktu 24 jam yang dilakukan terhadap NPS hasil perbanyakan dengan media cair dilakukan untuk mengetahui tingkat virulensi diperoleh data rata-rata mortalitas dari larva *Tenebrio molitor* sebagai berikut :



Gambar 4.2 Mortalitas larva *T. molitor* pada uji patogenitas 24 jam (angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada diagram batang menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji Tukey taraf 5%)

Media A menunjukkan rata-rata mortalitas paling tinggi dibandingkan dengan media cair lainnya yaitu sebesar 99,33%. Media C menunjukkan rata-rata mortalitas lebih baik yaitu sebesar 93,33% jika dibandingkan dengan pada Media B sebesar 92,66% dan pada Media D sebesar 89,33 %. Hasil penelitian pada uji patogenitas nematoda patogen serangga *Steinernema* sp. yang diperbanyak dengan media cair menunjukkan hasil yang berbeda nyata berdasarkan analisis varian ($F_{(3;16)} = 6,12$, $P = 0,005$, $\alpha 5\%$). Kemudian dilakukan uji lanjut menggunakan Tukey taraf 5 %.

Uji lanjut rata-rata mortalitas NPS pada larva *T. molitor* 24 jam setelah perlakuan menggunakan hasil perbanyakan dengan media cair menunjukkan hasil yang berbeda nyata antara perlakuan Media A dengan Media D. Hal tersebut menunjukkan bahwa nematoda hasil perbanyakan dengan Media A memiliki tingkat patogenitas yang paling baik dibandingkan dengan media perbayakan lainnya.

4.2 Pembahasan

Dari hasil penelitian diperoleh data jumlah NPS yang dihasilkan oleh masing-masing media cair. Pada pengamatan di minggu ke-1 dan minggu ke-2, terdapat peningkatan rata-rata jumlah NPS (Gambar 4.1.1) dari inokulum awal yang di inokulasikan ke masing-masing perlakuan di tiap ulangan sebesar 1 ml dengan jumlah nematoda sebanyak 100 JI. Konsentrasi awal dari nematoda yang di suspensikan ke dalam media turut menentukan jumlah dari hasil perbanyakan. Menurut Grewal *et al.* (2005), keberhasilan teknik produksi massal nematoda patogen serangga dengan media cair (*liquid culture*) dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain komposisi media, suplai oksigen, temperatur, biologi bakteri dan populasi bakteri- nematoda.

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa perbanyakan *Steinernema sp.* dengan media cair yang menghasilkan rata-rata jumlah nematoda terbanyak di pengamatan minggu ke-1 dan minggu ke-2 adalah perlakuan Media A yaitu sebesar 849,20 JI/56 ml dan 5216,20 JI/56 ml. Media A mampu menghasilkan jumlah NPS lebih tinggi dibandingkan dengan media lain, baik pada pengamatan minggu ke-1 dan minggu ke-2. Hal tersebut dipengaruhi oleh komposisi media dari Media A yang mengandung protein dari usus dan lemak hewan yang dibutuhkan dalam proses metabolisme nematoda *Steinernema sp.* dan juga bagi bakteri simbion *Xenorhabdus sp.*. Han dan Ehlers (2001) mengatakan bahwa lemak sebaiknya selalu ditambahkan untuk meningkatkan kadar lemak total pada juvenil infeksi. Kandungan lemak pada media memiliki efek pada komposisi asam lemak dari bakteri dan nematoda. Pada nematoda patogen serangga *Steinernema carpocapsae* membutuhkan protein hewani dan tidak dapat bereproduksi tanpa adanya sumber lemak pada media.

Media C mampu menghasilkan rata-rata jumlah NPS sebesar 514,80 JI/56 ml, jumlah tersebut lebih tinggi dari Media B yang menghasilkan NPS sebesar 462 JI/56 ml di minggu ke-1. Tetapi pada minggu ke-2, Media B menghasilkan rata-rata jumlah NPS sebesar 4424,20 JI/56 ml, lebih tinggi dibanding dengan Media C yang menghasilkan rata-rata jumlah NPS sebesar 3612,40 JI/56 ml. Sedangkan Media D menghasilkan rata-rata jumlah NPS terendah dari media

perbanyakannya, yaitu sebesar 182,60 JI/56 ml di minggu ke-1 dan sebesar 1720,40 JI/56 ml di minggu ke-2. Hal ini disebabkan oleh komposisi media yang terbuat dari makanan anjing buatan pabrik, sehingga terdapat kandungan tambahan lain. Selain itu konsentrasi yang ada pada media tinggi, sehingga menyebabkan kandungan oksigen semakin rendah. Keadaan rendahnya oksigen tersebut dapat menyebabkan nematoda kekurangan oksigen dan menghambat proses metabolisme yang penting bagi pertumbuhan nematoda. Dalam penelitiannya Chaerani (2000) mengatakan, jika difusi oksigen ke dalam suspensi rendah maka dapat menyebabkan penurunan aktivitas nematoda.

Menurut Ogura dan Haraguchi (1993), pada pembiakan nematoda patogen serangga, media yang bersumber nutrisi hewani memberikan hasil yang lebih dari kualitas bila dibandingkan dengan media yang menggunakan media buatan siap pakai. Ogura dan Haraguchi (1993) membuat media yang terdiri dari tepung, *D-glucose*, lemak babi, *peptone*, *yeast extract* dan agar. Dengan menggunakan medium tersebut ternyata *peptone* dan *yeast extract* dapat memacu hasil juvenil infeksi dari nematoda *Steinernema kushidai* lebih baik dibandingkan dengan media yang tidak menggunakan kedua bahan tersebut. Hal tersebut menunjukkan bahwa adanya komposisi *peptone* dan *yeast extract* pada media B dan Media C dalam proses perbanyakan dapat meningkatkan jumlah nematoda lebih baik dibandingkan dengan Media D.

Semua jenis media cair yang digunakan pada proses perbanyakan mampu menghasilkan jumlah NPS lebih tinggi dibanding inokulum awal yang diinokulasikan karena menurut Ehlers dan Ilan (2005), standart media yang digunakan untuk produksi massal sebaiknya mengandung sumber karbon (glukosa atau glicerol), protein yang bersumber dari hewan atau tanaman, *yeast extract* dan lemak yang berasal dari hewan atau tanaman. Media yang mengandung protein tinggi dari hewan mengandung semua unsur yang diperlukan oleh pertumbuhan bakteri dan lebih murah biayanya. Temperatur optimum bagi pembiakan nematoda yaitu antara 19°C - 27°C. Penelitian ini dilakukan di dalam ruangan, sehingga temperatur dalam ruangan cocok bagi pertumbuhan nematoda.

Jumlah nematoda terbanyak yang dihasilkan dari penelitian ini hanya sebesar 5216,20 JI/56 ml (pada Media A pengamatan minggu ke-2). Hal ini dikarenakan penggunaan alat untuk perbanyak nematoda yaitu hanya menggunakan *shaker* yang berfungsi untuk menjaga agar media cair tetap dalam kondisi homogen serta agar kandungan oksigen yang ada pada media cair cukup untuk nematoda. Sedangkan menurut penelitian yang dilakukan oleh Ehlers *et al.* (1998), perbanyak massal secara *in vitro* dengan *liquid culture* menghasilkan nematoda sebanyak 500.000 JI/ml, dengan konsentrasi awal yang di suspensikan ke dalam media sebesar 4.000 JI/ml, dan menggunakan alat bioreaktor berkapasitas 30.000 liter yang mampu memperbanyak nematoda patogen serangga dalam jumlah yang besar.

Variasi tingkat perolehan JI dapat diakibatkan oleh adanya poliksenisasi biakan nematoda hidup bersama dengan lebih dari satu mikroorganisme). 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. Bakteri ini tahan terhadap aktivitas senyawa-senyawa antibiotik yang diproduksi bakteri simbiotik dalam media. Bakteri-bakteri kontaminan ini mampu mengoloni media perbanyak tetapi aktivitas pertumbuhannya tidak mampu menyediakan nutrisi esensial untuk perkembangbiakan nematoda.

Saat proses penelitian, media ini menimbulkan bau menyengat selama masa pembiakan. Menurut Surrey dan Davies (1996), keadaan tersebut akan tidak menguntungkan untuk pembiakan massal pada skala fermentor yang dapat berlangsung hingga 45 hari karena dapat menarik organisme *non-symbiont* untuk datang dan menyebabkan kontaminasi pada media cair. Media yang mengandung bahan-bahan yang telah dibuat oleh pabrik besar sudah tidak menimbulkan bau menyengat, lebih mudah penyiapannya dan kandungannya dalam media produksi bisa diatur, tetapi butuh biaya yang jauh lebih mahal.

Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan rata-rata jumlah NPS pada minggu ke-2. Hal tersebut dikarenakan pada minggu ke-2 terdapat peningkatan jumlah nematoda dibandingkan dengan pada minggu ke-1. Adanya

peningkatan jumlah NPS tersebut tidak akan terjadi secara terus menerus pada minggu-minggu selanjutnya karena menurut Suyuti (2012) dalam penelitiannya mengatakan bahwa hasil panen nematoda patogen serangga pada minggu ke-3 mengalami penurunan, hal ini disebabkan makin berkurangnya kadar oksigen dan jumlah makanan yang ada di dalam media cair tersebut. Apabila media cair yang digunakan semakin padat, maka kelarutan oksigen dalam media cair tersebut semakin rendah, pH juga sangat menentukan jumlah populasi nematoda. Hasil perbanyakan di minggu ke-2 setelah inokulasi menunjukkan bahwa nematoda mampu menghasilkan jumlah terbaik, hal tersebut akan memberi keuntungan pada efisiensi waktu.

Biaya perbanyakan *Steinernema* sp. pada masing-masing media turut menjadi pertimbangan selain ke-efektifannya dalam membunuh inang. Media A yang merupakan media terbaik untuk nematoda merupakan media dengan biaya produksi terendah, tetapi media ini terbuat dari komposisi bahan usus ayam dan usus sapi sehingga menimbulkan bau yang kurang sedap. Media B membutuhkan biaya yang jauh lebih besar dibandingkan dengan media lain karena adanya kandungan *yeast extract* dan *peptone* yang memiliki harga yang sangat mahal, tetapi media tersebut tidak menimbulkan bau menyengat. Media C juga memiliki kandungan *yeast extract* sehingga biaya produksinya lebih besar dibanding Media A dan Media D. Sehingga dari segi ekonomi, biaya produksi pada media perbanyakan yang paling murah adalah Media A.

Pada uji patogenitas yang dilakukan terhadap NPS hasil perbanyakan dengan media cair diperoleh data rata-rata mortalitas dari larva *T. molitor* yang telah di uji (Gambar 4.1.2). Media A menunjukkan rata-rata mortalitas paling tinggi dibandingkan dengan media cair lainnya yaitu sebesar 99,33%. Media C menunjukkan rata-rata mortalitas lebih baik yaitu sebesar 93,33% jika dibandingkan dengan pada Media B sebesar 92,66% dan pada Media D sebesar 89,33 %. Menurut Kaya dan Gaugler (1993) faktor penentu patogenitas nematoda patogen serangga terletak pada kualitas dari antibiotik yang di produksi oleh bakteri simbiosis dari *Steinernema* sp. yaitu bakteri *Xenorhabdus* sp.. Pada penelitian yang dilakukan, bakteri yang dibiakkan pada *Nutrient Broth* merupakan

bakteri fase primer, ditunjukkan dengan koloni berwarna merah kebiruan yang sebelumnya telah ditumbuhkan pada media NBTA. Kaya and Stock (1997) menyatakan bahwa bakteri pada fase primer telah aktif menghasilkan antibiotik yang bersifat toksik bagi inang nematoda.

Hasil pengamatan mortalitas pada waktu 24 jam setelah di inokulasikan, *Steinernema* sp. telah mampu melepaskan bakteri simbion *Xenorhabdus* sp. sehingga larva *T. molitor* teracuni dan mati akibat antibiotik yang dihasilkan oleh bakteri simbion. Menurut Akhurst dan Boemere (1990), patogenesis *Xenorhabdus* sp. bergantung pada kemampuan masuknya nematoda ke dalam hemocoel serangga inang, juga kemampuan bakteri untuk memperbanyak diri di dalam hemolympha serta kemampuan untuk melawan mekanisme pertahanan serangga inang. Senyawa anti mikroba ini mampu menghasilkan lingkungan yang sesuai untuk reproduksi nematoda dan bakteri simbiotiknya sehingga mampu menurunkan dan mengeliminasi populasi mikroorganisme lain yang berkompetisi mendapatkan sumber makanan di dalam serangga mati.

Dalam waktu 24 jam, NPS hasil perbanyakan media cair yang memiliki tingkat virulensi paling tinggi diantara media lainnya adalah pada media A. Namun secara keseluruhan, NPS hasil perbanyakan dengan media cair yang telah di uji memiliki virulensi tinggi karena mampu membunuh larva *T. molitor* dalam waktu 24 jam. Terdapat hubungan antara mortalitas serangga uji dengan jumlah nematoda yang dihasilkan dari perbanyakan dengan media cair, hal ini juga digunakan sebagai ukuran efektivitas media perbanyakan dan efisiensi invasi nematoda. Data mortalitas dari uji patogenitas menunjukkan hasil berbeda nyata. Semakin tinggi konsentrasi nematoda maka akan semakin cepat serangga uji mati. Jumlah nematoda yang diaplikasikan akan sangat mempengaruhi tingkat mortalitas dari serangga uji sebab jumlah nematoda yang infeksiif akan semakin banyak dan akan menimbulkan mortalitas yang banyak serta dengan waktu yang relatif singkat untuk membunuh serangga uji.

Prabowo (2012) menyatakan bahwa semakin banyak jumlah JI yang diberikan, menyebabkan peningkatan mortalitas larva. Dengan semakin banyak jumlah JI menyebabkan semakin tinggi peluang JI untuk menginfeksi larva.

Keadaan ini terlihat pada perlakuan Media A, dimana Media A yang menghasilkan rata-rata jumlah NPS tertinggi memiliki tingkat virulensi yang tertinggi pula berdasarkan hasil uji patogenitas yang dilakukan pada larva *T. molitor* dalam waktu 24 jam merupakan media cair terbaik menurut hasil penelitian yang telah dilakukan. Media perbanyakan yang efektif akan menyediakan kehidupan yang cocok bagi nematoda, keseimbangan produk dari waktu pengiriman hingga saat aplikasi serta meringankan proses penanganan dari nematoda (Georgis *et al*, 1995). Menurut alasan tersebut, maka hasil penelitian perbanyakan NPS *Steinernema* sp. dengan media cair terbaik yang dapat direkomendasikan adalah Media A berdasarkan efisiensi waktu dan biaya, serta tingkat keefektifannya dalam membunuh larva *T. molitor*.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa media cair yang dapat direkomendasikan dari perbanyakan nematoda patogen serangga *Steinernema* sp. dengan media cair yang terbaik adalah Media A ditunjukkan dengan rata-rata jumlah NPS terbanyak yaitu sebesar 849, 20 JI/56 ml di minggu ke-1 dan sebesar 5216,20 JI/56 ml di minggu ke-2, serta diikuti tingkat virulensi yang tertinggi pula berdasarkan hasil uji patogenitas yang dilakukan pada larva *Tenebrio molitor* dalam waktu 24 jam dengan nilai mortalitas sebesar 99,33%. Dari segi ekonomi, biaya produksi dari Media A adalah yang terendah dibanding media lain.

5.2 Saran

Perbanyakan nematoda patogen serangga *Steinernema* sp. dengan media cair dapat menghasilkan jumlah nematoda lebih banyak, sehingga diharapkan dapat dijadikan rekomendasi untuk mempermudah distribusi dan pengaplikasian NPS di lapangan serta lebih efisien dalam hal biaya dan waktu. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai keefektifan NPS hasil perbanyakan ke pertanaman di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan dan Burhanuddin, 2007. Bioecology of entomopathogenic nematode (*Steinernemadae; Rhabditids*). Prosiding Seminar Ilmiah dan Pertemuan Tahunan XVIII PEI dan PFI.
- Akhurst, R.J. and Boemare, N.E. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R. and Kaya, H.K. (eds) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Florida: CRC Press.
- Bedding, R.A. 1981. Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematode) for field control of insect pests. *J. Nematol.*, 27(-): 109-114.
- Chaerani, J. H., Suhendar, M.A. dan Koswanudin. 2000. Produksi masal dan formulasi nematoda patogen serangga *Steinernema* dan *Heterorhabditis* untuk pengendalian penggerek batang padi. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman. Bogor: Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan.
- Davies, R. J. 1986. Scale-up of nematode production by submerged culture for the biocontrol of insect pests. In "New Zealand Biotechnology Mission to Japan. A report to the Hon. R.J. Tizard, Minister of Science and Technology on the New Zealand Biotechnology Mission to Japan.
- Ehlers R.U., Lunau, S., Osterfeld, K.H. and Osterfeld, K.K. 1998. Liquid culture of the entomopathogenic nematode-bacterium-complex *Heterorhabditis megidis/Photorhabdus luminescens*. *J. Bio. Cont.*, 43: 77-86.
- Ehlers and Ilan,S. 2005. *Mass Production*. In: Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., Shapiro- Ilan, D.I. (Eds.), *Nematodes as Biocontrol Agents*. UK: CABI Publishing.
- Friedman, M. J. 1990. *Commercial production and development : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boston: CRC Press.
- Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boston: CRC Press.
- Gaugler, R. and Han, R. 2002. *Production technology Entomopathogenic nematology*. UK: CABI Publishing.
- Georgis, R., Dunlop, D.B. and Grewal, P.S. 1995. *Formulation of entomopathogenic nematodes*. In: Hall, F.R. and Barry, J.W. (eds)

- Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery. Maryland: American Chemical Society.
- Grewal, P.S, Ehlers, R.U. & Ian, S. DI. 2005. *Nematodes as biocontrol Agents*. UK: CABI Publishing.
- Han, R., Cao, L. and Liu, X. 1993. Effects of inoculum size, temperature and time on in vitro production of *Steinernema carpocapsae* against *Agriotes*. *J. Nematol.* 39(-): 366-375.
- Han, R.C. and Ehlers, R.U. 2001. Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the *in vivo* and *in vitro* development and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *FEMS J. Microbiol/Ecol.*, 35: 239–247.
- Kaya, H. K. 1993. Entomogenous and entomopathogenic nematodes in biological control. In *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (eds) K. Evans, D.L. Trudgill & J. M. Webster). Wallingford: CAB International.
- Kaya, K. H. And Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic Nematodes. *J. Annu. Rev. Entomol.*, 38: 181-206.
- Kaya, K. H. and Stock S. P. 1990. *Techniques In Insect Nematology*. Argentina : Departement Of Nematology, University Of California, Davis , College Of Natural Sciences Of Museum.
- Kaya, K. H., and Stock, S.P. 1997. Techniques in insect nematology. in L. A. Lacey, eds. *Manual of techniques in insect pathology*. San Diego, CA: Academic Press.
- Lunau, S., S. Stoessel, A.J. Schmidt-Peisker, and R.-U. Ehlers. 1993. Establishment of monoxenic inocula for scaling up *in vitro* cultures of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. *J. Nematol.*, 39: 385-399.
- Nugrohorini dan Windriyanti, W. 2009. Produksi Biopestisida Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal Dengan Teknik *In Vitro* Sebagai Pengendali Hama Tanaman Kedelai (*Spodoptera* sp.). Surabaya: Fakultas Pertanian UPN.
- Ogura, N. And Haraguchi, N. 1993. Xenic Cultur of *Steinernema kushidai* (nematode Steinernematidae) on Artificial Media. *J. Nematol.*, 29(2): 266-273.
- Pace, G.W., Grote, W., Pitt, D.E. and Pitt, J.M. 1986. Liquid culture of nematodes. *International Patent Publication*.

- Poinar, G.O. 1979. *Nematodes for Biological Control of Insects*. Florida: CRC Press.
- Poinar, G.O. 1990. *Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae*. Florida: CRC Press.
- Prabowo, H. 2012. Pemanfaatan Nematoda Patogen *Steinernema* sp. Isolat Malang dan Nusa Tenggara Barat dalam Pengendalian *Spodoptera litura* L. Yang Ramah Lingkungan. *Jurnal Bumi Lestari*. 12(2): 350 – 356.
- Purnomo, H., Majid, A., dan Wagiana. 1998. Pembiakan Massal nematoda patogen Serangga *Steinernema Carpopapsae* Weiser Secara *In Vitro* Untuk Mengendalikan Hama Ulat Krop kubis *Crociodolomia binotalis* Zeller. Jember: Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Purnomo, H. 2009. *Pengantar Pengendalian Hayati*. Yogyakarta: Penerbit Andi.
- Purnomo, H., Haryadi, N. T., dan Hasyim, S. 2012. *Jamur & Nematoda Entomopatogen*. Jember: Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Samsudin, 2011. *Nematoda Pengendali Hayati*. Yogyakarta: Gajah Mada Press.
- Stock, P. 1993. Description of Argentinian Strain of *Steinernema* sp. (Nematode : Steinernematidae). *J. Nematol.* 21: 279-283
- Sulistyanto, 2000. Pengendalian Hayati Serangga Hama Tanaman Pangan dan Hortikultura dengan Nematoda Entomopatogen, *Steinernema spp* dan *Heterorhabditis spp*. Isolat Lokal. Jember: Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Sulistyanto, D. 2001. Pemanfaatan Nematoda Dalam Bidang pertanian. Jember:, Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Sulistyanto, D. 2002. Patologi Serangga (*Insect Pathology*). Jember: Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Surrey, M.R. and Davies, R.J. 1996. Pilot-scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 92-99.
- Suyuti, F. Z. 2012. Patogenesitas Nematoda Patogen Serangga *Steinernema* sp. Pada Beberapa Media Perbanyakan Massal. Skripsi. Jember: Fakultas Pertanian Universitas Jember.

- Wang, J and Bedding, A. 1997. Population dynamics of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* in *in vitro* monoxenic solid culture. *J. Nematol.*, 21: 165-171
- Wartono dan Priatno, T. 2009. Pertumbuhan Bakteri *Photorhabdus luminescens* pada Berbagai Media dan Produksi Eksiotoksin sebagai Racun Serangga. *J. Entomol.*, 6(2): 60-69.
- Wouts, W. M. 1981. Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on artificial media. *J. Nematol.*, 13(-): 467-469.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis Jumlah NPS minggu ke-1

ANOVA Table for Jumlah NPS minggu ke-1

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Jenis Media	3	1121639,750	373879,917	10,380	,0005	31,141	,994
Residual	16	576298,800	36018,675				

Means Table for Jumlah NPS minggu ke-1

Effect: Jenis Media

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
Media A	5	849,200	171,544	76,717
Media B	5	462,000	271,234	121,300
Media C	5	514,800	172,072	76,953
Media D	5	182,600	107,102	47,897

ANOVA Coefficients Table for Jumlah NPS minggu ke-1

	Coef	Std. Error	t-Test	P-Value
Intercept	502,150	42,437	11,833	<,0001
Jenis Media: Media A	347,050	73,504	4,722	,0002
Media B	-40,150	73,504	-,546	,5924
Media C	12,650	73,504	,172	,8655
Media D	-319,550			

Tukey/Kramer for Jumlah NPS minggu ke-1

Effect: Jenis Media

Significance Level: 5 %

	Mean Diff.	Crit. Diff	
Media A, Media B	387,200	343,743	S
Media A, Media C	334,400	343,743	
Media A, Media D	666,600	343,743	S
Media B, Media C	-52,800	343,743	
Media B, Media D	279,400	343,743	
Media C, Media D	332,200	343,743	

Lampiran 2. Analisis Jumlah NPS minggu ke-2**ANOVA Table for Jumlah NPS minggu ke-2**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Jenis Media	3	33711592,200	11237197,400	52,108	<,0001	156,324	1,000
Residual	16	3450436,000	215652,250				

Means Table for Jumlah NPS minggu ke-2**Effect: Jenis Media**

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
Media A	5	5216,200	521,915	233,407
Media B	5	4424,200	127,903	57,200
Media C	5	3612,400	585,568	261,874
Media D	5	1720,400	480,588	214,925

ANOVA Coefficients Table for Jumlah NPS minggu ke-2

	Coef	Std. Error	t-Test	P-Value
Intercept	3743,300	103,839	36,049	<,0001
Jenis Media: Media A	1472,900	179,855	8,189	<,0001
Media B	680,900	179,855	3,786	,0016
Media C	-130,900	179,855	-,728	,4772
Media D	-2022,900			

Tukey/Kramer for Jumlah NPS minggu ke-2**Effect: Jenis Media****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff	
Media A, Media B	792,000	841,099	
Media A, Media C	1603,800	841,099	S
Media A, Media D	3495,800	841,099	S
Media B, Media C	811,800	841,099	
Media B, Media D	2703,800	841,099	S
Media C, Media D	1892,000	841,099	S

Lampiran 3. Analisis Mortalitas *Tenebrio molitor***ANOVA Table for Mortalitas 24 Jam**

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Jenis Media	3	260,040	86,680	6,116	,0057	18,347	,909
Residual	16	226,773	14,173				

Means Table for Mortalitas 24 Jam**Effect: Jenis Media**

	Count	Mean	Std. Dev.	Std. Err.
Media A	5	99,332	1,494	,668
Media B	5	92,662	5,965	2,668
Media C	5	93,330	2,355	1,053
Media D	5	89,332	3,652	1,633

ANOVA Coefficients Table for Mortalitas 24 Jam

	Coef	Std. Error	t-Test	P-Value
Intercept	93,664	,842	111,263	<,0001
Jenis Media: Media A	5,668	1,458	3,887	,0013
Media B	-1,002	1,458	-,687	,5018
Media C	-,334	1,458	-,229	,8217
Media D	-4,332			

Tukey/Kramer for Mortalitas 24 Jam**Effect: Jenis Media****Significance Level: 5 %**

	Mean Diff.	Crit. Diff
Media A, Media B	6,670	6,819
Media A, Media C	6,002	6,819
Media A, Media D	10,000	6,819
Media B, Media C	-,668	6,819
Media B, Media D	3,330	6,819
Media C, Media D	3,998	6,819

Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian

Gambar 1. Media A (17,5 g usus ayam + 5 g lemak sapi + 27,5 ml akuades)



Gambar 2. Media B (2 g telur ayam + 0,5 g lemak sapi + 45 ml akuades + 0,5 g yeast extract + 0,5 g peptone + 1,5 g tepung kedelai)



Gambar 3. Media C (2,5 g tepung kedelai + 46,3 ml akuades + 0,2 g *yeast extract* + 0,5 g nutrient broth + 0,5 ml minyak kedelai)



Gambar 4. Media D (10 g *dog food* + 40 ml akuades)



Gambar 5. Proses *shaker* media cair



Gambar 6. Pengamatan jumlah NPS pada media cair



Gambar 7. Uji Patogenitas pada larva *T. molitor*