

# I. PENDAHULUAN

Salah satu kebutuhan bahan pokok penduduk Indonesia adalah pangan. Salah satu kendala utama produksi pangan adalah serangan serangga hama. Disamping menurunkan produksi, serangan hama juga dapat menurunkan kualitas tanaman (Herman, 2007).

Pengendalian *hama* sering bertumpu pada penggunaan bahan kimia. Dampak negatif dari penggunaan bahan-bahan kimia sintesis yang bersifat racun dapat menyebabkan munculnya hama-hama sekunder, musnahnya jenis-jenis yang bermanfaat, serta adanya residu pestisida yang tinggi pada komponen biotik dan abiotik dalam agroekosistem sehingga mengganggu kesehatan manusia dan keseimbangan lingkungan. Dengan semakin meningkatnya kesadaran masyarakat akan pentingnya kualitas lingkungan hidup yang baik, maka pengendalian serangga hama yang bertumpu pada penggunaan pestisida kimia sintesis harus ditekan sekecil-kecilnya.

*Beberapa spesies hama* telah banyak dilaporkan resisten terhadap pestisida kimia seperti golongan Carbamat, Organophosphorus, Pyrethroid, Piperonyl Butoxide (PB), Benzonyl Phenyl Urea (BPU) dan Abamectin. Bertumpu pada kejadian-kejadian tersebut, maka dilakukan pengembangan cara pengendalian dengan menggunakan pestisida biorasional yang memiliki patogenisitas tinggi terhadap inangnya. Salah satu jenis pestisida biorasional tersebut adalah nematoda entomopatogen. Jenis-jenis nematoda entomopatogen yang umumnya digunakan

sebagai pengendali serangga hama adalah *Steinernema* sp. dan *Heterorhabditis* sp. Kedua jenis nematoda entomopatogen tersebut sangat potensial untuk mengendalikan serangga hama ordo Lepidoptera, Coleoptera dan Diptera (Chaerani, Finegan, Downes dan Griffin, 1995).

Weiser (1991) juga mengemukakan bahwa Steinernematidae dan Heterorhabditidae merupakan parasit yang potensial bagi serangga-serangga yang hidup di dalam tanah atau di atas permukaan tanah. Kelebihan lain yaitu nematoda entomopatogen dapat membunuh inangnya dengan cepat (24 – 48 jam), mempunyai kisaran inang yang luas yaitu dapat membunuh berbagai jenis serangga hama dari berbagai ordo (Lepidoptera, Coleoptera, Diptera dan Hymenoptera), tidak berbahaya bagi organisme bukan sasaran, dapat diproduksi secara massal baik dalam media *in vitro* maupun *in vivo* dengan biaya yang relatif murah, dapat diaplikasikan dengan mudah, serta kompatibel dengan agens pengendali hayati lain (Ehlers, 1996).

Pengendalian hayati di dalam konsep dasar Pengendalian Hama Terpadu (PHT) memegang peranan yang sangat penting. Penggunaan agens hayati saat ini memperoleh perhatian yang sangat besar karena bahaya pengaruh samping penggunaan pestisida kimiawi atau senyawa sintetik terhadap lingkungan, baik menimbulkan dampak kekebalan serangga hama tanaman (resistensi), peledakan serangga hama sekunder (resurgensi) dan pencemaran air minum serta makin tingginya kesadaran masyarakat akan kualitas hidup yang baik. Nematoda entomopatogen merupakan salah satu alternatif untuk mengendalikan serangga hama tanpa menimbulkan dampak

negatif pada lingkungan. Berkaitan dengan hal tersebut di atas, maka penerapan bioteknologi pembiakan massal nematoda entomopatogen isolat lokal sebagai agens pengendali hayati serangga hama sangatlah penting.

Dengan adanya suatu agens hayati dan cara pembiakan massalnya yang tepat, petani dapat dengan mudah mengaplikasikan ke lapangan sebagai alternatif pengendalian serangga hama pada tanaman jagung yang aman terhadap lingkungan, sehingga kesehatan manusia dan keseimbangan lingkungan selalu terjaga.

### **Rumusan Masalah**

Selama ini, pengendalian *hama* sering bertumpu pada penggunaan bahan kimia. Dampak negatif dari penggunaan bahan-bahan kimia sintesis yang bersifat racun dapat menyebabkan munculnya hama-hama sekunder, musnahnya jenis-jenis yang bermanfaat, serta adanya residu pestisida yang tinggi pada komponen biotik dan abiotik dalam agroekosistem sehingga mengganggu kesehatan manusia dan keseimbangan lingkungan. Dengan semakin meningkatnya kesadaran masyarakat akan pentingnya kualitas lingkungan hidup yang baik, maka pengendalian serangga hama yang bertumpu pada penggunaan pestisida kimia sintesis harus ditekan sekecil-kecilnya.

Bertumpu pada kejadian-kejadian tersebut, maka dilakukan pengembangan cara pengendalian dengan menggunakan pestisida biorasional yang memiliki patogenisitas tinggi terhadap inangnya. Salah satu jenis pestisida biorasional tersebut adalah nematoda entomopatogen.

## II. PENGENALAN NEMATODA ENTOMOPATOGEN

Sebenarnya Indonesia memiliki potensi agens hayati yang luar biasa banyak (mega biodiversity) terutama Nematoda entomopatogen, Nematoda entomopatogen adalah nematoda yang memparasit serangga yang dapat dijumpai di setiap jengkal tanah di Indonesia (mulai dari pantai sampai pegunungan).

Nematoda entomopatogen (NEP) pertama kali ditemukan oleh Gotthold Steiner di Jerman pada tahun 1923 yang diberi nama *Steinernema kraussei*. Kemudian tahun 1929 Rudolph William Glaser menemukan *Steinernema* yang menginfeksi kumbang Jepang *Papillia japonica* di New Jersey, sehingga *Steinernema* tersebut diberi nama *Steinernema glaseri*. Glaser pulalah yang pertama berhasil membiakkan secara axenic (tanpa bakteri simbiosis).

Nematoda entomopatogen adalah agens pengendali hayati dalam famili Steinernematidae dan Heterorhabditidae (Adam & Nguyen, 2002). Nematoda ini membunuh serangga dengan bantuan yang diperoleh dari simbiosis mutualistik dengan bakteri yang dibawa dalam saluran pencernanya (intestine) (Xenorhabdus berasosiasi dengan genus *Steinernema* spp. dan Photorhabdus berasosiasi dengan *Heterorhabditis* spp. (Boemare, 2002). Sampai sekarang telah diidentifikasi 43 spesies NEP dari dua famili dan tiga genera (Koppenhofer & Fuzi, 2003), 33 spesies dari genus *Steinernema*, satu spesies dari genus *Neosteinernema*, sembilan dari genus *Heterorhabditidae*. NEP ini dapat diisolasi

menggunakan larva greater wax moth *Galleria mellonella* (Peters, 1996).

Nematoda entomopatogen merupakan salah satu agens pengendali hayati hama tanaman yang sangat potensial, karena secara aktif mencari serangga inang sasaran sehingga dapat digunakan untuk mengendalikan hama-hama yang berada dalam jaringan tanaman seperti hama pengorok daun (leafminer) dan penggerek batang (stemborer). Di samping itu pemanfaatan NEP untuk mengendalikan hama tanaman dapat mengurangi dampak negatif dari penggunaan pestisida sintetik, karena bersifat spesifik menyerang serangga-serangga yang menjadi hama tanaman.

Dua famili NEP yang berpotensi tinggi sebagai agens pengendali hayati yaitu famili Steinernematidae dan Heterorhabditidae. Nematoda ini membunuh serangga dengan bantuan bakteri yang dibawa dalam saluran pencernakannya (intestine) (*Xenorhabdus* berasosiasi dengan genus *Steinernema* spp. dan *Photorhabdus* berasosiasi dengan *Heterorhabditis* spp. Sampai sekarang telah diidentifikasi 43 spesies NEP dari dua famili dan tiga genera (Koppenhofer & Fuzi, 2003), 33 spesies dari genus *Steinernema*, satu spesies dari genus *Neosteinernema*, sembilan dari genus *Heterorhabditidae*. NEP ini dapat diisolasi menggunakan larva greater wax moth *Galleria mellonella* (Peters, 1996).

NEP dari genus Steinernematidae dan Heterorhabditidae merupakan parasit yang efisien bagi serangga-serangga yang hidup di tanah atau pada stadia tertentu hidup dalam tanah, memiliki virulensi yang tinggi terhadap inangnya, mematikan

inangnya dengan cepat (24 – 48 jam), dapat diproduksi secara massal baik di media *invitro* maupun di media *invivo* (Sulistyanto dan Ehlers, 1996).

Studi tentang famili *Steinernematidae* dan *Heterorhabditidae* telah dilakukan secara intensif karena kemampuan keduanya sebagai agens pengendali hayati pada serangga hama. Kedua famili adalah nematoda yang sangat kecil atau kurang dari 1-3 mm panjang. Kedua famili ini termasuk dalam ordo Rhabditida, meskipun tidak terlalu dekat akan tetapi keduanya memiliki strategi hidup yang sangat mirip. Untuk *Steinernema* jantan dan betina harus masuk ke dalam tubuh serangga inang agar dapat bereproduksi, sedangkan *Heterorhabditis* semua juvenil akan menjadi hermaphrodit, sehingga hanya diperlukan hanya satu individual untuk menginfeksi serangga inang agar dapat bereproduksi. Juvenil akan tetap berada dalam tubuh induknya, pada dasarnya memparasit juga induknya, hanya akan meninggalkan induknya ketika akan menjadi dewasa. Aspek unik dari nematoda ini adalah simbiosisnya dengan bakteri. Juvenil stadia ke-3 membawa bakteri dalam saluran pencernaannya (gut) dan ketika sesudah menginfeksi inangnya, maka bakteri itu akan dikeluarkan. Bakteri yang bersimbiosis itu adalah *Xenorhabdus* pada *Steinernematidae* dan *Photorhabdus* pada *Heterorhabditidae*.



Gambar 1. Nematoda Entomopatogen

Bakteri ini bertanggung jawab untuk membunuh serangga inang secara cepat, dalam 2-3 hari. Kematian serangga inang banyak diakibatkan oleh toksin yang dikeluarkan oleh bakteri. Bakteri akan berkembang secara cepat dalam tubuh serangga inang yang telah mati dan menggunakannya sebagai nutrisi. Nematoda pada prinsipnya adalah memakan bakteri tersebut. Nematoda akan berkembang dari generasi ke generasi pada inang yang sama, sampai populasi menjadi padat dan nutriennya menjadi rendah, dan pada saat yang sama juvenil akan keluar dari serangga inangnya untuk menemukan kembali serangga inang yang baru. Serangga inang yang mati diakibatkan oleh Heterorhabditis /Photorhabdus dapat dikenali dengan adanya perubahan warna menjadi orange atau merah, dikarenakan pigmen yang dihasilkan oleh bakteri dan serangga inang yang mati (cadaver) dapat memancarkan cahaya (luminesce) pada waktu yang pendek.

Hubungan antara nematoda dan bakteri ini bersifat mutualistik karena kedua mendapatkan keuntungan dari

hubungan tersebut. Meskipun nematoda dapat membunuh serangga inang tanpa adanya bakteri, akan tetapi mereka akan sangat lambat, dan tidak akan dapat bereproduksi tanpa memakan bakteri yang mensuplai nutrisi seperti sterol. Dengan bakteri, serangga inang akan terbunuh secara cepat dan cadaver akan terjaga dari bakteri lain karena adanya antibiotik yang diproduksi oleh bakteri. Yang didapat dari hubungan dengan nematoda bagi bakteri adalah karena mereka tidak bisa menyebar, mencari inang dan menginvasi tubuh serangga, oleh sebab itu nematoda membawa bakteri ke serangga inang.

Berdasarkan uji laboratorium NEP *Steinernema* spp. isolat lokal dapat menyebabkan angka mortalitas yang cukup tinggi, yaitu pada larva *P. xylostella* mencapai 68 % dan pada larva *Crocidolomia binotalis* mencapai 77 % dalam 48 jam setelah aplikasi, dengan konsentrasi 100 IJ/ml dan dalam skala lapang menggunakan dosis 0,5 juta/m<sup>2</sup>, dan keuntungan lain yang diperoleh dari NEP ini adalah tidak berbahaya terhadap organisme bukan sasaran seperti musuh alami (Sulistyanto dan Harahap, 2003). Di dalam laboratorium NEP dapat mempunyai spektrum inang yang cukup luas seperti *Steinernema carpocapsae* mampu menginfeksi 250 spesies serangga dari 75 famili dalam 11 ordo, namun demikian sejauh ini hasil yang memuaskan di laboratorium tidak dapat 100% bisa berhasil diterapkan di lapang (Sulistyanto dan Ehlers, 1996). Hal ini menunjukkan bahwa NEP pada habitatnya ataupun aplikasinya sebagai bioinsektisida di lapang mempunyai kekhususan inang, dimana kekhususan inang diakibatkan oleh mekanisme infeksi dan patogenitasnya (Simoes dan Rosa, 1996).

# III. EKOBIOLOGI NEMATODA ENTOMOPATOGEN

## 3.1. Perilaku (behavior)

NEP mempunyai kisaran serangga inang luas. Nematoda ini umumnya berada dalam serangga inangnya dalam 2-3 generasi, setelah itu free living juvenil infeksi (JI) akan secara aktif mencari inangnya. Juvenil infeksi (JI) ketika keluar dari serangga inang yang telah mati akan aktif mencari inangnya. Ada beberapa strategi NEP dalam mencari inangnya (*foraging behaviour*). Contohnya *Steinernema carpocapsae* akan selalu berada di atas permukaan tanah dan menggunakan taktik *sit and wait (ambusher)* dan ketika serangga inang yang umumnya aktif bergerak akan terinfeksi oleh nematoda ini. *Heterorhabditis bacteriophora* mempunyai strategi mencari inang yang dikenal sebagai *cruiser*, yang akan aktif bergerak di dalam tanah untuk mencari serangga inang yang umumnya tidak aktif bergerak seperti Uret Coleoptera dan serangga dalam tanah lainnya (Lewis et al., 1992). Akan tetapi, *Steinernema riobravis* menunjukkan gabungan kedua strategi tersebut (Lewis, 2002).

Diketahui ada beberapa perilaku nematoda entomopatogen dalam menemukan inangnya, yaitu perilaku “hunter” (menyerang) atau perilaku “ambusher” (menunggu). Mekanisme kunci yang digunakan oleh nematoda ‘ambusher’ untuk mendekati diri pada inang yang melintas adalah dengan cara ‘niktasi’, yaitu mengangkat seluruh bagian tubuhnya kecuali bagian posterior

(Gaugler dan Kaya, 1993). Contoh nematoda entomopatogen yang memiliki perilaku “hunter” adalah *Steinernema glaseri* dan *Heterorhabditis* sp. Sedangkan *S. Carpocapsae* dan *S. Feltiae* termasuk yang memiliki perilaku “ambusher” (diam atau menunggu) sampai inang berada di dekatnya dan kemudian baru menyerang (Gaugler, 1993).

Salah satu jenis nematoda entomopatogen adalah *Heterorhabditis indicus* mempunyai kecenderungan untuk menyebar di seluruh tanah dalam mencari inang. Strategi menjelajah adalah aktif mencari dan mengejar serangga inang, strategi ini digunakan untuk menginvasi inang yang diam. Strategi ini dikarakterisasikan dengan motilitas yang tinggi dan distribusi aktif keseluruhan profil tanah, kemampuan untuk orientasi, dan penggantian lokasi pencarian setelah kontak inang.

Stadia Infektif Juvenil (IJ) menyimpan cadangan makanan di dalam tubuhnya untuk melakukan mobilitas dan aktivitas, serta menginfeksi inang. Selama belum menemukan inang daya tahan tubuhnya sangat bergantung pada cadangan makanan yang dimilikinya. Penipisan cadangan makanan ini selain menyebabkan penurunan viabilitas juga menurunkan efektivitas nematoda.

## **3.2. Biologi nematoda entomopatogen**

### **3.2.1. Biologi *Steinernema* sp.**

Dikemukakan oleh Klein (1990), bahwa di dalam laboratorium NEP dapat mempunyai spektrum inang yang cukup luas seperti *Steinernema carpocapsae* mampu menginfeksi 250 spesies serangga dari 75 famili dalam 11 ordo, namun demikian

sejauh ini hasil yang memuaskan di laboratorium tidak dapat 100% bisa berhasil diterapkan di lapang (Sulistyanto dan Ehlers, 1996).

*Steinernema* sp. adalah jenis nematoda entomopatogen yang banyak digunakan sebagai agens pengendali hayati hama. *Steinernema* jantan mempunyai panjang tubuh 1000 – 1900  $\mu\text{m}$ , lebar 90 – 200  $\mu\text{m}$ , panjang stoma 4,5 – 7  $\mu\text{m}$ , lebar stoma 4 – 5  $\mu\text{m}$ , panjang ekor 19 – 27  $\mu\text{m}$ , panjang spikula 72 – 89  $\mu\text{m}$ , gubernakulum 57 – 70  $\mu\text{m}$ , panjang mucron 2,8 – 4,5  $\mu\text{m}$ . *Steinernema* betina, panjang tubuh 3020 – 3972  $\mu\text{m}$ , lebar 153 – 192  $\mu\text{m}$ , panjang stoma 7 – 12  $\mu\text{m}$ , lebar stoma 5,0 – 8,5  $\mu\text{m}$ , panjang ekor 30 – 47  $\mu\text{m}$ , lebar vulva 49 – 54  $\mu\text{m}$ . Untuk stadia ‘Infective juvenile’ : panjang tubuh 500 – 570  $\mu\text{m}$ , lebar 15 – 25  $\mu\text{m}$ , panjang ekor 47 – 54  $\mu\text{m}$  (Stock, 1993).

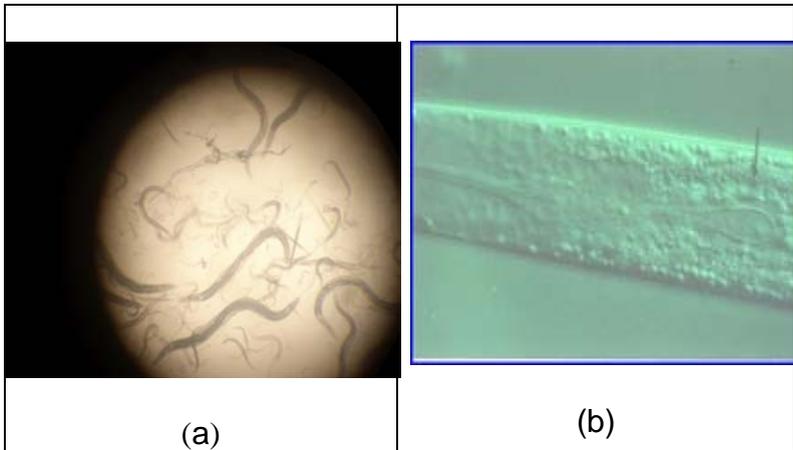
*Steinernema* spp. Dewasa berukuran besar dan mampu menghasilkan 10000 telur (Weiser, 1991). Nematoda ini mempunyai kulit tubuh yang halus, bentuk kepala tumpul, enam bibir masing-masing mempunyai gubernakulum dan stoma yang dangkal. *Steinernema* spp. Betina memiliki ovarium bertipe amphidelphic yang tumbuh dari arah anterior ke posterior. Vulva terletak pada bagian tengah panjang tubuhnya. *Steinernema* spp. Jantan mempunyai testis tunggal terefleksi, spikula sepasang dengan bentuk kurva simetris ataupun ramping. Kepala spikula lebih lebar dibandingkan panjangnya, ventral dan tajam. Pada pandangan ventral, gubernakulum tampak lonjong dengan bagian anterior membentuk bagian yang pendek dan sempit, dan tidak mempunyai bursa copulatrix. Daerah anterior nematoda jantan *Steinernema* spp. Memiliki penampakan yang sangat mirip dengan nematoda betina (Gaugler dan Kaya., 1990). Juvenil 3

masih berada dalam kutikula juvenil 2. Pada kutikula terdapat 4 – 8 striasi longitudinal (Stock, 1993).

Di dalam perkembangannya, nematoda entomopatogen *Steinernema* sp. mempunyai siklus hidup sebagai berikut : telur, juvenil dan dewasa. Sebelum mencapai dewasa, nematoda entomopatogen ini akan mengalami empat kali ganti kulit, baik yang terjadi di dalam telur, dalam lingkungan atau di dalam tubuh inangnya (Tanada dan Kaya, 1993).

Seperti jenis nematoda entomopatogen dari ordo Rhabditida lainnya, *Steinernema* sp. terdiri dari 4 stadia juvenil (juvenil 1 sampai juvenil 4). Stadia yang paling infeksiif adalah stadia juvenil 3 (IJ 3). Stadia IJ 3 ini dapat digunakan untuk mengendalikan serangga hama, dan dapat diisolasi dari semua jenis tanah di lingkungan sekitar larva serangga hama.

Secara umum selama perkembangbiakan nematoda, suhu (Grewal dan Richardson, 1993) dan makanan sangat berpengaruh baik pada *Steinernema* sp. Suhu dan makanan yang kurang mendukung bagi perkembangbiakan nematoda akan mempercepat berlangsungnya fase pada masing-masing stadia (Woodring dan Kaya, 1988). Stadia infeksiif juga dapat terbentuk apabila nematoda mengalami kekurangan makanan. Di dalam kondisi ini nematoda infeksiif dapat terbentuk tanpa melalui stadia juvenil 1 atau 2. Setelah stadia juvenil 4 terlampaui, maka nematoda akan berkembang menjadi nematoda dewasa jantan atau betina, dan setelah dua atau tiga minggu nematoda dewasa ini sangat memerlukan inang baru sebagai pemenuhan kebutuhan makanannya (Ehlers, 1996).



Gambar 2. Morfologi dan Anatomi Nematoda entomopatogen  
 (a) Morfologi Nematoda Entomopatogen;  
 (b) Intestinal lumen (tempat menyimpan bakteri)  
 dalam tubuh nematoda entomopatogen

### 3.2.2. Biologi *Heterorhabditis* sp.

Diantara spesies NEP yang diketahui efektif digunakan sebagai agensia hayati untuk mengendalikan hama tanaman adalah *Heterorhabditis indicus*. *H. Indicus* adalah nematoda yang bersimbiosis mutualisma dengan bakteri gram negatif dari famili Enterobacteriaceae. Kompleks nematoda-bakteri ini dalam lingkungan yang sesuai dapat menjadi agen pengendali hayati yang efektif terhadap hama sasaran. Species *H. indicus*, membawa satu spesies bakteri simbion, *Photorhabdus luminescens*. Sel-sel bakteri *P.luminescens* yang dorman disimpan dalam saluran pencernaan *H. indicus*.

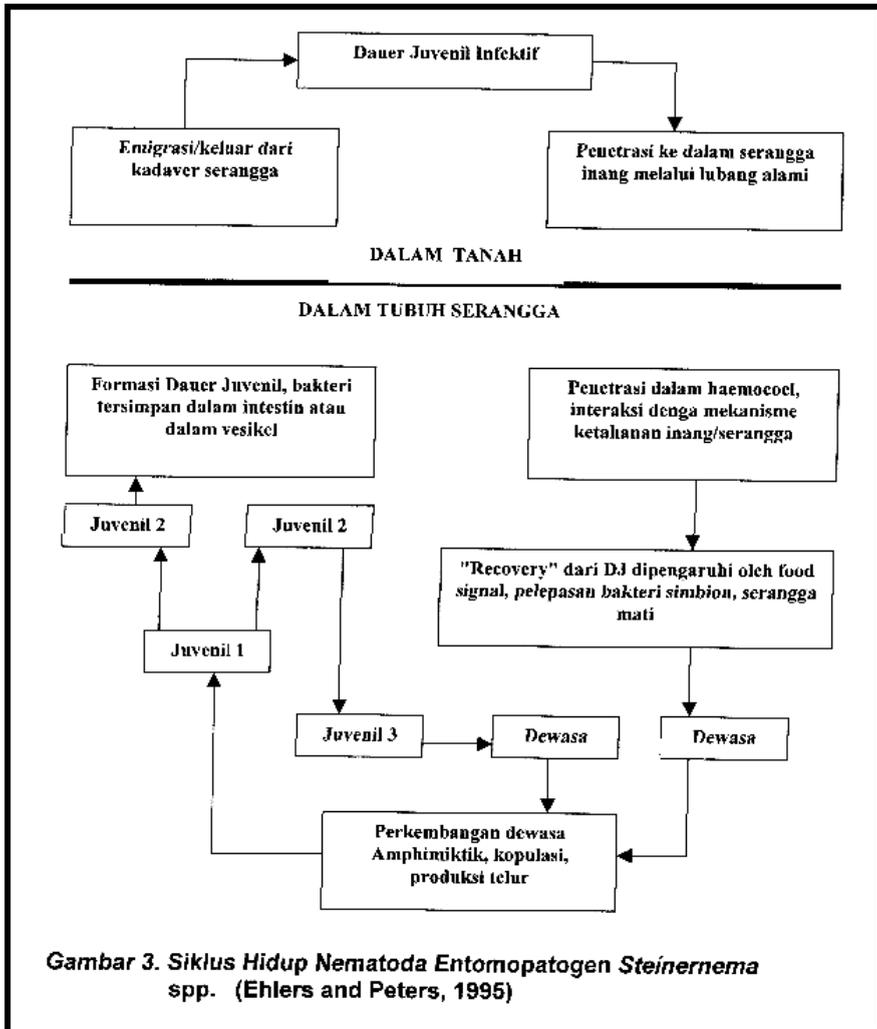
*H. indicus* walaupun hidup di dalam tanah, namun sangat efektif terhadap hama-hama di permukaan tanah, seperti pemakan daun, penggerek batang atau pengorok daun.

Klasifikasi *Heterorhabditis indicus* menurut Poinar (1990) sebagai

berikut :Kingdom : Animalia  
Filum : Nematoda  
Kelas : Secermentae  
Ordo : Rhabditida  
Famili : Rhabditidae  
Genus : Heterorhabditis  
Species : Heterorhabditis indicus

*H. indicus* mempunyai bentuk tubuh sebagaimana cacing, silindris, panjang tubuh betina 479 – 700  $\mu\text{m}$ , tubuh jantan 479-685  $\mu\text{m}$ , sedangkan tubuh juvenil infeksi (JI) 479 - 573  $\mu\text{m}$ . Tubuh simentris bilateral, tidak bersegmen-segmen, mempunyai kutikula sehingga tubuhnya licin, gerakannya fleksibel dan tidak ada gerakan kontraktil memanjang. Terdapat alat pencernaan yaitu mulut, esofagus, intestinum, rektum. Betina dewasa *Heterorhabditis indicus* tubuhnya lebih besar dan lebih panjang daripada jantan, pada pertengahan tubuhnya terdapat vulva yang berfungsi untuk perkawinan. Pada bagian kepala terdapat satu mulut dengan enam bibir yang menyerupai gigi dan terdapat satu papilla. Jantan dewasa *Heterorhabditis indicus* tubuhnya lebih kecil dan lebih pendek dari betina, ujung posterior melengkung dan terdapat sepasang spikula sebagai alat kopulasi. Kepala spikula pendek, berasal dari penyempitan lamina dan gubernaculum, berukuran setengah dari panjang spikula.

### 3.3. Siklus hidup (life cycle) Nematoda Entomopatogen



### **3.3.1. Siklus hidup nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* sp.**

*Heterorhabditis indicus* memiliki siklus hidup yang sederhana yang terdiri dari 4 stadia juvenil, dan dewasa. Siklus hidup terbagi kedalam siklus reproduktif dan infeksi. Siklus infeksi dimulai saat serangga terinfeksi oleh J1 yang masuk melalui lubang-lubang alami tubuh serangga. Pada siklus reproduktif, J1 berubah menjadi juvenil instar ketiga (J3) yang aktif memakan produk samping hasil metabolisme bakteri simbiosis, berganti kutikula menjadi juvenil instar keempat (J4) kemudian berganti kutikula menjadi dewasa. Telur diproduksi tiga hari setelah invasi nematoda kedalam tubuh serangga. Telur menetas dan berkembang di dalam tubuh induknya menjadi juvenil instar pertama (J1) yang akan berganti kutikula menjadi juvenil instar kedua (J2). Pada stadia J2 nematoda dapat menjalani siklus reproduktif kembali atau memasuki siklus infeksi, tergantung kepadatan populasi dan nutrisi inang. Jika nutrisi inang mencukupi dan kepadatan populasi rendah maka J2 berkembang menjadi J3, dan memasuki siklus reproduktif. Sebaliknya bila kepadatan populasi tinggi dan nutrisi sedikit, J2 berkembang menjadi J3 khusus yang bersifat infeksi (J1), tidak makan dan mampu hidup di luar tubuh inang serangga.

### **3.3.2. Siklus hidup nematoda entomopatogen *Steinernema* sp.**

*Steinernema* sp. adalah jenis nematoda entomopatogen yang banyak digunakan sebagai agens pengendali hayati hama. *Steinernema* jantan mempunyai panjang tubuh 1000 – 1900  $\mu\text{m}$ , lebar 90 – 200  $\mu\text{m}$ , panjang stoma 4,5 – 7  $\mu\text{m}$ , lebar stoma 4 – 5

$\mu\text{m}$ , panjang ekor 19 – 27  $\mu\text{m}$ , panjang spikula 72 – 89  $\mu\text{m}$ , gubernakulum 57 – 70  $\mu\text{m}$ , panjang mucron 2,8 – 4,5  $\mu\text{m}$ . *Steinernema* betina, panjang tubuh 3020 – 3972  $\mu\text{m}$ , lebar 153 – 192  $\mu\text{m}$ , panjang stoma 7 – 12  $\mu\text{m}$ , lebar stoma 5,0 – 8,5  $\mu\text{m}$ , panjang ekor 30 – 47  $\mu\text{m}$ , lebar vulva 49 – 54  $\mu\text{m}$ . Untuk stadia ‘Infective juvenile’ : panjang tubuh 500 – 570  $\mu\text{m}$ , lebar 15 – 25  $\mu\text{m}$ , panjang ekor 47 – 54  $\mu\text{m}$  (Stock, 1993).

*Steinernema* spp. Dewasa berukuran besar dan mampu menghasilkan 10000 telur (Weiser, 1991). Nematoda ini mempunyai kulit tubuh yang halus, bentuk kepala tumpul, enam bibir masing-masing mempunyai Gubernaculum dan stoma yang dangkal. *Steinernema* spp. Betina memiliki ovarium bertipe amphidelphic yang tumbuh dari arah anterior ke posterior. Vulva terletak pada bagian tengah panjang tubuhnya. *Steinernema* spp. Jantan mempunyai testis tunggal terefleksi, spikula sepasang dengan bentuk kurva simetris ataupun ramping. Kepala spikula lebih lebar dibandingkan panjangnya, ventral dan tajam. Pada pandangan ventral, Gubernaculum tampak lonjong dengan bagian anterior membentuk bagian yang pendek dan sempit, dan tidak mempunyai bursa copulatrix. Daerah anterior nematoda jantan *Steinernema* spp. Memiliki penampakan yang sangat mirip dengan nematoda betina (Gaugler dan Kaya., 1990). Juvenil 3 masih berada dalam kutikula juvenil 2. Pada kutikula terdapat 4 – 8 striasi longitudinal (Stock, 1993).

Di dalam perkembangannya, nematoda entomopatogen *Steinernema* sp. mempunyai siklus hidup sebagai berikut : telur, juvenil dan dewasa. Sebelum mencapai dewasa, nematoda entomopatogen ini akan mengalami empat kali ganti kulit, baik

yang terjadi di dalam telur, dalam lingkungan atau di dalam tubuh inangnya (Tanada dan Kaya, 1993).

Seperti jenis nematoda entomopatogen dari ordo Rhabditida lainnya, *Steinernema* sp. terdiri dari 4 stadia juvenil (juvenil 1 sampai juvenil 4). Stadia yang paling infeksius adalah stadia juvenil 3 (IJ 3). Stadia IJ 3 ini dapat digunakan untuk mengendalikan serangga hama, dan dapat diisolasi dari semua jenis tanah di lingkungan sekitar larva serangga hama.

Secara umum selama perkembangbiakan nematoda, suhu (Grewal dan Richardson, 1993) dan makanan sangat berpengaruh baik pada *Steinernema* sp. Suhu dan makanan yang kurang mendukung bagi perkembangbiakan nematoda akan mempercepat berlangsungnya fase pada masing-masing stadia (Woodring dan Kaya, 1988). Stadia infeksius juga dapat terbentuk apabila nematoda mengalami kekurangan makanan. Di dalam kondisi ini nematoda infeksius dapat terbentuk tanpa melalui stadia juvenil 1 atau 2. Setelah stadia juvenil 4 terlampaui, maka nematoda akan berkembang menjadi nematoda dewasa jantan atau betina, dan setelah dua atau tiga minggu nematoda dewasa ini sangat memerlukan inang baru sebagai pemenuhan kebutuhan makanannya (Ehlers, 1996).

### **3.4. Bakteri Simbion Nematoda Entomopatogen**

Apabila nematoda berhasil masuk ke dalam tubuh inangnya, maka bakteri simbion juga akan segera disebarkan ke dalam tubuh inang tersebut. Setelah bakteri berkembang biak dalam tubuh serangga, selanjutnya nematoda juga akan berkembang

dengan cepat dengan memakan sel bakteri dan jaringan tubuh serangga inang (Sulistyanto, 1999).

Nematoda marga *Steinernema* berasosiasi dengan bakteri simbion *Xenorhabdus* spp., yang termasuk dalam famili Enterobacteriaceae (Boemare, Lanmond dan Mauleon, 1996). Masing-masing jenis nematoda entomopatogen memiliki asosiasi simbiose yang khas dengan satu jenis bakteri, sedangkan *Xenorhabdus* sp. dapat berasosiasi dengan lebih dari satu jenis nematoda entomopatogen. Nematoda entomopatogen ini mampu menyimpan 1 sampai 250 sel bakteri simbion (Sulistyanto, 1999). *Steinernema* sp. mampu menyimpan bakteri *Xenorhabdus* sp. dalam intestinal lumen (vesikel) dari juvenil infeksi (Poinar, 1979).

Bakteri *Xenorhabdus* menghasilkan enzim Lechitinase, Protease dan entomotoksin yang mempengaruhi proses kematian serangga (Boemare *et al.*, 1996). Entomotoksin yang dihasilkan oleh bakteri berupa hydrocyl- dan acetoxyl- yang merupakan turunan senyawa indol, 4-ethyl- dan 4-isoprophyl-3,5-dihydroxy-transitive stilbenes (Jarosz, 1996). Molekul  $\square$ isband (*Xenocoumarins* dan *Xenorhabdins*) dan bakteriosin seperti *Xenorhabdisin* merupakan senyawa yang dapat menciptakan suasana ideal bagi pertumbuhan dan perkembangan bakteri, serta menghambat bakteri sekunder lain di dalam tubuh serangga (Boemare *et al.*, 1996).

Bakteri *Xenorhabdus* terdiri dua fase yang disebut dengan fase primer (fase I) dan fase sekunder (fase II). Fase primer selalu dapat diisolasi dari nematoda *Dauer Juveniles* (DJs) (Ehlers dan Peters, 1995). Menurut Boemare *et al.* (1996), bahwa bakteri fase primer mempunyai bentuk batang pendek dengan ukuran 80-

90 % dibanding batang panjang, serta flagel tersebar pada seluruh sisi sel (pleomorphic). Selain itu dalam fase primer, bakteri simbiosis menghasilkan senyawa antibiotik, lechitinase, bioluminescens (Woodring *et al.*, 1988), serta menyerap bahan tertentu dari media pertumbuhan. Sebaliknya, bakteri fase sekunder mempunyai bentuk morfologi koloni dan karakteristik yang berbeda dengan bakteri fase primer. Bakteri fase primer (fase I) tidak dapat bertahan lama dan akan segera berubah ke fase sekunder (fase II) yang mempunyai kecenderungan stabil dan sel bakteri berbentuk batang panjang.

Dalam bentuk primer, bakteri simbiosis menyerap bahan tertentu dari media pertumbuhan. Sebaliknya, bentuk sekunder kurang baik dalam karakteristik ini. Karakteristik ini memungkinkan membedakan diantara dua bentuk yang berbeda dari morfologi koloni (Krasomil dan Oesterfeld, 1994). Secara umum bentuk primer morfologi koloni bakteri *Xenorhabdus* sp. yaitu berbentuk bulat mengkilat menyerupai lendir, cembung, tepi agak rata dengan struktur dalam meneruskan cahaya. Bentuk sekunder bakteri menunjukkan karakteristik koloni berbentuk bulat, agak cembung, tepi agak rata, struktur dalam menyerupai pasir halus dengan meneruskan sinar meskipun benda di bawahnya tidak semua terlihat dengan jelas (Woodring dan Kaya, 1988).

### **3.5. Patogenisitas Nematoda Entomopatogen**

Mekanisme infeksi dan patogenisitas nematoda entomopatogen dalam serangga inang merupakan faktor-faktor yang menunjukkan spesifitas inang dari nematoda ini. Invasi dan evasi terhadap ketahanan inang merupakan tahapan penting

dalam proses patogenik. Kemampuan nematoda untuk melakukan penetrasi ke dalam haemocoel serangga dengan pelepasan enzim proteolitik merupakan salah satu faktor spesifik dalam hubungan timbal balik nematoda – serangga. Faktor spesifik lain adalah kemampuan nematoda untuk melawan ketahanan internal serangga yang berupa senyawa antibakteri. Toksin dan enzim ekstraseluler merupakan senyawa yang dilepaskan oleh nematoda untuk menyerang serangga inang (Simoes *et al.*, 1996).

Mekanisme patologi NEP memarasit serangga inang dengan jalan penetrasi secara langsung melalui kutikula ke dalam hemocoel atau melalui lubang-lubang alami, seperti spirakel, mulut dan anus. dan stigma (Tanada dan Kaya, 1993). Dikemukakan oleh Simoes dan Rosa (1996) bahwa terdapat interaksi mutualistik antara NEP dan bakteri *Xenorhabdus spp.* atau *Photorhabdus sp.*, dimana bakteri simbion tersebut terdapat dalam saluran pencernaan dari juvenil infeksi (NEP). Setelah masuk dalam tubuh serangga, nematoda melepaskan bakteri ke dalam haemolymph. Didalam tubuh serangga, bakteri bereproduksi dan menghasilkan kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangan nematoda. Tanpa bakteri simbion dalam serangga inang, nematoda tidak akan dapat bereproduksi, karena bakteri simbion ini berfungsi sebagai makanan yang sangat diperlukan oleh nematoda (Ehlers, 2001).

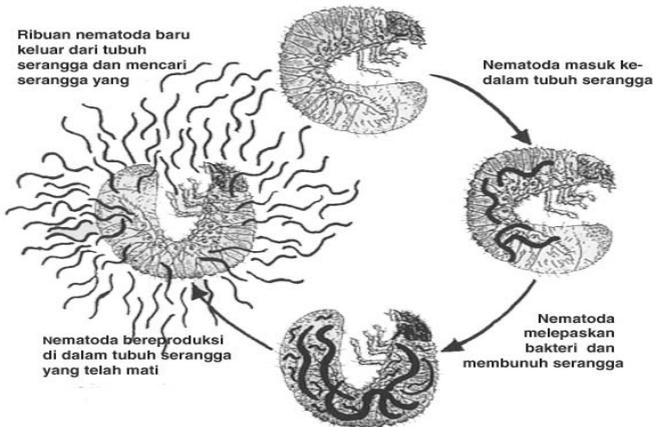
Demikian juga sebaliknya, bakteri tidak akan dapat masuk ke dalam tubuh serangga apabila tanpa bantuan nematoda entomopatogen, yang mempenetrasi tubuh serangga inang. Dengan demikian simbiose antara bakteri simbion dan nematoda

entomopatogen tidak dapat dipisahkan dan merupakan syarat mutlak antara keduanya (Sulistyanto, 1999).

Dalam haemolymph serangga, bakteri menghasilkan enzim ekstra seluler selama multiplikasi (Protease, Lipase, Lechitinase, DNAase dan Phosphatase) dan Lipo Poli Sakharida (LPS) yang merusak haemocyt (sel darah serangga) dan menghambat Prophenoloxidase, yaitu senyawa kimia anti bakteri yang berfungsi sebagai ketahanan internal serangga (Simoes dan Rosa, 1996). Dalam haemolymph serangga, bakteri juga menghasilkan toksin yang dapat menyebabkan kematian pada serangga apabila mekanisme pertahanan tubuh serangga tidak berhasil dalam mengatasi kompleksitas simbiose nematoda–bakteri (Jarosz, 1996). Adanya enzim dan toksin tersebut menyebabkan serangga mati dalam waktu cepat (24-48 jam) (Boemare *et al.*, 1996). Dalam tubuh inang yang mati, nematoda entomopatogen berkembang cepat dengan memakan sel bakteri dan jaringan tubuh inang, hingga akhirnya tinggal kulit tubuh inangnya saja (Ehlers, 1996).

Mekanisme patogenisitas nematoda entomopatogen secara umum melalui beberapa tahap yaitu *invasi*, *evasi* dan *toksikogenesis*. *Invasi* merupakan suatu proses terjadinya penetrasi nematoda entomopatogen ke dalam tubuh serangga inang melalui kutikula dan lubang-lubang alami, seperti mulut, anus, spirakel dan stigma. Tahap selanjutnya adalah *evasi* yaitu tahap dimana nematoda entomopatogen mengeluarkan bakteri simbiosis di dalam tubuh serangga inang. Setelah melalui tahap invasi dan evasi, selanjutnya terjadi proses *toksikogenesis* yaitu tahapan dimana bakteri simbiosis menghasilkan toksin sehingga

dapat menyebabkan kematian kematian pada serangga inang (Sulistyanto, 1999).



Gambar 4. Mekanisme Patogenesis NEP

Kemampuan NEP untuk bisa sampai ke dalam haemocoel serangga dengan pelepasan enzim proteolitik dan ketahanan internal serangga merupakan faktor spesifik yang menentukan virulensinya dalam menyerang serangga inang (Simoes dan Rosa, 1996).

Proses kematian serangga berawal dari pelepasan bakteri simbiosis oleh nematoda dalam *haemolymph* setelah nematoda masuk ke dalam tubuh serangga, di dalam tubuh serangga bakteri bereproduksi dan menghasilkan kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangan nematoda, selanjutnya nematoda memakan sel bakteri dan jaringan inangnya (Ehlers, 1996).



Gambar 5. Serangga mati akibat serangan nematoda

Gejala yang timbul pada serangga akibat adanya entomotoksin yang dihasilkan oleh bakteri simbiosis nematoda yaitu terjadinya perilaku yang hiperaktif (bergerak lebih aktif), berlanjut dengan kelumpuhan dan kejang-kejang otot selama tujuh menit sebelum serangga mati (Simoès, 1998). Setelah serangga mati terjadi perubahan warna pada tubuh serangga, tubuh menjadi lunak, dan apabila di bedah konstitusi jaringan menjadi cair tetapi tidak berbau busuk (Tanada dan Kaya, 1993; Simoès dan Rosa, 1996). Serangga inang yang mati tidak mengalami pembusukan sampai muncul generasi selanjutnya (Jarosz, 1996).

### 3.6. Penyebaran

Pada stadia *infektif juvenile* akan aktif meskipun hanya 90 cm ke arah horizontal dan vertikal dalam kurun waktu 30 hari. Penyebaran secara pasif oleh air, angin, inang yang terinfeksi, aktifitas manusia, dan lain-lain dapat menempuh jarak yang luas dan dapat dihitung distribusi penyebarannya. Faktor yang berpengaruh pada motilitas/kematian inang adalah kelembaban, suhu

dan tekstur tanah. Faktor yang terpenting adalah kelembaban karena nematoda membutuhkan film air yang menyelubungi area tanah. Di Indonesia *H. indicus* telah ditemukan di daerah Jawa, Ambon, Bali dan Seram yang umumnya menyukai habitat pantai.

Meskipun NEP mempunyai kisaran serangga inang luas (Tabel 1), hampir 100 spesies inang berbeda di laboratorium (Poinar, 1979), akan tetapi komersial NEP hanya ditujukan pada beberapa serangga (Grewal & Georgis, 1999; Shapiro-Ilan et al., 2002). Pada umumnya NEP efektif untuk mengendalikan serangga hama yang hidup dalam tanah (Klein, 1990; Sher et al, 2000; Shapiro-Ilan et al., 2002) dan serangga yang hidup dalam habitat tersembunyi (Kaya & Gaugler, 1993; Begley, 1990), dan serangga pemakan daun (Mason & Wright, 1997; Schroer & Ehler, 2005; Schroer et al., 2005). Penelitian juga menunjukkan bahwa nematoda entomopatogenik juga mampu mengendalikan nematoda parasit tanaman (Perez & Lewis, 2004; Jagdale et al., 2002).

Tabel 1. Penggunaan *Steinernematidae* dan *Heterorhabditidae* sebagai agens pengendali hayati

Famili and spesies	Serangga Target	Referens
<b>Heterorhabditidae</b>		
Heterorhabditis bacteriophora	Lepidoptera, Coleoptera	Begley (1990), Klein (1990)
H. megidis	Coleoptera	Klein (1990)
H. marelatus	Coleoptera, Lepidoptera	Liu and Berry (1996), Berry et al. (1997)
<b>Steinernematidae</b>		
Steinernema carpocapsae	Lepidoptera, Coleoptera, Siphonaptera	Begley (1990), Klein (1990), Georgis and Manweiler (1994)
S. feltiae	Diptera (Sciaridae)	Begley (1990), Klein (1990)
S. glaseri	Coleoptera (Scarabaeidae)	Klein (1990)
S. kushidai	Coleoptera (Scarabaeidae)	Ogura (1993)
S. riobrave	Lepidoptera, Orthoptera	Cabanillas et al. (1994)
	Coleoptera (Curculionidae)	Cabanillas and Raulston (1994)
S. scapterisci	Orthoptera (mole crickets)	Parkman et al. (1993)

### 3.7. Kelangsungan hidup

Faktor abiotik dan biotik sangat mempengaruhi efikasi dan persistensi nematoda entomopatogen untuk mengendalikan serangga hama yang hidup di lingkungan tanah, habitat tersembunyi dan daun. Persistensi JI yang digunakan sangat dipengaruhi faktor instrinsik (tingkah laku, fisiologi, karakteristik genetik) dan ekstrinsik. Faktor ekstrinsik meliputi faktor abiotik (temperatur, kelembaban tanah, tekanan osmotik, tekstur tanah, kelembaban, radiasi UV yang ekstrim) dan faktor biotik (antibiosis, kompetisi, dan musuh alami).

## IV. ISOLASI DAN IDENTIFIKASI NEMATODA ENTOMOPATOGEN

### 4.1. Isolasi Nematoda Entomopatogen (NEP)

Nematoda entomopatogen mempunyai habitat di dalam tanah. Hampir di seluruh tempat di Indonesia mengandung jenis nematoda tersebut. Setiap tempat memberikan karakteristik sendiri bagi nematoda, tergantung kondisi iklim suatu daerah. Kedua jenis nematoda tersebut dapat dibedakan dengan gejala yang ditimbulkannya pada serangga. Jenis *Steinernema* menunjukkan gejala berwarna coklat, sedangkan *Heterorhabditis* menunjukkan warna kemerahan.

Nematoda entomopatogen (NEP) seperti nematoda yang lain mempunyai habitat di tanah, oleh sebab itu NEP ini dapat diisolasi dari tanah dengan metoda bait trap. Serangga yang digunakan sebagai umpan adalah Greater wax moth larva *Galleria mellonella* atau larva kumbang *Tenebrio molitor*. Perbanyakan nematoda juga dilakukan secara in vivo dalam tubuh larva instar akhir ulat lilin (wax moth) *Galleria mellonella* (Poinar, 1979; Woodring & Kaya, 1988). Juvenil infeksi (ji) sebanyak 1 ml dengan konsentrasi 200 ji/ml dimasukkan ke dalam cawan Petri (Ø (diameter) 20 cm) yang telah dilapisi dengan dua lapis kertas saring Whatman No. 1. sebanyak 40 larva instar akhir *G. Mellonella* dimasukkan ke dalam cawan Petri tersebut dan diinkubasi di tempat gelap selama 48 jam. Larva-larva yang mati diletakkan pada cawan Petri yang telah berisi kertas tisu lembab,

kemudian dimasukkan pada sebuah kotak plastik berukuran lebih besar dari diameter cawan Petri. Kotak plastik ini diisi dengan air (0,1 formalin) setinggi setengah tinggi cawan Petri. Setelah 5-6 hari maka juvenil infektif akan terperangkap dalam air dan siap untuk dipanen. Teknik ini dikenal sebagai **perangkap White** (White trap).

Resep makanan buatan untuk perbanyak *G. Melonella* (Modifikasi dari Poinar & Thomas, 1984) :

Gliserin	: 880 g
Madu	: 900 ml
Lilin lebah madu	: 200 g
Yeast	: 260 g
Tepung jagung	: 260 g
Tepung gandum	: 1100 g

Sampel tanah sebaiknya diambil dari berbagai sudut areal dari lahan yang akan diketahui keberadaan NEP nya dan kedalaman tanah yang baik antara 5 cm -30 cm. Tanah tidak dalam kondisi kering, dan jika dibawa ke laboratorium untuk diteliti, sebaiknya tanah dimasukkan dalam wadah plastik yang gelap dengan aerasi baik dan tidak terkena cahaya matahari.

### ***Bahan dan Alat***

1. Sampel tanah pertanian
2. Kain kassa untuk membuat kantong serangga
3. Bak untuk tempat mencampur tanah
4. stoples kaca
5. Air
6. Karet gelang
7. Kertas saring

8. Serangga *Galeris melonella* atau *Tenebrio molitor*
9. Botol specimen
10. Ruangan penyimpanan
11. Petridish besar dan kecil
12. Larutan Ringer's
  - Aquadest - 1000 ml
  - NaCl - 9 gram
  - CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O - 37 gram
  - NaHCO<sub>3</sub> - 20 gram
  - KCl - 42 gram

### **Prosedur**

1. Menyiapkan serangga *G. Melonella* atau *T. Molitor* yang dimasukkan dalam kantong dari kain kassa.
2. Tanah dikondisikan dalam keadaan lembab (jangan becek). Kadar air sekitar 10% dari berat tanah.
3. Isi gelas-gelas/stoples dengan tanah yang lembab dan pada pertengahan gelas masukkan serangga dalam kantong kassa tadi, selanjutnya timbun kembali dengan tanah sampai penuh.
4. Tutup gelas/stoples dengan kain kassa hitam atau kertas, ditali dengan karet. Simpan di tempat yang tidak terkena panas selama 3-5 hari.
5. Serangga yang mati dengan menunjukkan gejala warna coklat/merah pada tubuhnya, diambil dan disusun dalam cawan petri besar yang didalamnya diberi cawan petri kecil yang dibalik, diberi kertas saring yang menjulur sampai ke dasar petri besar dan diberi air sampai setengah tinggi petri kecil (Metode White Trap).

6. Simpan/Inkubasikan selama 7-14 hari pada suhu 25 °C, maka nematoda dalam tubuh serangga akan keluar dan turun ke air.
7. Saringan 30  $\mu\text{m}$  digunakan untuk memisahkan jaringan serangga dengan nematoda.
8. Nematoda yang turun dari saringan 30  $\mu\text{m}$ , disaring kembali dengan saringan ukuran 15  $\mu\text{m}$ .
9. Simpan nematoda dalam wadah/ botol specimen dalam suhu 4 °C dan siap untuk aplikasi.



Gambar 6. Isolasi NEP dari dalam Tanah

### **Isolasi Nematoda Entomopatogen (NEP) dari Beberapa Wilayah Endemi Serangga Hama *Helicoverpa* sp. Di Jawa Timur**

Isolasi Nematoda entomopatogen spesies lokal akan dilakukan di wilayah di Jawa Timur, pada tanaman jagung, seperti di Malang, Lamongan, Probolinggo, Jombang, Tuban,. Sampel tanah diambil dari beberapa wilayah endemi hama *Helicoverpa* sp. Diambil dari berbagai sudut lahan pada kedalaman tidak lebih dari 30 cm dengan interval lebih kurang 20 meter. Sampel tanah dikondisikan dalam keadaan lembab.

### *Pelaksanaan Isolasi*

Sampel tanah diisikan pada gelas-gelas kaca sebanyak separuh gelas, kemudian memasukkan larva *Tenebrio molitor* instar akhir yang diletakkan dalam kain kassa. Dibawa ke Laboratorium untuk diisolasikan pada instar akhir larva *Tenebrio molitor*. Metode isolasi sesuai dengan metode baiting oleh Bedding dan Akhurst (1975) yaitu larva serangga dimasukkan dalam tanah (200 gram per baiting), setelah 3-5 hari larva yang mati kemudian diekstrak untuk mendapatkan nematoda entomopatogen isolat Jawa Timur.

Hasil isolasi nematoda entomopatogen yang diperoleh dari beberapa daerah di wilayah Jawa Timur yaitu Malang, Probolinggo, Tulungagung, Lamongan dan Kediri, diketahui bahwa nematoda hanya diperoleh dari empat daerah yaitu Malang, Probolinggo, Tulungagung dan Kediri. Pada sample tanah yang berasal dari Lamongan tidak ditemukan nematoda entomopatogen. Hal ini disebabkan karena tanah yang diambil dari daerah Lamongan adalah jenis lempung berliat dan berwarna kekuningan (Gambar 7). Nematoda tidak dapat hidup pada jenis tanah lempung berliat, karena pada jenis tanah ini tidak terdapat rongga sehingga oksigen tidak dapat masuk ke dalam tanah secara maksimal.



Gambar 7. Sampel Tanah yang Berasal dari 5 Daerah di Jawa Timur

### 3.2. Identifikasi NEP

Identifikasi nematoda entomopatogen yang ditemukan adalah dengan cara sebagai berikut:

#### a. Uji Gejala Kutikula Serangga Inang

Uji gejala pada serangga inang berfungsi untuk melihat gejala serangan oleh nematoda parasit serangga pada bagian kutikula yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna. Hal ini disebabkan oleh adanya reaksi bakteri simbiosis, *Xenorhabdus* sp. atau *Photorhabdus* sp. yang dikeluarkan oleh nematoda pada saat didalam tubuh serangga inang. Pengujian gejala menggunakan larva *Tenebrio molitor*. Uji gejala dilakukan dengan menginokulasi nematoda entomopatogen fase juvenil infeksi pada tubuh larva *Tenebrio molitor* dan ditempatkan pada temperatur ruang selama 24-48 jam. Hasilnya cukup dapat dijadikan acuan untuk membedakan antara Steinernematidae dan Heterorhabditidae, yaitu jika terinfeksi Steinernematidae kutikula

inang akan berwarna kecoklatan / coklat caramel dan jika terinfeksi Heterorhabditidae kutikula inang akan berwarna kemerahan.

#### **b. Pengamatan Morfologis/Morfometriks**

Identifikasi dilakukan dengan metode morfometriks, ciri-ciri morfologi infektive juvenile dan jantan dicocokkan dengan kunci determinasi oleh Poinar (1979), karakteristik diagnosa yang sangat penting antara lain; Jantan dibedakan dari bentuk dan dimensi dari panjang, bentuk dan besar spicula. Identifikasi pada juvenil infektif antara lain posisi site line, ekskretori porus, nerve ring, dan panjang esophagous (ES), jarak antara anterior sampai ekskretori porus (EP), panjang ekor (T), Masing-masing perlakuan identifikasi dilakukan pada 50 infektive juvenile dengan 3 ulangan (n=150).

#### **c. Isolasi Bakteri Symbion – Nematoda Entomopatogen, *Xenorhabdus* sp. dan *Photorhabdus* sp.**

Metode isolasi bakteri symbion nematoda entomopatogen dilakukan dengan metode Akhurst (1980), yaitu nematoda entomopatogen isolat lokal hasil isolasi dari beberapa daerah, diinokulasikan pada larva *Tenebrio molitor*. Diinkubasikan selama 48 jam atau sampai serangga mati. Larva serangga terserang diambil haemolymphnya dan digoreskan pada media NBTA, diinkubasikan selama 24-48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh di media NBTA dibiakkan pada media YS cair, diinkubasikan selama 24 – 48 jam dalam ruang gelap pada suhu kamar, dan dikocok secara terus-menerus menggunakan shaker. Bakteri *Xenorhabdus* spp. dan *Photorhabdus* spp. yang diperoleh,

dimasukkan dalam “ependorf cap” volume 2 ml yang sebelumnya telah diisi dengan gliserin steril, selanjutnya disimpan dalam freezer suhu  $-25^{\circ}\text{C}$ .

## 5.2. Identifikasi Nematoda Entomopatogen

Hasil pengamatan gejala pada kutikula larva menunjukkan bahwa larva *Tenebrio molitor* yang mati tubuhnya berwarna coklat karamel, lunak, tidak berbau busuk dan apabila dibedah didalamnya terdapat nematoda (Gambar 8). Warna coklat karamel pada tubuh serangga yang terserang menunjukkan bahwa serangga tersebut terserang nematoda dari genus tertentu.



Gambar 8. Larva *Tenebrio molitor* terserang Nematoda

Hasil pengamatan morfologis dengan melakukan pengukuran panjang tubuh nematoda diketahui bahwa nematoda isolat Malang, Probolinggo, Tulungagung dan Kediri mempunyai perbedaan panjang tubuh. Nematoda isolat Kediri mempunyai ukuran terpanjang (panjang rata-rata  $40,73 \mu\text{m}$ ), menyusul Probolinggo (rata-rata  $39,22 \mu\text{m}$ ), Malang (rata-rata  $37,82 \mu\text{m}$ ) dan

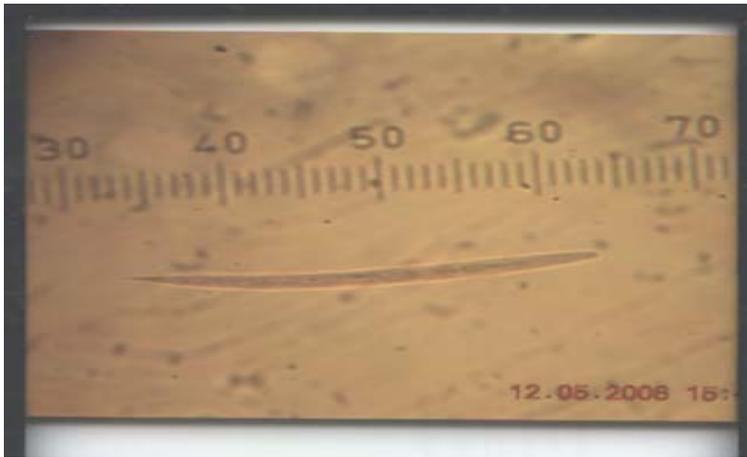
terakhir Tulungagung (rata-rata 35,60  $\mu\text{m}$ ). Ciri morfologis yang lain adalah sama yaitu kutikulanya halus, mempunyai striasi longitudinal dan tidak punya kait pada bagian anterior tubuhnya.

*Hasil isolasi bakteri simbion dari tubuh nematoda* diketahui bahwa bakteri yang diperoleh adalah jenis *Xenorhabdus* sp. (Gambar 9) Ciri bakteri *Xenorhabdus* sp., koloninya berbentuk bulat mengkilat menyerupai lendir, cembung, tepi agak rata dengan struktur dalam meneruskan cahaya, sedangkan fase sekunder menunjukkan karakteristik koloni berbentuk bulat, agak cembung, tepi agak rata, struktur dalam menyerupai pasir halus dengan meneruskan sinar meskipun benda dibawahnya tidak semua terlihat dengan jelas (Woodring & Kaya, 1988).



Gambar 9. Koloni Bakteri Simbion (*Xenorhabdus* sp.)

Berdasarkan hasil-hasil pengamatan gejala warna kutikula pada serangga terserang, morfologi nematoda dan isolasi bakteri simbiannya, dapat diidentifikasi bahwa nematoda hasil isolasi dari daerah Malang, Probolinggo, Tulungagung dan Kediri, semuanya adalah jenis *Steinernema* spp. (Gambar 10).



Gambar 10. *Steinernema* spp.

## V. STERILISASI

Dalam pengembangan agens hayati, baik alat, bahan maupun nematoda diperlukan dalam kondisi yang steril. Perkembangan nematoda akan terganggu, bahkan nematoda akan mengalami kematian jika berada dalam kondisi yang tidak bersih/steril.

### 5.1. Sterilisasi alat

1. Sterilisasi peralatan yang akan digunakan secara sederhana dapat dilakukan dengan cara peralatan disemprot dengan alkohol 70%.
2. Apabila ada autoklave atau dandang, dapat juga digunakan dengan cara : membungkus peralatan yang akan disterilkan dengan kertas minyak, selanjutnya dimasukkan (seperti dikukus) dalam dandang selama 1 – 2 jam. Setelah diautoklave atau disteril dalam dandang, peralatan dikering anginkan.

### 5.2. Sterilisasi Permukaan Tubuh Serangga

Agar tidak terkontaminasi, tubuh serangga dapat juga disterilkan. Untuk sterilisasi tubuh serangga yang mati dapat dilakukan dengan cara : mengoleskan alkohol 70% ke tubuh serangga selama 2-3 menit, kemudian tubuh dicuci dengan air steril 3 kali, selanjutnya dikeringanginkan pada kertas saring/tissue steril.

Apabila serangga masih hidup dengan cara : mengoleskan alkohol 50% ke tubuh serangga selama 2-3 menit, kemudian tubuh usap dengan air steril, selanjutnya dikeringanginkan pada kertas saring/tissue steril.

### **5.3. Sterilisasi permukaan Nematoda**

Nematoda dapat disterilkan permukaannya dengan menggunakan 2 metode : a) Hyamine 10x (Methylbenzethonium Chloride) atau Hyamine 1622 (benzethonium Chloride. b) Formaldehyde. Yakinkan suspensi nematoda bebas secara penuh dari bahan partikel asing. Jika bahan partikel tersebut ada, maka prosedur sterilisasi akan gagal.

1. Metode pertama menggunakan Hyamine dengan prosedur : Letakkan Nematoda ke dalam larutan 0,1% Hyamine 10x atau 1622 selama 15-30 menit. Setelah itu nematoda dicuci menggunakan larutan ringer's steril selama 10 menit, sebanyak 3 kali.
2. Metode pertama menggunakan Formaldehyde dengan prosedur : Letakkan Nematoda ke dalam larutan 0,1% Formaldehyde selama 30 menit. Setelah itu pindahkan Nematoda ke dalam larutan 0,1% Formaldehyde yang baru selama 30 menit. Selanjutnya nematoda dicuci menggunakan larutan ringer's selama 10 menit, sebanyak 3 kali.

## VI. PEMBIAKAN MASSAL NEMATODA ENTOMOPATOGEN

### 6.1. Pembiakan secara in Vivo

Nematoda entomopatogen (NEP) seperti nematoda yang lain mempunyai habitat di tanah, oleh sebab itu NEP ini dapat diisolasi dari tanah dengan metoda bait trap. Serangga yang digunakan sebagai umpan adalah Greater wax moth larva *Galleria mellonella* atau larva kumbang *Tenebrio molitor*. Perbanyakkan nematoda juga dilakukan secara *in vivo* dalam tubuh larva instar akhir ulat lilin (wax moth) *Galleria mellonella* (Poinar, 1979; Woodring & Kaya, 1988).

Perbanyakkan secara *in vivo* sangat penting untuk menjaga kelangsungan nematoda entomopatogen (NEP). Nematoda yang disimpan dalam tabung baik sebagai koleksi maupun sebagai stater harus di fershkan dengan cara menginokulasikan kembali ke tubuh serangga guna menjaga virulensi NEP tersebut. Selain itu perbanyakkan secara *in vivo* sangat penting untuk menyediakan stock nematoda dalam jumlah besar yang akan diinokulasikan ke media pertumbuhan *in vitro*.

#### **Bahan dan Alat**

1. Nematoda entomopatogen
2. Serangga Inang
3. Petridish ukuran 9 cm dan 14 cm
4. Kertas saring.tissue
5. Larutan Ringer's

Aquadest - 1000 ml  
NaCl - 9 gram  
CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O - 37 gram  
NaHCO<sub>3</sub> - 20 gram  
KCl - 42 gram

6. Saringan nematoda (kalau ada)
7. Botol specimen/botol kulture
8. Ruangan penyimpanan
- 9.

### ***Prosedur***

1. Siapkan serangga inang. Masukkan ke dalam cawan petri yang telah diberi kertas saring.
2. Inokulasikan sedikit nematoda (100 ljs/ml) ke cawan petri yang berisi serangga sampai kertas saring jenuh air (jangan tergenang karena nematoda memerlukan filum air untuk bergerak)
3. Inkubasikan selama 24-48 jam pada suhu 25 °C.
4. Serangga yang mati dengan menunjukkan gejala (warna coklat karamel pada tubuhnya untuk jenis *Steinernema* dan warna kemerahan pada tubuhnya untuk jenis *Heterorhabditis*), diambil dan disusun dalam cawan petri besar yang didalamnya diberi cawan petri kecil yang dibalik, diberi kertas saring yang menjulur sampai ke dasar petri besar dan diberi air sampai setengah tinggi petri kecil .
5. Simpan/Inkubasikan selama 7-14 hari pada suhu 25 °C, maka nematoda dalam tubuh serangga akan keluar dan turun ke air. Juvenil infektif yang terperangkap dalam air

siap untuk dipanen. Teknik ini dikenal sebagai **perangkap White** (White trap).

Perbanyakan nematoda entomopatogen hasil isolasi dari beberapa wilayah di Jawa Timur dilakukan secara *in vivo* dalam larva serangga *Tenebrio molitor* dengan metode White Trap (Gambar 11). Setelah 1-2 minggu, infeksi juvenil yang dihasilkan disaring menggunakan saringan 30  $\mu\text{m}$  dan 15  $\mu\text{m}$ , selanjutnya IJs tersebut disimpan dalam tabung penyimpanan yang berisi air steril pada suhu 4°C.



Gambar 11.. Perbanyakan Nematoda Entomopatogen secara *in vivo* dengan metode White Trap.

## 6.2. Pemiakan secara *in Vitro*

Nematoda seperti *Steinernema* dan *Heterorhabditis* dapat diproduksi massal sebagai biopestisida, hal dikarenakan mereka dapat berkembang dengan mudah dalam jumlah yang besar dengan media padat yang murah seperti media pork kidney atau makanan anjing, akan tetapi perkembangan lebih lanjut nematoda ini dapat diproduksi massal secara liquid dalam fermentor dengan

kapasitas 15.000 liter atau lebih dengan hasil 105 juvenil per millimeter (Friedman, 1990). Beberapa industri masih menggunakan media padat atau *invivo* pada serangga inang. Nematoda diformulasikan ke dalam bahan yang porous (seperti sponge atau foam). Nematoda ada yang dideksikasi dan dicampur tepung atau granula seperti vermikulit atau bahan pembawa lainnya. Metode optimasi formulasi dan pengepakan adalah kritikal poin bagi nematoda karena mereka harus dalam keadaan hidup ketika diaplikasikan.

### **6.2.1. Pembiakan Massal Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal Terseleksi (*Steinernema* spp. Isolat Tulungagung)**

Nematoda entomopatogen isolat lokal terseleksi (*Steinernema* spp. Isolat Tulungagung) diproduksi secara massal menggunakan media buatan yang dimodifikasi. Produksi massal dilakukan secara *in vitro* dalam *media spon* dengan menggunakan metode Bedding (1981). Tahapan-tahapannya adalah sebagai berikut :

#### **a. Isolasi Bakteri Symbion Nematoda Entomopatogen Isolat Terseleksi**

Isolasi bakteri symbion dilakukan langsung dari larva *Galeria melonella* yang telah terinfeksi nematoda entomopatogen. Sterilisasi permukaan larva yang terinfeksi nematoda dilakukan dengan menggunakan alkohol 95% selama 15 menit, dibilas tiga kali dengan aquadest steril, kemudian dikeringkan dengan kertas saring steril. Bagian tungkai larva *Galeria melonella* yang telah mati dipotong dengan pisau stainless steril dan cairan haemolympha yang

keluar dari tubuh larva digoreskan pada media *Nutrien Agar* atau media *NA-NR* (Lampiran 1-III). Media diinkubasi pada suhu 25°C selama 24 jam.

**b. *Perbanyakkan Bakteri Simbion Steinernema spp. Isolat Tulungagung***

Menyiapkan media cair *Yeast Salt* (Lampiran 1-I), dimasukkan dalam tabung Erlenmeyer ukuran 250 ml, kemudian disterilkan dalam autoclave selama 30 menit (suhu 121°C; tekanan 15 atm). Isolasi bakteri simbion dilakukan dengan cara mengambil koloni bakteri simbion dari hasil inkubasi dari media *Nutrient Agar* atau *NA-NR*. Koloni bakteri simbion, selanjutnya dibiakkan dalam media cair *Yeast Salt*, dan dikocok pada shaker secara terus-menerus, pada suhu 25°C (Kaya dan Stock, 1997). Setelah diinkubasikan selama 24 jam, bakteri simbion tersebut siap digunakan untuk proses produksi nematoda secara *in vitro* dalam media spon.

**c. *Pembuatan media Spon sebagai media pembiakan nematoda***

Pembuatan media spon dilakukan dengan cara mencampur semua bahan yang diperlukan untuk membuat media spon (Lampiran 1-II). Spon sebanyak 36 gram diremas-remas dalam bahan tersebut. *Media spon* dimasukkan dalam tabung Erlenmeyer ukuran 1000 ml, kemudian ditutup dengan kapas dan dilapisi aluminium foil. *Media spon* dalam tabung Erlenmeyer tersebut selanjutnya disterilkan dalam autoclave selama 30 menit (suhu 121°C; tekanan 15 atm).

**d. Inokulasi Bakteri Simbion pada Media Spon**

Setelah *media Spon* steril disiapkan, selanjutnya media dalam tiap tabung Erlenmeyer diinokulasi bakteri simbion *Xenorhabdus* spp. (umur 24 jam) yang diambil dari media *Yeast Salt*. Inokulasi dilakukan dengan menggunakan mikropipet Ependorf ukuran 100  $\mu$ l - 1000  $\mu$ l, selanjutnya diinkubasikan pada suhu 25°C.

**e. Inokulasi Nematoda Entomopatogen pada Media Spon.**

Inokulasi Nematoda Entomopatogen pada media spon dilakukan satu hari (24 jam) setelah media spon diinokulasi bakteri simbion tersebut. Nematoda entomopatogen (*Steinernema* spp. Isolat Tulungagung) diaplikasikan pada media spon yang telah diisi bakteri simbion *Xenorhabdus* sp. Tabung Erlenmeyer yang telah berisi nematoda dalam media spon tersebut ditutup menggunakan kapas steril dan pada pinggirnya ditutup parafilm atau kertas, kemudian disimpan pada suhu 25°C.

**f. Panen Nematoda Entomopatogen.**

Setelah disimpan dalam media spon selama 14 - 21 hari pada suhu 25°C, nematoda entomopatogen dapat dipanen.

**g. Formulasi Nematoda Entomopatogen**

Nematoda entomopatogen hasil panen diformulasi dalam spon dengan komposisi 40 ml suspensi nematoda dalam spon berukuran 15 X 20 cm, selanjutnya disimpan pada suhu 4°C.

## 6.2.2. Hasil Pembiakan Massal Nematoda Entomopatogen (*Steinernema* spp. Isolat Tulungagung)

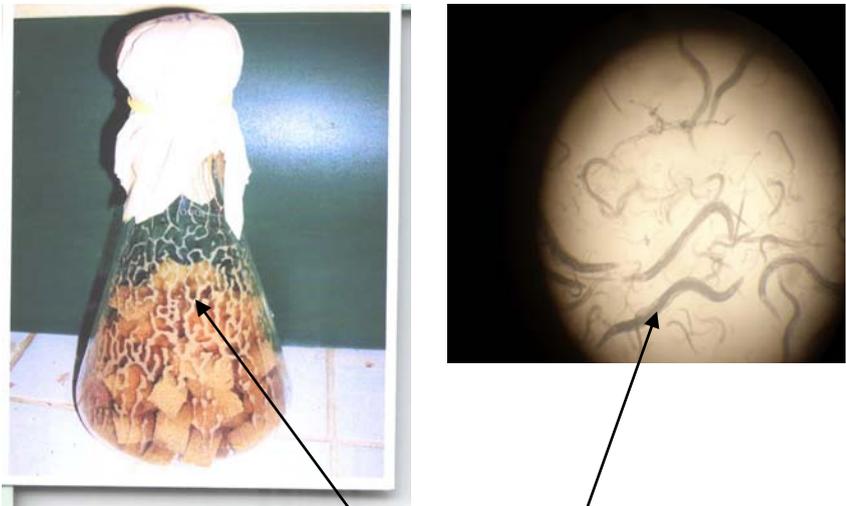
Pembiakan massal nematoda entomopatogen *Steinernema* spp. isolat Tulungagung dalam media spon dilakukan dengan metode *Bedding* (Gambar 12). Hasil Pembiakan massal *Steinernema* spp. isolat Tulungagung menunjukkan bahwa nematoda dapat berkembang biak dengan baik pada media spon. Hal ini diketahui dari hasil penghitungan jumlah nematoda dalam tiap spon yang berukuran 2 cm<sup>3</sup> terdapat nematoda berkisar antara 300.000-400.000 IJ. Menurut Harahap dan Sulistyanto (2005), dengan menggunakan metode *in vitro* dapat memperoleh nematoda entomopatogen sebanyak 300.000 – 400.000 IJ/spon pada dua minggu setelah aplikasi.



Gambar 12. Pembiakan Massal *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung menggunakan Metode Bedding

Pada saat pembiakan nematoda *Steinernema* spp. di dalam tabung *Erlenmeyer*, setelah 5 hari muncul jala-jala pada dinding tabung (Gambar 13). Jala-jala tersebut adalah nematoda

*Steinernema* spp. Isolat Tulungagung yang berkoloni, karena sifat dari nematoda *Steinernema* spp. adalah membentuk koloni. Hal ini berbeda dengan nematoda *Heterorhabditis* spp. yang tidak membentuk koloni pada media perbanyakan. Semakin lama koloni nematoda *Steinernema* spp. makin banyak jala-jala yang terbentuk, tetapi sekitar 10 hari kemudian nematoda *Steinernema* spp. tersebut masuk ke dalam media bedding. Menurut V. Converse, M. Matsumura dan P.S. Grewal (2007), nematoda *Steinernema* spp. akan membentuk koloni jika dikembangkan dalam media perbanyakan.



*Steinernema* spp. Isolat Tulungagung

Gambar 13. *Steinernema* membentuk jala-jala pada dinding tabung

Hasil Pemiakan massal *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung dari media Bedding disimpan dalam spon (Gambar 14) dan disimpan pada suhu 4°C. Dalam satu ampul spon yang

berukuran 15 x 20 cm, berisi 40 ml suspensi nematoda dengan jumlah nematoda berkisar antara 5.000.000 sampai 8.000.000 IJ.



Gambar 14. Penyimpanan nematoda entomopatogen *Steinernema* spp. isolat Tulungagung dalam spon

## VII. SCREENING NEMATODA ENTOMOPATOGEN

### 7.1. Screening Nematoda Entomopatogen Isolat Jawa Timur

Screening digunakan untuk menentukan isolat nematoda entomopatogen yang mempunyai patogenisitas tertinggi terhadap larva *Helicoverpa* sp. Pengujian dilakukan terhadap beberapa isolat yang berasal dari beberapa daerah di wilayah Jawa Timur.

Pengujian ini dilakukan dengan cara meletakkan 10 ekor larva *Helicoverpa* sp. instar II pada jagung muda. Masing-masing larva *Helicoverpa* sp. beserta pakan jagung muda diletakkan dalam vial yang telah dilapisi kertas saring lembab (ditetesi air steril 200  $\mu$ l). *Helicoverpa* sp. tersebut diaplikasi nematoda entomopatogen dengan konsentrasi 200 Infektif Juvenil (IJ)/ml pada 10 ekor *Helicoverpa* sp. dan diulang 5 kali (n=50). Persentase kematian dihitung 72 jam setelah aplikasi. Isolat nematoda yang mempunyai patogenisitas tertinggi, digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Screening nematoda entomopatogen isolat Malang, Probolinggo, Tulungagung dan Kediri dilakukan terhadap hama tanaman jagung *Helicoverpa* sp. **Hasil screening** empat jenis Nematoda Entomopatogen terhadap larva *Helicoverpa* sp. adalah sebagai berikut :



Gambar 15. Screening Empat Jenis Nematoda Entomopatogen Isolat Jawa Timur Terhadap Larva *Helicoverpa* sp. di Laboratorium

Hasil screening nematoda isolat dari Malang, Probolinggo, Tulungagung dan Kediri diketahui bahwa nematoda isolat Tulungagung menunjukkan persentase kematian tertinggi (persentase kematian *Helicoverpa* mencapai 100%), menyusul nematoda isolat Malang (kematian 80%), Probolinggo (kematian 74%) dan Kediri. (kematian 72%). Hal ini menunjukkan bahwa nematoda isolat Tulungagung mempunyai patogenisitas tertinggi dibanding nematoda isolat Malang, Probolinggo dan Kediri.

Patogenisitas yang tinggi dari nematoda *Steinernema* spp. (isolat Tulungagung) diduga disebabkan karena nematoda *Steinernema* splp. (isolat Tulungagung) mempunyai beberapa kelebihan, yaitu : dapat mematikan serangga-serangga dari ordo Lepidoptera, khususnya *Helicoverpa* sp. yang merupakan inang



utama nematoda *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung). Nematoda *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung) mempunyai daya tahan terhadap desikasi (kekeringan) lebih tinggi; serta bakteri simbion nematoda *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung) menghasilkan enzim dan toksin yang lebih efektif, dibanding dengan tiga jenis nematoda entomopatogen lain yang diuji. Dugaan penulis tentang inang utama nematoda entomopatogen *Steinernema* sp. ini pernah dilaporkan oleh Poinar (1990), bahwa nematoda *Steinernema* sp. yang diisolasi dari populasi serangga seringkali didapatkan dari larva Lepidoptera. Demikian juga daya tahan yang lebih tinggi pada nematoda entomopatogen *Steinernema* sp. ini didukung oleh laporan hasil penelitian Surrey dan Wharton (1995), bahwa beberapa jenis nematoda entomopatogen yaitu *Steinernema* sp. isolat tertentu mempunyai daya tahan terhadap desikasi lebih tinggi dibanding jenis-jenis nematoda entomopatogen yang lain, sehingga nematoda jenis ini lebih tahan hidup dan menyerang inang. Dugaan bahwa bakteri simbion *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung) mengandung enzim dan toksin yang lebih efektif dibanding dengan nematoda jenis lain, pernah dilaporkan oleh Kaya dan Koppenhofer (1996), bahwa *Steinernema spp. isolat tertentu* mampu mematikan serangga inang karena bakteri simbionnya memiliki enzim dan toksin yang sangat efektif. Bakteri simbion menghasilkan enzim ekstra seluler (Protease, Lipase, Lechitinase, DNAase dan Phosphatase) serta Lipo Poli Sakharida (LPS) yang merusak haemocyt (sel darah serangga) dan menghambat Prophenoloxidase, yaitu senyawa kimia anti bakteri yang berfungsi sebagai ketahanan internal serangga (Simoes dan Rosa, 1996). Disamping itu, bakteri

simbion juga memproduksi toksin (entomotoksin) yang dapat menyebabkan kematian pada serangga (Ehlers *et al.*, 1995). Entomotoksin yang dihasilkan oleh bakteri berupa hydrocyl- dan acetoxyl- yang merupakan turunan senyawa indol, 4-ethyl- dan 4-isoprophyl-3,5-dihydroxy-transitive stilbenes (Jarosz, 1996).

Mekanisme patogenisitas nematoda *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung) diawali dengan terjadinya penetrasi nematoda *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung) ke dalam tubuh *Helicoverpa* sp., yang diduga melalui lubang-lubang alami seperti spirakel, mulut, anus dan stigma, kemudian diakhiri dengan terjadinya kematian pada *Helicoverpa* sp. Dugaan bahwa terjadinya penetrasi nematoda *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung) ke dalam tubuh *Helicoverpa* sp. melalui lubang-lubang alami ini didukung oleh laporan Tanada dan Kaya (1993), bahwa mekanisme patogenisitas diawali dengan nematoda yang memarasit serangga inang dengan jalan penetrasi secara langsung melalui kutikula ke dalam haemocoel serangga (hanya untuk *Heterorhabditis* spp.) atau melalui lubang-lubang alami seperti mulut, anus, spirakel dan stigma. Setelah masuk ke dalam tubuh inang, nematoda melepaskan bakteri simbion ke dalam haemolymph (Ehlers, 1996). Bakteri simbion menghasilkan enzim dan toksin yang dapat menyebabkan kematian pada serangga (Boemare *et al.*, 1996).

Terjadinya kematian larva *Helicoverpa* sp. yang diaplikasi nematoda *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung) tertinggi mencapai 100%, disebabkan karena disamping nematoda *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung) mempunyai beberapa kelebihan, kondisi suhu dan kelembaban di laboratorium pada saat

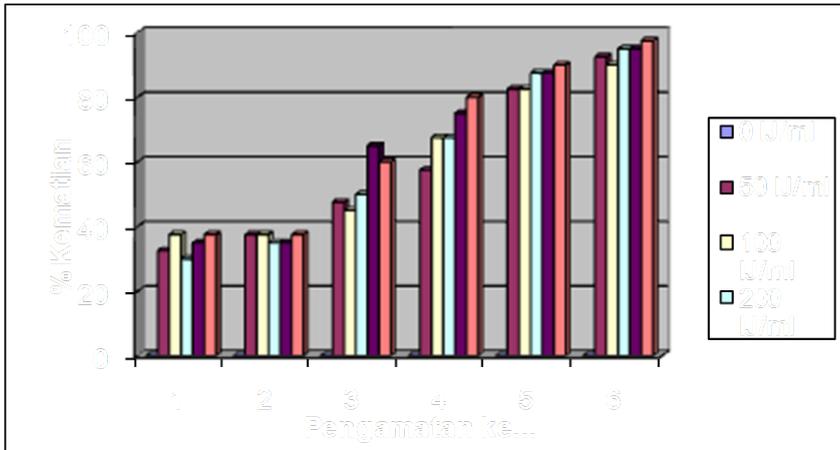
perlakuan juga mendukung. Pada saat perlakuan kondisi suhu cukup stabil yaitu suhu 25°C dan kelembaban 78%. Kondisi ini tampaknya sesuai bagi kelangsungan hidup (aktivitas dan reproduksi) *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung), sehingga *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung) dapat mengendalikan larva *Helicoverpa* sp. secara maksimal dengan persentase kematian mencapai 100%. Suhu udara yang sesuai bagi kehidupan nematoda entomopatogen pernah diteliti oleh Gaugler dan Kaya (1990), dan dilaporkan bahwa suhu udara yang sesuai bagi kehidupan nematoda entomopatogen adalah 20,9°C ± 5,9°C, sedangkan untuk suhu tanah 20,1°C ± 4,5°C. Kelembaban yang sesuai adalah sekitar 80%.

Hasil seleksi menunjukkan bahwa nematoda *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung) memiliki patogenesis tertinggi terhadap hama tanaman jagung *Helicoverpa* sp. dibanding tiga jenis nematoda entomopatogen lain yang diuji, maka nematoda *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung) digunakan untuk pengujian selanjutnya.

## VIII. PENGUJIAN TOKSISITAS NEMATODA ENTOMOPATOGEN DI LABORATORIUM

Tingkat toksisitas ditentukan berdasarkan nilai  $LC_{50}$ . Pengujian dilakukan terhadap larva *Helicoverpa* sp. , masing-masing larva diletakkan dalam vial berdiameter 3 cm yang telah dilapisi kertas saring lembab (kertas saring telah ditetesi air steril 200 $\mu$ l), dan diberi jagung muda sebagai pakan. Larva dalam vial diaplikasi nematoda entomopatogen isolat terseleksi (yang diperoleh dari hasil seleksi tersebut diatas) dengan konsentrasi 50, 100, 200, 400 dan 800 IJ/ml. Pada perlakuan kontrol, larva *Helicoverpa* sp. diaplikasi dengan air steril. Percobaan ini menggunakan 10 ekor larva *Helicoverpa* sp. instar II pada masing-masing konsentrasi dan diulang sebanyak 5 kali (n=50). Persentase kematian larva dihitung 3, 6, 12 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam setelah aplikasi. Penentuan nilai  $LC_{50}$  dilakukan dengan menghitung rerata kematian larva *Helicoverpa* sp. terlebih dahulu menggunakan rumus Abbot (1925) dan selanjutnya dianalisis menggunakan analisis probit (Finney, 1971).

**Hasil uji toksisitas** nematoda entomopatogen *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung) terhadap larva *Helicoverpa* sp. menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kematian (Gambar 16) mulai 3 jam setelah aplikasi (pengamatan ke 1), 6 jam, 12 jam, 24 jam, 48 jam, sampai 72 jam setelah aplikasi (pengamatan ke 6).



Gambar 16. Tingkat Kematian Larva *Helicoverpa* sp.instar II pada Berbagai Konsentrasi *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung)

Hubungan antara konsentrasi nematoda *Steinernema* spp. ( isolat Tulungagung) yang diaplikasikan dengan kematian larva *Helicoverpa* sp. (Gambar 16) dapat diketahui bahwa terjadi korelasi positif antara konsentrasi nematoda *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung) yang diaplikasikan dengan persentase kematian larva *Helicoverpa* sp. Hal ini ditunjukkan dengan terjadinya peningkatan kematian larva *Helicoverpa* sp. pada setiap peningkatan konsentrasi nematoda *Steinernema* spp. (isolat Tulungagung), sehingga dapat dikatakan bahwa konsentrasi nematoda *Steinernema* spp. (isolat Tulungagung) yang diaplikasikan berpengaruh positif terhadap persentase kematian larva *Helicoverpa* sp.

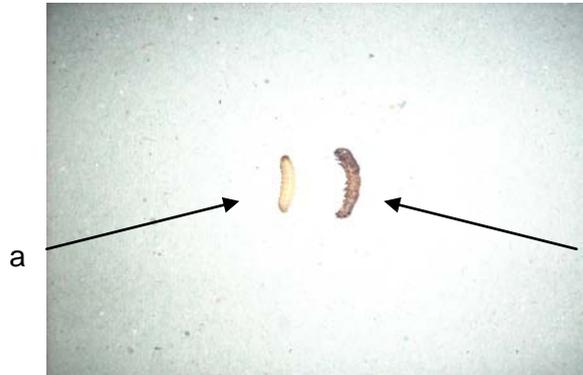


Gambar 17. Hubungan antara konsentrasi nematoda *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung) dengan kematian larva *Helicoverpa* sp.

Mengenai aktivitas gerak larva, diketahui bahwa larva *Helicoverpa* instar II merupakan larva yang infeksi, dimana larva ini sudah mulai bergerak aktif dan menyerang tanaman inang. Diduga, nematoda *Steinernema* spp. (isolat Tulungagung) mempunyai daya serang yang lebih tinggi terhadap larva yang bergerak aktif (larva instar II) dibanding larva yang bergerak kurang aktif (larva instar I yang baru menetas dari telur). Dugaan mengenai pengaruh aktivitas gerak serangga inang terhadap serangan *Steinernema* sp. pernah dilaporkan oleh Gaugler (1993), bahwa nematoda *Steinernema* spp. lebih cocok untuk diadaptasikan pada serangga inang yang mempunyai mobilitas tinggi.

Pada saat melakukan pengamatan tampak bahwa sebelum terjadi kematian pada *Helicoverpa* sp. yang telah terserang nematoda *Steinernema* spp. (isolat Tulungagung), *Helicoverpa* sp. mengalami perubahan perilaku menjadi hiperaktif. Hasil pengamatan penulis ini didukung oleh laporan Simoes *et al.* (1996), bahwa serangan nematoda entomopatogen menyebabkan perubahan perilaku pada serangga inang. Sebelum serangga yang terserang nematoda entomopatogen mengalami kematian, serangga akan bergerak hiperaktif selama lebih kurang tujuh menit, kemudian akhirnya mengalami kematian.

Setelah larva *Helicoverpa* sp. mati (tubuhnya tidak bergerak dan kaku) akibat terinfeksi nematoda *Steinernema* spp. (isolat Tulungagung), selanjutnya pada tubuh larva *Helicoverpa* sp. menampakkan gejala, yaitu terjadinya perubahan warna pada kutikula. Warna larva sehat yang semula coklat muda berubah menjadi coklat karamel (Gambar 18) Gejala lain adalah struktur jaringan tubuh larva *Helicoverpa* sp. menjadi lunak. Meskipun demikian, bentuk tubuh larva *Helicoverpa* sp. tetap utuh dan tidak berbau busuk. Hasil pengamatan penulis mengenai gejala serangan nematoda *Steinernema* sp. pada tubuh serangga inang ini juga pernah dilaporkan oleh Simoes *et al.* (1996), bahwa gejala serangan yang diakibatkan oleh *Steinernema* spp. ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada kutikula serangga inang, semula kutikula berwarna coklat muda berubah menjadi coklat karamel/coklat tua, tubuh serangga menjadi lunak dan apabila dibedah jaringan tubuh menjadi cair tetapi tidak berbau busuk.



Gambar 18. Gejala Serangan *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung pada larva *Helicoverpa* sp. (a. Larva sehat; b. Larva terserang)

Kemampuan untuk menyebabkan kematian dari nematoda *Steinernema* spp. (isolat Tulungagung) tidak hanya ditentukan oleh patogenesis nematoda-bakteri kompleks, tetapi juga ditentukan oleh kemampuan *Helicoverpa* sp. untuk mempertahankan diri. Hal ini pernah dilaporkan oleh Ehlers (1993) bahwa kemampuan menyebabkan kematian dari hubungan parasitasi nematoda entomopatogen dengan inang tidak hanya ditentukan oleh patogenesis nematoda-bakteri kompleks, tetapi juga oleh seberapa besar kemampuan serangga inang untuk mempertahankan diri melawan parasit yang menyerang.

Untuk mempertahankan diri terhadap serangan nematoda entomopatogen, serangga mempunyai senyawa anti bakteri. Terjadinya kematian dalam penelitian ini, diduga disebabkan karena *Helicoverpa* sp. tidak mampu mempertahankan diri melawan serangan nematoda *Steinernema* spp. (isolat Tulungagung), sehingga nematoda *Steinernema* spp. (isolat Tulungagung) mampu berkembang dan bereproduksi di dalam

tubuh *Helicoverpa* sp., yang akhirnya menyebabkan *Helicoverpa* sp. mengalami kematian. Ketidakmampuan *Helicoverpa* sp. untuk mempertahankan diri diduga disebabkan karena senyawa anti bakteri yang terdapat di dalam tubuh *Helicoverpa* sp. berhasil dihancurkan oleh nematoda *Steinernema* spp. (isolat Tulungagung). Dugaan bahwa terjadinya kematian disebabkan karena senyawa anti bakteri di dalam tubuh *Helicoverpa* sp. berhasil dihancurkan oleh nematoda *Steinernema* spp. (isolat Tulungagung) ini didukung oleh hasil penelitian Simoes dan Rosa (1996), bahwa serangga mempunyai ketahanan internal yang berupa senyawa kimia anti bakteri. Senyawa ini menyebabkan terjadinya pengkapsulan nematoda di dalam haemocoel, apabila nematoda tidak berhasil melawan ketahanan serangga inang. Apabila nematoda berhasil menghancurkan senyawa anti bakteri yang diproduksi oleh serangga, maka nematoda akan berhasil mencapai haemocoel, dapat berkembang menjadi dewasa dan bereproduksi di dalam haemocoel. Senyawa anti bakteri akan dihancurkan oleh enzim ekstraseluler yang dilepaskan oleh nematoda bersamaan dengan saat nematoda melakukan penetrasi ke dalam haemocoel serangga.

. Penentuan nilai Lethal Concentrate (LC<sub>50</sub>) didasarkan pada hasil uji konsentrasi nematoda *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung) terhadap kematian larva *Helicoverpa* sp. Hasil aplikasi beberapa konsentrasi nematoda *Steinernema* spp. (Isolat Tulungagung) pada *Helicoverpa* sp, pada beberapa jam pengamatan, setelah dianalisis menggunakan analisis probit (Finney, 1971) menghasilkan nilai LC<sub>50</sub> yang berbeda-beda (Tabel 2).

Tabel 2. Nilai LC<sub>50</sub> *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung) pada larva *Helicoverpa* sp.

Jam Pengamatan Setelah Aplikasi	Nilai L C <sub>50</sub> IJ/ml
3 jam	1E + 8
6 jam	6E + 18
12 jam	157,89
24 jam	16,422
48 jam	0,0542
72 jam	0.0477

Berdasarkan tabel diatas dapat diketahui bahwa pada jam pengamatan berbeda akan mempunyai nilai LC<sub>50</sub> yang berbeda pula. Pada jam pengamatan yang lebih lama, ternyata nilai LC<sub>50</sub> nya lebih rendah dibanding nilai LC<sub>50</sub> pada jam pengamatan yang lebih pendek. Dengan demikian dapat diketahui bahwa untuk mematikan 50% larva *Helicoverpa* sp. dalam waktu yang lebih cepat, maka dibutuhkan konsentrasi nematoda *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung) lebih tinggi. Demikian juga sebaliknya, kemampuan untuk mematikan 50% larva *Helicoverpa* sp. akan membutuhkan waktu lebih lama, apabila konsentrasi nematoda *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung) yang diaplikasikan lebih rendah.

Penentuan nilai LC<sub>50</sub> merupakan penentuan konsentrasi optimal, dimaksudkan agar nematoda *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung) efektif untuk mengendalikan larva *Helicoverpa* sp. Apabila konsentrasi nematoda *Steinernema* sp. (Isolat

Tulungagung) melebihi sejumlah konsentrasi tertentu, diduga akan terjadi kompetisi dalam hal ruang dan makanan antar nematoda itu sendiri. Dugaan mengenai pengaruh penggunaan konsentrasi nematoda entomopatogen, termasuk *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung), yang melebihi batas optimal telah dilaporkan oleh Kaya dan Koppenhofer (1996), bahwa konsentrasi nematoda entomopatogen (termasuk *Steinernema* sp.) yang digunakan harus sesuai dengan batas konsentrasi optimalnya. Apabila konsentrasi yang digunakan melebihi batas optimal, maka akan menciptakan suatu kompetisi dalam hal ruang dan makanan antar nematoda entomopatogen itu sendiri. Kompetisi ini yang menyebabkan nematoda entomopatogen kurang efektif apabila diaplikasikan melebihi batas konsentrasi optimalnya.

Hasil pembedahan pada larva *Helicoverpa* sp. yang mati diketahui bahwa rerata jumlah nematoda *Steinernema* spp. (Isolat Tulungagung) yang masuk ke dalam setiap tubuh larva *Helicoverpa* sp. sebanyak 3,9 IJ (kons. 50 IJ/ml); 7,7 IJ (kons 100 IJ/ml); 13,2 IJ (kons 200 IJ/ml); 18,8 IJ (kons 400 IJ/ml); 26 IJ (kons 800 IJ/ml). Semakin tinggi konsentrasi nematoda yang diaplikasikan, semakin tinggi pula jumlah nematoda yang masuk dalam tubuh larva *Helicoverpa* sp. Hal ini diduga disebabkan karena pada konsentrasi nematoda *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung) yang lebih tinggi, maka peluang nematoda untuk dapat bersentuhan dengan tubuh larva *Helicoverpa* sp. lebih tinggi pula. Nematoda yang menyentuh tubuh larva *Helicoverpa* sp. langsung melakukan penetrasi ke dalam tubuh larva *Helicoverpa* sp. dan mampu menyebabkan kematian pada larva *Helicoverpa* sp. Dugaan bahwa nematoda yang bersentuhan langsung dengan

serangga uji berpengaruh terhadap efektifitas nematoda entomopatogen terhadap serangga, pernah dilaporkan dalam hasil penelitian Cabanillas dan Raulston (1994) bahwa jumlah kematian serangga akan lebih tinggi apabila nematoda entomopatogen yang diaplikasikan secara langsung mengenai permukaan tubuh serangga.

Nematoda khususnya *Steinernema* masuk dalam tubuh serangga melalui lubang-lubang alami, seperti mulut, anus, stigma dan spirakel. Spirakel merupakan jalan masuk utama nematoda. Dugaan bahwa spirakel merupakan jalan masuk utama nematoda entomopatogen ke dalam tubuh serangga pernah diteliti oleh Gaugler *et al.* (1993), dan dilaporkan bahwa spirakel pada serangga-serangga Lepidoptera merupakan jalan masuk utama bagi nematoda untuk melakukan penetrasi ke dalam tubuh inang.

Di dalam vial, gerak larva *Helicoverpa* sp. sangat terbatas, sehingga peluang terjadinya kontak antara nematoda *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung) dan larva *Helicoverpa* sp. lebih besar. Kondisi demikian sangat mendukung efektifitas nematoda *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung) terhadap larva *Helicoverpa* sp.. Penggunaan media kertas saring yang diletakkan di dalam vial sangat membantu nematoda *Steinernema* sp. (Isolat Tulungagung) untuk menyerang inang. Dalam media ini nematoda *Steinernema* spp. (Isolat Tulungagung) dapat bertahan hidup untuk jangka waktu yang lebih lama, sehingga apabila sewaktu-waktu terjadi kontak dengan larva *Helicoverpa* sp., nematoda ini masih cukup efektif untuk mempenetrasinya. Hasil penelitian mengenai pengaruh media terhadap efektifitas nematoda entomopatogen telah dilaporkan oleh Caroli, Glazer dan Gaugler

(1996) bahwa lingkungan substrat kertas saring diketahui sangat menguntungkan bagi nematoda entomopatogen, terutama yang menggunakan strategi 'ambush' (menunggu inang), seperti nematoda *Steinernema* sp.

## VIII. PEMANFAATAN NEP SEBAGAI PENGENDALI HAYATI HAMA

---

Sebagai agens pengendali hayati NEP mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan dengan pestisida kimia yaitu kemampuan mencari inang dan membunuh dengan cepat (24-48 jam) dan kemampuan untuk survive dan recycling di dalam tanah (Kaya & Gaugler, 1993), aman terhadap lingkungan (Akhurs, 1990), mudah diproduksi secara massal (Fridmann, 1990), mudah diaplikasikan menggunakan alat semprot standar (Bateman, 2005; Matthews, 2001). Pengembangan nematoda untuk pengendalian hayati terkonsentrasi pada penggunaan nematoda untuk mengendalikan moluska dan serangga hama yang hidup di tanah dan nematoda juga digunakan pada serangga yang hidup tersembunyi (cryptic habitat).

Nematoda telah digunakan untuk *pengendalian hayati* klasikal dan beberapa telah sukses sebagai contoh penggunaan nematoda *Beddingia sicidicola* (Famili Phaenopsitylenchidae) telah dilepas di Australia untuk mengendalikan hama *Sirex noctilio* (Hymenoptera) yang mengebor masuk kedalam tanaman pinus. *Steinernema scapterici* yang sukses mengurangi populasi jengkerik di Uruguay dan Argentina setelah 3 tahun. Akan tetapi aplikasi nematoda tidak lepas dari kendala yaitu persistensinya tidak terlalu lama. Inundatif nematoda umumnya  $2.5 \times 10^9$  nematoda/ha. Ini sama dengan pengendalian dengan insektisida standar.

Nematoda seperti *Steinernema* dan *Heterorhabditis* dapat diproduksi massal sebagai biopestisida, hal dikarenakan mereka dapat berkembang dengan mudah dalam jumlah yang besar dengan media padat yang murah seperti media pork kidney atau makanan anjing, akan tetapi perkembangan lebih lanjut nematoda ini dapat diproduksi massal secara liquid dalam fermentor dengan kapasitas 15.000 liter atau lebih dengan hasil  $10^5$  juvenil per millimeter (Friedman, 1990). Beberapa industri masih menggunakan media padat atau *in vivo* pada serangga inang. Nematoda diformulasikan ke dalam bahan yang porous (seperti sponge atau foam). Nematoda ada yang dideksikasi dan dicampur tepung atau granula seperti vermikulit atau bahan pembawa lainnya. Metode optimasi formulasi dan pengepakan adalah kritikal poin bagi nematoda karena mereka harus dalam keadaan hidup ketika diaplikasikan. Nematoda ini akan efektif bila diaplikasikan dalam tanah yang ringan, tanah lembab pada temperatur sedang dan hangat. Selama aplikasi, penggunaan air untuk tetap menjaga temperatur tanah dan kelembaban adalah kritikal. Sehingga sering kali sebelum aplikasi nematoda dilakukan penyiraman air.

Selain *Steinernema* dan *Heterorhabditis*, beberapa nematoda digunakan untuk mengendalikan serangga seperti pada Ordo Mermithida. Obligat nematoda ini dapat dilihat dengan mata biasa, dimana betina dewasanya berukuran panjang 5-20 cm atau lebih, meskipun masih ramping. Satu Mermithidae membunuh serangga hama, menyelesaikan siklus hidupnya pada satu serangga itu, kemudian meninggalkan inangnya dan masuk ke lingkungan. Beberapa serangga hama yang diserang adalah nyamuk, lalat, wereng daun, dan belalang. *Romanomermis*

*culicivorax*, juvenilnya hidup dalam larva nyamuk dalam beberapa minggu, kemudian keluar dari tubuh inangnya sekaligus membunuh inangnya. Mereka akan berada di sediment bawah dari habitat perairan, berkembang menjadi jantan dan betina, kemudian kawin, memproduksi juvenil infeksi pada musim selanjutnya.



Gambar 19. Hama terserang NEP

### Manfaat yang diharapkan

Memberikan kepada petani alternatif pengendalian serangga hama *Helicoverpa* sp. yang aman terhadap lingkungan dengan menggunakan nematoda entomopatogen isolat lokal terseleksi (*Steinernema* spp. Isolat Tulungagung) dan mengurangi penggunaan pestisida (senyawa kimia sintetik), sehingga selain dapat meningkatkan produksi jagung, kualitas hidup masyarakat juga menjadi lebih baik.

### Prosedur Aplikasi NEP di Lapangan

NEP mudah diaplikasikan dengan menggunakan alat sprayer standar, dan kompatibel dengan cara pengendalian kimia yang lain, dengan konsentrasi  $0,5 \times 10^6 / m^2$  NEP *Heterorhabditis*

*bacteriophora* dapat membunuh *Phyllopertha horticola* sebesar 89 % (Sulistyanto, 1999).

Nematoda ini akan efektif bila diaplikasikan dalam tanah yang ringan, tanah lembab pada temperatur sedang dan hangat. Selama aplikasi, penggunaan air untuk tetap menjaga temperatur tanah dan kelembaban adalah kritikal. Sehingga sering kali sebelum aplikasi nematoda dilakukan penyiraman air.

1. Lahan tanaman yang akan diaplikasikan NEP harus sangat lembab atau macak-macak air.
2. Tangki semprot yang akan digunakan tidak boleh bekas pestisida kimia.
3. Kebutuhan rata-rata per hektar adalah 2,8 liter larutan NEP.
4. Dosis per tangki semprot 14 liter adalah 280 ml larutan NEP.
5. NEP yang disimpan dalam spon basah direndam terlebih dahulu dalam air, agar semua NEP keluar dari spon sebaiknya spon diguyur air yang ditampung ke dalam ember.
6. Jangan dicampur dengan pestisida kimia



Gambar 20. Cara Aplikasi NEP di Lapangan

Waktu aplikasi yang tepat adalah pada sore hari karena NEP sangat rentan terhadap kekeringan. Waktu satu malam cukup bagi NEP untuk menemukan dan menginfeksi inang.

Nematoda entomopatogen, *Heterorhabditis* spp. yang berasal dari semua jengkal tanah yang bersimbiose dengan bakteri *Photorhabdus* spp. yang ampuh mengendalikan hama Tanaman Pertanian, Pangan, Perkebunan, dll.

## **EFIKASI NEMATODA ENTOMOPATOGEN TERHADAP HAMA TANAMAN JAGUNG**

Untuk pengujian kemampuan nematoda entomopatogen di lapangan, dilakukan pada areal pertanaman jagung yang terserang hama (*Helicoverpa* sp.).

Jagung merupakan salah satu kebutuhan bahan pokok penduduk Indonesia. Pada tahun 2006, luas pertanaman jagung di dunia sudah mencapai 147 juta hektar. Salah satu kendala utama produksi jagung adalah serangan serangga hama. Salah satu

jenis hama yang menyerang jagung adalah *Helicoverpa* sp. Akibat serangan hama, produksi dan kualitas jagung merosot tajam (Herman, 2007).

Larva *Helicoverpa* sp. berbulu dan warnanya bermacam-macam ada yang hijau kuning, coklat muda, atau hitam. Pada samping badan terdapat 3-4 garis seperti gelombang sepanjang tubuhnya. Larva stadium akhir mempunyai panjang tubuh sekitar 50 mm. Imagonya meletakkan telur pada malam hari dan satu ekor betina dapat bertelur hingga 1000 butir dengan stadium telur lamanya 2-5 hari. Panjang tubuh imago berkisar 12-19 mm (Heinrich, 2007).



Gambar 21. Larva *Helicoverpa* sp. (Heinrich, 2007)

Hama ini dapat menyerang tanaman muda, terutama pucuk atau malai yang dapat berakibat tidak terbentuknya bunga jantan, berkurangnya hasil, dan bahkan tanaman mati (Widodo.D, 1996).

Telur diletakkan satu persatu di atas permukaan daun jagung. Peletakan telur dilakukan selama 10 hari atau kurang. Stadium larva terdiri dari 5 instar dan berkisar antara 17-24 hari, dimana larva instar terakhir akan meninggalkan tongkol dan membentuk pupa dalam tanah dengan stadium pupa antara 12-14

hari. Perkembangan telur sampai imago sekitar 35 hari (Heinrich, 2007).

Larva ini akan segera masuk kedalam tongkol sesudah menetas dari telur, maka untuk penanggulangannya di lakukan penyemprotan. Penyemprotan di lakukan setelah terbentuknya rambut jagung dan diteruskan setiap 1-2 hari hingga rambut berwarna coklat. Jadi penyemprotan yang menggunakan pestisida untuk pembasmian hama ini adalah 14-28 kali/musim (Anonim, 2000).

Kehidupan hama ini di alam tidak terlepas dari faktor yang berasal dari hama tersebut dan lingkungan sekitarnya, yaitu: fisik, biotik, dan makanan. Faktor fisik yang berpengaruh adalah suhu, kelembaban, curah hujan, angin, cahaya (Natawigena, 1990).

Uji efikasi nematoda entomopatogen dilakukan pada areal pertanaman jagung yang terserang *Helicoverpa* sp. Adapun tahapan-tahapan dalam uji efikasi sebagai berikut :

**a. Survey Lapangan**

Survey lapangan merupakan langkah awal yang dilakukan sebelum uji efikasi. Tujuan survey adalah untuk menentukan lokasi penelitian yaitu areal pertanaman jagung yang terserang hama tongkol jagung *Helicoverpa* sp.

**b. Pembuatan plot-plot pada areal pertanaman jagung yang terserang hama *Helicoverpa* sp.**

Percobaan di lapang memakai Rancangan Acak Kelompok, yang dilaksanakan dengan membuat plot-plot pada beberapa areal pertanaman jagung dengan ukuran 1 m<sup>2</sup> sebanyak 20 plot.

**c. Pembuatan Suspensi Nematoda Entomopatogen.**

Nematoda entomopatogen yang diperoleh dari hasil panen adalah stadia infeksi juvenil 3 (IJ 3). Nematoda dalam formulasi spon diberi air dan diremas-remas pelan dalam air, selanjutnya dihitung kerapatan nematodanya. Suspensi nematoda yang sudah diketahui kerapatannya tersebut digunakan untuk aplikasi di lapangan.

**d. Aplikasi Nematoda Entomopatogen.**

Uji efikasi nematoda entomopatogen (*Steinernema* spp. Isolat Tulungagung) dilakukan di daerah pertanaman jagung yang terserang hama *Helicoverpa* sp. Dosis nematoda yang diaplikasikan adalah 12.500 IJ/tan, 25.000 IJ/tan, 50.000 IJ/tan, 75.000 IJ/tan., 100.000 IJ/tanaman Berdasarkan Downing (1994), dosis NEP yang efektif untuk aplikasi lapang adalah 1.250.000.000 IJ/ha – 5.000.000.000 IJ/ha atau 125.000 IJ/m<sup>2</sup> - 500.000 IJ/m<sup>2</sup> atau 12.500 IJ/tanaman – 50.000 IJ/tanaman. Masing-masing perlakuan diulang 5 kali. Penyemprotan di lapang menggunakan knapsack sprayer dengan kapasitas 20 liter, dilakukan pada sore hari.

**e. Pengamatan terhadap serangga terinfeksi nematoda entomopatogen**

Pengamatan terhadap *Helicoverpa* yang mati akibat terinfeksi nematoda entomopatogen dilakukan pada 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15 hari setelah aplikasi. Persentase kematian hama *Helicoverpa* sp. dihitung menggunakan rumus Abbot (1925).

## Hasil Efikasi Nematoda Entomopatogen *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung di Lapangan

Dari hasil survey lapangan pada beberapa wilayah di Jawa Timur, ternyata ada 3 daerah yang dinilai endemi hama tanaman jagung *Helicoverpa* sp., yaitu daerah Lebo-Sidoarjo, Desa Sukorambi Jember dan desa Sedati Gede- Sidoarjo (Gambar 22).



A. Desa Sukorambi Jember



B. Desa Lebo, Sidoarjo



C. Tongkol Jagung Terserang *Helicoverpa* sp.



D. Desa Sedati Gede, Sidoarjo

Gambar 22. Areal pertanaman jagung sebagai lokasi penelitian (A, B, D); tongkol jagung terserang larva *Helicoverpa* sp.(C)

Hasil Uji Efikasi *Nematoda entomopatogen (Steinernema spp. isolat Tulungagung)* terhadap hama tanaman jagung (*Helicoverpa sp.*) pada areal pertanaman jagung di Desa Sukorambi-Jember (Tabel 3), Lebo-Sidoarjo (Tabel 4) dan Sedati Gede-Sidoarjo (Tabel 5) menunjukkan bahwa mulai pengamatan pertama (3 hari setelah aplikasi) sudah terjadi mortalitas larva *Helicoverpa sp.*, dan jumlah mortalitas meningkat pada pengamatan hari ke 4, 5, 6, 7 dan 8 setelah aplikasi. Adanya peningkatan mortalitas *Helicoverpa sp.* diduga disebabkan karena pada waktu yang semakin bertambah, nematoda *Steinernema spp.* semakin tumbuh dan berkembang di dalam tubuh *Helicoverpa sp.*, sehingga tingkat kerusakan jaringan tubuh serangga semakin tinggi pula. Tingkat kerusakan jaringan tubuh yang tinggi dapat menyebabkan mortalitas serangga. Hasil pengamatan mortalitas *Helicoverpa sp.* menunjukkan bahwa jumlah mortalitas *Helicoverpa sp.* mencapai maksimal pada hari ke 7-8 setelah aplikasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Levine & Sadeghi (1992), bahwa nematoda entomopatogen *Steinernema spp.* efektif untuk mengendalikan larva Lepidoptera selama 1 sampai 8 hari setelah aplikasi.

Tabel 3. Persentase Mortalitas Larva *Helicoverpa* sp. akibat serangan Nematoda entomopatogen *Steinernema* spp. isolat *Tulungagung* pada areal pertanaman jagung di desa Sukorambi, Jember.

Perlakuan	Pengamatan hari ke... setelah aplikasi				
	3	4	5	6	7
<b>A</b>	30	33,3	53,3	66,6	86,6
<b>B</b>	40	53,3	60	73,3	93,3
<b>C</b>	40	60	66,6	93,3	100
<b>D</b>	53,3	60	73,3	93,3	100
<b>E</b>	60	66,6	73,3	93,3	100

Keterangan :

A = 12.500 IJ/tanaman (Infective Juvenile/ tanaman)

B = 25.000 IJ/tanaman

C = 50.000 IJ/tanaman

D = 75.000 IJ/tanaman

E = 100.000 IJ/tanaman

Tabel 3, pada pengamatan 7 hari setelah aplikasi, mortalitas rata-rata *Helicoverpa* sp. pada perlakuan C, D dan E telah mencapai 100%. Hal ini menunjukkan bahwa nematoda *Steinernema* spp. isolat *Tulungagung* efektif diaplikasikan di lapangan sampai 7 hari, dimana kondisi suhu pada saat perlakuan 28°C - 30°C dan kelembaban 80%.

Hasil pengamatan di desa Lebo Sidoarjo, tingkat mortalitas tertinggi terjadi pada hari ke 8 (perlakuan E) dengan rata-rata mortalitas 97,22% (Tabel 3) dan desa Sedati Gede – Sidoarjo, tingkat mortalitas tertinggi terjadi pada hari ke 7 (perlakuan E)

dengan rata-rata mortalitas 100% (Tabel 4). Dengan demikian dapat diketahui bahwa, tingkat mortalitas *Helicoverpa* sp. akibat serangan *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung di desa Sukorambi, Jember lebih tinggi daripada di desa Lebo, Sidoarjo dan Sedati Gede, Sidoarjo. Hal ini diduga disebabkan karena suhu di wilayah Jember lebih rendah dibanding suhu di wilayah Sidoarjo (31°C -34 °C). Sesuai dengan pendapat Buhler & Timothy (1994) bahwa efektifitas *S. carpocapsae* dan *S. glaseri* terhadap larva Lepidoptera akan hilang setelah 8 hari pada suhu 29,9°C dan kelembaban 67,5 %.

Tabel 4. Persentase Mortalitas Larva *Helicoverpa* sp. akibat serangan *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung pada areal pertanaman jagung di desa Lebo, Sidoarjo

Perlakuan	Pengamatan hari ke... setelah aplikasi					
	3	4	5	6	7	8
<b>A</b>	30,55	47,21	55,55	61,11	72,21	91,66
<b>B</b>	49,99	63,88	69,43	74,99	80,55	88,88
<b>C</b>	49,99	66,66	69,43	72,21	77,80	86,10
<b>D</b>	63,88	74,99	80,55	80,55	83,30	91,66
<b>E</b>	55,55	69,44	77,77	80,55	88,88	97,22

Keterangan :

A = 12.500 IJ/tanaman (Infective Juvenile/ tanaman)

B = 25.000 IJ/tanaman

C = 50.000 IJ/tanaman

D = 75.000 IJ/tanaman

E = 100.000 IJ/tanaman

Tabel 5. Persentase mortalitas Larva *Helicoverpa* sp. akibat serangan *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung pada areal pertanaman jagung di desa Sedati Gede, Sidoarjo

Perlakuan	Pengamatan hari ke... setelah aplikasi				
	3	4	5	6	7
A	20	33,3	53,3	60	80
B	40	46,7	60	66,6	86,6
C	46,7	53,3	60	80	93,3
D	53,3	60	73,3	86,6	93,3
E	53,3	60	80	93,3	100

Keterangan :

A = 12.500 IJ/tanaman (Infective Juvenile/ tanaman)

B = 25.000 IJ/tanaman

C = 50.000 IJ/tanaman

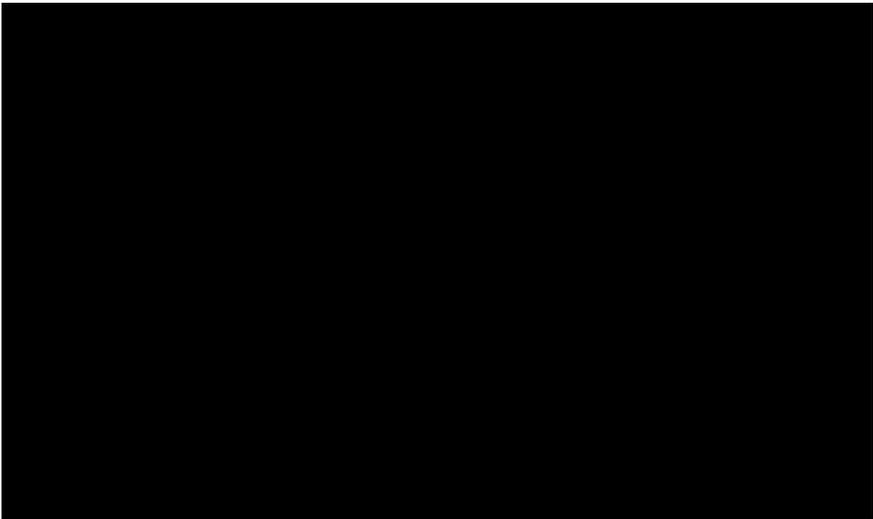
D = 75.000 IJ/tanaman

E = 100.000 IJ/tanaman

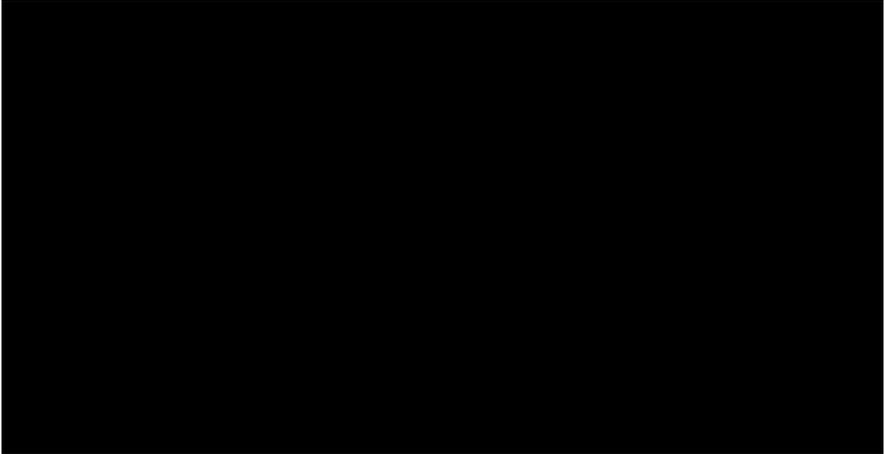
Hasil analisis statistik pengaruh aplikasi nematoda *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung terhadap mortalitas *Helicoverpa* sp. tidak menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan, baik pada perlakuan di desa Sukorambi - Jember, desa Lebo - Sidoarjo maupun desa Sedati Gede - Sidoarjo. Dengan demikian dapat diketahui bahwa dosis nematoda *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung yang efektif dalam mengendalikan *Helicoverpa* sp. adalah 12.500 IJ/tanaman.

Meskipun demikian, dari data yang diperoleh dapat diketahui bahwa ada kecenderungan kenaikan tingkat mortalitas *Helicoverpa* sp. pada perlakuan dosis nematoda entomopatogen

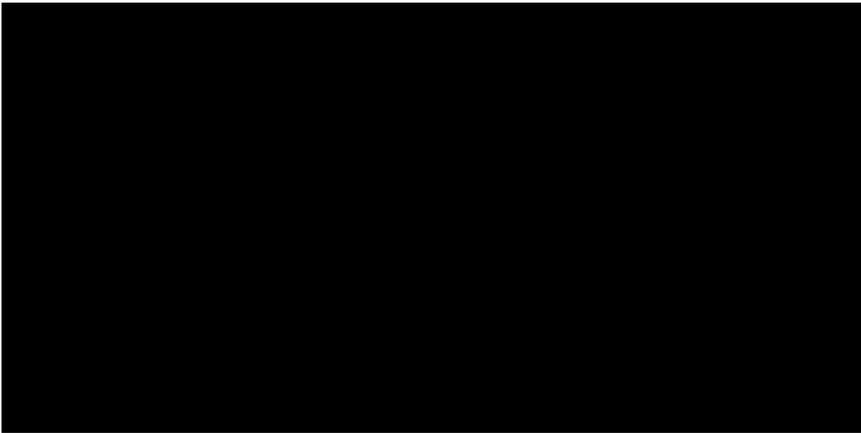
(*Steinernema* spp. isolat Tulungagung) yang semakin meningkat. Sebagaimana tampak dalam tabel (Tabel 3, tabel 4, dan tabel 5), bahwa pada dosis *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung yang semakin tinggi, maka mortalitas *Helicoverpa* sp. juga cenderung lebih tinggi. Demikian juga sebaliknya, pada dosis *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung yang lebih rendah, maka mortalitas larva *Helicoverpa* sp. juga cenderung lebih rendah. Adanya kecenderungan kenaikan tingkat mortalitas *Helicoverpa* spp. Akibat serangan *Steinernema* spp. isolat Tulungagung pada areal pertanaman jagung, apabila digambarkan dalam grafik sebagai berikut :



Gambar 23. Grafik Tingkat Mortalitas *Helicoverpa* spp. Akibat serangan *Steinernema* spp. isolat Tulungagung pada areal pertanaman jagung di desa Sukorambi, Jember



Gambar 24. Grafik Tingkat Mortalitas *Helicoverpa* spp. Akibat serangan *Steinernema* spp. isolat Tulungagung pada areal pertanaman jagung di desa Lebo, Sidoarjo



Gambar 25. Grafik Tingkat Mortalitas *Helicoverpa* spp. Akibat serangan *Steinernema* spp. isolat Tulungagung pada areal pertanaman jagung di desa Sedati Gede, Sidoarjo

Grafik hubungan antara waktu pengamatan dan persentase mortalitas *Helicoverpa* spp. menunjukkan bahwa semakin tinggi (bertambah) waktu/hari pengamatan, persentase mortalitas

*Helicoverpa* spp. semakin meningkat. Hal ini diduga disebabkan karena semakin lama, nematoda yang berada di dalam tubuh *Helicoverpa* spp. semakin tumbuh dan berkembang. Apabila nematoda sudah berkembang (jumlahnya meningkat), maka merusak jaringan tubuh *Helicoverpa* spp. akibat serangan nematoda akan semakin parah, sehingga akhirnya menyebabkan terjadinya mortalitas *Helicoverpa* spp. Setelah *Helicoverpa* spp. mati, maka nematoda akan mencari inang yang baru. Sebagaimana telah dikemukakan seorang peneliti bahwa nematoda *Steinernema* berada dalam tubuh hama/inang selama 10-14 hari atau sampai mati, selanjutnya nematoda keluar dari tubuh inang dan mencari inang yang baru (Anonim, 2006).

Serangga yang mati akibat serangan nematoda akan menampilkan gejala spesifik. Gejala serangan nematoda *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung terhadap larva *Helicoverpa* spp. adalah tubuh larva berubah warna menjadi kecoklatan/karamel, selanjutnya tubuh larva menjadi lunak tetapi tidak berbau busuk dan kemudian hancur, jika dibedah ditemukan nematoda *Steinernema* spp. dalam tubuh larva. Menurut Boemare *et al* (1996), gejala hama yang terinfeksi *Steinernema* spp. berwarna kecoklatan/ karamel karena bakteri *Xenorhabdus* spp. yang bersimbiosis dengan nematoda *Steinernema* spp. menghasilkan enzim lekitinase, protease serta entomotoksin (eksotoksin dan endotoksin) yang mempengaruhi proses kematian pada hama. Bakteri *Xenorhabdus* spp. termasuk bakteri gram negatif, katalase negatif dan bioluminenscens negatif sehingga gejala larva yang terinfeksi nematoda *Steinernema* spp. berwarna kecoklatan/karamel. Menurut Jarozs (1996) *dalam* Harahap

(2000), tidak adanya bau busuk pada larva yang terserang nematoda *Steinernema* spp. diduga karena adanya aktifitas antibiotik yang dihasilkan bakteri *Xenorhabdus* spp. dan dapat menghambat aktifitas mikroorganisme lain.

Hasil pembedahan pada *Helicoverpa* sp. yang mati diketahui bahwa jumlah nematoda *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung yang masuk tubuh *Helicoverpa* sp. berkisar antara 1 - 30 ekor. Jumlah ini sangat sedikit dibanding dengan jumlah *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung yang diaplikasikan. Banyaknya *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung yang tidak berhasil mempenetrasi *Helicoverpa* sp. diduga disebabkan karena adanya beberapa faktor yang mempengaruhinya, meliputi : pada saat diaplikasikan *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung tidak langsung bersentuhan dengan *Helicoverpa* sp. Mengingat nematoda ini bersifat 'menunggu inang', maka nematoda yang tidak bersentuhan mempunyai peluang kecil untuk berhasil mempenetrasi *Helicoverpa* sp. Disamping itu, penyebab lain adalah *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung tidak aktif atau mati setelah diaplikasikan. Tidak aktif atau matinya *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung ini bisa disebabkan oleh adanya faktor-faktor abiotik dan biotik yang mempengaruhinya. Faktor abiotik yang berpengaruh terhadap aktivitas *Steinernema* spp. Isolat Tulungagung meliputi kelembaban, sinar ultra violet dan temperatur. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan aplikasi nematoda entomopatogen dikemukakan oleh Buhler & Timothy (1994), juga Mason & Wright (1997) bahwa ada beberapa faktor abiotik yang sangat berpengaruh terhadap keberhasilan aplikasi nematoda entomopatogen seperti

kelembaban, sinar ultra violet dan temperatur. Oleh karena itu aplikasi nematoda entomopatogen yang tepat dilakukan pada sore hari untuk mencegah terjadinya desikasi dan inaktivasi oleh sinar ultra violet (Griffin, More & Downes, 1991).

Banyak faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan penggunaan nematoda entomopatogen. Hal ini pernah diteliti dan dilaporkan oleh Gaugler (1993), bahwa efektifitas nematoda entomopatogen tergantung pada berhasil tidaknya penyesuaian terhadap kondisi lingkungan. Pendapat Gaugler (1993), bahwa menghindari kelembaban rendah, tidak adanya perlindungan terhadap sinar ultraviolet dan temperatur ekstrim merupakan pendekatan untuk mencapai keberhasilan penggunaan nematoda entomopatogen.

## X. KESIMPULAN

1. Nematoda entomopatogen yang mempunyai patogenisitas tertinggi (100 %) terhadap hama tanaman jagung *Helicoverpa* sp. adalah *Steinernema* sp. (isolat Tulungagung).
2. Waktu terbaik yang dibutuhkan untuk mematikan 50% *Helicoverpa* sp. adalah 12 jam dengan nilai  $LC_{50} = 18,422$  IJ/ml.
3. Mortalitas *Helicoverpa* sp. tertinggi terjadi pada 7-8 hari setelah aplikasi.
4. Tingkat mortalitas *Helicoverpa* sp. di daerah Jember lebih tinggi daripada tingkat mortalitas *Helicoverpa* sp. di daerah Sidoarjo.
5. Dosis nematoda (*Steinernema* spp. isolat Tulungagung) yang paling efektif untuk mengendalikan hama tanaman jagung (*Helicoverpa* sp.) adalah 12.500 IJ/tanaman.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bedding, R.A. (1981) Low cost *in vitro* mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (nematodes) for field control of insect pest. *Nematologica* 27 : 109-114.
- Boemare, N.E., Lanmond and Mauleon, H. (1996) The entomopathogenic nematodes *Bacterium complex*, biology, life cycle and vertebrate safety. *Biocontrol Science and Technology* 6 : 333-346.
- Buhler, W.G. and Timothy, J.G. (1994) *Persistence of Steinernema carpocapsae and S. glaseri as Measured by Their Control of Black Cutworm Larvae in Bentgrass*. Dept. of Entomology, Purdue University West Lafayette.
- Caroli, L., Glazer, I and Gaugler, R. (1996) Entomopathogenic nematodes infectivity assay : comparison of penetration rate into different hosts. *Biocontrol Science and Technology* 6 : 333 – 346.
- Ehlers, R.U. (1996) Current and future use of nematodes in biocontrol : practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology* 6 : 303-316.
- Ehlers, R.U. (2001) Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 : 623-633.
- Gaugler, R. and Kaya, H.K. (1990) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press. Boca Raton. Florida.
- \_\_\_\_\_. (1993) Ecological genetic of entomopathogenic nematodes. In *Nematodes and The Biological Control of Insect Pest*. CSIRO. Australia. p.89-95.

- Georgis, R. (1992) Present and future prospect for entomopathogenic nematodes products. *Biocontrol, Science and Technology* 2:83-99.
- Grewal, P.S. and Richardson, P.N. (1993) Effect of application rates of *Steinernema feltiae* on biological control of the mushroom fly *Lycoriella auripila* (Diptera : Sciaridae). *Biocontrol Science and Technol.* 8 : 29-40.
- Griffin, C.T., More, J.F. and Downes, M.J. (1991) Occurrence of insect parasitic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in the Republic of Ireland. *Journal of Nematology* 37 : 92 – 100.
- Griffin and Ehlers, R.U. (2000) Pathogenecity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. *Journal of Invertebrate Pathology* 75: 55-58.
- Heinrich, E.A. (2007). Maize insect Pest in North America. Department of Entomology. University of Nebraska Lincoln. Nebraska.
- Jarosz, J. (1996) Do antibiotic compound produced *in vitro* by *Xenorhabdus nematophilus* minimize the secondary invasion of insect carcasses by contaminating bacteria. *Nematologica* 42 : 367-377.
- Kaya, H.K. and Stock, S.P. (1997) *Manual of Technique in Insect Pathology*. p. 21 - 27.
- Levine, E. and Sadeghi, H.O. (1992) Field evaluation of *S. carpocapsae* against black cutworm larvae in field corn. *Journal of Entomology Science* 27 : 427 - 435.
- Mason, J.M. and Wright, D.J. 1997. The recovery of entomopathogenic nematodes from selected areas. *Journal of Helminthology* 70. 303-307.
- Natawigena, H. 1990. Dasar Perlindungan Tanaman. Penebar Swadaya. Jakarta.

- Poinar, G.O. (1990) Taxonomy and biology of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. *Entomopathogenic Nematodes in biological Control of Insect*. CRC Press. Boca Raton. Florida. P. 23-60.
- Simoës, N. and Rosa, J.S. (1996) Pathogenecity and host specificity of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology* 6 : 403-412.
- Smits, P.H., Wieggers, G.L. and Vlug, H.J. (1994). *Selection of Insect Parasitic Nematodes for Biological Control of the Garden Chafer **Phyllopertha horticola***. Entomol. Exp. Appl. 70 : 77 – 82. Kluwer Academic Publisher. Belgia.
- Stock, P. (1993) *Description of Argentinian Strain of Steinernema sp. (Nematoda : Steinernematidae)*. Nematol. Medit. Buenos Aires. Argentina. 21 : 279 – 283.
- Sulistiyanto, D. (1999) Nematoda Entomopatogen, *Steinernema* spp. dan *Heterorhabditis* spp. Isolat Lokal sebagai Pengendali Hayati Serangga Hama Perkebunan. *Makalah Lustrum Universitas Jember, 2 Desember 1999*. Jember. 12 hal.
- Surrey, M.R., and Wharton, D.A. (1995). Desiccation survival of the infective larvae of the insect parasitic nematodes, *Heterorhabditis zealandiaca* Poinar. *Int. Journal of Parasitology* 25: 749-752.
- Weiser, J. (1991) *Biological Control of Vectors Manual for Collecting, Field Determination and Handling of Biofactors for Control Vectors*. John Willey and Sons. Chichester. England.
- Woodring, J.L. and Kaya. (1988) Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. A Handbook of Technique. Arkansas Agric.Expt. Stst. Fayatville. Arkansas.30 p.

## Lampiran 1

### KOMPOSISI MEDIA

#### I. Media Yeast Salt (YS)

NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- 0,5 gram
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- 0,5 gram
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	- 0,2 gram
NaCl	- 5 gram
Yeast Extract	- 5 gram
H <sub>2</sub> O	- 1000 ml

#### II. Media Bedding (Spon)

Nutrient Broth	- 7,04 gram
Yeast Extract	- 2,56 gram
Tepung Kedele	- 115,2 gram
Minyak Jagung	- 93 gram
Aquadest	- 432 ml
Spon	- 36 gram

#### III. Media NA-NR

Nutrient Agar	- 23 gram
Neutral Red	- 0,03 gram
Aquadest	- 1000 ml