

Produksi Massal dan Formulasi Nematoda Patogen Serangga (NPS) *Steinernema* dan *Heterorhabditis* untuk Pengendalian Penggerek Batang Padi

Chaerani, J. Harjosudarmo, M.A. Suhendar, dan D. Koswanudin

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRAK

Nematoda patogen serangga (NPS) dari genera *Steinernema* dan *Heterorhabditis* merupakan agen hayati yang efektif terhadap penggerek batang padi dan serangga hama dari ordo lain, namun pemanfaatannya secara luas masih terhambat oleh upaya perbanyakannya secara massal dan teknik formulasi penyimpanannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui media cair yang efisien untuk perbanyakannya massal NPS tersebut dan mencari formulasi media yang dapat mempertahankan viabilitas dan efektifitas dalam penyimpanan jangka panjang. Media cair yang mengandung 1% yeast extract, 2,5% telur ayam, 2,5% tepung kedelai, dan 1% minyak kedelai menghasilkan *Heterorhabditis indicus* PLR2 tertinggi (93.934 J3/ml media). Efektifitas *H. indicus* PLR2 produk semua jenis media cair terhadap larva uji *Tenebrio molitor* sangat rendah (0-13,3%) dibandingkan dengan nematoda yang diproduksi secara *in vivo* (86,7%) disebabkan oleh teknik pemanenan yang tidak optimal. Enam dari tujuh media cair yang diuji tidak berbeda nyata dalam memproduksi *Steinernema* T96 dengan hasil antara 50.617-60.917 J3/ml media, tetapi media yang mengandung 1% yeast extract, 2,5% telur ayam, 2,5% tepung kedelai, dan 1% minyak kedelai menghasilkan nematoda dengan efektifitas tertinggi (89%) terhadap larva *T. molitor*. Formulasi alginat dan spons pada tiga bulan setelah penyimpanan pada suhu 10°C dapat mempertahankan viabilitas *H. indicus* PLR2 masing-masing sebesar 61,1% dan 52,1%. Efektifitas *H. indicus* PLR2 yang diformulasi dalam alginat terhadap larva uji *T. molitor* (78,3%) tidak berbeda nyata dengan nematoda segar yang tidak diformulasi (97,5%), sedangkan yang diformulasi dalam spons mengalami penurunan efektifitas hingga 61,7%. Viabilitas *Steinernema* T96 tertinggi (40,0%) diperoleh pada formulasi spons namun efektifitasnya terhadap larva *T. molitor* berkurang 1,6 kali (33,4%) dibandingkan dengan nematoda segar dan tidak diformulasi (54,2%). Penelitian lanjutan yang diperlukan untuk menaikkan produksi massal NPS adalah mencari kombinasi tingkat inokulum bakteri simbiosis dan nematoda yang optimal, mengetahui kondisi optimum untuk produksi massal dalam fermentor mini bervolume 500-1000 ml, dan memperbaiki teknik pemanenan.

Kata kunci: Nematoda patogen serangga, *Steinernema*, *Heterorhabditis*

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPN) belonging to the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* are effective biocontrol agents for rice stem borers and other insect pests. However, the wide use of EPN is still hampered by inefficient mass production and formulation techniques. The objectives of this study were to search suitable liquid media for mass production of EPN and to obtain formulation technique that able to retain EPN viability and effectiveness after long term storage. Media consisting of 1% yeast extract, 2.5% chicken eggs, 2.5% soyflour, and 1% soyoil produced the highest level of *Heterorhabditis indicus* PLR2 up to 93,934 infective juveniles/ml media under static culture condition in petri dishes. The

effectiveness of *H. indicus* PLR2 produced from all tested media were low (0-13.3%) against *Tenebrio molitor* larvae compared to the effectiveness of nematode produced *in vivo* (86.7%) due to inefficient harvest technique. Six out of seven tested media yielded a similar level number of *Steinernema* T96 (50,617-60,917 infective juveniles of J3/ml media). However, the highest effectiveness up to 89% against *T. molitor* larva was obtained from *Steinernema* T96 produced in media consisting of 1% yeast extract, 2.5% chicken egg, 2.5% soyflour, and 1% soyoil. Alginate and sponge formulations were able to maintain *H. indicus* PLR2 viability up to 61.1% and 52.1%, respectively, after three month storage at 10°C. The effectiveness of *H. indicus* PLR2 formulated in alginate to *T. molitor* was 78.3%, which was not significantly different to the effectiveness of fresh- and non-formulated-nematodes (97.5%), whereas those formulated in sponge had lower effectiveness (61.7%). The highest viability rate of *Steinernema* T96 up to 40.0% was obtained from sponge formulation but its effectiveness to *T. molitor* decreased to 33.4% compared to the effectiveness of fresh- and non-formulated-nematodes (54.2%). Further improvements on liquid mass production technique are necessary, i.e. searching optimum level of bacterial and nematode inocula, studying appropriate level of aeration rate in fermentor, and improving harvest method to prevent loss of nematode activity and infectivity.

Key words: Entomopathogenic nematodes, *Steinernema*, *Heterorhabditis*

PENDAHULUAN

Heterorhabditis dan *Steinernema* adalah genera nematoda yang bersifat patogenik terhadap serangga hama. Stadia infeksiif nematoda, yaitu juvenil instar-3 (JI) membawa bakteri patogenik terhadap serangga *Xenorhabdus* spp. yang berasosiasi dengan *Steinernema* spp. dan *Photorhabdus luminescens* yang berasosiasi dengan *Heterorhabditis* spp. JI mempunyai mobilitas tinggi dan aktif mencari mangsa, memiliki virulensi tinggi, berkisaran inang luas, mudah diaplikasikan, dan kompatibel dengan beberapa jenis pestisida kimiawi (Gaugler dan Kaya, 1990). Meskipun merupakan organisme yang hidup di dalam tanah, musuh alami ini juga efektif terhadap hama-hama di atas permukaan tanah seperti pemakan daun, penggerek batang, dan pengorok daun (Gaugler dan Kaya, 1990; Fallon *et al.*, 1995; Chaerani dan Waluyo, 1996; Chaerani dan Nurbaeti, 1996; Yulensri, 2001). Sejauh ini belum dilaporkan resistensi serangga terhadap nematoda patogen serangga (NPS) dan dampak negatif terhadap jasad bukan sasaran seperti mamalia dan Vertebrata (Gaugler dan Kaya, 1990). Berbagai keuntungan ini membuat NPS prospektif dikembangkan sebagai insektisida biologi untuk penggerek batang padi, terutama penggerek batang padi putih dan kuning yang hingga saat ini merupakan hama yang selalu muncul setiap tahun dan sulit dikendalikan (Reissig *et al.*, 1985; Rauf *et al.*, 1992; Suharto, 1992). Timbulnya resistensi penggerek batang padi putih terhadap insektisida kimiawi (Soejitno *et al.*, 1994), daerah serangan hama yang meluas, dan kehilangan hasil yang besar hingga puso (Direktorat Bina Perlindungan Tanaman, 1996) semakin mendorong pemanfaatan NPS untuk pengendalian penggerek batang padi yang aman dan efektif.

Hambatan utama pemanfaatan NPS di lapang adalah diperlukan dalam jumlah banyak. Untuk mencapai mortalitas penggerek batang padi 74-86% dibutuhkan $2,5 \times 10^{10}$ ekor nematoda/ha (Fallon *et al.*, 1995; Chaerani dan Nurbaeti, 1996), untuk menghasilkan mortalitas hama lanas ubi jalar 66% diperlukan sedikitnya $2,4 \times 10^9$ ekor nematoda/ha (Chaerani dan Waluyo, 1996), dan untuk menghasilkan mortalitas pengorok daun krisan 70% diperlukan 5×10^8 ekor nematoda/ha (Yulensri, 2001). Sementara itu, teknik pembiakan yang telah dilakukan pada media buatan semi padat dalam matriks spons tidak efisien untuk skala besar karena peningkatan kapasitas produksinya berbanding lurus dengan ruang, waktu, dan tenaga kerja (Chaerani *et al.*, 1995). Teknik pemanenannya kurang efisien karena masih banyak nematoda yang terperangkap di dalam spons. Peningkatan skala produksi (*scaling-up*) memerlukan teknik fermentasi cair dalam bioreaktor, namun masih perlu di-ketahui terlebih dahulu media cair yang cocok untuk reproduksi NPS.

NPS tidak mempunyai struktur istirahat, sehingga masa simpannya relatif pendek. Hal ini berdampak tidak kompetitif dengan insektisida kimiawi (Georgis, 1992). Oleh karena itu, diperlukan teknik formulasi untuk mempertahankan viabilitas dan infektifitas NPS dalam penyimpanan jangka panjang, sekaligus mempermudah transportasi dan aplikasi. Imobilisasi NPS dalam substrat formulasi yang lembab dan penyimpanan pada suhu rendah dapat menghambat laju metabolisme, sehingga berhasil mempertahankan viabilitas dan infektifitas NPS selama 6 bulan hingga setahun (Gaugler dan Kaya, 1990; Georgis, 1992).

Agar potensi NPS sebagai pengendali hayati serangga hama efektif dapat diwujudkan secara penuh, maka penelitian teknik pembiakan massal pada media buatan dan teknik formulasinya perlu segera dilakukan. Tujuan jangka pendek dari penelitian ini adalah untuk memperoleh jenis media cair yang cocok untuk produksi massal NPS lokal dan bahan formulasi yang dapat mempertahankan viabilitas dan infektifitas NPS dalam penyimpanan. Dalam jangka panjang teknik yang telah dikembangkan akan ditawarkan kepada pihak swasta, sehingga NPS dapat diproduksi secara massal sebagai bioinsektisida. Sasaran akhirnya adalah pemanfaatan NPS secara luas untuk mengurangi penggunaan insektisida kimiawi.

BAHAN DAN METODE

Pengaruh Jenis Media Cair terhadap Produksi NPS

Bakteri fase primer yang bersimbiosis dengan *Steinernema* T96 dan *H. indicus* PLR2 dibiakkan pada media NB (5 g pepton, 3 g *beef extract*, dan 1 l akuades) selama 48 jam di atas *orbital shaker* berkecepatan 170 rpm pada suhu kamar. Inokulum bakteri diperoleh dengan cara mensentrifugasi biakan pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Pelet yang terjadi diresuspensi dalam NaCl 0,5% kemudian dihitung konsentrasinya.

Inokulum NPS diperbanyak pada larva *T. molitor* menggunakan metode infeksi kertas saring (Woodring dan Kaya, 1988). Wadah pembiakan NPS (cawan petri berdiameter 9 atau 15 cm) diberi alas dua lapis kertas saring Whatman #93 kemudian ditetesi dengan suspensi mengandung 100-200 JI/ml air secara merata ke atas kertas saring dengan volume sesuai ukuran wadah pembiakan, berturut-turut 1,4 dan 4 ml. Sesuai besarnya wadah pembiakan, sebanyak 30 ekor atau 10 g larva *T. molitor* diaplikasikan kedalamnya. Larva terinfeksi NPS dipindahkan ke alat perangkap JI setelah 5-7 hari. JI dipanen mulai hari ke-12 hingga ke-20 setelah inokulasi dan disimpan dalam air dalam cawan petri pada suhu 10°C sebelum dipergunakan.

Tujuh macam media cair yang diuji efektifitasnya untuk perbanyakan NPS (Tabel 1) dituang ke dalam cawan petri sebanyak 7-8 ml. Media diinokulasi dengan 0,1 ml NaCl 0,5% yang mengandung $6,1 \times 10^9$ - $1,5 \times 10^{12}$ sel/ml bakteri simbiosis fase primer. Setelah 48 jam inkubasi dalam keadaan gelap media diinokulasi dengan 0,5 ml akuades steril berisi 5000 JI berumur 1-7 hari simpan yang telah disterilisasi permukaan dengan Hyamine® 0,4% selama 15 menit dan dibilas tiga kali dengan akuades steril (Woodring dan Kaya, 1988).

Produksi J3 diamati pada 3 minggu setelah inokulasi nematoda dari 0,2 ml sampel media/cawan petri. Pemanenan J3 dilakukan dengan cara penyaringan berseri menggunakan saringan berlubang 150, 250, dan 500 mesh, dilanjutkan dengan proses sedimentasi-dekantasi 4-6 kali hingga didapatkan suspensi J3 yang jernih. Efektifitas produk J3 dari tiap media diuji terhadap larva *T. molitor* dengan metode *assay* pada pasir. Lima ekor larva *T. molitor* diletakkan pada dasar botol selai bekas bervolume 300 ml kemudian ditimbun pasir yang telah dilembabkan dengan 7% air (v/v). Lima ribu J3 diaplikasikan dalam 1 ml air pada permukaan pasir. Botol ditutup

Tabel 1. Komposisi media cair untuk produksi nematoda patogen serangga *Steinernema* dan *Heterorhabditis*

Media*	Komposisi	Sumber
A	35% usus ayam, 10% lemak sapi, 55% akuades, 40% usus ayam, 60% akuades	Bedding (1981; 1984, dimodifikasi)
B	4% telur ayam, 1% lemak sapi, 90% akuades, 1% yeast extract, 1% pepton, 3% tepung kedelai	Han <i>et al.</i> (1993)
C	1% minyak kedelai, 88% akuades, 1% yeast extract, 10% usus ayam	Lunau <i>et al.</i> (1993)
D	5% tepung kedelai, 92,6% akuades, 0,4% yeast extract, 1% nutrient broth, 1% minyak kedelai	Wouts (1981)
E	2,5% telur ayam, 93% akuades, 1% yeast extract, 2,5% tepung kedelai, 1% minyak kedelai	-
F	01,25% telur ayam, 0,23% NaCl, 90,47% akuades, 5% yeast extract, 4% minyak kedelai, 3,55% susu bubuk	Surrey dan Davies (1996)
G	3% minyak kedelai, 91% akuades, 2,5% yeast extract, 3,5% usus ayam	-

*Media diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit

rapat dan diinkubasikan dalam keadaan gelap selama 5 hari. Sebagai pembandingnya adalah efektifitas JI hasil perbanyakan pada larva *T. molitor*.

Pembuatan Formulasi NPS

JI yang akan diformulasi diproduksi secara massal dengan dua cara, yaitu *Steinernema* T96 diperbanyak pada media buatan pada matriks spons *polyurethane* (Bedding, 1981; 1984) sedangkan *H. indicus* PLR2 diperbanyak pada larva *T. molitor* dengan metode infeksi kertas saring (Chaerani, 1996). Komposisi media buatan untuk perbanyakan massal *Steinernema* T96 terdiri dari 80% usus ayam, 20% air (v/v) yang kemudian diserapkan ke dalam spons berukuran 1 cm³ dengan perbandingan 12,5 : 1 (b/v). Dua puluh lima sampai 30 g media dimasukkan ke dalam botol selai bekas volume 300 ml kemudian diautoklaf selama 60 menit. Media diinokulasi dengan 5 ml biakan bakteri simbiosis T96 fase primer (*Xenorhabdus* sp.) berumur 48 jam dalam NB. Setelah 48 jam inkubasi dalam keadaan gelap media diinokulasi dengan 1 ml air mengandung 1000 JI *Steinernema* T96 yang telah di-sterilisasi permukaan dengan Hyamine 0,4% (Woodring dan Kaya, 1988). Nematoda dipanen 2-3 minggu kemudian, dengan cara merendam matriks spons dalam air selama 24-48 jam. Endapan nematoda disaring secara berseri menggunakan saringan berlubang 150, 250, dan 500 mesh, dilanjutkan dengan proses sedimentasi-dekantasi 6-8 kali atau hingga diperoleh nematoda yang bersih dari media. Untuk perbanyakan inokulum *H. indicus* PLR2, 12 ml air mengandung 100-200 JI/ml disebarkan merata ke atas dua lapis kertas saring Whatman #93 yang mengalasi kotak plastik berukuran 20 cm x 25 cm x 5 cm (lebar x panjang x tinggi). Larva *T. molitor* sebanyak 50 g dimasukkan ke dalamnya. Kotak ditutup rapat dan diinkubasi dalam gelap selama 5-7 hari. Larva yang terinfeksi dimasukkan ke dalam perangkap khusus. JI dipanen setiap hari mulai hari ke-12 sampai ke-20 setelah inokulasi, kemudian dicuci dengan proses sedimentasi-dekantasi 2-3 kali.

Nematoda diformulasi dalam enam macam bahan pembawa dengan perbandingan bahan formulasi, JI, dan air (Tabel 2).

Formulasi nematoda menggunakan empat macam jenis tepung (kaolin,

Tabel 2. Formulasi nematoda patogen serangga

Formulasi	<i>Steinernema</i> T96			<i>H. indicus</i> PLR2		
	Berat bahan formulasi (g)	Volume air (ml)	Konsentrasi (JI/ml)	Berat bahan formulasi (g)	Volume air (ml)	Konsentrasi (JI/ml)
Kaolin	335	189	12.059	364	188	57.739
Tapioka	400	260	12.059	348	213	50.962
Kaolin + tapioka	386	230	13.631	387	196	55.383
Arang halus	286	350	12.059	286	350	31.014
Alginat	8,65	433	12.059	8,65	433	25.089
Spons <i>polyurethane</i>	16	160	24.117	13	130	83.500

ta-pioka, kaolin + tapioka, dan arang) dibuat secara manual dengan cara mencampurkan suspensi nematoda ke dalam bahan pembawa dan mengaduknya dengan tangan hingga didapatkan adonan yang kohesif dan dapat dibentuk granul berdiameter 0,5-0,8 cm. Granul dikeringanginkan selama 30-60 menit di atas kertas HVS.

Formulasi nematoda dalam gel alginat dibuat dengan cara meneteskan campuran *sodium alginate* dan nematoda, yang secara kontinu diaduk dengan *magnetic stirrer*, melalui pipet berlubang 2 mm ke dalam larutan penggumpal (1,47 g CaCl₂ per 100 ml air). Kapsul yang terbentuk dibiarkan di dalam larutan penggumpal selama 30 menit kemudian disaring dan dicuci dengan air keran mengalir.

Untuk memformulasi NPS dalam spons, suspensi JI dituangkan ke dalam potongan spons kering berukuran 1 cm³. Dengan bantuan pinset suspensi JI diserapkan dan diperas dalam gelas beker berulang kali hingga suspensi JI terserap merata ke dalam spons.

Masing-masing formulasi dikemas dalam kantung plastik berkelim, berisi 15-20 g formulasi tepung, 5 g formulasi alginat atau 2 g formulasi spons. Formulasi disimpan dalam inkubator bersuhu 10°C selama tiga bulan.

Setiap bulan dilakukan pengamatan viabilitas dan infektifitas nematoda patogen serangga. Jumlah JI yang hidup diamati dari 1 g formulasi spons dan 2 g formulasi tepung yang direndam dan dilarutkan dalam air keran dan 2 g formulasi alginat yang dilarutkan dalam Na₃C₆H₅O₇ 0,4% (Georgis, 1992). Infektifitas JI diuji terhadap larva *T. molitor* dengan metode kertas saring pada cawan petri berdiameter 9 cm dengan dosis 100 JI/larva, dibandingkan dengan JI yang tidak diformulasi berumur 1-7 hari simpan hasil perbanyakan pada larva *T. molitor*.

Kedua penelitian menggunakan rancangan percobaan acak kelompok. Perlakuan media cair diulang sebanyak 6-12 kali, sedangkan perlakuan formulasi 4 kali. Nilai tengah perlakuan dibandingkan berdasarkan Uji Beda Nyata Duncan (UBD) pada taraf P = 0,05.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi NPS pada Media Cair

Produksi *H. indicus* PLR2 tertinggi hingga 93.934 J3/ml media terdapat pada media E yang mengandung 1% *yeast extract*, 2,5% telur ayam, 2,5% tepung kedelai, dan 1% minyak kedelai. Produksi terendah (17.943 J3/ml media) terdapat pada media G yang terdiri dari 2,5% *yeast extract*, 3,5% usus ayam, 3% minyak kedelai, dan 91% akuades (Tabel 3). Media F yang merupakan media pembiakan massal nematoda subtropik *H. bacteriophora* pada fermentor 500 l (Surrey dan Davies, 1996) ternyata tidak dapat meningkatkan produksi *H. indicus* tropik, tingkat produksi J3 pada media ini setara dengan tingkat produksi pada media G.

Tabel 3. Produksi *H. indicus* PLR2 dan *Steinernema* T96 3 minggu setelah inkubasi pada tujuh media buatan cair dan efektifitasnya terhadap larva *T. molitor*

Media	<i>H. indicus</i> PLR2		<i>Steinernema</i> T96	
	J3/ml*	Mortalitas larva <i>T. molitor</i> (%)**	J3/ml***	Mortalitas larva <i>T. molitor</i> (%)**
A	27.213 ^{bc}	0 ^c	60.917 ^a	73,3 ^{ab}
B	18.603 ^c	0 ^c	59.611 ^a	70,0 ^{ab}
C	79.297 ^{ab}	0 ^c	36.066 ^a	79,3 ^{ab}
D	28.298 ^{bc}	13,3 ^b	57.259 ^a	83,3 ^a
E	93.934 ^a	6,7 ^b	50.617 ^a	89,3 ^a
F	18.465 ^c	0 ^c	16.528 ^b	40,0 ^c
G	17.943 ^c	0 ^c	55.144 ^a	80,0 ^{ab}
<i>In vivo</i>	-	86,7 ^a	-	54,3 ^{bc}

*Rata-rata dari 12 ulangan, hasil transformasi $\sqrt{(X + 1)}$; **rata-rata dari 4 ulangan, diuji pada pasir lembab (7%, v/v) dalam botol selai dengan dosis 1000 JI/larva *T. molitor* (n = 5 ekor); ***rata-rata dari 6 ulangan, hasil transformasi \sqrt{X}

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut Uji Beda Nyata Duncan

Uji efektifitas produk *H. indicus* terhadap larva *T. molitor* dengan metode *assay* pada pasir menunjukkan hasil yang tidak memuaskan, di mana persentase serangga terinfeksi hanya 0-13,3%, sementara JI produk perbanyak secara *in vivo* pada larva *T. molitor* mencapai 86,7% (Tabel 3). Pengujian efektifitas pada kertas saring dalam cawan petri juga mendapatkan hasil serupa (data tidak diperlihatkan). Metode pengujian efektifitas pada kertas saring memberikan kondisi infeksi yang ideal, karena kelembaban yang tinggi dan lingkungan yang terkurung di dalam cawan petri sehingga tidak ada hambatan bagi nematoda untuk menemukan sasaran. Oleh karena itu, penyebab tidak efektifnya *H. indicus* diduga bukan disebabkan oleh hilangnya infektifitas nematoda akibat perlakuan media cair namun dapat disebabkan oleh teknik pemanenannya. Pada proses pemanenan secara sedimentasi-dekantasi nematoda sering dibiarkan terendam dalam suspensi yang keruh dalam waktu cukup lama. Pada kondisi ini difusi oksigen ke dalam suspensi rendah sehingga dapat menurunkan aktivitas nematoda.

Media A menghasilkan J3 *Steinernema* T96 terbanyak (60.917 J3/ml media) diikuti oleh media B, D, G, E, dan C, namun secara statistik tidak berbeda nyata satu sama lain (Tabel 3). Produksi terendah terdapat pada media F, hanya 16.528 J3/ml media. Efektifitas *Steinernema* T96 produk media E dan D terhadap larva *T. molitor* merupakan yang tertinggi, berturut-turut 89,3 dan 83,3%, jauh lebih tinggi dibandingkan dengan efektifitas *Steinernema* T96 produk *in vivo* pada larva *T. molitor* (Tabel 3).

Berbagai media buatan yang telah dirancang untuk pembiakan massal NPS pada dasarnya mengandung bahan-bahan untuk pertumbuhan bakteri simbiosis NPS. Makromolekul yang telah diurai oleh bakteri dapat diserap langsung oleh nematoda pasangannya untuk perkembangannya. Media yang hanya mengandung protein tinggi dari hewan mengandung semua unsur yang

diperlukan oleh pertumbuhan bakteri dan lebih murah biayanya. Akan tetapi media ini menimbulkan bau menyengat selama masa pembiakan. Hal ini akan tidak menguntungkan untuk pembiakan massal pada skala fermentor yang dapat berlangsung hingga 45 hari (Surrey dan Davies, 1996). Media yang mengandung bahan-bahan yang telah di-pabrikasi kurang menimbulkan bau menyengat, lebih mudah penyiapannya, dan kandungannya dalam media produksi bisa diatur, namun lebih mahal. Biaya produksi massal *H. indicus* pada media E yang merupakan media terbaik untuk nematoda ini adalah Rp 230 per satu juta ekor, empat kali lebih mahal biaya produksinya dibandingkan dengan media A yang mengandung usus ayam dan lemak sapi. Sementara itu, biaya produksi *Steinernema* yang terendah juga terdapat pada media A, Rp 26 per satu juta nematoda. Dengan pertimbangan kurang menimbulkan bau dan efektifitas produk nematoda yang tinggi terhadap serangga, perbanyakkan massal *Steinernema* T96 sebaiknya dilakukan pada media E atau D. Biaya produksi per satu juta ekor nematoda pada kedua media ini berturut-turut Rp 428 dan Rp 473.

Penelitian lanjutan yang diperlukan untuk mengoptimalkan produksi NPS adalah perlu diketahuinya kombinasi tingkat kepadatan inokulum bakteri dan nematoda (Han *et al.*, 1993) dan pengujian sistem fermentor yang sesuai terutama untuk *Heterorhabditis* spp. yang dikenal sulit dibiakkan dalam fermentor (Surrey dan Davies, 1996). Selain itu, teknik pemanenan massal nematoda dari media masih perlu dicari karena akan sangat berpengaruh terhadap viabilitas dan aktivitas JJ. Pada dasarnya tekniknya meliputi penyaringan untuk memisahkan partikel media yang kasar, dilanjutkan dengan sedimentasi dan dekantasi untuk pemisahan dari partikel media yang halus. Tahap akhir pemanenan ini akan sangat menentukan aktivitas produk nematoda sehingga sebaiknya dilakukan dalam waktu singkat dengan cara sentrifugasi berkapasitas besar. Surrey dan Davies (1996) merancang teknik sentrifugasi massal berkapasitas 4 x 5 liter yang sangat menghemat waktu sehingga tidak membiarkan nematoda terlalu lama berada didalam suspensi media.

Viabilitas NPS dalam Formulasi

Tiga bulan setelah penyimpanan *H. indicus* PLR2 yang hidup dalam formulasi berkisar antara 4,0-61,1% dengan viabilitas tertinggi pada formulasi alginat dan spons *polyurethane* (Tabel 4). Formulasi alginat selain dapat mempertahankan viabilitas hingga 61,1% ternyata juga dapat menstabilkan efektifitas *H. indicus* terhadap larva *T. molitor* sebesar 78,3%, yang setara dengan JI segar yang tidak diformulasi (97,5%) (Tabel 4). Penurunan viabilitas hingga 52,1% pada formulasi spons juga diiringi dengan penurunan efektifitas sebesar 61,7%. Sementara itu *H. indicus* yang diformulasi dalam kaolin meskipun mengalami penurunan viabilitas yang nyata (18,6%), ternyata masih dapat mempertahankan virulensinya hingga 80,8%. Pada formulasi tapioka, kaolin + tapioka, dan arang sisa *H. indicus* yang masih hidup tidak mampu menginfeksi *T. molitor*.

Dibandingkan dengan *H. indicus*, viabilitas *Steinernema* T96 dalam formulasi menurun dengan cepat, hanya yang diformulasi dalam spons yang menunjukkan persentase JI hidup sebanyak 40,0%, sementara pada formulasi lain kurang dari 20% (Tabel 4). Meskipun masih hidup dengan persentase cukup tinggi, ternyata *Steinernema* T96 yang diformulasi dalam spons menjadi tidak aktif, terlihat dari rendahnya efektifitas JI terhadap larva *T. molitor* sebesar 33,4%, setara dengan efektifitas JI yang diformulasi dalam alginat (26,7%).

Penurunan viabilitas *Steinernema* T96 yang cepat dibandingkan dengan *H. indicus* PLR2 dapat disebabkan oleh perbedaan media produksi, di mana *Steinernema* T96 diproduksi secara *in vitro* sedangkan *H. indicus* secara *in vivo*. Nematoda yang diproduksi secara *in vitro* mengalami penurunan jumlah cadangan makanan berupa asam lemak yang diperlukan untuk ketahanan hidup, aktivitas, dan infektivitas dibandingkan dengan yang diproduksi secara *in vivo* (Patel dan Wright, 1996; Selvan *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1997).

Tabel 4. Viabilitas dan efektifitas *H. indicus* PLR2 dan *Steinernema* T96 3 bulan setelah penyimpanan dalam formulasi pada suhu 10°C

Formulasi	<i>H. indicus</i> PLR2		<i>Steinernema</i> T96	
	Persentase JI hidup/g formulasi*	Efektifitas terhadap larva <i>T. molitor</i> (%)**	Persentase JI hidup/g formulasi*	Efektifitas terhadap larva <i>T. molitor</i> (%)**
Kaolin	18,6 ^c	80,8 ^a	0 ^c	-
Tapioka	24,4 ^{bc}	-	0 ^c	-
Kaolin + tapioka	4,0 ^c	-	0 ^c	-
Arang	5,9 ^c	-	19,5 ^b	-
Alginat	61,1 ^a	78,3 ^a	14,3 ^b	26,7 ^b
Spons <i>polyurethane</i>	52,1 ^{ab}	61,7 ^b	40,0 ^a	33,4 ^b
Non-formulasi	-	97,5 ^a	-	54,2 ^a

*Rata-rata dari empat ulangan, hasil transformasi arcsin \sqrt{X} ; **rata-rata dari empat ulangan, diuji terhadap 30 ekor larva *T. molitor* pada kertas saring dengan dosis 100 JI/larva

Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut Uji Beda Nyata Duncan

Dari keenam formulasi, spons merupakan bahan yang terbaik untuk mempertahankan viabilitas kedua NPS. Teknik penyimpanannya sederhana, di mana nematoda terperangkap dalam pori-pori spons yang menyediakan cukup udara bagi nematoda (Bedding, 1984). Formulasi arang dan kaolin berkurang kelembabannya seiring dengan lamanya waktu simpan sehingga dapat menyebabkan nematoda terdehidrasi. Tapioka tidak cocok untuk bahan formulasi karena berjamur dalam masa penyimpanan. Kelemahan formulasi spons adalah tidak praktis bila nematoda akan diaplikasikan secara penyemprotan untuk pengendalian penggerek batang padi dan hama di atas permukaan tanah. Spons harus direndam terlebih dahulu dalam air beberapa waktu lamanya, namun nematoda yang dapat dikeluarkan dari spons (*recovery rate*) tidak sampai 80%. Hal ini dapat menyebabkan berkurangnya dosis aplikasi efektif. Untuk aplikasi semprot formulasi alginat merupakan cara yang paling praktis dalam hal pengemasan, transportasi, dan aplikasi (tidak menyumbat nosel alat semprot) namun biayanya tinggi. Bahan formulasi pembentuk *jelly* seperti poliakrilimid dan gelatin perlu dicoba. Kedua polimer ini tidak berpengaruh negatif terhadap nematoda, dan bisa diurai oleh mikroba sehingga ramah lingkungan. Bila akan disemprotkan, bahan-bahan ini dilarutkan dalam air tanpa pelarut khusus seperti halnya alginat (Georgis, 1992). Pengembangan formulasi NPS perlu dilanjutkan agar produk bioinsektisidanya dapat diterima secara komersial.

KESIMPULAN DAN SARAN

Media cair terbaik untuk produksi *H. indicus* PLR2 adalah media yang mengandung 1% *yeast extract*, 2,5% telur ayam, 2,5% tepung kedelai, dan 1% minyak kedelai. *H. indicus* PLR2 dapat diformulasi dalam alginat dan spons dengan tingkat viabilitas berturut-turut sebesar 61,1 dan 52,1% dan efektifitas cukup tinggi terhadap larva *T. molitor* berturut-turut sebesar 78,3 dan 61,7% setelah disimpan selama tiga bulan pada suhu 10°C. *Steinernema* T96 dapat diproduksi pada enam jenis media cair dengan hasil antara 50,617-60,917 J3/ml media, namun efektifitas nematoda tertinggi terhadap larva *T. molitor* didapatkan dari media mengandung 1% *yeast extract*, 2,5% telur ayam, 2,5% tepung kedelai, dan 1% minyak kedelai. Viabilitas *Steinernema* T96 tertinggi (40,0%) diperoleh pada formulasi spons namun efektifitasnya terhadap larva berkurang 1,6 kali (33,4%) dibandingkan dengan nematoda segar dan tidak diformulasi (54,2%).

Perlu perbaikan teknik produksi massal dengan mencari kombinasi tingkat inokulum bakteri simbiosis dan nematoda yang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Bedding, R.A. 1981.** Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* 27:109-114.
- Bedding, R.A. 1984.** Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Ann. Appl. Biol.* 104:117-120.
- Chaerani. 1996.** Perbanyakakan *Heterorhabditis indicus* (Rhabditida: Heterorhabditidae) pada larva *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). Makalah disampaikan pada Kongres Nasional II dan Seminar Ilmiah PERNEMI. Jember, 23-24 Juli 1996. 10 hlm.
- Chaerani dan B. Nurbaeti. 1996.** Kajian pemanfaatan nematoda patogen serangga (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) sebagai pengendali hayati penggerek batang padi kuning *Scirpophaga incertulas* Wlk. (Lepidoptera: Pyralidae). Makalah disampaikan dalam Kongres Nasional II dan Seminar Ilmiah PERNEMI. Jember, 23-24 Juli 1996. 13 hlm.
- Chaerani, M.M. Finnegan, C. Griffin, dan M.J. Downes. 1995.** Pembiakan massal nematoda patogen serangga *Steinernema* dan *Heterorhabditis* isolat Indonesia secara *in vitro* untuk pengendalian hama penggerek batang padi secara hayati. *Prosiding Pekan IPTEK 1995, PUSPIPTEK Serpong. Buku 2:133-138.*
- Chaerani dan Waluyo. 1996.** Potensi nematoda patogen serangga *Steinernema* dan *Heterorhabditis* (Rhabditida: Steinernematidae dan Heterorhabditidae) sebagai pengendali hayati hama lanas ubi jalar *Cylas formicarius* F. (Coleoptera: Apionidae). Makalah disampaikan pada Seminar Nasional Pengendalian Hayati. Yogyakarta, 25-26 September 1996. 12 hlm.
- Direktorat Bina Perlindungan Tanaman. 1996.** Evaluasi serangan organisme pengganggu utama padi selama 5 tahun (1991-1995) berdasarkan laporan pengamat hama. *Direktorat Jenderal Pertanian Tanaman Pangan.* 84 hlm.
- Fallon, D, C. Griffin, Chaerani, and M. Downes. 1995.** Field control potentials of Indonesian nematode strains of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae* against rice stem borers. Paper presented to the Workshop on Sustainable Insect Pest Management in Tropical Rice. Cisarua, Indonesia, December 5-7, 1995. 27 p.
- Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990.** Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press. Boca Raton, Ann Arbor, Boston. 365 p.

- Georgis, R. 1992.** The role of biotechnology companies in commercialization of entomopathogenic nematodes. *In* Gommers, F.J. and P.W.Th. Maas (Eds.). Nematology from Molecule to Ecosystem. Proceedings of Second International Nematology Congress 11-17 August 1990, Veldhoven, the Netherlands. European Society of Nematologists, Inc. Inwergrowie, Dundee, Scotland. p. 294-306.
- Han, R., L. Cao, and X. Liu. 1993.** Effects of inoculum size, temperature, and time on *in vitro* production of *Steinernema carpocapsae* Agriotos. *Nematologica* 39:366-375.
- Lunau, S., S. Stoessel, A.J. Schmidt-Peisker, and R.-U. Ehlers. 1993.** Establishment of monoxenic inocula for scaling up *in vitro* cultures of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Nematologica* 39:385-399.
- Patel, M.N. and D.J. Wright. 1996.** Glycogen: Its importance in the infectivity of aged juveniles of *Steinernema carpocapsae*. *Parasitology* 114:591-596.
- Rauf, A., I.W. Winasa, R. Anwar, A. Tarigan, dan J. Lestari. 1992.** Kajian beberapa teknik pengendalian penggerek batang padi putih *Scirpophaga innotata* (WLK.) (Lepidoptera: Pyralidae). Makalah Seminar Hasil Penelitian Pendukung Pengendalian Hama Terpadu. Cisarua, 7-8 September 1992. 16 hlm.
- Reissig, W.H., E.A. Heinrichs, J.A. Litsinger, K. Moody, L. Fielder, T.W. Mew, and A.T. Barion. 1985.** Illustrated guide to integrated pest management in rice in Tropical Asia. IRRI, Los Banos, Philippines. 411 p.
- Selvan, S., R. Gaugler, and E. Lewis. 1993.** Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. *J. Parasitol.* 79:167-172.
- Soejitno, J., I.M. Samudra, dan D. Kilin. 1994.** Kajian ketahanan penggerek padi putih, *Scirpophaga innotata* Walker terhadap insektisida karbofuran. *Penelitian Pertanian* 14(2):78-83.
- Suharto, H. 1992.** Pengendalian secara kultur teknis, kimiawi, dan mekanis pada penggerek batang padi putih *Scirpophaga innotata* Wlk. *Dalam* Prosiding Simposium Penerapan Pengendalian Hama Terpadu. Bandung, 3-4 September. Perhimpunan Entomologi Indonesia. hlm. 50-54.
- Surrey, M.R. and R.J. Davies. 1996.** Pilot-scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Invertebr. Pathol.* 67:92-99.
- Woodring, J.L. and H.K. Kaya. 1988.** Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bull. 331, Arkansas Agric. Exp. Stat. Fayetteville, Arkansas. 25 p.

- Wouts, W.M. 1981.** Mass production of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on artificial media. *J. Nematol.* 13:467-469.
- Yang, H., H. Jian, S. Zhang, and G. Zhang. 1997.** Quality of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* produced on different media. *Bio. Control* 10:193-198.
- Yulensri. 2001.** Uji keefektifan nematoda entomopatogen *Heterorhabditis indicus* dan *Steinernema riobravis* terhadap hama pengorok daun *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae). Tesis Magister Sains Institut Pertanian Bogor. 49 hlm.