

PERBANYAKAN MASSAL NEMATODA PATOGENIK SERANGGA *HETERORHABDITIS INDICUS* SECARA IN VIVO

¹Chaerani, ²Christine T. Griffin

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik
Pertanian (BB BIOGEN)

Jln. Tentara Pelajar no 3A, Kampus Pertanian Cimanggu, Bogor 16111

Tel. 0251-8337975, HP 085692852060, Fax. 0251-8338820, e-mail chaeran1@yahoo.com

²National University of Ireland, Maynooth, Co. Kildare, Irelande-mail Christine.griffin@nuim.ie

ABSTRAK

Heterorhabditis indicus adalah salah satu spesies nematoda patogenik yang efektif terhadap berbagai spesies serangga. Metode perbanyakan massal yang sederhana dan efektif telah dikembangkan pada larva ‘ulat Hong Kong’ (*Tenebrio molitor*) menggunakan metode inokulasi kertas saring dalam kotak plastik. Dosis inokulum 50 juvenil infektif (JI)/larva *Tenebrio* memberikan hasil tertinggi ($7,3 \times 10^5$ JI/g larva), yang tidak berbeda nyata dengan yang dihasilkan pada dosis 100 dan 200 JI/larva. Pemanenan JI secara efisien dilakukan menggunakan perangkap White yang dimodifikasi untuk menampung sejumlah besar larva terinfeksi. Periode pemanenan yang terbaik adalah antara 10–26 hari setelah inokulasi (HSI) dengan puncak produksi tertinggi terjadi pada 14 HSI. Teknik perbanyakan massal *H. indicus* secara *in vivo* ini menggunakan sumber daya minimal sehingga cocok diadopsi oleh petani dan diaplikasikan pada pertanian organik.

Kata kunci: pengendalian hayati, nematoda patogenik serangga, perbanyakan massal, *Tenebrio molitor*, modifikasi perangkap White

ABSTRACT

The entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indicus* is an effective biological control agent of various insect pests. Simple and efficient mass propagation technique of the nematode has been developed on *Tenebrio molitor* by using filter paper inoculation method in plastic containers. An inoculum dose of 50 infective juveniles (IJs) per *Tenebrio* larvae gave the highest yield (7.3×10^5 IJs/g larvae), which was not significantly different from those obtained from inoculum dose of 100 or 200 JI/larvae. Efficient harvest of IJs has been made possible by the use of modified White trap which can accommodate a large number of infected larvae. IJs could be collected between 10 to 26 days after inoculation (DAI) with the highest peak production occurred at 14 DAI. The developed *in vivo* mass propagation technique requires minimal inputs and is therefore suitable for adoption by farmers and use in organic farming.

Keywords: biological control, entomopathogenic nematodes, mass propagation, *Tenebrio molitor*, modified White trap

PENDAHULUAN

Nematoda patogenik serangga (NPS) dari famili *Steinernematidae* dan *Heterorhabditidae* mempunyai karakteristik ideal sebagai jasad pengendali hayati serangga hama, yaitu berspektrum luas, dapat menyebabkan kematian serangga dalam waktu hanya 24-48 jam, kompatibel dengan pestisida sintetik, dan dapat diaplikasikan dengan alat semprot standar (Kaya dan Gaugler, 1993). Kemampuan patogeniknya diakibatkan oleh simbiosis mutualistik dengan bakteri patogenik *Enterobacteriaceae* yang tersimpan di dalam saluran pencernaannya (Kaya dan Gaugler, 1993; Burnell dan Stock, 2010). Stadia nematoda yang dapat menginfeksi serangga adalah stadia pradewasa (juvenil) instar-3 (atau biasa disebut juvenil infektif [JI] atau *dauer juvenile*). JI adalah satu-satunya stadia yang mampu hidup bebas diluar tubuh inang, tidak berkembang menjadi instar lanjut dan tidak makan dalam jangka waktu beberapa lama hingga menemukan inang potensial (Kaya dan Gaugler, 1993). JI terbungkus oleh kutikula juvenil instar-2 sehingga tahan terhadap kondisi lingkungan di luar tubuh inang. Setelah menginvasi inang melalui bukaan alami (mulut, spirakel, dan anus) dan kadang-kadang melalui kutikula tipis atau kutikula *intersegment*, JI segera menginjeksikan sel-sel dorman bakteri simbiosis ke dalam tubuh serangga (Shapiro-Ilan *et al.*, 2002). Bakteri berkembang biak di dalam *hemocoel* dan menyebabkan kematian serangga karena keracunan darah, baik akibat *toxaemia* ataupun *septicemia* (Burnell dan Stock, 2000). JI berkembang menjadi juvenil instar-4, dewasa dan berbiak menjadi JI dalam 2-3 minggu yang kemudian keluar ke alam bebas meninggalkan bangkai inang terinfeksi (*cadaver*) sambil membawa sel-sel bakteri simbiosis di dalam saluran pencernaannya (Shapiro-Ilan *et al.*, 2002; Burnell dan Stock, 2000).

Spesies *Heterorhabditis indicus* (Rhabditida: Heterorhabditidae) yang bersimbiosis dengan bakteri *Photobacterium luminescens* subsp. *akhurstii* (Tailliez *et al.*, 2010) berperilaku aktif menjelajah (*cruiser*) di dalam tanah dan habitat tersembunyi (*cryptic habitat*) mencari inang sasaran yang tidak dapat dijangkau oleh pestisida konvensional (Kaya dan Gaugler, 1993). *H. indicus* tersebar luas di daerah tropik termasuk Indonesia (Griffin *et al.* 2000; Chaerani *et al.*, 2007). Penelitian di rumah kaca dan semi lapang menunjukkan bahwa spesies ini memiliki efikasi yang baik terhadap berbagai jenis serangga. Di rumah kaca *H. indicus* dapat menyebabkan mortalitas larva pengorok daun *Liriomyza huidobrensis* sebesar 75% (Yulensri, 2001), hama lanas ubi jalar (*Cylas formicarius*) 43% (Chaerani dan Waluyo 2006); dan penggerek batang padi putih dan kuning (*Scirpophaga* spp.) berturut-turut 74% dan 78% (Chaerani dan Nurbaeti, 2006; 2007). Di lapangan efektivitasnya terhadap kompleks penggerek batang padi (*Scirpophaga* spp., *Chilo* spp., *Sesamia inferens*) dapat mencapai 67% (Fallon, 1998).

Perbanyakan massal NPS yang paling mudah dan murah adalah secara *in vivo* pada serangga, biasanya pada larva *greater wax moth* (*Galleria mellonella*, Lepidoptera: Pyralidae) karena larva ini rentan terhadap hampir semua spesies NPS, menghasilkan JI dalam jumlah besar, dan tersedia secara komersial (Woodring dan Kaya 1988). Larva *Galleria* dapat dibiakkan pada pakan buatan

namun sulit didapatkan dalam jumlah besar dalam waktu singkat sehingga beberapa peneliti menggunakan serangga alternatif. Di Indonesia De Chenon *et al.* (1992), menggunakan larva alternatif seperti *Tirathaba rufivenas*, *Setothosea asigna*, *Hidari irava* dan spesies-spesies Lepidoptera lainnya yang dikumpulkan dari perkebunan kelapa sawit untuk perbanyakan *Steinernema carpocapsae* namun tidak merinci tingkat produksi JI. Shapiro-Ilan *et al.* (2002) melaporkan bahwa larva *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) dapat menghasilkan JI *S. carpocapsae* dan *H. bacteriophora* yang setara jumlahnya dengan yang dihasilkan pada larva *Galleria*.

Pemanfaatan *H. indicus* untuk pengendalian hayati serangga membutuhkan tersedianya JI dalam jumlah besar secara kontinyu sehingga diperlukan larva inang alternatif yang mudah dibiakkan atau diperoleh dari pasar komersial. Penelitian ini bertujuan mengembangkan metode perbanyakan dan pemanenan *H. indicus* yang efisien pada larva serangga inang alternatif. Tahap penelitian terdiri dari pengujian suhu inkubasi, pengujian larva serangga alternatif untuk produksi JI, pengujian wadah infeksi, pencarian dosis inokulum optimum, dan pengamatan pola produksi JI.

METODE PENELITIAN

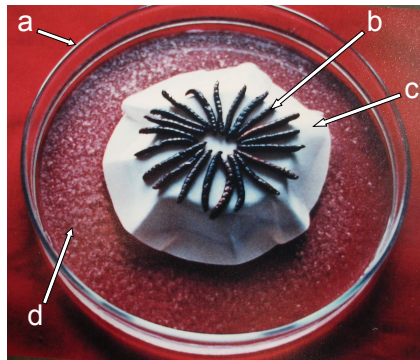
Larva Serangga

Empat spesies larva digunakan dalam penelitian ini. Larva *Galleria* diperoleh dari sarang lebah di Bogor kemudian dipelihara pada pakan buatan (Poinar, 1975). *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) diperoleh dari tanaman sawi di Cipanas kemudian dipelihara di laboratorium dengan diberi pakan daun talas. Larva *Tenebrio* dan ‘ulat cangkilung’ (nama lokal Sunda; ordo Lepidoptera, famili dan spesies tidak diketahui) berturut-turut diperoleh dari pedagang pakan ikan/burung di Bogor. Rata-rata berat tubuh larva *Tenebrio* dan ‘ulat cangkilung’ berturut-turut 0,08 dan 0,43 g/ekor.

Isolat NPS

Dua isolat *H. indicus* yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu INA H1 asal Anyer, Jawa Barat dan INA H4 asal Seram, Maluku (Griffin *et al.* 2000), diperbanyak terlebih dahulu pada larva *Tenebrio* menggunakan metode inokulasi kertas saring pada cawan petri (Woodring dan Kaya 1988). Suspensi *H. indicus* dalam air keran (0,7 ml) mengandung 100–200 JI/ml diinfestasikan pada satu lembar kertas saring (Whatman nomor 9) yang melapisi alas dan tutup cawan petri berdiameter 9 cm. Dua puluh ekor *Tenebrio* dimasukkan kedalam cawan. Cawan ditutup dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar ($26 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$) dalam keadaan gelap. Larva yang mati terinfeksi dengan gejala khas, yakni yang berubah warna menjadi coklat tua kemerahan, tidak berbau busuk, tidak berair, dan tidak melunak, dipindahkan ke cawan panen atau perangkap White (*White trap*; Woodring dan Kaya 1988). Perangkap White terbuat dari tutup cawan petri berdiameter 5 cm yang ditelungkupkan dan ditutup dengan kertas saring Whatman nomor 1 (diameter 9 cm) kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri berdiameter

15 cm yang berisi air keran setinggi $\pm 0,5$ cm (Gambar 1). *Cadaver* dengan warna coklat tua kemerahan yang merata diletakkan berjajar diatas kertas saring yang tepiannya dibiarkan menyentuh permukaan air. Cawan ditutup dan diinkubasi dalam keadaan gelap. Air yang telah mengandung JI yang keluar bermigrasi dari tubuh serangga dipindahkan ke dalam gelas erlenmeyer. Perangkat diisi kembali dengan air. JI dicuci dengan dengan air keran menggunakan metode sedimentasi dan dekantasi sebanyak tiga sampai empat kali. NPS disimpan dalam 20–25 ml air keran (≤ 1 cm) dengan konsentrasi ± 10.000 JI/ml air di dalam cawan-cawan petri berdiameter 9 cm yang kemudian diletakkan dalam inkubator (Sanyo MIR-151) bersuhu $10 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Umur JI sebelum digunakan dalam penelitian tidak lebih dari dua minggu.



Gambar 1. Perangkat White untuk pemanenan juvenil infeksi (JI) *Heterorhabditis*. Perangkat terdiri dari cawan petri berdiameter 15 cm (a), kertas saring (b) yang menutupi tutup cawan petri berdiameter 9 cm, bangkai larva terinfeksi (*cadaver*) (c), dan air yang telah berisi JI yang terlihat sebagai massa putih (d).

Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Mortalitas Larva Serangga

Larva *Galleria* dan *Tenebrio* ($n=10$ ekor) diinokulasi dengan 20 JI INA H1/ larva menggunakan metode inokulasi kertas saring pada cawan petri. Cawan-cawan petri kemudian diletakkan pada suhu kamar atau dalam inkubator yang telah diatur suhunya pada 24, 28 atau $30 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Kematian serangga dicatat pada 3–7 hari setelah inokulasi (HSI). Penelitian ini menggunakan rancangan faktorial 2×4 yang diacak secara lengkap dengan 4 ulangan perlakuan.

Uji Spesies Serangga untuk Produksi JI *H. indicus*

Sepuluh ekor larva dari tiga spesies serangga, yaitu *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), *Tenebrio* dan ‘ulat cangkilung’ diinokulasi dengan 100 JI INA H1/larva pada cawan petri berdiameter 9 cm menggunakan metode inokulasi kertas saring. Untuk mencegah kanibalisme, pada cawan petri berisi *Spodoptera* diletakkan potongan daun talas yang telah dibilas dengan air keran.

Larva-larva yang hanya diberi air digunakan sebagai kontrol. Parameter yang diamati terdiri dari 1) kematian serangga yang diamati pada 3–7 HSI dan 2) total produksi JI dari 5 ekor larva pada 10–20 HSI. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 5 ulangan perlakuan.

Pengaruh Macam Wadah Infeksi terhadap Produksi *H. indicus*

Penelitian yang terdiri dari dua tahap ini menggunakan larva *Tenebrio* yang dinilai paling baik sebagai inang alternatif (lihat Hasil dan Pembahasan). Percobaan I menggunakan tiga jenis wadah infeksi, yaitu cawan petri berdiameter 9 cm (selanjutnya disebut wadah A) dan 15 cm (wadah B), serta kotak plastik dengan panjang 29 cm, lebar 21 cm dan tinggi 6 cm (wadah C). Bagian dasar dan dalam tutup tiap wadah infeksi dilapis dengan selembat kertas saring (Toyo nomor 52) yang telah dipotong sesuai ukuran wadah, lalu ditetesi dengan suspensi isolat INA H1 dalam air keran (dosis 400 JI/larva *Tenebrio*). Volume suspensi JI untuk tiap lembar kertas saring berturut-turut 1,4 dan 2 ml untuk wadah A; 3 dan 4 ml untuk wadah B; serta 8 dan 8 ml untuk wadah C. Kedalam wadah A dan B dimasukkan 100 ekor larva *Tenebrio*, sedangkan ke dalam wadah C 500 ekor. Semua wadah ditutup kemudian diinkubasi pada suhu optimum untuk inkubasi. Penutup wadah C diganti dengan penutup berkasa pada 4 HSI. Pengamatan kematian larva dilakukan pada 3–7 HSI. Untuk setiap jenis wadah terdapat 3 ulangan dan 2 ulangan kontrol, yaitu larva diletakkan dalam wadah infeksi yang dilapis dengan kertas saring dan hanya diberi air.

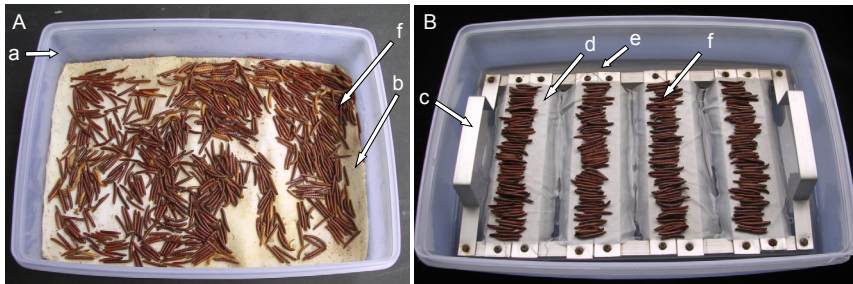
Pada percobaan II dilakukan modifikasi metode inokulasi, yaitu 1) hanya perlakuan A dan C yang diuji, masing-masing terdiri dari 2 ulangan dan tidak ada kontrol, 2) volume air untuk wadah C dikurangi menjadi 7 ml untuk tiap lembar kertas saring, dan 3) pada kedua wadah infeksi dua lembar kertas saring digunakan untuk melapisi bagian dasar wadah.

Pengaruh Dosis Inokulum terhadap Produksi JI *H. indicus*

Produksi massal dilakukan pada kotak plastik (wadah C) menggunakan metode infeksi yang telah dimodifikasi. Alas kotak plastik (Lion Star Dicky K-7:u) dilapis dengan dua lembar kertas saring (Toyo nomor 52) kemudian diinfestasi dengan 14 ml air keran mengandung JI *H. indicus* INA H4 pada dosis bervariasi (50, 100, 200, 400, dan 800 JI/larva). Selanjutnya lima puluh gram larva *Tenebrio* ($n=500\pm 50$ ekor) diinfestasikan ke dalam kotak (Gambar 2A). Kotak ditutup rapat lalu diinkubasi pada suhu kamar. Setelah 3 hari penutup kotak diganti dengan penutup berkasa. Sebagai pembandingan digunakan dua lapis kertas saring yang diberi 14 ml air keran tanpa nematoda. Tiap perlakuan dosis diulang 4 kali.

Sepuluh cadaver dipilih secara acak kemudian dibedah di bawah mikroskop untuk penghitungan jumlah JI yang berhasil menginvasi. Dua ratus cadaver lainnya diletakkan pada perangkap White yang telah dimodifikasi untuk memuat sejumlah besar larva (Gambar 2B). Perangkap massal ini berupa kotak plastik (Lion Star Dicky K-7:u) yang diisi air setinggi ± 0.5 cm dan di dalamnya diletakkan sebuah

platform terbuat dari aluminium tempat meletakkan cadaver yang dilengkapi dengan pegangan pada kedua ujungnya untuk memudahkan pemanenan JI. Alat ini terdiri dari empat pelat aluminium masing-masing berukuran panjang 17 cm dan lebar 4 cm dan disangga oleh dua batang aluminium berukuran panjang 26 cm, lebar 1 cm dan tebal 1 cm. Lajur-lajur aluminium ditutup dengan kain katun basah berukuran panjang 20-23 cm dengan lebar melebihi lebar lajur agar tepian kain menyentuh air. Pada setiap lajur diletakkan 50 cadaver secara berjajar. Selama inkubasi kotak perangkap ditutup dengan penutup berkasa.



Gambar 2. Perbanyakan massal nematoda infeksius (JI) *Heterorhabditis indicus* pada larva *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). A. Kotak plastik (ukuran 29 cm×21 cm×6 cm) untuk infeksi (a) beralas kertas saring (b). B. Kotak plastik berisi perangkap White yang dimodifikasi dari aluminium dengan pegangan pada kedua ujungnya (c) dan pelat aluminium yang dialasi dengan kain (d) yang tepiannya menyentuh permukaan air (e) dan di atasnya diletakkan bangkai larva terinfeksi/cadaver (f).

Pola Produksi JI *H. indicus*

Pola produksi harian JI diamati untuk mengetahui saat-saat pemanenan JI yang tepat. Larva *Tenebrio* ($n=20$) diinokulasi dengan 100 JI INA H4 per larva menggunakan metode infeksi kertas saring pada cawan petri berdiameter 9 cm. Larva yang terinfeksi diletakkan pada cawan perangkap White. JI dipanen setiap hari sejak pertama kali muncul dan dihitung populasinya.

Analisis Statistik

Data dianalisis menggunakan prosedur ANOVA menggunakan program GenStat 6.0 (Payne *et al.* 2002). Data ditransformasi bilamana perlu untuk menormalkan sebaran galat. Pembedaan rata-rata perlakuan dilakukan menggunakan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf $P=0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Mortalitas Larva Serangga

Suhu yang diuji (24–30°C) adalah kisaran suhu yang biasa dijumpai di negara tropik sehingga diharapkan *H. indicus*, yang hanya ditemukan di negara tropik, aktif dan dapat menginfeksi serangga dalam kisaran suhu ini. Hasil percobaan mendukung dugaan ini. Tingkat kematian serangga tidak dipengaruhi oleh suhu inkubasi ($P=0,24$) maupun interaksi antara suhu dengan spesies serangga ($P=0,38$) tetapi dipengaruhi oleh spesies serangga ($P=0,04$; Tabel 1). Larva *Galleria* lebih rentan daripada larva *Tenebrio*. Mortalitas kedua serangga terlihat paling tinggi pada suhu kamar tetapi tidak berbeda nyata dengan mortalitas pada perlakuan suhu inkubasi lainnya. Dengan demikian perbanyakan *H. indicus* dapat dilakukan pada suhu kamar.

Tabel 1. Persentase mortalitas larva *Galleria mellonella* dan *Tenebrio molitor* setelah diinokulasi dengan *Heterorhabditis indicus* INA H1 pada empat suhu inkubasi.

Suhu (°C)	<i>Galleria</i> ¹	<i>Tenebrio</i> ¹	Rata-rata
24	99,8	87,5	96,0
28	92,3	87,3	89,9
30	87,4	88,7	88,1
Kamar (26±1,6)	100,0	91,5	97,9
Rata-rata	97,1 a	88,9 b	

^{1,2}Rata-rata dari 4 ulangan dan hasil transformasi balik dari $\arcsine \sqrt{(x/100)}$. Angka rata-rata dalam satu baris yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda secara nyata menurut uji BNT pada taraf $P=0,05$.

Uji Spesies Serangga untuk Produksi *H. indicus*

Perbandingan tiga spesies larva untuk perbanyakan *H. indicus* menunjukkan bahwa larva *Tenebrio* dan ‘ulat cangkilung’ setara efektivitasnya dalam menghasilkan JI (Tabel 2). Keduanya menghasilkan JI secara nyata lebih tinggi (berturut-turut $5,77 \times 10^5$ dan $5,22 \times 10^5$ JI/larva) dibandingkan dengan *Spodoptera* ($0,11 \times 10^5$ JI/larva). Rendahnya tingkat reproduksi *H. indicus* pada *Spodoptera* diakibatkan oleh mudah terdisintegrasinya *cadaver* larva ini dibandingkan dengan kedua spesies larva lainnya, sehingga nematoda yang sedang berkembang di dalamnya gagal menyelesaikan siklus hidupnya. *Tenebrio* tersedia secara reguler dalam jumlah banyak dengan harga lebih murah dibandingkan dengan ‘ulat cangkilung’ sehingga menjadi alternatif terbaik dari larva *Galleria* untuk perbanyakan massal *H. indicus*.

Tabel 2. Produksi juvenil infektif (JI) *Heterorhabditis indicus* INA H1 pada tiga spesies larva.

Spesies serangga (n=5 ekor)	Produksi JI/g larva
Spodoptera litura	10.675 b
‘Ulat cangkilung’ (Lepidoptera, nama famili dan Latin tidak diketahui)	523.614 a
Tenebrio molitor	577.229 a

¹Rata-rata dari 5 ulangan. Angka-angka dalam satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji BNT pada taraf $P=0,05$.

Pengaruh Macam Wadah Infeksi terhadap Produksi *H. indicus*

Pada Percobaan I mortalitas larva secara alami paling tinggi terjadi pada wadah C (26%) walaupun tidak berbeda nyata dengan yang terdapat pada wadah A dan B (Tabel 3). Pada kontrol untuk wadah C mortalitas larva secara alami juga paling tinggi (12%) diikuti oleh kontrol untuk wadah A (7%) dan B (2%). Persentase larva terinfeksi pada wadah C paling rendah (64%) namun tidak berbeda nyata dengan yang terjadi pada wadah A dan B.

Pada percobaan II pengurangan volume total air yang diaplikasikan pada tiap lembar kertas saring pada wadah C dari 8 ml menjadi 7 ml berhasil menurunkan tingkat kematian alami menjadi hanya 6% sekaligus meningkatkan persentase larva terinfeksi menjadi 88%, setara dengan yang terdapat pada wadah A. Mortalitas larva secara alami dan persentase larva terinfeksi pada wadah A relatif tetap pada kedua percobaan, yang menandakan bahwa kondisi infeksi pada wadah ini telah optimum. Ketiga jenis wadah kebanyakan dapat digunakan untuk kebanyakan massal NPS, namun wadah C lebih efisien dalam pengerjaannya dan dapat memuat sejumlah besar serangga.

Kelembaban atau lapisan air pada kertas saring diperlukan untuk membantu mobilitas JI namun persentasenya perlu diatur agar tidak menyebabkan larva membusuk sebelum terinfeksi nematoda. Kelembaban selama 24–72 jam cukup untuk memberi waktu bagi nematoda mencapai sasaran inangnya. Kontak terus menerus antara kertas saring yang telah diinfestasi nematoda dengan larva perlu dipertahankan untuk mencapai persentase infeksi yang tinggi. Larva Coleoptera tidak dapat memanjat dinding yang licin pada bagian dalam wadah infeksi karena tidak memiliki tungkai palsu, sehingga kertas saring pada bagian dalam tutup wadah infeksi (Percobaan I) tidak diperlukan tetapi dua lembar kertas saring sekaligus diletakkan pada bagian dasar wadah infeksi (Percobaan II).

Tabel 3. Mortalitas larva *Tenebrio molitor* pada tiga macam wadah infeksi setelah diinokulasi dengan 400 juvenil infeksi Heterorhabditis indicus INA H1.

Perlakuan ¹	Volume air pada kertas saring (ml)		Jumlah larva	Mortalitas larva secara alami (%) ²		Larva terinfeksi (%) ²	
	Alas	Tutup					
Percobaan I							
A	1,4	2,0	100	10,0	bc	87,7	a
B	3,0	4,0	100	10,0	bc	83,6	ab
C	8,0	8,0	500	25,8	c	63,8	b
Kontrol A	1,4	2,0	100	6,6	b	-	
Kontrol B	3,0	4,0	100	1,9	a	-	
Kontrol C	8,0	8,0	500	12,1	bc	-	
Percobaan II							
A	3,4	0,0	100	9,5	b	88,1	a
C	14,0	0,0	500	6,3	a	88,3	a

¹A=cawan petri diameter 9 cm, B=cawan petri diameter 15 cm, C=kotak plastik berukuran panjang 29 cm×lebar 21 cm×tinggi 6 cm. KA, KB dan KC berturut-turut adalah kontrol untuk perlakuan A, B dan C ²Rata-rata dari 3 ulangan (Percobaan I) dan 2 ulangan (Percobaan II). Angka-angka dalam satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji BNT pada taraf $P=0,05$.

Pengaruh Dosis Inokulum JI terhadap Produksi *H. indicus*

Persentase larva *Tenebrio* yang terinfeksi dan persentase JI yang menginvasi larva semakin meningkat dengan meningkatnya dosis inokulum ($P<0,005$), akan tetapi produksi JI menurun secara nyata ($P=0,001$; Tabel 4). Korelasi sederhana antara dosis inokulum dengan persentase mortalitas *Tenebrio* dan jumlah JI yang berhasil menginvasi bersifat positif dan sangat nyata ($P<0,001$), dengan koefisien korelasi (r) berturut-turut 0,74 dan 0,74, sedangkan korelasi antara dosis inokulum dengan total produksi JI bersifat negatif dan sangat nyata ($r=-0,84$, $P<0,0001$).

Dosis inokulum terendah (50 JI/larva) hanya menyebabkan 58% mortalitas larva *Tenebrio* tetapi menghasilkan JI tertinggi ($7,3 \times 10^5$ JI/g larva), yang tidak berbeda secara nyata dengan JI yang dihasilkan pada dosis 100 dan 200 JI/g larva, berturut-turut $6,4 \times 10^5$ dan $6,5 \times 10^5$ JI/g larva. Peningkatan dosis inokulum hingga 400 dan 800 JI/g larva menghasilkan persentase mortalitas larva $>80\%$ namun JI yang dihasilkan berkurang 1,7 kali.

Peningkatan jumlah JI yang menginvasi larva dengan semakin meningkatnya dosis inokulum juga terjadi pada larva *Galleria* yang diinokulasi dengan *H. megidis* (Boff *et al.* 2000), dan pada larva *Tenebrio* yang diinokulasi dengan *Steinernema* sp. (Baliadi *et al.*, 2011). Penurunan tingkat produksi JI dengan semakin bertambahnya dosis inokulum juga dilaporkan oleh Selvan *et al.* (1993) dan Flanders *et al.* (1996) untuk *H. bacteriophora*, oleh Boff *et al.* (2000) untuk *H. megidis*, dan oleh Baliadi *et al.* (2011) untuk *Steinernema* sp. Peningkatan jumlah JI yang berhasil menginfeksi larva meningkatkan persaingan intraspesifik

dalam memperoleh makanan (Woodring dan Kaya 1988; Flanders *et al.* 1996) dan oksigen (Senthamizhselvan dan Blackshaw 1990) sehingga mengganggu pertumbuhan dan perkembangan nematoda. Ketersediaan oksigen di dalam tubuh serangga juga semakin berkurang karena bakteri simbiosis bersifat aerobik (Senthamizhselvan dan Blackshaw 1990).

Tabel 4. Persentase mortalitas larva *Tenebrio molitor*, jumlah juvenil infeksi (JI) yang menginvasi larva, dan JI yang dihasilkan pada variasi dosis inokulum JI *Heterorhabditis indicus* INA H4.

Inokulum (JI/larva)	Mortalitas larva (%) ^{1,2}	Jumlah JI yang menginvasi/larva ^{1,3,4}	Produksi JI/g larva ^{1,3}
50	58,3 d	1,4 d	730.713 a
100	66,9 c	2,0 cd	639.888 a
200	75,7 b	3,8 bc	651.388 a
400	83,3 a	6,6 b	513.963 b
800	80,7 a	9,7 a	438.050 b

¹Rata-rata dari 4 ulangan. Angka-angka dalam satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji BNT pada taraf 5%. ²Hasil transformasi balik dari $\arcsin \sqrt{(x/100)}$.

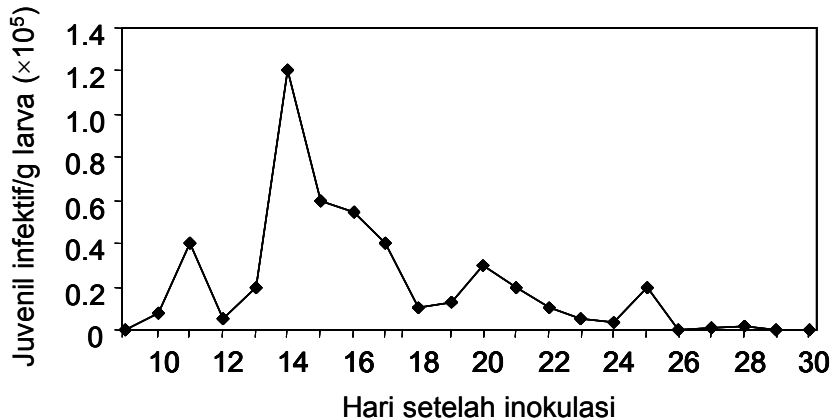
³Hasil transformasi balik dari $\log(x)$. ⁴ $n=10$ ekor larva.

Tingkat produksi JI tergantung pada ukuran serangga dan spesies atau strain nematoda. Pada larva *Galleria* (berat tubuh 0,2–0,3 g/ekor) produksi *H. bacteriophora* strain Oswego dapat mencapai $1,3\text{--}1,4 \times 10^6$ (Flanders *et al.* 1996) sedangkan strain HP88 $3,3\text{--}5,0 \times 10^6$ /g larva (Selvan *et al.* 1993). Dengan menggunakan larva *Tenebrio* (berat larva 0,12 g/ekor) untuk memperbanyak *H. bacteriophora* strain Hb, Shapiro-Ilan *et al.* (2002) memperoleh $8,9\text{--}9,4 \times 10^5$ JI/g larva, yang $1,3 \times$ lebih banyak dibandingkan dengan hasil *H. indicus* pada larva *Tenebrio* (berat larva 0,08 g/ekor) pada penelitian ini.

Pola Produksi JI *H. indicus*

JI mulai muncul pada 10 HSI sehingga peletakan *cadaver* pada perangkat dilakukan pada 7 HSI. Produksi JI berfluktuasi dengan empat puncak produksi: satu puncak rendah pada 11 HSI ($0,4 \times 10^5$ JI/larva) diikuti dengan satu puncak produksi tertinggi pada 14 HSI ($1,2 \times 10^5$ JI/larva), kemudian dua puncak rendah pada 20 ($0,33 \times 10^5$ JI/larva) dan 25 HSI ($0,22 \times 10^5$ JI/larva) (Gambar 3). Lama periode produksi JI sejalan dengan ukuran tubuh larva. Pada penelitian ini siklus produksi JI pada larva *Tenebrio* lebih banyak namun dengan selang waktu yang pendek antar puncak produksi (4 atau 5 hari) dan periode produksi yang lebih pendek (26 hari) dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Flanders *et al.* (1996) untuk produksi JI *H. bacteriophora* pada larva *Galleria* (30 hari). Kemunculan JI *H. bacteriophora* dimulai pada 10 HSI dengan tiga puncak produksi yang berjarak 8 dan 9 hari dengan puncak produksi tertinggi pada 17 HSI (Flanders *et al.* 1996).

Peningkatan dosis inokulum juga akan mempercepat kemunculan JI (Boff *et al.* 2000), yang menandakan penipisan makanan yang tersedia dalam tubuh serangga.



Gambar 3. Pola produksi harian juvenil infeksi *Heterorhabditis indicus* INAH4 pada larva *Tenebrio molitor* ($n=20$ ekor).

Periode pemanenan yang terbaik adalah antara 10-26 HSI. Setelah periode ini terdapat mortalitas JI yang tinggi karena air dalam perangkap tercemar debris dari serangga yang mulai terdisintegrasi dan terkontaminasi oleh mikroorganisme. Pengetahuan tentang pola kemunculan JI ini membantu sinkronisasi penjadwalan produksi massal JI secara *in vivo* dengan waktu aplikasi di lapangan. Hal ini dikarenakan NPS mempunyai masa simpan yang pendek akibat tidak memiliki stadia dorman (Bedding *et al.*, 2002).

Teknologi perbanyakan *H. indicus* pada larva *Tenebrio* sangat sederhana dan berbiaya murah karena menggunakan sumber daya yang mudah diperoleh sehingga cocok diadopsi oleh petani dan diterapkan pada usaha pertanian organik. Kualitas JI yang dihasilkan juga tinggi dan lebih efektif dibandingkan dengan yang dihasilkan secara *in vitro* (Chaerani *et al.*, 2012). Proses pengendalian mutu dapat diminimalisasi karena hanya stadia JI yang dipanen dan bersih dari stadia lainnya yang berada di dalam tubuh serangga. Dengan menggunakan perangkap White yang telah dimodifikasi untuk memuat sejumlah besar *cadaver*, proses pemanenan massal JI menjadi sangat praktis dibandingkan dengan perangkap White konvensional (Samsudin dan Indriati, 2013). Perangkat aluminium yang berisi *cadaver* cukup dipindahkan ke kotak plastik baru yang berisi air, kemudian suspensi JI yang berada di kotak pertama dipanen dan dibersihkan.

Biaya produksi bisa lebih ditekan dengan mengganti kertas saring dengan jenis kertas lain yang dapat menyerap air seperti kertas merang, kertas singkong, atau kertas koran, namun volume air yang diaplikasikan harus disesuaikan. Substrat infeksi juga dapat diganti dengan media yang konduktif untuk infeksi yaitu

pasir atau tanah bertekstur ringan (Shapiro-Ilan *et al.*, 2012). Kapasitas produksi per satuan luas dapat ditingkatkan dengan menggunakan kotak infeksi dan alat perangkap yang berukuran lebih besar. Akan tetapi kepadatan larva *Tenebrio* yang dinfestasikan dan kelembaban harus disesuaikan dengan luas kotak agar tidak terjadi kekurangan oksigen dan peningkatan gas amoniak (Shapiro-Ilan *et al.*, 2002). Teknik inokulasi akan lebih efisien dan hemat dengan mencelupkan larva inang ke dalam suspensi JI (Shapiro-Ilan *et al.*, 2002).

KESIMPULAN

Larva *Tenebrio molitor* yang tersedia secara komersial merupakan larva alternatif terbaik untuk perbanyakan *Heterorhabditis indicus*. Metode perbanyakan massal nematoda ini yang mudah, efisien dan murah telah dikembangkan dengan menggunakan metode infeksi kertas saring di dalam kotak plastik dan inkubasi pada suhu kamar. Juvenil infeksi (JI) nematoda dipanen menggunakan perangkap White yang telah dimodifikasi untuk produksi massal. Peningkatan dosis inokulum juvenil infeksi (JI) nematoda berbanding lurus dengan mortalitas larva *Tenebrio* dan persentase JI yang berhasil menginfeksi tetapi berbanding terbalik dengan produksi JI. Kisaran dosis 50-200 JI/larva *Tenebrio* menghasilkan $6,4-7,3 \times 10^5$ JI/g larva yang tidak berbeda nyata satu sama lain. Periode pemanenan JI adalah antara 10-26 hari setelah inokulasi.

SARAN

Dosis inokulum yang optimum untuk produksi massal *H. indicus* adalah 50 JI/larva *Tenebrio*. Kapasitas produksi JI dapat ditingkatkan dengan menggunakan kotak infeksi yang lebih besar namun tingkat kelembabannya harus disesuaikan agar terjadi infeksi larva secara optimal. Teknik perbanyakan yang berbiaya murah ini cocok diadopsi oleh petani dan diterapkan pada pertanian organik.

DAFTAR PUSTAKA

- Baliadi, Y., Sastrahidayat, I.R., Djauhari, S., and Rahardjo, B.T. 2011. Pathogenicity of the entomopathogenic nematode *Steinernema* sp., in mealworm *Tenebrio molitor*. *Agrivita* 33(3): 233-244.
- Bedding, R.A., Clark, S.D., Lacey, M.J., and Butler, K.L. 2002. Patent 6407310.
- Boff, M. C., Wieggers, G.L., Gerritsen, L.J.M., and Smits, P.H. 2000. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. *Journal of Nematology* 2 (3): 303-308.
- Burnell, A.M. and Stock, S.P. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts – lethal pathogens of insects. *Nematology* 2(1): 31-42.

- Chaerani dan Nurbaeti, B. 2006. Efektivitas nematoda patogenik serangga (Rhabditida: *Steinernema* dan *Heterorhabditis*) terhadap penggerek batang padi putih (*Scirpophaga innotata*). *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 12(2): 92-103.
- Chaerani dan Nurbaeti, B. 2007. Uji efektivitas nematoda entomopatogen (Rhabditida: *Steinernema* dan *Heterorhabditis*) sebagai musuh alami non-endemik penggerek batang padi kuning (*Scirpophaga incertulas*). *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* 7(2): 71-76.
- Chaerani dan Waluyo. 2006. Pencarian nematoda patogenik serangga (*Steinernema* dan *Heterorhabditis*) yang efektif untuk pengendalian hama lanas (*Cylas formicarius*) ubi jalar. *Widyaiset* 9(3): 19-27.
- Chaerani, Suhendar, M.A., dan Harjosudarmo, J. 2012. Perbanyakkan nematoda patogenik serangga (Rhabditida: *Steinernema* dan *Heterorhabditis*) pada media *in vitro* cair static. *Jurnal AgroBiogen* 8(1): 19-26.
- Chaerani, Suryadi, Y., Priyatno, T.P., Koswanudin, D., Rahmat, U., Sujatmo, Yusuf, dan Griffin, C.T. 2007. Isolasi nematoda patogen serangga *Steinernema* dan *Heterorhabditis*. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* 7(1): 1-9.
- De Chenon, R.D., Sipayung, A., and Soedharto, Ps. 1992. Use of entomogenous nematode against *Coptotermes curvignathus* Holmgren, Rhinotermitidae. *Buletin Pusat Penelitian Perkebunan Marihat* 12: 9-17
- Fallon, D.J. 1998. The use of indigenous entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis indica* and *Steinernema* spp.) to control rice stem borer in West Java, Indonesia. PhD dissertation, National University of Ireland, Maynooth.
- Flanders, K.L., Miller, J.M., and Shields, E.J. 1996. In vivo production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *Journal of Economic Entomology* 89: 373-380.
- Griffin, C.T., Chaerani, R., Fallon, D., Reid, A.P., and Downes, M.J. 2000. Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis indica* in Indonesia. *Journal of Helminthology* 74: 143-150.
- Kaya, H.K. and Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38: 181-206.
- Payne R.W., Harding, S.A., Murray, D.A., Soutar, D.M., Baird, D.B., Welham, S.J., Kane, A.F., Gilmour, A.R., Thompson, R., Webster, R., and Wilson, G.T. 2002. GenStat for Windows, 6th edn. VSN, Oxford.

- Poinar, G.O. Jr. 1975. Entomogenous nematodes. E.J. Brill. Leiden, Netherlands.
- Samsudin dan Indriati, G. 2013. Sinergisme *Heterorhabditis* sp. dengan penyarungan buah dalam mengendalikan penggerek buah kakao. *Buletin RISTRI* 4(1): 19-26.
- Selvan, S., Campbell, J.F., and Gaugler, R. 1993. Density-dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. *Journal of Invertebrate Pathology* 62: 278-284.
- Senthamizhselvan, M. and Blackshaw, R.P. 1990. The influence of *Neoaplectana bibionis* and *Heterorhabditis heliothidis* and their associated bacteria on oxygen consumption in *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 56: 20-24.
- Shapiro-Ilan, D.I., Gaugler, R., Tedder, W.L., Brown, I., and Lewis, E.E. 2002. Optimization of inoculation for in vivo production of entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology* 34(4): 343-350.
- Shapiro-Ilan, D.I., Han, R., and Dolinski, C. 2012. Entomopathogenic nematode production and application technology. *Journal of Nematology* 44(2): 206-217.
- Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pagès, S., and Boemare, N. 2010. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperate* subsp. *thracensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 1921–1937.
- Woodring, J.L. and Kaya, H.K. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331. Arkansas Agricultural Experiment Station Fayetteville, Arkansas.
- Yulensri. 2001. Uji keefektifan nematoda entomopatogen *Heterorhabditis indicus* dan *Steinernema riobravus* terhadap hama pengorok daun *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae). Program Studi Entomologi/Fitopatologi Program Pascasarjana IPB. 49 hlm.