

PENYIAPAN INOKULUM NEMATODA PARASIT PADA TANAMAN REMPAH DAN OBAT

Ketersediaan populasi nematoda yang cukup dan relatif seragam diperlukan untuk memenuhi bahan penelitian. Untuk mendapatkan jumlah/populasi nematoda sesuai keperluan dilakukan pengumpulan nematoda secara langsung dari lapang atau melalui perbanyakan nematoda di laboratorium dengan berbagai metoda untuk mengekstraksi dan mensterilisasi nematoda parasit.

Nematoda parasit merupakan salah satu organisme pengganggu tumbuhan yang menjadi kendala dalam produksi tanaman termasuk tanaman rempah, obat, dan aromatik (TROA). Nematoda parasit yang kerap menyerang TROA adalah nematoda buncak akar *Meloidogyne* spp. pada jahe, nilam, dan tanaman lainnya; *Pratylenchus brachyurus* pada tanaman nilam; dan *Radopholus similis* pada tanaman lada. Untuk memenuhi keperluan penelitian, diperlukan populasi nematoda yang cukup dan relatif seragam yang nantinya akan diinokulasikan/ditularkan pada tanaman tertentu sesuai dengan perlakuan yang akan diujikan atau untuk pengujian lainnya. Untuk mendapatkan jumlah/populasi nematoda sesuai keperluan dilakukan pengumpulan nematoda dari lapang atau dari tempat yang sebelumnya telah disiapkan dan digunakan untuk perbanyakan nematoda.

Tulisan ini akan menjelaskan mengenai sumber dan jenis inokulum, cara memperoleh (ekstraksi) nematoda dari jaringan tanaman (akar), dan penyediaan inokulum nematoda.

A. Sumber inokulum/populasi nematoda

Sumber nematoda dapat berasal dari: 1) pengumpulan populasi nematoda di alam atau 2) pengumpulan populasi nematoda dari biakan aseptik nematoda.

a.1. Pengumpulan nematoda dari alam

Pengumpulan nematoda dari alam yaitu pengumpulan nematoda dari tanaman inang yang menunjukkan gejala serangan nematoda di lapang. Kelebihan cara ini, kita tidak perlu membiakkan nematoda secara khusus, tetapi kekurangannya kita harus menemukan tanaman inang sakit yang cukup banyak untuk memperoleh populasi nematoda yang cukup banyak untuk keperluan inokulasi. Selain itu, nematoda di alam sering terkontaminasi oleh jamur maupun bakteri parasit nematoda yang bersifat tular tanah sehingga perlu dilakukan sterilisasi nematoda dengan larutan bakterisida dan fungisida sebelum digunakan dalam penelitian.

a.2. Pengumpulan nematoda dari biakan aseptik

Umumnya peneliti mempersiapkan inokulum nematoda dengan membiakkan nematoda pada kalus, potongan akar, atau wortel (Dropkin dalam Pengantar Nematologi Tumbuhan, 1991). Pada metoda ini nematoda diinokulasikan pada jaringan kalus, potongan akar, atau wortel, dalam hal ini nematoda dan jaringan tanaman yang digunakan harus bebas dari jasad renik atau kontaminan dengan memberikan perlakuan awal seperti tersebut di atas, nematoda diharapkan akan berkembang biak pada media biakan steril tersebut.

Nematoda *P. brachyurus* dan *R. similis* umumnya dibiakkan pada kalus alfalfa atau media wortel; sedangkan nematoda *Meloidogyne* spp. atau *Heterodera* spp. dibiakkan pada potongan akar steril. Wortel yang akan digunakan sebagai media disterilisasi kemudian dimasukkan ke dalam botol/wadah steril. Botol dapat disterilkan dengan meletakkan di oven dan nematoda disterilkan dengan larutan sterilan sebelum diinokulasikan ke wortel. Nematoda diambil dengan cara diekstrak dari akar nilam atau lada yang sakit (lihat ekstraksi nematoda). Nematoda yang sehat dan segar yang diperoleh dari ekstraksi, selanjutnya diperbanyak di media wortel. Jika berhasil, dalam 1 potongan wortel akan menghasilkan kira-kira 20.000 larva/juvenil dan dewasa nematoda dalam waktu lebih kurang dua bulan tergantung pada jumlah nematoda yang diinokulasikan dan ukuran potongan wortel yang digunakan.

B. Jenis inokulum nematoda

Inokulum nematoda dapat berupa telur atau berupa larva (juvenil) dan betina dewasa (bentuk "fermiform"/memanjang), tergantung jenis nematoda.

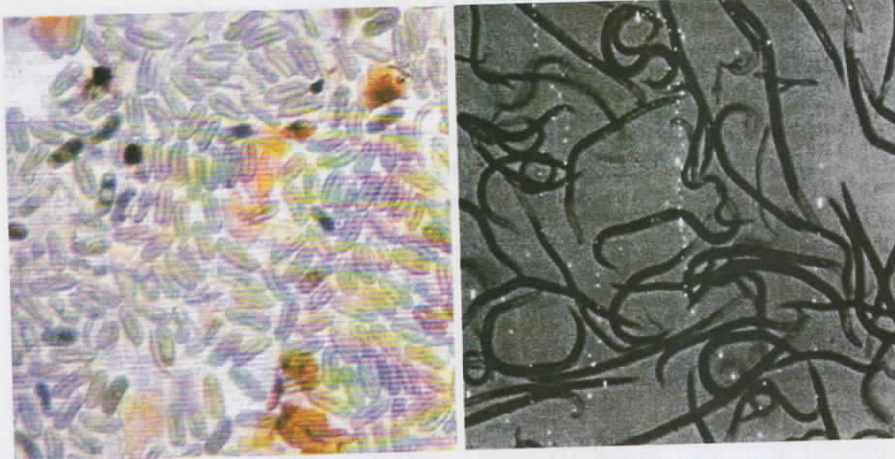
b.1. Inokulum telur

Telur biasanya digunakan sebagai inokulum untuk penelitian nematoda dari famili Heteroderidae (nematoda buncak akar *Meloidogyne* spp., nematoda siste *Heterodera* spp. dan *Globodera* spp.). Nematoda tersebut

merupakan endoparasit "sedentary" yaitu nematoda akan menetap di dalam jaringan akar tanaman. Nematoda betina akan menetap dalam jaringan akar dekat pembuluh akar dan menghasilkan telur dalam jumlah banyak. Telur-telur tersebut diletakkan dalam kantung telur yang berselaput lendir dari gelatin (gelatinous) untuk melindungi telur dari kekeringan dan jasad renik. Kantung telur muncul dari puru yang terbentuk akibat interaksi antara tanaman inang dan infeksi nematoda. Telur-telur mengandung zigot sel tunggal (embrio) apabila baru diletakkan. Embrio berkembang menjadi J-1 (juvenile tahap satu) yang mengalami pergantian kulit pertama dalam telur. J-1 siap menetas keluar menembus dinding telur dan menjadi J-2 (juvenile tahap dua) yang bergerak bebas mencari akar-akar tanaman inang yang sesuai dan masuk ke dalam akar melalui pelukaan dengan stiletnya. Di dalam jaringan akar, J-2 berkembang menjadi J-3, kemudian J-4. J-4 akan berkembang menjadi betina yang menggembung. Nematoda betina terus menghasilkan telur selama hidupnya, bahkan dapat mencapai jumlah lebih dari 1000 telur/betina. Nematoda betina dewasa tetap tertambat pada daerah makannya di dalam jaringan tanaman (stele) dengan bagian posterior tubuhnya berada pada permukaan akar. Telur-telur tersebut berisi juvenile-juvenil J-2 yang siap menetas dan terangsang mencari akar tanaman. Apabila telur-telur tersebut diinokulasikan ke akar tanaman yang mengeluarkan eksudat, juvenil segera menetas dan mencari akar secara aktif.

b.2. Inokulum J-2 (juvenil tahap 2) atau betina dewasa (inokulum nematoda bentuk fermiform)

Juvenil dan betina dewasa biasanya digunakan sebagai inokulum dalam penelitian nematoda peluka dan pelubang akar *Pratylenchus* spp. dan *R. similis*. Kedua jenis nematoda tersebut merupakan nematoda endoparasit migratori, yaitu menyerang jaringan korteks akar dan bergerak berpindah-pindah dalam akar membentuk lorong-lorong sehingga akar membusuk dan



Gambar 1. Kumpulan telur nematoda buncak akar *Meloidogyne* sp. yang diekstrak dari akar terinfeksi di lapang (kiri), dan juvenil dan betina dewasa nematoda *Pratylenchus* sp. yang diekstraksi dari media wortel yang aseptik (kanan)

mati. Betina meletakkan telur-telur dalam lorong-lorong dan larva menetas dalam lorong tersebut. Ekstraksi larva dan betina relatif lebih mudah untuk nematoda kelompok ini.

C. Ekstraksi nematoda

c.1. Ekstraksi telur nematoda buncak akar *Meloidogyne* spp.

Telur *Meloidogyne* sp. dapat dikumpulkan dari kantung telur dengan memecah kantung telur yang bergelatin. Akar/rimpang/umbi yang terinfeksi berat dari inang yang cocok mengandung kantung telur yang melimpah. Akar/rimpang/umbi dicuci bersih untuk memisahkan tanah yang melekat.

Bagian-bagian tanaman tersebut dikocok dengan tangan dalam 200 ml larutan 0,53% atau 1,05% NaOCl/ natrium hipoklorit dalam botol 500 ml selama 4 menit. Cairan kocokan tersebut dituang ke saringan 200 mesh di atas saringan halus (500 mesh) atau 300 (45 µm) mesh di atas halus 400 mesh (38 µm) saringan uji laboratorium (laboratory test sieve) dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan hipoklorit. Telur-telur pada saringan yang paling halus dikumpulkan ke dalam air bersih. Melalui metode ini, selain telur dapat pula diperoleh juvenil/larva nematoda yang menetas dari telur. Telur dan juvenil dapat disuspensikan di dalam air dan konsentrasinya diatur sesuai dengan yang diperlukan untuk inokulasi (Hussey dan Barker dalam Pl. Dis. Repr 57, 1973).

c.2. Ekstraksi nematoda *Pratylenchidae* (*Pratylenchus* spp. atau *R. similis*)

Nematoda peluka akar atau pelubang akar merupakan nematoda "migratory" endoparasit yang menginfeksi jaringan korteks akar

sehingga ekstraksi dapat dilakukan dengan metoda corong Baermann yang dimodifikasi diletakkan di dalam ruang pengkabutan. Agar nematoda tetap dalam keadaan segar, pengumpulan nematoda dilakukan pada hari pertama, selanjutnya dapat setiap hari sampai nematoda dalam akar habis, yaitu dengan melakukan pengamatan keberadaan nematoda di bawah mikroskop.

Jika tidak ada ruang pengkabutan, ekstraksi nematoda dapat dilakukan dengan metoda inkubasi. Bagian tanaman yang terserang nematoda dimasukkan ke dalam botol yang berisi air sehingga setengahnya terendam. Nematoda akan keluar dari akar dan masuk ke dalam air. Setiap hari air dalam botol yang mengandung nematoda dikumpulkan dengan pipet ke dalam botol penampungan. Air dalam botol ekstraksi diganti dengan air segar yang baru.

D. Inokulum nematoda yang dapat digunakan untuk penelitian

Sebagai bahan penelitian, nematoda yang dibutuhkan harus memenuhi syarat antara lain: 1) spesies nematoda kompatibel/sesuai dengan inangnya (tanaman percobaan), 2) sehat (tidak terinfeksi parasit), 3) segar (aktif bergerak), 4) murni (tidak terkontaminasi dengan spesies lain), dan 5) populasinya dalam jumlah yang memadai dan relatif seragam.

Kadang-kadang populasi nematoda dalam jumlah yang cukup dari alam/lapang sulit diperoleh dari satu jenis tanaman. Pengumpulan dapat dilakukan dari tanaman lain yang terserang nematoda yang sama dengan tanaman inang yang akan diteliti dan telah dibuktikan dapat menginfeksi. Contoh untuk percobaan nematoda *Meloidogyne* spp pada jahe dapat menggunakan populasi nematoda dari lada dan kumis

kucing. Nematoda buncak akar dari kedua tanaman tersebut terbukti dapat menginfeksi jahe.

Nematoda yang aktif bergerak adalah ciri nematoda yang siap dan akan aktif mencari akar jika diinokulasikan ke akar tanaman sehingga diharapkan infeksi berhasil. Di alam, tanaman sering diserang oleh dua atau lebih spesies nematoda, oleh sebab itu, perlu meminimalkan kontaminasi populasi dari spesies lain dengan pengamatan pendahuluan di bawah mikroskop. Biasanya populasi yang dominan adalah populasi yang merusak tanaman inang tersebut.

E. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam mengekstraksi nematoda

Faktor-faktor yang mempengaruhi besar kecilnya populasi/jumlah nematoda yang diperoleh dalam ekstraksi nematode sebagai berikut: 1) produk turunan (zat) dari jaringan tanaman, 2) aktivitas bakteri dari bahan tanaman yang membusuk, 3) kekurangan oksigen, 4) ukuran sampel yang terlalu besar, dan 5) suhu serta lama penyimpanan nematoda (Southey dalam Laboratory methods for work with Plant and Soil Nematodes. Sixth edition. 1986).

Penyimpanan bahan tanaman untuk ekstraksi yang terlalu lama pada suhu tinggi akan menyebabkan nematoda dalam jaringan mati. Selama ekstraksi nematoda dari akar atau bahan tanaman lain, untuk menghindari adanya faktor-faktor tersebut, air dalam corong Baermann ditampung pada hari pertama dan hari berikutnya air akan bening dan nematoda dapat keluar dari akar ke air dalam jumlah banyak. Pada hari-hari selanjutnya dapat ditampung setiap hari sampai lima hari. Apabila sampel terlalu banyak akan menumpuk pada saringan corong Baermann sehingga nematoda sulit keluar dengan leluasa. Penumpukan nematoda pada ujung corong menyebabkan nematoda kekurangan oksigen. Oleh sebab itu, letakkan bahan tanaman ekstraksi secukupnya pada saringan corong Baermann, agar bagian tanaman cukup terendam air permukaanannya dengan baik dan nematoda tidak kekurangan oksigen.

Dengan memperhatikan hal-hal tersebut di atas, akan diperoleh inokulum nematoda yang berkualitas baik sehingga diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan penelitian.

Kurniati dan S. Retno Djiwanti

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

Email: kurniati_ati70@yahoo.com

retnomuslim@yahoo.com