

PERBANYAKAN NEMATODA *ENTOMOPATOGEN* (NEP) PADA BERBAGAI MEDIA BUATAN *ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES* (ENPS) *REARING ON VARIOUS ARTIFICIAL CULTURE MEDIA*

Dyah Rini Indriyanti, Nurul Fitria Awalliyah, Priyantini Widiyaningrum

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil perkembangbiakan nematoda entomopatogen pada berbagai media buatan. Desain penelitian menggunakan rancangan acak lengkap, tujuh perlakuan dan lima ulangan. Tujuh perlakuan media yaitu media A (tepung kedelai), B (hati ayam), C (*dog food*), D (campuran hati ayam dan tepung kedelai 1:1), E (campuran tepung kedelai dan *dog food* 1:1), F (hati ayam dan *dog food* 1:1) dan G (campuran tepung kedelai, hati ayam dan *dog food* 1:0,5:0,5). Sebanyak $1,2 \times 10^3$ JI/ml di biakkan pada setiap media rearing selama empat minggu. Populasi NEP diamati setiap minggu. Hasil menunjukkan media terbaik untuk perbanyak NEP adalah media E (campuran tepung kedelai dan *dog food*) dengan populasi tertinggi $3,5 \times 10^4$ JI/ml. media E mengandung karbohidrat 1,27%, protein 1,52% dan lipid 1,09%.

Kata kunci: Nematoda entomopatogen; Perbanyak; Media buatan

PENDAHULUAN

Pengendalian hama yang ramah lingkungan sudah saatnya digalakkan mengingat pengendalian dengan pestisida pada produk pertanian menyebabkan berbagai dampak negatif. Salah satu pengendalian yang ramah lingkungan yaitu pengendalian hayati dengan menggunakan Nematoda Entomopatogen (NEP). NEP terbukti dapat mengendalikan berbagai larva serangga hama. Peranan NEP dalam pengendalian hayati sangat penting karena NEP mempunyai kemampuan mencari inang yang tinggi, menginfeksi dan membunuh serangga sasaran dalam waktu singkat hanya 24-48 jam.

Pengendalian NEP pada larva Coleoptera banyak diteliti dari berbagai aspek, juga pada larva Lepidoptera. Nematoda ini tidak berbahaya bagi mamalia dan vertebrata, tidak meracuni lingkungan, kompatibel dengan sebagian besar pestisida kimia.

Namun demikian aplikasi NEP di lapangan terkendala dengan penyediaan NEP yang siap pakai. NEP dapat diperoleh melalui isolasi dari tanah, namun memerlukan waktu dan ketrampilan

khusus. NEP dapat diperoleh dengan cara membeli sebagai biopestisida, namun Biopestisida NEP ternyata tidak tahan lama, banyak yang mati setelah dua minggu jika tidak diberi media pakan.

Selama ini pembiakan NEP masih terbatas menggunakan cara *in vivo* yaitu pembiakan dengan menggunakan larva serangga, diantaranya ulat hongkong (*Tenebrio molitor*) atau ulat bambu (*Galeria melonella*) dan ulat jagung (*H. armigera*). Kendala menggunakan cara pembiakan secara *in vivo* adalah ketergantungan pada stok serangga inang. Oleh sebab itu perlu dicarimedia pengembangbiakan NEP secara *in vitro* yang murah dan mudah digunakan petani. Tujuan penelitian ini yaitu untukmendapatkan media yang cocok untuk perbanyak NEP secara *in vitro*.

METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang, Mei sampai Juli 2014. Metode penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan tujuh perlakuan danlima kali ulangan. NEP yang digunakan diperoleh dari isolasi dari tanah dengan menggunakan serangga umpan *Tenebrio molitor* lalu diperbanyak dengan metode *White Trap*.

Media perbanyak yang disiapkan untuk perlakuan terdiri dari: media A (tepung kedelai), media B (hati ayam), media C (*dog food*), media D (campuran tepung kedelai dan hati ayam 1:1), media E (campuran tepung kedelai dan *dog food* 1:1), media F (campuran hati ayam dan *dog food* 1:1), media G (campuran tepung kedelai, hati ayam dan *dog food* 1:0,5:0,5). Komposisi lengkap media tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Media Pakan NEP

Komposisi media	Tepung kedelai (g)	Bubuk Hati ayam (g)	Bubuk <i>Dog food</i> (g)	Agar-agar (g)	Aquadest (ml)
Tepung kedelai (A)	2	-	-	0,2	30
Bubuk hati ayam (B)	-	2	-	0,2	30
Bubuk <i>dog food</i> (C)	-	-	2	0,2	30
Media D (A+B)	1	1	-	0,2	30
Media E (A+C)	1	-	1	0,2	30
Media F (B+C)	-	1	1	0,2	30
Media G (A+B+C)	1	0,5	0,5	0,2	30

Bahan baku media yang berbentuk padat dioven (suhu 70°C) sampai kering kemudian dihaluskan. Masing-masing media dicampur dengan agar-agar bubuk sebanyak 0,2 gram dan ditambah aquades 30 ml, diaduk lalu dimasukkan ke dalam botol kaca ukuran tinggi 11 cm, dan diameter 6,5 cm. Di bagian bawah botol diberi spon ukuran diameter 6 cm, tebal 1 cm. Media dimasukkan dalam botol ditutup dengan plastik, lalu disterilkan dengan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121⁰ C (1,5 Atm). Setelah botol dan media dingin, masing-masing media diinokulasi dengan NEP awal sebanyak 1 ml yang berisi 1,2x 10³ ekor. Populasi NEP dihitung

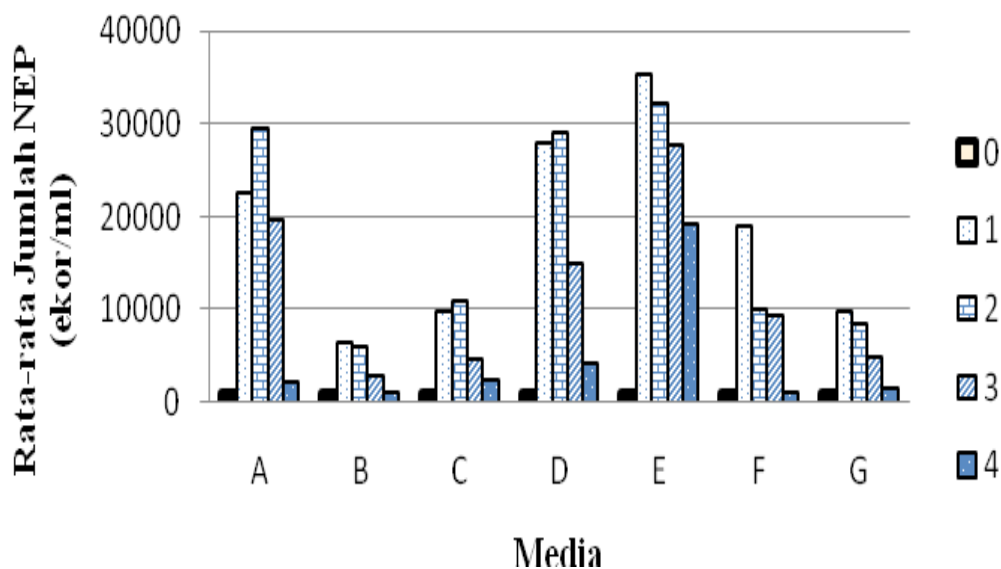
setiap minggu selama empat minggu. Penghitungan dilakukan dengan bantuan mikroskop dan *hand counter*. Penghitungan kelimpahan NEP dilakukan dengan cara mengambil cairan sampel yang mengandung nematoda dari masing - masing media sebanyak 0,05 ml. Cairan ditetaskan pada gelas benda yang telah diberi garis bantu. Perhitungan dilakukan minimal tiga kali supaya

valid lalu dirata-rata. Populasi NEP JI/ml = $\frac{\text{sampel air dalam media}}{\text{sub contoh volume air}} \times \frac{\text{sampel air dalam media}}{\text{sub contoh volume air}}$ x Jumlah NEP.

Data yang diamati adalah kelimpahan NEP pada tiap media perbanyakkan. Data dianalisis secara statistik menggunakan bantuan software SPSS versi 16. Media terbaik untuk pertumbuhan NEP dianalisis kandungan nutrisi karbohidrat, protein dan lemak di Balai Besar Teknologi Pencegahan Pencemaran Industri (BBTPPI), Semarang.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rata-rata kelimpahan NEP pada berbagai media pakan selama empat minggu pembiakan tercantum pada Gambar 1.



Keterangan media: A (tepung kedelai); B (hati ayam); C (*dog food*); D (campuran A+B); E (campuran A+C); F (campuran B+C); G (campuran A+B+C).

Gambar 1. Kelimpahan NEP pada berbagai media buatan selama empat minggu

Data kelimpahan NEP pada Gambar 1, secara umum tampak populasi NEP tertinggi terjadi pada minggu pertama. Oleh sebab itu analisis data difokuskan pada minggu pertama. Uji normalitas data kelimpahan NEP minggu pertama berdistribusi normal ($P > 0,05$). Hasil uji ANOVA satu arah dengan taraf 5% menunjukkan nilai $P = 0,00$. Nilai P yang diperoleh $< 0,05$,

berarti terdapat perbedaan rata-rata jumlah NEP antara media pakan. Hasil analisis uji Tukey dapat diringkas pada Tabel 1.

Tabel 1. Analisis uji Tukey data kelimpahan NEP pada berbagai media pada minggu pertama

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Media B	5	9552.00			
Media C	5	1.46E4	1.46E4		
Media G	5	1.89E4	1.89E4		
Media F	5		2.27E4	2.27E4	
Media D	5			2.94E4	
Media A	5			3.07E4	
Media E	5				4.40E4
Sig.		.078	.169	.188	1.000

Keterangan : Angka yang terdapat dalam “kolom subset” yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%, dan berbeda nyata pada kolom subset yang berbeda.

Hasil analisis uji Tukey (Tabel 1) menunjukkan bahwa kelimpahan NEP minggu pertama terjadi pada media E, media yang terdiri dari campuran tepung kedelai dan *dog food*. Media E termasuk kategori media terbaik untuk perkembangbiakan NEP. Sebaliknya kelimpahan NEP terendah terjadi pada media B (hati ayam). Media F, D, dan A secara statistik tidak berbeda nyata, artinya NEP yang dibiakkan pada ketiga media ini tidak berbeda nyata kelimpahannya. Ketiga media termasuk kategori sedang untuk media NEP. Begitu pula kelimpahan NEP pada media C, G dan F tidak berbeda nyata menurut statistik, ketiga media ini termasuk kategori rendah untuk media perbanyakkan NEP, artinya ketiga media tersebut kurang cocok untuk perkembangbiakan NEP.

Hasil pembiakan NEP pada ketujuh media, menunjukkan bahwa NEP dapat berkembangbiak pada media selain larva serangga. Kelimpahan NEP yang berbeda-beda pada masing masing media disebabkan karena komposisi nutrisi pada tiap media yang berbeda.

Kelimpahan NEP secara umum pada minggu pertama - kedua meningkat dibanding populasi awal. Hal ini disebabkan karena nutrisi yang terkandung pada masing-masing media masih mencukupi kebutuhan NEP untuk berkembangbiak. Menurut Wagiman *et al.* 2003 siklus hidup nematoda dari telur sampai dewasa memerlukan waktu kurang lebih 14 hari, jika nutrisinya melimpah maka siklus hidupnya cepat. Hal ini terlihat pada minggu kedua rata-rata kelimpahan NEP meningkat (Gambar 1), berarti terjadi perkembangbiakan NEP.

Ketika populasi NEP tinggi (pada minggu pertama-kedua) sedangkan jumlah media tetap, maka akan terjadi persaingan kebutuhan nutrisiantara NEP yang ada di dalam botol. Kelimpahan NEP yang tinggi menghasilkan limbah hasil sekresi yang tinggi pula, dan bercampur dengan media pakan. Pada akhirnya minggu ketiga dan keempat kelimpahan NEP menurun tajam. Penurunan populasi nematoda entomopatogen ini disebabkan karena semakin berkurangnya

nutrisi pada media yang dibutuhkan NEP dan adanya senyawa limbah yang merupakan hasil sekresi metabolisme NEP yang bercampur menjadi satu dengan media sehingga menyebabkan media menjadi berbau tidak sedap sehingga menjadi racun bagi NEP dan banyak nematoda mati.

Hasil pengukuran pH pada minggu keempat rata-rata mengalami peningkatan menjadi dari pH awal 5 menjadi 8 bahkan lebih. Kenaikan pH disebabkan karena adanya senyawa-senyawa lain yang bercampur jadi satu dengan media, misalnya CO₂ hasil respirasi yang menyebabkan kenaikan pH.

Kelimpahan tertinggi NEP terjadi pada media E campuran tepung kedelai dan *dog food* 1:1 (NEP = 3,5 x10⁴ ekor/ml). Pada media tepung kedelai (A) saja populasi NEP pada minggu pertama hanya (2,2x 10⁴ ekor/ml), NEP pada media *dog food* (9,7x 10³ ekor/ml) tetapi jika kedua media dicampur dengan perbandingan 1:1, maka populasi NEP meningkat menjadi (3,5 x10⁴ ekor/ml). Hal ini berarti campuran media tersebut sinergis atau cocok untuk pertumbuhan NEP. Hal tersebut disebabkan karena pada campuran media E terdapat berbagai nutrisi seperti karbohidrat, protein, lemak, vitamin dan mineral yang diperlukan bagi perkembangbiakan NEP. Tepung kedelai mengandung protein tinggi. *Dog food* merupakan bahan makanan bagi anjing yang dijual dalam bentuk kemasan dengan berbagai merk dagang. Kandungan nutrisi dari *dog food* yang digunakan pada penelitian ini tertulis pada kemasan mengandung karbohidrat 30,8 %, protein 29,4 % dan lemak 29,1 %. Komponen utama dari *dog food* adalah campuran daging ayam, sapi, minyak sayur, serat sayuran, agar-agar, vitamin dan mineral. Menurut Somwong dan Petchara (2012) makanan anjing atau *dog food* yang mengandung banyak lemak berperan dalam peningkatan produksi JI nematoda entomopatogen dibandingkan bubuk ikan. Wagiman *et al.* (2001) melaporkan bahwa media *dog food* secara nyata menghasilkan produksi juvenil infektif yang paling tinggi bila dibandingkan dengan kotoran kambing, kompos, ulat kubis, dan air.

Hal tersebut sesuai dengan pendapat Shapiro & Gaugler 2002, bahwa media yang baik untuk perbanyak NEP harus memenuhi kebutuhan nutrisi dari nematoda seperti karbohidrat, protein dan lemak. Protein merupakan nutrisi yang penting untuk kultur nematoda entomopatogen secara *in vitro*. Menurut Somwong nutrisi yang paling dibutuhkan oleh nematoda entomopatogen adalah protein dan lemak. Lemak sangat dibutuhkan untuk perkembangan dan reproduksi NEP. Menurut Yoo *et al* (2000) nutrisi terpenting yang dibutuhkan NEP untuk menjaga daya tahan NEP yaitu lemak. Lemak merupakan sumber energi terpenting nematoda entomopatogen karena 60 % dari total energinya diperoleh dari metabolisme lemak.

Oleh sebab itu mengapa tepung kedelai dan *dog food* baik untuk NEP karena kedua media campuran tersebut mengandung nutrisi yang dibutuhkan NEP. Hal tersebut didukung dengan adanya hasil analisis kandungan nutrisi pada media E yang dilakukan di BBTPPI Semarang menunjukkan bahwa media campuran tepung kedelai dan *dog food* hasil uji mengandung karbohidrat 1.27 %, protein 1.52 % dan lemak 1.09 %.

Kelimpahan NEP pada berbagai media perbanyak berturut-turut pada minggu pertama adalah sebagai berikut. Pada media E (campuran kedelai dan *dog food*) dengan jumlah NEP sebesar $3,5 \times 10^4$ ekor/ml, media D (campuran kedelai dan hati ayam) (NEP = $2,7 \times 10^4$ ekor/ml), media A (kedelai) (NEP = $2,2 \times 10^4$ ekor/ml), media F (campuran hati ayam dan *dog food*) (NE = $1,8 \times 10^4$ ekor/ml, media G (campuran kedelai, hati ayam dan *dog food*) (NEP = $9,9 \times 10^3$ ekor/ml, media C (*dog food*) (NEP = $9,7 \times 10^3$ ekor/ml, dan media B (hati ayam) (NEP = $6,5 \times 10^3$ ekor/ml).

Selain media E, ada kecenderungan media yang ditambah tepung kedelai menghasilkan kelimpahan NEP yang cukup tinggi terlihat pada media D. Minyak kedelai yang merupakan protein nabati dengan kandungan asam-asam amino yang sedikit berbeda dari protein hewani berperan dalam peningkatan produksi JI nematoda entomopatogen. Populasi JI *H. indicus* terus meningkat pada media Han yang mengandung tepung kedelai, produksi JI tertinggi $1,6 \times 10^5$ ekor/g media yang terjadi dalam 2 minggu.

Media yang kurang cocok untuk perbanyak NEP adalah media B (hati ayam). Kandungan nutrisi hati ayam meliputi Karbohidrat 6 %, Protein 19,7 % dan Lemak 3,2 %. Pada media yang mengandung protein tinggi, selama perlakuan perbanyak NEP terjadi degradasi senyawa protein menjadi gas amonia. Semakin tinggi kandungan protein maka semakin banyak amonia yang terbentuk di dalam botol, sehingga menjadi racun bagi perkembangbiakan NEP. Hal ini nampak pada media hati ayam yang banyak mengandung protein dengan kelimpahan NEP terendah. Amonia dapat terbentuk dari dekomposisi bahan-bahan organik yang mengandung nitrogen yang berasal dari feses.

Media pakan yang digunakan mengalami perubahan selama penelitian berlangsung, seperti perubahan warna yang sebelumnya berwarna kuning kecoklatan hingga menjadi kuning kehitaman. Masing-masing media pakan mengalami perubahan bau sebelum dan sesudah diinokulasi NEP. Pada awalnya aroma media terasa segar, namun setelah diinkubasi selama empat minggu baunya sangat menyengat. Hal ini disebabkan adanya produk hasil proses metabolisme NEP yang bercampur menjadi satu di dalam botol media, dan kemungkinan adanya kontaminan mikroorganisme lain.

Hasil pengamatan pH pada masing-masing media perbanyak nematoda entomopatogen yaitu pH awal sebesar 5-5,5 dan pH akhir sebesar 5,5-8,5. Pengukuran pH pada awal pengamatan menunjukkan bahwa pH pada semua media dalam suasana asam, sedangkan pengukuran pH pada akhir pengamatan (minggu keempat) menunjukkan bahwa pH pada semua media dalam suasana basa. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas NEP selama penelitian berlangsung. Hal tersebut kemungkinan disebabkan adanya aktivitas NEP di dalam botol media pakan tertutup yang menyebabkan peningkatan kadar konsentrasi karbondioksida (CO_2) yang mengakibatkan peningkatan nilai pH pada akhir pengamatan. Peningkatan nilai pH pada media pakan juga dapat

disebabkan terjadinya penguraian protein dan adanya senyawa nitrogen berupa amonia. Gas amonia yang menimbulkan bau menyengat dan bersifat racun dapat ditemukan pada pH tinggi (basa).

Media buatan untuk perbanyak nematoda entomopatogen mempunyai pH yang paling produktif yaitu 5,5-6,5. Kelangsungan hidup dan patogenitas nematoda sedikit menurun ketika pH tanah diturunkan dari 8 menjadi 4, tetapi kelangsungan hidup dan patogenitasnya menurun pada pH 10 (Afifah *et al* 2013). pH merupakan salah satu faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi kehidupan mikroorganisme. Dari berbagai pendapat tersebut dapat dikatakan bahwa nilai pH dapat menjadi indikator kualitas media untuk perkembangbiakan NEP.

Nematoda merupakan organisme poikilotermik dengan tingkat metabolisme yang sangat dipengaruhi oleh suhu di sekitar yang secara langsung mempengaruhi perkembangan dan pertumbuhan nematoda. Pada penelitian ini NEP dibiakkan pada suhu kamar 27^o C-31^o C.

Cahaya sangat berpengaruh terhadap perkembangbiakan NEP. Selama masa inkubasi, botol yang digunakan disimpan pada tempat yang tidak terkena matahari langsung, karena NEP lebih sensitif dengan sinar matahari langsung terutama UV. Sinar UV dapat menurunkan aktivitas NEP bahkan dapat menimbulkan kematian. Pengukuran intensitas cahaya dilakukan pada setiap minggunya dengan mengukur setiap pagi, siang dan sore. Intensitas cahaya di ruang penelitian berkisar antara 4.8 Lux – 34 Lux.

Kelembaban adalah salah faktor yang mempengaruhi aktivitas nematoda entomopatogen. Nematoda entomopatogen memerlukan kelembaban yang cukup untuk kelangsungan hidup dan pergerakannya. Kelembaban yang rendah akan menyebabkan NEP tidak mampu untuk bergerak karena kelembaban yang teramat kering dapat menimbulkan kematian bagi NEP. Kelembaban di ruang penelitian berkisar antara 65-85%.

Untuk mendukung adanya kelangsungan hidup nematoda di luar habitat alaminya, nematoda sangat bergantung pada air dan cadangan makanan sebagai sumber energinya (Chen & Glazer 2004). Nematoda dapat melakukan aktivitas dengan kelembaban kadar air \pm 60-70% untuk mempermudah pergerakan nematoda. Berbagai media buatan yang telah dimodifikasi untuk pembiakan nematoda pada dasarnya mengandung bahan-bahan yang kaya akan nutrisi yang dapat mempercepat perkembangbiakannya dengan kadar air yang disesuaikan kelembabannya.

Data hasil penelitian menunjukkan bahwa NEP dapat dibiakkan secara *in vitro* pada media selain larva serangga. Media dapat diperoleh dengan mudah dan murah seperti yeast diperoleh *dog food* dapat diperoleh di tempat penjual pakan hewan peliharaan, tepung kedelai dapat dibuat dari kacang kedelai, dan hati ayam dapat diperoleh dari membeli di pasar. Untuk selanjutnya bahan-bahan tersebut perlu dibuat formulasi agar siap saji, sehingga memudahkan petani untuk menggunakan media tersebut untuk pembiakan NEP. Formulasi dapat berbentuk bubuk maupun kaplet atau tablet.

Biopestisida NEP dapat dibeli namun daya hidupnya hanya berlangsung kira-kira dua minggu saja, setelah itu banyak yang mati. Dengan ditemukan media pembiakan yang dapat digunakan untuk perkembangan NEP, maka petani dapat membeli biopestisida NEP lalu dapat membiakkan sendiri sehingga lebih irit. Atau dapat mengisolasi NEP dari tanah organik yang banyak mengandung NEP.

Berdasarkan data penelitian yang diperoleh selama 4 minggu, disarankan dalam proses biakan NEP secara *in vitro* sebaiknya panen NEP dilakukan pada minggu pertama atau kedua. Hal ini berdasarkan pada jumlah populasi NEP yang masih tinggi pada minggu pertama atau ke dua. Untuk minggu berikutnya perlu diberi media yang baru lagi agar ketersediaan nutrisi dapat terjaga setiap saat.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Sebanyak tujuh media yang digunakan dalam penelitian ini, media terbaik untuk perkembangbiakan NEP adalah media E yang terdiri dari campuran tepung kedelai dan dog food 1:1. Media E menghasilkan kelimpahan NEP tertinggi pada minggu pertama pembiakan sebesar $3,5 \times 10^4$ ekor/ml. Analisis nutrisi media E mengandung karbohidrat 1,27 %, protein 1,52 % dan lemak 1,09 %.

Saran

Berdasarkan hasil pengamatan selama 4 minggu, disarankan apabila akan membiakkan NEP pada media, sebaiknya NEP dipanen pada minggu pertama atau minggu kedua, saatnya populasi NEP dalam jumlah banyak.

DAFTAR PUSTAKA

- Shapiro DI & Gaugler R., 2002, Production Technology for Entomopathogenic Nematodes and Their Bacterial Symbionts, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28: 137-146.
- Subagiya, 2005, Pengendalian hayati dengan nematoda entomogenus *Steinernema carpocapsae* strain lokal terhadap hama *Crocidolomia binotalis* di Tawangmangu, *Agrosain* 7(1):34-39.