

MEDIA KULTUR ALTERNATIF *IN VITRO* PADA NEMATODA ENTOMOPATOGEN

Alternative In Vitro Culture Media for Entomopathogenic Nematodes

Iqbal Erdiansyah^{1*}, Rio Yudha Pratama¹, Trisnani Alif¹, Tirto Wahyu Widodo¹

¹Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember

Diterima redaksi: 21 Februari 2024/ Direvisi: 09 Mei 2024/ Disetujui: 21 Mei 2024 /

Diterbitkan online: 31 Mei 2024

DOI: 10.21111/agrotech.v10i1.11599

Abstrak. Nematoda entomopatogen (NEP) merupakan agensia hayati prospektif. Kendala perbanyakannya NEP yaitu terbatasnya akses pembelian dan mahalnnya harga media perbanyakannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh komposisi media alternatif terhadap kepadatan populasi NEP. Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus-Desember 2022 menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan yaitu MA (4g tepung bekatul padi), MB (4g ampas kelapa), MC (4 g tepung keong mas), MD (2 g tepung bekatul padi + 2 g ampas kelapa), ME (2 g tepung bekatul padi + 2 g tepung keong mas), MF(2 g ampas kelapa + 2 g tepung keong mas), MG(2 g tepung bekatul padi + 1 g ampas kelapa + 1 g tepung keong mas) dan diulang sebanyak 4 kali. Variabel yang diamati yaitu populasi nematoda. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Tukey 5%. Hasil penelitian menunjukkan media alternatif berpengaruh terhadap kepadatan populasi NEP. Media pertumbuhan MG merupakan media terbaik dengan rata-rata jumlah populasi pada minggu pertama (1044.25J/0.25ml), kedua (1120.75 J/0.25ml), ketiga (177J/0.25ml) dan keempat (89.25J/0.25ml).

Kata Kunci: Media, populasi, ampas kelapa, bekatul, keong mas.

Abstract. Entomopathogenic nematodes (ENPs) are prospective biological agents. The obstacles multiplication of NEP are limited access to purchasing and the high price of multiplication media. This research aims to determine effect of alternative media composition on the population density of Entomopathogenic Nematodes. This research was conducted in August-December 2022 using a completely randomized Design (CRD) with 7 treatments, its MA (4g rice bran), MB (4g coconut pulp), MC (4 g golden snail), MD (2 g rice bran + 2 g coconut pulp), ME (2 g rice bran + 2 g golden snail), MF (2 g coconut pulp + 2 g golden snail), MG (2 g rice bran + 1 g coconut pulp + 1 gram golden snail) was repeated 4 times. The observed variable is densitiy of Nematodes Population. The data obtained were analyzed using ANOVA and continued with the 5% Tukey test. The results showed a significant effect of alternative medium on the NEP population with the best treatment on MG medium, the average population in 1st week (1044.25J/0.25ml), 2st week (1120.75J/0.25ml), 3st week (177J/0.25ml) and 4st week (89.25J/0.25ml)

Keywords: medium, population, coconut pulp, rice bran, golden snail.

* Korespondensi email: iqbal@polije.ac.id

Alamat : Jl. Mastrip, Krajan Timur, Sumbersari, Kec. Sumbersari, Kabupaten Jember, Jawa Timur

PENDAHULUAN

Nematoda yang bersifat endoparasit pada serangga dikenal dengan istilah Nematoda Entomopatogen (NEP). Jenis Nematoda potensial seperti *Steinernema sp.*

dan *Heterorhabditis sp.* yang bersimbiosis dengan bakteri *Xenorhabdus sp.* Bakteri tersebut merupakan agensia hayati yang memiliki kemampuan untuk mengendalikan hama pada ordo

Lepidoptera, Coleoptera, dan Diptera dengan rentang waktu 24-48 jam menggunakan inang serangga yang berkualitas. Perbanyakkan secara *in vivo* dinilai kurang praktis dan cenderung lebih mahal apabila dilakukan dalam skala produksi besar selain itu keterbatasan serangga inang (Kranti dkk, 2020) Perbanyakkan alternatif lain yaitu secara invitro. Dalam perkembangannya perbanyakkan secara *invitro* dengan menggunakan media semi padat dengan komposisi media kaya protein dan lemak hewani, namun dalam skala komersial diketahui tidak ekonomis karena peningkatan kapasitas produksi sejalan dengan peningkatan biaya operasional, waktu yang dibutuhkan, serta rendahnya hasil nematoda (Kranti, dkk. 2020). Kualitas media sangat tergantung dengan komposisi pada media. Sehingga dibutuhkan solusi komposisi media perbanyakkan secara invitro yang bernilai ekonomis dan dapat meningkatkan kerapatan populasi nematoda.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus-Desember 2022 di Laboratorium Fitopatologi Program Studi Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini Menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial dengan 7 perlakuan dan 4 ulangan meliputi :

- MA : 4 g tepung bekatul padi
- MB : 4 g ampas kelapa
- MC : 4 g tepung keong mas
- MD : 2 g tepung bekatul padi + 2 g ampas kelapa
- ME : 2 g tepung bekatul padi + 2 g tepung keong mas
- MF : 2 g ampas kelapa + 2 g tepung keong mas

- MG : 2 g tepung bekatul padi + 1 g ampas kelapa + 1 g tepung keong mas

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA dan diuji lanjut menggunakan uji Post Host Test 5%.

Pengambilan sampel

Pengambilan sampel tanah di lahan Pertanian Organik Dusun Kopang Krajan Desa Darsono, Jember, dengan menggunakan metode Hade, dkk (2020) yang telah dimodifikasi yaitu paralon (diameter 7.5 cm) yang dibenamkan di daerah perakaran tanaman \pm 20 cm dari permukaan tanah dan tanah yang terangkat disimpan dalam plastik yang berlubang.

Pembuatan Media alternatif

Masing-masing media perlakuan ditambahkan 27 ml aquades, dipanaskan dan diaduk hingga homogen, lalu ditambahkan spon *polyurethane* ukuran 1 x 1 cm² dengan ketebalan 2 cm sebanyak 12 spon. Didinginkan dan dilakukan sterilisasi media menggunakan autoklaf suhu 121°C tekanan 1.5 Atm selama 30 menit. pengukuran pH media dilakukan sebelum dan akhir perlakuan dengan menggunakan kertas lakmus yang dicelupkan pada media dan diamkan 1-2 detik, warna yang keluar dari kertas lakmus kemudian dibandingkan dengan indikator warna yang ada didalam kemasan kertas lakmus (Erdiansyah dkk. 2022).

Isolasi agensia

Teknik isolasi dengan menggunakan *insect baiting method* (Vintyas & Purnomo, 2022; Afifah, dkk 2013). Dengan cara menimbang Tanah ditimbang 200 gr sampel tanah dan membenamkan 10 ekor *Tenebrio molitor* dalam wadah plastik tembus udara yang telah dibalut dengan kain kasa. Larva yang mati (\pm 7-14 hari

Media Kultur Alternatif *in Vitro* pada Nematoda Entomopatogen

pembenaman) dibilas dengan aquadest dan dipindahkan ke tempat perangkap nematoda (*white trap*). Ekstraksi nematoda dilakukan dengan meletakkan *T.molitor* diatas kertas saring pada cawan petri (diameter 15 cm) yang berisi cawan petri (diameter 9 cm) dalam posisi terbalik lalu ditambahkan aquades steril hingga mencapai setengah diameter cawan petri (diameter 9cm). Inkubasi *white trap* dilakukan selama 14 hari pada suhu ruang. Infektif juvenil nematoda yang tumbuh pada larva *T. molitor* keluar dan bermigrasi ke dalam air. Warna kulit pada *T. molitor* yang terdapat dalam *white trap* akan luruh bersama air dan ± dua minggu setelahnya dapat dilakukan pemanenan nematoda dan dilakukan identifikasi morfometrik.

Inokulasi NEP

Metode ini menggunakan Sivaramakrishnan and Razia (2021) yang telah dimodifikasi yaitu dengan cara hasil isolasi NEP disterilkan dengan NaClO 1% selama 15 menit dan dibilas menggunakan air steril. Hasil endapan sebanyak 0.25 ml dimasukkan pada masing-masing media. Kepadatan populasi NEP dihitung mulai dari minggu pertama hingga keempat dengan rumus (Indriyanti and Muharromah, 2016):

$$\text{Populasi NEP (J/ml)} = \frac{\text{sampel air media (ml)}}{\text{sub contoh (ml)}} \times \sum \text{NEP}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan morfometrik (tabel 1) menunjukkan morfologi genus *Steinernema sp* pada J3 dengan panjang tubuh kisaran 779-841 (µm), lebar tubuh kisaran 27-41 (µm), dan ekor kisaran 68-78 (µm) (Flores, dkk. 2021). Media alternatif yang digunakan sebagai media perbanyakan NEP memiliki pH yang berbeda-beda (tabel 2). Perbedaan pH diawal dan diakhir minggu pada masing-masing media berasal dari aktifitas

pertumbuhan NEP serta kandungan dari masing-masing media. Perubahan pH pada media perbanyakan NEP dikarenakan adanya aktivitas nutrisi pada bahan yang memiliki kandungan ammonia menyebabkan perubahan pH menjadi basa, yaitu sekitar 5-9 masih dapat ditoleransi untuk perbanyakan NEP (Indriyanti & Muharromah, 2016).

Tabel 1. Rerata Populasi NEP setiap minggu

Nematoda entomopatogen	Rerata (µm)
Panjang tubuh	857,42
Lebar tubuh	37,02
Ekor	80,46

Tabel 2. pH pada media Perlakuan

Perlakuan	pH	
	Minggu awal	Minggu akhir
MA	5	7
MB	5	7
MC	6.5	8
MD	5	7
ME	6	7.5
MF	7	8.5
MG	5.5	7.5

Perbanyakan NEP secara *in vitro* pada berbagai media perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Pada minggu pertama semua media mengalami peningkatan populasi NEP sebagai media perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Pada minggu pertama semua media mengalami peningkatan populasi NEP sebagai media perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Pada minggu pertama semua media mengalami peningkatan populasi NEP dari inokulasi awal (108 J/0.25 ml). berdasarkan uji ANOVA rata-rata jumlah NEP menunjukkan hasil berbeda nyata, dilanjutkan dengan uji Tukey taraf 1%

populasi nematoda setiap minggu sangat beragam (tabel 3).

Tabel 3. Rerata Populasi NEP setiap minggu

Perlakuan	Populasi NEP (J/0.25ml)			
	M1	M2	M3	M4
MA	401.8a	146.8a	74.5a	22.25a
MB	599.3b	702.3b	117.8b	52.25b
MC	282.0c	461.0c	132.5bc	64.25bc
MD	703.8d	768.5b	135.8bc	70.25c
ME	386.3a	534.5c	136.5bc	79.75ce
MF	843.5e	896.5d	146.5c	32.25a
MG	1044.3f	1120.8e	177.0d	89.25e

*Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji tukey 5%

Hasil pengamatan minggu pertama menunjukkan perbedaan yang signifikan dan terjadi peningkatan (awal 108 J/0.25ml) di masing-masing media perlakuan. Rerata tertinggi pada media tepung bekatul, ampas kelapa dan keongmas (1044.25 J/0.25ml) dan rerata terendah pada media keongmas (282 J/0.25ml). tingkat kompleksitas nutrisi pada masing-masing media memiliki pengaruh penting dalam perkembangbiakan NEP. Semakin kompleks nutrisi yang dikandung pada media semakin baik untuk perbanyak NEP. Secara umum kandungan nutrisi lemak, karbohidrat dan protein memiliki peranan penting. Nutrisi dasar lemak merupakan nutrisi kunci yang dibutuhkan oleh siklus hidup NEP sebagai sumber energi terutama pada fase Juvenil 1 (Belur & Malan, 2021). Selain itu, lingkungan sekitar pertumbuhan NEP turut berpengaruh yaitu kelembapan yaitu sebesar 65-85%, Intensitas cahaya 4.8-34 Lux, suhu 29.2-10°C (Indriyanti, 2015).

Pada minggu kedua populasi NEP cenderung meningkat di semua media perlakuan kecuali pada media MA (145.75 J/0.25 ml). Rerata tertinggi didapatkan pada perlakuan MG (1120.75 J/0.25ml)

dimana nutrisi yang dibutuhkan untuk perkembangbiakan NEP tersedia melimpah sehingga memungkinkan percepatan perkembangan biakan dan pertumbuhan populasi NEP (Indriyanti, dkk. 2014). Penurunan populasi NEP pada media tepung bekatul diduga karena berkurangnya sumber nutrisi utama berupa lemak yang digunakan sebagai pertahanan hidup terhadap cekaman lingkungna (Selvan, dkk. 1993).

Pada minggu ketiga dan ke empat trend populasi NEP cenderung menurun. Penurunan ini berkolerasi dengan kebutuhan nutrisi dalam perkembangbiakan NEP terhadap siklus hidup. Pemenuhan Kebutuhan nutrisi dengan baik akan mempercepat siklus hidup NEP dan jika nutrisi tidak terpenuhi maka akan memperpanjang siklus hidup NEP (Ramakuwela, dkk. 2016).

Dari keseluruhan pengamatan setiap minggu media dengan komposisi campuran ampas kelapa, bekatul padi dan tepung keong mas merupakan media yang memiliki populasi NEP paling bagus. Kombinasi komposisi dari sumber hewani maupun nabati merupakan komposisi terbaik untuk perkembangbiakan NEP. Populasi NEP yang bersumber dari media kelapa memiliki jumlah populasi yang sangat banyak (Kalita, dkk. 2019). Media Pertumbuhan NEP dengan nutrisi lipid yang tinggi sangat berpengaruh pada pertumbuhan dan perkembangan NEP (Somwong dan Petcharat, 2012).

KESIMPULAN

Media alternatif berpengaruh terhadap kepadatan Populasi NEP dengan perlakuan paling baik pada media campuran bekatul padi, ampas kelapa dan keong mas cenderung lebih besar rerata kepadatan populasinya dibandingkan dengan media pertumbuhan yang lain.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis ucapkan kepada beberapa partisipan yaitu supervisor, teknisi, dan kolega yang ada di Politeknik Negeri Jember yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd El-Rah, A.M., A. M. Abdelazeem, H. Elbrense, & S. Vergara-i. (2022). *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* as Symbiotic Bacteria for Bio-Control Housefly (*Musca domestica* L.). *Pak. J. Biol. Sci.*, 25(7):586–601 doi: 10.3923/pjbs.2022.586.601.
- Afifah, L., Tri Rahardjo, B. & Tarno, H. (2013). Eksplorasi Nematoda Entomopatogen pada Lahan Tanaman Jagung, Kedelai, dan Kubis di Malang serta Virulensinya terhadap *Spodoptera litura* Fabricius. *Jurnal HPT*, 1(2), pp. 1–9.
- Bultum, L.E., S. A. Emire, and Y. T. Wolde. (2016). Influence of Full Fat Rice Bran From Ethiopian Rice Milling Industries on Nutritional Qualities, Physicochemical and Sensory Properties of Bread and Biscuits. *J. Food Meas. Charact.*, 14(4):2253–2261, doi: 10.1007/s11694-020-00472-7.
- Chaerani. (2011). Pembiakan nematode pathogen seta (Rhabditida: *Heterorhabditis* dan *Steinernema*) pada media semi padat. *J.HPT Tropika*. 1(1):69-77
- Chitra, P., Sujatha, K. and Jeyasankar, A. (2017). Entomopathogenic Nematode as a Biocontrol Agent – Recent Trends – A Review. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4(1), pp. 9–20. doi:10.22192/ijarbs.
- Dunn, M. D., P. D. Belur & A. P. Malan. (2020). A Review of The In Vitro Liquid Mass Culture of Entomopathogenic Nematodes. *Biocontrol Sci. Technol.*31(1): 1–21. doi: 10.1080/09583157.2020.1837072.
- Elbrense, H., A. M. A. Elmasry, M. F. Seleiman, M. S. AL-Harbi, & A. M. Abd El-Raheem. (2021). Can Symbiotic Bacteria (*Xenorhabdus* and *Photorhabdus*) be more Efficient than Their Entomopathogenic Nematodes against *Pieris rapae* and *Pentodon algerinus* Larvae. *Biology*. 10(10):999. doi: 10.3390/biology10100999.
- Erdiansyah, I., Taufika, R., Widodo, T. W., Jannah, D. D., & Prayitno, H. (2022). Viability of biofertilizer bacteria *Rhizobium* spp based on household waste. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 980(1). IOP Publishing.
- Flores, P., Alvarado. A., Lankin, G., Lax, P., Prondan, S., & Aballay, E. (2021). Morphological, molecular and ecological characterization of a native isolate of *Steinernema felriae* (Rhabditida:Steinernematidae) from southern Chile. *Parasites vectors*. 14(45):1-13
- Hade, W.S., Djamilah., & Priyatningsih. (2020). Entomopatogen nematode exploration and virulency against *Spodoptera frugiperda* J.E Smith. *Agritropica*. 3(2):70-81
- Herlina, E., D. Widiastuti, & N. S. Dewi. (2020). Diversification of Tapioka Flour in the Making of Food Fiber Enriched Flakes (*Dietary Fiber*) of Coconut Flour. *ADRI Int. J. Eng. Nat. Sci.* 5(2):1–6 doi: 10.29138/aijens.v5i2.11.
- Indriyanti, D. R. & N. L. Muharromah. (2016). Mass Cultivation of Entomopathogenic Nematode in Artificial Media. *Biosaintifika J. Biol. Biol. Educ.* 8, (1):113–120. doi: 10.15294/biosaintifika.v8i1.5579.
- Joko, T., S. Sulistiyani, O. Setiani, M. Rahardjo, & I. S. Arumdani. (2023). Life Cycle Analysis on Pesticide

- Exposure and Residues in the Environment of Brebes County Shallot Farms and Farmers. *J. Ecol.* 24(3):76–89 doi: 10.12911/22998993/157424.
- Kalita, R. M., J. George., L. Khataniar., G. Devi., & B. Bhattacharyya. (2019). Mass multiplication of entomopathogenic nematodes in artificial media. *Journal of Entomology and Zoology Studies.* 7(5):215-219
- Kranti K.V.V.S., K., Yadav, S. & Patil, J. (2020). Mass Multiplication of Entomopathogenic Nematodes on In Vitro Solid Media. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(3): 565–570. doi: 10.20546/ijcmas.2018.707.382.
- Kumari, B. (2022). Use of Entomopathogenic Nematodes in Recent Trends : A Review. *Pharma Innov. J.* 11(4):30–38.
- Orozco-Hidalgo, M. T., B. Quevedo-Hidalgo, and A. Sáenz-Aponte. (2019). Growth Kinetics and Pathogenicity of *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* SL0708. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 29(1) :71, doi: 10.1186/s41938-019-0172-2.
- P. Somwong dan J. Petcharat. (2012). Culture Of The Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae* (WEISER) On Artificial Media. *ARPJN Journal of Agricultural and Biological Science.* 7(4):229-232
- Pérez-Campos S.-J., A.-I. Rodríguez-Hernández, Ma. del-Rocío López-Cuellar, A. Zepeda-Bastida, and N. Chavarría-Hernández. (2018). In-Vitro Liquid Culture of The Entomopathogenic Nematode, *Steinernema colombiense*, in Orbitally Shaken Flasks. *Biocontrol Sci. Technol.* 28(9):901–911 doi: 10.1080/09583157.2018.1499872.
- Ramakuwela T, Hatting J, Laing M D, Hazir S & Thiebaut N. (2016). Biological characterization of the entomopathogenic nematode, *Steinernema innovationi*: a South African isolate. *Journal of nematology.* 4(50):507-516
- Siahaan, V. N. S., T.H. Wahyuni, A.H. Daulay & S.R. Lubis. (2020). Utilization Of Golden Snail Flour (GSF) on Ration of Quail. *J. Peternak. Integratif.* 8(3):194–201. doi: 10.32734/jpi.v8i3.5098.
- Sivaramakrishnan, S. and M. Razia. (2021). Entomopathogenic Nematodes and Their Symbiotic Bacteria : A Laboratory Manual. in Springer Protocols Handbooks. New York, NY: Springer US,. doi: 10.1007/978-1-0716-1445-7.
- Vintyas, R.M. & Purnomo, H. (2022). Larva *Hermetia illucens* dan *Alphitobius diaperinus* terhadap Produksi Nematoda Entomopatogen *Steinernema* spp. *Jurnal penelitian agronomi.* 24(1):63-67
- Zhang, F., Makirita, Winisia E., Wu, L., Gou, Y., Liu, Y., Peng, L., Chacha, M., Mbega, E. R., Li, X., He, N., & Liu, T. (2019). Effects of Growth Conditions on the Forms of *Xenorhabdus nematophila*: A Symbiotic Bacterium of the Entomopathogenic *Steinernema carpocapsae*. *J. Biobased Mater. Bioenergy,* 13(3): 346–352. doi: 10.1166/jbmb.2019.1867.
- Zhen, S., Yang, L., , Yanli, H.,, Xinghui G.,, Limeng, Z., Weibin, R., & David, S. (2018). Enhanced Entomopathogenic Nematode Yield and Fitness via Addition of Pulverized Insect Powder to Solid Media. *J. Nematol.* 50(4): 495–506. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2018-050>