



Karakteristik Morfologi dan Fisiologi Beberapa Isolat Lokal Bakteri Simbiose Nematoda Entomopatogen Kompleks Serta Uji Virulensi pada Larva *Plutella xylostella*

M. Harabap dan D. Sulistyanto

Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian - Universitas Jember
Jl. Kalimantan IV/86 Jember 68121

ABSTRACT

Local isolates of entomopathogenic nematodes are symbiotically associated with bacteria of the genus *Xenorhabdus* or *Photorhabdus*. Symbiont bacteria isolated from local isolates of entomopathogenic nematode (Pujon, Cemoro Lawang and *X. nematophilus*) were identical with *Xenorhabdus* spp and isolate of Ngadas was identical with *Photorhabdus luminescens*. Some isolates, such as *Xenorhabdus* (isolate of Pujon) and *P. luminescens* (isolate of Ngadas) had capability to produce antibiotic against *Bacillus pumilus*. The results of virulence tests against larvae of *Plutella xylostella* indicate that *P. luminescens* (isolate of Ngadas) has a high virulence when the bacteria was injected into insect haemocoel. High virulence was indicated by *Xenorhabdus nematophilus* when it was applied orally.

Key words: Bakteri simbiose, isolat lokal, *Xenorhabdus* spp., *Photorhabdus luminescens*, antibiotik, virulensi, *Plutella xylostella*.

PENDAHULUAN

Xenorhabdus spp. dan *Photorhabdus* spp. famili Enterobacteriaceae merupakan bakteri yang berasosiasi secara spesifik dengan nematoda jenis *Steinernema* spp. dan *Heterorhabditis* spp. (Ehlers, 1996). Bakteri simbion tersebut terdapat pada bagian depan dan pertengahan saluran pencernaan nematoda, kemudian akan dilepaskan ke dalam tubuh serangga dan berperan dalam proses terbunuhnya serangga inang dengan memproduksi toksin dan menyebabkan *fatal septisemia* (Jarosz, 1996).

Nematoda entomopatogen dan asosiasinya dengan bakteri aman bagi binatang berdarah panas dari vertebrata,

dan manusia. Bakteri simbion *Xenorhabdus* dan *Photorhabdus* diketahui mengekskresikan beberapa senyawa metabolisme dalam medium broth. Peneliti-an lebih jauh melaporkan bahwa bakteri simbion tidak bersifat toksik dan berisiko rendah bagi manusia terhadap alergi akibat reaksi melawan protein spesifik dari kompleksitas nematoda bakteri (Boemare *et al.*, 1996).

Di Indonesia telah ditemukan Nematoda entomopatogen dari berbagai daerah. Sebagai bagian dari asosiasi dengan nematoda, bakteri *Xenorhabdus* dan *Photorhabdus* mempunyai peranan penting dalam membunuh serangga. Beberapa penelitian telah mengetahui kemampuan bakteri simbion *Xenorhabdus*.



nematophilus dan *Photorhabdus* dalam mengendalikan beberapa serangga seperti *Galleria mellonella*, *Popilia japonica* dengan persentase kematian rata-rata diatas 60% (Yeh and Alm, 1992), tetapi untuk serangga *Plutella xylostella* belum ada laporan lebih lanjut. Untuk itu perlu diuji kemampuan bakteri simbiose tersebut dalam membunuh serangga terutama hama *P. xylostella* terlepas dari simbiosenya terhadap nematoda entomopatogen sehingga dapat diketahui potensinya sebagai bioinsektisida.

BAHAN DAN METODE

Isolat Nematoda Entomopatogen.

Nematoda entomopatogen yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat lokal Pujon (*Steinernema* spp), Ngadas (*Heterorhabditis indica*), Cemoro Lawang (*Steinernema* spp) dan *Steinernema carpocapsae* yang diperoleh dari koleksi yang ada di laboratorium Perlindungan Tanaman Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Isolasi Bakteri Simbiose Nematoda Entomopatogen.

Bakteri yang berada dalam intestine nematoda di isolasi dengan cara menginokulasi larva *Tenebrio molitor* dalam cawan petri yang diberi kertas saring dengan nematoda entomopatogen dan diinkubasi. Setelah 48 jam serangga yang mati disterilkan dengan alkohol 70% selama 2 - 3 menit, kemudian dibilas dengan air steril tiga kali dan dikering-

kan. *Haemolymph* serangga diambil dengan memotong tungkai ke tiga toraks serangga dan digoreskan pada media McConkey [(McConkey (MERCK) 50 g, Aquadest 1000 ml)]. Hasil goresan di inkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan bakteri bentuk primer. Koloni merah yang muncul diambil dengan jarum ose dan dibiakkan pada media [Yeast Salt ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,5 g, K_2HPO_4 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, NaCl 5 g, Yeast Ekstrak (DIFCO) 5 g, Aquadest 1000 ml)] selama 24 jam yang digoyang 400-500 rpm dalam gelap. Setelah itu bakteri diberi glycerol 15% dan dimasukkan dengan mikropipet Eppendorf dalam caps berukuran 2 ml serta disimpan pada suhu -20°C .

Identifikasi Bakteri dengan Uji Karakteristik Morfologi.

Identifikasi bakteri nematoda entomopatogen isolat lokal dilakukan dengan melihat karakteristik morfologi bakteri yang ditumbuhkan pada beberapa media yang berbeda antara lain NA (Nutrient Agar DIFCO 37 g, Aquadest 1000 ml), McConkey dan NBTA (NA) 37 g, Bromothymol Blue (BTB) 0,025 g, Aquadest 1000 ml, $\text{pH} \geq 8,5$ setelah 50°C ditambah TTC (Tetra Tri Chlorine) 4 g kemudian tambahkan 2-3 ml aquadest dan sterilkan lewat millipore 0,2 μm (Gerritsen and Krasomil-Osterfeld, 1994) dan mengamati penyerapan warna, besar koloni serta bentuk koloni dari masing-masing isolat. Untuk pengamatan secara



mikroskopis digunakan pewarnaan negatif dengan tinta cina. Hasil pewarnaan tersebut diamati dengan mikroskop pada pem-besaran 1000x untuk membandingkan ukuran dan bentuk sel masing-masing bakteri.

Identifikasi Bakteri dengan Uji Gram.

Gelas obyek diberi satu tetes KOH 3%, kemudian koloni bakteri berumur 24 jam diambil dengan jarum *ose* dan diletakkan di atasnya, dicampur dan diaduk sampai merata. Jika campuran bersifat lengket setelah diangkat sekitar 1 cm, maka bakteri tersebut bersifat gram negatif, dan jika tidak lengket maka bakteri tersebut bersifat gram positif.

Identifikasi Bakteri dengan Uji Katalase.

Gelas obyek ditetesi dengan satu tetes H₂O₂ 3%, kemudian koloni bakteri berumur 24 jam diambil dengan jarum *ose* dan diletakkan di atasnya, dicampur dan diaduk sampai merata. Reaksi positif ditandai dengan terdapatnya gelembung-gelembung udara, sedangkan reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung-gelembung udara.

Identifikasi Bakteri dengan Uji Fluorescens.

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui fluoresensi, pijaran warna hijau atau biru. Bakteri yang akan diuji ditumbuhkan pada medium King's B

dan diinkubasi selama tiga hari pada suhu kamar. Bila dibawah sinar ultra violet bakteri berpendar hijau kebiruan, maka bakteri menghasilkan senyawa fluorencens dan uji bersifat positif.

Identifikasi Bakteri dengan Uji Bioluminescens.

Pengujian ini bertujuan untuk membedakan jenis bakteri dari golongan *Xenorhabdus* dan *Photorhabdus*. Nematoda entomopatogen dari golongan *Heterorhabditis* bersimbiose dengan bakteri *Photorhabdus* yang menghasilkan bioluminescens (Boemare *et al.*, 1996). Bakteri yang diuji disuntikkan ke dalam tubuh serangga *Tenebrio molitor*, dan serangga yang mati diamati perubahan warna tubuhnya. Warna kemerahan pada tubuh serangga yang mati menunjukkan bakteri positif dari golongan *Photorhabdus*. Sedangkan warna coklat karamel pada tubuh serangga menunjukkan bakteri tersebut berasal dari golongan *Xenorhabdus*.

Uji Aktifitas Antibiotik terhadap *Bacillus pumilus*.

Uji aktifitas antibiotik bertujuan untuk mengetahui kemampuan antibiotik dari bakteri simbiose nematoda entomopatogen melawan *Bacillus pumilus*. Bakteri dititikkan pada media NA sebanyak 4 titik dan diinkubasi selama 48 jam. Bakteri *B. pumilus* dibiakkan dalam media YS (Yeast Salt) dan diinkubasi selama 24 jam dalam *shaker* 400-500 rpm. Setelah diinkubasi, biakan



B. pumilus diberi 40% NA bersuhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ dan dituang ke permukaan biakan bakteri 48 jam mem-bentuk lapisan diatas bakteri simbiose nematoda entomopatogen. Dua lapis agar tersebut di inkuba-si selama 24 - 48 jam dan diamati zona penghambatan di sekitar bakteri nematoda entomo-patogen.

Uji Virulensi Bakteri Simbiose Nematoda Entomopatogen terhadap Larva *Plutella xylostella*.

Dua isolat yaitu *Xenorhabdus nematophilus* dari nematoda entomopatogen *S. carpocapsae* (All. Strain) dan *Photorhabdus luminescens* dari nematoda entomopatogen *Heterorhabditis indica* isolat Ngadas dipilih untuk diuji virulensinya terhadap larva *Plutella xylostella* dengan menggunakan dua metode uji yaitu metode injeksi dan metode oral. Bakteri yang diuji virulensinya berada pada fase primer sedangkan larva *P. xylostella* yang digunakan adalah instar empat untuk perlakuan injeksi dan instar tiga untuk metode oral. Serangga yang diuji sebanyak 10 larva untuk masing-masing perlakuan konsentrasi dan diulang sebanyak 3 kali.

Metode Injeksi.

Dalam pengujian ini bakteri fase primer disuntikkan ke dalam tubuh serangga dengan menggunakan *microsyringe* sebanyak 2 μl . Dalam metode ini dilakukan uji pendahuluan dengan menyuntikkan 0 (Kontrol), 86, 860, 8.600, 86.000, 860.000 sel/ml bakteri *X.*

nematophilus dan 0 (Kontrol), 12, 120, 1.200, 12.000, 120.000 sel/ml bakteri *Photorhabdus luminescens* (isolat Ngadas). Melalui regresi sederhana untuk mencari 50% kematian, diperoleh konsentrasi untuk pengujian bakteri *X. nematophilus* sebesar 0 (Kontrol), 500, 1500, 2500, 3500 dan 4500 sel/ml untuk *P. xylostella*. Sedangkan untuk bakteri *P. luminescens* (isolat Ngadas) diperoleh konsentrasi sebesar 0 (Kontrol), 20, 70, 120, 170, 220. Kematian serangga diamati selama 24 - 72 jam.

Metode Oral.

Bakteri fase primer yang diuji diambil dari caps, ditumbuhkan dalam medium YS selama 24 jam dan dilakukan seri pengenceran dari 10^{-1} s/d 10^{-6} dengan diketahui jumlah konsentrasi bakteri yang ada dalam medium. Kubis dipotong-potong sebesar 3 cm x 3 cm, digores dan direndam dalam masing-masing seri pengenceran selama 5 menit kemudian diberikan pada masing-masing serangga sebagai pakan. Kematian serangga diamati 24 - 72 jam.

Analisa Data.

Uji Pendahuluan dari penelitian dianalisa dengan menggunakan analisis regresi sederhana untuk menemukan konsentrasi bakteri yang menyebabkan kematian serangga mencapai 50% ($L_c 50$). Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis dengan analisis probit untuk mengetahui jumlah sel bakteri



yang dibutuhkan untuk membunuh 50 % larva *Plutella xylostella*.

HASIL

Karakteristik Morfologi Beberapa Bakteri Simbiose Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal.

Bakteri *Xenorhabdus* maupun *Photorhabdus* cenderung menghasilkan dua bentuk fase berbeda. yang disebut dengan bentuk primer (fase I) dan bentuk sekunder (fase II). Bentuk primer dapat dilihat dari sel yang berbentuk batang pendek dan terlihat tidak aktif, sedangkan bakteri sekunder berbentuk batang panjang.

Pada media selektif seperti Mc-Conkey, koloni yang terbentuk dari bakteri primer menyerap *neutral red media*, sedangkan bakteri sekunder tidak. Pada media NBTA fase primer keempat bakteri tersebut menunjukkan terjadi penyerapan BTB, Sedangkan fase sekunder tidak terjadi penyerapan BTB.

Bentuk morfologi secara umum koloni fase primer dari tiga jenis bakteri isolat lokal dan *Xenorhabdus nematophilus* adalah bulat mengkilat menyerupai lendir, cembung, tepi agak rata dengan struktur dalam meneruskan cahaya. Fase sekunder menunjukkan karakteristik koloni yang berbentuk bulat, agak cembung, tepi agak rata, struktur dalam menyerupai pasir halus dengan meneruskan sinar meskipun benda dibawahnya tidak semua terlihat dengan jelas (Woodring and Kaya, 1988) (Tabel 1).

Karakteristik Fisiologi Beberapa Bakteri Simbiose Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal.

Identifikasi secara fisiologis terhadap keempat bakteri yang diuji menunjukkan persamaan dengan bakteri jenis *Xenorhabdus* atau *Photorhabdus* yang telah diteliti sebelumnya. Bakteri simbiose yang diuji merupakan bakteri Gram negatif, dan yang membedakan bakteri tersebut dari golongan *Xenorhabdus* atau *Photorhabdus* adalah Katalase (+) dan Bioluminescens (+) untuk golongan *Photorhabdus* yang ditunjukkan oleh bakteri simbiose isolat Ngadas., sedangkan *Xenorhabdus* bereaksi negatif. Hasil pengamatan beserta uji fisiologis yang pernah dilakukan dapat dilihat pada Tabel 2

Hasil pengujian terhadap *X. nematophilus* dan *Xenorhabdus sp.* (isolat Cemoro Lawang) menunjukkan tidak adanya aktifitas antibiotik melawan *B. pumilus* atau bisa dikategorikan sangat lemah. Hal ini ditunjukkan oleh tidak adanya zona penghambatan yang terlihat pada lapisan agar. Sebaliknya hasil uji terhadap *Xenorhabdus sp.* (isolat Pujon) dan *P. luminescens* (isolat Ngadas) menunjukkan adanya aktifitas antibiotik melawan *B. pumilus* setelah 24 jam dengan diameter zona yang berbeda pada masing-masing bakteri.



Tabel 1. Hasil Pengamatan Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal pada Beberapa Media

Karakteristik Morfologi	Bakteri Simbiiose Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal			
	<i>P. luminescens</i> (isolat Ngadas)	<i>Xenorhabdus</i> sp. (isolat Pujon)	<i>Xenorhabdus</i> sp. (isolat C. Lawang)	<i>Xenorhabdus</i> <i>nematophilus</i>
Koloni pd media Nutrient Agar				
Primer	Bulat mengkilat menyerupai lendir, cembung, tepi agak rata dengan struktur dalam meneruskan cahaya, warna koloni putih susu.			
Sekunder	Bulat, agak cembung, tepi agak rata, struktur dalam menyerupai pasir dengan warna koloni putih susu kekuningan.			
Koloni pd media McConkey				
Primer	Bulat mengkilat menyerupai lendir, cembung, tepi agak rata dengan struktur dalam meneruskan cahaya, warna koloni merah jernih, terjadi penyerapan <i>neutral red</i> dengan memperlihatkan zona jernih pada media.			
Sekunder	Bulat, agak cembung, tepi agak rata, struktur dalam menyerupai pasir halus dengan meneruskan sinar meskipun benda dibawahnya tidak semua terlihat dengan jelas, warna koloni bagian tengah merah dengan bagian tepi berwarna lebih muda, tidak terjadi penyerapan <i>neutral red</i> dengan tidak adanya zona jernih pada media.			
Koloni pd media NBTA				
Primer	Bulat, cembung, tepi agak rata, struktur dalam meneruskan cahaya, warna biru jernih, terjadi penyerapan <i>BTB</i> dengan memperlihatkan zona jernih pada media.			
Sekunder	Bulat, cembung, tepi agak rata, struktur dalam menyerupai pasir halus dan meneruskan sinar meskipun benda dibawahnya tidak semua terlihat dengan jelas, warna koloni bagian tengah merah dengan bagian tepi berwarna lebih muda, tidak terjadi penyerapan <i>BTB</i> dengan tidak adanya zona jernih pada media.			
Bentuk Sel				
Primer	Batang pendek dan ada yang agak panjang	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek
Sekunder	Batang panjang	Batang panjang	Batang panjang	Batang panjang

Uji Virulensi Bakteri Simbiiose Nematoda Entomopatogen pada Larva *Plutella xylostella*.

Gejala serangan yang terlihat pada larva *P. xylostella* dan *T. molitor* yang terinfeksi *X. nematophilus* adalah terjadinya perubahan warna tubuh yang semula hijau dan coklat muda untuk masing-masing serangga menjadi coklat karamel dan akhirnya coklat kehitaman, sedangkan untuk gejala yang disebabkan oleh *P. luminescens* (isolat Ngadas) menunjukkan perubahan warna menjadi coklat agak kemerahan.

Diantara isolat bakteri yang diuji, *X. nematophilus* dan *P. luminescens* isolat

Ngadas, virulensi yang baik pada perlakuan melalui pakan (oral) terdapat pada bakteri *X. nematophilus*. Kemampuan membunuh sebesar 50% (LC_{50}) lewat pakan tersebut membutuhkan sejumlah 695.196 sel bakteri/ml sedangkan pada *P. luminescens* isolat Ngadas jauh lebih besar yaitu $5,8 \times 10^9$ sel bakteri/ml (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Karakteristik Morfologi dan Fisiologi.

Bakteri simbiiose nematoda entomopatogen mempunyai 2 fase yang

**Tabel 2.** Hasil Pengujian Sifat-sifat Fisiologis Bakteri Simbiose Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal

No.	Jenis Pengujian	Hasil uji fisiologis isolat				<i>Xenorhabdus</i> menurut	
		NG	P	CL	Xn	Woodring and Kaya (1988)	Aguilera et al. (1993)
1.	Gram	-	-	-	-	-	-
2.	Katalase	+	-	-	-	-	-
3.	Fluorescens	-	-	-	-	-	-
4.	Fermentasi Laktosa (Mc. Conkey)	+	+	+	+	+	-
5.	Pigmentasi pada Serangga (Bioluminescens)	+	-	-	-	-	-
6.	Aktifitas antibiotik Melawan <i>Bacillus pumilus</i>	+	+	-	-	(+) pada <i>Photorhabdus luminescens</i>	-
	Diameter zona Penghambatan (mm)						
	24 jam	-	.5	-	-		
	48 jam	1,5	2,5	-	-		

Keterangan: NG = Bakteri *Photorhabdus luminescens* (isolat Ngadas), CL = Bakteri *Xenorhabdus* sp. (isolat Cemoro Lawang), P = Bakteri *Xenorhabdus* sp. (isolat Pujon), Xn = Bakteri *Xenorhabdus nematophilus* (All strain), Table 3. Virulensi Bakteri Simbiose Nematoda Entomopatogen yang dinyatakan dalam LC₅₀.

Table 3. Virulensi Bakteri Simbiose Nematoda Entomopatogen yang dinyatakan dalam LC₅₀

Perlakuan	Nilai LC ₅₀ (sel bakteri/ml) pada	
	<i>P. luminescens</i> (isolat Ngadas)	<i>X. nematophilus</i>
Injeksi	$1,9 \times 10^7$	4.704,35
Oral	$5,8 \times 10^9$	695.168

berbeda yang dapat berubah dengan cepat. Dalam hal ini Boemare *et al.* (1996) mengemukakan bahwa bakteri fase I terdapat dalam bentuk yang tidak stabil dengan bentuk batang pendek sebesar 80 - 90% dan batang panjang (*pleomorphic*). Fenomena fase yang berbeda dalam morfologi dan fisiologi bakteri menurut Kaya and Koppenhofer (1996) dalam Poiner *et al.*, (1989) dipengaruhi oleh aktifitas lytic yang hanya dijumpai pada fase I dan tidak dijumpai pada fase II.

Perbedaan yang jelas antara bakteri golongan *Photorhabdus luminescens* dan *Xenorhabdus* sp. adalah pada terjadi-

nya bioluminescens. Proses biooksidasi yang merubah energi kimia menjadi energi sinar inilah yang menjadi ciri utama bakteri simbiose golongan *Photorhabdus* yang dapat dilihat oleh mata telanjang pada tubuh serangga maupun dalam ruang gelap.

Dengan adanya aktifitas antibiotik dari bakteri simbiose yang diuji dapat disimpulkan bahwa *Xenorhabdus* sp. (isolat Pujon) dan *P. luminescens* isolat Ngadas mempunyai virulensi dan aktifitas menghambat mikroorganisme sekunder yang cukup besar. Senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh bakteri berupa hydrocyl- dan acetoxyl- yang merupa-



Gambar 1. Zona Penghambatan Bakteri Simbiosis Nematoda Entomopatogen terhadap *Bacillus pumilus*

kan turunan senyawa indol, 4-ethyl- dan 4-isophrophyl-3, 5-dihydrooxy-transitive stilbenes (Paul *et al.*, 1981 dalam Jarosz, 1996), molekul organik (xenocoumarins dan xenor-habdins) dan bakteriosin seperti xenor-habdins menciptakan suasana yang ideal bagi pertumbuhan dan perkembangan bakteri dan menghambat bakteri sekunder lain di dalam tubuh serangga (Boemare *et al.*, 1996).

Uji Virulensi Bakteri Simbiosis Nematoda Entomopatogen terhadap Larva *Plutella xylostella*.

Dalam kemampuan membunuh serangga tidak terlepas dari substrat-substrat yang dike-luarkan oleh bakteri seperti protease, lipase, lecithinase, DNAase dan phosphatase. Selain itu adanya entomotoksin (eksotoksin dan endotoksin) mempengaruhi proses kematian pada serangga (Boemare *et al.*, 1996), menghasilkan perilaku yang progresif dan berlanjut dengan kelumpuhan dan kejang-kejang otot selama tujuh menit sebelum mati (Simoes, 1998). Warna kemerahan yang disebabkan bakteri *Photobabidus* dika-

renakan bakteri ini menghasilkan bioluminescens (Woodring and Kaya, 1988).

Diantara isolat bakteri yang diuji, *X. nematophilus* dan *P. luminescens* isolat Ngadas, virulensi yang baik dengan perlakuan melalui pakan (oral) terdapat pada bakteri *X. nematophilus*. Fenomena ini berbeda dengan metode injeksi dimana bakteri yang virulen adalah *P. luminescens* (isolat Ngadas). Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh perbedaan persistensi bakteri pada permukaan daun dari pengaruh faktor luar. Dalam hal ini, *X. nematophilus* lebih mampu mengatasinya dibandingkan *P. luminescens* (isolat Ngadas). Menurut Ehlers (1996) bakteri membutuhkan nematoda untuk melindungi dirinya dari kondisi luar yang dapat membunuhnya, sehingga kepekaan terhadap kondisi lingkungan sangat menentukan hidup atau matinya sel bakteri. Dalam kasus ini adapat dikemukakan asumsi sementara bahwa bakteri *P. luminescens* (isolat Ngadas) lebih rentan pada kondisi lingkungan dibandingkan *Xenorhabdus nematophilus*.



Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa bakteri simbiose nematoda entomopatogen, terutama isolat lokal, mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai bioinsektisida. Dari hasil penelitian, bakteri ini tidak mampu hidup pada kondisi suhu tubuh manusia maupun mamalia lainnya (Ehlers *et al.*, 2000) sehingga sangat aman untuk bioinsektisida masa depan.

DAFTAR PUSTAKA

- Boemare, N.E., C. Laumond, and H. Mauleon. 1996. The entomopathogenic nematode-bacterium complex, biology, life cycle and vertebrate safety. *Biocontr. Sci. Technol.* 6(3):333-346.
- Ehlers, R.U. 1996. Current and future use of nematodes in biocontrol: practise and commercial aspects with regard to regulator policy issues. *Biocontr. Sci. Technol.* 6(3):304-315.
- _____, I. Niemann, S. Hollmer, O. Strauch, D. Jende, M. Shanmugasundaram, U.K. Mehta, S.K. Easwaramoorthy, and A. Burnell. 2000. Mass production potential of the Bacto-Helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica-Photorhabdus luminescens*. *Biocontr. Sci. Technol.* 10, 607-616.
- Geritsen, L.J.M and K.C.K. Osterfeld. 1994. Characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* strain and form variants, Summary of a Practical Work Shop Session. *Biotechnol.: Genetics of Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complex*. European Commission. p. 194-203.
- Jarosoz, J. 1996. Do antibiotic compound produced in vitro by *Xenorhabdus* nematophilus minimize the secondary invasion of insect carcasses by contaminating bacteria? In Paul *et al.* (1981). Antibiotics in microbial ecology isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. 42:367-377
- Krasomil-Osterfeld, K.C. 1994. Phase variation in *Photorhabdus*, *Xenorhabdus* and other bacteria a review. *Biotechnol.: Genetics of Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complex*. European Commission. p. 194-203.
- Kaya, H.K. and A.M. Koppenhofer. 1996. *Biocontr. Sci. Technol* In Poinar, G. O., Jr. R. Hess, W. Lanier, S. Kinney and J. White. 1989. Preliminary observations of a bacteriophage infecting *Xenorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae). 6:351-371.
- Simoës, N. 1998. Pathogenicity of complex *Steinernema carpocapsae*, *Xenorhabdus nematophilus*: molekular aspects related with virulence, Entomopathogenic nematodes, Pathogenic of nematodes versus insect defence: impact on selection of virulent strains, *Proceedings of a workshop held at Universidade dos Açores 17 to 20 March 1996*. Ponta Delgada, Açores, Portugal, European Commission, p. 194-203.
- Woodring, J.L. and H.K. Kaya. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Biology and Techniques. *Southern Cooperative Series Bulletin 331*. Arkansas Agriculture Experiment Station. Fayetteville. Arkansas.
- Yeh, T. and S. R. Alm. 1992. Effects of entomopathogenic nematode species, rate, soil moisture, and bacteria on control of japanesa beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae in the laboratory. *J. Econ. Entomol.* 85:2144-2147.