

KAJIAN PRODUKSI BIOINSEKTISIDA DARI *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* PADA MEDIA TAPIOKA

Abdul Aziz Darwis, Khaswar Syamsu, Ummi Salamah

Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis subsp *israelensis* (*B.t.i*) as one of the *Bacillus thuringiensis* (*B.t*) species produces crystal protein called delta endotoxin. As other *B.t* crystal protein, this crystal is specifically toxic to mosquitoes and blackflies. This research of *B.t.i* fermentation used tapioca as carbon source and urea as nitrogen source. The composition of media fermentation used were 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5% and 3.0% of tapioca, and 1% urea. The result shows that *B.t.i* was able to grow in all treatment units. Bioassay shows that the best performance was obtained from media with 2.0% tapioca.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, tapioca

PENDAHULUAN

Penggunaan insektisida kimia sering menyebabkan efek samping yang tidak diinginkan, seperti serangga menjadi resisten, matinya serangga bukan target serta kerusakan ekosistem. Oleh karena itu dibutuhkan agen biologi yang mempunyai sifat-sifat seperti insektisida kimia, yaitu mempunyai toksisitas tinggi terhadap serangga target, dapat diproduksi pada skala industri, mempunyai masa simpan lama dan mudah dalam transportasi (Margalit, 1990).

Salah satu mikroorganisme patogen terhadap serangga adalah *Bacillus thuringiensis* (*B.t*). Bakteri ini mampu membentuk kristal protein dengan nama δ -endotoksin yang bersifat toksik terhadap serangga yang termasuk dalam ordo Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Mallophaga dan Acan. Salah satu spesies *B.t* adalah *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* (*B.t.i*) yang mampu membunuh larva nyamuk dan lalat hitam.

Kendala dalam produksi bioinsektisida di Indonesia adalah bahan baku fermentasi yang masih impor. Pada umumnya, fermentasi *B.t.i* menggunakan dekstrosa sebagai sumber karbon. Sumber karbon ini dapat disubstitusi dengan menggunakan tapioka, karena dalam tapioka terkandung 86.9% pati.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kombinasi terbaik antara tapioka sebagai sumber karbon dan urea sebagai sumber nitrogen dalam produksi bioinsektisida, kinetika fermentasi *B.t.i* dan toksisitas bioinsektisida yang dihasilkan terhadap larva nyamuk *Culex sp*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah tapioka dan urea. Mikroorganisme yang digunakan adalah isolat *B.t.i* yang diperoleh dengan membiakkan *B.t.i* dari Vectobac.

Bahan kimia yang digunakan adalah *nutrien broth* (NB), *nutrien agar* (NA), HCl, NaOH, MgSO₄.7H₂O, MnSO₄.7H₂O, FeSO₄.7H₂O, ZnSO₄.7H₂O, CaCO₃, H₂SO₄ pekat, garam fisiologis, *naphtol blue black*, fenol, asam asetat, *basic fuchsin*, etanol 98 persen, air suling dan spiritus. Selain itu dibutuhkan larva nyamuk *Culex sp* untuk bioassay.

Alat-alat yang digunakan adalah *rotary shaking incubator*, otoklaf, pH meter, sentrifuse, oven, spektrofotometer, timbangan analitik, desikator, soxhlet dan alat gelas lainnya.

Metode Penelitian

Persiapan medium fermentasi

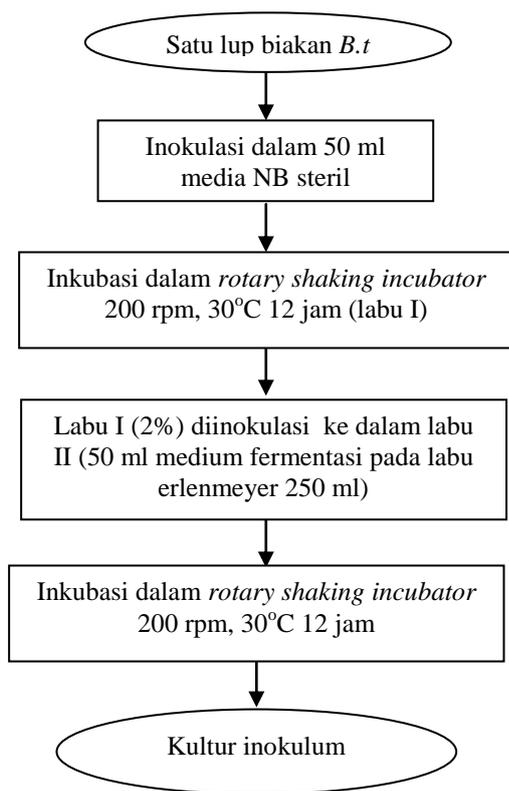
Persiapan medium fermentasi dilakukan dengan cara : melarutkan tepung tapioka dan CaCO₃ dengan larutan *buffer* dan disterilkan secara terpisah. *Trace element* dicampur dengan urea dan disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah steril, larutan tapioka dicampur dengan *trace element* secara aseptis. Perlakuan yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Susunan Medium Fermentasi

No	Media	Komposisi	
		tapioka	urea
1.	A1	0.5 %	1 %
2.	A2	1.0 %	1 %
3.	A3	1.5 %	1 %
4.	A4	2.0 %	1 %
5.	A5	2.5 %	1 %
6.	A6	3.0 %	1 %

Persiapan inokulum

Inokulum (kultur bibit) fermentasi disiapkan secara bertahap mengikuti metode Vandekar dan Dulmage (1982). Diagram alir persiapan inokulum disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram alir persiapan inokulum

Fermentasi

Fermentasi *B.t* dilakukan secara batch pada erlemeyer 250 ml dengan volume 150 ml dan diinkubasi pada *rotary shaking incubator* 200 rpm suhu 30°C selama 48 jam.

Pengambilan contoh

Pengambilan contoh (*sampling*) dilakukan sebanyak 10 kali dengan volume 7.5 ml pada waktu inkubasi 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36 dan 48 jam.

Analisis

Analisis selama fermentasi meliputi pengukuran pH, bobot kering biomassa, *Optical Density* (OD), *Total Plate Count* (TPC), *Viable Spore Count* (VSC) dan kadar gula sisa.

Bioassay

Bioassay dilakukan dengan memasukkan 10 ekor larva nyamuk *Culex sp.* pada cairan fermentasi dengan berbagai tingkat pengenceran. Mortalitas larva dihitung setelah inkubasi selama 24 jam.

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan satu faktor. Faktor yang dipakai adalah kadar tapioka yang terdiri dari 6 taraf. Dengan demikian terdapat 6 unit perlakuan dengan 2 kali ulangan. Model yang digunakan untuk desain ini adalah :

$$Y_{ij} = \mu + A_i + \Sigma j_{(i)}$$

Dimana :

Y_{ij} = variabel respon dari hasil observasi ke-j karena perlakuan ke-i; dengan i = 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan j = 1, 2

μ = rata-rata sebenarnya

A_i = efek perlakuan ke-i

$\Sigma j_{(i)}$ = efek unit eksperimen ke-j disebabkan oleh perlakuan ke-i

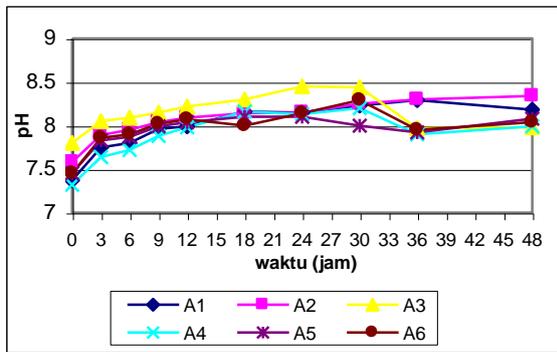
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pola Perubahan pH

Selama fermentasi, nilai pH berada pada selang 7.37-8.29. Nilai pH ini masih berada pada kisaran pH pertumbuhan *Bacillus thuringiensis*. Secara umum, *Bacillus thuringiensis* dapat tumbuh pada pH 5,5 – 8,5 dengan pertumbuhan optimum pada pH 6,5 – 7,5 (Bernhard dan Utz, 1993). Gambar 2 memperlihatkan pola perubahan pH selama fermentasi.

Secara umum, pola perubahan pH untuk semua perlakuan hampir sama. Nilai pH cenderung naik sampai fermentasi jam ke- 30. Kenaikan ini disebabkan karena reaksi pada urea. Sneath (1986) mengatakan bahwa *Bacillus thuringiensis* diketahui memiliki enzim urease. Adanya aktivitas enzim urease akan mengubah urea menjadi ammonium bikarbonat dengan reaksi kimia :





Gambar 2. Grafik hubungan antara pH terhadap waktu fermentasi

Reaksi kimia tersebut menyebabkan urea terlarut dalam air dan berlangsung selama 48 jam. Adanya reaksi tersebut akan menyebabkan peningkatan pH larutan hingga 8.5 (James, 1983). Pada penelitian ini, ada kemungkinan reaksi hidrolisis urea belum selesai. Hal ini disebabkan karena campuran urea dan *trace element* belum sampai pada jam ke-48, sehingga pH larutan masih belum stabil.

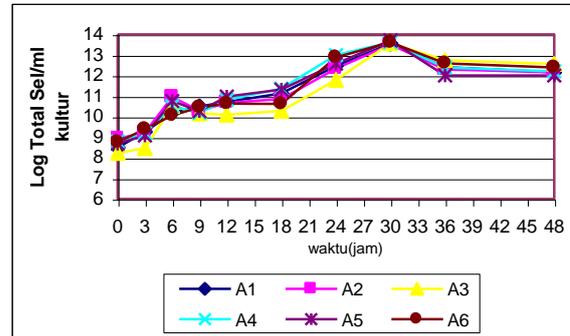
Rata-rata pada jam ke-36 fermentasi, nilai pH medium menurun. Penurunan ini disebabkan karena dalam medium terjadi proses katabolisme glukosa yang menyebabkan terakumulasinya asam dalam medium. Mengutip pendapat Benoit et al (1990) yang mempelajari fermentasi *Bacillus thuringiensis* HD-1 dalam medium glukosa-tripton-mineral, bahwa asam-asam yang terakumulasi tersebut adalah asam laktat, asam piruvat, asam asetat dan asetoin. Peningkatan kembali nilai pH selama fermentasi disebabkan oleh pemanfaatan kembali asam asetat yang terakumulasi dalam medium untuk memproduksi poli- β -hidroksibutirat (PHB). PHB ini selanjutnya digunakan sebagai energi selama proses sporulasi. Selain itu, kenaikan nilai pH juga disebabkan karena terakumulasinya bahan-bahan alkali hasil metabolisme urea.

Pertumbuhan Sel *B.t*

Pertumbuhan *B.t.i* selama fermentasi disajikan dengan tiga pengukuran, yaitu pengukuran terhadap kekeruhan atau *Optical Density* (OD), *Total Plate Count* (TPC) atau metode cawan sebar dan bobot kering biomassa. Kurva pertumbuhan sel *B.t.i* dengan pengukuran TPC untuk semua perlakuan dapat dilihat pada Gambar 3.

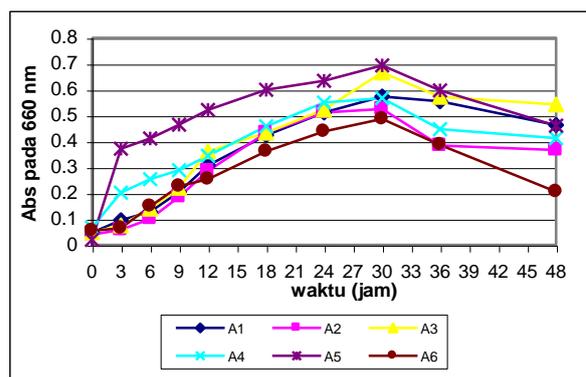
Nilai log total sel tertinggi untuk masing-masing perlakuan adalah 3.606×10^{13} sel/ml untuk media tapioka 0.5%, 3.212×10^{13} sel/ml untuk media tapioka 1%, 3.681×10^{13} sel/ml untuk media tapioka 1.5%, 4.093×10^{13} sel/ml untuk media tapioka 2%, 5.164×10^{13} sel/ml untuk media tapioka 2.5% dan 4.150×10^{13} sel/ml untuk media tapioka 3%.

Berdasarkan analisis sidik ragam, nilai log total sel tertinggi untuk masing-masing perlakuan memberikan hasil yang tidak berbeda nyata. Hal ini berarti bahwa sel *B.t.i* dapat tumbuh dengan baik pada semua perlakuan media.



Gambar 3. Grafik hubungan antara log total sel terhadap waktu fermentasi

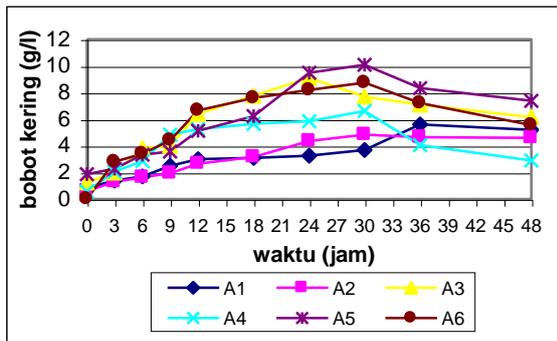
Pengukuran kekeruhan atau *Optical Density* (OD) merupakan salah satu metode langsung untuk mengetahui pertumbuhan sel. Menurut Gumbira-Said (1987), kekeruhan suatu suspensi sel diukur pada panjang gelombang antara 600 – 700 nm bila menggunakan spektrofotometer. Pada penelitian ini, pengukuran OD yang dilakukan pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm memberikan hasil seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik hubungan antara OD terhadap waktu fermentasi

Kekeruhan media terus meningkat hingga fermentasi pada jam ke 30. Hal ini mendukung data pertumbuhan sel *B.t.i* dengan metode hitungan cawan, bahwa pertumbuhan sel berlangsung hingga jam ke 30 fermentasi. Fase stasioner dan penurunan terjadi setelah jam ke 30. Demikian juga dengan hasil yang diperoleh dengan metode cawan sebar.

Pertumbuhan sel juga ditunjukkan dengan peningkatan bobot kering biomassa selama fermentasi seperti terlihat pada Gambar 5.



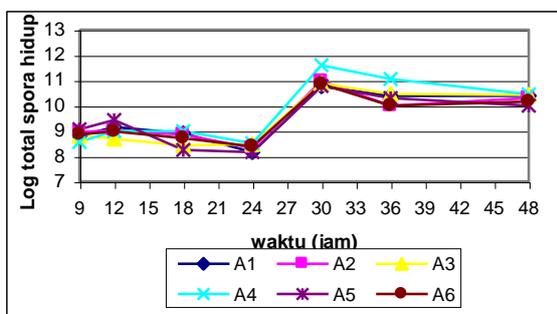
Gambar 5. Grafik hubungan antara OD terhadap waktu fermentasi

Bobot kering biomassa yang dihasilkan bervariasi dari 5,2 g/l sampai 8,75 g/l. Bobot kering biomassa tertinggi diberikan oleh perlakuan media tapioka 2,5%, yaitu sebesar 8,75 g/l. Hasil ini menunjukkan bahwa bobot kering biomassa tertinggi memberikan jumlah sel tertinggi. Pada pengukuran TPC, jumlah log total sel tertinggi juga diberikan pada perlakuan media tapioka 2,5%. Berdasarkan analisis sidik ragam, perbedaan persentase tapioka dalam media memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata terhadap bobot kering biomassa.

Jumlah Spora Hidup (VSC)

VSC merupakan analisa untuk mengetahui jumlah spora hidup yang terkandung dalam serbuk campuran spora kristal. VSC ditentukan dengan mengikuti metode Mummigatti dan Raghunathan (1990), yaitu dengan melakukan sederetan pengenceran dan dicawakan pada medium *nutrient agar*.

Pembentukan spora *B.t.i* dimulai pada jam ke-9 seperti yang terlihat pada Gambar 6. Berbeda dengan pendapat Sukmadi et al (1997) yang menyatakan bahwa spora mulai terbentuk pada saat fase eksponensial mulai berakhir.



Gambar 6. Grafik hubungan antara VSC terhadap waktu fermentasi

Pembentukan spora pada jam ke-9 ini dimungkinkan karena kondisi lingkungan yang kurang sesuai bagi sel, yaitu pH yang ekstrim. Nilai pH rata-rata pada jam ke-9 adalah 7,88 sampai 8,15. Menurut Sukmadi *et al* (1996), cepat lambatnya pembentukan spora tergantung pada kondisi lingkungan kultur. Biasanya spora akan terbentuk pada lingkungan yang kurang sesuai bagi sel, misalnya nilai pH yang ekstrim, suhu yang ekstrim dan kurangnya suplai makanan bagi sel atau kemungkinan lain yang menyebabkan kondisi lingkungan tidak sesuai bagi sel.

Secara umum total spora hidup tertinggi terjadi pada jam ke-30 fermentasi. Perlakuan media 2 % tapioka memberikan jumlah total spora hidup tertinggi, yaitu sebesar $3,89 \times 10^{11}$ spora/ml kultur. Analisis sidik ragam membuktikan bahwa persentase tapioka dalam media memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap total spora hidup tertinggi untuk semua perlakuan.

Kinetika Fermentasi

Perhitungan kinetika fermentasi menunjukkan bahwa nilai efisiensi penggunaan substrat gula ($S_0 - S_t / S_0$) tertinggi dicapai pada media tapioka 1%, yaitu sebesar 0,66. Hal ini berarti bahwa metabolisme berlangsung lebih baik dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Pada media tapioka 2,5%, nilai efisiensi penggunaan substrat mendekati efisiensi pada media tapioka 1%, yaitu sebesar 0,65. Besarnya nilai efisiensi ini berkorelasi positif dengan bobot biomassa kering, yaitu 8,75 g/l.

Laju pertumbuhan sel dapat dihitung berdasarkan massa sel dan jumlah sel. Nilai laju pertumbuhan spesifik berdasarkan massa sel (μ_x) menunjukkan jumlah massa sel per satuan waktu fermentasi. Sedangkan nilai laju pertumbuhan spesifik berdasarkan jumlah sel (μ_N) menyatakan jumlah total sel per satuan waktu fermentasi.

Nilai laju pertumbuhan spesifik berdasarkan massa sel (μ_x) tertinggi dicapai pada media tapioka 2%, yaitu sebesar 0,42, sedangkan nilai laju pertumbuhan berdasarkan jumlah sel (μ_N) tertinggi dicapai pada media tapioka 1,5%. Hasil ini berkorelasi positif dengan nilai efisiensi perubahan substrat menjadi biomassa ($Y_{x/s}$), yaitu sebesar 0,90 g sel/g substrat. Nilai efisiensi perubahan substrat menjadi spora ($Y_{p/s}$) tertinggi dicapai pada media tapioka 1%, yaitu sebesar 2,91 log spora/g substrat.

Bioassay

Tingkat mortalitas larva nyamuk *Culex sp.* pada inkubasi 24 jam berkisar antara 0-100%. Pada perlakuan media 2% tapioka, mortalitas larva nyamuk *Culex sp* masih didapati pada pengenceran 10^{-5} , yaitu sebesar 10%. Hal ini membuktikan

bahwa pada perlakuan ini, *B.t.i* mampu menghasilkan δ -endotoksin dengan toksisitas paling tinggi.

Nilai LC_{50} paling kecil didapat pada perlakuan media tapioka 2%, yaitu sebesar 7.015 mg/l dengan nilai potensi tertinggi yaitu sebesar 8694.23 IU/mg. Potensi bioinsektisida ini sebesar 0.579 kali bila dibandingkan dengan potensi Vectobac.

KESIMPULAN

Kesimpulan

Secara umum, *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* yang menghasilkan bahan aktif bioinsektisida dapat tumbuh baik pada semua perlakuan yang diujikan.

Pada *bioassay*, potensi bioinsektisida tertinggi diberikan oleh media tapioka 2%. Potensi ini ditunjukkan dengan tingginya nilai potensi bioinsektisida yang dihasilkan oleh media tapioka 2% bila dibandingkan dengan media lain. Pada media ini, nilai LC_{50} produk bioinsektisida adalah sebesar 7.015 mg/l dengan nilai potensi sebesar 0.579 kali nilai potensi standar Vectobac.

Saran

Untuk penelitian lanjutan sebaiknya dilakukan : 1) produksi bioinsektisida dengan berbagai konsentrasi urea sebagai sumber Nitrogen dan 2)

kemungkinan produksi bioinsektisida dengan kultur semi padat dengan substrat tapioka.

DAFTAR PUSTAKA

- Gumbira Said, E. 1987. Bioindustri. Penebar Swadaya, Jakarta.
- James, D.W. 1993. Urea : A Low Cost Nitrogen Fertilizer with Special Management Requirement. Utah State University, USA.
- Margalit, J. 1990. Discovery of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Di dalam* D. J Sutherland (eds). Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies : Biochemistry, Genetic and Application of *B.t.i* and *B. sphaericus*. Rotgers Univercity Press. New Brunswick, New Jersey. USA : 3-10
- Mummigati, S.G. dan Raghunathan. 1990. Influence of Media Composition on The Production of Deltaendotoxin by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 55 : 147-151.
- Sneath, P.H.A. 1986. Endospore Forming Gram Positive Rods And Cocci. *Di dalam* P.H.A Sneath, N.S. Majr, M.E. Sharpe dan J.G. Holt (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. Baltimore, USA.
- Sukmadi, B. Haryanto, B dan Ratna, S.H. 1997. Pengaruh Konsentrasi Dekstrosa Pada Produksi Bahan Aktif Bionsektisida *B.t* subsp *aizawai*. *Majalah BPPT* No LXXII : 17 – 23.
- Vandekar, M.and H.T. Dulmage. 1982. Guidelines for Production of *Bacillus thuringiensis* H-14. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva, Switzerland.