

PENGGANDAAN SKALA PRODUKSI BIOINSEKTISIDA *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* UNTUK MEMBASMI JENTIK NYAMUK *Aedes aegypti*

Mulyorini Rahayuningsih¹⁾, Khaswar Syamsu¹⁾, Abdul Aziz Darwis²⁾, Rini Purnawati³⁾

ABSTRACT

SCALE-UP STUDY ON THE BIOINSECTICIDE PRODUCTION of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* FOR ERADICATING *Aedes aegypti* LARVAE

The objective of this research is to study the scaling up of bioinsecticide production from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* using *onggok* (a cassava by-product) as a carbon source. The insecticide produced was used to eradicate *Aedes aegypti* larvae. The product was a crystal protein produced during bacterial sporulation. Scaling up from laboratory to pilot plant scale was done using two methods, i.e. constant agitation power per unit volume (Pg/V) and constant oxygen transfer coefficient (k_{La}). The results showed that yield of product per substrate ($Y_{p/s}$) of Pg/V based product with the value of 3.52 ± 0.02 spora per gram substrates was higher than $Y_{p/s}$ of k_{La} based product with the value of 2.96 spora per gram substrate. Logarithmic value of viable spore count (log of VSC) was also higher, i.e. 7.23 ± 0.30 for Pg/V based product as compared to 7.17 ± 0.20 for k_{La} based product. Substrate efficiency was also higher in Pg/V based (92.47%) than k_{La} based (64.87%). LC_{50} of Pg/V based product was lower (0.49 $\mu\text{g/mL}$) meaning that it was more toxic than k_{La} based product (0.62 $\mu\text{g/mL}$). Amino acid content of Pg/V based product was also higher than k_{La} based product. Constant Pg/V method was suggested as a based on the scaling up of bioinsecticide production of *B. thuringiensis israelensis* on industrial scale.

Keywords : bioinsecticide, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, k_{La} , Pg/V , LC_{50} , viable spore count

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengkaji patokan penggandaan skala produksi bioinsektisida (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) yang dapat menghasilkan bioinsektisida untuk membasmi nyamuk *Aedes aegypti* dengan rendemen dan toksisitas tinggi dengan menggunakan media fermentasi *onggok* tapioka sebagai sumber karbon. Bioinsektisida tersebut berupa kristal protein toksin yang dihasilkan bersama dengan pembentukan spora.

Percobaan penggandaan skala dari skala laboratorium ke skala pilot dilakukan dengan menggunakan dua metode, yaitu Pg/V (tenaga pengadukan per volume) tetap dan k_{La} (koefisien laju transfer oksigen) tetap. Hasil penelitian me-

nunjukkan bahwa rendemen produk per substrat ($Y_{p/s}$) yang dihasilkan dari patokan Pg/V lebih tinggi, yaitu sebesar $3,52 \pm 0,02$ spora per gram substrat dibandingkan dengan produk dari patokan k_{La} sebesar 2,96 spora per gram substrat. Nilai logaritmik jumlah spora hidup (logVSC) juga lebih tinggi, yaitu $7,23 \pm 0,30$ pada patokan Pg/V sedangkan dari patokan k_{La} sebesar $7,17 \pm 0,20$. Nilai efisiensi penggunaan substrat yang lebih tinggi juga diperoleh dari penggandaan skala berbasis Pg/V , yaitu sebesar 92,47% dibandingkan dengan k_{La} yang sebesar 64,87%. LC_{50} produk yang dihasilkan dari patokan Pg/V lebih kecil yang berarti lebih toksik, yaitu sebesar 0,49 $\mu\text{g/mL}$ dibandingkan dengan produk dari patokan k_{La} sebesar 0,62 $\mu\text{g/mL}$. Kandungan asam amino produk yang dihasilkan dari penggandaan skala dengan Pg/V juga lebih tinggi. Metode Pg/V tetap disarankan untuk dipilih sebagai patokan penggandaan skala untuk produksi bioinsektisida *B. thuringiensis israelensis* skala industri.

Kata kunci : bioinsektisida, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, k_{La} , Pg/V , LC_{50} , viable spore count

¹⁾ Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor (PPSHB IPB), Jl. Puspa Kampus IPB Darmaga, Telp: 0251-621257, Faks: 0251-621724. E-mail mulyorinir@yahoo.com

²⁾ Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

³⁾ Laboratorium Teknik Kimia Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor

PENDAHULUAN

Negara-negara yang secara geografis terletak di wilayah tropis selalu dihadapkan dengan masalah wabah penyakit yang penyebarannya dilakukan oleh nyamuk, di antaranya adalah malaria, kaki gajah (filariasis), chikungunya, dan demam berdarah. Di Indonesia, wabah demam berdarah rutin terjadi setiap tahun. Pada awal tahun 2007, jumlah penderita demam berdarah mencapai \pm 90 ribu orang dengan jumlah korban meninggal ratusan orang. Penyakit demam berdarah ini disebabkan oleh virus yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti*. Pemberantasan nyamuk penyebar penyakit demam berdarah ini merupakan tindakan preventif yang efektif dan memecahkan persoalan pada akhirnya.

Upaya pengasapan yang dilakukan selama ini ternyata tidak menyelesaikan masalah karena hanya membunuh nyamuk dewasa. Upaya lain yang dilakukan adalah dengan program 3M (mengubur, menguras, dan menutup). Namun, usaha ini juga tidak mudah karena nyamuk *Ae. aegypti* hidup dalam air bersih seperti bak mandi, bak penampungan air minum, dan kolam.

Penggunaan insektisida kimia tidak menguntungkan karena dapat membahayakan jiwa manusia dan organisme lain serta resistensi serangga. Usaha yang lebih tepat adalah dengan memutus rantai kehidupan nyamuk, yaitu dengan membunuh jentik nyamuk menggunakan bioinsektisida. Bioinsektisida yang dihasilkan oleh *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), telah terbukti efektif untuk pemberantasan larva nyamuk. Aktivitas insektisidal dari produk *Bti* diduga berkaitan erat dengan kandungan empat protein protoksin *cry* yang dikenal sebagai *cry IVa, b, c, dan d*. Protein tersebut sama seperti protein kristal pada galur *Bt* lainnya, yaitu yang diproduksi bersamaan dengan sporulasi, tetapi daya racunnya sangat spesifik untuk nyamuk dan lalat (Chilcott *et al.* 1990). Di samping itu, *Bti* juga memproduksi suatu protein yang disebut *cyt* yang mempunyai modus kerja yang berbeda dengan protein lain dan secara umum bersifat sitolitik terhadap serangga.

Produk komersial *Bti* telah beredar di pasaran dengan merek dagang *Vectobac, Bactimos, Teknar, dan Skeetal*. Namun, semua produk ini masih diimpor

sehingga memerlukan devisa yang cukup besar. Dalam keadaan krisis ekonomi dan moneter, Indonesia justru dituntut untuk mengurangi impor dan menggalakkan ekspor. Oleh sebab itu perlu dilakukan upaya untuk memproduksi sendiri bioinsektisida tersebut secara efisien dan ekonomis sehingga dapat menghindari ketergantungan akan bahan-bahan impor.

Salah satu kunci keberhasilan memperdagangkan bioinsektisida *Bti* adalah pengembangan medium fermentasi yang mempunyai syarat murah harganya dan tersedia secara melimpah. Salah satu sumber karbon potensial di Indonesia adalah ongkok tapioka, yaitu limbah yang dihasilkan pada pengolahan ubi kayu menjadi tapioka yang masih mengandung karbohidrat sebesar 60-70% sehingga cocok digunakan sebagai sumber karbon dalam medium fermentasi.

Penelitian skala laboratorium telah mendapatkan nisbah karbon dan nitrogen dengan media ongkok tapioka dan urea optimum sebesar 7:1, pH dan suhu sebesar $6,90 \pm 0,10$ dan $26,35 \pm 1,50$ °C serta laju agitasi dan laju aerasi optimum, yaitu 200 rpm dan 1 vvm (Rahayuningsih *et al.* 2005). Untuk mengembangkan skala laboratorium ke skala industri perlu dikaji metode pengandaan skalanya.

Pengembangan industri umumnya dilakukan dengan menggunakan tahapan skala laboratorium, skala *pilot plant*, dan skala industri. Skala laboratorium merupakan tahap penyeleksian mikrob yang digunakan, skala *pilot plant* merupakan tahap penerapan kondisi operasi optimum dan skala industri merupakan tahap yang prosesnya akan dilaksanakan dengan mempertimbangan perhitungan ekonomi.

Translasi skala laboratorium ke skala pilot atau industri memerlukan patokan perhitungan yang tepat. Ada beberapa metode yang digunakan dalam pengandaan skala. Mengingat fermentasi bioinsektisida *B. thuringiensis* bersifat aerobik, maka digunakan patokan pengandaan skala yang berhubungan dan mengacu pada perpindahan oksigen, yaitu tekanan parsial O_2 atau P_{O_2} merupakan fungsi dari $k_L a$ (koefisien laju transfer oksigen volumetrik) tetap dan Pg/V (tenaga pengadukan per volume fermentor) tetap.

Penelitian ini bertujuan mengkaji patokan pengendalian skala produksi bioinsektisida *Bti* yang dapat menghasilkan bioinsektisida dengan rendemen dan toksisitas tinggi menggunakan substrat onggok dan diaplikasikan untuk membasmi nyamuk *Ae. aegypti*. Hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan sebagai data dasar untuk pengembangan industri bioinsektisida skala industri.

METODE

Bahan dan Alat

Kultur *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (*Bti*) dibiakkan pada medium agar-agar miring (*nutrient agar*). Onggok digunakan sebagai sumber karbon sedangkan urea sebagai sumber nitrogen.

Bahan-bahan yang digunakan adalah *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCO_3$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, HCl, Tris (hidroksi metil) amino metana. Untuk uji hayati digunakan larva nyamuk *Ae. aegypti* yang diperoleh dari Laboratorium Entomologi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Peralatan analitis yang digunakan adalah *spektrofotometer*, bioreaktor 2 L kapasitas kerja 1,3 L, bioreaktor 20 L dengan kapasitas kerja 13 L, dan satu perangkat alat elektroforesis.

Analisis Karbon dan Nitrogen pada Onggok dan Urea

Onggok tapioka kering digiling menjadi tepung onggok menggunakan Hammer mill, dan disaring sebesar 100 mesh kemudian dianalisis kadar karbon dan kadar nitrogennya. Urea teknis dianalisis kadar nitrogennya menggunakan metode Kjeldahl (AOAC 1984). Perhitungan ini digunakan untuk menghitung nisbah C:N media.

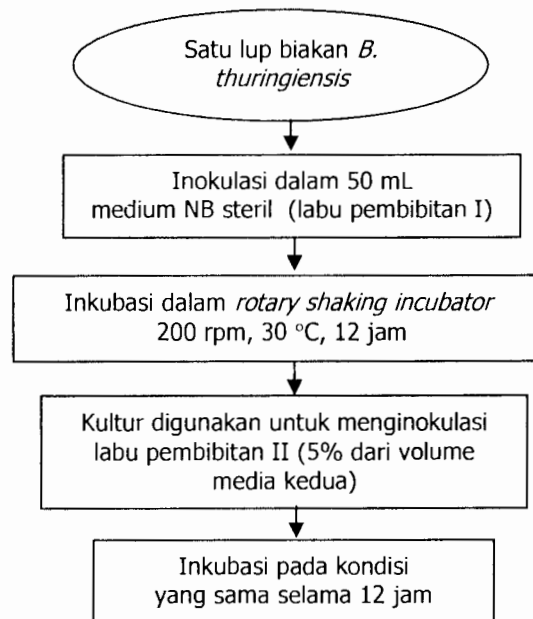
Persiapan Inokulum

Diagram alir persiapan inokulum disajikan pada Gambar 1.

Persiapan Medium Fermentasi

Medium fermentasi menggunakan nisbah karbon : nitrogen sebesar 7 : 1. Larutan mineral (*trace element*) per liter medium fermentasi sesuai dengan yang digunakan Dulmage dan Rhodes (1971),

yaitu 0,3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 g $MnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, dan 1,0 g $CaCO_3$. Medium fermentasi dan larutan mineral tersebut dilarutkan ke dalam larutan bufer fosfat pH 7.



Gambar 1 Diagram alir persiapan inokulum

Perhitungan Pengendalian Skala

Ketersediaan oksigen sangat berpengaruh pada pertumbuhan dan sintesis bioinsektisida oleh *Bti*. Parameter penting yang berpengaruh pada ketersediaan oksigen di dalam media adalah koefisien perpindahan oksigen volumetrik ($k_L a$) dan kebutuhan tenaga per unit volume (Pg/V) (Demain dan Davies 1999). Oleh karena itu, dalam tahap pengendalian skala dicoba dua patokan tersebut, yaitu nilai $k_L a$ dan Pg/V . Perhitungan pengendalian skala memerlukan data ciri reologi cairan fermentasi dan spesifikasi fermentor yang digunakan, yakni tipe pengaduk, jumlah pengaduk (N), diameter pengaduk (D_i), jumlah baji ($blade = N_b$), tinggi fermentor (H_f), diameter tangki (D_t), dan volume tangki fermentor (V_f). Dari perhitungan ini dapat diperoleh nilai aerasi dan agitasi sesuai patokan pengendalian skala.

Menentukan Nilai $k_L a$ (Stanburry dan Whitaker 1984)

Nilai $k_L a$ diukur pada cairan fermentasi hasil produksi bioinsektisida oleh *Bti*. menggunakan

fermentor 13 L. Fermentasi dilakukan sampai mencapai akhir fase eksponensial (72 jam). Oksigen terlarut diukur dengan menggunakan elektrode oksigen YSI Model 55/55 F. Pengukuran $k_L a$ dilakukan dengan metode dinamik.

Menentukan Ciri Reologi Cairan Fermentasi (Stanburry dan Whitaker 1984)

Densitas cairan fermentasi ditentukan dengan piknometer dan viskositas cairan fermentasi diukur dengan alat *Brookfield viscosimeter* pada laju putar 6, 12, 30, dan 60 rpm menggunakan spindel no. 2.

Kebutuhan Tenaga per unit Volume (Pg/V) (Stanburry dan Whitaker 1984)

Nilai tenaga per skala produksi, diasumsikan bahwa dengan efisiensi aerasi yang sama akan diperoleh rendemen produk yang sama baik pada skala kecil maupun skala besar

Konsumsi tenaga per satuan volume cairan fermentasi di dalam tangki fermentor (Pg/V) adalah

$$Pg/V = N^3 D^2$$

dengan

- Pg : Konsumsi tenaga
- V : Volume cairan fermentasi
- N : Laju sirkulasi cairan fermentasi
- D : Diameter pengaduk

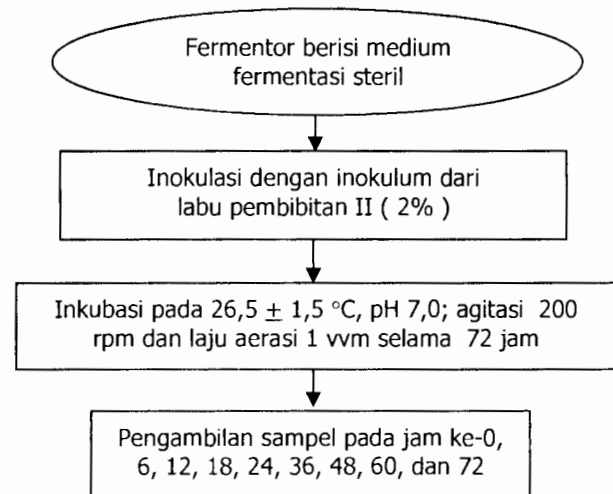
Fermentasi untuk Penggandaan Skala Produksi Bioinsektisida

Fermentasi dilakukan dalam fermentor 2 L dan 20 L setelah mendapatkan besaran aerasi dan agitasi sesuai dengan perhitungan penggandaan skala tersebut di atas.

Contoh diambil pada 9 titik pengamatan, yaitu pada saat inkubasi jam ke-0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, dan 72. Diagram alir fermentasi untuk produksi bioinsektisida disajikan pada Gambar 2.

Pengukuran Parameter Keberhasilan Produksi Bioinsektisida

Parameter yang diukur untuk menentukan efisiensi dan produktivitas fermentasi bioinsektisida mengikuti prosedur standar dalam rekayasa biokimia/rekayasa bioproses yang meliputi pengukuran dan penghitungan jumlah sel dengan pengukuran total sel (N) (Benoit *et al.* 1990), jumlah spora hidup yang menggambarkan jumlah produk kristal protein toksin yang



Gambar 2 Diagram alir proses produksi bioinsektisida

dihasilkan (P) (metode Mummigati dan Raghunatan 1990), jumlah substrat yang dikonsumsi (S) (Metode Fenol, AOAC 1984). Data tersebut digunakan untuk menghitung laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{maks}), efisiensi penggunaan substrat, rendemen substrat terhadap jumlah sel ($Y_{N/s}$) dan terhadap produk (kristal protein atau spora) yang dihasilkan ($Y_{p/s}$), serta rendemen antara produk terhadap jumlah sel ($Y_{p/N}$).

Selanjutnya dilakukan pengujian toksisitas produk bioinsektisida terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti* (LC_{50}) (Yamamoto *et al.* 1983). Hasil uji toksisitas diolah dengan analisis *Probit Quant* menggunakan piranti lunak dari Steve Mound, University of Wales, College of Cardiff, Inggris. Dilakukan juga pencirian terhadap susunan kristal protein produk bioinsektisida menggunakan SDS PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) dan analisis asam amino menggunakan *amino acid analyzer* di Laboratorium Terpadu, Institut Pertanian Bogor.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Karbon dan Nitrogen pada Onggok dan Urea

Hasil analisis kadar karbon, nitrogen, abu, dan air terhadap onggok disajikan dalam Tabel 1. Hasil analisis ini digunakan sebagai acuan perhitungan nisbah C/N dalam media produksi bioinsektisida dengan onggok sebagai sumber karbon(C) dan urea sebagai sumber nitrogen (N).

Tabel 1 Kadar karbon dan nitrogen onggok dan urea untuk media fermentasi

| Komponen | Kadar (%) | |
|--------------|-----------|-------|
| | Onggok | Urea |
| Karbon (C) | 40,43 | 20,00 |
| Nitrogen (N) | 0,143 | 45,20 |
| Abu | 0,87 | - |
| Air | 2,11 | - |

Nisbah C/N media fermentasi yang digunakan, yaitu sebesar 7:1 memerlukan konsentrasi onggok sebesar 20 g/L. Penetapan basis konsentrasi onggok 20 g/L didasarkan pada penelitian Wicaksono (2002) yang menyatakan bahwa pada konsentrasi tersebut menghasilkan toksisitas tertinggi dari bioinsektisida *B. t. kurstaki*, sedangkan jumlah urea teknis yang dibutuhkan adalah 3,46 g/L.

Penggandaan Skala dan Pengukuran Parameter Keberhasilan Produksi Bioinsektisida

Kajian penggandaan skala bioproses dimulai dari percobaan skala laboratorium untuk mempelajari faktor-faktor fisik, kimia, dan hayati penting yang memengaruhi proses dan hasil fermentasi. Berdasarkan hasil penelitian tahap sebelumnya, yaitu hasil yang optimum pada proses fermentasi *Bti*, dirancang suatu prosedur/metode untuk skala pilot. Rancangan tersebut bertujuan memberikan kondisi fermentasi yang optimum, yang selanjutnya digunakan untuk rancang bangun alat dan proses produksi skala industri.

Agar penyimpangan yang terjadi selama proses penggandaan skala dapat diminimumkan sehingga tidak menyebabkan kerugian, maka kajian penggandaan skala produksi bioinsektisida ini dilakukan dengan mempertahankan kesamaan geometrik fermentor, menggunakan komposisi media, suhu proses, pH awal, konsentrasi kelarutan oksigen, dan galur mikroorganisme yang sama.

Geometri fermentor skala laboratorium yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 2. Tipe impeler yang digunakan dalam penelitian ini adalah turbin pipih (*flat-blade turbine*). Bentuk dan jumlah impeler yang digunakan akan memengaruhi tenaga yang digunakan untuk menyebarkan oksigen secara merata

ke seluruh bagian agar pencampuran berlangsung sempurna.

Tabel 2 Geometri fermentor skala laboratorium 2 L dan 20 L (kapasitas 1,3L dan 13L)

| Parameter Skala Geometri | 2 L | 20 L |
|------------------------------------|---------|---------|
| Tinggi fermentor (H_t) | 0,25 m | 0,45 m |
| Tinggi cairan fermentasi (H_L) | 0,153 m | 0,213 m |
| Diameter impeler (D_i) | 0,05 m | 0,09 m |
| Diameter tangki (D_t) | 0,129 m | 0,197 m |

Hasil perhitungan penggandaan skala dengan patokan Pg/V dan $k_L a$ memberikan nilai Pg/V sebesar $0,01303 \text{ HP/m}^3$, dan $k_L a$ sebesar $0,0015$. Dari perhitungan tersebut diperoleh hasil penggandaan skala produksi dari skala 2 L menjadi skala 10 L dengan menggunakan basis Pg/V , membutuhkan aerasi sebesar $0,8 \text{ vvm}$ dan laju agitasi 135 rpm , sedangkan bila menggunakan basis $k_L a$, maka laju aerasi yang ditetapkan sebesar $0,6 \text{ vvm}$ dan laju agitasi 34 rpm .

Patokan Pg/V dan $k_L a$ kemudian digunakan dalam percobaan penggandaan skala produksi dari 2 L menjadi 10 L. Keberhasilan produksi bioinsektisida yang digandakan skalanya dengan dua patokan tersebut diukur dari beberapa parameter dan disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 Parameter kinetika kultivasi produksi bioinsektisida skala 2 liter dan skala 10 liter

| Parameter | Skala 2 liter \pm sd | Skala 10 liter basis $Pg/V \pm$ sd | Skala 10 liter basis $k_L a \pm$ sd |
|--|------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Log N-maks | $9,23 \pm 0,06$ | $10,10 \pm 0,04$ | $10,14 \pm 0,03$ |
| Log VSC maks | $7,54 \pm 0,50$ | $7,23 \pm 0,30$ | $7,17 \pm 0,20$ |
| $\ln \mu_{maks}$ (jam^{-1}) | $0,11 \pm 0,02$ | $0,59 \pm 0,01$ | $0,57 \pm 0,01$ |
| $Y_{ws}(\text{sel/g substrat}) \times 10^{11}$ | $4,29 \pm 0,20$ | $8,71 \pm 0,10$ | $21,36 \pm 0,30$ |
| $Y_{ps}(\text{spora/g substrat}) \times 10^9$ | $9,38 \pm 0,02$ | $3,52 \pm 0,02$ | $2,96 \pm 0,01$ |
| $(S_0 - S_t)/S_0$ % | $86,70 \pm 0,02$ | $92,47 \pm 0,09$ | $64,87 \pm 0,02$ |
| LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | Tidak diukur | 0,49 | 0,62 |

Tabel 3 menunjukkan bahwa perubahan skala dengan patokan Pg/V dan $k_L a$ menyebabkan laju pertumbuhan spesifik (μ) dari $0,11 \text{ jam}^{-1}$ pada skala produksi 2 L meningkat menjadi $0,59 \text{ jam}^{-1}$ dan $0,57 \text{ jam}^{-1}$ pada skala produksi 10 L. Hal tersebut sesuai

dengan pernyataan Wang *et al.* (1978) bahwa sifat-sifat hayati yang tercakup di dalam kinetika pertumbuhan mikroorganisme selama kultivasi bergantung pada penggandaan skala. Beberapa parameter kinetika akan berubah walaupun pola metabolisme tidak berubah. Rendemen produk sebagai spora per gram substrat (Y_p/s) juga lebih tinggi pada produk dengan patokan Pg/V , yaitu sebesar $3,52 \pm 0,02$ spora per gram substrat dibandingkan dengan produk dari patokan k_La sebesar 2,96 spora per gram substrat. Nilai efisiensi penggunaan substrat yang lebih tinggi diperoleh dari penggandaan skala berbasis Pg/V , yaitu sebesar 92,47% dibandingkan dengan k_La yang sebesar 64,87%. Hal ini menunjukkan bahwa metabolisme berlangsung lebih baik. Begitu pula laju pertumbuhan sel (μ_N maks), log *viable spore count* (VSC) memberikan nilai yang relatif lebih tinggi. Dengan demikian, penggunaan patokan Pg/V dan k_La memberi pengaruh yang berbeda pada keberhasilan produksi bioinsektisida (pertumbuhan sel dan pembentukan spora).

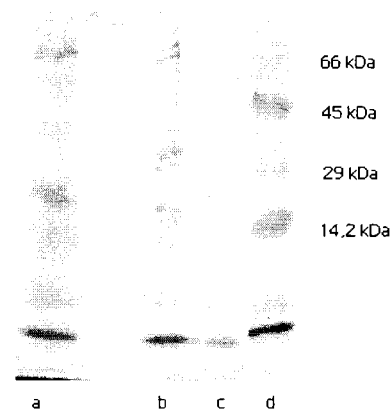
Dengan menggunakan basis Pg/V tetap, ternyata untuk ukuran impeler yang lebih besar dan volume yang lebih besar, laju ujung impeller akan meningkat. Peningkatan laju ujung impeller akan menurunkan laju geser kultur sehingga waktu pencampuran antara oksigen terlarut, nutrien, dan mikroorganisme akan meningkat. Dengan demikian diharapkan nutrien tersebut tersebar lebih merata dalam seluruh bagian tangki sehingga meminimumkan gradien konsentrasi massa dalam kultur. Akibatnya pertumbuhan sel dan pembentukan produk bioinsektisida berjalan lebih baik seperti yang ditunjukkan oleh Tabel 3.

Dari hasil perhitungan tersebut, Pg/V tetap akan dipilih dalam produksi skala pilot pada penelitian selanjutnya.

Ciri Produk Bioinsektisida

Pengamatan terhadap profil kristal protein yang dihasilkan dengan menggunakan SDS PAGE menunjukkan pola protein yang sama pada produksi skala lab dan skala pilot. Terlihat dari jumlah fraksi yang terbentuk sama, yaitu ada 6 fraksi, dengan bobot molekul 15; 23,75; 39,94; 41,80; 65,32; dan 67,00 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa proses pengganda-

an skala tidak menyebabkan perubahan secara kualitatif jenis protein yang dihasilkan (Gambar 3).



Keterangan:

- a = Produk skala laboratorium
- b = Produk skala pilot basis Pg/V
- c = Produk skala pilot basis k_La
- d = Standar

Gambar 3 Pola pita protein produk bioinsektisida

Hasil bioasai seperti yang tercantum dalam Tabel 3 menunjukkan perbedaan nilai toksisitas yang diperoleh, yaitu produk penggandaan skala dengan patokan Pg/V relatif lebih toksik dilihat dari kecilnya nilai LC_{50} . Hal ini diduga karena kandungan proporsi asam amino kristal protein toksin yang lebih tinggi (Tabel 4). Rahayuningsih (2003) menyatakan bahwa kandungan asam amino dalam kristal mempunyai peranan penting dalam kemampuan kristal untuk menyisip ke dalam membran fosfolipid yang berimplikasi pada toksisitas. Hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut. Sesuai dengan modus kerjanya, bioinsektisida *Bti* termasuk dalam golongan racun perut karena toksin akan memberikan pengaruh jika dimakan oleh serangga sasaran. Mekanisme toksisitasnya adalah dalam *midgut* serangga, toksin akan terhidrolisis oleh enzim protease yang ada dalam usus serangga menjadi toksin yang berukuran lebih kecil dan mudah menyisip dalam dinding usus. Setelah penyisipan terjadi, dinding usus serangga menjadi rusak, serangga menjadi tidak mampu makan dan akhirnya mati.

Dinding usus serangga merupakan membran fosfolipid terdiri atas molekul yang mempunyai bagian

Tabel 4 Komposisi asam amino hasil produk penggandaan skala berdasarkan Pg/V dan k_{La}

| No | Asam amino | Sifat | Skala 10 L basis Pg/V (%bk) | Skala 10 L basis k_{La} (%bk) |
|----|--------------|------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 1 | Aspartat | Hidrofilik | 0,5201 | 0,3985 |
| 2 | Glutamat | Hidrofilik | 0,6609 | 0,4899 |
| 3 | Serina | Hidrofilik | 0,2730 | 0,1867 |
| 4 | Histidin | Hidrofilik | 0,0833 | 0,0704 |
| 5 | Glisin | Hidrofobik | 0,3563 | 0,2436 |
| 6 | Treonina | Hidrofilik | 0,3075 | 0,2693 |
| 7 | Arginina | Hidrofilik | 0,3506 | 0,2165 |
| 8 | Alanina | Hidrofobik | 0,3879 | 0,2923 |
| 9 | Tirosina | Hidrofilik | 0,1897 | 0,1245 |
| 10 | Metionina | Hidrofobik | 0,4856 | 0,2124 |
| 11 | Valina | Hidrofobik | 0,3506 | 0,2585 |
| 12 | Fenilalanina | Hidrofobik | 0,2270 | 0,1664 |
| 13 | Isoleusina | Hidrofobik | 0,2213 | 0,1664 |
| 14 | Leusina | Hidrofobik | 0,3994 | 0,2923 |
| 15 | Lisina | Hidrofilik | 0,2787 | 0,2084 |

polar yang bersifat hidrofilik dan bagian nonpolar yang bersifat hidrofobik. Setelah menyisip pada plasma membran, toksin akan membuat lubang kecil atau pori di dalam membran. Lubang ini akan mengganggu permeabilitas plasma membran, kemudian merusak kesetimbangan osmotik koloid dan menyebabkan masuknya air ke dalam sel. Akibatnya sel akan membengkak yang menyebabkan terganggunya integritas membran dan akhirnya sel menjadi lisis.

Sifat relatif hidrofobik-hidrofilik dalam kristal diduga disebabkan oleh proporsi relatif asam amino hidrofilik hidrofobik. Beberapa asam amino memiliki sifat hidrofobik, yaitu asam-amino nonpolar sedangkan asam amino lain bersifat hidrofilik, yaitu asam amino yang mempunyai gugus polar atau asam amino dengan rantai asam atau basa (Alberts *et al.* 1989). Dari penelitian ini terlihat bahwa proporsi relatif asam amino akan memengaruhi kemampuan penyisipan toksin yang berimplikasi pada toksisitas seperti ditunjukkan oleh lebih tingginya secara relatif kandungan asam amino pada produk yang dihasilkan dari penggandaan skala dengan patokan Pg/V dibandingkan dengan produk dari k_{La} . Dengan demikian sifat hidrofobik-hidrofilik yang berhubungan dengan kemampuan menyisip pada membran fosfolipidnya pun berbeda. Dengan konsentrasi molekul yang dapat menyisip pada membran fosfolipid lebih besar, maka produk Pg/V menunjukkan nilai toksisitas yang lebih tinggi daripada produk k_{La} .

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen produk per substrat ($Y_{p/s}$) yang dihasilkan dari patokan Pg/V lebih tinggi, yaitu sebesar $3,52 \pm 0,02$ spora per gram substrat dibandingkan dengan produk dari patokan k_{La} sebesar 2,96 spora per gram substrat. Nilai logaritmik jumlah spora hidup (log VSC) juga lebih tinggi, yaitu $7,23 \pm 0,30$ pada patokan Pg/V sedangkan dari patokan k_{La} sebesar $7,17 \pm 0,20$. Nilai efisiensi penggunaan substrat yang lebih tinggi juga diperoleh dari penggandaan skala berbasis Pg/V , yaitu sebesar 92,47% dibandingkan dengan k_{La} yang sebesar 64,87%. Parameter utama keberhasilan bioinsektisida adalah toksisitas terhadap *Ae. aegypti* yang dihitung sebagai konsentrasi produk yang menyebabkan 50% larva mati (LC_{50}). LC_{50} produk yang dihasilkan dari patokan Pg/V lebih kecil yang berarti lebih toksik, yaitu sebesar 0,49 $\mu\text{g/mL}$ dibandingkan dengan produk dari patokan k_{La} sebesar 0,62 $\mu\text{g/mL}$. Kandungan asam amino produk yang dihasilkan dari penggandaan skala dengan Pg/V juga lebih tinggi. Metode Pg/V tetap disarankan untuk dipilih sebagai patokan penggandaan skala untuk produksi bioinsektisida *Bti* skala industri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jendral Pendidikan, Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Bersaing Perguruan Tinggi XII.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemist. Washington, DC.
- Alberts BD, Bray J, Lewis M, Roberts RK, Watson JD. 1989. Molecular Biology of the Cell. Edisi ke-2. New York: Garland. hlm 41-323.
- Benoit TG, Wilson GR, Baugh CL. 1990. Fermentation During Growth dan Sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Lett Appl Microbiol* 10:15-18.
- Chilcott CN, Knowles BH, Ellar DJ, Drobniewski FA. 1990. Mechanism of action of *B. thuringiensis israelensis* Parasporal Body. *Dalam* Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies:

- Biochemistry, Genetics and Application of *B. thuringiensis israelensis* and *B. sphaericus*. de Barjac H, Sutherland DJ, editor. New Brunswick, New Jersey: Rutgers University Pr. hlm 45-65.
- Demain AL, Davies JE. 1999. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Edisi ke-2. Washington DC: ASM Pr. hlm 236-239.
- Dulmage HT, Rhodes RA. 1971. Production of Pathogen in Artificial Media. *Dalam* Microbial Control of Insects and Mites, Burgess HD, Hussey NW, editor. London: Academic Pr. hlm 507-540.
- Mummigatti SG, Raghunathan AN. 1990. Influence of Media Composition on the Production of δ -endotoxin by *B. thuringiensis* var *thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 55:147-151.
- Rahayuningsih M. 2003. Toksisitas dan Aktivitas Dipterisidal Bioinsektisida *Bacillus thuringiensis israelensis* Tipe Liar dan Mutan pada Berbagai Formulasi Media dan Kondisi Kultivasi, [disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Rahayuningsih M, Syamsu K, Purnawati R, Yulianti F. 2005. Kajian Produksi Bioinsektisida *Bacillus thuringiensis israelensis* untuk Pencegahan Wabah Demam Berdarah. Laporan Penelitian Hibah Bersaing Tahun I. Bogor: Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor.
- Stanburry PF, Whitaker A. 1984. *Principles of Fermentation Technology*. New York: Pergamon Pr.
- Wang DIC, Cooney CL, Demain AL, Dunnill P, Humprey AE, Lilly MD. 1978. *Fermentation and Enzyme Technology*. New York: John Wiley.
- Wicaksono Y. 2002. Pemanfaatan Onggok Tapioka dan Urea sebagai Media Sumber Karbon dan Nitrogen dalam Produksi Bioinsektisida oleh *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, [skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Yamamoto TT, Iizuka, Aronson JN. 1983. Mosquitocidal Protein of *Bacillus thuringiensis israelensis*: Identification and Partial isolation of the Protein. *Curr Microbiol* 9:279-284.