

## PRODUKSI BIOINSEKTISIDA oleh *Bacillus thuringiensis* MENGGUNAKAN KULTIVASI MEDIA PADAT

### BIOINSECTICIDE PRODUCTION FROM *Bacillus thuringiensis* BY USING SOLID-STATE CULTIVATION

Rini Purnawati\*, Titi C. Sunarti, Khaswar Syamsu, Mulyorini Rahayuningsih

Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB  
Kampus IPB Dramaga, PO Box 220 Bogor 16002  
Email: purnawati.rini@gmail.com

Makalah: Diterima 25 Juni 2014; Diperbaiki 16 Januari 2015; Disetujui 23 Januari 2015

#### ABSTRACT

In bio insecticide production, the use of agricultural by products as a substrate to produce the starter has the role important on the efficient production processes, as well as the use of single isolate and production media. The bio insecticide production was carried out by the solid state cultivation, by examining the effect of substrate thick nessoncell growth and bio insecticide toxicity of bio insecticide produced. The bacterial of localisolates used were obtained from carrion worm of *Attacus atlas*, and identified as *Bacillus thuringiensis* and had important potential as bio insecticide. Tofu whey was used for starter media, while mixture of dregs sago and iles-iles as its production media. During the cultivation the media thickness affected on pH, cell growth, spores and substrate consumption. The increased of substrate thickness caused the decrease of pH, and simultaneously the decrease of cell growth, spores and substrate consumption. The product with highes toxicity capability against dipteralarvae ( $LC_{50}$  of 0,24 mg/mL) and lepidoptera larvae ( $LC_{50}$  of 3,3 mg/mL) was obtained under cultivation process with substrate thicknes of 1 cm.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, bioinsecticide, solid-state cultivation, solid waste sago, solid waste iles-iles

#### ABSTRAK

Pada produksi bioinsektisida, penggunaan limbah industri pertanian sebagai substrat dapat memperoleh proses produksi yang efisien. Pada penelitian ini produksi bioinsektisida dilakukan dengan cara kultivasi media padat untuk mengkaji pengaruh ketebalan substrat terhadap pertumbuhan sel, terbentuknya spora dan toksisitas dari bioinsektisida yang dihasilkan. Bakteri isolat lokal yang digunakan diperoleh dari bangkai ulat *Attacus atlas*, dan telah diidentifikasi sebagai *Bacillus thuringiensis* serta memiliki potensi sebagai bioinsektisida. Limbah cair tahu digunakan sebagai media starter, sedangkan campuran ampas sago dan iles-iles sebagai media produksinya. Selama kultivasi ketebalan media berpengaruh terhadap pH, pertumbuhan sel, jumlah spora dan konsumsi substrat. Peningkatan ketebalan substrat menyebabkan penurunan pH, dan mengakibatkan menurunnya pertumbuhan sel, spora dan konsumsi substrat. Produk memiliki kemampuan toksisitas tertinggi terhadap larva golongan diptera ( $LC_{50}$  0,24 mg/mL) dan larva golongan lepidoptera ( $LC_{50}$  3,3 mg/mL) diperoleh dari kultivasi pada substrat dengan ketebalan 1 cm.

Kata kunci: *Bacillus thuringiensis*, bioinsektisida, kultivasi padat, ampas sago, ampas iles-iles

#### PENDAHULUAN

Meningkatnya kesadaran akan perlunya insektisida yang aman, meningkatkan kebutuhan terhadap produk bioinsektisida. Produk komersial *Bacillus thuringiensis* telah beredar di pasaran dengan merk dagang Agritol, Vectobac, Dipel, Thuricide dari USA, Bathurin dari Cheko, Biosphor dari Jerman, Aquabac, Teknar, Bactimos dan lain-lain. Semua produk ini masih impor sehingga diperlukan devisa yang cukup besar untuk mendapatkannya. Di Indonesia industri bioinsektisida dengan bahan aktif *B. thuringiensis* belum berkembang, oleh sebab itu perlu dilakukan upaya agar dapat memproduksi bioinsektisida pada skala industri dengan mudah, sehingga dapat

menghindari ketergantungan akan bahan-bahan impor.

*B. thuringiensis* merupakan bioinsektisida mikrobial yang cukup banyak digunakan dibandingkan yang berasal dari mikroba yang lain. Bakteri ini adalah bakteri Gram positif, berbentuk batang, dan memiliki kemampuan menghasilkan kristal protein selama masa sporulasinya. Sebagai pengendali hayati, spora dan kristal protein ini dapat bersifat racun pada sistem pencernaan serangga (Pujiastuti, 2004; Valicente *et al.*, 2010).

Industri bioinsektisida cukup potensial untuk dikembangkan di Indonesia. Hal ini didukung oleh adanya galur lokal dan bahan media tumbuh berbasis agroindustri yang melimpah dan murah. Beberapa penelitian menunjukkan *B. thuringiensis*

dapat tumbuh pada kultivasi media padat menggunakan berbagai media, baik pada media produk pertanian, limbah agroindustri, limbah industri maupun limbah rumah tangga. Bahan-bahan tersebut dapat dimanfaatkan sebagai media karena merupakan bahan organik juga mengandung *trace element* yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan memproduksi protein kristal (Capablo *et al.*, 2001; Devi dan Rao, 2005; Zuang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013).

Limbah industri tahu dapat menjadi alternatif untuk media perbanyakan inokulum (starter) *Bacillus thuringiensis*, karena ditinjau dari komposisi kimianya mengandung air 98,63%, nitrogen 0,02%, karbon 0,27% dan mineral 0,43% (Nelly, 2012). Bahan-bahan tersebut diperlukan pada pertumbuhan sel baru, spora dan toksin (Valicente dan Mourao, 2008). Ampas sagu dan ampas iles-iles mengandung karbohidrat yang tinggi sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon, protein dimanfaatkan sebagai sumber nitrogen, mineral akan membantu pertumbuhan sel dan pembentukan endotoksin, serta kandungan serat sebesar 14% pada ampas sagu (Awg-Adeni *et al.*, 2010) akan memberikan sifat porus pada media, sehingga akan memperbaiki kondisi kultivasi media padat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan proses produksi bioinsektisida (*Bacillus thuringiensis*) menggunakan isolat lokal dengan starter dan media kultivasi menggunakan hasil samping agroindustri, dengan cara kultivasi media padat. Secara khusus penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh ketebalan media kultivasi terhadap pertumbuhan dan produk yang dihasilkan oleh *Bacillus thuringiensis*, serta mendapatkan kemampuan toksisitas produk.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Mikroorganisme yang digunakan adalah bakteri yang diisolasi dari bangkai ulat *Attacus atlas* dari Darmaga, Bogor. Hasil isolasi menunjukkan satu *cluster* dengan *B. thuringiensis* (Purnawati *et al.*, 2014). Serangga uji menggunakan larva ulat *Crociodolomia pavonana* dari Laboratorium Fisiologi dan Toksikologi Serangga Departemen Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian IPB dan larva nyamuk *Aedes aegypti* dari Unit Kajian Pengendalian Hama Pemukiman, Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Limbah cair tahu dari industri kecil CV Jadi Sari di Bogor. Ampas iles-iles yang merupakan hasil samping fraksinasi glukomanan dari tepung iles-iles dari PT Ambico di Pasuruan dan ampas sagu merupakan hasil samping ekstraksi pati sagu dari empulur batang sagu (*Metroxylon* sp) dari industri kecil daerah Cimahpar Bogor. Bahan kimia yang digunakan untuk proses produksi dan analisis.

Kultivasi dilakukan menggunakan tempat dari plastik berbentuk silinder dengan diameter 20 cm dan tinggi 14 cm, *autoclave*, *cleanbench*, *waterbath*, *incubator*, *rotary shaker*, spektrofotometer UV-VIS, spektrofotometer serapan atom, neraca analitik, serta alat-alat gelas untuk menunjang proses dan analisa.

### Metode

#### Karakterisasi Bahan Baku

Bahan baku untuk media tumbuh berupa ampas iles iles dan ampas sagu. Ampas sagu dicecilkan ukurannya hingga 20 mesh sementara ampas iles-iles sudah berukuran 100 mesh, kedua bahan dikeringkan dengan oven pengering tipe rak. Bahan tersebut selanjutnya dianalisis kadar karbon, kadar nitrogen, kadar air, kadar abu dan mineral (Fe, Mg, Mn, Zn, dan Ca) (AOAC, 2005). Informasi dari tahap ini digunakan untuk membuat formula media fermentasi untuk produksi bioinsektisida, dengan rasio C/N : 7

#### Proses Kultivasi

Produksi bioinsektisida diawali dengan penyegaran isolat, dilanjutkan dengan persiapan inokulum medium kultivasi. Satu lup biakan *Bacillus thuringiensis* diinokulasi dalam 50 mL media limbah cair tahu yang telah disterilisasi menggunakan *autoclave*, kemudian diinkubasi pada *rotary shaking incubator*, dengan kecepatan agitasi 150 rpm, suhu 28-32°C, selama 16 jam. Selanjutnya kultur tersebut digunakan sebagai starter media kultivasi dengan penambahan 10% (v/w) dari berat media yang digunakan.

Kultivasi media padat mengacu pada metode Capablo *et al.* (2001) yang dimodifikasi. Media kultivasi menggunakan campuran ampas sagu: ampas iles-iles dengan perbandingan 1 : 2. Konsentrasi elemen mikro disesuaikan dengan kondisi minimum yang dipergunakan oleh Valicente dan Mourao (2008) yaitu 1 g/L CaCO<sub>3</sub>, 0,3 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,02 g/L MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,02 g/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dan 0,02 g/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Kelembaban bahan diatur hingga nilai a<sub>w</sub> mencapai 0,92, kondisi pH diatur pada pH 6,8 – 7,2, dan diinkubasi pada suhu 30°C.

Penelitian ini mempelajari pengaruh empat tingkat ketebalan media yaitu 1 cm, 3 cm, 5 cm, dan 7 cm, terhadap keasaman (nilai pH), jumlah sel yang terbentuk, jumlah spora dan konsumsi substrat. Pengamatan dilakukan pada jam ke-0, 24, 48, 72, 96, 120 dan 144. Setiap perlakuan dilakukan dengan dua kali ulangan. Untuk pengujian sampel dilakukan homogenisasi terlebih dahulu, lalu diambil sebanyak sekitar 4 g. Parameter kinetika kultivasi yang diukur untuk menentukan efisiensi dan produktivitas proses produksi mengacu pada Rahayuningsih (2003) adalah jumlah sel (N), jumlah spora hidup (P), jumlah substrat yang dikonsumsi dengan melihat

kadar gula (S), laju pertumbuhan spesifik maksimum ( $\mu_{N\text{-maks}}$ ), efisiensi penggunaan substrat ( $1 - St/S_0$ ).

Rancangan percobaan yang digunakan untuk menganalisa pengaruh ketebalan media terhadap jumlah sel dan jumlah spora adalah rancangan acak kelompok, dengan dua kali ulangan, mengikuti persamaan berikut (Hanafiah, 2005):

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

- $Y_{ij}$  = nilai variabel respon unit percobaan yang dikenai taraf ke-i faktor ketebalan pada jam pengamatan ke-j  
 $\mu$  = nilai rata-rata pengamatan yang sesungguhnya  
 $A_i$  = keragaman akibat taraf kelompok ke-i faktor ketebalan  
 $B_j$  = keragaman akibat perlakuan taraf ke-j jam pengamatan  
 $\varepsilon_{ij}$  = pengaruh galat dari satuan percobaan ke-ij yang memperoleh kombinasi perlakuan.

Data yang diperoleh dari pengukuran parameter masing-masing dianalisis menggunakan ragam uji F. Apabila hasilnya menunjukkan perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji Duncan.

## Analisis

### Jumlah Sel dan Spora

Jumlah sel dan jumlah spora dilakukan dengan cara mengencerkan sampel secara serial pada larutan garam (0,85% NaCl), kemudian ditumbuhkan pada cawan petri dengan media *nutrient* agar diinkubasi pada suhu 30°C selama 16-18 jam, sampai koloni terbentuk sempurna. Jumlah koloni dinyatakan sebagai jumlah sel, sedangkan untuk jumlah spora, sampel yang telah diencerkan secara serial dipanaskan pada penangas air pada suhu 80°C selama 15 menit lalu didinginkan selama 5 menit sebelum ditumbuhkan pada cawan petri dengan media *nutrient* agar. Perhitungan jumlah dihitung pada rentang 29-300 koloni setiap cawan. Hasilnya dinyatakan dalam *coloni forming units* per mL (CFU/mL) (Zhuang *et al.*, 2011).

### Konsumsi Substrat

Penurunan bobot kering substrat diamati dengan cara menimbang substrat yang telah dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C sampai bebas air. Kemudian persentase bobot sisa dihitung dengan cara membagi bobot kering substrat saat pengamatan dengan bobot kering substrat awal dikalikan dengan seratus persen.

Penentuan kadar karbohidrat dilakukan dengan cara ekstraksi karbohidrat dari sampel dengan cara menimbang dengan teliti lalu melarutkannya menggunakan air panas sampai larut

sempurna, lalu ditambah akuades sampai tanda tera pada labu yang digunakan untuk pengenceran. Filtrat dipisahkan dengan kertas saring. Filtrat dianalisis menggunakan metoda phenol-sulphat (Matsuko *et al.*, 2005).

### Uji Hayati

Pengujian kemampuan bioinsektisida dengan melihat toksisitas produk dari hasil kultivasi 96 jam. Pengujian kemampuan toksisitas pada serangga, dilakukan terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* dan ulat *Crocidolomia pavonana*, keduanya pada kondisi instar II.

Pengujian kemampuan toksisitas terhadap larva *A. aegypti* dilakukan dengan menggunakan metode seperti yang dilakukan oleh Rahayuningsih (2013). Sampel diencerkan secara serial sebanyak lima taraf konsentrasi menggunakan akuades, volume larutan dibuat 10 mL. Sebanyak 10 ekor larva nyamuk *A. aegypti* dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi sampel. Sebagai kontrol digunakan akuades tanpa sampel. Pengamatan jumlah larva nyamuk yang mati dilakukan setelah 24 jam. Jumlah ulangan dilakukan 5 kali.

Pengujian kemampuan toksisitas terhadap *C. pavonana* dilakukan dengan menggunakan metode residu pada daun seperti yang dilakukan oleh Dono *et al.* (2010) yang dimodifikasi (dengan modifikasi konsentrasi sampel uji dan larutan pengencer yang digunakan. Sampel diuji dengan lima taraf konsentrasi sehingga dapat mematikan larva pada kisaran 0,01 - 5% yang ditentukan berdasarkan uji pendahuluan. Sampel diencerkan menggunakan larutan *agristick* (Alkilaril poliglikol eter) 0,1%. Daun sawi berukuran 4 cm x 4 cm dicelupkan sampai rata pada campuran sampel dengan *agristick* pada konsentrasi yang telah ditentukan, kemudian dikering anginkan. Sebagai kontrol digunakan larutan *agristick* 0,1% tanpa sampel. Setelah pelarut menguap, dua potong daun perlakuan diletakkan dalam cawan petri berdiameter 9 cm yang dialasi kertas hisap. Ke dalam setiap cawan petri dimasukkan 10 ekor larva *C. pavonana* instar II awal. Larva kontrol diberi pakan daun yang hanya dicelupkan dalam pelarut sesuai dengan pelarut sediaan yang digunakan. Pemberian pakan daun perlakuan dilakukan selama 48 jam, selanjutnya larva diberi pakan daun tanpa perlakuan hingga mencapai instar IV.

Nilai  $LC_{50}$  ditentukan dengan menggunakan analisis program *Probit Quant* dari Steve Maund. Potensi produk dihitung dengan cara membandingkan terhadap produk komersial merk Vectobac untuk toksisitas terhadap golongan diptera dan merk Bactospeine WP untuk toksisitas terhadap golongan lepidoptera sebagai standar. Potensi bioinsektisida menurut Dulmage *et al.* (1990) dihitung dengan rumus :

$$\text{Potensi sampel} = \frac{LC_{50} \text{ standar}}{LC_{50} \text{ sampel}} \times \text{Potensi standard (IU/mg)}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Bahan Baku Media Kultivasi

Bahan baku untuk media kultivasi *B. thuringiensis* menggunakan ampas sagu dan ampas iles-iles. Ampas iles-iles merupakan hasil samping fraksinasi industri glukomanan, menurut Syaefullah (1990) masih mengandung pati cukup tinggi yaitu sebesar 34 %. Ampas sagu sebagai limbah padat dari industri ekstraksi pati sagu masih mengandung pati sebesar 51,53% (Asben *et al.*, 2012).

Hasil analisis komposisi kimia dan sifat fisik (Tabel 1) menunjukkan keduanya mengandung karbohidrat yang tinggi sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon. Protein yang terkandung pada ampas iles-iles dan ampas sagu dapat dimanfaatkan sebagai sumber nitrogen.

Sisa glukomanan yang ada pada ampas iles-iles sebesar 2,52% mempunyai kemampuan untuk mengikat air. Sesuai dengan nilai *water holding capacity* yang tinggi yaitu sebesar 9,80, menyebabkan media dapat terjaga kelembabannya. Tetapi ampas iles-iles mempunyai densitas kamba yang rendah yaitu 0,07, sehingga bila dijadikan media akan sangat padat, sedangkan kultivasi substrat padat harus dalam bentuk yang memungkinkan berlangsungnya sirkulasi udara. Oleh sebab itu media dicampur dengan ampas sagu. Kandungan serat yang tinggi pada ampas sagu sebesar 22,51%, serta densitas kamba yang tinggi yaitu sebesar 0,32 akan membantu sifat porus pada media sehingga media menjadi tidak terlalu padat, sehingga masih memungkinkan ada sirkulasi udara.

Tabel 1. Komposisi kimia dan sifat fisik ampas sagu dan ampas iles-iles

Parameter	Ampas sagu	Ampas iles-iles
Air (% bb)	16,65 ± 0,17	10,32 ± 0,36
Abu (% bk)	8,80 ± 0,12	8,01 ± 0,02
Lemak (% bk)	1,53 ± 0,04	1,77 ± 0,06
Protein (% bk)	2,01 ± 0,01	12,64 ± 0,47
Serat (% bk)	27,03 ± 0,69	8,04 ± 0,69
Karbohidrat ( <i>by difference</i> ) (% bk)	60,65 ± 0,68	69,55 ± 0,22
Glukomanan (% bk)	-	2,81 ± 0,02
Densitas kamba (g/mL)	0,32 ± 0,02	0,07 ± 0,01
<i>Water holding capacity</i> (%)	296 ± 6	980 ± 8

*B.thuringiensis* membutuhkan sumber karbon, nitrogen dan mineral seperti Ca, Mg, Mn, Fe, dan Zn untuk pertumbuhan sel vegetatif dan menghasilkan endotoksin (Valicente dan Mourao, 2008). Ampas sagu dan ampas iles-iles dapat dimanfaatkan sebagai substrat karena juga mengandung jenis mineral yang dibutuhkan,

komposisi mineral pada ampas sagu dan ampas iles-iles seperti tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan mineral pada ampas sagu dan ampas iles-iles

Parameter	Ampas sagu (ppm)	Ampas iles-iles (ppm)
Kalsium	21.552	20.815
Magnesium	1.057	569
Mangan	558	41
Besi	1.422	928
Seng	116	116

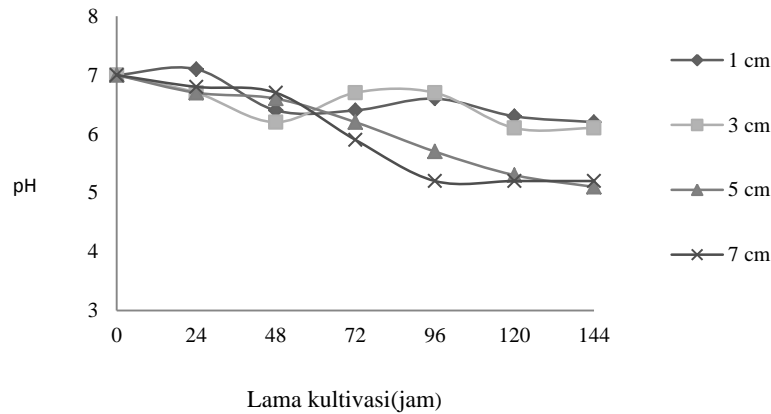
Komponen mineral yang sangat penting dalam produksi protein kristal adalah kalsium, sebagaimana dinyatakan oleh Dulmage *et al.* (1990). Kalsium selain berperan dalam pertumbuhan dan pembentukan endotoksin juga berfungsi menjaga kestabilan spora terhadap panas. Dari hasil analisis kadar mineral menunjukkan ampas sagu dan ampas iles-iles memiliki kandungan kalsium yang tinggi (> 20.000 ppm), disamping itu juga mengandung Mg, Mn, Fe, dan Zn yang dibutuhkan oleh *Bacillus thuringiensis* untuk pertumbuhan sel vegetatif, sporulasi dan menghasilkan endotoksin.

### Kultivasi Produk

Pertumbuhan dan pembentukan produk selama proses kultivasi dapat diamati melalui perubahan pH cairan kultivasi, pengukuran jumlah sel, pembentukan spora, konsumsi substrat dengan melihat total karbohidrat, dan susut bobot kering substrat.

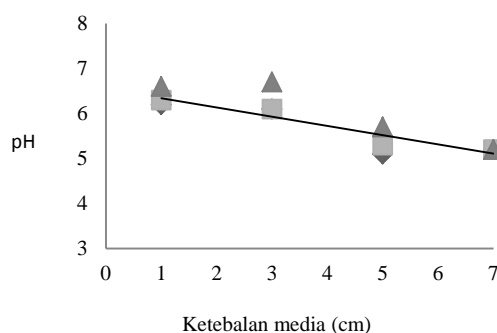
Selama kultivasi berlangsung terjadi perubahan pH pada media kultivasi, perubahan ini disebabkan oleh adanya perubahan kesetimbangan ion hidrogen yang terjadi akibat pengaruh pembentukan produk. Menurut Benoit *et al.* (1990) selama kultivasi *Bacillus thuringiensis* dapat menghasilkan asam laktat, asam piruvat, asam asetat dan poli-β-hidroksi butirat. Selama kultivasi sampai 144 jam menunjukkan penurunan pH substrat (Gambar 1). Pada ketebalan 1 cm dan 3 cm tidak menunjukkan penurunan pH yang signifikan. Pada ketebalan 5 cm dan 7 cm pH turun cukup signifikan, pada jam ke-96 pH di bawah 6, tidak di bawah pH 5 sehingga bakteri masih dapat tumbuh. Menurut Bernard dan Utz (1993) kondisi optimum untuk pertumbuhan *Bacillus thuringiensis* adalah pada pH 5,5-8,5.

*Bacillus thuringiensis* selama kultivasi menghasilkan amilase (Bakri *et al.*, 2012), oleh sebab itu pati yang ada pada media akan terhidrolisis dan merubahnya menjadi glukosa sehingga mudah dikonsumsi oleh bakteri.



Gambar 1. Pengaruh ketebalan media terhadap perubahan pH selamakultivasi

Selanjutnya melalui proses metabolisme yang ada di dalam sel, melalui proses glikolisis glukosa dirubah menjadi asam organik. Selain enzim amilase, menurut Lin *et al.* (2012) *Bacillus thuringiensis* ada juga yang menghasilkan selulase sehingga menghidrolisis komponen selulosa menjadi fermentable sugars, selanjutnya glukosa diubah menjadi asam. Jumlah dan jenis karbohidrat dalam media akan mempengaruhi terbentuknya jumlah asam organik, semakin tebal media akan menghasilkan asam organik lebih banyak yang menyebabkan pH media akan semakin rendah (Gambar 2).



Gambar 2. Hubungan pH dengan ketebalan media

Pertumbuhan sel pada media dengan ketebalan yang berbeda menunjukkan pola yang hampir sama, tetapi berbeda pada jumlahnya. Menurut Wenge dan Methews (1999) pertumbuhan dan penggunaan metabolisme dalam kultivasi dan proses jalur metabolik bakteri sangat dipengaruhi oleh parameter kultivasi seperti suhu, pH, dan tingkat oksigen terlarut.

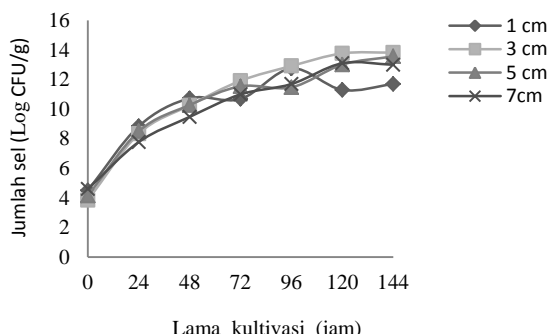
Kurva pertumbuhan *B. thuringiensis* pada media campuran ampas sagu dan ampas iles-iles mempunyai fase adaptif singkat sehingga tidak nampak pada kurva tersebut. Fase ini diduga terjadi pada waktu pertumbuhan jam ke-0 hingga jam ke-4 (melihat pada media starter). Karena bakteri ditumbuhkan dulu pada media penyegaran sehingga

penyesuaian diri terhadap lingkungan menjadi lebih cepat. Kurva pertumbuhan menunjukkan fase logaritmik secara keseluruhan sampai jam ke-120. Pada fase logaritmik mikroba membelah dengan cepat dan konstan, pada fase ini pula pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisinya, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Periode ini berada pada kondisi pertumbuhan seimbang dengan laju pertumbuhan spesifik konstan, sedangkan komposisi media berubah akibat terjadinya sintesis produk (Mangunwidjaja dan Suryani, 1994).

Selanjutnya setelah jam ke-120 memasuki fase stasioner, berdasarkan analisis ragam uji F menunjukkan bahwa pengaruh perbedaan ketebalan media terhadap pengukuran jumlah sel pada selang pengamatan 24 jam signifikan pada taraf 5%. Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan jumlah sel terhadap waktu mulai dari jam ke-0 sampai jam ke-120 berbeda nyata, dan pada jam ke-120 dengan ke-144 tidak berbeda nyata. Hal ini menunjukkan setelah jam ke-120 pertumbuhan sel konstan artinya memasuki fase stasioner. Pada fase ini populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati

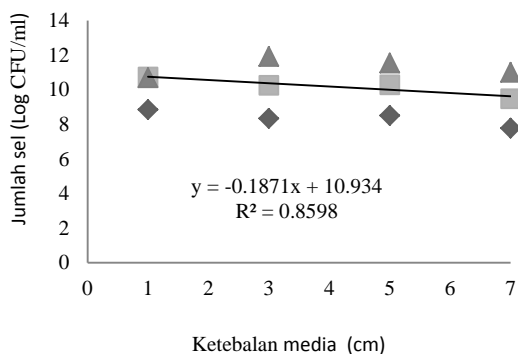
Fase pertumbuhan maksimum ( $\pi_N$ -max) pada ke-4 tingkat ketebalan berada pada jam ke-24, tetapi berbeda kecepatannya, kemudian laju pertumbuhan sel menurun (Gambar 3). Perubahan tersebut karena pada awal kultivasi *Bacillus thuringiensis* mengkonsumsi senyawa sederhana yang ada pada substrat. Setelah senyawa sederhana pada substrat mulai habis, *Bacillus thuringiensis* harus menguraikan senyawa yang lebih kompleks menjadi senyawa sederhana, baru dapat dikonsumsi. *Bacillus thuringiensis* menghasilkan enzim ekstraseluler seperti amilase dan  $\mu$ -glukonase yang akan mengurai pati menjadi gula sederhana, serta protease yang akan mengurai protein menjadi asam amino. Pada kondisi ini sel tetap tumbuh tetapi jumlah sel yang mati juga semakin meningkat, sampai terjadi jumlah sel hidup hasil pembelahan

sama dengan jumlah sel yang mati, sehingga jumlah sel hidup relatif konstan.



Gambar 3. Pertumbuhan sel selama kultivasi

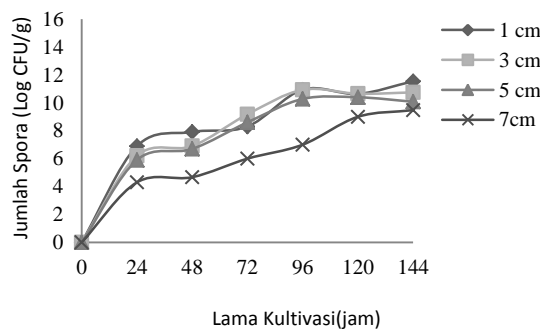
Ketebalan media ternyata mempengaruhi pertumbuhan sel. Berdasarkan analisis ragam uji F interaksi antara ketebalan media dan waktu pengamatan signifikan pada taraf 1%. Hal ini karena semakin tebal media menyebabkan pH semakin rendah, dan ketika pada kondisi pH tidak optimum untuk pertumbuhan maka jumlah sel menurun. Disamping itu semakin tebal media, tingkat aerasi menjadi berkurang, untuk pertumbuhan sel yang baik dibutuhkan oksigen yang cukup. Gambar 4 menunjukkan semakin tebal media, jumlah sel yang dihasilkan semakin rendah.



Gambar 4. Hubungan pertumbuhan sel dengan ketebalan media

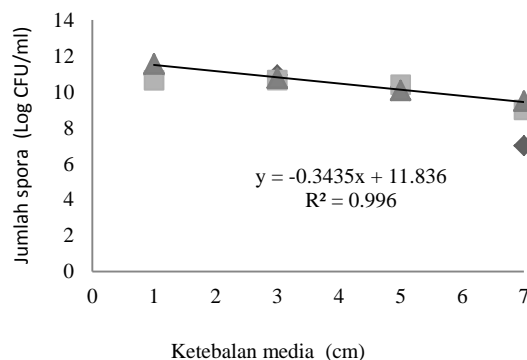
Akumulasi asam organik pada fase logaritmik mengakibatkan turunnya pH medium. Menurut Frazier dan Westhoff (1988) lingkungan sel yang asam dapat mengakibatkan proton akan masuk ke dalam sitoplasma dan menurunkan pH internal sel sehingga dapat mendenaturasi komponen-komponen sel protein termasuk enzim sehingga mengakibatkan pertumbuhan mikroba terhambat. Sebagian mikroba dapat mengeluarkan sejumlah proton yang masuk ke dalam sitoplasma dengan menggunakan energi, tetapi lama kelamaan energi yang tersedia akan berkurang dan tidak cukup untuk aktivitas dan sintesis komponen-komponen sel, sehingga pertumbuhan sel dapat terhambat bahkan berhenti.

Pembentukan spora oleh *Bacillus thuringiensis* selama kultivasi merupakan hal yang sangat penting dalam proses produksi bioinsektisida. *Bacillus thuringiensis* akan membentuk spora bersamaan dengan terbentuknya kristal protein (Federici *et al.*, 2010) yang berfungsi sebagai bahan aktif pada bioinsektisida. Oleh sebab itu semakin banyak spora yang terbentuk maka diharapkan makin tinggi jumlah kristal protein yang dihasilkan, sehingga dengan melihat jumlah spora yang terbentuk dapat digunakan untuk menentukan waktu panen sebagai indikator bahwa produk telah terbentuk. Hal ini karena kristal protein akan lisis dari dinding sel pada masa akhir sporulasi ( Schnepf *et al.*, 1998).



Gambar 5. Hubungan pembentukan spora dengan lama kultivasi

Spora mulai teramati pada jam ke-24, dan sampai jam ke-144 masih menunjukkan terbentuknya spora (Gambar 5). Pembentukan spora mulai terlihat nyata pada jam ke-24 sampai jam ke-96. Pada fase selanjutnya laju pembentukan spora melambat, hal ini kemungkinan karena terjadi perkecambahan spora menjadi sel vegetatif. Terbukti dengan tidak terlihatnya fase kematian pada grafik pertumbuhan sel (Gambar 3).

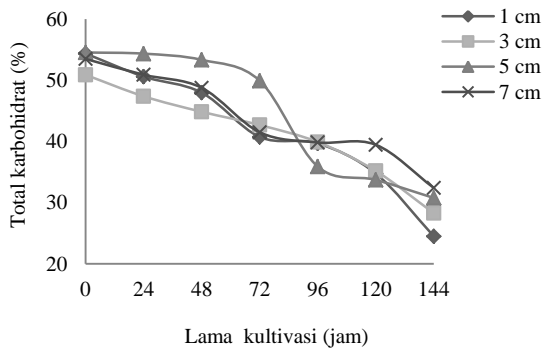


Gambar 6. Hubungan Jumlah spora dengan ketebalan media

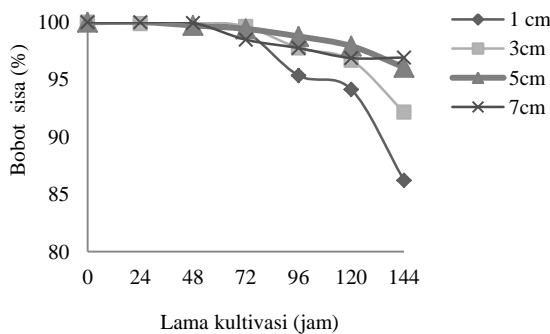
Ketebalan media sangat berpengaruh pada jumlah spora yang dihasilkan. Berdasarkan analisis ragam uji F menunjukkan bahwa perbedaan ketebalan media terhadap pengukuran jumlah spora

pada selang pengamatan 24 jam berpengaruh signifikan pada taraf 1%. Interaksi antara ketebalan media dan waktu pengamatan signifikan pada taraf 1%. Jumlah spora semakin menurun pada media yang semakin tebal (Gambar 6).

Selama kultivasi berlangsung sel akan mengkonversi sumber karbon menjadi biomassa, produk, CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O. Hal ini akan menyebabkan terjadinya penurunan kadar karbohidrat (Gambar 7) dan penyusutan bobot kering substrat (Gambar 8). Pada awal kultivasi terjadi penyusutan bobot yang lambat, baru pada jam ke-96 mengalami penurunan yang tinggi sesuai dengan berkurangnya kadar karbohidrat, karna pada tahap awal baru terjadi proses penguraian pati menjadi senyawa yang lebih sederhana, baru kemudian dikonsumsi oleh *Bacillus thuringiensis*. Disamping itu ketersediaan enzim amilase yang semakin banyak menyebabkan pati terurai menjadi lebih cepat.



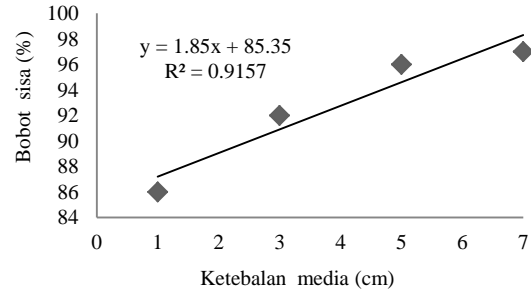
Gambar 7. Hubungan kadar karbohidrat dengan lama kultivasi



Gambar 8. Perubahan bobot sisa selama kultivasi

Ketebalan media mempengaruhi penurunan bobot kering substrat. Semakin tebal substrat penurunan bobot kering semakin kecil. Gambar 9

menunjukkan semakin tebal media persentase bobot sisa media makin tinggi. Semakin tebal media sirkulasi oksigen semakin rendah sehingga pertumbuhan sel juga semakin rendah, karena semakin tebal media jumlah sel yang terbentuk semakin rendah sehingga jumlah enzim yang terbentuk semakin sedikit menyebabkan total substrat yang dikonsumsi maupun yang dikonversi menjadi senyawa lain seperti asam organik, CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O juga menjadi semakin rendah.



Gambar 9. Hubungan bobot sisa dengan ketebalan media pada jam ke-144

### Kinetika Kultivasi

Pengamatan parameter kinetika kultivasi dilakukan untuk melihat laju pertumbuhan mikroorganisme, pembentukan spora sebagai produk dan konsumsi substrat. Pertumbuhan dapat dicirikan dengan waktu yang digunakan untuk menggandakan jumlah atau massa sel dan konversi substrat menjadi biomassa. Pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini, nilai laju pertumbuhan spesifik berdasarkan jumlah sel ( $\mu_N$ ) yang menyatakan jumlah sel per satuan waktu kultivasi. Laju pertumbuhan maksimum pada semua tingkat ketebalan pada jam ke-24. Laju pertumbuhan maksimum tertinggi pada media dengan ketebalan 3 cm. Hasil perhitungan kinetika kultivasi disajikan pada Tabel 3. Banyaknya karbohidrat yang dimanfaatkan menjadi biomassa dan produk ditunjukkan oleh nilai efisiensi pemanfaatan substrat  $((S_0 - S_t)/S_0)$ . Ketebalan media kultivasi 1 cm menunjukkan efisiensi paling besar yaitu 55%. Nilai ini masih relatif kecil, karena masih banyaknya karbohidrat yang belum terurai. Tetapi sisa pati justru dapat dimanfaatkan sebagai pelindung produk yang dihasilkan, dengan memanfaatkan sebagai penyalut/enkapsulasi, setelah karbohidrat dipisahkan dari serat dan sisa bahan pengotor yang lain.

Tabel 3. Parameter kinetika kultivasi produksi bioinsektisida pada beberapa ketebalan

Parameter	Satuan	Ketebalan media (cm)			
		1	3	5	7
N-max	Log CFU/g	12,7±0,3	13,8±0,9	13,5±0,6	13,1±0,9
P-max	Log CFU/g	11,5±0,6	10,7±0,3	10,1±0,4	9,4±0,5
$\mu_{N-max}$	Jam <sup>-1</sup>	0,020±0,002	0,022±0,002	0,021±0,001	0,017±0,001
$(S_0 - S_t)/S_0$	%(db)	55±3	44±1	44±1	39±1

**Toksistas Produk**

Tingkat efektivitas insektisida mikrobial ditentukan berdasarkan kemampuan bahan aktif bioinsektisida membunuh serangga target. Salah satu cara yang dapat digunakan untuk pengujian ini adalah dengan uji hayati. Uji hayati bioinsektisida didesain untuk menentukan berapa jumlah bahan yang diperlukan yang dapat mematikan populasi serangga sasaran. Pengukuran kematian populasi serangga adalah konsentrasi toksin yang dapat membunuh 50% populasi serangga adalah LC<sub>50</sub>.

*Bacillus thuringiensis* dapat berfungsi sebagai biokontrol untuk larva nyamuk seperti nyamuk *Anopheles*, *Culex*, *Aedes* yang merupakan vektor penyakit bagi manusia (Foda *et al.*, 2010; Federici *et al.*, 2010; Renganathan *et al.*, 2011). Pengaruh ketebalan media terhadap kemampuan toksistas produk pada larva nyamuk diujikan terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* (golongan Diptera) tersaji pada Tabel 4. Nilai LC<sub>50</sub> pada setiap pengujian pada kondisi yang berbeda akan bervariasi, dan dapat diminimalisir dengan cara membandingkan dengan formula standar dengan pengujian menggunakan populasi serangga yang sama, selanjutnya potensi sampel dihitung dengan membandingkan LC<sub>50</sub> standard dengan LC<sub>50</sub> sampel yang diuji (Dulmage *et al.*, 1990).

Kemampuan toksistas dilihat dari potensinya media yang menggunakan campuran ampas sagu dengan ampas iles-iles memberikan kemampuan toksistas yang lebih baik, menghasilkan kisaran nilai potensi produk sebesar 2 500 IU/mg sampai 5.000 IU/mg, apabila dibandingkan kultivasi menggunakan media tunggal. Menurut Sasmitaloka (2014) hasil kultivasi *Bacillus thuringiensis* subsp.*israelensis* (dari Vectobac) yang ditumbuhkan pada media ampas iles-iles menghasilkan potensi 160 IU/mg dan pada media ampas sagu 741 IU/mg.

*Bacillus thuringiensis* dapat juga berfungsi sebagai biokontrol untuk larva ulat (golongan Lepidoptera) (Patel *et al.*, 2009; Capablo *et al.*, 2001). Kemampuan toksistas terhadap larva ulat

diujikan terhadap larva ulat *Crocidolomia pavonana*, disajikan pada Tabel 5.

Ketebalan media ternyata berpengaruh terhadap kemampuan toksistas produk. Semakin tebal media kemampuan toksistas menurun. Hal ini berhubungan dengan jumlah endotoksin yang dihasilkan, semakin tebal media jumlah endotoksin yang dihasilkan menurun, dilihat dari jumlah spora yang menurun (Gambar 6).

Bioinsektisida yang dihasilkan memiliki daya toksistas terhadap larva *Crocidolomia pavonana* (golongan Lepidoptera) dan larva *Aedes aegypti* (golongan Diptera), tetapi lebih efektif terhadap larva *Aedes aegypti*. Hal ini sesuai dengan karakteristik kristal yang dihasilkan, bentuk dan BM proteinnya mendekati kristal dari *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, dimana kristal protein yang dihasilkan dari *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* memang lebih cocok digunakan sebagai biokontrol untuk larva nyamuk. Potensi yang dihasilkan lebih kecil dari produk komersial. Hal ini karena produk komersial kemungkinan mengandung bahan aktif dengan konsentrasi lebih tinggi, sementara hasil yang diperoleh masih banyak mengandung serat dan karbohidrat, sehingga konsentrasi kristal dalam bahan masih relatif kecil. Kemampuan daya bunuh mungkin dapat ditingkatkan dengan meningkatkan konsentrasi kristal protein.

Hasil kultivasi perlu dipisahkan dari serat dan sebagian karbohidrat pada media, sehingga akan meningkatkan konsentrasi kristal proteinnya. Penghilangan serat juga mengurangi masalah pada aplikasi, karna dengan adanya serat dapat menyumbat pada alat penyemprot. Karbohidrat perlu disisakan sebagian karena dapat berfungsi sebagai penyalut kristal protein yang berfungsi sebagai pelindung. Pada aplikasi di lapangan adanya karbohidrat yang menempel pada daun akan memberi aroma manis yang akan merangsang serangga untuk mengkonsumsinya.

Tabel 4. Toksistas produk bioinsektisida terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*

Parameter	Satuan	Ketebalan Media (cm)				Standar (Vectobac)
		1	3	5	7	
LC <sub>50</sub>	mg/mL	0,24	0,48	0,55	0,59	0,02
Potensi	IU/mg	5 000	3 750	3 000	2 500	15 000*

\*WHO

Tabel 5. Toksistas produk bioinsektisida terhadap larva ulat *Crocidolomia pavonana*

Parameter	Satuan	Ketebalan Media (cm)				Standar (Bactospeine WP)
		1	3	5	7	
LC <sub>50</sub>	mg/mL	3,3	7,0	7,2	7,2	0,05
Potensi	IU/mg	2 424	1 143	1 111	1 111	16 000*

\*Standard USDA



## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Bioinsektisida dapat diproduksi menggunakan isolat lokal dan memanfaatkan campuran ampas sagu dan ampas iles-iles sebagai media tumbuhnya. Prosesnya menggunakan cara kultivasi media padat. Ketebalan media kultivasi untuk memproduksi bioinsektisida mempengaruhi kinerja *Bacillus thuringiensis*, semakin tebal media menyebabkan pH media semakin rendah, jumlah sel dan spora yang dihasilkan semakin rendah. Begitu pula kemampuan toksisitas semakin menurun. Bioinsektisida yang dihasilkan memiliki daya toksisitas terhadap larva *Crocidolomia pavonana* (golongan Lepidoptera) dan larva *Aedes aegypti* (golongan Diptera), dan memiliki potensi lebih tinggi terhadap larva *Aedes aegypti*.

### Saran

Perlu dilakukan penelitian berikutnya untuk melakukan *recovery* dan formulasi produk, agar diperoleh konsentrasi bahan aktif yang lebih tinggi sehingga meningkatkan potensi produk.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih atas dukungan fasilitas berupa bahan kimia dan alat dari Program I-MHERE B2.C IPB.

## DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 2005. *Official Method of Analysis of The Association of Official Agricultural Chemist*. Washington DC.
- Asben A, Irawadi TT, Syamsu K, Haska N. 2012. Kajian potensi dan pemanfaatan limbah ampas sagu setelah pretreatment. *J Lumbung. Politani Payakumbuh*. 11(1): 1-11.
- Awg-Adeni DS, Abd-Aziz S, Bujang K, Hassan MA. 2010. Bioconversion of sago residu into value added products. *Afri J Biotechnol*. 9:2016-2021.
- Bakri Y, Ammounh H, El-Khouri S, Harba M Thonart P. 2012. Isolation and identification of a new *bacillus* strain for amylase production. *Res Biotechnol*. 3(6): 51-58
- Benhard K dan Utz R. 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides for Experimental and commercial uses. di dalam. Enwistle PF, Cory JS, Bailey MJ & Higgs S. (editor). *Bacillus thuringiensis*, An Enviromental Biopesticide: Theory and Practice. Chichester : John Wiley and Son. p 255-266.
- Benoit LG, Wilson GR dan Baugh CL.1990. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Lett Appl Microbiol* 10:15-16.
- Capablo DMF, Valisente FH, Moraes IO, Pelizer LH. 2001. Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis tolworthi* to control fall armyworm in Maize. *J Biotechnol*. 4(2): 112-115.
- Devi PSV dan Rao MLN. 2005. Tailoring production technology: *Bacillus thuringiensis* (Bt) for localized production. *Tailoring Biotechnol*. 1(2):107-120.
- Dono D, Ismayana S, Idar, Prijono D, Muslikha I. 2010. Status dan mekanisme resistensi biokimia *crocidolomia pavonana* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) terhadap insektisida organofosfat serta kepekaannya terhadap insektisida botani ekstrak biji *Barringtonia asiatica*. *J Entomol Indon* 7(1):9-27.
- Dulmage T, Yousten AA, Singer S, Lacey LA. 1990. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/WHO special programme for research and training in tropical diseases (tdr).
- Federici, Brian A, Park, Hyun-Woo, Bidesh DK. 2010. Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with mphasis on genetic engineering of bacterial larvacides for mosquito control. *The Open Toxicol J*. 3:83-100.
- Foda MS, Fawkia M, El-Beih M, Maysa E, Nora NA.El-Gamal. 2010. Physiological formation of mosquitocidal toxin by a novel *bacillus thuringiensis* isolate under solid state fermentation. *J Life Sci*. 7:144-152.
- Frazier WC dan Westhoff DC. 1988. *Food Microbiology*. New York: McGraw-Hillbook Company.
- Mangunwidjaja D dan Suryani A. 1994. *Teknologi Bioproses*. Jakarta: Penerbit Swadaya.
- Hanafiah KA. 2005. *Rancangan Percobaan: Teori dan Aplikasi*. 2<sup>nd</sup> Ed. Jakarta: Rajawali Pers.
- Lin L, Kan X, Yan H dan Wang D. 2012. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electron J Biotechnol*. 15 (3): 1-7.
- Mangunwidjaja D dan Suryani A. 1994. *Teknologi Bioproses*. Jakarta: Penerbit Swadaya.
- Matsuko T, Minomi A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S, Lee YC. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem*. 339: 69-72.
- Nelly A. 2012. Penentuan rasio C/N dan pengembangan produksi bioinsektisida oleh *Bacillus thuringiensis* menggunakan media kultivasi limbah industri tahu. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

- Patel HK, Jani JJ, dan Vyas HG. 2009. Isolation and characterization of lepidopteran specific *Bacillus thuringiensis*. *IJB*. 6 (3):121-126.
- Pujiastuti Y. 2004. Toksisitas kristal protein dan spora isolat *Bacillus thuringiensis* pada larva lepidoptera. *Agria*. 1(1):27-29.
- Purnawati R, Sunarti TC, Syamsu K, Rahayuningsih M. 2014. Characterization of novel *Bacillus thuringiensis* isolated from *attacus atlas* and its growth kinetics in the cultivation media of tofu whey for bioinsecticide production. *J Biol Agric and Health*. 4(16): 33-39.
- Rahayuningsih M. 2003. Toksisitas dan aktivitas dipteroidal bioinsektisida *Bacillus thuringiensis israelensis* tipe liar dan mutan pada berbagai formulasi media dan kondisi kultivasi. [Disertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Renganathan K, Rathinam X, Danial M, Subramaniam S. 2011. Quick isolation and characterization of novel *Bacillus thuringiensis* strains from mosquito breeding sites in Malaysia. *Emir J Food Agric*. 23 (01): 17-26.
- Sasmitaloka KS. 2014. Produksi bioinsektisida oleh *Bacillus thuringiensis* menggunakan hasil samping agroindustri pada kultivasi media padat. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Schnepf EN, Crickmore J, dan Van Rie D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Di dalam : Apaydin O. 2004. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strain from different grain habitats. [Disertasi]. Turkey: Institute of Technology Turkey.
- Syaefillah S. 1990. Studi karakteristik glukomanan dan sumber "*indigenous*" Iles-Iles (*A. onchophyllus*) dengan variasi proses pengeringan dan basis perendaman [Tesis]. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Valicente FH dan Mourao AHC. 2008. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. *Neotropical Entomology*. 37(6):702-708.
- Valicente FH, Tuelher EDS, Leilete MIS, Freire FL, Vieira CM. 2010. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using commercial laboratory medium and agricultural by products as nutrient sources. *Revista Brasileira de Milho e Sargo*. 9(1):1-11.
- Wenge F dan Methews AF. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum* kinetic model and effects of pH, substrate and oxygen. *J Biochem Eng*. 3: 163-170.
- Zhang W, Qiu L, Gong A, Cao Y, Wang Bin. 2013. Solid-state fermentation of kitchen waste for productio of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide. *Biores*. 8(1):1124-1135.
- Zhuang L, Zhou S, Wang Y, Liu Z, Xu R. 2011. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: effect of heavy metals. *Biores Technol*. 102:4820-4826.