Hayati, Juni 1994, hlm.21-23
ISSN 0854-8587 Vol. 1, No. 1

Isolasi *Bacillus thuringiensis* Berl. dari Peternakan Ulat Sutera dan Toksisitasnya terhadap Larva *Crocidolomia binotalis* Zell. dan *Spodoptera litura* F.

IMAN RUSMANA DAN RATNA SIRI HADIOETOMO*
Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jl. Raya Pajajaran, Bogor, 16144

Diterima 16 Mei 1994/Disetujui 20 Juni 1994

In the effort to isolate *Bacillus thuringiensis* from sericultural farms, 48 soil samples from different farms in South Sulawesi, Central Java, and East Java were examined. As many as 2813 isolates of spore formers were obtained and when they were examined under the phase contrast microscope, 32 of them showed the formation of crystal proteins. Isolates which were toxic to *C. binotalis* includes SPG-A 11.10b.01, SPG-A 12.01.03, SPG-A 12.03.01, and SPG-A 12.16.01; their toxicity was comparable to that of Thuricide. None of the isolates tested showed 100% mortality to *S. litura*. However, SPG-A 11.10b.01 and SPG-A 12.16.01 were more toxic than that of Thuricide. The highest mortality obtained for *S. litura* was 65%.

PENDAHULUAN

Bacillus thuringiensis merupakan bakteri patogen pada serangga. Sifat patogenitasnya disebabkan bakteri ini menghasilkan beberapa macam toksin yang bersifat insektisidal. Toksin-toksin tersebut adalah α-eksotoksin, β-eksotoksin, dan δ-endotoksin (protein kristal) (Dubois dan Lewis, 1981). Di antara toksin-toksin tersebut, protein kristal yang diproduksi secara komersial untuk insektisida mikrobe.

Di Indonesia insektisida mikrobe berbahan aktif *B. thuringiensis* yang digunakan diimpor dari beberapa negara: Belgia (Bactospeine), Amerika Serikat (Dipel), dan Swiss (Thuricide). Galur *B. thuringiensis* yang digunakan pada insektisida tersebut adalah *B. thuringiensis* var. kurstaki.

Usaha eksplorasi *B. thuringiensis* asli Indonesia perlu dilakukan karena *B. thuringiensis* (protein kristalnya) mempunyai spektrum inang yang sempit. Oleh karena itu, pemberantasan serangga hama yang ada di Indonesia idealnya menggunakan *B. thuringiensis* asal Indonesia.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi galur-galur *B. thuringiensis* dari tanah tempat pembuangan limbah peternakan ulat sutra dan uji toksisitasnya terhadap larva *Crocidolomia binotalis* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae) dan *Spodoptera litura* F. (Lepidoptera: Noctuidae).

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Contoh Tanah. Sebanyak kurang lebih 100 gram contoh tanah diambil dari tempat pembuangan limbah peternakan ulat sutera pada kedalaman 12-20 cm, kemudian dimasukkan ke dalam kantung-kantung plastik. Seluruhnya dikumpulkan 48 contoh tanah dari propinsi Sulawesi Selatan (35 contoh tanah), Jawa Tengah (4 contoh tanah) dan, Jawa Timur (9 contoh tanah).

Isolasi *Bacillus thuringiensis*. Satu gram contoh tanah disuspensikan dalam sembilan mililiter air suling steril, kemudian diberi perlakuan renjatan panas dengan suhu 80°C selama 10 menit (Rodina, 1972). Suspensi tersebut diencerkan berseri dan sebanyak 0.1 ml dari pengenceran yang sesuai disebarkan pada medium nutrien agar (NA, pH 7.4) dan diinkubasikan pada suhu ruang (27-30°C).

Pengamatan ini dilakukan terhadap morfologi koloni dan sel sejak dua hari inkubasi. Koloni yang terpisah baik dan menunjukkan ciri koloni *Bacillus* dimurnikan dengan metode penggoresan kuadran pada medium NA.

Pengamatan protein kristal dilakukan dengan menggunakan mikroskop kontras fase pada perbesaran 1000 kali. Biakan murni disimpan pada agar miring NA dengan suhu 4°C.

Pengujian Toksisitas *B. thuringiensis* pada Larva Serangga Sasaran. Daun makanan serangga (daun sawi untuk *C. binotalis* dan daun talas untuk *S. litura*) yang digunakan berukuran 5 cm x 5 cm. Sementara itu untuk setiap isolat uji disiapkan suspennsi protein kristal bercampur spora yang dibubuhi 4°/oo larutan Triton B-1956 untuk membantu meratakan dan melekatkan spora dan protein kristal pada permukaan daun. Potongan daun tadi masing-masing dicelupkan ke dalam suspensi, kemudian dikeringudarakan. Sebagai kontrol digunakan potongan daun yang dicelupkan ke dalam *Nutrient Broth* steril.

Pengujian ini dilakukan dengan tiga ulangan, setiap ulangan digunakan 20 larva instar pertama berumur satu hari. Larva-larva tersebut ditempatkan dalam cawan petri yang telah diberi kertas serap dan daun yang sudah diberi perlakuan. Mortalitas larva diamati setiap hari selama empat hari.

HASIL

Jumlah Contoh Tanah yang Diperiksa. Dari 48 contoh tanah yang diperiksa, semuanya menunjukkan adanya bakteri yang berciri-ciri genus *Bacillus*. Akan tetapi, hanya pada 21 contoh tanah (43.75 %) yang menunjukkan adanya tanda protein kristal yang merupa-

*Penulis untuk Korespondensi

kan ciri khas *B. thuringiensis*. Kedua puluh satu contoh tanah ini berasal dari lima kabupaten, yaitu 15 contoh tanah dari Soppeng, 2 contoh tanah dari Sidrap, 2 contoh tanah dari Pasuruan, 1 contoh tanah dari Kediri, dan 1 contoh tanah dari Blitar (Tabel 1).

Perolehan *B. thuringiensis*. Jumlah isolat yang menunjukkan ciri-ciri genus *Bacillus* seluruhnya ada 2813. Dari jumlah tersebut hanya 32 isolat (1.14%) yang merupakan bakteri pembentuk protein kristal. Kabupaten Soppeng mempunyai frekuensi kandungan bakteri pembentuk protein kristal tertinggi, yaitu 1.66%. Semua spora bakteri pembentuk protein kristal hasil isolasi berbentuk oval dan letaknya subterminal.

Tabel 1. Isolat *Bacillus thuringiensis* dari Tanah Tempat Pembuangan Limbah Peternakan Ulat Sutera di Beberapa Kabupaten di Indonesia

Kabupaten	Contoh Tanah yang Mengandung BPPK /Contoh Tanah yang Diisolasi	Isolat BPPK	Isolat *Bacillus*	Persentase Isolat BPPK/ Isolat *Bacillus*
Soppeng	15/29	26	1564	1.66
Kediri	1/1	1	86	1.16
Sidrap	2/4	2	176	1.14
Blitar	1/2	1	151	0.66
Pasuruan	2/6	2	443	0.45
Enrekang	0/1	0	54	0.00
Tana Toraja	0/1	0	65	0.00
Temanggung	0/3	0	206	0.00
Pati	0/1	0	69	0.00
Total	21/48	32	2813	4.8
Persentase Frekuensi Keseluruhan				1.14

BPPK: bakteri pembentuk protein kristal

Bentuk Protein Kristal. Dari isolat hasil isolasi ditemukan empat macam bentuk protein kristal yaitu bipiramida, oval, tidak beraturan (amorf), dan bulat. Sebagian besar isolat mempunyai protein kristal berbentuk bipiramida. Hanya dua isolat (SPG-A 12.01.01 dan SPG-A 12.01.02) yang protein kristalnya berbentuk oval, dua isolat (SPG-A 11.14.01 dan SDP-A 21.01.01) yang protein kristalnya berbentuk amorf, dan satu isolat (SPG-A 11.17.01) yang protein kristalnya berbentuk bulat.

Toksisitas terhadap *C. binotalis* dan *S. litura*. Dari hasil uji toksisitas *B. thuringiensis* hasil isolasi pada larva *C. binotalis* instar pertama, ada empat isolat (SPG-A 11.10b.01, SPG-A 12.01.03, SPG-A 12.03.01, dan SPG-A 12.16.01) yang toksisitasya sama dengan Thuricide (Tabel 2). Keempat isolat tersebut mempunyai protein kristal berbentuk bipiramida.

Menurut hasil uji toksisitas *B. thuringiensis* hasil isolasi pada *S. litura* instar pertama, ada dua isolat (SPG-A 12.16.01, dan SPG-A 11.10b.01) yang keefektifannya sampai hari ketiga mencapai 65% (Tabel 3). Kedua isolat tersebut lebih efektif daripada Thuricide.

PEMBAHASAN

Bacillus adalah salah satu genus bakteri yang mampu membentuk struktur dorman yaitu endospora. Endospora ini bersifat resisten terhadap bahan-bahan kimia dan perlakuan fisik (panas, sinar ultra violet, dan kering).

Tabel 2. Mortalitas Rata-Rata Larva *Crocidolomia binotalis* pada Uji Toksisitas *B. thuringiensis* Hasil Isolasi

Sandi Isolat	Mortalitas Rata-Rata Larva sampai Hari Ke-1	Ke-2	Ke-3	Ke-4
Pembanding[a]	1	18	20	20
SPG-A 11.10b.01	6	20	20	20
SPG-A 12.01.03	3	20	20	20
SPG-A 12.03.01	2	19	20	20
SPG-A 12.16.01	17	20	20	20
SPG-A 11.10b.03	1	4	12	12
SPG-A 11.19.01	2	8	10	15
SPG-A 11.12.02	0	5	9	12
SDP-A 21.01.01	3	4	9	9
SPG-A 12.01.01	0	2	7	7
SPG-A 12.01.02	1	2	4	8
SPG-A 21.07.01	2	4	4	7
SPG-A 11.17.01	1	2	4	11
BTR-A 11.02.01	0	2	4	6
SPG-A 21.05.01	2	4	4	9
SPG-A 12.14.01	1	3	3	7
SPG-A 21.07.01	0	2	3	3
SDP-A 11.07.01	1	2	3	4
SPG-A 11.14.01	0	1	3	3
SPG-A 11.15.01	0	2	2	2
SPG-A 11.10a.02	1	1	2	2
SPG-A 11.19.02	0	0	2	2
PSR-A 11.16.01	0	1	2	2
SPG-A 11.10a.01	0	1	2	2
SPG-A 11.10b.02	0	1	2	2
KDR-A 11.01.01	1	1	2	3
SPG-A 11.13.02	0	0	1	1
PSR-A 11.08.01	0	0	0	3
SPG-A 21.02.02	0	0	0	0
SPG-A 11.12.01	0	0	0	0
SPG-A 11.13.01	0	0	0	0
SPG-A 11.19.03	0	0	0	0
SPG-A 21.02.01	0	0	0	0
Kontrol	0	0	0	0

[a] Pembanding yang digunakan adalah isolat dari Thuricide HP

Perlakuan renjatan panas (80°C selama 10 menit) pada metode isolasi bertujuan untuk mematikan mikrobe yang berbentuk sel vegetatif serta mematahkan dormansi endospora. Oleh sebab itu, koloni-koloni bakteri yang tumbuh pada medium NA semuanya berasal dari endospora.

Dari 2813 isolat *Bacillus* yang diperiksa diperoleh 32 isolat bakteri pembentuk protein kristal 1.14% . Dibandingkan dengan hasil isolasi Ohba dan Aizawa (1986) di Jepang yang memperoleh 189 isolat dari 6910 isolat yang terkumpul (2.7 %), hasil ini termasuk rendah. Rendahnya perolehan hasil isolasi ini diduga disebabkan oleh kematian ulat sutera yang diinfeksi bakteri (terutama *B. thuringiensis*) rendah serta pembuangan ulat sutera yang mati dengan cara membakar dan memendamnya.

Tabel 3. Mortalitas Rata-Rata Larva *Spodoptera litura* pada Uji Toksisitas *B. thuringiensis* Hasil Isolasi

Sandi Isolat	Mortalitas Rata-Rata Larva sampai Hari			
	Ke-1	Ke-2	Ke-3	Ke-4
Pembanding*	2	7	9	9
SPG-A 12.16.01	11	12	13	13
SPG-A 11.10b.01	1	6	13	14
SPG-A 11.19.01	4	6	8	9
PSR-A 11.16.01	3	5	6	6
SPG-A 11.19.03	2	5	5	5
KDR-A 11.01.01	4	5	5	5
SPG-A 11.10a.01	3	4	5	5
SDP-A 12.01.03	4	5	5	5
SPG-A 12.01.02	4	4	4	5
SPG-A 11.12.02	1	4	4	4
SPG-A 11.14.01	2	4	4	4
SPG-A 11.17.01	2	3	4	4
SPG-A 11.13.02	1	3	3	4
SPG-A 21.05.01	3	3	3	3
SDP-A 11.07.01	0	1	3	3
SPG-A 11.10b.02	1	3	3	3
SPG-A 11.10b.03	1	2	3	3
SPG-A 12.01.01	2	2	3	3
SPG-A 21.07.01	0	1	3	3
PSR-A 11.08.01	1	3	3	3
BTR-A 11.02.01	0	2	3	3
SPG-A 11.13.01	2	2	2	2
SPG-A 12.03.01	0	2	2	2
SPG-A 21.02.02	1	2	2	2
SPG-A 11.10a.02	1	1	2	2
SPG-A 11.15.01	1	2	2	2
SPG-A 21.07.01	0	2	2	2
SDP-A 21.01.01	0	1	1	2
SPG-A 12.14.01	0	1	1	2
SPG-A 11.12.01	1	1	1	1
SPG-A 11.19.02	0	1	1	1
SPG-A 21.02.01	0	0	0	0
Kontrol	0	0	0	0

* Pembanding yang digunakan adalah isolat dari Thuricide HP.

Menurut percobaan ini larva *C. binotalis* lebih rentan terhadap *B. thuringiensis* daripada larva *S. litura*. Pada pengamatan hari ketiga mortalitas tertinggi *C. binotalis* ialah 20 larva atau 100 % (empat isolat), dan *S. litura* ialah 13 larva atau 65 % (dua isolat).

Faktor yang mempengaruhi kerentanan larva serangga ialah jenis atau tipe protein kristal, pH saluran pencernaan serangga yang alkalin, dan enzim proteolitik (Hofte dan Whiteley, 1989).

Protein kristal yang dihasilkan *B. thuringiensis* pada masa sporulasi merupakan protoksin yang belum aktif. Protein kristal akan bersifat toksik setelah dihidrolisis oleh enzim protease dalam saluran pencernaan serangga yang mempunyai pH alkalin. Menurut Aronson *et al.* (1986) toksin protein kristal ini mengakibatkan pembengkakan mikrofili yang terdapat pada saluran pencernaan serangga (usus tengah), pembengkakan sel, perubahan retikulum endoplasma, dan mitokondria, gangguan transfer ion-ion, glukosa, serta oksigen, kehilangan ATP dari sel epitelium, dan akhirnya pemisahan serta pemecahan sel-sel saluran pencernaan serangga. Kerusakan struktur dan fungsi sel-sel epitelium saluran pencernaan tersebut menyebabkan keseimbangan pH dan ion hemolimpa terganggu sehingga larva serangga yang rentan akan mengalami kelumpuhan dan akhirnya mati. Kelumpuhan dan kematian serangga terjadi 30 menit sampai 3 hari setelah pemberian protein kristal.

Larva yang mati tubuhnya mengkerut, menjadi kering, sedikit melengkung, dan menjadi hitam. Warna hitam pada larva yang mati disebabkan oleh aktivitas jasad renik sekunder (Steinhaus, 1951).

Percobaan ini sedang dilanjutkan di laboratorium yang sama untuk melihat toksisitas isolat-isolat bakteri pembentuk protein kristal ini terhadap larva serangga yang lain, serta identifikasi varietas-varietas bakteri pembentuk protein kristal ini secara serologis.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Dr.Ir. Teguh Santosa (Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, IPB, Bogor) dan Dr. M. Ohba (Institute of Biological Conntrol, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan) atas bantuan masing-masing dalam pengujian toksisitas dan komfirmasi identifikasi protein kristal.

DAFTAR PUSTAKA

Aronson, A.I., W. Beckman, and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and Related Insect Pathogens. *Microbiol. Rev.* 50(1):1-24.

Dubois, N.R. and F.B. Lewis. 1981. What is *Bacillus thuringiensis*. *J. Arboricul.* 7(9):233-240.

Hofte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53(2):242-255.

Ohba, M. and K. Aizawa. 1986. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Soil of Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 47:277-282.

Rodina, A.G. 1972. *Methods In Aquatic Microbiology*. Baltimore: University Press.

Steinhaus, E.A. 1951. Possible Use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an Aid in the Biological Control of the Alfalfa Caterpillar. *Hilgardia*. 20(18):359-381.