

PENGARUH pH DAN SUHU TERHADAP PRODUKSI BIOINSEKTISIDA OLEH *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* MENGGUNAKAN SUBSTRAT ONGGOK TAPIOKA

M. Rahayuningsih - P. Suryadarma, dan Djauhar F.A.

Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas IPB

ABSTRACT

A two level factorial composite experimental design was used in the study of pH and temperature effects on bioinsecticides production using *Bacillus thuringiensis israelensis* (B.t.i.). The statistical analysis indicates the two factors were major variables in the bioinsecticides product. The temperatures (X_1) that were used in this research were low level (25 °C) and high level (35 °C) and the pH values were 5,5 and 8. Two main parameters in the research were the growth of B.t.i. and bioinsecticide activity. Growth of B.t.i. was indicated by the value of minimum growth rate, maximum biomass, time needed for the formation of maximum biomass and substrates utilization of the medium cultivation.

The results of the research indicated that maximum growth rate is influenced by temperature and pH. The effect of temperature on the growth of B.t.i. was showed by numerous value : i.e maximum biomass at significance level of 84,16 percent, time needed for the formation of maximum biomass at significance level of 76,67 percent, substrates utilization at significance level of 72,65 percent and the effect of pH on time forming of maximum biomass at significance level of 75,25 percent. Bioinsecticides activity was influenced by temperature at significance level of 97,11 percent and by pH at significance level of 96,95 percent.

Keyword : bioinsecticides, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, two-level factorial experimental design

PENDAHULUAN

Bioinsektisida dari *Bacillus thuringiensis* adalah bahan aktif berupa kristal protein yang bersifat racun terhadap serangga tertentu dan dibentuk bersamaan dengan proses sporulasi. Kondisi kultivasi selama fermentasi akan berpengaruh terhadap kristal protein yang dihasilkan (Pearson dan Ward, 1988; Moms *et al.*, 19%). Spora dan kristal protein dihasilkan pada saat akhir dari fase logaritmik (Pearson dan Ward, 1988).

Bacillus thuringiensis (Bt) adalah bakteri bersel vegetatif yang berbentuk batang dengan ukuran 3-5 mikrometer dan lebar 1,0-1,2 mikrometer ketika tumbuh pada media. Bakteri ini bersifat gram positif, aerob tetapi umumnya anaerob fakultatif, mempunyai flagela dan membentuk spora. Koloni *Bacillus thuringiensis* berbentuk bulat dengan tepian berkerut, memiliki diameter 5-10 milimeter, berwarna putih, elevasi timbul dan permukaan koloni kasar (Stahly *et al.*, 1992; Shieh, 1994). Gill *et al.* (1992) menambahkan bahwa spora yang dibentuk oleh *Bacillus thuringiensis* berbentuk oval, berwarna hijau kebiruan dan berukuran 1,0-1,3 mikrometer

Menurut Gumbira Sa'id (1987), faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap

pertumbuhan sel dan pembentukan produk adalah suhu dan pH awal media. Nilai pH mempengaruhi fungsi membran/ permeabilitas sel, sintesis enzim dan komponen sel lainnya. Sebagai contoh pH dapat menggumpalkan protein pada titik isoelektrik. Hasil-hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa kondisi kultur dalam media kultivasi berpengaruh terhadap pembentukan spora dan kristal protein (Morris *et al.*, 1996). Selanjutnya dinyatakan oleh Morris *et al.* (1996), bahwa nilai pH awal media yang rendah akan menyebabkan produksi kristal protein yang rendah, sedangkan pH yang tinggi menghasilkan bobot kering biomassa yang tinggi.

Selain itu, kondisi kultivasi yang berpengaruh terhadap pertumbuhan sel adalah suhu. Di atas suhu optimum untuk pertumbuhan, laju pertumbuhan menurun. Hal tersebut disebabkan oleh meningkatnya laju kematian akibat terjadinya denaturasi protein, yang berakhir dengan terjadi lisis termal pada sel. Sebaliknya, di bawah suhu minimum akan terjadi penggumpalan membran yang mengganggu proses transpor substrat sehingga pertumbuhan terganggu. Suhu optimum akan memberikan kondisi terbaik untuk aktifitas enzim yang terlibat dalam metabolisme sel. Sikdar *et al.* (1991) menyatakan bahwa dalam kultivasi

bioinsektisida oleh *B.t* suhu tidak berhubungan secara langsung dengan pertumbuhan sel dan produksi kristal protein

Di lain pihak, hasil penelitian Schnepf *et al.* (1998) menunjukkan bahwa struktur dan susunan asam-asam amino didalam toksin berpengaruh terhadap toksisitas bioinsektisida. Keberhasilan produksi bioinsektisida dipengaruhi oleh terbentuknya kristal protein selama proses sporulasi. Berdasarkan fenomena tersebut, pH dan suhu diduga akan memberikan pengaruh yang nyata mengingat produknya adalah protein dan spora. Protein adalah bentukan yang peka terhadap suhu dan pH. Sedangkan spora adalah bentukan sel yang pada umumnya disintesa pada kondisi ekstrim. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan kajian yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu dan pH terhadap faktor-faktor penting dalam produksi bioinsektisida yaitu pertumbuhan sel *Bacillus thuringiensis israelensis* (*B.t.i.*), pembentukan spora dan pembentukan kristal protein.

METODE PENELITIAN

Karakterisasi Media Kultivasi dan Persiapan Inokulum

Karakterisasi media fermentasi meliputi analisa komposisi media yaitu ongkok tapioka dan urea sebagai sumber karbon dan nitrogen. Ongkok tapioka berasal dari daerah Kedung Halang Bogor dalam bentuk kering. Untuk mendapatkan tepung ongkok tapioka dilakukan penggilingan yang bertujuan untuk memecah partikel dengan menggunakan *Hammer mill*, kemudian dilakukan penyaringan dengan ukuran 100 mesh. Terhadap tepung ongkok tapioka yang dihasilkan, dilakukan analisa kadar karbon (metode Total Karbon Organik, *TOC Analyzer*), kadar nitrogen (Kjeldahl, AOAC, 1984), kadar air (AOAC, 1984) dan kadar abu (AOAC, 1984). Untuk urea dilakukan analisa guna mengetahui kadar nitrogen dengan menggunakan metode Kjeldhal. Hasil analisa kadar karbon dan nitrogen digunakan dalam formulasi media fermentasi.

Penyiapan inokulum dilakukan dengan menumbuhkan produk komersial bioinsektisida (*Vectobac*) kedalam agar miring yang berisi nutrisi agar steril dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Tujuan tahapan tersebut adalah untuk mendapatkan sel *B.t.i* dalam keadaan segar. Tahap selanjutnya adalah melakukan inokulasi sebanyak satu lup biakan *B.t* kedalam medium nutrisi broth (NB) sebagai labu pembibitan 1 kemudian dilakukan inkubasi selama 12 jam, 30°C dalam *water shakerbath*. Tujuan dari penyiapan inokulum 1 adalah untuk

mendapatkan kondisi pertumbuhan yang optimum yang berasal dari media padat (agar miring) ke media cair. Inokulum hasil pembibitan 1 digunakan untuk menginokulasi medium pembibitan 2 sebanyak 5 persen. Medium pembibitan 2 berisi medium yang digunakan untuk memproduksi bioinsektisida. Menurut Hartoto (1992), sebelum diinokulasikan ke dalam medium kultivasi/produksi, perlu dilakukan pengembangan inokulum beberapa tahap yang bertujuan untuk mengadaptasikan sel ke dalam medium kultivasi agar biomassa tumbuh dengan baik serta menghasilkan produk yang diinginkan dalam jumlah dan kualitas yang baik.

Penentuan Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Pertumbuhan

Kultivasi dimulai dengan menyiapkan media yaitu ongkok tapioka, urea dan mineral (*trace element*). Formulasi media dibuat berdasarkan rasio C/N optimal yaitu 7/1 (Wicaksono, 2002) dan penambahan *trace element*. Jenis dan jumlah mineral yang digunakan dalam formulasi sesuai dengan yang digunakan oleh Dulmage dan Rhodes (1971) yang terdiri dari 0.3 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02 g/l $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,02 g/l $FeSO_4$. Bahan-bahan untuk menyusun media kultivasi ditambah larutan buffer dengan nilai pH sesuai dengan perlakuan kemudian disterilisasi. Sterilisasi dilakukan terpisah antara sumber karbon dan sumber nitrogen.

Media steril diinokulasi dengan kultur yang sudah disiapkan dalam tahap pengembangan inokulum. Kultivasi dilakukan dalam labu erlenmeyer volume kerja 500 ml yang diisi media sebanyak 150 ml dengan menggunakan *water shakerbath* dan diinkubasi selama 72 jam. Suhu inkubasi dalam *water shakerbath* diatur sesuai dengan perlakuan.

Analisa terhadap pertumbuhan *B.t.i* dilakukan terhadap contoh yang diambil pada jam ke- 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, dan 72. Analisis tersebut meliputi pengukuran bobot kering biomassa dan penggunaan substrat. Hasil dari penghitungan bobot kering biomassa digunakan untuk menentukan laju pertumbuhan sel, bobot biomassa maksimum dan waktu terbentuknya bobot biomassa maksimum.

Pengujian Aktivitas Bioinsektisida

Analisa terhadap aktivitas bioinsektisida dilakukan terhadap contoh yang diambil pada jam ke- 24, 48 dan 72. Aktivitas bioinsektisida (*bioassay*) dilakukan dengan mengikuti prosedur Yamamoto *et al.*, (1983). Pengujian dilakukan terhadap 10 larva nyamuk

Aedes aegypti dalam 10 ml air yang sudah diisi produk mengandung kristal protein dan dibiarkan selama 24 jam. Kontrol yang digunakan dalam bioassay adalah air sebanyak 10 ml yang berisi 10 larva nyamuk *Aedes aegypti* tanpa penambahan kristal protein (bioinsektisida). Setiap set bioassay diulang sebanyak tiga kali. Aktivitas bioinsektisida dinyatakan sebagai LC₅₀ yaitu konsentrasi yang menyebabkan 50 % larva nyamuk mati. Nilai LC₅₀ tersebut dihitung dengan menggunakan analisa *Probit Quant* (software berasal dari Steve Mound, University of Wales, College of Cardiff, Inggris).

Pengukuran Jumlah Spora

Analisa terhadap produk yaitu jumlah spora hidup dilakukan terhadap contoh yang diambil pada jam ke- 24, 48 dan 72. Jumlah spora hidup ditentukan dengan mengikuti prosedur Mumugati dan Raghunathan (1990) yaitu dengan melakukan sederetan pengenceran dan dicawankan dengan metode cawan sebar pada medium NA (*Nutrient Agar*). Sebelum serbuk spora kristal diencerkan, terlebih dahulu diberi renjatan panas pada suhu 65 °C selama 15 menit untuk membunuh sel-sel vegetatif. Koloni yang tumbuh setelah dicawankan adalah sel spora. Hasil analisa pengukuran aktivitas bioinsektisida (potensi produk) dan jumlah spora hidup dihitung dengan SPSS dengan variabel waktu untuk mendapatkan waktu pemanenan produk bioinsektisida.

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan faktorial dua tingkat (*two level factorial*) dengan dua faktor perlakuan yaitu suhu (X₁) dengan nilai rendah dan tinggi masing-masing 25 dan 35 °C dan pH (X₂) pada 5,5 dan 8. Matrik perlakuan selama fermentasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Matrik Perlakuan Suhu dan pH untuk Produksi Bioinsektisida

No	Kode Nilai		Nilai Asli	
	X ₁	X ₂	Suhu	pH
1	-1	-1	25	5.5
2	-1	+1	25	8
3	0	0	30	6.75
4	0	0	30	6.75
5	+1	-1	35	5.5
6	+1	+1	35	8

Model rancangan percobaan faktorial untuk mengetahui pengaruh linier dari kedua variabel terhadap respon yang diinginkan adalah sebagai berikut :

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^2 a_i x_i + \sum_{i < j} a_{ij} x_i x_j$$

Keterangan :

- Y = Respon dari masing-masing perlakuan
- a₀, a_i, a_{ij} = Koefisien parameter
- x_i = Pengaruh linier faktor perlakuan utama
- x_ix_j = Pengaruh linier dua faktor perlakuan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Media Kultivasi dan Persiapan Inokulum

Hasil analisa kadar karbon dan kadar nitrogen onggok tapioka dan urea dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kadar Karbon, Kadar Nitrogen, Kadar Abu dan Kadar Air dari Onggok Tapioka

No	Komponen	Kadar (persen)	
		Onggok tapioka	Urea
1	Karbon (C)	40.43	20
2	Nitrogen (N)	0.143	45.2
3	Sulfur (S)	1	-
4	Abu	0.87	-
5	Air	2.11	-

Berdasarkan Tabel 2 diatas, onggok tapioka mengandung unsur karbon dalam jumlah yang relatif tinggi yaitu 40,43 persen. Hal ini disebabkan karena kandungan pati dalam onggok tapioka yang cukup tinggi yaitu 60 – 70 persen berat kering (Abbas, 1985). Komponen media yang digunakan sebagai sumber nitrogen adalah urea. Hasil analisa menunjukkan bahwa kadar nitrogen urea sebesar 45,2 persen. Kadar nitrogen tersebut tidak berbeda dengan hasil James (1993) yaitu kadar nitrogen tertinggi urea sebesar 46 persen.

Hasil analisa dari onggok tapioka dan urea berguna untuk menentukan nilai nisbah karbon dan nitrogen. Nilai nisbah karbon dan nitrogen (nilai C/N) onggok tapioka dan urea yang digunakan sesuai dengan nilai C/N untuk pertumbuhan mikroorganisme yaitu sebesar 7/1 (Wicaksono, 2002).

Pengaruh Suhu dan pH terhadap Laju Pertumbuhan

Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa laju pertumbuhan maksimum (μ_{max}) dipengaruhi suhu (X₁) dan pH (X₂). Koefisien parameter dan nilai signifikansi laju pertumbuhan maksimum (μ_{max}) disajikan pada Tabel 3.

Dari Tabel 4 dapat dilihat bahwa pada tingkat signifikansi 92,08 persen, suhu selama kultivasi (X_1) memiliki pengaruh negatif p > 0,05 terhadap nilai bobot kering biomassa maksimum. Hal ini berarti bahwa semakin tinggi suhu yang digunakan (terbatas pada selang suhu yang dicobakan) akan menyebabkan semakin tumunya nilai bobot kering biomassa maksimum. Nilai biomassa berhubungan dengan konversi maksimal dari substrat ke massa sel. Menurut Moo-Young (1985), suhu pada umumnya penting dalam mempengaruhi efisiensi konversi substrat menjadi massa sel dimana substrat tersebut adalah sumber karbon atau energi. Di atas suhu optimum untuk pertumbuhan laju

Parameter	Koefisien	Signifikansi
Intersep	118,2135	92,20
Suhu (X_1)	-7,1786	92,08
pH (X_2)	-3,022	80,92
Interaksi X_1 dan X_2	0,1172	83,29
R^2	96,15	

Tabel 4. Koefisien Parameter dan Nilai signifikansi Biomassa Maksimum

Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa nilai bobot kering biomassa maksimum dipengaruhi oleh suhu (X_1) dan pH (X_2). Kedua faktor tersebut mempunyai pengaruh negatif terhadap bobot kering biomassa maksimum. Semakin besar pH awal media menyebabkan semakin kecil nilai bobot kering biomassa maksimum. Koefisien parameter dan nilai signifikansi bobot kering biomassa maksimum disajikan pada Tabel 4.

Pengaruh Suhu dan pH terhadap Biomassa Maksimum

bahwa pH tidak berpengaruh terhadap laju pertumbuhannya. Hal ini diduga karena digunakan media serta adanya kesetimbangan komposisi media yaitu karbon dan nitrogen dengan rasio yang tepat. Pada proses kultivasi, sumber karbon (onggok tapioka) akan dimetabolisme sel menjadi asam-asam organik yang akan berkontribusi terhadap nilai keasaman media. Sebaliknya sumber nitrogen (urea) akan diragikan menjadi amonia sehingga pH menjadi meningkat. Keseimbangan komposisi keduanya akan menyebabkan kisaran nilai pH tetap pada nilai yang baik bagi pertumbuhan $B. l.$ sehingga tidak memberikan pengaruh terhadap bobot sel yang diukur. Hasil ini memberikan informasi positif dalam artian pada saat kultivasi bioinsektivida dilakukan sebagai suatu kegiatan industri, maka pH bukan merupakan faktor yang sangat signifikan selama digunakan buffer dan komposisi media yang tepat.

Dalam kultivasi, pH medium pada umumnya mempengaruhi fungsi membran/permeabilitas sel, sintesis enzim dan komponen sel lainnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa faktor derajat keasaman (pH) memberikan pengaruh pada tingkat signifikansi hanya sebesar 76,42 persen. Dalam penelitian ini dilakukan perlakuan pH antara 5,5 - 8. Nilai pH cairan kultur selama kultivasi berlangsung, berkisar antara 5,6 - 7,9. Kisaran tersebut masih berada pada kisaran pertumbuhan $B. l.$ karena menurut Bernhard dan Utz (1993) dalam Enwistle *et al.* (1993) $B. l.$ tumbuh dengan baik pada kisaran pH 5,5 dan 7,5. Hasil penelitian menunjukkan

Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa suhu kultivasi (X_1) berpengaruh terhadap laju pertumbuhan pada tingkat signifikansi 65,45 persen. Nilai signifikansi yang kecil mungkin disebabkan karena pengambilan interval suhu dalam perlakuan tidak pada selang yang lebar sehingga tidak menghasilkan perbedaan yang signifikan terhadap laju pertumbuhan. Dalam penelitian ini dilakukan pengambilan interval suhu antara 25 - 35 °C. Menurut Heimpel (1967) dan Deacon (1983), $B. l.$ dapat tumbuh pada medium buatan dengan suhu pertumbuhan berkisar antara 15 - 40 °C namun optimumnya sekitar 30°C. Suhu yang berkisar antara 25 - 35 °C tidak memberikan pengaruh yang signifikan, tetapi berdasarkan analisa statistik terdapat kecenderungan yang positif yaitu semakin tinggi suhu pada selang yang dicobakan (yaitu dari 25, 30 hingga 35 °C) laju pertumbuhan $B. l.$ cenderung semakin meningkat. Diduga suhu 30 hingga 35 °C memberikan kondisi terbaik untuk aktivitas enzim yang terlibat dalam metabolisme dan pertumbuhan sel. Apabila suhu dinaikkan di atas suhu optimum, maka laju pertumbuhan menurun, disebabkan oleh meningkatnya laju kematian akibat terjadinya denaturasi protein, yang berakibat dengan terjadi lisis sel pada sel. Sebaliknya dari hasil penelitian yang dilakukan terlihat bahwa ada kecenderungan menurunnya pertumbuhan apabila suhu diturunkan (pada selang yang dicobakan). Hal ini diduga karena terjadinya pengumpulan membran yg mengganggu proses transport substrat sehingga pertumbuhan sel terganggu.

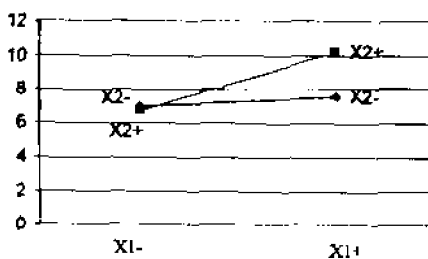
Parameter	Koefisien	Signifikansi
Intersep	-0,687135	71,19
Suhu (X_1)	0,028454	65,45
pH (X_2)	0,066794	76,42
Interaksi X_1 dan X_2	-0,001988	74,84
R^2	90,69	

Tabel 3. Koefisien Parameter dan Nilai signifikansi Laju Pertumbuhan Maksimum (μ_{maks})

pertumbuhan menurun, disebabkan oleh meningkatnya laju kematian akibat terjadinya denaturasi protein, yang berakhir dengan terjadi lisis termal pada sel.

Derajat keasaman (pH) (X_2) memberikan pengaruh negatif pada tingkat signifikansi 80.92 persen terhadap bobot kering biomassa maksimum. Hal ini berhubungan dengan konversi media (sumber karbon dan nitrogen) menjadi biomassa dan produk. Perlakuan terhadap pH awal medium fermentasi akan berpengaruh terhadap sintesa sumber karbon. Hal ini disebabkan karena sel akan mengkonsumsi substrat sederhana kemudian baru mengkonsumsi substrat yang kompleks. Selama *B.t.t.* mengkonsumsi sumber karbon, maka akan terjadi penurunan nilai pH selama kultivasi. Hal ini disebabkan karena terbentuknya asam-asam organik akibat proses katabolik terhadap glukosa yang terdapat pada sumber karbon. Menurut Benoit *et al* (1990), proses katabolik terhadap glukosa tersebut oleh *Bacillus thuringiensis* melalui *Embden Meyerhoff Pathway (EMF)* dan lintasan pentosa fosfat. Proses perombakan ini menghasilkan ATP dan asam-asam organik, seperti asam piruvat, asam sitrat, asam laktat dan aseton. *Bacillus thuringiensis* bersifat kemoheterotrof, pada umumnya mengoksidasi karbohidrat secara aerobik untuk membentuk asam organik yang dioksidasi lebih lanjut menjadi CO_2 . Norris (1971) menyatakan bahwa pada fase eksponensial, *Bacillus thuringiensis* menggunakan gula dalam media dan menghasilkan asam asetat serta asam piruvat yang menyebabkan pH media mengalami penurunan pada waktu inkubasi tertentu. Meskipun begitu, nilai pH masih pada kisaran nilai pH pertumbuhan *B.t.*

biomassa maksimal (mg/ml)



Gambar 1. Pengaruh Interaksi Suhu (X_1) dan pH (X_2) Terhadap Bobot Kering Biomassa Maksimum.

Dari hasil analisa statistik, interaksi dua faktor yaitu suhu selama kultivasi dan pH awal medium berpengaruh positif terhadap bobot kering biomassa maksimum. Suhu dan pH awal medium berpengaruh terhadap konversi substrat sebagai sumber karbon. Semakin tinggi suhu dan

pH awal medium (terbatas pada selang yang dicobakan) akan menyebabkan semakin tinggi bobot kering biomassa maksimum.

Pengaruh Suhu dan pH terhadap Waktu terbentuknya Biomassa Maksimum (t-maks.)

Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa, faktor suhu (X_1) dan pH (X_2) berpengaruh terhadap waktu terbentuknya biomassa maksimum (t-maks.). Koefisien parameter dan nilai signifikansi waktu terbentuknya biomassa maksimum (t-maks.) disajikan pada Tabel 5.

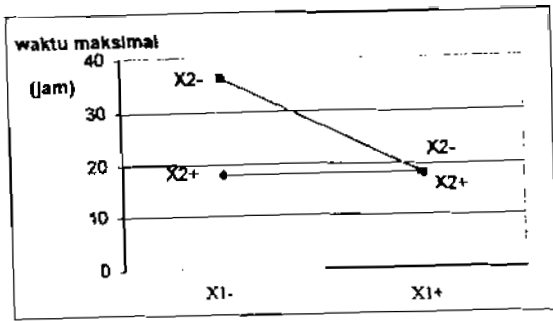
Tabel 5. Koefisien Parameter dan Nilai Signifikansi Waktu Terbentuknya Biomassa Maksimum (t-maks.).

Parameter	Koefisien	Signifikansi
Intersep	482.1	90.53
Suhu (X_1)	-23.76	88.34
pH (X_2)	-25.2	87.63
Interaksi X_1 dan X_2	0.72	85.98
R^2	94.61	

Berdasarkan Tabel 5, dapat dilihat bahwa faktor suhu selama kultivasi berpengaruh negatif terhadap waktu terbentuknya biomassa maksimum (t-maks.) pada tingkat signifikansi 88.34 persen. Semakin tinggi suhu yang diberikan pada selang yang dicobakan (hingga 35 °C) akan menyebabkan waktu terbentuknya biomassa maksimum semakin singkat. Hal ini sesuai dengan hasil analisis pengaruh suhu terhadap laju pertumbuhan. Semakin tinggi suhu (terbatas pada selang yang dicobakan), laju pertumbuhan semakin tinggi yang artinya waktu pembentukan biomassa maksimum semakin cepat. Hal ini diduga karena semakin tinggi suhu (pada selang percobaan) maka laju metabolisme substrat akan semakin tinggi sehingga biomassa maksimum cepat terbentuk (Moo-Young, 1985).

Derajat keasaman (pH) (X_2) berpengaruh negatif terhadap waktu terbentuknya biomassa maksimum (t-maks.). Semakin tinggi pH awal medium kultivasi (pada selang nilai pH yang dicobakan) akan menyebabkan semakin cepat terbentuknya biomassa maksimum. Menurut Rahayuningsih (2003), derajat keasaman (pH) dalam medium kultivasi memegang peranan yang penting dalam penyediaan kondisi yang tepat sehubungan dengan sintesa enzim dan *turnover* protein. Selain itu, nilai pH mempengaruhi fungsi membran/ permeabilitas sel, sintesis enzim dan komponen sel lainnya. Semua galur *Bacillus thuringiensis* memiliki enzim amilase (Bernhard dan Utz, 1993). Enzim amilase berperan dalam pemecahan pati pada onggok tapioka menjadi gula sederhana yang merupakan sumber energi

untuk pertumbuhan, pemeliharaan sel dan pembentukan produk.



Gambar 2. Pengaruh Interaksi Suhu (X₁) dan pH (X₂) Terhadap Waktu Terbentuknya Bobot Kering Biomassa Maksimum.

Hubungan antara faktor suhu selama fermentasi dan pH awal medium disajikan pada Gambar 2. Interaksi antara dua faktor tersebut berpengaruh positif pada tingkat signifikansi 85.98 persen. Hal ini diduga karena dengan semakin meningkatnya suhu dan pH (terbatas pada selang yang dicobakan), konversi substrat onggok tapioka terjadi secara cepat sehingga fase pertumbuhan logaritmik berlangsung lebih singkat yang berakibat pada lebih cepat tercapainya fase stasioner (bobot kering biomassa maksimum tercapai lebih awal).

Pengaruh Suhu dan pH terhadap Penggunaan Substrat.

Selama kultivasi berlangsung, sel akan mengkonversi substrat sumber karbon menjadi biomassa dan produk. Hal ini ditandai dengan berkurangnya konsentrasi substrat yaitu nilai kadar gula sisa. Tinggi rendahnya kadar gula sisa dalam medium kultivasi dipengaruhi oleh kemampuan sel dalam mengkonversi pati dari sumber karbon menjadi biomassa dan produk.

Pada Tabel 6, disajikan koefisien parameter dan nilai signifikansi dari efisiensi penggunaan substrat.

Tabel 6. Koefisien Parameter dan Nilai Signifikansi Efisiensi Penggunaan Substrat.

Parameter	Koefisien	Signifikansi
Intersep	1353.1345	86.22
Suhu (X ₁)	-84.2162	86.33
pH (X ₂)	-9.514	56.83
Interaksi X ₁ dan X ₂	0.4164	58.99
R ²	83.87	

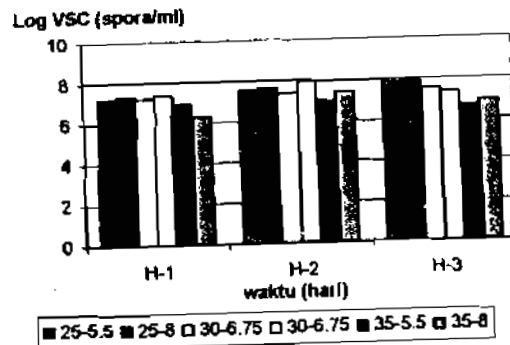
Hasil analisa secara statistik menunjukkan bahwa faktor suhu selama

fermentasi berpengaruh negatif terhadap efisiensi penggunaan substrat sisa pada tingkat signifikansi 86.33 persen. Hal ini berarti bahwa semakin tinggi suhu yang digunakan (pada selang nilai yang dicobakan) substrat yang digunakan semakin sedikit/rendah. Hal ini diduga disebabkan karena terpengaruhnya enzim-enzim yang memetabolisme substrat oleh suhu dimana pada suhu yang terlalu tinggi (di atas optimum), maka laju denaturasi protein (sel dan enzim) akan terjadi. Akibatnya substrat yang dimetabolisme semakin kecil.

Hasil penelitian menunjukkan ternyata derajat keasaman (pH) tidak berpengaruh dalam penggunaan substrat selama kultivasi. Hal ini mungkin disebabkan karena enzim amilase masih aktif pada selang nilai pH antara 5,5 – 8 (Wang *et al.*, 1979).

Pengukuran jumlah Spora Hidup

Pada penelitian yang dilakukan, perhitungan jumlah spora hidup dimulai pada jam ke-24 dimana kultivasi mulai memasuki fase stasioner. Pemilihan waktu pengukuran jumlah spora pada jam ke-24 karena diduga sel mulai mengalami sporulasi. Hal ini sesuai dengan Sukmadi *et al.*, (1996) yang menyatakan bahwa pembentukan spora mulai terlihat nyata pada saat fase eksponensial akan berakhir yaitu saat dimulainya fase stasioner.



Gambar 3. Jumlah Spora Hidup Dalam Produk yang Dipanen.

Pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa jumlah spora tertinggi terdapat pada jam ke-72. Faktor suhu berpengaruh terhadap pembentukan spora yaitu semakin tinggi suhu (terbatas pada selang yang dicobakan) ternyata menyebabkan semakin sedikit terbentuknya spora. Hal ini diduga karena suhu berpengaruh terhadap pertumbuhan *B.t.1* yaitu semakin tinggi suhu yang diberikan menyebabkan semakin turunnya nilai bobot kering biomassa. Penurunan hasil sel pada saat suhu ditinggikan kemungkinan disebabkan oleh peningkatan kebutuhan pemeliharaan sel yaitu mekanisme pertahanan sel dari denaturasi akibat naiknya suhu. *Bt* adalah bakteri yang dapat membentuk spora. Spora pada umumnya

dibentuk pada saat kondisi ekstrim, misalnya suhu yang terlalu tinggi atau berkurangnya nutrisi dalam substrat (Sukmadi *et al.*, 19%).

Waktu Mtivasi berpengaruh terhadap pembentukan spora yaitu semakin lama waktu menyebabkan semakin banyak spora yang terbentuk. Hal ini berhubungan dengan penggunaan substrat selama kultivasi, yaitu semakin lama kultivasi berlangsung akan menyebabkan terjadinya penurunan jumlah substrat. Penurunan konsentrasi substrat akan mempengaruhi pembentukan spora.

Pembentukan spora selama kultivasi merupakan hal yang sangat penting karena pembentukan kristal protein sebagai bahan aktif bioinsektisida terjadi bersamaan dengan pembentukan spora. Semakin banyak spora yang dibentuk diharapkan semakin tinggi pula jumlah kristal protein yang terbentuk.

Penentuan Aktivitas Bioinsektisida (Bioassay)

Penentuan aktivitas bahan aktif bioinsektisida dapat ditentukan dengan melakukan pengujian bahan aktif produk bioinsektisida terhadap serangga target dengan teknik *bioassay*. Efektifitas bioinsektisida ditentukan oleh tingkat mortalitas serangga target. Tingkat mortalitas serangga target ini ditentukan sebagai nilai LC_{50} dan potensi produk bioinsektisida. LC_{50} merupakan satuan yang menyatakan konsentrasi produk yang mampu membunuh 50% dari populasi serangga uji (target). Semakin kecil nilai LC_{50} maka produk semakin efektif, yang berarti semakin besar toksisitasnya.

Hasil pengujian pada kontrol menunjukkan bahwa semua larva nyamuk yang diujikan tidak mati. Penentuan potensi standar produk (IU/mg) diperoleh dari perbandingan LC_{50} standar dengan LC_{50} contoh uji dikalikan dengan potensi standar menurut *Institute Pasteure Standard 1982* (IPS 82) yaitu 15000 IU/mg. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu kultivasi berpengaruh terhadap aktivitas bioinsektisida. Semakin lama waktu kultivasi (terbatas pada selang yang dicobakan) menyebabkan semakin tinggi potensi produk bioinsektisida sehingga kemampuan untuk membunuh larva semakin efektif. Hal ini diduga berkorelasi dengan pembentukan spora-kristal yaitu semakin lama waktu kultivasi maka spora yang terbentuk semakin tinggi. Karena kristal protein dibentuk bersamaan dengan pembentukan spora, maka berarti bahwa kristal protein yang dibentuk juga semakin banyak sehingga potensi bioinsektisida juga semakin besar. Pernyataan tersebut tidak terlalu benar, karena dari hasil penelitian terlihat bahwa potensi bioinsektisida dari perolehan spora yang tertinggi yaitu pada perlakuan suhu 25°C dan

pH 5.5 ternyata tidak yang tertinggi. Diduga protein penyusun kristal adalah faktor yang mempengaruhi toksisitas.

Tabel 7. Perbandingan Bobot Kering Biomassa, Log VSC Produk, LC_{50} dan Potensi Produk Bioinsektisida.

Suhu (x ₁)	PH (x ₂)	X (mg/ml)	Log VSC	LC ₅₀ (µg/ml)	Potensi (IU/mg)
25	5.5	2.42	8.090	0.05	19314
25	8	0.50	7.851	0.04	24143
30	6.75	2.20	7.496	0.11	8779
30	6.75	2.40	7.255	0.12	8048
35	5.5	2.24	6.665	0.1	9657
35	8	1.48	6.845	0.29	3330

Pada Tabel 7 terlihat bahwa semakin kecil nilai LC_{50} maka semakin tinggi efektivitas produk bioinsektisida yang dihasilkan. Salah satu faktor yang menentukan tingginya toksisitas adalah potensi dari kristal protein yang dipengaruhi oleh komposisi protein penyusunnya. Yamamoto *et al.*, (1983), menyatakan bahwa *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (B.t.i)* dapat memproduksi banyak kristal protein dengan berbagai ukuran dan bentuk. Komposisi protein kompleks dari *B.t.i* menyebabkan variasi dari bentuk kristal. Struktur dan susunan asam-asam amino didalam toksin berpengaruh terhadap toksisitas bioinsektisida (Schnepf *et al.*, 1998).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa potensi produk bioinsektisida tertinggi diperoleh dari perlakuan kultivasi 25 °C dan pH awal medium 8 yaitu sebesar 24.143 IU/mg. Hal ini menunjukkan bahwa produk bioinsektisida yang dihasilkan mempunyai potensi 1.6 kali lebih besar dibandingkan dengan produk komersil (*Vectobac*). Nilai potensi yang tinggi juga menunjukkan bahwa *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (B.t.i)* dapat menghasilkan δ -endotoksin dengan tingkat toksisitas t e w pada suhu 25 °C dan pH awal medium 8.

Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Bioinsektisida

Hubungan antara faktor reaksi terhadap respon yaitu aktivitas bioinsektisida dapat disajikan dalam model atau persamaan linier. Melalui persamaan linier dapat diketahui pengaruh linier dari perlakuan suhu selama fermentasi, pH awal medium fermentasi serta interaksi antara dua faktor yaitu (suhu dan pH) terhadap respon yaitu aktivitas bioinsektisida.

Salah satu indikator dari pengujian aktivitas bioinsektisida (*bioassay*) adalah kemampuan untuk membunuh larva nyamuk *Aedes aegypti*. Respon dari penentuan aktivitas bioinsektisida adalah nilai potensi produk yang besar atau nilai LC_{50} yang kecil. Hal ini berarti

semakin kecil nilai LC_{50} akan memiliki efektivitas daya bunuh yang besar.

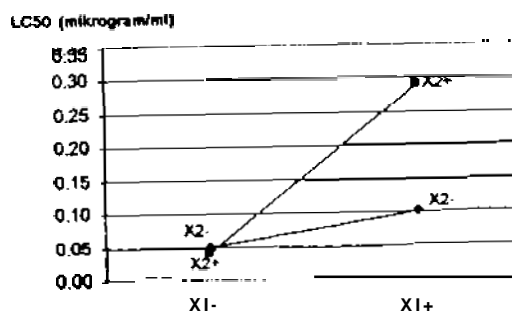
Tabel 8. Parameter Koefisien dan Nilai Signifikansi Aktivitas Bioinsektisida

Parameter	Koefisien	Signifikansi
Intersep	1.222	93.67
Suhu (X_1)	-0.051	90.78
pH (X_2)	-0.204	97.32
Interaksi X_1 dan X_2	0.008	97.76
R^2	99.88	

Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa, faktor suhu selama kultivasi dan pH awal media berpengaruh negatif terhadap aktivitas bioinsektisida. Suhu (X_1) berpengaruh negatif terhadap aktivitas bioinsektisida pada tingkat kepercayaan 90 persen. Hal ini berarti bahwa semakin tinggi suhu (terbatas pada selang yang dicobakan) menyebabkan semakin kecil nilai LC_{50} yang berarti semakin efektif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai jumlah spora hidup (VSC) tertinggi terdapat pada perlakuan suhu 25 °C yaitu $12,77 \times 10^7$ spora/ml. Hal ini sesuai dengan potensi produk bioinsektisida yang tinggi juga terjadi pada suhu 25 °C. Dari hasil penelitian diperoleh bahwa ada korelasi antara pembentukan spora dengan aktivitas bioinsektisida. Menurut Rahayuningsih (2003), kondisi lingkungan (suhu dan pH) berpengaruh pada stabilitas mRNA yang menyandikan gen pembentukan spora dan kristal (gen Cry). Gen tersebut menentukan karakter toksin yang dihasilkan. Karakter toksin yang dihasilkan berpengaruh pada toksisitas yang dapat dilihat dari hasil *bioassay*.

Faktor pH berpengaruh negatif pada tingkat kepercayaan 95 persen. Hal ini berarti bahwa semakin tinggi pH awal medium (terbatas pada selang yang dicobakan) nilai LC_{50} semakin kecil atau potensi produk bioinsektisida semakin besar. Hal ini diduga proses sintesa kristal protein dan sporulasi berjalan optimal. Keadaan ini disebabkan oleh lingkungan pH yang cukup optimal sehingga aktivitas enzim yang berperan dalam sporulasi dan sintesa kristal protein juga tinggi. Agaisse dan Lereclus (1995) merangkum beberapa faktor yang berkontribusi pada tingginya kristal protein. Mereka mengemukakan bahwa mekanisme transkripsi memegang peranan penting. Stabilitas mRNA berperan dalam ekspresi gen yang menyandikan kristal protein. Dengan demikian, derajat keasaman (pH) dalam medium memegang peranan yang nyata dalam penyediaan kondisi yang tepat sehubungan dengan sintesa enzim dan *turnover* protein, sehingga berpengaruh terhadap sintesa kristal protein dan toksisitasnya terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*.



Gambar 4 Pengaruh Interaksi Suhu (X_1) dan Ph (X_2) Terhadap Aktivitas Bioinsektisida (potensi produk).

Interaksi antara suhu selama kultivasi dan pH awal medium berpengaruh positif pada tingkat kepercayaan 95 persen. Pada Gambar 4, diketahui terdapat perbedaan kemiringan antara garis $-X_2$ dengan garis $+X_2$ yang mengindikasikan penurunan potensi produk atau aktivitas bioinsektisida sejalan dengan peningkatan suhu selama kultivasi pada selang nilai yang dicobakan. Penurunan aktivitas bioinsektisida mungkin disebabkan dalam proses pembentukan kristal protein semakin tinggi suhu berkombinasi dengan semakin tingginya pH hingga melebihi nilai optimal, akan terjadi denaturasi protein dan terganggunya sintesis enzim. Hal ini menyebabkan potensi kristal protein yang bersifat toksik berkurang.

KESIMPULAN

Pada selang suhu yang dicobakan yaitu antara 25 hingga 35°C hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu berpengaruh negatif terhadap bobot kering biomassa maksimum, waktu terbentuknya biomassa maksimum (t_{maks}) dan efisiensi penggunaan substrat sisa. Bobot kering biomassa dipengaruhi pada tingkat signifikansi 92.08 persen, waktu tercapainya biomassa maksimum pada tingkat signifikansi 88.34 persen dan efisiensi penggunaan substrat sisa dipengaruhi pada tingkat signifikansi 86.33 persen. Faktor pH pada selang nilai yang dicobakan, berpengaruh negatif terhadap waktu terbentuknya biomassa maksimal pada tingkat signifikansi 87.63 persen.

Aktivitas bioinsektisida juga dipengaruhi oleh suhu dan pH. Suhu berpengaruh negatif sedangkan pH berpengaruh positif artinya pada selang suhu yang dicobakan, semakin tinggi suhu aktivitas bioinsektisida cenderung menurun, sebaliknya pada selang pH yang dicobakan semakin tinggi pH, aktivitas bioinsektisida cenderung meningkat. Hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan untuk penentuan selang nilai optimasi suhu dan pH

untuk produksi bioinsektisida dari *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* menggunakan substrat onggok tapioka.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, S., Halim dan S. T. Amidarmo. 1985. Limbah Tanaman Ubi kayu. *Di dalam* F.G Winarno (editor). Monografi Limbah Pertanian. Kantor Menteri Muda Urusan Peningkatan Produksi Pangan, Jakarta.
- Agaisse, H dan D Lereclus. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* Produce So much Insecticidal Crystal Protein? *Journal of Bacteriology*. 177 (21): 6027-6032.
- AOAC, 1984. Official Methods of Analysis of The Association of Official Agricultural Chemist, Washington, D. C.
- Benoit, L. G., G. R. Wilson dan C. L. Baugh. 1990. Fermentation During Growth and Sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Lett. Appl. Microbiol.* 10:15-16.
- Bernhard, K. dan R. Utz. 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticide for Experimental and Commercial Uses. *Di dalam* P. F. Enwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey dan S. Higgs (editor). *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice. John Wiley and Son, Chichester: 255-266.
- Couh, T. L. And D. A. Ross. 1980. Production and Utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol and Bioengin.* 22:1297-1304.
- Deacon, J. W. 1993. Microbial Control of Plant and Diseases. Van Nostrand Reinhold (VK) Co, Ltd.
- Dulmage, H. T. dan Rhodes, R.A. 1971. Production of Pathogens in Artificial Media, pp.507-540 *Di dalam*: Burges, H.D. (ed). *Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980*. Acad Press, New York.
- Gill, S. S., E. A. Cowles, dan P. V. Pietrantonio. 1992. The Mode of Action of *Bacillus thuringiensis*. Endotoxin. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Gumbira-Said, E. 1987. Bioindustri. Mediyatama Sarana Perkasa, Jakarta.
- Hartoto, L. 1992. Teknologi Fermentasi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, PAU Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Heimpel, A.M. 1967. A Critical Review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berl, and Other Crystalliferous Bacteria. *Ann. Rev. Entomol.* 12:287-322.
- <http://www.kimianet.lipi.go.id>
<http://www.epa.org>
- James, D.W. 1993. Urea: A Low Cost Nitrogen for Fertilizer With Special Management Requirements. Utah State University, USA.
- Jenie, B.S. L. dan Fachda. 1991. Pemanfaatan Onggok dan Dedak Padi Untuk Produksi Pigmen Angkak Oleh *Monascus purpureus*. Pertemuan Ilmiah Tahunan. Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia, Bogor
- Margalit, J. 1990. Discovery of *B. thuringiensis israelensis*. *Di dalam* Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies: Biochemistry, Genetics and Application of *B. thuringiensis* and *B. sphaericus*. Eds: H.de Barjac and D.J Sutherland. Rutgers University Press. New Brunswick, New Jersey, USA. 3-10.
- Moo Young, M. 1985. Comprehensive Biotechnology. Eds. A.T. Bull dan H. Dalton. Pergamon Press, Oxford. 113-280.
- Morris, O.N., P. Kanagaratnam dan J.S. Davies. 1996. Effect of Culture Condition Spore-Crystal Yield and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD 133). *J. of inverteb. Pathol.* 67:129-136.
- Norris, J.R. 1971. The Protein Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*: Biosynthesis and Physical Structure. *Di dalam* H.D. Burges dan N.W. Hussey (editor). *Microbial Control of Insect and Mites*. Academic Press, London, New York: 229-246.
- Pearson, D dan O.P. Ward, 1988. Effect of Culture Conditions on Growth and Sporulation of *Bacillus Thuringiensis* subsp. *israelensis* and Development of Media for Production of the Protein Crystal Endotoxin. *Biotechnology Letter* 10(7):451-456.
- Philip, F.E., J.S. Cory, M.J. Bailey, dan S. Higgs. 1993. *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, pp. 148. John Wiley and Sons, New York.
- Quinlan, R. J. And S. G. Lisansky. 1985. Microbial Insecticides, pp. 233-254. In H. Dellweg, ed. *Biotechnology vol. 3*. Verlag Chemis, Weinheim.
- Rahayuningsih, M. 2003. Toksisitas dan Perbedaan Aktivitas Dipterოსida Bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Tipe Liar dan Mutan pada berbagai Formulasi Media dan Kondisi Kultivasi. Disertasi. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler. dan D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal

- Proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: 775-806.
- Shieh, 1994. Identification and Clasification of *Bacillus thuringiensis*. Dalam Kumpulan Makalah Seminar *Bacillus thuringiensis*. Komisi Pestisida, Departemen Pertanian, Jakarta.
- Sikdar, D. P., M. K. Majumdar dan S. K. Majumdar. 1993. Optimization of Processor for Production of Delta Endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in a 5 litre Fermentor. Biochemical Archieves. 9 : 119-123.
- Stanburry, P.F. dan A. Whitaker. 1984. Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press, Oxford.
- Stahly, D. P., R. E. Andrews dan A. Ayosten. 1992. The Genus *Bacillus* Insect Pathogens. Di dalam A. Balows, H. G. Truper, M. Drowkin, W. Horder and K. H. Scheifer (eds.) The Prokaryotes Spriinger-Verlag, New York.
- Steinhaus, E.A. 1949. Principles of Insect Pathology. McGraw Hill Book Company, Inc. London. 757 hal.
- Sukmadi, B., Haryanto, B., dan Ratna S. 1996. Pengaruh Konsentrasi Dektrosa pada Produksi Bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* subspecies *aizawai*. Majalah BPPT No.LXXII : 17-23.
- Vandekar, M. dan H. T. Dulmage. 1982. Guideliness for Production of *Bacillus thuringiensis* H-14. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. Geneva.
- Wang, D.I.C., C.L. Cooney, A.L. Demain, P. Dunhill, A.E. Humprey dan M.D. Lilly. 1978. Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley and Sons, New York.
- Wicaksono, Y. 2002. Pemanfaatan Ongkok Tapioka dan Urea sebagai Media Sumber Karbon dan Nitrogen dalam Produksi Bioinsektisida oleh *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Yamamoto, T., T. Lizuka dan J.N. Aronson. 1983. Mosquitocidal Protein of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* : Identification and Partial Isolation of the Protein. Current Microbiology, Vol.. 9, pp. 279-284.