

6/B10
1999
0042

25

**STABILITAS BEBERAPA FORMULASI
BIOINSEKTISIDA**
Bacillus thuringiensis subsp. aizawai

DIAN MALINI OKTOVINA



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
1999**

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Amuwan.

Katakanlah : Kalau sekiranya lautan menjadi tinta untuk (menulis) kalimat-kalimat Tuhanku, sungguh habislah laut itu sebelum habis (ditulis) kalimat-kalimat Tuhanku, meskipun kami datangkan tambahan sebanyak itu (pula)"
(Al-Kahfi : 109)

**Kehidupan yang bergerak merayap
Menjelajahi bentangan kebisuan cakrawala ... lautan tersingkap ... pulau tersinggahi
Datang sosok insan peduli akan hidupnya
Atau mungkin hidup orang banyak ...
Jelajahi bumi dan buka kunci
Walau bola mata terpenjara dalam lensa
Terus menggali dan temukan arti
Buku itu ... tidak lagi tumpukan lembar-lembar daun lontar kosong
Namun kini tertuang pena penuh makna
Makna yang bukakan bola mata dunia**

**Ya. Kini hidup baginya lebih punya arti
Dari sekedar aliran darah dan hembusan nafas
Darah adalah tinta analisa
Nafas adalah telaah panjang ...**

**Satu-satu ... kini terjawab
Masih sekian banyak lagi yang belum terkuak
Namun kini ia terbujur kaku dalam penantian
Akankah kita meneruskan langkahnya ?**

(Wina, Maret'97)

**Kupersembahkan untuk :
Kedua orang tuaku serta
orang-orang terkasih**



**STABILITAS BEBERAPA FORMULASI
BIOINSEKTISIDA**
Bacillus thuringiensis subsp. aizawai

DIAN MALINI OKTOVINA

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Sains

pada

Jurusan Biologi

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
1999**



Judul : Stabilitas Beberapa Formulasi Bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*
Nama : Dian Malini Oktovina
NIM : G31.0724

@Makapla milik IPB University

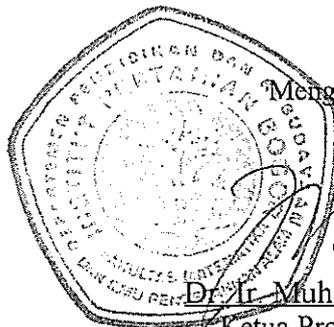
Menyetujui,

Dr. Ir. Ratna Siri Hadioetomo
Pembimbing I

Drs. R. Bambang Sukmadi, MSi
Pembimbing II

Karnadi, SSI
Pembimbing III

Mengetahui,

Dr. Ir. Muhammad Jusuf
Ketua Program Studi

Tanggal Lulus : 11 FEB 1999



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



RINGKASAN

DIAN MALINI OKTOVINA. Stabilitas Beberapa Formulasi Bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (*The Stability of Several Formulations of Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* Bioinsecticides). Dibimbing oleh RATNA SIRI HADIOETOMO, R. BAMBANG SUKMADI, dan KARNADI.

Dalam penelitian ini dikaji tiga macam formulasi cair [*flowable concentrates* (fc)] bioinsektisida dengan bahan aktif *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (Bta). Ketiga macam formulasi tersebut diberi nama sandi FC (formulasi C), FD (formulasi D), dan FE (formulasi E). Dalam semua kasus, bahan aktif ketika dipanen disuspensikan kembali dalam cairan formulasi yang sesuai (10% volume cairan fermentasi) lalu sebanyak 1 ml dicampurkan dengan cairan formulasi hingga volume total masing-masing mencapai 100 ml. Dalam penelitian ini disertakan kontrol negatif GC, GD, dan GE [1 ml suspensi bahan aktif tersebut di atas dicampurkan dengan 99 ml larutan garam fisiologis (NaCl)]. Sebagai kontrol positif dipakai produk komersial Florbac fc (Novo Nordisk, Denmark). Pengkajian ini dilakukan untuk mencari formulasi yang paling mendukung viabilitas spora dan stabilitas kristal protein Bta selama penyimpanan pada suhu kamar yang berkaitan dengan keampuhannya terhadap larva *Spodoptera litura* instar-1.

Penurunan nilai pH, viabilitas spora dan kristal protein Bta serta mortalitas larva semakin tinggi dengan bertambahnya umur formulasi. Persentase penurunan total viabilitas spora yang disebabkan oleh ketiga macam formulasi yang dicobakan setelah disimpan selama tiga bulan mencapai lebih dari 90%, yaitu masing-masing sebesar 96,96% (FE), 93,33% (FD), dan 92,57% (FC). Konsentrasi kristal protein sebagaimana diduga dengan hemasitometer memperlihatkan penurunan yang serupa dengan penurunan viabilitas spora tetapi dengan persentase yang lebih rendah, yaitu masing-masing sebesar 42,23% (FC), 53,33% (FD), dan 77,22% (FE). Persentase penurunan tersebut menunjukkan toksiknya cairan formulasi yang dicobakan terhadap spora dan kristal protein Bta. Penurunan total viabilitas spora yang terjadi pada kontrol negatif, yaitu masing-masing sebesar 14,08% (GC), 21,69% (GD), dan 10,34% (GE) juga mendukung kesimpulan tersebut. Penurunan pH juga terjadi pada semua formulasi, masing-masing sebanyak 0,73 (FC), 0,85 (FD), dan 1,46 (FE) satuan pH. Tidak ada satupun pelakuan formulasi yang menyebabkan mortalitas larva 100% meskipun sampai hari ke-4.

Produk komersial Florbac fc yang disertakan sebagai kontrol positif menunjukkan nilai pH dan VSC yang tetap stabil selama tiga bulan masa penyimpanan dengan nilai mortalitas 100%.

Secara keseluruhan, ketiga macam formulasi yang dicobakan tidak ada yang dapat mendukung viabilitas spora dan stabilitas kristal protein Bta dengan baik. Pengkajian kembali komposisi bahan-bahan formulasinya perlu dilakukan untuk menghasilkan cairan formulasi yang dikhendaki.



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Pekalongan pada tanggal 26 Oktober 1976 sebagai anak kedua dari tiga bersaudara, anak dari pasangan Moezamil Zamahsari dan Azizah.

Tahun 1994 penulis lulus dari SMA Negeri 37 Jakarta dan pada tahun yang sama lulus seleksi masuk IPB melalui jalur Ujian Masuk Perguruan Tinggi Negeri (UMPTN). Pada tahun 1994 penulis memilih Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Selama mengikuti perkuliahan penulis menjadi asisten mata kuliah Mikrobiologi Dasar pada tahun ajaran 1996/1997 dan 1997/1998, serta mata kuliah Fisiologi Tumbuhan pada tahun ajaran 1997/1998.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan Masalah Khusus (MK) yang berjudul **Stabilitas Beberapa Formulasi Bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai***.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada berbagai pihak yang telah membantu penyelesaian karya ilmiah ini, terutama Ibu Dr. Ir. Ratna Siri Hadioctomo selaku pembimbing I yang telah banyak memberikan petunjuk, saran, kritik, dan pengalamannya selama penelitian maupun penulisan dan Bapak Drs. R. Bambang Sukmadi, MSi serta Bapak Karnadi, SSi atas fasilitas dan bimbingannya selaku pembimbing II dan III. Di samping itu penghargaan diberikan kepada Bapak Dr. Ir. Koesnandar, M.Eng. yang telah memberikan izin untuk melakukan penelitian di Pusat Pengkajian dan Penerapan Bioteknologi Industri dan Pertanian (PPP-Biotek), PUSPIPTEK, Serpong. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada sahabat-sahabatku, Vina dan Iya atas segala kebersamaan dan bantuannya dalam pelaksanaan penelitian dan juga penulisan ini. Kepada Teh Ari, Teh Herni, Teh Heni, Mahmud, Pak Wahid, Pak Joe, Hadi, Mbak Indri, seluruh staf *Control Room*, Bapak Ir. Syamsudin, dan keluarga Bapak Sudrajat, penulis ucapkan terima kasih atas segala bantuannya.

Ungkapan terima kasih yang mendalam ditujukan kepada keluarga tercinta, Ibu, Bapak, Nenek, Mas Anto, dan Fitra atas doa, dukungan dan kasih sayangnya, Teh Inge, Ade Anne, dan Mami atas cintakasihnya serta rekan-rekan Biologi, warga Cirahayu 6 (atas), Agria Swara atas kekeluargaan dan kebersamaannya selama ini.

Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat.

Bogor, Februari 1999

Dian Malini Oktovina



DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
PENDAHULUAN.....	1
Latar Belakang	1
Bioinsektisida Berbahan Aktif <i>Bacillus thuringiensis</i>	1
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> sebagai Bahan Aktif Bioinsektisida.....	3
Formulasi <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
<i>Spodoptera litura</i> sebagai Serangga Sasaran <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	5
BAHAN DAN METODE.....	6
Waktu dan Tempat Penelitian	6
Jenis Formulasi.....	6
Sumber Bahan Aktif	6
Penyiapan Formulasi dengan Bahan Aktif <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	6
Analisis Formulasi Bahan Aktif	6
HASIL DAN PEMBAHASAN	7
Viabilitas Spora <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> dan Perubahan pH Formulasi Selama Penyimpanan	7
Stabilitas Kristal Protein <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	8
KESIMPULAN DAN SARAN	10
DAFTAR PUSTAKA.....	10
LAMPIRAN.....	15



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Berbagai produk bioinsektisida komersial berbahan aktif <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
2. Produk bioinsektisida <i>Bacillus thuringiensis</i> yang beredar di Indonesia dengan berbagai merk dagang serta jenis formulasinya	2
3. Berbagai bahan tambahan yang biasa digunakan dalam formulasi bioinsektisida <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
4. Hubungan antara jumlah spora hidup (VSC) <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> dengan lama penyimpanan serta persentase penurunan totalnya pada tiga jenis formulasi ..	8
5. Konsentrasi kristal protein <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> dalam tiga jenis formulasi yang berbeda serta persentase penurunan totalnya setelah tiga bulan masa penyimpanan.....	9
6. Hubungan stabilitas kristal protein dalam tiga jenis formulasi bahan aktif <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> terhadap mortalitas larva <i>Spodoptera litura</i> instar-1 setelah empat hari perlakuan	9

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Perubahan nilai pH formulasi selama tiga bulan penyimpanan pada suhu kamar	8

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Komposisi pakan ulat dan cara pembuatannya	15
2. Perubahan pH formulasi selama tiga bulan penyimpanan pada suhu kamar	16

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Di antara berbagai hama penting pertanian di Indonesia, salah satunya adalah *Spodoptera litura*. Hama ini dikenal sering menimbulkan kerugian pada berbagai tanaman penting pertanian dan perkebunan seperti padi, kedelai, kacang tanah, kacang hijau, jagung, kentang, tomat, kubis, kapas, ubi jalar, dan tembakau (Kalshoven, 1981).

Pada awalnya, usaha-usaha pengendalian hama tanaman pertanian banyak menggunakan insektisida kimia. Pemakaian insektisida ini memang menguntungkan karena daya bunuh terhadap hama sasaran relatif cepat dan mudah diaplikasikan. Namun, kemampuan dan aplikasinya yang mudah membuat insektisida ini sering digunakan dengan dosis dan frekuensi yang tinggi, sehingga timbul dampak yang merugikan. Dampak negatif yang dimaksud antara lain ialah timbulnya residu yang menyebabkan polusi lingkungan, hama sekunder, dan resistensi hama terhadap insektisida yang digunakan (Sudarmo, 1995). Mengingat dampak tersebut, maka upaya pengendalian alternatif seperti metode pengendalian serangga hama secara hayati mendapat perhatian serius.

Penggunaan bioinsektisida berbahan aktif *Bacillus thuringiensis* (Bt) merupakan salah satu aplikasi pengendalian hama secara hayati. Menurut Kalmakoff dan Longworth (1980), bioinsektisida ini telah banyak dipakai dan diproduksi secara komersial baik dalam bentuk formulasi cair maupun serbuk kering.

Sejak bioinsektisida Bt dikenal oleh petani Indonesia pada awal tahun 1970-an (Hadioctomo, komunikasi pribadi), ternyata belum ada satupun yang diproduksi di dalam negeri. Secara umum, faktor-faktor yang dapat menghambat komersialisasi bioinsektisida Bt meliputi terbatasnya metode produksi dengan biaya rendah, kurangnya konsistensi pemakaian di lapang, dan ketidakstabilan formulasi (Wilson & Jackson, 1997). Formulasi bioinsektisida yang baik merupakan formulasi yang dapat mendukung stabilitas bahan aktif yang bersangkutan selama masa simpan yang cukup panjang.

Dalam upaya untuk merintis produksi bioinsektisida Bt komersial di dalam negeri,

belakangan ini Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) telah melakukan pengkajian formulasi baik dalam bentuk serbuk, cair maupun pasta atau krim. Beberapa formulasi cair secara fisiko-kimia dapat digunakan, dan untuk mengetahui kualitas masing-masing formulasi dilakukan pengujian bioasai terhadap tiga formulasi yang selanjutnya disebut sebagai formulasi C, D, dan E.

Tujuan penelitian ini ialah mencari formulasi di antara ketiga macam formulasi yang diuji tersebut di atas yang paling mendukung viabilitas spora dan stabilitas kristal protein Bt subsp. *aizawai* (Bta) selama penyimpanan pada suhu kamar yang berkaitan dengan keampuhannya terhadap larva *S. litura* instar-1.

Bioinsektisida Berbahan Aktif *Bacillus thuringiensis*

Bioinsektisida berbahan aktif Bt selain digunakan untuk mengendalikan serangga hama tanaman pertanian dan kehutanan, juga dipakai untuk mengendalikan serangga yang merupakan vektor berbagai penyakit pada manusia dan hewan (Priest, 1992). Dalam tinjauannya, Bravo (1997) menyebutkan bahwa Bt tidak hanya toksik bagi hama serangga dari berbagai ordo, seperti Lepidoptera, Coleoptera, dan Diptera, tetapi juga terhadap anggota-anggota Hymenoptera, Homoptera, Mallophaga, dan Acari serta invertebrata lain seperti Nematelminthes, Platyhelminthes, dan Sarcostigophora.

Pemakaian bioinsektisida Bt ini memberikan beberapa keuntungan di antaranya ialah tidak meninggalkan residu yang dapat mencemari lingkungan dan relatif aman bagi organisme bukan sasaran (Aronson *et al.*, 1986). Akan tetapi, sebagaimana ditinjau oleh Luthy *et al.* pada tahun 1982, penggunaannya selain menguntungkan juga memiliki beberapa kekurangan yaitu spektrum sasaran yang sempit, tingkat persistensinya yang terbatas di lingkungan, kerentanan delta-endotoksinya terhadap sinar matahari, dan biaya produksinya yang relatif tinggi dibandingkan insektisida kimia.

Menurut tinjauan Frankenhuyzen (1993), penggunaan Bt sebagai pengendali serangga hama pertama kali dilakukan pada akhir tahun 1920-an dan awal tahun 1930-an terhadap hama ulat jagung (*Ostrinia nubilalis*) di Eropa

Tenggara. Pemanfaatan Bt ini berlanjut selama dua dasawarsa berikutnya untuk membasmi beberapa hama Lepidoptera di Eropa dan Amerika. Sporeine merupakan produk komersial berbahan aktif Bt pertama (galur *berliner*) yang dikeluarkan di Prancis pada tahun 1938. Setelah itu, pengembangan produk-produk komersial lain mulai dilakukan sejak tahun 1950-an di beberapa negara lain seperti Uni Soviet, Amerika, Cekoslovakia, dan Jerman. Tinjauan oleh Knowles (1994) menyebutkan bahwa dewasa ini Bt merupakan bahan aktif bioinsektisida yang paling banyak digunakan. Disebutkan juga bahwa penjualan bioinsektisida Bt tersebut mencapai 90-95% pangsa pasar bioinsektisida komersial.

Salah satu di antara produk Bt yang digunakan secara luas ialah Thuricide yang

dikeluarkan di Amerika pada tahun 1957. Sampai dengan tahun 1960-an, bahan aktif yang terkandung di dalam produk komersial tersebut hanya terbatas pada Bt Berliner (Bt H-1). Namun, penggunaan Bt Berliner mulai ditinggalkan sejak ditemukan Bt subsp. *kurstaki* (Btk/HD-1) pada tahun 1967 yang diketahui lebih ampuh 2-200 kali terhadap hama pertanian. Hingga awal tahun 1980-an, produk komersial berbahan aktif Btk HD-1 ini mendominasi upaya pengendalian terhadap hama pertanian dan kehutanan anggota ordo Lepidoptera. Pada pertengahan tahun 1980-an, penggunaan galur ini juga masih mendominasi 60% aplikasi pertanian dan 20% aplikasi kehutanan dari jumlah total perdagangan bioinsektisida Bt.

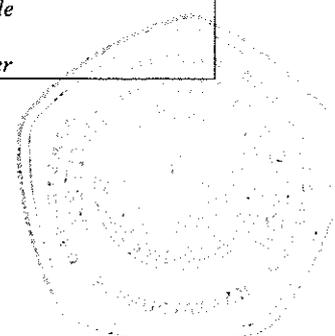
Tabel 1. Berbagai produk bioinsektisida komersial berbahan aktif *Bacillus thuringiensis*

Bahan aktif	Produk	Ajukan
Bt subsp. <i>berliner</i>	Sketal	Powles & Rogers (1989)
Bt subsp. <i>kurstaki</i>	Thuricide, Dipel, Sporeine, Bactis, Plantibac, Bug Time, Biospor, Biotrol, Condor, Cutlass, Delfin, Foil, Biobit, Javelin	Luthy <i>et al.</i> (1982), Powles & Rogers (1989),
Bt subsp. <i>israelensis</i>	Teknar, Mozkill, Bactimos, Bactucide, Vectobac, Skeetal	Powles & Rogers (1989), Navon (1993)
Bt subsp. <i>galleriae</i>	Entobacterine 3, Gomeline	Luthy <i>et al.</i> (1982)
Bt subsp. <i>dendrolimus</i>	Dendrobacilline	Luthy <i>et al.</i> (1982)
Bt subsp. <i>insectus</i>	Toxobacterin, Insectine	Luthy <i>et al.</i> (1982)
Bt subsp. <i>caucasicus</i>	BIP	Luthy <i>et al.</i> (1982)
Bt subsp. <i>aizawai</i>	Bacilin, Florbac, Turex, Xentari, Certan	Navon (1993), Anonim (1997)
Bt subsp. <i>thuringiensis</i>	Leptox, Bathurin, Bitoxibacilline, Baktukal, Bactospeine	Luthy <i>et al.</i> (1982)

Tabel 2. Produk bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* yang beredar di Indonesia dengan berbagai merk dagang serta jenis formulasinya

Produk	Bahan aktif Bt	Jenis formulasi
Bacilin WP	Bta	wettable powder
Florbac FC	Bta	fluid
Turex WP	Bta GC-91	wettable powder
Xentari G	Bta	granule
Bactospeine ULV	Btk H-14	oil
Bactospeine WP	Btk H-14	wettable powder
Condor 70F	Btk EG-2348	fluid
Condor WP	Btk EG-2348	wettable powder
Cutlass WP	Btk EG-2371	wettable powder
Dipel WP	Btk HD-7	wettable powder
Delfin WDG	Btk SA-115	granule
Foil 70F	Btk EG-2424	fluid
Thuricide HP	Btk HD-1	powder

Sumber : Anonim, 1997



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Navon (1993) dalam tinjuannya menyebutkan bahwa selama lebih dari 20 tahun dominasi galur Btk HD-1 didasarkan atas kemampuan galur tersebut dalam mengendalikan lebih dari 100 spesies hama Lepidoptera. Sementara itu, galur-galur Bt yang lain mempunyai spektrum inang yang lebih sempit dengan nilai ekonomis yang lebih rendah. Khusus untuk larva *Spodoptera*, dilaporkan bahwa bahan aktif galur-galur Bta dan Bt subsp. *entomocidus* (Bte) ternyata lebih ampuh dibandingkan galur Btk HD-1. Di antara 58 subspecies Bt yang diketahui sejauh ini, baru sembilan yang diproduksi secara komersial sebagaimana tampak pada Tabel 1.

Di Indonesia telah beredar sejumlah produk bioinsektisida berbahan aktif Bt dengan berbagai merk dagang (Tabel 2) yang digunakan untuk mengendalikan hama pertanian dan kehutanan.

Bacillus thuringiensis subsp. *aizawai* sebagai Bahan Aktif Bioinsektisida

Bacillus thuringiensis subsp. *aizawai* pertama kali ditemukan oleh Aizawa pada tahun 1962 (Dulmage, 1981) dan berdasarkan antigen flagelumnya termasuk serotipe 7 (H-7). Bakteri ini mempunyai endospora subterminal berbentuk oval dan selama masa sporulasi menghasilkan satu kristal protein dalam setiap selnya. Kristal protein ini yang dikenal juga sebagai delta-endotoksin merupakan komponen utama yang menyebabkannya bersifat insektisidal. Menurut tinjauan Faust dan Bulla (1982), delta-endotoksin tersebut bersifat termolabil karena dapat terdenaturasi oleh panas (walaupun lebih stabil dibandingkan eksotoksin yang terlarut) dan tidak larut dalam pelarut organik namun larut dalam pelarut alkalin. Dilaporkan bahwa kemampuan delta-endotoksin dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu komposisi protoksin dan nilai nutritif medium kultur yang bersangkutan (Aronson, 1995; Mummigatti & Raghunathan, 1990).

Menurut klasifikasi yang terbaru yang didasarkan pada persentase kesamaan sekuen asam amino yang menyusun kristal protein yang bersangkutan, dikenali 22 kelas dengan 124 jenis gen *cry* yang menyandikan kristal protein Bt (Crickmore *et al.*, 1998). Bta sendiri diketahui memiliki empat jenis gen *cry1*, yaitu *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ca*, dan *cry1Da* (Wright *et al.*, 1997; Crickmore *et al.*, 1998) yang

menyandikan kristal protein berbentuk bipiramida (Schnepf *et al.*, 1998). Menurut tinjauan Lereclus *et al.* (1993), kristal protein ini memiliki aktivitas insektisidal terhadap larva serangga ordo Lepidoptera dan Diptera.

Kristal protein Bta yang tersusun atas protoksin *Cry1Aa* (32%), *Cry1Ab* (38%), *Cry1Ca* (26%), dan *Cry1Da* (5%) (Wright *et al.*, 1997) dengan berat molekul 130-140 kDa, apabila terserap dalam suasana basa saluran pencernaan tengah serangga yang rentan akan terlarut dan terhidrolisis untuk menghasilkan protein toksin. Selama aktivasi proteolitiknya tersebut, enzim protease akan mengubah polipeptida tersebut menjadi fragmen toksin aktif berukuran 60-70 kDa. Toksin *Cry1Aa* dan *Cry1Ab* akan berikatan dengan reseptor spesifik yang berukuran 210 kDa pada membran mikrofilia apikal sel epitelium usus tengah serangga, sementara protein *Cry1Ca* berikatan dengan reseptor lainnya yang berukuran 40 kDa (Maagd *et al.*, 1996). Ikatan antara toksin dengan reseptornya tersebut akan menginduksi perubahan konformasi toksin yang diikuti dengan penyisipan toksin pada membran sehingga terjadi oligomerisasi toksin berupa lubang pada pori membran (Bravo, 1997). Fenomena tersebut menyebabkan sistem pompa ion K^+ pada membran apikalnya tidak berfungsi sehingga mengganggu keseimbangan osmotik yang berakibat lisisnya sel. Akhirnya, larva akan berhenti makan dan mati karena gejala septisemia setelah satu atau tiga hari (Aronson *et al.*, 1986; Hofte & Whiteley, 1989; Prieto-Samsonov *et al.*, 1997).

Di antara galur-galur Bta, ada beberapa galur yang sangat ampuh dalam mengendalikan serangga hama *Spodoptera* karena mengandung berbagai protein *Cry1*. Menurut tinjauan Lereclus *et al.* (1993), protein *Cry1Ca* yang terdapat pada Bta diketahui bersifat toksik terhadap larva *S. littoralis*, *S. exigua*, dan *S. frugiperda*. Di pihak lain, *Cry1Da* agak kurang toksik terhadap larva *S. exigua* namun paling toksik terhadap *S. frugiperda* (Ceron *et al.*, 1995). Protein *Cry1Ca* itu sendiri ternyata tidak hanya dapat dijumpai pada Bta saja tetapi juga pada Bte (Moar *et al.*, 1995) dan Bt var. *kenyae* 4F1 sebagaimana yang disebutkan dalam tinjauan Juarez-Perez *et al.* pada tahun 1997.

Selain protein *Cry1Ca*, *Cry1Da*, *Cry1Aa*, dan *Cry1Ab* yang dimiliki Bta, jenis protein *Cry1* lain yang juga bersifat toksik terhadap *Spodoptera* adalah *Cry1Ea* dan *Cry1Fa*.



Namun, di antara protein-protein CryI yang disebutkan ini, yang paling toksik adalah protein CryI_{Ca}, CryI_{Ea}, dan CryI_{Fa} (Muller *et al.*, 1996).

Liu *et al.* (1998) melaporkan bahwa pada beberapa kasus, spora ternyata secara sinergis dapat meningkatkan toksisitas kristal protein. Pada Bt_a, sinergisme yang terjadi ialah antara spora dengan protein CryI_{Ca} tetapi tidak dengan protein CryI yang lain.

Formulasi *Bacillus thuringiensis*

Faktor-faktor yang dapat menghambat komersialisasi bioinsektisida Bt meliputi terbatasnya metode produksi dengan biaya rendah, kurangnya konsistensi pemakaian di lapang, dan ketidakstabilan formulasi (Wilson & Jackson, 1997).

Optimasi metode produksi berkaitan dengan galur Bt dan medium fermentasi yang digunakan untuk menghasilkan biomassa. Seleksi terhadap galur-galur Bt yang sesuai dengan medium produksinya menjadi suatu keharusan yang tidak dapat ditunda. Pada umumnya konsentrasi sel yang dihasilkan berkisar antara 10^8 - 10^9 sel/ml. Pada skala produksi yang lebih tinggi, konsentrasi sel ini bisa melebihi 5×10^9 sel/ml (Bernhard & Utz, 1993).

Untuk menghasilkan suatu produk bioinsektisida komersial, campuran spora-kristal Bt yang dihasilkan melalui fermentasi perlu diformulasi (Flores *et al.*, 1997). Formulasi ini merupakan suatu proses pencampuran bahan aktif (campuran spora-kristal) dengan konsentrasi tertentu dengan bahan-bahan tambahan sehingga dihasilkan siapan (produk akhir) yang praktis untuk digunakan (Magallona *et al.*, 1990). Bahan-bahan tambahan tersebut meliputi bahan pembawa, pengemulsi (khusus untuk formulasi cair), penyebar, perekat, dan protektan. Bahan pembawa dan pengemulsi digunakan untuk memudahkan aplikasi di lapang. Sementara bahan penyebar, perekat, dan protektan diperlukan untuk mencapai kondisi fisik formulasi yang diharapkan seperti mampu menyebar dengan baik, persisten, dan terlindung dari sinar ultra violet yang dapat menonaktifkan kristal protein (Keller & Langenbruch, 1993).

Formulasi Bt yang stabil seyogyanya dapat disimpan cukup lama pada suhu kamar tanpa mengalami perubahan bahan aktifnya. Untuk menghasilkan formulasi tersebut, bahan-bahan

formulasi yang digunakan tidak boleh merangsang terjadinya perkecambahan spora atau pertumbuhan sel sebelum waktunya dan tidak mengganggu stabilitas bahan aktifnya (Angus & Luthy, 1971). Stabilitas bahan aktif dapat terganggu apabila bahan formulasi yang digunakan membunuh spora hidup ataupun mendenaturasi kristal protein Bt. Persyaratan umum ini berlaku bagi semua bahan tambahan dalam formulasi. Berbagai bahan tambahan yang biasa digunakan dalam formulasi bioinsektisida Bt dapat dilihat pada Tabel 3.

Formulasi cair maupun kering merupakan bentuk dasar formulasi bioinsektisida Bt yang telah diproduksi secara komersial (Kalmakoff & Longworth, 1980). Formulasi cair biasanya merupakan cairan emulsi (*emulsifiable concentrates/emulsible concentrates*), minyak (*oil*) ataupun cairan terlarut (*fluid concentrates/flowable concentrates*). Di pihak lain, formulasi kering dapat berupa butiran (*granule*), tepung hembus (*dust*), dan tepung (*powder*) (Navon, 1993; Sudarmo, 1995).

Tabel 3. Berbagai bahan tambahan yang biasa digunakan dalam formulasi bioinsektisida *Bacillus thuringiensis*

Jenis bahan tambahan	Contoh
Bahan pembawa	ekstrak tanah, laktosa, talek, kuarsa, kaolin, bentonit, atapulgit, silikat sintetik, xilena, metil naftalena, minyak tanah, aminoester, tween 20
Bahan pengemulsi	pinolin 1882, tween 80, span 80, triton B, 9D 207
Bahan penyebar	bubuk susu, sirup jagung, tepung kasein, bubuk darah, gelatin, saponin, senyawa deterjen
Bahan perekat	tepung, dekstrin, karet, lovo (cairan amino stearat), polivinil klorida, molase, glutolin
Bahan protektan	musin, sukrosa, kasein

Sumber : Angus & Luthy, 1971

Kedua bentuk dasar formulasi di atas masing-masing memiliki keuntungan dan kerugian. Keuntungan pemakaian formulasi cair ialah selain murah (Magallona *et al.*, 1990) juga mudah dipakai di lapang karena mendukung penyemprotan, persistensi, dan penyebaran dengan baik (Angus & Luthy, 1971). Di samping itu, formulasi cair seringkali

menunjukkan kemampuan yang lebih tinggi daripada formulasi kering. Vandenberg dan Shimanuki (1990) melaporkan bahwa formulasi cair Certan (Sandoz, San Diego) berbahan aktif Bt menyebabkan mortalitas yang lebih tinggi terhadap larva *Galleria mellonella* ketimbang formulasi kering produksi Sandoz dengan galur Bt yang sama. Pada kasus lain, Lacey dan Undeen (1984) melaporkan bahwa galur Bt subsp. *israelensis* (Bti) yang sama dalam formulasi cair Teknar WDC terbukti lebih ampuh dibandingkan formulasi tepung Vectobac WP ataupun Bactimos WP dalam membunuh hama lalat hitam (*Simulium vittatum*). Ukuran partikel formulasi kemungkinan berpengaruh terhadap jumlah bahan aktif yang termakan hama sasaran. Diketahui, ukuran rata-rata partikel formulasi Teknar WDC (2,1 μm) lebih kecil ketimbang Vectobac WP (5,2 μm) ataupun Bactimos WP (4,0 μm). Namun demikian, sifat formulasi cair diketahui kurang stabil ketimbang formulasi kering (Navon, 1993; Bernhard & Utz, 1993). Batas kadaluwarsa formulasi cair yang relatif lebih singkat (satu tahun) ketimbang formulasi kering (dua sampai tiga tahun) menunjukkan hal tersebut. Navon (1993), dalam tinjauannya juga mengemukakan bahwa formulasi serbuk kering baru kehilangan sedikit aktivitas toksiknya setelah beberapa tahun disimpan. Di pihak lain, formulasi kering walaupun relatif stabil namun pemakaiannya di lapang tidak mudah dan menghabiskan biaya yang lebih mahal (Angus & Luthy, 1971; Bernhard & Utz, 1993).

Menurut tinjauan oleh Keller dan Langenbruch (1993), stabilitas bahan aktif dalam formulasi cair tampaknya dipengaruhi oleh pH formulasi dan suhu penyimpanan. Nilai pH yang merusak kristal Bt pada umumnya adalah pH yang sangat rendah atau sangat tinggi.

Spodoptera litura sebagai Serangga Sasaran *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*

Spodoptera litura yang tergolong ke dalam filum Arthropoda, kelas Insecta, ordo Lepidoptera, dan famili Noctuidae merupakan salah satu ulat grayak yang secara luas tersebar di Asia, Eropa, Afrika, Australia, dan beberapa Kepulauan Pasifik. Larvanya yang polifag sudah banyak dikenal di Indonesia sebagai hama perusak beberapa jenis tanaman penting pertanian dan perkebunan. Sebagai contoh,

menurut data statistik tahun 1994-1995, luas area tanaman padi di Pulau Jawa yang diserang rata-rata mencapai 2.287,5 ha dengan intensitas serangan sekitar 21% per tahunnya, sehingga mengakibatkan kerusakan yang cukup besar (BPS, 1994-1995).

Sebagai hama yang ganas, *S. litura* ini tidak saja memakan jaringan daun tetapi juga bunga, buah, dan akar. Sihwarni (1984) melaporkan bahwa stadium larva merupakan stadium serangga yang merugikan tanaman dengan masa berkembang yang paling lama (± 20 hari) dibandingkan telur, pupa, maupun imago. Larva *S. litura* terdiri dari lima atau enam instar, setiap instarnya mempunyai warna kulit tersendiri. Larva instar pertama dan kedua merusak daun dengan cara memakan bagian bawah daun dan menyisakan tulang-tulang daun dan epidermis atas. Pada instar ketiga, larva aktif memakan seluruh jaringan daun kecuali tulang daun sehingga daun berlubang-lubang. Larva instar keempat, kelima, dan keenam memakan semua jaringan daun. Noch *et al.* (1983) melaporkan bahwa seekor ulat pada instar kelima mampu menghabiskan semua daun kedelai pada tanaman berumur dua minggu dalam waktu tiga sampai empat hari. Kemampuan larva *S. litura* memakan daun tanaman yang diserangnya dipengaruhi oleh tingkat instarnya. Semakin tinggi tingkat instar semakin besar luas daun yang dimakannya (Purnomo, 1986).

Serangan ulat grayak di lapangan setiap saat berfluktuasi dan sulit diduga. Kemampuannya untuk berkembang biak sangat tinggi. Diketahui, seekor imago betina dapat melakukan perkawinan beberapa kali dan mampu menghasilkan telur sebanyak 2.000 sampai 3.000 butir (Kalshoven, 1981).

Insektisida kimia telah lama dipakai untuk mengendalikan hama *S. litura* (Noch *et al.*, 1983). Kerentanan larva terhadap insektisida ini berbeda-beda bergantung pada jenis insektisida kimia yang digunakan (Laba & Soekarna, 1984). Di antara jenis insektisida tersebut, ada jenis yang mudah membunuh larva instar awal tetapi ada juga yang membunuh instar yang lebih tinggi. Akan tetapi, penggunaan insektisida kimia ternyata mengakibatkan turunnya populasi musuh alami serangga sasaran (Prasaja & Harnoto, 1984) sehingga upaya pengendalian secara hayati dengan menggunakan bakteri Bt menjadi sangat diminati.

Secara umum, Bt bekerja secara spesifik sehingga spektrum inangnya relatif sempit. Bt sendiri diketahui bersifat spesifik terhadap hama *S. litura* karena protein Cry1Ca yang dimiliki Bt dapat mengenali protein reseptor pada usus tengah serangga tersebut. Protein Cry1Ca yang merupakan protoksin apabila termakan oleh serangga akan larut dalam lingkungan alkalin usus tengah serangga, lalu diproses oleh protease lumen usus. Selanjutnya, proses ini akan menghasilkan fragmen ujung N yang merupakan toksin aktif. Toksin aktif ini kemudian terikat pada reseptor yang sesuai yang ada pada *brush border membrane vesicle* (BBMV) sel epitel usus tengah. Terikatnya toksin pada reseptornya menyebabkan terbentuknya lubang pada membran sehingga merusak membran sel epitel sasaran. Selanjutnya sel mengalami lisis. Larva akhirnya mati setelah berhenti makan (Maagd *et al.*, 1996).

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Agro-Mikrobiologi, Pusat Pengkajian dan Penerapan Bioteknologi Industri dan Pertanian (PPP-Biotek), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Kawasan Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (PUSPIPTEK), Serpong-Tangerang, mulai bulan Mei sampai November 1998.

Jenis Formulasi

Dalam penelitian ini diujikan tiga macam formulasi cair [*flowable concentrates* (fc)] bioinsektisida yang diberi nama sandi C, D, dan E. Cairan formulasi C dan D, keduanya berwarna kuning tua, meskipun formulasi C tampak lebih jernih dibandingkan D. Di pihak lain, formulasi E tampak jernih dan tidak berwarna. Informasi mengenai komposisi ketiga macam formulasi tersebut belum dipublikasikan oleh BPPT.

Sumber Bahan Aktif

Bahan aktif Bt yang dipakai dalam penelitian ini adalah suspensi Bt yang merupakan campuran spora-kristal hasil

fermentasi dengan komposisi medium Sukmadi *et al.* (1997) yang dimodifikasi, yaitu: dekstrosa 1,0%, tepung kedelai 1,5%, tepung jagung 0,5% dan mineral ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,03%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,002%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,002%, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,002%, dan $CaCO_3$ 0,1%).

Sesuai dengan perlakuan yang ingin dicobakan dalam penelitian ini, masing-masing pelet bahan aktif hasil sentrifugasi yang diperoleh dari proses pemanenan disuspensikan ke dalam cairan formulasi (10% volume cairan fermentasi) yang sesuai. Suspensi spora-kristal tersebut dipakatkan sedemikian hingga mencapai konsentrasi sel sebesar $8,55 \times 10^8$ sel/ml yang diperkirakan setara dengan 7.500 IU/ml. Bahan aktif ini kemudian disimpan dalam freezer sampai waktunya dipergunakan.

Penyiapan Formulasi dengan Bahan Aktif *Bacillus thuringiensis subsp. aizawai*

Sebanyak 1 ml bahan aktif diisikan ke dalam setiap tiga botol berwarna gelap berukuran 120 ml hingga mencapai volume kerja 100 ml untuk tiap formulasi. Botol-botol formulasi tersebut selanjutnya disimpan pada suhu kamar selama berlangsungnya pengujian.

Analisis Formulasi Bahan Aktif

Setiap bulan selama kurun waktu tiga bulan dilakukan analisis terhadap masing-masing formulasi yang meliputi: (1) hitungan spora hidup (*viable spore count* atau VSC); (2) pH formulasi; dan (3) stabilitas kristal protein dalam hal konsentrasi dan keampuhannya terhadap larva *S. litura* instar-1.

Penghitungan spora hidup dilakukan dengan cara seperti berikut ini. Mula-mula sebanyak 1 ml campuran spora-kristal disuspensikan dalam 9 ml larutan garam fisiologis (NaCl steril 0,85%) lalu diberi renjatan panas pada suhu 80°C selama 7 menit. Suspensi ini kemudian diencerkan seperlunya secara serial dan 50 µl dari pengenceran yang sesuai dicawankan pada cawan *nutrient agar* (NA) dengan metode cawan sebar. Setelah diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 30°C, dilakukan penghitungan koloni untuk penentuan VSC.

Untuk mengetahui fluktuasi pH cairan formulasi selama waktu penyimpanan, sebanyak 3 ml masing-masing formulasi diukur pHnya dengan menggunakan pH meter.

Untuk mengetahui stabilitas kristal protein, dilakukan penghitungan jumlah kristal/ml

dengan menggunakan hemasitometer dan uji toksisitas (bioasai) terhadap larva *S. litura* instar-1. Untuk setiap perlakuan yang diujikan dalam bioasai dipakai 20 ekor larva yang ditempatkan di dalam cawan-cawan plastik, masing-masing dengan tiga ulangan. Setiap 20 ekor larva ini diberi 0,5 g pakan buatan (komposisi pakan buatan dapat dilihat pada Lamp. 1) yang telah dikontaminasi dengan 40 μ l masing-masing perlakuan (formulasi dan kontrol positif) yang sesuai, yang telah diencerkan sedemikian sehingga mempunyai konsentrasi $1,25 \times 10^8$ sel/ml [catatan: 40 μ l suspensi spora-kristal per 0,5 g pakan mengandung campuran spora-kristal yang setara dengan 1 mg serbuk (10^7 spora) hasil liofilisasi Sukmadi *et al.* (1997) per g pakan]. Sebagai kontrol positif digunakan Florbac fc (Novo Nordisk, Denmark) yang konsentrasinya ($8,55 \times 10^8$ sel/ml) diduga dengan metode hitungan cawan. Ada dua kontrol negatif yang disertakan, yaitu formulasi tanpa bahan aktif dan air steril, masing-masing dihantarkan dalam volume 40 μ l juga. Persentase mortalitas larva diamati tiap 24 jam selama empat hari berturut-turut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Viabilitas Spora *Bacillus thuringiensis subsp. aizawai* dan Perubahan pH Formulasi Selama Penyimpanan

Penurunan viabilitas spora yang disebabkan oleh ketiga macam formulasi yang dicobakan dapat dilihat pada Tabel 4. Perhatikan bahwa GC, GD, dan GE yang disebut sebagai pembanding sesungguhnya adalah suspensi sel yang diisikan ke dalam botol-botol berisikan larutan garam fisiologis. Akan tetapi, sewaktu sel tersebut dipanen, setelah pencucian, pelet sel terlebih dahulu disuspensikan kembali dalam cairan formulasi yang sesuai (sebanyak 10% volume cairan fermentasi). Ternyata pada ketiga pembanding ini terlihat juga penurunan viabilitas spora yang berkisar antara 27,32% (GC) sampai 58,85% (GE) setelah penyimpanan tiga bulan. Larutan garam fisiologis sendiri diketahui tidak bersifat toksik, tetapi dalam penelitian ini tidak ada bahan aktif yang hanya disuspensikan dalam larutan garam fisiologis

saja, sehingga sejauh mana larutan garam fisiologis berkontribusi pada penurunan viabilitas spora tidak diketahui.

Turunnya viabilitas spora Bta di dalam ketiga macam cairan formulasi yang dicobakan terlihat jauh lebih besar daripada yang tampak pada pembanding (lihat Tabel 4). Persentase penurunan total VSC terlihat semakin tinggi dengan bertambahnya umur formulasi. Setelah tiga bulan masa penyimpanan, FE menunjukkan penurunan terbesar (96,96%) disusul oleh FD (93,33%) dan FC (92,57%).

Di pihak lain, produk komersial Florbac fc (Novo Nordisk, Denmark) yang sudah disimpan selama tiga bulan ternyata memperlihatkan nilai VSC yang tetap stabil (8×10^8 spora/ml). Hal ini menunjukkan bahwa cairan formulasi yang dipakai oleh produk komersial tersebut dapat mendukung stabilitas spora hidup yang tersuspensikan di dalamnya, sangat berbeda jauh dengan tiga formulasi BPPT yang menunjukkan penurunan total viabilitas spora sampai lebih dari 90% selama tiga bulan masa penyimpanan. Berhubung komposisi bahan-bahan formulasi yang digunakan oleh BPPT merupakan suatu informasi yang belum dapat dipublikasikan, maka hal di atas tidak dapat dijelaskan lebih jauh.

Pada awalnya, ketiga macam formulasi yang dicobakan mempunyai pH awal sekitar netral (6,04-6,58). Setelah tiga bulan masa penyimpanan, terjadi penurunan pH pada semua formulasi sebanyak 0,73 (FC), 0,85 (FD), dan 1,46 (FE) satuan pH. Berbeda halnya dengan nilai pH produk komersial Florbac fc (Novo Nordisk, Denmark) yang tetap stabil (pH=4,5) setelah disimpan selama tiga bulan. Tidak jelas apakah bioinsektisida komersial ini pada awalnya disiapkan pada pH netral lalu menjadi stabil pada pH 4,5 atau memang sudah mempunyai nilai pH ini sejak disiapkan.

Turunnya nilai pH pada semua formulasi yang dicobakan kemungkinan disebabkan oleh reaksi kimia biasa dan bukan oleh fermentasi. Hal ini terlihat dari nilai pH botol kontrolnya (cairan formulasi tanpa bahan aktif) yang cenderung turun pula dengan laju yang hampir sama (lihat Gamb. 1 dan Lamp. 2). Selain itu, hasil pengamatan mikroskopik terhadap semua formulasi sejak sebelum disimpan (t_0) sampai setelah disimpan selama tiga bulan (t_3) menunjukkan tidak adanya sel vegetatif, sebagaimana yang seharusnya teramati bila terjadi perkecambahan spora dan fermentasi.



Jelas bahwa viabilitas spora dipengaruhi oleh dua faktor yaitu nilai pH dan cairan formulasi. Cairan formulasi yang toksik sebagaimana tampak pada Tabel 4 yang didukung oleh hasil

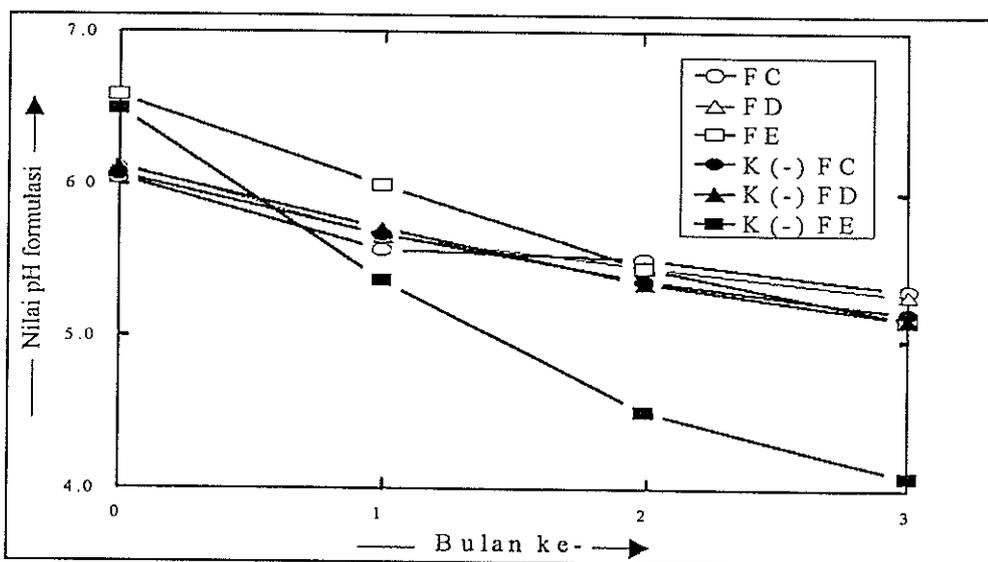
Akan tetapi, ketika disimpan selama 100 hari pada suhu 30°C, pH naik (dari 6,4 menjadi 8,0) dan viabilitas spora ada yang hilang.

Tabel 4. Hubungan antara jumlah spora hidup (VSC) *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* dengan lama penyimpanan serta persentase penurunan totalnya pada tiga jenis formulasi

Perlakuan ^a	VSC (Jumlah spora x 10 ⁸ /ml) ^b				% Penurunan total VSC		
	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₀ -t ₁	t ₀ -t ₂	t ₀ -t ₃
FC	7,77	2,28	1,17	0,57	70,66	84,94	92,57
FD	8,47	2,34	1,20	0,56	72,37	85,83	93,33
FE	8,58	4,06	0,95	0,26	52,68	88,89	96,96
GC	7,10	6,10	5,91	5,16	14,08	16,76	27,32
GD	8,30	6,50	5,97	5,03	21,69	28,07	39,39
GE	8,70	7,80	5,05	3,58	10,34	41,95	58,85

^a FC = formulasi C; FD = formulasi D; FE = formulasi E; GC, GD, dan GE = formulasi C, D, dan E di dalam larutan garam fisiologis

^b Nilai-nilai VSC yang tercantum merupakan rata-rata dari tiga ulangan; t₀ = sebelum disimpan; t₁ = disimpan 1 bulan; t₂ = disimpan 2 bulan; t₃ = disimpan 3 bulan



Gambar 1. Perubahan nilai pH formulasi selama tiga bulan penyimpanan pada suhu kamar.

bioasai (lihat bawah) dan turunnya nilai pH menyebabkan penurunan viabilitas spora Bt. Namun, tidak diketahui berapa besar kontribusi masing-masing faktor tersebut.

Sebagaimana disitir oleh Vandenberg dan Shimanuki (1990), Ignoffo pada tahun 1964 dalam penelitiannya menemukan bahwa suspensi Bt Berliner disimpan selama 500 hari pada suhu 10°C terjadi perubahan pH yang relatif kecil (dari 6,4 menjadi 6,8) tetapi viabilitas spora tetap stabil.

Stabilitas Kristal Protein *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*

Ketiga jenis cairan formulasi yang diujikan selain menyebabkan deteriorasi spora juga melarutkan kristal protein. Penurunan konsentrasi kristal protein terjadi selama tiga bulan penyimpanan, namun persentase penurunannya tidak sebesar seperti yang terjadi pada viabilitas spora. Tabel 5 memperlihatkan persentase penurunan total terkecil pada FC (42,23%) disusul oleh FD (53,33%) dan FE (77,22%).

Tabel 5. Konsentrasi kristal protein *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* dalam tiga jenis formulasi yang berbeda serta persentase penurunan totalnya setelah tiga bulan masa penyimpanan

Perlakuan ^a	Jumlah kristal protein x 10 ⁸ /ml ^b				% Penurunan total konsentrasi kristal protein		
	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₀ -t ₁	t ₀ -t ₂	t ₀ -t ₃
FC	7,01	4,91	4,59	4,05	29,96	34,52	42,23
FD	8,27	5,01	4,67	3,86	39,42	43,53	53,33
FE	8,43	5,98	3,13	1,92	29,06	62,87	77,22

^a FC = formulasi C; FD = formulasi D; FE = formulasi E
^b Nilai-nilai konsentrasi kristal protein yang tercantum merupakan rata-rata dari tiga ulangan; t₀ = sebelum disimpan; t₁ = disimpan 1 bulan; t₂ = disimpan 2 bulan; t₃ = disimpan 3 bulan

Tabel 6. Hubungan stabilitas kristal protein dalam tiga jenis formulasi bahan aktif *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* terhadap mortalitas larva *Spodoptera litura* instar-1 setelah empat hari perlakuan

Perlakuan ^a	% Mortalitas larva <i>S. litura</i> instar-1 pada hari ke-4 akibat perlakuan setelah penyimpanan ^b			
	t ₀ ^c	t ₁ ^d	t ₂ ^d	t ₃ ^d
FC ^e	91,67 (88,34)	88,33 (83,33)	81,67 (78,34)	78,33 (75,00)
FD ^e	95,00 (85,00)	90,00 (81,67)	88,33 (80,00)	76,67 (68,34)
FE ^e	96,67 (85,00)	93,33 (81,66)	80,00 (70,00)	75,00 (63,33)
K(-) FC	3,33	5,00	3,33	3,33
K(-) FD	10,00	8,33	8,33	8,33
K(-) FE	11,67	11,67	10,00	11,67
K(-) air steril	0	0	0	0
K(+) Florbac	100	100	100	100

^a FC = formulasi C; FD = formulasi D; FE = formulasi E; K(-) FC, K(-) FD, dan K(-) FE = formulasi C, D, dan E tanpa bahan aktif Bta
^b Nilai mortalitas merupakan rata-rata dari tiga ulangan; t₀ = sebelum disimpan; t₁ = disimpan 1 bulan; t₂ = disimpan 2 bulan; t₃ = disimpan 3 bulan
^c Konsentrasi bahan aktif Bta setara dengan konsentrasi sel dalam 1 mg serbuk
^d Konsentrasi bahan aktif Bta tidak dapat disetarakan dengan konsentrasi sel dalam 1 mg serbuk
^e Nilai mortalitas di dalam kurung sudah dikoreksi oleh mortalitas larva yang disebabkan oleh cairan formulasi tanpa bahan aktif

Menurut Keil (1991), diketahui ada sejumlah zat yang bersifat merusak kristal protein seperti natrium hipoklorit. Adanya natrium hipoklorit di dalam formulasi diketahui dapat melarutkan kristal protein Bt sehingga mengurangi toksisitasnya terhadap serangga sasaran. Kristal protein yang sudah terlarut tersebut dapat dibuat tidak aktif oleh bahan-bahan tambahan tertentu seperti asam trikloroasetat dan merkuri klorida. Sementara bahan lain seperti senyawa deterjen (natrium dodesil sulfat dan triton x-100) dapat membuka struktur kristalnya sehingga kristal protein menjadi lebih sensitif terhadap gangguan.

Data pada Tabel 6 menunjukkan bahwa kematian larva *S. litura* ini memang benar-benar disebabkan oleh pengaruh bahan aktif Bta yang diumpangkan. Terbukti, pada cawan kontrol negatif (air suling steril) larva tetap sehat,

tumbuh normal, dan dapat berkembang ke instar berikutnya. Larva *S. litura* yang mati akibat perlakuan tubuhnya menjadi keriput, kering, dan berubah warna menjadi coklat kehitaman. Sementara sisa-sisa larva yang tidak mati bukan berarti tetap sehat. Larva-larva tersebut menunjukkan gejala-gejala tidak normal, yaitu kurang aktif bergerak, tubuh menjadi kecil dan kurus serta lambat atau bahkan tidak dapat berkembang ke instar berikutnya.

Ternyata, pemberian cairan formulasi saja tanpa dibubuhi bahan aktif dalam semua kasus menyebabkan mortalitas yang berkisar antara 3,33% (cairan FC) sampai 11,67% (cairan FE). Hal ini menunjukkan bahwa cairan formulasi itu sendiri mempunyai daya bunuh. Diketahui bahwa bahan-bahan dalam cairan formulasi yang dapat meningkatkan daya bunuh bahan aktif (sinergisme) dapat menunda perkembangan

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

KESIMPULAN DAN SARAN

Di antara ketiga formulasi cair bioinsektisida yang diujikan (FC, FD, dan FE), ternyata tidak ada satupun yang mendukung viabilitas spora dan stabilitas kristal protein Bta dengan baik. Disarankan agar dilakukan perubahan komposisi bahan-bahan formulasinya sehingga dapat dihasilkan cairan formulasi yang dikehendaki.

DAFTAR PUSTAKA

- Angus, T. A. & P. Luthy.** 1971. Formulation of microbial insecticides, hlm. 623-637. Di dalam H. D. Burges & N. W. Hussey (Penyunting). *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press, New York.
- Anonim.** 1997. Pestisida untuk pertanian dan kehutanan. Komisi Pestisida Departemen Pertanian, Jakarta.
- Aronson, A.** 1995. The protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusions affects solubility and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11): 4057-4060.
- Aronson, A. I., W. Beckman & P. Dunn.** 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50(1): 1-24.
- Benz, G.** 1971. Synergism of micro-organisms and chemical insecticides, hlm. 327-355. Di dalam H. D. Burges & N. W. Hussey (Penyunting). *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press, New York.
- Bernhard, K. & R. Utz.** 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses, hlm. 255-267. Di dalam P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey & S. Higgs (Penyunting). *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

resistensi hama terhadap bioinsektisida yang bersangkutan mengingat situs kerjanya berbeda (Benz, 1971; Thalib, 1992). Akan tetapi, kalau toksisitas cairan formulasi tersebut tidak selektif seperti yang terjadi dalam penelitian ini, maka pengaruhnya justru merugikan. Sebagaimana yang dikemukakan oleh Angus dan Luthy (1971), bahan-bahan formulasi yang digunakan hendaknya mendukung terjadinya infeksi terhadap organisme sasaran tanpa mengganggu stabilitas bahan aktifnya.

Tidak ada satupun perlakuan formulasi yang menyebabkan mortalitas larva 100%, meskipun sampai hari ke-4. Nilai mortalitas terendah dicapai oleh perlakuan FE untuk formulasi yang sudah disimpan selama tiga bulan (63,33%), sementara yang tertinggi dicapai oleh perlakuan FC untuk formulasi sebelum disimpan (88,34%). Berbeda halnya dengan suspensi spora-kristal yang dihasilkan produk Florbac fc yang tetap memberikan nilai mortalitas 100% sekalipun disimpan selama tiga bulan.

Semakin lama disimpan, semua formulasi Bta yang dicobakan menyebabkan mortalitas larva yang semakin menurun. Hal ini disebabkan karena jumlah spora dan kristal protein (lihat Tabel 4 dan 5) yang diumpungkan mengalami penurunan pula akibat toksiknya cairan formulasi itu sendiri. Sampai pada suatu titik (dimulai dengan penyimpanan dua bulan), konsentrasi spora-kristal di dalam semua formulasi menjadi sedemikian rendahnya sehingga tidak mungkin lagi disetarakan dengan konsentrasi spora-kristal yang dikehendaki seperti yang terkandung dalam 1 mg serbuk bahan aktif / g pakan. Oleh sebab itu, semakin turunnya mortalitas larva sebagaimana teramati pada Tabel 6 untuk formulasi yang disimpan selama dua dan tiga bulan belum tentu disebabkan semata-mata oleh hilangnya toksisitas kristal protein Bta.

Stabilitas kristal protein Bta hanya diukur berdasarkan jumlah kristal protein/ml sebagaimana dihitung oleh hemasitometer dan keampuhannya melalui bioasai. Penentuan konsentrasi kristal protein dengan metode-metode yang lebih akurat [misalnya metode Bradford (Bradford, 1976)] tidak dapat dilakukan karena keterbatasan teknis.

insektisida pada kedelai. Di dalam *Seminar Hasil Penelitian Tanaman Pangan*. Volume 1. Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor.

- Lacey, L. A. & A. H. Undeen. 1984. Effect of formulation, concentration, and application time on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* (H-14) against black fly (diptera: simuliidae) larvae under natural conditions. *J. Econ. Entomol.* 77: 412-418.
- Lereclus, D., A. Delecluse & M. M. Lecadet. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes, hlm. 37-70. Di dalam P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey & S. Higgs (Penyunting). *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Liu, Y. B., B. E. Tabashnik, W. J. Moar & R. A. Smith. 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4): 1385-1389.
- Luthy, P., J. L. Cordier & H. M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application, hlm. 35-73. Di dalam E. Kurstak (Penyunting). *Microbial and Viral Pesticides*. Marcel Dekker Inc, New York.
- Maagd, R. A. de, H. van der Klei, P. L. Bakker, W. J. Stiekema & D. Bosch. 1996. Different domains of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8): 2753-2757.
- Magallona, E. D., M. Soehardjan & H. Lumbantobing. 1990. *Pesticides in Estate Crop Protection in Indonesia*. Directorate General of Estate Crops, Jakarta.
- Moar, W. J., M. Pusztai-Carey, H. van Faassen, D. Bosch, R. Frutos, C. Rang, K. Luo & M. J. Adang. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (lepidoptera: noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 61(6): 2086-2092.
- Muller, J., J. Chan, J. Chaufaux, C. Builsson, D. Lereclus. 1996. *Spodoptera littoralis* (lepidoptera: noctuidae) resistance to Cry1C and cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins. *J. Econ. Entomol.* 80: 791-797.
- Mummigatti, S. G. & A. N. Raghunathan. 1990. Influence of media composition on the production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 55: 147-151.
- Navon, A. 1993. Control of lepidopterans pests with *Bacillus thuringiensis*, hlm. 125-170. Di dalam P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey & S. Higgs (Penyunting). *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Noch, I. P., L. Herlinawati & H. Suharto. 1983. Reaksi ulat grayak (*Spodoptera litura* F.) terhadap aplikasi insektisida, hlm. 33-36. Prosiding Simposium Hama Palawija 3-4 Desember 1985. Perhimpunan Entomologi Indonesia Cabang Bandung. Balitan, Sukamandi.
- Powles, R. J. & P. L. Rogers. 1989. *Bacillus* toxin for insect control—a review. *Austr. J. Biotechnol.* 3: 3.
- Prasaja, I. & Harnoto. 1984. Awas... ulat grayak, ada di mana-mana, hlm 19-20. Di dalam *Serangga Sebagai Kawan dan Lawan*. Berita Entomologi No.1 Mei 1984.
- Priest, F. G. 1992. Enzymes, extracellular, hlm. 81-92. Di dalam J. Lederberg (Penyunting). *Encyclopedia of Microbiology*. Volume 2. Academic Press, London.

- Prieto-Samsonov, D. L., R. I. Vazquez-Padron, C. Ayra-Pardo, J. Gonzalez-Cabrera & G. A. de la Riva.** 1997. *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* 19: 202-219.
- Purnomo.** 1986. Daya makan dan pertumbuhan ulat grayak (*Spodoptera litura*) pada berbagai varietas kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill). Tesis. Universitas Lampung, Bandar Lampung.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler & D. H. Dean.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3): 775-806.
- Sihwarni, T.** 1984. Biologi *Spodoptera* (=Prodenia) *litura* Fabricius (noctuidae, lepidoptera) pada kedelai dan kacang tanah. Skripsi. Jurusan Ilmu Hama dan Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, IPB, Bogor.
- Sudarmo, S.** 1995. *Pestisida*. Kanisius, Yogyakarta.
- ✓ **Sukmadi, B., R. S. Hadioetomo & B. Haryanto.** 1997. Pemanfaatan sumber nitrogen lokal untuk produksi bahan aktif bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Majalah BPP Teknologi.* 79: 109-117.
- Thalib, S.** 1992. Uji potensi beberapa insektisida mikrobia, insektisida Deltametrin dan campurannya terhadap ulat grayak *Spodoptera litura* (Fabricius) (lepidoptera: noctuidae). Tesis. Fakultas Pasca Sarjana, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Vandenberg, J. D. & H. Shimanuki.** 1990. Viability of *Bacillus thuringiensis* and its efficacy for larvae of the greater wax moth (lepidoptera: pyralidae) following storage of treated combs. *J. Econ. Entomol.* 83(3): 760-765.
- Wilson, C. L. & M. A. Jackson.** 1997. Commercializing of biologically-based technology for the control of plant pests. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* 19: 156.
- Wright, D. J., M. Iqbal, F. Granero & J. Ferre.** 1997. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(5): 1814-1819.



@Hak cipta milik IPB University

LAMPIRAN

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Lampiran 1. Komposisi pakan ulat dan cara pembuatannya*)

Bahan	Per 100 g pakan
Bahan A :	
Agar-agar kertas	1,20 g
Kacang jogo	10,00 g
Dedak gandum	10,00 g
Khamir	4,00 g
Air suling	60,00 ml
Bahan B :	
Asam L-askorbat	0,40 g
Asam sorbat	0,14 g
Metil-p-hidroksibenzoat	0,28 g
Air suling steril	20,00 ml

*) Resep ini diperoleh dari Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan

Cara pembuatan :

Bahan A dan B pada awalnya disiapkan secara terpisah. Pada penyiapan bahan A, mula-mula sebanyak 1,20 g agar-agar kertas dipanaskan dalam 50 ml air suling sampai larut, lalu dibubuhi bahan-bahan A yang lain dan diaduk hingga rata. Sisa air sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalamnya lalu disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121^oC dan 1 atm selama 15 menit. Sementara itu, bahan-bahan B yang padat dilarutkan dalam 20 ml air suling steril dan dicampurkan dengan bahan A yang sudah dibiarkan sampai dingin, dan diaduk secara aseptik hingga rata.



Lampiran 2. Perubahan pH formulasi selama tiga bulan penyimpanan pada suhu kamar

Formulasi ^a	Nilai pH ^b			
	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃
FC	6,04	5,57	5,51	5,31
FD	6,13	5,66	5,46	5,28
FE	6,58	5,99	5,45	5,12
K(-) FC	6,06	5,67	5,37	5,16
K(-) FD	6,11	5,71	5,35	5,12
K(-) FE	6,49	5,37	4,51	4,09

^a FC = formulasi C; FD = formulasi D; FE = formulasi E; K(-) FC, K(-) FD, dan K(-) FE = formulasi C, D, dan E tanpa bahan aktif Bta

^b Nilai-nilai pH yang tercantum merupakan rata-rata dari tiga ulangan; t₀ = sebelum disimpan; t₁ = disimpan 1 bulan; t₂ = disimpan 2 bulan; t₃ = disimpan 3 bulan

