

**FERMENTASI *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*
SKALA PILOT DENGAN UREA SEBAGAI
SUMBER NITROGEN TAMBAHAN**

REVINA RATNA RUMIYANTIE



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

@Hak cipta milik 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.

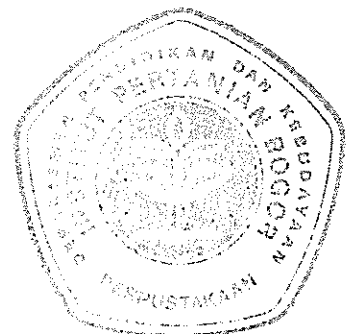
IPB University

**Apa yang ada di sisimu akan lenyap, dan apa yang ada di sisi Allah adalah kekal. Dan
sesungguhnya Kami akan memberi balasan kepada orang-orang yang sabar dengan
pahala yang lebih dari apa yang telah mereka kerjakan.**

(An Nahl: 96)

Karya ini kupersembahkan untuk

kedua orangtua ku tercinta



- 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.

**FERMENTASI *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*
SKALA PILOT DENGAN UREA
SEBAGAI SUMBER NITROGEN TAMBAHAN**

REVINA RATNA RUMIYANTIE

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains
pada
Program Studi Biologi

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Judul : Fermentasi *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* dengan Urea sebagai Sumber Nitrogen Tambahan
Nama : Revina Ratna Rumiyantie
NIM : G04311683

@Hak cipta milik IPB University

Menyetujui

Dr. Ir. Ratna Siri Hadioetomo
Pembimbing I

Drs. R. Bambang Sukmadi, M.Si
Pembimbing II

Mengetahui

Dr. Ir. Muhammad Yusuf
Ketua Program Studi

Tanggal lulus : 11 FEB 1999



RINGKASAN

REVINA RATNA RUMIYANTIE. Fermentasi *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* Skala Pilot dengan Urea sebagai Sumber Nitrogen Tambahan (*The Pilot Fermentation of Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* with Urea as an Additional Nitrogen Source). Dibimbing oleh RATNA SIRI HADIOETOMO dan BAMBANG SUKMADI.

Pada penelitian ini *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (Bta) ditingkatkan skala fermentasinya dari skala laboratorium ke skala pilot dengan menggunakan medium glukosa-mineral-ekstrak khamir dan kombinasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan urea. Untuk mengetahui kombinasi optimum antara $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan urea, maka di awal percobaan diseleksi empat macam kombinasi yaitu 0.1% dan 0.2%, 0.1% dan 0.4%, 0.2% dan 0.2%, serta 0.2% dan 0.4%. Konsentrasi sel per ml dan toksisitas yang diperoleh dari keempat kombinasi medium tersebut ternyata relatif sama. Maka pemilihan medium untuk percobaan fermentasi skala pilot didasarkan pada pertimbangan ekonomi, yaitu yang mengandung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1% dan urea 0.2%.

Sebagai akibat katabolisme glukosa, dihasilkan asam yang menyebabkan turunnya pH kultur pada fermentasi skala laboratorium maupun skala pilot. Nilai pH terendah untuk fermentasi skala laboratorium didapati lebih rendah (5.72) dibandingkan dengan fermentasi skala pilot (5.94). Pada kedua skala fermentasi, nilai pH terendah dicapai pada 12 jam fermentasi, bertepatan dengan akhir fase log yang menunjukkan nilai OD tertinggi (3.42 untuk skala laboratorium dan 3.79 untuk skala pilot). Konsentrasi sel maksimum yang dicapai pada skala pilot (3.22×10^9 sel/ml) lebih tinggi $\pm 33\%$ dibandingkan dengan yang diperoleh pada skala laboratorium (2.15×10^9 sel/ml).

Masa sporulasi kultur Bta pada skala pilot terjadi lebih lama (24 jam) dibandingkan dengan pada skala laboratorium (18 jam), namun waktu tambahan yang diperlukan untuk mencapai lisis sempurna (melibatkan lebih dari 90% sel) pada semua skala fermentasi ternyata sama (18 jam). Pada skala pilot, kultur memerlukan waktu sedikit lebih lama untuk siap dipanen (54 jam fermentasi) dibandingkan dengan pada skala laboratorium (setelah 48 jam fermentasi).

Ketika diujikan toksisitasnya terhadap larva *Spodoptera litura* instar-1, bahan aktif berupa campuran spora-kristal yang dihasilkan pada skala pilot ternyata lebih toksik daripada yang dihasilkan pada skala laboratorium.

Secara keseluruhan, hasil yang diperoleh pada fermentasi skala pilot lebih baik dibandingkan hasil pada fermentasi skala laboratorium.



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Jakarta pada tanggal 7 Agustus 1976 sebagai putri kedua dari tiga bersaudara, pasangan Bapak R. Moch. Setyarso dan Ibu Sri Hariati.

Penulis menyelesaikan pendidikan di Sekolah Dasar Sumbangsih pada tahun 1988 dan menyelesaikan pendidikan di Sekolah Menengah Pertama Negeri 82 Jakarta pada tahun 1991. Pada tahun yang sama penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Atas Negeri 49 Jakarta dan lulus pada tahun 1994.

Tahun 1994 penulis diterima sebagai mahasiswi di Institut Pertanian Bogor melalui jalur Penelusuran Minat dan Kemampuan (PMDK). Setahun kemudian penulis menjadi mahasiswi di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

Selama mengikuti perkuliahan penulis menjadi asisten mata kuliah Mikrobiologi Dasar pada tahun ajaran 1995/1996 dan asisten mata kuliah Biologi Umum pada tahun ajaran 1996/1997.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan Masalah Khusus ini.

Pada kesempatan ini dengan ketulusan hati penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya terutama kepada Ibu Dr. Ir. Ratna Siri Hadioetomo selaku dosen pembimbing I yang telah meluangkan banyak waktu untuk memberikan bimbingan, saran, pengalaman, dan kritik selama penelitian dan penulisan laporan ini. Ucapan terima kasih juga diberikan kepada Bapak Drs. R. Bambang Sukmadi, M.Si, selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, saran, dan pengalaman selama penelitian berlangsung serta memberikan fasilitas dan dana hingga penelitian ini dapat terlaksana. Disamping itu terima kasih juga diberikan kepada Bapak Dr. Ir. Koesnandar, M.Eng. yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melakukan penelitian di PPP-Biotek, Puspiptek, Serpong, Tangerang.

Ungkapan terima kasih juga diberikan kepada Nina dan Maria atas kerjasamanya selama ini. Kepada seluruh staf dan pegawai Laboratorium Agromikrobiologi khususnya Mahmud, Pak Joe, Pak Wahid, dan Hadi yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian ini dan juga seluruh staf dan pegawai Laboratorium Fermentasi khususnya Mas Latif, Mas Dodo, Mas Rudy, Mas Wiwin, Mas Hary, dan Mas Handy yang banyak memberi bantuan selama proses fermentasi, penulis ucapkan terima kasih.

Penulis tak lupa mengucapkan terima kasih yang mendalam kepada keluargaku tercinta bapak, mama, Mbak Priska, dan Dik Mono yang selalu memberikan doa, semangat, dan kasih sayang sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas ini.

Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Bogor, Februari 1999

Revina Ratna Rumiyanie



DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	ix
PENDAHULUAN.....	1
Latar Belakang	1
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> (Bta).....	2
Fermentasi <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
<i>Spodoptera litura</i> sebagai Serangga Sasaran	4
BAHAN DAN METODE	5
Waktu dan Tempat Penelitian	5
Mikroorganisme dan Pemeliharaannya	5
Penyiapan Medium Fermentasi	5
Penyiapan Inokulum.....	5
Fermentasi <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	5
Pengujian Kualitas Bahan Aktif <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	6
KESIMPULAN DAN SARAN	9
DAFTAR PUSTAKA.....	9
LAMPIRAN	13

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. Konsentrasi sel, waktu fermentasi, dan waktu generasi berbagai medium yang menggunakan tepung-tepungan.....	4
2. Hasil seleksi empat medium fermentasi di awal percobaan	6
3. Pengaruh perlakuan bahan aktif bioinsektisida yang di produksi dalam dua skala fermentasi terhadap larva <i>Spodoptera litura</i> instar-1	8

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Pertumbuhan sel dan perubahan pH kultur <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> selama fermentasi dalam skala laboratorium dan skala pilot	7

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Kalkulasi biaya penggunaan bahan - bahan medium fermentasi <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	13
2. Perubahan nilai pH dan kerapatan optis <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> selama berlangsungnya fermentasi pada skala laboratorium dan skala pilot.....	15

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Serangan hama sering kali menjadi faktor penghambat tercapainya kualitas dan kuantitas produksi pertanian yang tinggi. Di pulau Jawa misalnya tercatat 21% tanaman padi sawah terserang oleh hama perusak daun *Spodoptera litura* atau yang dikenal juga sebagai ulat grayak dengan luas area yang diserang rata-rata sebesar 2.288 ha per tahun (BPS, 1994-1995).

Penggunaan pestisida untuk menanggulangi masalah tersebut dinilai kurang bermanfaat karena dapat menimbulkan permasalahan baru, seperti ketahanan serangga terhadap pestisida, resurgensi hama, matinya musuh-musuh alami hama, meningkatnya populasi serangga hama yang sebelumnya secara ekonomis tidak penting, serta timbulnya pencemaran lingkungan. Berdasarkan Instruksi Presiden No. 3 tahun 1986 yang berisi tentang pelanggaran penggunaan 57 jenis insektisida untuk pertanian padi dan penghapusan subsidi pestisida, maka pada akhir dasawarsa ini, telah dikembangkan pengendalian hama terpadu yang meliputi penanaman varietas tanaman tahan hama, teknik bercocok tanam dan pemberantasan hama dengan menggunakan musuh alami (bioinsektisida).

Insektisida mikroba merupakan patogen serangga yang dikembangkan dari virus, bakteri, riketsia, cendawan, dan protozoa (Ignofo & Anderson, 1979). Dalam dunia bioinsektisida, bakteri *Bacillus thuringiensis* atau sering disebut Bt telah dikenal mampu berperan sebagai pengendali utama hama secara alami, bahkan Bt merupakan satu-satunya bakteri yang penggunaan dan penyebarannya secara komersial telah meluas. Bt membentuk kristal protein atau dikenal sebagai δ -endotoksin yang mempunyai daya racun terhadap larva serangga yang tergolong dalam ordo Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Mallophaga, dan Acari, serta invertebrata lain seperti Nematelminthes, Platyhelminthes, dan Sarcocystidophora (Bravo, 1997).

Salah satu faktor yang dibutuhkan untuk mengkomersialkan Bt ialah adanya teknologi fermentasi yang baik. Faktor yang sangat

penting dalam fermentasi Bt ialah pengembangan komposisi medium. Penelitian yang mempelajari pemanfaatan bahan baku lokal sebagai medium fermentasi Bt di Indonesia telah dilakukan. Sukmadi *et al.* (1996) menemukan konsentrasi optimum dekstrosa sebagai sumber karbon sebesar 1%. Kemudian Sukmadi (1996) menyebutkan bahwa molase tebu 1.25% dapat menggantikan dekstrosa 1%. Sukmadi *et al.* (1997) mendapatkan konsentrasi optimum untuk tepung kedelai sebesar 1.5% dalam medium dekstrosa (1%) - tepung jagung (0.5%) - mineral. Permatasari (1998) menyatakan apabila molase tebu tidak tersedia, maka glukosa teknis 1% mampu menggantikan dekstrosa 1%. Dalam penelitiannya juga disebutkan bahwa selain tepung kedelai, tepung ikan 1.05% dapat dijadikan sumber nitrogen alternatif. Selanjutnya, Sutriawati (1998) dan Suryanti (1998) menyatakan bahwa penambahan tepung jagung 0.5% dalam medium molase - tepung ikan dan molase - tepung kedelai dianggap tidak perlu karena memperpanjang waktu sporulasi Bt sehingga fermentasi menjadi kurang efisien.

Bila sudah diperoleh hasil yang memuaskan pada skala laboratorium, percobaan pada skala pilot sangat perlu dilakukan sebelum produksi dilaksanakan pada skala industri. Hal ini sangat penting untuk menghindari masalah-masalah yang mungkin timbul bila fermentasi di produksi pada skala besar (Smith, 1993).

Menurut Sukmadi (komunikasi pribadi) medium fermentasi yang mengandung tepung-tepungan tidak dapat ditingkatkan skala produksinya dengan menggunakan fermentor karena dapat meninggalkan endapan pada alat tersebut sehingga merusak agitator atau pengaduknya. Dengan demikian pada penelitian ini akan digunakan medium-medium yang tidak meninggalkan endapan pada waktu fermentasi.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Arcas *et al.* (1984), diketahui bahwa medium yang mengandung glukosa sebagai sumber karbon, ekstrak khamir dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebagai sumber nitrogen, dan mineral terbukti mendukung pertumbuhan Bt dengan baik. Di pihak lain, Liu & Bajpai (1995) menyatakan bahwa konsentrasi sel dan toksisitas yang dihasilkan akan lebih meningkat apabila ke dalam medium tersebut ditambahkan *corn steep liquor* (CSL) sebagai sumber nitrogen.

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.

Penggunaan ekstrak khamir dalam medium pertumbuhan Bt di Indonesia termasuk mahal, namun demikian beberapa peneliti menyebutkan bahwa dari sekian banyak bahan yang dapat dijadikan sebagai sumber nitrogen, ekstrak khamir adalah yang terbaik. Seperti diketahui, ekstrak khamir mengandung komposisi asam-asam amino yang penting bagi pertumbuhan Bt, di antaranya sisteina, asam aspartat, alanina, histidina, serina, valina, leusina, dan isoleusina. Selain itu terdapat pula sejumlah mineral, di antaranya Mg, Mn, Ca, Fe, Zn, dan Cu yang dapat meningkatkan kemampuan kristal protein yang dihasilkan Bt (Arcas *et al.*, 1984). Kelebihan penggunaan ekstrak khamir dibuktikan oleh perolehan produk akhir berupa konsentrasi spora-kristal yang jauh lebih tinggi daripada yang dihasilkan dengan menggunakan sumber nitrogen lain. Diharapkan bahwa produksi spora-kristal dalam jumlah yang lebih tinggi tersebut dapat menutupi biaya produksinya yang mahal. Jadi sekalipun mahal, ekstrak khamir tetap harus disertakan di dalam medium fermentasi.

Penggunaan glukosa kualitas analitik dalam skala industri di Indonesia juga mahal dan CSL tidak tersedia. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan digunakan glukosa teknis sebagai sumber karbon dan kombinasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan urea sebagai sumber nitrogen tambahan. Pemilihan urea dalam penelitian ini tidak hanya didasarkan pada kemampuan Bt untuk menghidrolisisnya, tetapi juga karena harganya terjangkau dan mudah diperoleh. Penggunaan urea dimaksudkan untuk menggantikan CSL sekaligus mengurangi konsentrasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang digunakan.

Penelitian ini bertujuan untuk: (1) menentukan komposisi medium dengan kombinasi urea dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang paling optimal untuk pertumbuhan Bta, (2) menguji kemampuan medium terpilih untuk mendukung pertumbuhan Bta pada skala pilot, dan (3) pengujian toksisitas δ -endotoksin yang dihasilkan terhadap larva *S. litura* instar-1.

Bacillus thuringiensis subsp. *aizawai* (Bta)

Bacillus thuringiensis subsp. *aizawai* pertama kali ditemukan oleh Aizawa pada tahun 1962 (Dulmage, 1981). Bakteri ini digolongkan ke dalam genus *Bacillus*, famili

Bacillaceae, ordo Eubacteriales, dan kelas Schizomycetes. *Bacillus thuringiensis* pada umumnya bereaksi Gram positif dengan sel vegetatif berbentuk batang yang berukuran panjang 3-5 μm dan lebar 1-1.2 μm serta bersifat motil karena memiliki flagelum peritrikus. Pada medium padat, koloninya tampak berwarna putih dengan permukaan kasar dan tepian tidak teratur (Sneath, 1986). Sebagai organisme mesofilik, kisaran suhu pertumbuhannya ialah 15-45°C dengan suhu optimum 26-30°C. Kisaran pH pertumbuhannya adalah 5.5-8.5, dengan pH optimum 6.5-7.5 (Benhard & Utz, 1993).

Bt subsp. *aizawai* membentuk endospora berbentuk elips di bagian subterminal sel (Sneath, 1986). Seperti halnya pada Bt lain, selama masa sporulasi, Bta membentuk tubuh paraspora berupa kristal protein yang disebut juga δ -endotoksin. Luthy *et al.* (1982) membagi proses sporulasi menjadi tujuh tahap. Sintesis bahan-bahan kristal terjadi pada tahap ke-2 proses sporulasi yang kira-kira bertepatan dengan pembentukan septum. Pembentukan kristal berlangsung hingga tahap ke-4 sporulasi pada saat korteks dibentuk. Setelah proses sporulasi menjadi sempurna, kristal protein dilepaskan ke dalam kultur.

Kristal protein Bta berbentuk bipiramida yang bersifat insektisidal terhadap larva serangga yang tergolong ordo Lepidoptera (Lereclus *et al.*, 1993). Dalam satu kristal bipiramida tersebut terkemas semua protein Cry Bta.

Menurut analisis serologis berdasarkan antigen flagelumnya, sejauh ini dikenal 55 serotipe dan 58 serovar (Schnepf *et al.*, 1998). Bta termasuk ke dalam serotipe 7 (H-7) (Dulmage, 1981).

Sifat insektisida Bta berhubungan dengan gen penyandi kristal protein yang disebut gen *cry*. Menurut klasifikasi terbaru, dikenali ada 22 gen *cry* dan 2 gen *cyt*. Gen *cry* yang dimiliki Bta meliputi *cryIA(a)*, *IA(b)*, *IC(a)*, *ID(a)* (Crickmore *et al.*, 1998). Protein Cry1C(a) menyandikan protein yang toksik terhadap *Spodoptera litura*, sedangkan protein Cry1 lain yang dimiliki Bta yaitu Cry1A(a), Cry1A(b), dan Cry1D(a) kurang toksik terhadap *S. litura*, tetapi dapat memberikan pengaruh sinergis pada protein Cry1C(a) sehingga dapat meningkatkan keampuhannya (Muller *et al.*, 1996).

Fermentasi *Bacillus thuringiensis*

Selama pertumbuhan vegetatif, Bt melakukan katabolisme glukosa melalui lintasan *Embden Meyerhof Parnas* (EMP) (93-100%) dan lintasan pentosa fosfat (0-7%) (Nickerson *et al.*, 1974). Menurut Benoit *et al.* (1990) yang mengamati pertumbuhan dan sporulasi Bt HD-1 dalam medium glukosa-tripton - mineral, peruraian glukosa oleh Bt menghasilkan asam laktat, asam piruvat, asam asetat, dan asetoin. Akumulasi asam-asam tersebut menyebabkan penurunan nilai pH kultur selama pertumbuhan vegetatif.

Asam piruvat yang dihasilkan kemudian dioksidasi dalam siklus asam trikarboksilat (TCA). Elektron yang dibebaskan dari oksidasi substrat akan dialirkan ke rantai sitokrom untuk memproduksi ATP. Oksidasi substrat secara sempurna akan menghasilkan CO₂ dan air. Intermediat siklus TCA banyak dipakai untuk biosintesis asam amino. Menurut Luthy *et al.* (1982), asam glutamat dan alanina berperan penting dalam metabolisme utama nitrogen pada Bt.

Ketika sumber karbohidrat di dalam medium habis terpakai, bakteri beralih menggunakan sumber nitrogen. Bt diketahui mampu menghidrolisis urea (Sneath, 1986). Selain itu, asam asetat yang terakumulasi akibat metabolisme karbohidrat dipakai lebih lanjut untuk memproduksi poli-β-hidroksibutirat (PHB) yang selanjutnya akan digunakan sebagai sumber energi selama proses sporulasi (Benoit *et al.*, 1990).

Bt bersifat anaerobik fakultatif, merupakan mikroba kemoorganotrof, dapat menghidrolisis pati, kasein, dan sitrat, mampu menguraikan protein karena memiliki enzim protease dan peptidase, serta menghasilkan asam dari peruraian glukosa, namun tidak membentuk asam dari peruraian arabinosa, xilosa dan manitol (Sneath, 1986; Priest, 1992).

Ada dua tipe fermentasi yang biasa digunakan untuk memproduksi bioinsektisida Bt, yaitu fermentasi semi padat (*semi-solid*) dan fermentasi terbenam (*submerged*). Fermentasi terbenam lebih disukai karena selain mudah menjaga kesterilan kulturnya, juga proses pemanenan dan pengaturan parameter selama proses produksinya dirasakan lebih sederhana (Benhard & Utz, 1993).

Proses fermentasi cair dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu fermentasi sistem tertutup (*batch process*), fermentasi kontinyu, dan fermentasi sistem tertutup dengan penambahan substrat pada selang waktu tertentu (*fed batch*) (Crueger & Crueger, 1984). Produksi bioinsektisida Bt pada umumnya dilakukan melalui fermentasi sistem *batch* karena hasil akhir yang diinginkan adalah spora dan kristal protein yang dibentuk selama proses sporulasi (Benhard & Utz, 1993).

Pengembangan proses fermentasi pada umumnya dilakukan pada tiga tahapan skala, yaitu skala laboratorium, skala pilot, dan skala industri. Peningkatan dari skala laboratorium ke skala industri pada umumnya menimbulkan masalah besar yang berkaitan dengan pembuangan panas, ketersediaan oksigen, tidak memadainya komponen nutrisi dalam medium, cara mempertahankan kesterilan, dan masalah pengadukan. Dengan demikian perlu adanya tahap skala pilot untuk mengoptimalkan proses-proses tersebut dan mencegah segala akibat negatif yang mungkin timbul sebelum proses dibawa ke skala industri. Keberhasilan dalam peningkatan skala dapat dilakukan melalui pendekatan yang mengacu pada hasil-hasil yang diperoleh pada skala laboratorium (Smith, 1993).

Salah satu faktor yang berperan dalam komersialisasi Bt ialah metode produksi bahan aktif (Wilson & Jackson, 1997). Dengan metode produksi yang baik akan dihasilkan kuantitas dan kualitas δ-endotoksin sesuai dengan yang diharapkan. Jumlah δ-endotoksin yang dihasilkan per sel yang sedang bersporulasi akan tergantung pada kepadatan populasi sel dalam kultur fermentasi (Benhard & Utz, 1993). Konsentrasi yang ditetapkan untuk produksi skala besar berkisar antara 5 x10⁹ spora/ml hingga 1x10¹⁰ spora/ml (Luthy *et al.*, 1982).

Penelitian untuk mendapatkan komposisi medium fermentasi merupakan hal yang sangat penting karena kemampuan δ-endotoksin dipengaruhi oleh kandungan nutrisi dalam medium (Mummigatti & Raghunathan, 1990). Dalam usaha mencari komposisi medium fermentasi yang optimum bagi fermentasi Bta, Sukmadi (1996) menemukan bahwa konsentrasi optimum dekstrosa sebesar 1% dapat digantikan oleh molase tebu 1.25% dan sebagai sumber nitrogen dapat digunakan tepung kedelai (1.5%)

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.

atau tepung ikan (1.05%). Penelitian lanjutan yang dilakukan oleh sejumlah peneliti telah menghasilkan sejumlah informasi yang sangat berguna (lihat Tabel 1). Ternyata glukosa teknis 1% dapat menggantikan dekstrosa 1% dengan harga 28 kali lebih murah. Selain itu, penambahan tepung jagung 0.5% ke dalam medium yang berbahan dasar molase dan tepung-tepungan dianggap tidak perlu karena memperpanjang waktu sporulasi Bt sehingga fermentasi menjadi kurang efisien. Konsentrasi

dapat menghabiskan satu tanaman kedelai berumur enam minggu (Prasaja & Hartono, 1984).

Ulat grayak tinggal bergerombol di bagian bawah daun sampai instar ketiga. Mulai instar keempat, ulat berpencar ke daun-daun yang lain. Semakin tinggi tingkat instar suatu larva akan semakin banyak makanan yang dibutuhkan, mengingat pada stadium pupa dibutuhkan cadangan makanan yang banyak untuk metabolisme selama berkepompong. Pada siang

Tabel 1. Konsentrasi sel, waktu fermentasi, dan waktu generasi berbagai medium yang menggunakan tepung-tepungan

Komposisi medium fermentasi *	Konsentrasi sel/ml	Waktu fermentasi	Waktu generasi	Pustaka
Gt 1% - Tk 1.5% - m	5.25×10^8	72 jam	54 menit	Permatasari (1998)
Gt 1% - Ti 1.05% - m	5.10×10^8	54 jam	54 menit	Permatasari (1998)
M 1.25% - Tk 1.5%	5.05×10^8	66 jam	46 menit	Suryanti (1998)
M 1.25% - Ti 1.05%	5.50×10^8	72 jam	54 menit	Sutriawati (1998)

*Gt = glukosa teknis, Tk = tepung kedelai, Ti = tepung ikan, m = mineral ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.003%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002%, $Zn SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002%, dan $CaCO_3$ 0.1%), M = molase tebu

sel yang dicapai berkisar antara 5.05×10^8 sel/ml hingga 5.50×10^8 sel/ml dengan waktu generasi 46 - 54 menit dan lama fermentasi 54 - 72 jam.

Spodoptera litura sebagai Serangga Sasaran

Spodoptera litura tergolong dalam famili Noctuidae, ordo Lepidoptera, dan kelas Insecta. Dalam siklus hidupnya ulat ini mengalami metamorfosis melalui empat stadium yaitu telur, larva, pupa, dan imago (Kalshoven, 1981).

Larva *S. litura* dikenal juga sebagai ulat grayak. Ulat tersebut dapat merusak berbagai jenis tanaman pangan, seperti padi, jagung, kacang-kacangan dan juga tanaman perkebunan (Kalshoven, 1981). Keganasan ulat ini semakin meningkat apabila populasi musuhnya berkurang. Populasi yang tinggi pada ulat grayak dicapai antara bulan Juni sampai dengan September. Seekor larva mampu menghabiskan daun seluas 192 cm² atau seluas tanaman kedelai yang berumur dua minggu dan dapat menghancurkan tanaman hanya dalam waktu satu malam. Lebih lanjut diperkirakan bahwa serangan 10 ekor larva

hari ulat bersembunyi dalam tanah, sedangkan pada malam hari mereka melakukan penyerangan (Prasaja & Hartono, 1984).

Pengendalian serangga ini dengan menggunakan insektisida ternyata kurang berhasil karena diduga serangga tersebut telah tahan terhadap insektisida (Laba & Sukarna, 1984). Bioinsektisida berbahan aktif Bt dapat mengendalikan serangga *S. litura* asalkan galur Bt yang bersangkutan memiliki gen *cry* yang dapat menghasilkan kristal protein yang kompatibel dengan reseptor yang terletak pada membran sel epitelium usus tengah serangga tersebut. Diketahui bahwa larva *S. litura* memiliki reseptor untuk protein Cry1C. Gen *cry* lain yang menghasilkan kristal protein yang spesifik terhadap *Spodoptera* ialah gen *cry1E* yang ditemukan pada Bt var. *kenyae* 4F1 (Visser *et al.*, 1990).

Protein Cry 1 merupakan protoksin yang berupa polipeptida dengan berat molekul 130-140 kDa. Protoksin yang termakan larva serangga akan dihidrolisis oleh enzim protease pada lingkungan alkalin usus tengah serangga sehingga terlarut dan menghasilkan toksin

berukuran 60-65 kDa. Toksin ini akan terikat pada suatu reseptor spesifik pada membran sel epitelium usus serangga. Ikatan antar toksin dengan reseptor akan menginduksi pembentukan lubang pada membran. Akibatnya sel membengkak dan lisis. Kejadian ini menyebabkan larva berhenti makan dan akhirnya mati (Visser *et al.*, 1993).

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan April hingga Oktober 1998 bertempat di laboratorium Agromikrobiologi, Pusat Pengkajian dan Penerapan Bioteknologi Industri dan Pertanian (PPP-Biotek) BPPT, Kawasan PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang.

Mikroorganisme dan Pemeliharaannya

Isolat yang digunakan adalah Bta koleksi laboratorium Agro-Mikrobiologi, PPP-Biotek, Puspipstek, Serpong, Tangerang. Bakteri ini diisolasi dari Florbac fc (Novo, Nordisk, Denmark) yang ditumbuhkan dan dipelihara dalam medium *nutrient agar* (NA) miring pada pH 7.2, suhu 30°C selama 48 jam, kemudian disimpan pada suhu 4°C sampai waktunya digunakan.

Penyiapan Medium Fermentasi

Medium fermentasi yang dipakai dalam penelitian ini pada dasarnya mengacu pada komposisi medium Arcas *et al.* (1984) disertai modifikasi dalam hal sumber karbon dan sumber nitrogen yang digunakan. Medium tersebut terdiri dari glukosa teknis 1%, MgSO₄·7H₂O 0.4%, MnSO₄·7H₂O 0.003%; CaCl₂·2H₂O 0.0041%, K₂HPO₄ 0.3%, dan KH₂PO₄ 0.3% yang berfungsi sebagai mineral. Sebagai sumber nitrogen digunakan ekstrak khamir 0.4% serta kombinasi antara (NH₄)₂SO₄ dan urea. Untuk mengetahui kombinasi optimum antara (NH₄)₂SO₄ dan urea, maka di awal percobaan dicobakan empat macam kombinasi yaitu: 0.1% dan 0.2%, 0.1% dan 0.4%, 0.2% dan 0.2%, serta 0.2% dan 0.4%.

Bahan-bahan medium selain glukosa teknis dan MgSO₄·7H₂O dicampur dengan air

suling di atas pemanas berpengaduk hingga mendidih. Medium disesuaikan pHnya menjadi 7.0 - 7.2. Semua bahan medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm selama 15 menit. Setelah dingin semua bahan dicampurkan secara aseptik.

Penyiapan Inokulum

Bta hasil isolasi dari Florbac fc yang telah tersedia dalam medium NA miring diinokulasikan sebanyak satu lup kedalam 100 ml NB steril dalam labu erlenmeyer 500 ml sebagai labu pembibitan pertama, kemudian diberi renjatan panas pada suhu 80°C selama 7 menit dan diinkubasi dalam *rotary shaking incubator* (Infors HT CH-4103, Bottmingen) pada 200 rpm, suhu 30°C, selama 12 jam. Sebanyak 5% inokulum dari kultur pembibitan labu pertama dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 500 ml sebagai labu pembibitan kedua yang berisi 100 ml NB steril dan diinkubasi pada kondisi yang sama selama 12 jam.

Fermentasi *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*

Dalam penelitian ini akan dilakukan fermentasi skala pilot tetapi fermentasi skala laboratorium juga diikutsertakan sebagai pembandingan.

Fermentasi skala laboratorium dilakukan dengan menggunakan labu erlenmeyer 500 ml dengan volume kerja 125 ml. Setiap labu diinokulasi dengan 2% inokulum dari labu pembibitan kedua kemudian diinkubasi dalam *rotary shaking incubator* dengan kecepatan 250 rpm dan suhu 30°C.

Fermentasi skala pilot dilakukan dalam fermentor 20 liter (Chemap-Fermentor, CH-8604 Volketsuid, Switzerland) dengan volume kerja 10 liter. Kondisi fermentor disesuaikan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Flores *et al.* (1996) dengan menggunakan suhu 30°C dan aerasi sebesar 10 liter/menit yang setara dengan 1 vvm. Akan tetapi karena keterbatasan teknis, agitasi yang seharusnya diberikan pada 700 rpm hanya dapat dilaksanakan pada 500 rpm. Selama berlangsungnya fermentasi dilakukan pengamatan pada interval waktu tiga jam hingga kultur mulai bersporulasi dan dilanjutkan dengan pengamatan pada interval waktu enam jam

hingga kultur siap dipanen. Pengamatan meliputi penentuan konsentrasi sel bakteri dengan metode turbidimetri pada panjang gelombang 620 nm, pengukuran pH dengan menggunakan pH meter, dan pengamatan spora-kristal secara mikroskopik.

Proses pemanenan baik pada skala laboratorium maupun pada skala pilot dilakukan dengan menggunakan metode Sukmadi *et al.*(1996) yang dimodifikasi. Cairan fermentasi dinetralkan pHnya menjadi 7.0 - 7.2 dengan HCl 1N steril kemudian disentrifugasi pada 10°C (Beckman JS-20, USA) pada 6 400 rpm selama 34 menit. Endapan hasil sentrifugasi yang terdiri dari campuran spora-kristal dicuci dua kali dengan air suling steril, lalu disuspensikan kembali ke dalam cairan formulasi C (FC). FC telah disiapkan oleh BPPT dalam usaha mencari cairan formulasi yang mampu mendukung viabilitas spora dan stabilitas kristal protein Bta (komposisi FC masih merupakan informasi yang tertutup). Volume akhir suspensi ini diatur menjadi 10% volume cairan fermentasi ketika dipanen, kemudian disimpan dalam freezer sampai diperlukan untuk percobaan berikutnya.

Pengujian Kualitas Bahan Aktif *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*

Suspensi bahan aktif bioinsektisida Bta hasil panen diuji kualitasnya. Pengujian meliputi penentuan jumlah spora hidup (*Viable spore count*) VSC dengan metode hitungan cawan setelah sampel diberi renjatan panas pada suhu 80°C selama 7 menit dan pengujian toksisitas campuran spora-kristal yang dihasilkan terhadap larva *S. litura* instar-1. Larva diberi umpan berupa pakan buatan. Pada

setiap perlakuan (suspensi bahan aktif, Florbac fc, air suling steril, dan FC), volume yang dihantarkan adalah 40 µl. Suspensi bahan aktif disiapkan sedemikian rupa sehingga bila 40 µl suspensi tersebut diteteskan pada 0.5 g pakan, akan mengandung konsentrasi bahan aktif yang setara dengan yang terkandung dalam 1mg serbuk hasil liofilisasi (Sukmadi *et al.*, 1997) per g pakan (1 mg serbuk mengandung 10⁷ spora hidup). Sebagai pembanding digunakan bio-insektisida komersial Florbac fc dengan konsentrasi yang telah disesuaikan seperti tersebut di atas (berdasarkan hitungan cawan, Florbac fc mengandung 8.55x10⁸spora/ml). Dalam percobaan ini disertakan dua macam kontrol, yaitu: (1) pakan yang ditetesi air suling steril dan (2) pakan yang ditetesi FC. Jumlah larva yang digunakan dalam pengujian ini adalah 20 ekor untuk setiap perlakuan dengan pengulangan sebanyak tiga kali. Pengamatan terhadap kondisi fisik dan mortalitas larva dilakukan setiap hari sampai hari keempat.

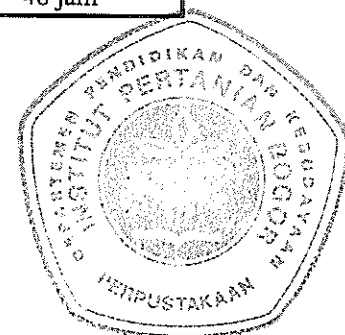
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada tahap seleksi terhadap empat medium fermentasi yang mengandung kombinasi (NH₄)₂SO₄ dan urea yang berbeda-beda, ternyata diperoleh konsentrasi sel per ml dan toksisitas yang relatif sama (Tabel 2). Maka pemilihan medium untuk percobaan berikutnya, yaitu fermentasi skala pilot didasarkan pada pertimbangan ekonomi, yaitu yang mengandung (NH₄)₂SO₄ 0.1% dan 0.2% urea.

Pengamatan terhadap pertumbuhan sel Bta dan perubahan pH selama proses fermentasi terlihat pada Gambar 1. Fermentasi pada kedua

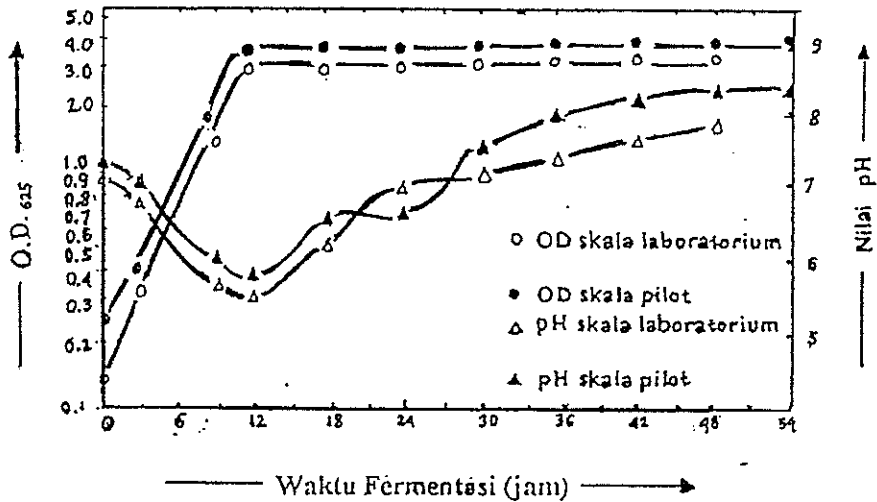
Tabel 2. Hasil seleksi terhadap empat medium fermentasi di awal percobaan

Medium fermentasi	Konsentrasi sel/ml	Toksitas	Waktu fermentasi
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1% Urea 0.2%	2.53 x 10 ⁹	85.04 %	48 jam
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1% Urea 0.4%	2.24 x 10 ⁹	83.57 %	48 jam
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2% Urea 0.2%	2.46 x 10 ⁹	85.04 %	48 jam
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2% Urea 0.4%	2.15 x 10 ⁹	85.04 %	48 jam



skala fermentasi yang dicobakan tidak memperlihatkan adanya fase lag. Hal ini disebabkan karena medium fermentasi yang digunakan paling tidak sama baiknya dengan NB yang digunakan sebagai medium untuk pembibitan. Sel Bta segera membelah dengan cepat mengikuti kurva logaritmik sampai dengan jam ke-12.

dalam medim glukosa - tripton - mineral, mengatakan bahwa asam-asam yang terakumulasi dari proses tersebut di atas meliputi asam laktat, asam piruvat, asam asetat, dan asetoin. Nilai pH terendah (5.85 untuk skala laboratorium dan 5.94 untuk skala pilot) dicapai pada waktu yang bersamaan dengan diperolehnya populasi tertinggi, yaitu 2.15×10^9



Gambar.1 Pertumbuhan sel dan perubahan pH kultur *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* selama fermentasi dalam skala laboratorium dan skala pilot.

Nilai OD sesungguhnya dalam percobaan ini lebih tinggi daripada yang diperoleh, karena pengenceran terhadap cairan kultur fermentasi untuk pemeriksaan OD baru dilakukan setelah nilai OD mencapai 1.0. Hal ini mempengaruhi kemiringan kurva pertumbuhan, sehingga waktu generasi yang diperoleh (2.8 - 3.2 jam) tidak dapat dipercaya karena menjadi lebih lama dari waktu yang sebenarnya. Pada penelitian sebelumnya, ketika menumbuhkan sel yang sama di dalam medium glukosa-mineral yang dibubuhi tepung ikan maupun tepung kedelai diperoleh waktu generasi 54 menit (Permatasari, 1998).

Pengamatan terhadap nilai pH selama berlangsungnya fase logaritma memperlihatkan adanya penurunan. Penurunan pH disebabkan karena proses katabolisme glukosa oleh Bta yang menyebabkan terakumulasinya asam di dalam medium. Menurut Benoit *et al.* (1990) yang mempelajari fermentasi Bt-HD-1

sel/ml untuk skala laboratorium dan $3,22 \times 10^9$ sel/ml untuk skala pilot. Hasil yang lebih tinggi pada skala pilot mungkin disebabkan karena kondisi aerasi yang lebih baik. Aerasi pada skala pilot tidak hanya diberikan dalam bentuk pengadukan tetapi juga dioptimumkan dengan penambahan oksigen terlarut ke dalam medium. Walaupun agitasi yang diberikan pada skala pilot hanya 500 rpm (tidak mencapai 700 rpm seperti yang dilakukan Flores *et al.*, 1997), namun dengan penambahan oksigen terlarut ke dalam medium menyebabkan kondisi aerasi lebih baik dibandingkan pada skala laboratorium. Menurut Flores *et al.* (1997) banyaknya transfer oksigen ke dalam medium mendukung pembentukan spora yang lebih banyak. Konsentrasi sel pada kedua skala fermentasi ini lebih tinggi daripada yang diperoleh pada penelitian sebelumnya (5.25×10^8 sel/ml) (Permatasari, 1998). Dalam hal sumber nitrogennya, medium dalam penelitian ini lebih mahal 130 kali per liter medium bila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya

yang menggunakan sumber nitrogen berupa tepung ikan dan tepung kedelai (perhitungan dapat dilihat pada Lamp. 1). Namun, karena sumber nitrogen yang berupa tepung-tepungan tidak dapat ditingkatkan skala produksinya, maka sumber nitrogen dalam penelitian ini dapat menjadi alternatif pilihan mengingat konsentrasi sel yang dihasilkan $\pm 84\%$ lebih tinggi dibandingkan penelitian sebelumnya.

Kultur pada kedua skala fermentasi mulai memasuki fase statis setelah 12 jam fermentasi. Bersamaan itu pula sel mengalami sporulasi. Proses ini ditandai dengan terbentuknya daerah yang memantulkan cahaya (refraktil) di bagian subterminal sel Bta yang teramati di bawah mikroskop. Keterbatasan sumber karbon mungkin menjadi pemicu terjadinya proses sporulasi. Selain karena keterbatasan nutrisi, proses sporulasi juga dapat dipengaruhi oleh aerasi, suhu dan pH yang ekstrim (Vandekar & Dulmage, 1982).

Selama fase statis, nilai pH kultur kembali meningkat. Peningkatan nilai pH terjadi karena asam asetat yang terakumulasi dalam medium dimanfaatkan kembali oleh sel untuk memproduksi poli- β -hidroksibutirat (PHB) yang selanjutnya dapat digunakan sebagai sumber energi selama proses sporulasi (Benoit

Setelah fermentasi berjalan selama 30 jam, endospora pada sebagian besar populasi dalam kultur skala laboratorium tampak sudah berada pada fase terang. Kejadian yang sama pada skala yang ditingkatkan baru teramati setelah 36 jam fermentasi. Dengan demikian proses sporulasi untuk populasi dalam kultur membutuhkan waktu 18 jam (skala laboratorium) dan 24 jam (skala pilot). Peristiwa ini disusul dengan lisis sempurna (lebih dari 90% sel dalam populasi mengalami lisis) yang dicapai setelah 48 jam fermentasi untuk skala laboratorium atau setelah 54 jam untuk skala pilot. Hal ini berarti, setelah sebagian besar populasi mengandung spora yang tampak terang sebagaimana yang teramati di bawah mikroskop, diperlukan tambahan waktu 18 jam untuk kedua skala fermentasi sebelum sebagian besar kultur siap dipanen. Tidak jelas mengapa proses sporulasi dan terjadinya lisis sel 90% pada skala pilot berlangsung lebih lama.

Sebagaimana diperoleh dari hasil hitungan cawan terhadap hasil pemanenan bahan aktif di akhir fermentasi, konsentrasi akhir spora hidup (VSC) yang diperoleh pada skala pilot (5.65×10^9 spora/ml) lebih besar dibandingkan dengan yang diperoleh pada skala laboratorium (4.69×10^9 spora/ml). Mengingat bahwa dalam setiap sel Bta hanya terdapat satu kristal, maka

Tabel 3. Pengaruh perlakuan bahan aktif bioinsektisida yang diproduksi dalam dua skala fermentasi terhadap larva *Spodoptera litura* instar-1

Hari ke	Mortalitas larva <i>S. Litura</i> yang diakibatkan oleh				
	Campuran spora-kristal yang diperoleh dari fermentasi *		Florbac	Kontrol	
	Skala laboratorium	Skala Pilot		Formulasi C (FC)	Air suling steril
1	8.89	11.76	16.67	0	0
2	85 (78.34)	94.17 (87.51)	96.67	6.66	0
3	88.89 (82.23)	100 (93.34)	100	6.66	0
4	96.67 (88.34)	100 (91.67)	100	8.33	0

* Nilai mortalitas yang dicantumkan dalam kurung sudah dikoreksi oleh nilai mortalitas yang diakibatkan oleh Formulasi C (FC)

et al., 1990). Selain itu kenaikan pH juga disebabkan karena terakumulasinya bahan-bahan alkali sebagai hasil metabolisme ekstrak khamir dan urea yang masih tersisa. Bt memang diketahui memiliki enzim urease (Sneath, 1986).

nilai-nilai VSC tersebut menunjukkan banyaknya kristal yang diperoleh. Bila memperhitungkan faktor pemekatan suspensi spora-kristal, maka kedua nilai ini jauh lebih rendah daripada yang diharapkan (2.15×10^{10} spora/ml untuk skala laboratorium dan 3.22×10^{10} spora/ml untuk skala

laboratorium dan 3.22×10^{10} spora/ml untuk skala pilot). Diperkirakan spora hilang di dalam proses pemanenan. Hal ini menyulitkan perbandingan nilai-nilai VSC yang diperoleh melalui kedua skala fermentasi.

Hasil pengujian toksisitas dapat dilihat pada Tabel 3. Mortalitas ulat *S. litura* instar-1 menurut bioasai ternyata tidak hanya dipengaruhi oleh campuran spora-kristal Bt saja, tetapi juga oleh FC. Pakan yang hanya dibubuhi FC menyebabkan mortalitas 6.66% pada hari kedua dan ketiga dan meningkat hingga 8.33% pada hari keempat. Tidak tertutup kemungkinan bahwa mortalitas yang disebabkan oleh campuran spora-kristal yang diperoleh dari skala pilot dapat mencapai 100%, tetapi karena FC yang dipergunakan bersifat toksik, hal ini sulit dilihat. Berbeda dengan mortalitas spora-kristal dari skala laboratorium tidak pernah mencapai 100%. Setelah dikoreksi oleh mortalitas yang disebabkan oleh FC, campuran spora kristal hanya mencapai mortalitas 88.34% pada fermentasi skala laboratorium dan 91.67% untuk fermentasi skala pilot. Mengingat konsentrasi spora-kristal yang ditetaskan sudah disetarakan dalam semua kasus, maka tidak diketahui dengan jelas mengapa suspensi spora-kristal yang dihasilkan melalui fermentasi skala pilot menyebabkan mortalitas yang lebih tinggi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Medium dengan kombinasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1% dan urea 0.2% yang digunakan dalam penelitian ini ternyata dapat mendukung fermentasi Bt dengan baik. Dibandingkan dengan fermentasi laboratorium, fermentasi skala pilot menghasilkan perolehan sel yang lebih banyak ($\pm 33\%$ lebih tinggi) disertai peningkatan pH yang lebih tinggi pula di akhir fermentasi, dan campuran spora-kristal yang lebih ampuh terhadap larva *S. litura* instar-1

Untuk meringankan biaya produksi perlu disurvei berbagai sumber nitrogen lokal terutama limbah yang dapat dijadikan komponen medium fermentasi Bt di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Arcas, J., O. Yantorno, E. Arraras & R. Ertola. 1984. A new medium for growth and delta endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnol. Lett.* 6(8): 495-500.
- Benoit, L. G., G. R. Wilson & C. L. Baugh. 1990. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Let. Appl. Microbiol.* 10: 15-16.
- 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 Enviromental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Biro Pusat Statistik. 1994. *Survei Pertanian. Luas dan Intensitas Serangan Jasad Pengganggu Padi dan Palawija di Jawa*. Biro Pusat Statistik, Jakarta.
- _____. 1995. *Survei Pertanian Luas dan Intensitas Serangan Organisme Pengganggu Tanaman dan Bencana Alam Padi, Palawija, dan Sayuran di Jawa*. Biro Pusat Statistik, Jakarta.
- Bravo, A. 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksin family protein and their functional domains.. *Bacteriol.* 179(9): 2793-2801.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 62(3): 807-813.
- Crueger, W. & A. Crueger. 1984. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. Science Tech, Inc. USA.

- Dulmage, H. T.** 1981. Insecticidal activity of isolates *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control, hlm. 193-222. Di dalam H. D. Burges (Penyunting). *Microbial Control of Pests and Plant* Academic Press, London.
- Flores, E. R. F. Perez & M. De La Torre.** 1997. Scale-up of *Bacillus thuringiensis* based on oxygen transfer. *J. Ferment. and Bioeng.* 83(6):561-564.
- Ignoffo, C. M. & R. F. Anderson.** 1979. Bioinsecticides, hlm. 1-27. Di dalam H. J. Peppler & D. Perlman (Penyunting). *Microbiol. Tecnology.* Academic Press, New York.
- Kalshoven, L. G. E.** 1981. *The Pest of Crops in Indonesia.* Terjemahan P. A. van der Laan PT. Ichtar Baru van Hoeve, Jakarta.
- Laba, I. W. & D. Soekarna.** 1984. Mortalitas larva ulat grayak (*Spodoptera litura* F.) pada berbagai instar dan perlakuan insektisida pada kedelai. Di dalam *Seminar Hasil Penelitian Tanaman Pangan.* Volume- 1. Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor.
- Lereclus, D., A. Delecluse & M. M. Lecadet.** 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes, hlm 37-60. Di dalam P. F. Ent Wisle, J. S. Cory, M. J. Bailey & S. Higgs (Penyunting). *Bacillus thuringiensis, An Enviromental Biopesticide: Theory and Practice.* John Wiley & Sons, Chichester.
- Luthy, P., J. L. Cordier & H. M. Fischer.** 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic consideration and application, hlm. 35-73. Di dalam E-Kurstak (Penyunting). *Microbial and Viral Pesticides.* Marcel Dekker, Inc., New York.
- Liu W. H. & P. K. Bajpai.** 1995. A modified growth medium for *Bacillus thuringiensis.* *Biotechnol Prog.* 11: 589-591.
- Muller-Cohn, J., J. Chaufaux, C. Buisson, N. Gilois, V. Sanchis & D. Lereclus.** 1996. *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to Cry 1C and cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal protein. *J. Econ. Entomol.* 89(4): 791-797.
- Mummigatti, S. G. & A. A. Raghunathan.** 1990. Influence of media composition on the production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis var thuringiensis.* *J. Inverteb. Pathol.* 55: 147-151.
- Nickerson, K. W., G. St. Julian & L. A. Bulla, Jr.** 1974. Physiology of spore forming bacteria associated with insect: radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis.* *Appl. Microbiol.* 28: 124-132.
- Permatasari, A. U.** 1998. Kinerja *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* dalam medium glukosa-mineral dengan dua macam sumber nitrogen yang berbeda. Skripsi. Jurusan Biologi FMIPA IPB, Bogor.
- Prasaja, I. & Hartono.** 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 Press. Inc., San Deigo.
- 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.

- Smith, J. E. 1993. *Prinsip Bioteknologi*. Ed ke-2. Terjemahan U. F. Sumo, B. Sumantri, dan A. Subono. Gramedia, Jakarta.
- Sneath, P. H. A. 1986. Endopore-forming gram-positive rods and cocci, hlm. 1104-1139. Di dalam P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Penyunting). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2 Baltimore, USA.
- Sukmadi, B. 1996. Pemanfaatan sumber karbon dan nitrogen lokal sebagai substrat untuk produksi bahan aktif bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. Tesis. Program Pasca Sarjana. IPB, Bogor.
- Sukmadi, B., B. Haryanto & R. S. Hadioetomo. 1996. Pengaruh konsentrasi dekstrosa pada produksi bahan aktif bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Majalah BPP-Teknologi*. 72: 109-177.
- 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 – 177.
- Suryanti, H. 1998. Pengaruh tepung jagung dalam medium molase-tepung kedelai terhadap kinerja *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. Skripsi. Jurusan Biologi. FMIPA IPB, Bogor.
- Sutriawati, H. 1998. Pengaruh penambahan tepung jagung dalam medium molase dalam tepung ikan terhadap pertumbuhan dan toksisitas *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. Skripsi. Jurusan Biologi. FMIPA IPB, Bogor.
- Vandekar, M. & H. T. Dulmage. 1982. *Guidelines for Production Bacillus thuringiensis H-14*. Procceding of a consultation held in Geneva, Switzerland.
- Visser, B., E. Munsterman, A. Stoker, & W. G. Dirkse. 1990. A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *spodoptera exigua*-specific crystal protein.. *J. Bacteriol.* 172(12): 6783-6788.
- Visser, B., D. Bosch & G. Honee. 1993. Domain function studies of *Bacillus thuringiensis* crystal protein: a genetic approach, hlm. 71-85. Di dalam P. F. Entwistle, J. S. Corey, M. J. Bailey & S. Higgs (Penyunting). *Bacillus thuringiensis, An Enviromental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Wilson, C. L. & M. A. Jackson. 1997. Commercializing of biologically-based technology for the control of plant pest. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* 19: 156.





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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Lampiran 1. Kalkulasi biaya penggunaan bahan-bahan medium fermentasi *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai**

A. Kalkulasi Harga

Harga tepung kedelai	= Rp	3 500,00/700g	atau	Rp	5,00/g
Harga tepung ikan	= Rp	7 000,00/kg	atau	Rp	7,00/g
Harga ekstrak khamir	= Rp	1 126 000,00/500g	atau	Rp	2 300,00/g
Harga (NH ₄) ₂ SO ₄	= Rp	380 000,00/kg	atau	Rp	380,00/g
Harga urea	= Rp	1 500/kg	atau	Rp	1,50/g

B. Kalkulasi Biaya

1. Medium dengan tepung kedelai 1.5%					
Tepung kedelai dalam 1 liter medium	=	15 g	=	Rp	75,00
2. Medium dengan tepung ikan 1.05%					
Tepung ikan dalam 1 liter medium	=	10.5g	=	Rp	74,00
3. Medium dengan ekstrak khamir 0.4% + (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1% + urea 0.2%					
Untuk 1 liter medium = ekstrak khamir	=	4g	=	Rp	9 200,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	=	1g	=	Rp	380,00
urea	=	2g	=	Rp	3,00
					+
				Total	= Rp 9 583,00 ≈ Rp 9 600,00

C. Perbandingan Biaya Sumber Nitrogen dalam Medium Fermentasi Bta

Ekstrak khamir 0.4% + (NH₄)₂SO₄ 0.1% + urea 0.2% terhadap tepung kedelai 1,5%
Rp 9 600,00 : Rp 75, 00 = 128 : 1

Ekstrak khamir 0.4% + (NH₄)₂SO₄ 0.1% + urea 0.2% terhadap tepung ikan 1.05%
Rp 9 600,00 : Rp 74, 00 = 130 : 1

Kalkulasi dilakukan menurut harga yang berlaku pada tanggal 30 Januari 1999



Lampiran 2. Perubahan nilai pH dan kerapatan optis *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* selama berlangsungnya fermentasi pada skala laboratorium dan skala pilot

Waktu Fermentasi (jam)	Tahapan Skala Fermentasi			
	Skala Laboratorium		Skala Pilot	
	pH	OD	pH	OD
0	7.13	0.15	7.25	0.29
3	6.94	0.39	7.08	0.41
9	5.85	1.76	6.15	1.84
12	5.72	3.42	5.94	3.78
18	6.65	3.39	6.52	3.72
24	6.89	3.44	6.77	3.74
30	7.26	3.71	7.86	4.48
36	7.56	3.72	8.09	4.07
42	7.68	3.81	8.36	4.35
48	8.01	3.91	8.42	4.32
54			8.43	4.58

@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.