

**PENGARUH AERASI TERHADAP PRODUKSI BIOINSEKTISIDA  
OLEH *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*  
PADA BIOREAKTOR TANGKI BERPENGADUK DAN KOLOM GELEMBUNG**

Khaswar Syamsu, Mulyorini Rahayuningsih, dan Farida Yulianti

Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

**ABSTRACT**

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is a well known entomopathogenic bacteria that is widely used as a bioinsecticide against mosquitoes and blackflies. Composition of nutrient plays an essential role on the production of bioinsecticide. In addition, dissolved oxygen which is effected by aeration and agitation is important factor which should be investigated for optimization purposes. In this study, the effect of aeration and bioreactor type were investigated. The cultivation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in Batch Stirred Tank Reactors (BSTR) and Bubble Column Reactor were aerated at the rates of 0.5, 1.0, 1.5 vvm. Toxicity of the resulted bioinsecticide and other parameters were measured. The results of study suggested that cultivation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the bubble column bioreactor with aeration rate of 1.5 vvm was better compared to the other treatments. The potency of the bioinsecticide in this treatment was 64.795 IU/mg.

**PENDAHULUAN**

Nyamuk dan lalat hitam merupakan serangga yang turut berperan serta dalam masalah kesehatan di beberapa negara, terutama negara tropis dan sub tropis (Becker & Margalit, 1993). Salah satu cara untuk menanggulangi permasalahan tersebut adalah dengan membasmi serangga yang berperan sebagai vektor pembawa penyakit.

Penggunaan insektisida kimia untuk membasmi serangga vektor pembawa penyakit dinilai kurang menguntungkan karena pemakaian dengan dosis dan frekuensi yang tinggi menjadikan serangga vektor pembawa penyakit tersebut resisten dan menyebabkan terganggunya keseimbangan ekosistem (Becker & Margalit, 1993). Oleh karena itu, penggunaan insektisida kimia tersebut diganti dengan bioinsektisida (insektisida mikrobial), yaitu produk insektisida yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang banyak dikembangkan dari bakteri, virus, cendawan dan protozoa (Ignofo & Anderson, 1979). Adapun bakteri yang telah dikenal mampu menghasilkan kristal protein sebagai toksin terhadap nyamuk dan lalat hitam adalah *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.

*Bacillus thuringiensis* adalah bakteri yang berbentuk batang, bersifat gram positif dan berflagelum. Bakteri ini dapat membentuk spora secara aerobik, dan selama masa sporulasi juga dapat membentuk kristal protein yang toksik. Kristal protein ini dikenal dengan nama  $\delta$ -endotoksin (Shieh, 1994; Knowles, 1994). Menurut Gill *et.al.* (1992) spora yang dihasilkan oleh *Bacillus thuringiensis* berbentuk oval dan berwarna terang, rata-rata memiliki dimensi 1,0 - 1,3  $\mu$ m. Jika ditumbuhkan pada medium padat, koloni *Bacillus thuringiensis*

berbentuk bulat dengan tepian berkerut, memiliki diameter 5 - 10 mm, berwarna putih, elevasi timbul dan permukaan koloni kasar (Buchner, 1981).

Di Indonesia, telah beredar berbagai merek dagang. Namun demikian penggunaan bioinsektisida tersebut masih jarang karena bioinsektisida bermerk yang ada di Indonesia masih merupakan produk impor, sehingga harganya relatif mahal. Permasalahan tersebut dapat diatasi jika bioinsektisida tersebut dapat diproduksi di dalam negeri dengan bahan baku lokal atau hasil samping produk pertanian. Salah satu hasil samping produk pertanian yang dapat digunakan sebagai media kultivasi *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* adalah air kelapa (Priatno, 1999).

Air kelapa merupakan hasil samping produk pertanian yang mengandung gula, vitamin, mineral, dan zat-zat tumbuh seperti asam nikotinat, auksin, giberelin, piridoksin dan thiamin (Thuleckle, 1961). Komponen nutrisi yang lengkap ini sangat cocok digunakan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme.

Faktor yang sangat mempengaruhi kultivasi *Bacillus thuringiensis* adalah komponen medium dan kondisi kultivasi untuk pertumbuhan mikroorganisme seperti pH, kelarutan oksigen dan temperatur (Dulmage dan Rhodes, 1971). Dalam pertumbuhannya, mikroorganisme membutuhkan sumber air, karbon, nitrogen, unsur mineral, dan faktor pertumbuhan dalam medium pertumbuhannya (Vandekar & Dulmage, 1982). Medium basal untuk pertumbuhan *Bacillus thuringiensis* terdiri dari garam, glukosa, dan asam amino, seperti asam glutamat, asam aspartat dan alanin dalam konsentrasi yang cukup untuk mendukung pertumbuhan

dan sporulasi *Bacillus thuringiensis* (Dulmage, et.al., 1990).

Menurut Dulmage & Rhodes (1971), karbon adalah bahan utama untuk mensintesis sel baru atau produk sel. Beberapa sumber karbon yang dapat digunakan untuk memproduksi bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* dengan kultivasi terendam adalah glukosa, sirup jagung, dekstrosa, sukrosa, laktosa, pati, minyak kedelai, dan molase dari bit dan tebu. Selanjutnya Priatno (1999) menambahkan bahwa air kelapa juga dapat digunakan sebagai sumber karbon untuk memproduksi bioinsektisida *Bacillus thuringiensis*.

Selain unsur karbon, nitrogen juga berperan dalam produksi bioinsektisida dari *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Beberapa sumber nitrogen yang sering digunakan dalam memproduksi bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* adalah tepung kedelai, tepung biji kapas (proflo), *corn steep*, gluten jagung, ekstrak khamir, pepton kedelai, tepung ikan, tripton, tepung endosperma, dan kasein. Stanbury & Whitaker (1984) menambahkan bahwa urea merupakan sumber nitrogen yang sesuai untuk pertumbuhan mikroorganisme karena kemampuannya untuk mempertahankan pH. Namun urea ini mempunyai sifat tidak stabil selama proses sterilisasi, oleh karena itu penggunaannya dibatasi.

Selain sumber karbon dan nitrogen, mikroorganisme juga memerlukan mineral untuk pertumbuhan dan pembentukan produk metabolit. Kebutuhan mineral bervariasi tergantung pada jenis mikroorganisme yang ditumbuhkan. Menurut Dulmage & Rhodes (1971), garam-garam organik yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme meliputi K, Mg, P, S dan yang diperlukan dalam jumlah sedikit seperti Ca, Zn, Fe, Co, Cu, Mo dan Mn. Dalam medium kultivasi *Bacillus thuringiensis* ditambahkan 0,3 g/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,02 g/l  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,02 g/l  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  dan 1,0 g/l  $CaCO_3$  (Vandekar & Dulmage, 1982).

Kualitas dan kuantitas  $\delta$ -endotoksin yang dihasilkan selama proses fermentasi sangat dipengaruhi oleh metode produksinya. Dengan metode produksi yang baik akan menghasilkan kualitas dan kuantitas  $\delta$ -endotoksin sesuai dengan yang diharapkan. Jumlah  $\delta$ -endotoksin yang dihasilkan setiap sel yang sedang bersporulasi akan tergantung pada kepadatan populasi sel dalam kultur produksi bioinsektisida tersebut (Bernhard & Utz, 1993). Konsentrasi yang ditetapkan untuk produksi skala besar antara  $5 \times 10^9$  sampai  $1 \times 10^{10}$  spora per ml (Luthy, et. al, 1992).

Kondisi kultivasi *Bacillus thuringiensis* dalam labu kock dilakukan pada suhu 28 - 32 °C, pH awal medium kultur sekitar 6,8 - 7,2, agitasi 142 - 340 rpm dan dipanen pada waktu inkubasi 24 - 48 jam (Vandekar & Dulmage, 1982). Sedangkan kultivasi *Bacillus thuringiensis* dalam bioreaktor dilakukan

pada kondisi suhu 28 - 32 °C, pH awal medium 6.8 - 7.2, volume medium sekitar setengah sampai dua per tiga dari kapasitas volume bioreaktor, agitasi 400 - 700 rpm, aerasi 0.5 - 1.5 v/v/m dan dipanen pada waktu inkubasi 40 - 72 jam (Vandekar & Dulmage, 1982 ; Sikdar, et.al. 1993).

Teknik Kultivasi yang sering digunakan untuk memproduksi bahan aktif bioinsektisida dengan menggunakan kultur *Bacillus thuringiensis* ada dua jenis, yaitu kultivasi semi padat (*semi solid cultivation*) dan kultivasi terendam (*submerged cultivation*). Pada umumnya, kultivasi terendam lebih disukai karena dapat menjaga kesterilan kultur dan proses pemanenan dan pengaturan parameter selama proses produksi lebih sederhana.

Teknik kultivasi secara terendam dapat dilakukan dengan sistem tertutup pada bioreaktor. Ada beberapa jenis bioreaktor yang dapat digunakan, yaitu bioreaktor tangki berpengaduk dan bioreaktor kolom gelembung. Bioreaktor tangki berpengaduk merupakan jenis bioreaktor yang paling sederhana dan umum digunakan. Bioreaktor ini digunakan untuk substrat yang mempunyai viskositas tinggi dan enzim terimobilisasi dengan aktivitas rendah (Machfud, et.al., 1989). Sedangkan bioreaktor kolom gelembung (*bubble column*) merupakan bioreaktor yang berbentuk kolom yang dilengkapi dengan pemasok udara dari bagian bawah dan tanpa pengadukan mekanis. Pada bioreaktor ini, pencampuran semata-mata bergantung pada sirkulasi udara yang dimasukkan (Crueger, 1987).

Sebelum produk bioinsektisida tersebut digunakan, perlu dilakukan pengujian terhadap aktivitas (tingkat toksisitasnya). Aktivitas insektisida mikroba ditentukan dengan menghitung jumlah spora hidup dan melalui bioassay untuk menentukan kadar letal ( $LC_{50}$ ) dan International Unit (IU) (Vandekar & Dulmage, 1982) atau dosis letal ( $LD_{50}$ ), diet dilution unit ( $DDU_{50}$ ) dan IU (Dulmage & Rhodes, 1971).  $LCC_{50}$ ,  $LD_{50}$ , dan  $DDU_{50}$  sebenarnya hanya menunjukkan potensi dan umur serangga, karena dipengaruhi oleh spesies dan umur serangga. Oleh karena itu maka disepakati bahwa potensi produk insektisida mikroba (*Bacillus thuringiensis*) dinyatakan dalam Satuan Internasional.

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis bioreaktor dan laju aerasi yang dapat memproduksi bioinsektisida oleh *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* dengan menggunakan substrat air kelapa secara optimal, mengetahui kinetika fermentasi produksi bioinsektisida oleh *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* dengan menggunakan substrat air kelapa dan mengetahui toksisitas bioinsektisida yang dihasilkan terhadap larva nyamuk *Culex sp.*

## BAHAN DAN METODA

### Bahan dan Alat

Isolat *Bacillus thuringiensis* yang digunakan adalah *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* yang diperoleh dari *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* komersial (Vectobac). Media fermentasi yang digunakan adalah air kelapa yang diperoleh dari pasar di daerah Bogor. Sedangkan sumber nitrogen yang digunakan adalah pupuk urea.

Bahan-bahan yang digunakan adalah Nutrien Agar (NA), Nutrien Broth (NB), HCl, NaOH,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCO_3$ , glukosa,  $H_2SO_4$ ,  $CuSO_4$ , garam fisiologis, Naphtanol blue back, metanol 98 persen, asam asetat, Basic fuchsin, etanol 95 persen, fenol, air suling dan spiritus. Selain itu juga dibutuhkan nyamuk *Culex sp.* untuk bioassay.

Alat-alat yang digunakan adalah bioreaktor kolom gelembung swa rancang volume 1,5 liter, bioreaktor tangki berpengaduk model Biostat-M volume 1,5 liter, rotary shaking incubator, otoklaf, pemanas berpengaduk, pH-meter, labu erlenmeyer, sentrifuse, loop inkubasi, tabung reaksi, pipet, lemari pendingin, spektrofotometer, timbangan analitik, cawan petri, gelas piala, kertas saring, bunsen, keranjang tabung dan kertas serap.

### Metoda Penelitian

#### Penyiapan Medium Kultivasi

Medium kultivasi yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada komposisi medium Priatno (1999). Medium tersebut terdiri dari air kelapa 70,5 % yang berfungsi sebagai sumber karbon, buffer asetat 29,5 %, urea 1 % sebagai sumber nitrogen,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,3%,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,02 %,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,02 %, dan  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,02 % yang berfungsi sebagai sumber mineral dan  $CaCO_3$ .

Bahan-bahan medium selain air kelapa dan  $CaCO_3$  dicampur dengan buffer asetat. Semua medium disesuaikan pHnya menjadi 7,0, kemudian disterilisasi dalam otoklaf pada suhu  $121^\circ C$ , 1 atm selama 15 menit. Setelah dingin semua bahan dicampurkan secara aseptik.

#### Penyiapan Inokulum

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* hasil isolasi dari Vectobac yang telah tersedia dalam medium NA miring diinokulasikan sebanyak satu lup ke dalam 100 ml NB steril dalam labu erlenmeyer 250 ml sebagai labu pembibitan pertama, kemudian diinkubasi dalam rotary shaking

incubator pada suhu  $30^\circ C$ , 200 rpm selama 12 jam. Sebanyak 5 % inokulum dari kultur pembibitan pertama dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 ml sebagai labu pembibitan kedua yang juga berisi NB steril dan diinkubasi pada kondisi yang sama selama 12 jam.

#### Kultivasi *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

Kultivasi dilakukan dalam bioreaktor berpengaduk (*Batch Stirred Tank Reactor*/BSTR) Model Biostat-M dan bioreaktor kolom gelembung (*Bubble Column*) swa rancang yang masing masing bervolume 1,5 liter dengan volume produksi 1,3 liter. Perlakuan yang dicobakan dalam penelitian ini dapat dilihat Tabel 1.

Tabel 1. Perlakuan dalam penilitan ini

Sandi Kultivasi	Jenis Bioreaktor	Laju Aerasi (v/v/m)
A1B1	Tangki Berpengaduk	0,5
A1B2	Tangki Berpengaduk	1,0
A1B3	Tangki Berpengaduk	1,5
A2B1	Kolom Gelembung	0,5
A2B2	Kolom Gelembung	1,0
A2B3	Kolom Gelembung	1,5

Kultivasi dilakukan selama 48 jam pada kondisi pH netral, suhu  $30^\circ C$ , 200 rpm, dan laju aerasi sesuai dengan perlakuan. Selama berlangsungnya kultivasi dilakukan pengamatan pada interval waktu tiga jam hingga jam ke12 dan dilanjutkan dengan pengamatan pada interval waktu enam jam hingga kultur siap dipanen. Analisis yang dilakukan meliputi pengukuran pH, pengukuran pertumbuhan sel dengan mengukur bobot kering biomassa dan jumlah sel (TPC), penentuan jumlah spora hidup (VSC), pengukuran kadar gula sisa dengan metoda fenol dan pengamatan terhadap pembentukan kristal protein ( $\delta$ -endotoksin) secara mikroskopik.

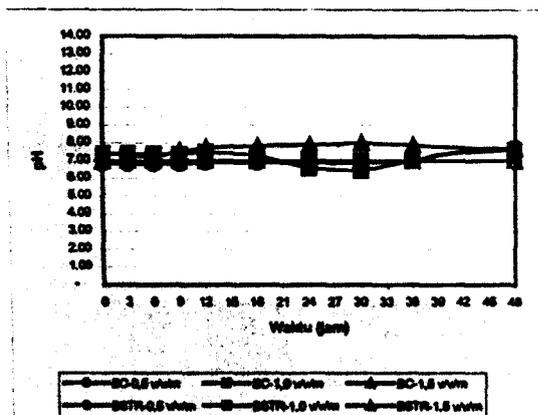
#### Pengujian Aktivitas Bioinsektisida

Suspensi bahan aktif bioinsektisida *B.t.i* hasil panen diuji kualitasnya dengan menguji toksisitasnya terhadap larva nyamuk *Culex sp.* instar kedua. Cairan kultivasi diencerkan hingga sepuluh tingkat pengenceran kemudian sebanyak 10 ekor larva dimasukkan ke dalam 25 ml cairan kultivasi yang telah diencerkan tersebut. Setelah 24 jam mortalitas larva diamati. Hasil perhitungan tingkat mortalitas tersebut diolah dengan menggunakan program Quant sehingga diperoleh nilai  $LC_{50}$ -nya, sehingga potensi bioinsektisida yang dihasilkan dapat ditentukan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pola Perubahan pH Selama Kultivasi

Hasil pengamatan terhadap cairan kultivasi menunjukkan bahwa pH cairan selama kultivasi cenderung konstan. Hal ini disebabkan oleh adanya penambahan larutan penyangga ke dalam media fermentasi sehingga pembentukan asam maupun basa tidak sampai mengakibatkan perubahan pH yang tinggi. Gambar 5. memperlihatkan bahwa pH cairan kultivasi berkisar antara 6,44 – 8,00 untuk fermentasi yang dilakukan pada bioreaktor kolom gelembung, sedangkan pH pada kultivasi yang dilakukan pada bioreaktor tangki berpengaduk menunjukkan nilai yang konstan. Kisaran pH ini masih berada pada kisaran pH pertumbuhan *Bacillus thuringiensis*. Secara umum, *Bacillus thuringiensis* dapat tumbuh pada kisaran pH 5,5 – 8,5 dan tumbuh optimum pada kisaran pH 6,5 – 7,5 (Bernhard & Utz, 1993). Pada dasarnya, nilai pH pada cairan kultivasi yang dikultivasi pada bioreaktor kolom gelembung menunjukkan pola tertentu. Pada fasa lag cairan kultivasi cenderung mengalami penurunan pH dan setelah memasuki fasa stasioner mengalami kenaikan kembali. Penurunan pH ini disebabkan oleh proses katabolisme glukosa yang menyebabkan terakumulasinya asam di dalam medium. Peningkatan kembali nilai pH selama fasa stasioner disebabkan oleh pemanfaatan kembali asam asetat yang terakumulasi dalam medium untuk memproduksi poli- $\beta$ -hidroksibutirat (PHB) yang selanjutnya dapat digunakan sebagai energi selama proses sporulasi. Selain itu kenaikan pH juga disebabkan oleh terakumulasinya bahan-bahan alkali sebagai hasil metabolisme urea yang masih tersisa. Menurut Sneath (1986), *Bacillus thuringiensis* memang diketahui memiliki enzim urease.



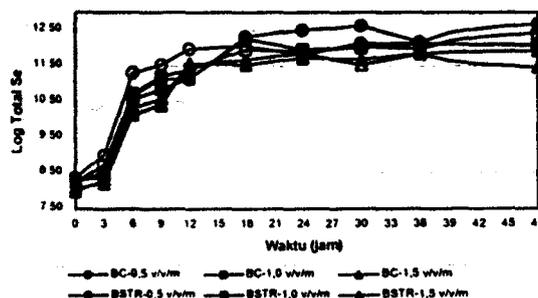
Gambar 5. Grafik Hubungan Antara pH dengan Waktu Fermentasi

### Pertumbuhan *Bacillus Thuri-Ngiensis* Subsp. *Israelensis* Selama Kultivasi

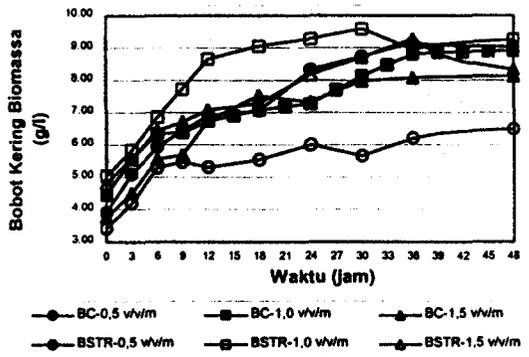
Hasil pengamatan terhadap pola pertumbuhan sel menunjukkan bahwa *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* yang dikultivasi pada bioreaktor tangki berpengaduk dan bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi yang bervariasi memperlihatkan pola pertumbuhan yang hampir sama, yaitu mula-mula lambat kemudian cepat dan melambat kembali. Menurut Wang, *et.al.* (1978), pertumbuhan mikroorganisme secara curah pada media tertentu mempunyai tiga fasa dalam kurvanya, yaitu fasa awal, yang diikuti fasa eksponensial, fasa stasioner dan fasa penurunan.

Pada penelitian ini, rentang waktu pertumbuhan lambat (fasa lag) terjadi sangat pendek, yaitu sampai jam ketiga fermentasi. Fasa lag yang pendek ini karena inokulum yang dimasukkan ke dalam media fermentasi telah beradaptasi, sehingga pada saat dimasukkan ke dalam media fermentasi dapat tumbuh dan berkembang dengan cepat.

Seperti terlihat pada Gambar 6., pada hampir semua perlakuan, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* pada berbagai perlakuan memasuki fasa stasioner pada jam ke-12, kecuali kultivasi yang menggunakan bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 0,5 v/v/m dan laju aerasi 1,0 v/v/m serta kultivasi menggunakan bioreaktor tangki berpengaduk dengan laju aerasi 1,0 v/v/m yang memasuki fasa stasioner pada jam ke-18. Perbedaan selang waktu fasa eksponensial ini diduga karena pada kultivasi yang dilakukan pada bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 0,5 v/v/m dan laju aerasi 1,0 v/v/m serta kultivasi yang dilakukan pada bioreaktor tangki berpengaduk dengan laju aerasi 1,0 v/v/m mempunyai konsentrasi oksigen terlarut yang mencapai titik optimal dan mampu memberikan kondisi pertumbuhan yang baik untuk *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.



Gambar 6. Grafik Hubungan Antara Log Total Sel terhadap waktu Fermentasi



Gambar 7. Grafik Hubungan Antara Bobot Kering Biomassa terhadap waktu Fermentasi

Pertumbuhan sel *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* selain ditunjukkan oleh peningkatan jumlah sel juga dapat ditunjukkan oleh peningkatan bobot kering biomassa yang dihasilkan. Gambar 7. memperlihatkan bahwa bobot kering biomassa sel *Bacillus thuringiensis israelensis* meningkat selama fermentasi berlangsung.

Dari Gambar 6. dan 7., dapat dilihat bahwa pada akhir kultivasi (jam ke-48) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* yang dikultivasi pada bioreaktor tangki berpengaduk dengan laju aerasi 1,0 v/v/m menghasilkan bobot kering biomassa tertinggi, yaitu sebesar 9,25 g/l. Sedangkan jumlah total sel berdasarkan hitungan cawan terbesar dicapai oleh kultivasi pada bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 0,5 v/v/m, yaitu sebesar  $4,68 \times 10^{12}$  sel/ml.

Pada dasarnya pengukuran bobot kering biomassa dan jumlah sel dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan mikroorganisme selama kultivasi. Namun berdasarkan hasil penelitian, bobot kering biomassa tertinggi tidak menghasilkan jumlah sel tertinggi. Perbedaan ini terjadi karena pengukuran terhadap bobot kering biomassa tidak hanya mengukur sel hidup saja tetapi juga sel yang mati, spora, dan bahan-bahan lain yang tidak larut, sedangkan pada pengukuran jumlah sel hasil yang diperoleh hanya jumlah sel hidup saja. Meskipun demikian secara umum perolehan bobot kering biomassa yang tinggi juga menghasilkan jumlah sel yang tinggi pula.

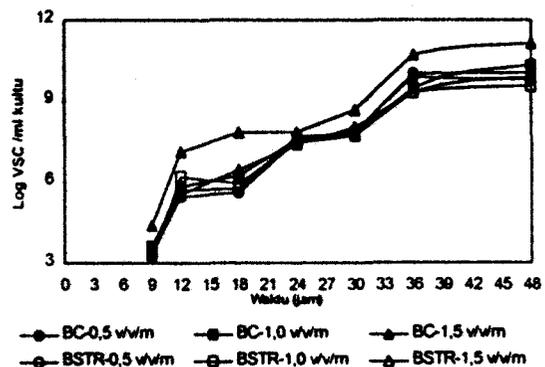
Penambahan laju aerasi ternyata dapat menurunkan perolehan bobot kering biomassa, begitu juga apabila laju aerasinya dikurangi. Jika konsentrasi oksigen terlarut lebih kecil dari konsentrasi oksigen kritis, maka metabolisme sel akan terganggu (Rachman, 1989). Pada laju aerasi yang lebih tinggi, jumlah oksigen yang dimasukkan lebih banyak dan menyebabkan oksigen cenderung berada dalam fasa gas dan gelembung gas ini akan cepat pecah kembali sebelum terjadi pelarutan oksigen ke dalam kultur

(Stanbury & Whitaker, 1984). Menurunnya jumlah oksigen terlarut di dalam kultur menyebabkan berkurangnya oksigen yang dikonsumsi oleh sel, sehingga pertumbuhan sel terganggu karena *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* merupakan bakteri aerob. Oleh karena itu, pasokan oksigen ke dalam kultur harus seimbang dengan laju konsumsi oksigen.

#### Pola Pembentukan Spora

Hasil pengamatan terhadap pembentukan spora menunjukkan bahwa proses pembentukan spora pada kultivasi *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* dengan media air kelapa dimulai pada jam ke-9. Pada dasarnya, pola pembentukan spora pada masing-masing perlakuan memperlihatkan adanya kesamaan, yaitu spora terbentuk secara cepat pada jam ke-9 sampai jam ke-36, dan kemudian mengalami perlambatan hingga jam ke-48.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kultivasi pada bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 1,5 v/v/m menghasilkan total spora hidup paling tinggi, yaitu sebesar  $1,32 \times 10^{11}$  spora/ml kultur. Menurut Sukmadi, *et. al.* (1996), cepat lambatnya pembentukan spora tergantung pada kondisi lingkungan kultur. Biasanya spora akan tumbuh pada kondisi lingkungan di sekitar sel yang kurang sesuai bagi sel, misalnya pH yang ekstrim, suhu yang ekstrim dan kurangnya suplai makanan bagi sel atau kemungkinan lainnya yang dapat menyebabkan kondisi lingkungan tidak sesuai bagi sel sehingga sel membentuk spora. Perolehan jumlah spora hidup dalam penelitian ini masih lebih tinggi jika dibandingkan dengan nilai konsentrasi yang ditetapkan untuk produksi pada skala besar yaitu antara  $5 \times 10^9$  sampai  $1 \times 10^{10}$  spora/ml cairan kultur (Luthy, *et.al.*, 1982).



Gambar 8. Grafik Hubungan Antara Log VSC dengan Waktu Fermentasi

Gambar 8. memperlihatkan bahwa fermentasi pada bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 1,5 v/v/m mampu menghasilkan total spora hidup paling tinggi. Hal ini disebabkan oleh besarnya kemampuan bioreaktor ini untuk memasok oksigen, sehingga suplai oksigen dalam cairan kultivasi berlebih. Jika konsentrasi oksigen lebih besar dari konsentrasi kritis maka dapat merangsang pembentukan produk walaupun tidak berpengaruh terhadap peningkatan produksi biomassa (Rachman, 1989). Flores, *et.al.* (1997) menambahkan bahwa banyaknya transfer oksigen ke dalam medium mendukung pembentukan spora yang lebih banyak.

**Kinetika Kultivasi**

Penentuan parameter kinetika kultivasi perlu dilakukan karena parameter kinetika kultivasi ini digunakan untuk menentukan kecepatan pertumbuhan mikroorganisme, pembentukan produk dan konsumsi substrat. Jika dilihat dari nilai efisiensi penggunaan substrat gula ((So-St)/So), maka nilai paling tinggi terjadi pada kultivasi dengan menggunakan bioreaktor tangki berpengaduk dengan laju aerasi 1,0 v/v/m, yaitu sebesar 0,24. Hal ini menunjukkan bahwa metabolisme sel pada sistem ini lebih baik jika dibandingkan dengan sistem yang lain. Hasil ini berkorelasi positif terhadap pembentukan biomassa. Perolehan biomassa tertinggi juga terjadi pada kultivasi dengan bioreaktor tangki berpengaduk dengan laju aerasi 1,0 v/v/m, yaitu sebesar 9,58 g/l.

Berdasarkan hasil perhitungan parameter kinetika kultivasi seperti terlihat pada Tabel 5. dapat diketahui bahwa nilai laju pertumbuhan spesifik maksimum sel berdasarkan massanya ( $\mu_x$ -max) terjadi pada kultivasi dengan menggunakan bioreaktor tangki berpengaduk dengan laju aerasi 0,5 v/v/m, yaitu sebesar 0,09/jam sedangkan nilai laju pertumbuhan spesifik maksimum sel berdasarkan jumlah sel ( $\mu_N$ -max) terjadi pada kultivasi dengan menggunakan bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 0,5 v/v/m, yaitu sebesar 1,77/jam. Nilai laju pertumbuhan sel maksimum pada kedua parameter tersebut tidak terjadi pada kultivasi yang mempunyai efisiensi penggunaan substrat tertinggi. Hal ini diduga karena pertumbuhan sel tidak hanya dipenga-

oleh konsumsi sumber karbon saja, tetapi juga dipengaruhi oleh konsumsi sumber nitrogen.

Pada kultivasi dengan menggunakan bioreaktor gelembung dengan laju aerasi 1,5 v/v/m, substrat air kelapa dapat dikonversi menjadi sel dan spora dengan baik oleh *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Hal ini didukung oleh data pada Tabel 5. bahwa nilai efisiensi perubahan substrat menjadi biomassa (Yx/s) yang paling tinggi terjadi pada kultivasi dengan bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 1,5 v/v/m. Hasil yang sama juga terjadi pada efisiensi perubahan substrat menjadi spora.

Berdasarkan pada hasil perhitungan seperti yang tertera pada Tabel 5. dapat disimpulkan bahwa sebagian substrat air kelapa dikonversi menjadi biomassa. Pernyataan ini didukung oleh data bahwa nilai Yx/s jauh lebih besar jika dibandingkan dengan nilai Yp/s.

**Penentuan Aktivitas Bioinsektisida**

Salah satu cara yang dapat digunakan untuk menentukan aktifitas bahan aktif bioinsektisida adalah dengan *bioassay*. Bioinsektisida yang paling efektif adalah bioinsektisida yang mampu membunuh larva serangga target paling banyak, yang ditunjukkan oleh tingkat mortalitasnya. Berdasarkan tingkat mortalitas larva serangga target tersebut, maka LC<sub>50</sub> dan potensi produk bioinsektisida dapat dihitung. LC<sub>50</sub> adalah satuan yang menyatakan dosis atau konsentrasi produk yang dapat membunuh 50 persen serangga target.

Hasil penelitian, seperti terlihat pada Tabel 6. menunjukkan bahwa *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* yang dikultivasi pada bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 1,5 v/v/m mampu menghasilkan  $\delta$ -endotoksin dengan toksisitas paling tinggi. Hal ini dibuktikan dengan kemampuannya untuk membunuh larva nyamuk *Culex sp.* yang paling tinggi dibandingkan dengan yang lain. Selain ditunjukkan oleh tingkat mortalitas larva nyamuk *Culex sp.*, efektifitas produk bioinsektisida juga ditunjukkan oleh kecilnya nilai LC<sub>50</sub>. semakin kecil nilai LC<sub>50</sub>-nya maka efektifitas produk tersebut semakin tinggi.

Tabel 5. Hasil Perhitungan Parameter Kinetika

Parameter Kinetika	BC	BC	BC	BSTR	BSTR	BSTR
	0,5 v/v/m	1,0 v/v/m	1,5 v/v/m	0,5 v/v/m	1,0 v/v/m	1,5 v/v/m
X-max (gram)	9,15	8,90	8,13	6,48	9,58	9,28
$\mu_N$ -max (jam <sup>-1</sup> )	1,04	1,68	1,50	1,77	1,54	1,54
$\mu_x$ -max (jam <sup>-1</sup> )	0,09	0,07	0,07	0,08	0,05	0,05
Yx/s (gr sel/gr substrat)	2,07	1,82	2,92	1,87	1,60	1,64
Yp/s (gr sel/gr substrat)	0,01	0,06	0,88	0,04	0,01	0,10
(So-St)/So	0,22	0,22	0,14	0,16	0,24	0,20

Tabel 6. Tingkat Mortalitas Larva Nyamuk *Culex sp.*

Jenis Bioreaktor	Laju Aerasi (v/v/m)	Mortalitas (%) pada Konsentrasi									
		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$
Kolom Gelembung	0,5	13	7	0	0	0	0	0	0	0	0
	1,0	87	73	43	37	27	23	3	0	0	0
	1,5	100	90	60	50	40	20	7	3	0	0
Tangki Berpengaduk	0,5	100	80	33	27	13	10	0	0	0	0
	1,0	30	17	3	3	0	0	0	0	0	0
	1,5	40	33	27	10	3	0	0	0	0	0
VECTOBAC		100	100	100	100	93	46	20	17	13	7

Tabel 7. Perbandingan Antara Bobot Kering Biomassa, Log VSC, LC<sub>50</sub> dan Potensi Bioinsektisida untuk Masing-Masing Perlakuan

Jenis Bioreaktor	Laju Aerasi (v/v/m)	Bobot Kering Biomassa (g/l)	Log VSC	LC <sub>50</sub> (mg/l)	Potensi (IU/mg)
Kolom Gelembung	0,5	9,15	9,78	inaktif	inaktif
	1,0	8,90	10,31	41,086	14,602
	1,5	8,13	11,12	9,257	64,795
Tangki Berpengaduk	0,5	6,48	10,03	255,990	2,344
	1,0	9,58	9,54	inaktif	inaktif
	1,5	9,28	9,87	inaktif	inaktif

Hasil penelitian menunjukkan bahwa potensi produk komersial Vectobac 231,5 kali lebih besar jika dibandingkan dengan produk yang dihasilkan dalam penelitian ini. Hal ini diduga karena perbedaan formulasi medium yang digunakan, karena komposisi medium sangat mempengaruhi proses produksi  $\delta$ -endotoksin. Selain itu, rendahnya potensi yang dihasilkan oleh bioinsektisida dalam penelitian ini juga dapat disebabkan oleh waktu kultivasi yang kurang lama. Hal ini didukung oleh masih rendahnya nilai efisiensi penggunaan substrat, rata-rata sebesar 20 persen.

Berdasarkan pengamatan terhadap bobot kering biomassa, jumlah spora, LC<sub>50</sub> dan potensi produk bioinsektisida seperti terlihat pada Tabel 7. dapat disimpulkan bahwa tidak ada hubungan antara bobot kering biomassa dengan potensi produk bioinsektisida yang dihasilkan. Hal ini juga berarti bahwa bobot kering biomassa tidak mempengaruhi tingkat mortalitas larva nyamuk *Culex sp.* oleh produk yang dihasilkan. Jika dilihat dari perolehan total spora dapat diketahui bahwa total spora yang dihasilkan berkorelasi positif dengan efektifitas produk bioinsektisida terhadap larva nyamuk *Culex sp.* Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa  $\delta$ -endotoksin yang merupakan bahan aktif bioinsektisida terdapat di dalam spora.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa air kelapa cocok untuk digunakan sebagai substrat bagi pertumbuhan *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* untuk memproduksi bahan aktif bioinsektisida. Kultivasi dengan menggunakan substrat air kelapa pada bioreaktor kolom gelembung dan tangki berpengaduk mampu meningkatkan pertumbuhan sel *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* jika dibandingkan dengan kultivasi pada skala erlenmeyer.

Selama proses kultivasi, pH cairan kultur cenderung konstan pada kisaran pH netral sehingga pertumbuhan selnya baik. Perolehan bobot kering biomassa tertinggi dicapai pada kultivasi dengan menggunakan bioreaktor tangki berpengaduk dengan laju aerasi 1,0 v/v/m setelah kultivasi berlangsung selama 30 jam, yaitu sebesar 9,58 g/l. Perolehan jumlah sel tertinggi dicapai pada kultivasi dengan menggunakan bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 0,5 v/v/m, yaitu sebesar  $4,68 \times 10^{12}$  sel/ml dan spora tertinggi dicapai pada kultivasi dengan menggunakan bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 1,5 v/v/m, yaitu sebesar  $1,32 \times 10^{11}$  spora/ml.

Berdasarkan hasil perhitungan kinetika kultivasi, dapat diketahui bahwa laju pertumbuhan spesifik ( $\mu_x$ ) tertinggi dicapai pada kultivasi dengan

menggunakan bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 0,5 v/v/m, yaitu sebesar 0,09/jam dan laju pertumbuhan spesifik ( $\mu_N$ ) tertinggi dicapai pada kultivasi dengan menggunakan bioreaktor tangki berpengaduk dengan laju aerasi 0,5 v/v/m, yaitu sebesar dan 1,77/jam. Sedangkan efisiensi perubahan substrat menjadi biomassa dan spora tertinggi dicapai pada kultivasi dengan menggunakan bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 1,5 v/v/m, masing-masing sebesar 1,82 gram sel/gram substrat dan 0,88 gram spora/gram substrat. Hal ini berarti bahwa perolehan biomassa dan spora tertinggi tidak menunjukkan efisiensi perubahan substrat tertinggi pula.

Kultivasi menggunakan bioreaktor kolom gelembung dengan laju aerasi 1,5 v/v/m menghasilkan  $\delta$ -endotoksin yang mempunyai efektifitas terhadap larva nyamuk *Culex sp.* tertinggi. Hal ini dibuktikan oleh hasil uji aktivitas produk bioinsektisida (*bioassay*) yang menghasilkan nilai  $LC_{50}$  terendah, yaitu sebesar 9,257 mg/l dan potensi yang tertinggi, yaitu sebesar 64,795 IU/mg. Nilai potensi yang dihasilkan ini masih lebih kecil jika dibandingkan dengan produk komersial Vectobac, yaitu sebesar 15000 IU/mg.

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa semakin tinggi laju aerasi maka jumlah spora dan toksisitas produk bioinsektisida yang dihasilkan semakin baik.

#### Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai produksi bioinsektisida oleh *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* menggunakan media utama air kelapa dengan perpanjangan waktu kultivasi dan pengaruh konsumsi sumber nitrogen terhadap pembentukan spora dan  $\delta$ -endotoksin

#### DAFTAR PUSTAKA

- Becker dan J. Margalit. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* Against Mosquitoes and Blackflies. *Di dalam* P.F. Enwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey dan S. Higgs (editor). *Bacillus thuringiensis. An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley and Sons, Chichester :147-168.
- Bernhard, K. dan R. Utz. 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides for Experimental and Commercial Uses. *Di dalam* P.F. Enwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey dan S. Higgs (editor). *Bacillus thuringiensis. An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley and Sons, Chichester :147-168.
- Buchner, G.E. 1981. Identification of Bacteria Found in Insect. *Di dalam* H.D. Burges (editor). *Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, New York.
- Crueger, W. 1987. Physical aspect of Bioreactor Performance. Dechema. Frankfurt.
- Dulmage, H.T. dan R.A. Rhodes. 1971. Production of Pathogens in Artificial Media, PP. 507-540. *Di dalam* H.D. Burges dan N.W. Hussey (editor). *Microbial Control of Insect and Mites*. Acad. Press, NY.
- Dulmage, H.T., J.A. Corea dan G.G. Morales. 1990. Potential for Improved Formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* Through Standardization and Fermentation Development. *Di dalam* H. de Barjac dan D.J. Sutherland (editor). *Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies : Biochemistry, Genetic and Application of Bacillus thuringiensis israelensis & Bacillus Sphaericus*. Rutgers University Press. New Brunswick, New Jersey, USA : 3-10.
- Flores, E. R. , F. Perez dan M. de la Torre. 1997. Scale-Up of *Bacillus thuringiensis* Based on Oxygen Transfer. *J. Ferment. and Bioeng.* 83(6) : 561-564.
- Gill, S.S., E.A. Knowles, dan P.V. Pietrantonio, 1992. The Mode of Action of *Bacillus thuringiensis*-Endotoxin. *Annu. Rev. Entomol.* 37 : 615-636.
- Ignoffo, C.M. dan R.F. Anderson. 1979. Bioinsecticides. *Di dalam* H.J. Pepler dan D. Perlman (editor). *Microbiol. Technology* Academic Press, New York : 1-27.
- Knowles, B.H. 1994. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal  $\delta$ -endo-toxin. *Dalam* P.D. Evans (editor). *Advances in Insect Physiology*. Academic Press, London.
- Luthy, P. J.L. Cordier dan H.M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* as a Bacterial Insecticide : Basic Consideration and Application. *Di dalam* *Microbial & Viral Pesticides*. Marcel Dekker, Inc. New York : 35-72.
- Machfud, E. Gumbira-Sa'id dan Krisnani. Fermentor. PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.
- Priatno, T. 1999. Mempelajari Pemanfaatan Air kelapa Sebagai Media Utama Quinlan, R.J. dan S.G. Lisansky. 1985. Microbial Insecticides, pp.233-254. *Di dalam* H. Dellweg (editor). *Biotechnology vol. 3*. Verlag Chemi, Weinheim.
- Rachman, A. 1989. Pengantar Teknologi Fermentasi. PAU Pangan dan Gizi-IPB, Bogor.
- Shieh, T.R. 1994. Identification and Classification of *Bacillus thuringiensis*. *Di dalam* Kumpulan Makalah Seminar *Bacillus thuringiensis*. Komisi Pestisida Departemen Pertanian Jakarta.
- Sikdar, D.D., M.K. Majumdar dan S.K. Majumdar. 1993. Optimization of Process for Production of  $\delta$ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in a Five Litre Fermentor. *Biochemical Archives*. 9: 119-123.

- Sneath, P.H.A. 1986. Endospore-Forming Gram Positive Rods and Cocci. *Di dalam* P.H.A Sneath, N.S. mair, M.E. Sharpe. Dan J.G. Holt (editor). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Baltimore, USA.
- Stanbury, P.F. dan A. Whitaker. 1984. *Principles of Fermentation*. Tech. Pergamon Press. New York.
- Thuleckle, 1961. *Coconuts*. Longmans Green and Co., London.
- Vandekar, M. dan H.T. Dulmage. 1982. Guidelines for Production *Bacillus thuringiensis* H-14. Proceeding of a Consultation Held in Geneva, Switzerland.
- Wang, D. I. C., C.L. Cooney., A.L. Demain, P. Dunhill, A.E. Humphrey dan M.D. Lilly. 1978. *Fermentation and Enzyme Technology*. John Wiley and Sons, NY.