

Prof. Dr. Ir. Akhmad Gazali, MS
Ir. Ilhamiyah, MM
Dr. Achmad Jaelani, S.Pt., M.Si.

BACILLUS THURINGIENSIS

Biologi, Isolasi, Perbanyakkan dan Cara Aplikasinya



BACILLUS THURINGIENSIS

Biologi, Isolasi, Perbanyakkan dan Cara Aplikasinya

Prof. Dr. Ir. Akhmad Gazali, MS
Ir. Ilhamiyah, MM
Dr. Achmad Jaelani, S.Pt., M.Si.



BACILLUS THURINGIENSIS

Biologi, Isolasi, Perbanyak dan Cara Aplikasinya

A k h m a d G a z a l i , I l h a m i y a h , A c h m a d J a e l a n i

@2017

All rights reserved

x + 65 hal; 15 x 23cm

ISBN: 978-602-9864-64-6

Desain & Layout :
Rasta Albanjari
Tim Pustaka Banua

Desain Cover :
Rasta Albanjari

Cetakan Pertama
Dicetak Oleh :



Pustaka Banua

Jl Pramuka, Komplek Smanda, Perum Bumi Pramuka Asri No 19
Blok D Banjarmasin - CP: 0813 5162 8292
email: opinibanua@gmail.com

*Hak cipta dilindungi oleh Undang-Undang
Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian
Atau seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari Penulis*

isi diluar tanggung jawab percetakan

**KUTIPAN PASAL 27
Sanksi Pelanggaran Undang-Undang Hak Cipta
(UU No.19 Tahun 2002)**

1. Barang siapa dengan sengaja melanggar dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 Ayat (1) dan Ayat (2) di pidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp 1.000.000,00 (satu juta rupiah) atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran hak cipta atau hak terkait sebagai dimaksud pada Ayat (1), diidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 50.000.000,00 (lima puluh juta rupiah).

KATA PENGANTAR

Bacillus thuringiensis atau yang sering disingkat dengan B.t. adalah bakteri penyebab penyakit serangga yang sering digunakan untuk mengendalikan serangga hama yang menyerang tanaman, baik tanaman palawija seperti jagung dan kedelai maupun tanaman hortikultura seperti tanaman sayuran dan buah-buahan.

Bakteri ini dapat diisolasi dari serangga terinfeksi, tanah maupun sisa-sisa tanaman yang sudah menjadi kompos.

Buku ini membahas mengenai bakteri *Bacillus thuringiensis*, khususnya tentang biologi, cara isolasi, perbanyakkan, serta cara aplikasinya, terutama pada tanaman sayuran yaitu tanaman sawi.

Buku ini diharapkan dapat menambah khasanah ilmu pengetahuan dan menjadi bahan bacaan bagi mahasiswa dan masyarakat yang ingin mendalami ilmu tentang pengendalian hama secara hayati terutama menggunakan bakteri, *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih yang setinggi-tingginya kepada semua teman yang mendukung selesainya buku ini.

Kritik dan saran kami harapkan dari pembaca untuk kesempurnaan penulisan buku ini.

Wassalam,

Penulis,



Bacillus thuringiensis
Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

DAFTAR ISI

hal

Kata Pengantar
Daftar Isi

Pendahuluan.....	1
Biologi Bakteri Patogen Serangga	5
Cara Isolasi <i>Bacillus thuringiensis</i> dan Patogenisitasnya	11
Perbanyakan <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
Aplikasi <i>Bacillus thuringiensis</i>	49
Kesimpulan.....	55
Daftar Pustaka	57

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya



PENDAHULUAN

Patogen merupakan golongan mikroorganisme atau jasad renik yang hidup pada atau di dalam tubuh hama dan menimbulkan penyakit. Beberapa patogen menyebabkan penyakit pada tanaman dan hewan, akan tetapi banyak juga mikroorganisme yang berguna : mendegradasi racun, memproduksi nutrient bagi tanaman, beberapa pathogen berguna untuk mengendalikan gulma, antagonis terhadap pathogen penyakit tumbuhan dan ada juga mikroorganisme yang menyebabkan penyakit pada serangga atau arthropoda lainnya. Patogen serangga memasuki tubuh serangga melalui dua jalan : 1) ketika inang menelan individual pathogen selama proses makan (dikenal sebagai *passive entry*), dan 2) Ketika patogen masuk melalui bukaan-bukaan alami atau penetrasi langsung ke kurikula serangga (disebut *active entry*). Perpindahan (*transmission*) penyakit serangga dapat terjadi dari serangga yang sakit ke serangga yang sehat (*horizontal transmission*), dan bisa juga perpindahan penyakit terjadi dari serangga ke progeny/offspringnya yang sering dikenal sebagai *vertical transmission*.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Seperti mikroorganisme infeksius lainnya, pathogen serangga mempunyai perilaku spesifik di udara, air, dan yang lain. Spora bakteri, protozoa dan mikrosporidia selalu secara cepat berada di bawah pada suspensi air. Akan tetapi spora cendawan yang sangat kecil dan ringan akan terbawa angin. Nematoda aktif mencari inang. Karakteristik spesifik dari stadia infeksiif patogen sangat dipengaruhi bagaimana patogen itu kontak dan menginfeksi inangnya.

Mikroorganisme patogen sangat rentan terhadap faktor lingkungan. Sedikit sekali dari patogen yang bisa survive dalam beberapa jam pada sinar matahari langsung, dan UV. Beberapa juga sangat rentan pada kondisi kering, temperatur tinggi, *freezing* dan beberapa kemikal lainnya. Kemampuan stadia infeksiif patogen untuk survive di luar inangnya adalah faktor utama dalam pengembangan mikrobial insektisida.

Bioinsektisida adalah esensial karena tidak toksik bagi manusia dan vertebrata lainnya. Umumnya bioinsektisida ini menyerang pada hama tertentu dan jarang yang berdampak buruk pada serangga berguna. Bioinsektisida juga cepat mengalami penurunan aktivitas di lapang (uv, desikasi), dan tidak persisten. Kenyataan ini membuat bioinsektisida itu perlu diaplikasikan berkali-kali (inundasi) untuk memberi efek pengendalaikan yang berarti bagi hama.

Semua patogen serangga mempunyai spesifik sebaran inang yang mana mereka bisa survive dan bereproduksi. Beberapa patogen dapat mempunyai inang yang sangat spesifik dan ada juga mempunyai sebaran inang yang luas. Sebaran inang ini penting dalam introduksi patogen tertentu ke habitat baru.

Di alam bebas patogen sering mematikan serangga hama sehingga berperan penting dalam mempengaruhi perubahan-perubahan populasi serangga hama. Seperti halnya parasitoid dan predator patogen yang berperan sebagai pengendali alamiah, dan sekarang digunakan sebagai agensia pengendalian hayati yaitu yang disebut dengan *microbiocontrol*.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakkan dan Cara Aplikasinya

Secara alami kemampuan patogen serangga menyebabkan sakit pada inangnya sangat tergantung juga pada dosis. Hubungan patogen dan dosis sering dikenal sebagai LD_x yang berarti dosis yang dibutuhkan untuk membunuh inang pada x% dari populasi. ID_x adalah dosis yang dibutuhkan untuk menginfeksi pada x% populasi inang, sedangkan LT_x adalah waktu yang dibutuhkan untuk membunuh pada x% populasi inang.

Bakteri, fungi, nematoda, virus, dan protozoa adalah mikroorganisme umum yang menjadi pathogen serangga. Diantaranya telah tersedia secara komersial sebagai insektisida biologi atau insektisida mikrobial (Tabel 1), akan tetapi ada juga mikroorganisme secara alami dan cepat mendesimasi populasi hama bila didukung dengan kondisi yang tepat. Penggunaan mikroorganisme sebagai bioinsektisida harus terregistrasi dan terlabeli seperti pada insektisida kimia.

Tabel 1. Patogen yang tersedia secara komersial sebagai biological atau mikrobial insektisida (Flint & Dreistadt, 1998).

Patogen	Tipe	Hama
<i>Autographa californica</i> NPV	V	Alfafa looper larvae
<i>Bacillus lentimorbus</i>	B	Japanese beetle larvae, turf grubs, white grubs
<i>Bacillus popilliae</i>	B	Japanese beetle larvae, turf grubs, white grubs
<i>Bacillus sphaericus</i>	B	Mosquito larvae
<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>aizawai</i>	B	Greater wax moth caterpillar in beehives
<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>Kurstaki</i>	B	Caterpillar of butterflies and moths
<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i>	B	Mosquito, blackfly
<i>B.t.</i> ssp. <i>sandiego</i> or <i>tenebrio</i>	B	Leaf beetle larvae
<i>Beauveria bassiana</i>	F	Aphids, cricket, grasshoppers, locusts, thrips, whiteflies
Beet armyworm NPV	V	Beet armyworm larvae
Codling moth granulosis virus	V	Codling moth larvae
Douglas fir tussock moth NPV	V	Douglas fir tussock moth larvae
Gypsy moth NPV	V	Gypsy moth larvae
<i>Heliothis</i> moth NPV	V	Bollworm, tobacco budworm
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	N	Flea beetle, Japanese beetle larvae, root maggots, turf grubs, weevils, white grubs, and soil dwelling insect
<i>Hirsutella thompsonii</i>	F	Citrus rust mite

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakkan dan Cara Aplikasinya

Lagenidium giganteum	F	Mosquito larvae
Metarhizium anisopliae	F	Cockroaches, flies
Nosema locustae	P	Grasshoppers, crickets. Locusts
Paecilomyces fumosoroseus	F	Aphids, whiteflies,
Sawfy NPV	V	Pine sawfy larvae
Steinemema carpocapsae	N	Carpenterworm, clearwing moth larvae, flea beetle, Japanese beetle larvae, root maggots, tuf grubs, weevils, whitw grubs, and soil dwelling
S. feltiae	N	Fungus gnat larvae, and soil dwelling insect

B bacterium F fungus N nematoda P protozoa V virus

Sifat-sifat mikroorganisme yang baik untuk digunakan sebagai agensia *microbiocontrol* antara lain adalah :

- Cepatmenyebar
- Persisten
- Aman dan diterima secara estetis
- Dapat menekan hama sampai ke tingkat sub-economic level
- Hasil pengendalian dapat diramalkan
- Mempunyai virulensi yang tinggi
- Mudah diproduksi secara massal
- Biaya produksi mikroba yang murah
- Mudah disimpan dan mudah cara pemakaiannya

Mikroorganisme yang dapat digunakan untuk pengendalian hayati adalah bakteri, virus jamur, protozoa, rickettsia dan nematoda.

BIOLOGI BAKTERI PATOGEN SERANGGA

Bakteri yang menyerang serangga umumnya termasuk famili *Bacillaceae*, *Lactobacillaceae*, *Brevibacteriaceae* dan *Pseudomonaceae*.

Bakteri patogen serangga dikelompokkan ke dalam empat katagori (Bucher, 1960 cit. Falcon, 1971) yaitu :

- a. Patogen obligat, contohnya *Bacilluseulomarahae*
- b. Bakteri berspora dan membentuk kristal, contohnya *Bacillus thuringiensis var. aizawai*
- c. Patogen fakultatif, contohnya *Serattiaaeruginosa*
- d. Patogen potensial, contohnya *Pseudomonasaeruginosa*

Dewasa ini para ahli patologi serangga dan entomologiwan umumnya banyak menaruh perhatian terhadap bakteri-bakteri pembentuk spora karena ternyata banyak yang patogenesitasnya sangat tinggi terhadap serangga-serangga dan vektorpenyakit.

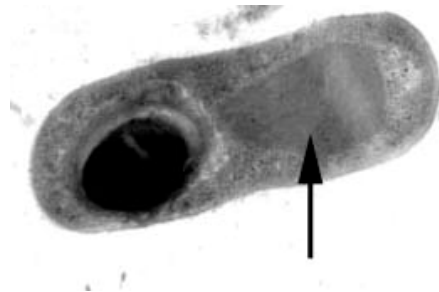
Bakteri pembentuk spora ini membentuk endospora, yang tahan tetap secara dorman di lapangan atau diluar tubuh inang.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Endospora ini bila tertelan oleh serangga inang yang rentan, maka spora tersebut akan tumbuh berkecambah dalam saluran pencernaan. Khususnya untuk bakteri obligat yang tergolong genus *Bacillus*, sel-sel vegetatif yang berkembang setelah perkecambahan spora akan memasuki hemocoel dan merusak jaringan-jaringan tertentu sehingga akan memenuhi rongga tubuh serangga. Fase perkembangan infeksi ini disebut "Septicemia". Sebelum serangga terinfeksi mati akan terbentuk spora-spora berdinding tebal yang tampak keputihan di seluruh integumen, sehingga disebut *milky disease*. Setelah serangga mati, tubuhnya akan mengalami disintegrasi dan spora-spora akan jatuh ke tanah. Penyakit yang menunjukkan gejala demikian adalah *Bacillus popillae* yang menyerang *Popilia japonica*.

Pada bakteri yang membentuk spora yang mengandung kristal, selain mempunyai endospora, juga menghasilkan kristal protein dalam sporangium pada saat terjadinya sporulasi. Kristal ini mengandung endotoksin yang dapat menyebabkan saluran pencernaan mengalami paralisis pada larva jenis Lepidoptera. Kristal protein ini disebut juga sebagai endotoksin.



Gambar Sporangium *Bacillus thuringiensis* yang menunjukkan Kristal (panah) dan spora (perbesaran dengan mikroskop elektron).

Bacillus thuringiensis siap melakukan proliferasi apabila kondisi lingkungan seperti temperatur dan ketersediaan nutrient mendukung, seraya formasi spora telah terbukti dipicu oleh faktor-faktor internal dan eksternal termasuk sinyal untuk kelaparan nutrisi, kepadatan sel, dan perkembangan siklus sel

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

(Hilbert and Piggot, 2004). Siklus hidup Bt dibagi dalam fase-fase, yaitu fase I : pertumbuhan vegetative; fase II: transisi untuk sporulasi; fase III: Sporulasi; fase IV: pematangan spora dan lisis sel (Hilbert and Piggot, 2004; Berbert-Molina *et al.*, 2008). Produksi dari sifat protein Kristal disimpan dalam Kristal pada sel induk telah terbukti terutama pada awal sporulasi (Sedlak *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2005; Guidelli-Thuler *et al.*, 2009; Pérez-García *et al.*, 2010). Sejumlah Cry-gen telah terbukti ditranskripsi dari dua promotor tumpang tindih BtI dan BtII oleh RNA polimerase yang mengandung sporulasi tergantung faktor sigma σE dan σK (Sedlak *et al.*, 2000; Hilbert and Piggot, 2004). dan mutasi di wilayah konsensus dari σE telah terbukti dapat menghambat transkripsi dari promotor BtI dan BtII (Sedlak *et al.*, 2000). Ini juga telah ditunjukkan bahwa beberapa protein Bt insektisida dihasilkan dan disekresikan ke dalam media kultur selama pertumbuhan vegetatif (Estruch *et al.*, 1996; Donovan *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2004; Bhalla *et al.*, 2005; Leuber *et al.*, 2006; Milne *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010; Abdelkefi-Mesrati *et al.*, 2011).

Cry toksin Bt menghasilkan faktor virulensi tambahan yang mengandung fosfolipase C (Palvannan and Boopathy, 2005; Martin *et al.*, 2010), protease (Hajaij-Ellouze *et al.*, 2006; Brar *et al.*, 2009; Infante *et al.*, 2010) and hemolisin (Gominet *et al.*, 2001; Nisnevitch *et al.*, 2010). Faktor virulensi dikendalikan oleh regulator pleiotropic PlcR dan telah menunjukkan bahwa sitotoksitas Bt adalah tergantung pada PlcR (Ramarao and Lereclus, 2006). Penghapusan gen plcR telah terbukti menghasilkan pengurangan drastis virulensi Bt terhadap serangga terinfeksi secara oral (Salamitou *et al.*, 2000). Produksi faktor virulensi oleh Bt diperlukan tetapi tidak cukup untuk Bt disebut patogen (Fedhila *et al.*, 2003) namun produksi protein yang telah terbukti tanpa keraguan untuk menjadi insektisida patogen serangga (Frankenhuyzen, 2009).

Pada proses infeksi, serangga-serangga rentan dapat mati karena racun kristal tadi atau menjadi sangat lemah sehingga bakteri mampu masuk ke dalam hemocoel dan menimbulkan

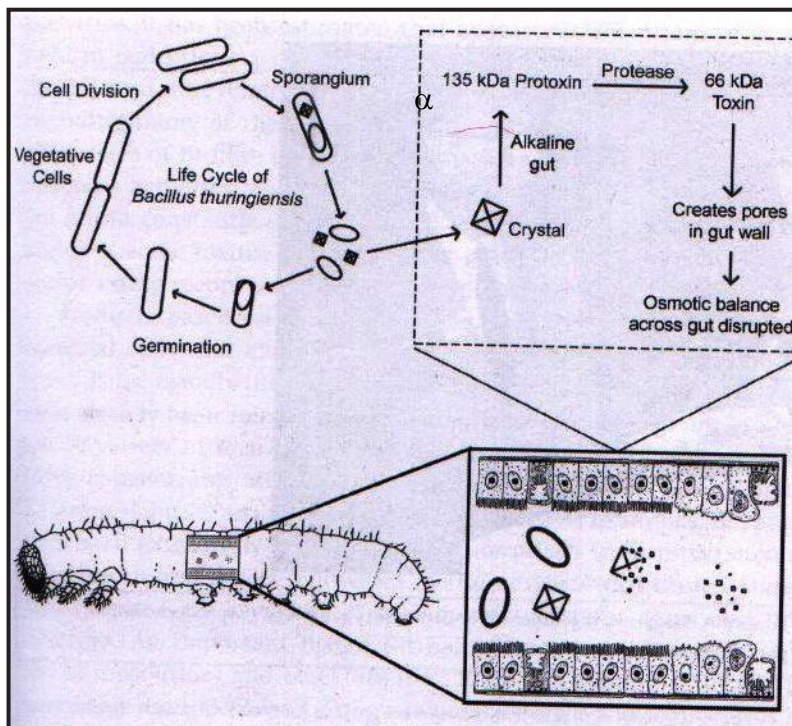
Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

septicemia yang mematikan. Selain kristal tersebut, bakteri pembentuk kristal ini setidaknya-tidaknya menghasilkan tiga macam substansi lain yang bersifat sebagai racun terhadap serangga.

Substansi tersebut masing-masing dikenal sebagai :

α - *eksotoksin*, yaitu suatu enzim yang dihasilkan oleh bakteri yang sedang berkembang berupa fosfolipase- C yang menghancurkan fosfolipida esensial jaringan tubuh serangga ; β - *eksotoksin*, yaitu sekresi sel-sel bakteri pada medium di sekitarnya yang bersifat larut dalam air, tahan panas dan sangat beracun terhadap larva, dan pupa Diptera dan beberapa jenis Lepidoptera. Toksin ini disebut juga “*fly-factor*” atau “*heatstable exotoxin*”; γ -*eksotoksin*, yaitu suatu fosfolipase yang dapat merusak fosfolipida, yang diperkirakan membebaskan asam-asam lemak dari molekul-molekul.

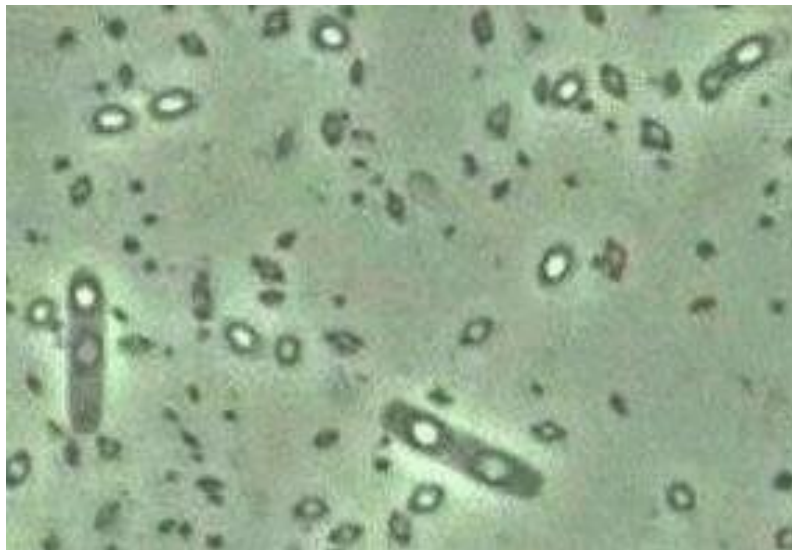


Gambar Siklus hidup *Bacillus thuringiensis* (Tanada dan Kaya, 1993).

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Saluran pencernaan makanan adalah organ yang mula-mula terserang pada proses infeksi bakteri tadi, maka pertanda pertama dari penyakit ini adalah berhubungan dengan perilaku makan dan metabolisme. Larva yang terinfeksi akan terlihat kehilangan nafsu makan, seterusnya tidak lagi makan, diare, paralisis saluran pencernaan dan regurgitasi. Selanjut akan menjadi lemah, tidak mengadakan respon terhadap iritasi, kejang-kejang dan gerakan menjadi tidak teratur; pada serangga terinfeksi menunjukkan perubahan perilaku, misalnya serangga bergerak naik ketempat yang lebih tinggi atau menyembunyikan diri di bawah dedaunan. Jenis bakteri tertentu menunjukkan warna yang khas pada larva yang sudah mati, misalnya berwarna merah menunjukkan infeksi oleh *S. marcescens*. Larva lebah yang terinfeksi *Bacillus alvei* menjadi kuning atau abu-abu, sedangkan yang terserang *Bacillus larvae* menjadi coklat tua, dan lundu kumbang jepang, *Popilia javanica* yang terinfeksi oleh *B. popillae*, sebagian posterior menjadi putih. Kebanyakan infeksi bakteri lainnya menunjukkan warna berubah menjadi coklat kehitaman disebabkan terjadinya dekomposisi akibat bakteri yang menginfeksi.



Gambar Morfologi sel dan kristal *B. thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

CARA ISOLASI BACILLUS THURINGIENSIS DAN PATOGENISITASNYA

Isolasi Bakteri Serangga

Serangga yang terinfeksi disterilisasi dengan memasukan serangga tersebut ke dalam etanol 90 % selama 2 detik, kemudian ke dalam cairan sodium hipoklorit 5 % selama 4 menit, selanjutnya serangga terinfeksi dibersihkan dengan memasukan serangga tersebut ke dalam botol kecil berisi aquades steril, botol digoyang-goyang sebentar. Pencucian dilakukan sebanyak tiga kali. Botol dan aquades steril harus diganti setiap kali dengan yang baru. Serangga yang telah steril diletakkan ke dalam cawan Petri steril, kemudian dipotong sebanyak 3 bagian, dengan menggunakan jarum ose potongan serangga dipindahkan ke dalam cawan Petri yang mengandung media NA. Biakan yang tumbuh diinkubasikan selama 2 hari pada temperatur kamar. Biakan yang terdiri dari dua atau lebih biakan bakteri dipisahkan dengan membiakannya ke dalam media NA dalam cawan Petri. Bakteri yang tumbuh kemudian diinokulasikan kepada serangga sehat untuk melihat gejala serangga yang muncul.

Isolasi bakteri dari Tanah, Air dan Bahan Organik

Bahan yang digunakan terdiri dari air distilasi, Luria-Bertani Broth, 0,25 M sodium acetate pH 6,8, medium T3 (per liter: 3 g tryptone, 2 g Tryptose; 1,5 g yeast extract; 0,05 M sodium phosphate pH 6,8 dan 0,005 g $MnCl_2$), Nutrient Agar, dan Nutrient Broth. Alat yang yang digunakan antara lain cawan petri, tabung reaksi, gelas Erlenmeyer, jarum ose, mikroskop phase contrast.

Sampel bahan dikoleksi dengan mengorek permukaan tanah, bahan organik dan air dengan menggunakan spatula steril dan didapatkan sekitar 10 g sampel yang diperoleh dari kedalaman 2 – 5 cm. Semua sampel ditempatkan dalam plastik klip steril dan disimpan pada suhu 4°C hingga dilakukan proses selanjutnya.



Gambar Kegiatan Pengambilan Sampel Tanah

Isolasi *B. thuringiensis* dilakukan menurut metode yang dilakukan oleh Travers *et al.* (1987). Satu gram dari masing-masing sampel disuspensi ke dalam 10 ml air destilasi steril dan di pasteurisasi pada 80°C selama 30 menit.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Untuk seleksi *B. thuringiensis* satu ml masing-masing suspensi ditambahkan ke 10 ml Luria-Bertani (Merck, Germany) broth (1.0% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1.0% Sodium Chloride (NaCl), pH 7.0) diberi buffer dengan 0,25 M sodium acetate pH 6,8. Suspensi dipanaskan pada 30°C selama empat jam dan kemudian dipanaskan pada suhu 80°C selama 3 menit.

Suspensi diencerkan dan dikulturkan di atas media T3 (per liter: 3 g tryptone, 2 g Tryptose; 1,5 g yeast extract; 0,05 M sodium phosphate pH 6,8 dan 0,005 g MnCl₂), kemudian diinkubasikan pada suhu 30° C selama 24 jam. Koloni yang menunjukkan morfologi yang sama diseleksi dan diperiksa di bawah mikroskop phase-contrast untuk menentukan keberadaan parasporal inclusion dan spora. Semua isolat *B. thuringiensis* dipindah ke dalam media Nutrient Agar miring.



Gambar Sampel Tanah

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakannya dan Cara Aplikasinya



Gambar Pemanasan Ekstrak Sampel Tanah

Dari hasil penelitian eksplorasi lapangan oleh Gazali *et al.* (2015) di daerah lahan pasang surut di Kalimantan Selatan dan Kalimantan Tengah didapatkan 11 isolat *Bacillus thuringiensis* dengan nilai LC_{50} seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai LC_{50} isolat *Bacillus thuringiensis* yang diisolasi pada ekosistem lahan pasang surut (Gazali *et al.*, 2015)

No.	Ekosistem	LC_{50} (Sel/ml)
1.	Pertanaman Padi-Hewan	$1,72 \times 10^{11}$
2.	Padi-Pisang	$2,23 \times 10^{10}$
3.	Pertanaman Padi	$4,52 \times 10^7$
4.	Selokan(Drainase sawah)	$5,30 \times 10^7$
5.	Padi-Kacang	$1,59 \times 10^{10}$
6.	Hutan Rakyat	$5,36 \times 10^{12}$
7.	Perkebunan Karet	$3,83 \times 10^{11}$
8.	Hutan Rakyat	$1,59 \times 10^{11}$
9.	Selokan (Got)	$2,41 \times 10^7$
10.	Kebun Karet	$5,68 \times 10^9$
11.	Sayuran	$1,25 \times 10^8$

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa semakin tinggi konsentrasi, semakin banyak ulat *P. xylostella* yang mati, hal ini disebabkan semakin besar konsentrasi semakin besar dosis *B. thuringiensis* yang termakan oleh ulat. Hal ini sesuai dengan penelitian Damo (1990), yang melakukan skrining *B. thuringiensis* terhadap *Helicoverpa armigera* yang menemukan bahwa semakin tinggi dosis *B. thuringiensis* semakin tinggi mortalitas ulat. Hasil penelitian Gazali *et al.* (1999), juga menemukan bahwa semakin tinggi konsentrasi *B. thuringiensis* semakin tinggi mortalitas ulat *P. xylostella* instar ketiga.

Dari hasil uji patogenesis oleh Gazali *et al.* (2015) di dapat bahwa patogenesis *B. thuringiensis* tertinggi berasal isolat yang diisolasi pada lahan yang berasal dari ekosistem saluran air (selokan/Got) pada hutan dengan nilai LC50 sebesar $2,41 \times 10^7$ sel/ml air (Tabel 2). Tingginya patogenesis *B. thuringiensis* pada saluran air pada ekosistem hutan ini disebabkan menumpuknya bakteri *B. thuringiensis* pada saluran air tersebut dan juga adanya faktor lingkungan yang mendukung berkembangnya populasi *B. thuringiensis* pada ekosistem tersebut yaitu pada saluran air di ekosistem hutan yang ada di tempat eksplorasi lebih tertutup dari sinar violet yang dapat merusak sel bakteri. Menurut Poinar dan Thomas (1984) bahwa factor abiotik sangat berpengaruh dalam mengatur terjadinya infeksi. Faktor abiotik yang sangat berpengaruh yaitu cahaya ultra violet yang dapat merusak spora dan Kristal *B. thuringiensis*, temperatur dan kelembapan dapat mengganggu stabilitas *B. thuringiensis*.

Dari hasil uji efektivitas *B. thuringiensis* yang terpilih didapatkan bahwa aplikasi pestisida berbahan aktif klorfluazuron dan aplikasi *B. thuringiensis* dapat menurunkan intensitas serangan ulat pemakan daun sawi, *P. xylostella* (Tabel 3). Diantara konsentrasi *B. thuringiensis* yang diaplikasikan konsentrasi 4 cc/l mempunyai kemampuan menurunkan serangan yang paling tinggi dengan dibandingkan konsentrasi 3 cc/l dan 2 cc/l, karena semakin tinggi konsentrasi semakin tinggi jumlah sel *B. thuringiensis* yang termakan oleh ulat *P. xylostella*.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Tabel 3. Rata-rata intensitas kerusakan daun yang disebabkan oleh ulat *P. xylostella* setelah diaplikasi dengan larutan *Bacillus thuringiensis* dan pestisida klorfluazuron (Gazali et al. (2015))

No.	Perlakuan	Intensitas Kerusakan Daun (%)
1.	Kontrol ((Diaplikasi dengan air)	67,5 a
2.	Aplikasi Klorfluazuron	21,8 b
3.	Aplikasi <i>B. thuringiensis</i> Konsentrasi 4 cc/l	25,5 c
4.	Aplikasi <i>B. thuringiensis</i> Konsentrasi 3 cc/l	50,1 d
5.	Aplikasi <i>B. thuringiensis</i> Konsentrasi 2 cc/l	56,3 e

Keterangan: nilai rata-rata persentase intensitas kerusakandaunpada kolom yang sama yang diikuti hurup yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Jarak Berganda Duncan padatarap 95%.

Aplikasi *B. thuringiensis* dapat mengakibatkan menurunnya intensitas serangan hal ini disebabkan merusakkan daun akibat serangan ulat *P. xylostella* menurun. Menurut Poinar dan Thomas (1984) gejala serangga yang terinfeksi *B. thuringiensis* adalah menyebabkan serangga berhenti makan, lamban bergerak, dari mulut dan anusnya keluar cairan. Pada serangga yang sudah mati tubuhnya berair, warna kulit tubuhnya menjadi hitam, lunak, mengkerut, berbau busuk, dan setelah beberapa hari menjadi kering dan mengecil.



Gambar Ulat *Plutella xylostella* yang mati karena terinfeksi

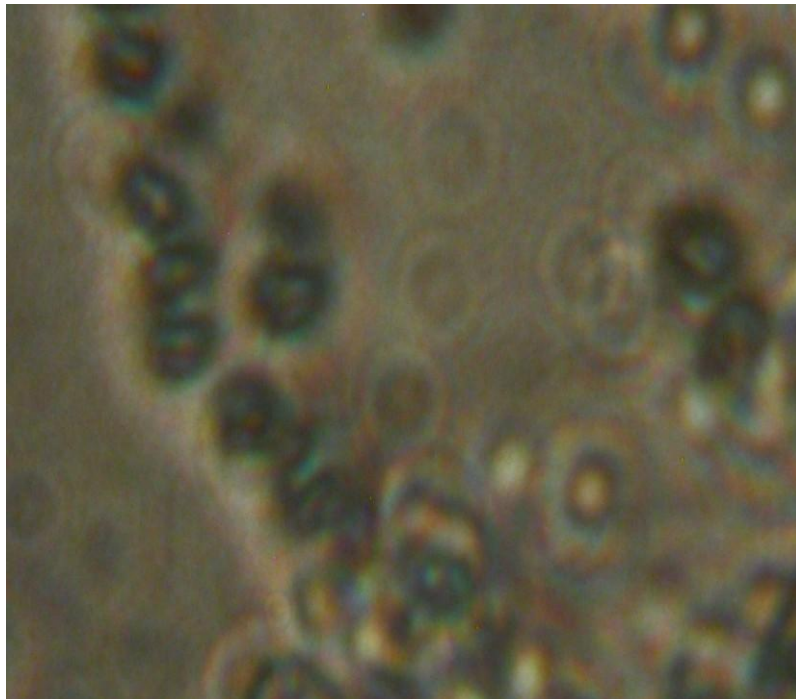
Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Berdasarkan pengamatan jumlah ulat yang mati maka dapat didapatkan hasil bahwa aplikasi perlakuan larutan *B. thuringiensis* dapat menurunkan jumlah ulat *P. xylostella* yang dapat hidup dan penggunaan *B. thuringiensis* dengan konsentrasi 4 cc/l dapat membunuh lebih banyak ulat *P. xylostella* dibandingkan dengan dosis yang lain dan kemampuan membunuhnya sama dengan pestisida organik sintetik Klorfluazuron dengan konsentrasi 2 cc/l (Tabel 4).

Hal ini sesuai dengan penelitian Don-Fronk (1971) mendapatkan bahwa pemberian insektisida mikroba *B. thuringiensis* dengan interval penyemprotan tujuh hari sekali sangat efektif dalam mengendalikan hama-hama kubis.

Menurut Simpati (1985), bahwa deposit *B. thuringiensis* selama tujuh hari setelah aplikasi masih mampu mematikan ulat *P. xylostella* dan *Crocidolomia binotalis*.



Gambar Sel dan Kristal protein dan *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakannya dan Cara Aplikasinya

Tabel 4. Rata-rata jumlah ulat *Plutella xylostella* yang mati akibat aplikasi *Bacillus thuringiensis* dan pestisida Klorfluazuron (Gazali *et al.*, 2015)

No.	Perlakuan	Rata-rata jumlah ulat yang mati
1.	Kontrol ((Diaplikasi dengan air)	0,00 a
2.	Aplikasi Klorfluazuron	23,50 b
3.	Aplikasi <i>B. thuringiensis</i> Konsentrasi 4 cc/l	22,25 b
4.	Aplikasi <i>B. thuringiensis</i> Konsentrasi 3 cc/l	14,75 c
5.	Aplikasi <i>B. thuringiensis</i> Konsentrasi 2 cc/l	12,50 c

Keterangan : nilai rata-rata ulat *Plutella xylostella* yang mati pada kolom yang sama yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 95%.

PERBANYAKAN BACILLUS THURINGIENSIS

Media Kultur Mikrobia

Medium pertumbuhan (disingkat medium) adalah tempat untuk menumbuhkan mikroba. Mikroba memerlukan nutrisi untuk memenuhi kebutuhan energi dan untuk bahan pembangun sel, untuk sintesa protoplasma dan bagian-bagian sel lain. Setiap mikroba mempunyai sifat fisiologi tertentu, sehingga memerlukan nutrisi tertentu pula.

Susunan kimia sel mikroba relatif tetap, baik unsur kimia maupun senyawa yang terkandung di dalam sel. Dari hasil analisis kimia diketahui bahwa penyusun utama sel adalah unsur kimia C, H, O, N, dan P, yang jumlahnya + 95 % dari berat kering sel, sedangkan sisanya tersusun dari unsur-unsur lain (Lihat Tabel). Apabila dilihat susunan senyawanya, maka air merupakan bagian terbesar dari sel, sebanyak 80-90 %, dan bagian lain sebanyak 10-20 % terdiri dari protoplasma, dinding sel, lipida untuk cadangan makanan, polisakarida, polifosfat, dan senyawa lain.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Tabel 5. Susunan unsur-unsur penyusun sel bakteri *E. coli*

Unsur-unsur kimia	Persentase berat kering
Carbon (C)	50
Oksigen (O)	20
Nitrogen (N)	14
Hidrogen (H)	8
Fosfor (P)	3
Belerang (S)	1
Kalium (K)	1
Natrium (Na)	1
Kalsium (Ca)	0,5
Magnesium (Mg)	0,5
Klor (Cl)	0,5
Besi (Fe)	0,2
Lain-lain	0,3

Fungsi Nutrisi untuk Mikrobia

Setiap unsur nutrisi mempunyai peran tersendiri dalam fisiologi sel. Unsur tersebut diberikan ke dalam medium sebagai kation garam anorganik yang jumlahnya berbeda-beda tergantung pada keperluannya. Beberapa golongan mikroba misalnya diatomea dan alga tertentu memerlukan silika (Si) yang biasanya diberikan dalam bentuk silikat untuk menyusun dinding sel. Fungsi dan kebutuhan natrium (Na) untuk beberapa jasad belum diketahui jumlahnya. Natrium dalam kadar yang agak tinggi diperlukan oleh bakteri tertentu yang hidup di laut, alga hijau biru, dan bakteri fotosintetik. Natrium tersebut tidak dapat digantikan oleh kation monovalen yang lain.

Jasad hidup dapat menggunakan makanannya dalam bentuk padat maupun cair (larutan). Jasad yang dapat menggunakan makanan dalam bentuk padat tergolong tipe *holozoik*, sedangkan yang menggunakan makanan dalam bentuk cair tergolong tipe holofitik. Jasad holofitik dapat pula menggunakan makanan dalam bentuk padat, tetapi makanan

tersebut harus dicernakan lebih dulu di luar sel dengan pertolongan enzim ekstraseluler. Pencernaan di luar sel ini dikenal sebagai *extracorporeal digestion*. Bahan makanan yang digunakan oleh jasad hidup dapat berfungsi sebagai sumber energi, bahan pembangun sel, dan sebagai aseptor atau donor elektron. Dalam garis besarnya bahan makanan dibagi menjadi tujuh golongan yaitu air, sumber energi, sumber karbon, sumber aseptor elektron, sumber mineral, faktor tumbuh, dan sumber nitrogen.

Penggolongan Mikroba Berdasarkan Nutrisi dan Oksigen

Berdasarkan sumber karbon

Berdasarkan atas kebutuhan karbon jasad dibedakan menjadi jasad ototrof dan heterotrof. Jasad ototrof ialah jasad yang memerlukan sumber karbon dalam bentuk anorganik, misalnya CO₂ dan senyawa karbonat. Jasad heterotrof ialah jasad yang memerlukan sumber karbon dalam bentuk senyawa organik.

Jasad heterotrof dibedakan lagi menjadi jasad saprofit dan parasit. Jasad saprofit ialah jasad yang dapat menggunakan bahan organik yang berasal dari sisa jasad hidup atau sisa jasad yang telah mati. Jasad parasit ialah jasad yang hidup di dalam jasad hidup lain dan menggunakan bahan dari jasad inang (hospes)-nya. Jasad parasit yang dapat menyebabkan penyakit pada inangnya disebut jasad patogen.

Berdasarkan sumber energi

Berdasarkan atas sumber energi jasad dibedakan menjadi jasad fototrof, jika menggunakan energi cahaya; dan khemotrof, jika menggunakan energi dari reaksi kimia. Jika didasarkan atas sumber energi dan karbonnya, maka dikenal jasad fotoototrof, fotoheterotrof, khemoototrof dan khemoheterotrof.

Berdasarkan Sumber Donor Elektron

Berdasarkan atas sumber donor elektron jasad digolongkan menjadi jasad litotrof dan organotrof. Jasad litotrof ialah jasad yang dapat menggunakan donor elektron dalam bentuk senyawa anorganik seperti H_2 , NH_3 , H_2S , dan S. jasad organotrof ialah jasad yang menggunakan donor elektron dalam bentuk senyawa organik.

Berdasarkan Sumber Energi dan Donor Elektron

Berdasarkan atas sumber energi dan sumber donor elektron jasad dapat digolongkan menjadi jasad fotolitotrof, fotoorganotrof, khemolitotrof, dan khemoorganotrof. Perbedaan keempat golongan jasad tersebut sbb:

Jasad	Sumber Energi	Sumber Donor	Contoh
Fotolitotrof	Cahaya	Zat anorganik	Tumbuhan tingkat tinggi, alga
Fotoorganotrof	Oksidasi zat anorganik	Zat organik	Bakteri belerang fotosintetik
Khemolitotrof	Oksidasi zat organik	Zat anorganik	Bakteri besi, bakteri hydrogen, bakteri nitrifikasi
Khemoorganotrof		Zat organik	Jasad heterotrof

Berdasarkan Kebutuhan Oksigen

Berdasarkan akan kebutuhan oksigen, jasad dapat digolongkan dalam jasad aerob, anaerob, mikroaerob, anaerob fakultatif, dan kapnofil. Pertumbuhan mikroba di dalam media cair dapat menunjukkan sifat berdasarkan kebutuhan oksigen. Jasad aerob ialah jasad yang menggunakan oksigen bebas (O_2) sebagai satu- satunya aseptor hidrogen yang terakhir dalam proses respirasinya. Jasad anaerob, sering disebut anaerob obligat atau anaerob 100% ialah jasad yang tidak dapat menggunakan oksigen bebas sebagai aseptor hidrogen terakhir dalam proses respirasinya. Jasad mikroaerob ialah jasad yang hanya memerlukan oksigen dalam jumlah yang sangat sedikit. Jasad aerob fakultatif ialah jasad yang dapat hidup dalam keadaan anaerob maupun aerob. Jasad ini juga bersifat anaerob toleran. Jasad kapnofil ialah jasad yang memerlukan kadar oksigen rendah dan kadar CO_2 tinggi.

Interaksi Antar Jasad dalam Menggunakan Nutrien

Jika dua atau lebih jasad yang berbeda ditumbuhkan bersama- sama dalam suatu medium, maka aktivitas metabolismenya secara kualitatif maupun kuantitatif akan berbeda jika dibandingkan dengan jumlah aktivitas masing- masing jasad yang ditumbuhkan dalam medium yang sama tetapi terpisah.

Fenomena ini merupakan hasil interaksi metabolisme atau interaksi dalam penggunaan nutrisi yang dikenal sebagai sintropik atau sintropisme atau sinergitik. Sebagai contoh ialah bakteri penghasil metan yang anaerob obligat tidak dapat menggunakan glukosa sebagai substrat, tetapi bakteri tersebut akan segera tumbuh oleh adanya hasil metabolisme bakteri anaerob lain yang dapat menggunakan glukosa.

Contoh lain ialah biakan campuran yang terdiri atas dua jenis mikroba atau lebih sering tidak memerlukan faktor tumbuh untuk pertumbuhannya. Mikroba yang dapat mensintesis bahan selnya dari senyawa organik sederhana dalam medium, akan mengekskresikan berbagai vitamin atau asam amino yang sangat penting untuk mikroba lainnya.

Adanya ekskresi tersebut memungkinkan tumbuhnya mikroba lain. Kenyataan ini dapat menimbulkan koloni satelit yang dapat dilihat pada medium padat. Koloni satelit hanya dapat tumbuh kalau ada ekskresi dari mikroba lain yang menghasilkan faktor tumbuh esensiil bagi mikroba tersebut.

Bentuk interaksi lain adalah *cross feeding* yang merupakan bentuk sederhana dari simbiose mutualistik. Dalam interaksi ini pertumbuhan jasad yang satu tergantung pada pertumbuhan jasad lainnya, karena kedua jasad tersebut saling memerlukan faktor tumbuh esensiil yang diekskresikan oleh masing- masing jasad.

Medium Pertumbuhan Mikrobia

Susunan dan kadar nutrisi suatu medium untuk pertumbuhan mikroba harus seimbang agar mikroba dapat tumbuh optimal. Hal ini perlu dikemukakan mengingat banyak senyawa yang menjadi zat penghambat atau racun bagi mikroba jika kadarnya terlalu tinggi (misalnya garam dari asam lemak, gula, dan sebagainya).

Banyak alga yang sangat peka terhadap fosfat anorganik. Disamping itu dalam medium yang terlalu pekat aktivitas metabolisme dan pertumbuhan mikroba dapat berubah. Perubahan faktor lingkungan menyebabkan aktivitas fisiologi mikroba dapat terganggu, bahkan mikroba dapat mati.

Medium memerlukan kemasaman (pH) tertentu tergantung pada jenis jasad yang ditumbuhkan. Aktivitas metabolisme mikroba dapat mengubah pH, sehingga untuk mempertahankan pH medium ditambahkan bahan buffer. Beberapa komponen penyusun medium dapat juga berfungsi sebagai buffer.

Macam Medium Pertumbuhan

Medium dasar/ basal mineral

Medium dasar adalah medium yang mengandung campuran senyawa anorganik. Medium dasar ini selanjutnya ditambah zat lain apabila diperlukan, misalnya sumber karbon, sumber energi, sumber nitrogen, faktor tumbuh, dan faktor lingkungan yang penting seperti pH dan oksigen serta tekanan osmosis.

Medium sintetik

Medium sintetik adalah medium yang seluruh susunan kimia dan kadarnya telah diketahui dengan pasti. Sebagai contoh adalah medium dasar yang ditambah NH_4Cl (medium 1) dengan sumber karbon berupa gas CO_2 , apabila diinkubasikan dalam keadaan gelap dapat digunakan untuk menumbuhkan bakteri nitrifikasi khemoototrof, misalnya bakteri *Nitrosomonas*. Bakteri ini memperoleh energi dari oksidasi amonium, selain itu amonium juga berfungsi sebagai sumber nitrogen.

Contoh lain adalah medium dengan susunan sama dengan medium 1 tetapi ditambah glukosa (medium 2). Dalam keadaan aerob merupakan medium untuk perbanyakan jamur dan bakteri yang bersifat heterotrof. Glukosa berfungsi sebagai sumber karbon dan sumber energi. Dalam keadaan anaerob, medium ini dapat digunakan untuk menumbuhkan bakteri fakultatif anaerob maupun anaerob obligat. Energi diperoleh dari hasil fermentasi glukosa.

Untuk menumbuhkan mikroba yang memerlukan faktor tumbuh dapat menggunakan medium yang komposisinya sama dengan medium 2 tetapi ditambah asam nikotinat (vitamin) sebagai faktor tumbuh (medium 3).

Medium kompleks

Medium kompleks adalah medium yang susunan kimianya belum diketahui dengan pasti. Sebagai contoh medium ini adalah medium dasar yang ditambah glukosa dan ekstrak khamir (medium 4). Susunan kimia ekstrak khamir tidak diketahui secara pasti, tetapi mengandung berbagai faktor tumbuh yang sering diperlukan oleh mikroba. Medium ini dapat untuk menumbuhkan mikroba khemoheterotrof aerob maupun anaerob baik yang memerlukan maupun yang tidak memerlukan faktor tumbuh.

Medium yang juga termasuk medium kompleks adalah yang mengandung ekstrak tanah.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Contoh susunan medium dasar dan medium sintetik :

Medium dasar	Bahan tambahan			
	Medium 1	Medium 2	Medium 3	Medium 4
Air, 1 liter K ₂ HPO ₄ , 1 gram MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,2 gram FeSO ₄ .7H ₂ O, 0,01 gram CaCl ₂ , 0,01 gram Unsur mikro (garam Anorganik Mn, Mo, Cu, Co, Zn), masing- masing 0,02- 0,5 mg	NH ₄ Cl, 1 gram	Glukosa, 5 gram NH ₄ Cl, 1 gram	Glukosa, 5 gram NH ₄ Cl, 1 gram Asam nikotinat, 0,1 gram	Glukosa, 5 gram Ekstrak khamir

Medium diperkaya

Medium diperkaya adalah medium yang ditambah zat tertentu yang merupakan nutrisi spesifik untuk jenis mikroba tertentu.

Medium ini digunakan untuk membuat kultur diperkaya (*enrichment culture*) dan untuk mengisolasi mikroba spesifik, dengan cara mengatur faktor lingkungan (suhu, pH, cahaya), kebutuhan nutrisi spesifik dan sifat fisiologinya.

Dengan demikian dapat disusun medium diperkaya untuk bakteri yang bersifat khemoheterotrof, khemoototrof, fotosintetik, dan untuk mikroba lain yang bersifat spesifik.

Beberapa Medium Patogen Serangga

A. Caprylate-thallos Agar (CTA)

Larutan A :

1. 0,15 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Magnesium sulphate heptahydrate
2. 0,68 g KH_2PO_4 Potassium dihydrogen orthophosphate
3. 2,61 g K_2HPO_4 Diptassium hydrogen orthophosphate anhydrous
4. 1,0 ml $CaCl_2$ Calcium chloride solution (1%)
5. 10,0 ml Trace element solution (lihat di bawah)
6. 1,1 ml $CH_3(CH_2)_6.COOH$ n-octanoic acid (caprylic acid)
7. 0,25 g Tl_2SO_4 Thallous sulphate
8. 0,1 g yeast extract

Perhatian : Hati-hati mengambil thallos sulphate (Racun ekstrem bila terhirup pernapasan). Cegah kontak dengan kulit, mata, dan pakaian.

Tambahkan 500 ml air destilata, tambahkan masing-masing bahan secara lengkap, sebelum penambahan berikutnya. Atur pH 7,2. (Gunakan K_2HPO_4 untuk meningkat pH, KH_2PO_4 untuk menurunkan).

Larutan A dapat dibuat sampai satu minggu ke depan, distrilisasikan dan disimpan pada suhu 4°C.

Larutan B :

1. 7,0 g NaCl Sodium chloride
2. 1,0 g $(NH_4)_2SO_4$ Ammonium sulphate

Larutkan dalam 500 ml air detilata. Atur pH sampai 7,20 (Gunakan K_2HPO_4 untuk meningkat pH, KH_2PO_4 untuk menurunkan). Tambahkan 15 g Difto agar. Tambahkan batang pengaduk magnet, panaskan sampai mendidih.

Sterilisasikan larutan A dan larutan B secara terpisah selama 15 menit pada 121°C, 15 psi. Tambahkan larutan A ke

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

larutan B secara aseptis, aduk. Untuk mencegah pengendapan terjadi, tuangkan agar saat masih panas.

Trace element solution untuk CTA

1. 1,96 g H₃PO₄ Trihydrogen phosphate
2. 0,055 g FeSO₄.7 H₂O Ferrous sulphate heptahydrated
3. 0,0287 g ZnSO₄.7H₂O Zinc silphate hepta hydrated
4. 0,0223 g MnSO₄.H₂O Manganous sulphate hydrated
5. 0,0025 g CuSO₄.5H₂O Cupric sulphate hydrated
6. 0,003 g Co(NO₃)₂.6H₂O Cobaltous nitrate hexa hydrated
7. 0,002 g H₃BO₃ Boric acid powder

Larutkan dalam 1 l air destilata, simpan pada temperatur 4°C.

B. Deoxyribonuclease Agar (DNase)

Metode : Buat 1 liter (45 – 50 plate)

Larutan A :

1. 900 ml Air destilata
2. 37,8 g DNase agar

Tambahkan pengaduk magnetik; larutkan agar dalam air, panaskan sampai mendidik.

Larutan B :

1. 90 ml Air destilata
2. 0,09 g Toluidine blue O

Larutkan indicator dalam air; aduk rata.

Sterilisasikan kedua larutan secara terpisah selama 15 menit pada 121°C, 15 psi. Tambahkan larutan B ke larutan A; aduk sebelum dituang.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

C. Adonitol Agar

Metode : Buat 1 liter

1. 8,33 g peptone
2. 4,17 g NaCl (sodium chloride)

Larutkan secara sempurna ke dalam air destilata. Atur pH 7,4.

Tambahkan :

1. 10 ml Larutan Bromothymol blue. (lihat bawah)
2. 5,0 g Adonitol (larutkan dalam 20 ml air destilata)

Tambahkan air destilata sehingga larutan menjadi 1 liter.

Tambah :

12,5 g Bacto agar

Tambahkan sebuah pengaduk magnetik; panaskan sampai mendidih. Sterilisasikan selama 30 menit pada 121°C, 15 psi; Tuangkan selagi masih panas.

Larutan Bromothymol blue

1. 0,2 g Bromothymol blue
2. 5,0 ml 0,1 M NaOH Sodium hydroxide
3. 95,0 ml Air Destillata

Sterilisasi selama 15 menit pada 121°C, 15 psi. Simpan pada temperatur ruang.

D. Itaconate Agar

Metode : Buat 1 liter

1. 6,0 g Na₂HPO₄ Sodium phosphate (dibasic)
2. 3,0 g KH₂PO₄ Potassium phosphate (monobasic)
3. 0,5 g NaCl Sodium chloride
4. 1,0 g NH₄Cl Ammonium chloride

Larutkan bahan dalam 1 liter air destilata secara berurutan. Atur pH 7,0. Tambahkan :

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

15 g Difco Agar. Tambahkan pengaduk magnetik, panaskan sampai mendidih. Sterilisasi selama 30 menit pada 121°C, 15 psi. Biarkan dingin. Sebelum dituang, tambahkan :

1. 10 ml 0,01 M larutan CaCl₂ (steril)
2. 1 ml 1 M larutan MgSO₄·7H₂O (steril)
3. 10 ml 20 % larutan itaconate (filter steril)

E. J-medium

Metode : Buat 1 liter

1. 5,0 g Tryptone
2. 15,0 Yeast Ekstrak
3. 3,0 g K₂HPO₄ Dipotassium hydrogen orthophosphate anhydrous (potassium phosphate)
4. 1,0 g Glucose (filter sterilized)
5. 1000 ml air destilata

Larutkan bahan-bahan ke dalam air destilata. Atur pH antara 7,3 – 7,5. Bila menginginkan medium padat, tambahkan 20 g agar dan sebuah pengaduk magnetik; panaskan sampai mendidih. Sterilisasi selama 15 menit pada 121°C, 15 psi. Tambahkan glucose setelah campuran dingin.

F. Luria Bertani agar

Metode : buat 1 liter.

1. 15,0 Agar
2. 10,0 g Tryptone
3. 10,0 g NaCl Sodium chloride
4. 5,0 g Yeast extract

Larutkan bahan dalam air destilata. Tambahkan pengaduk magnetik. Atur pH 7,5. Sterilkan selama 15 menit pada 121°C, 15 psi.

G. Luria Bertani broth

Metode : Buat 1 liter

1. 10,0 g Pacreatic digest of casein
2. 10,0 g NaCl Sodium chloride
3. 5,0 g Yeast extract

Larutkan bahan-bahan ke dalam air destilata. Tambahkan pengaduk magnetik, panaskan sampai mendidih. Atur pH 7,2. Sterilisasi selama 15 menit pada 121°C, 15 psi.

H. MYPGP medium

Metode : Buat 1 liter.

1. 10,0 g Mueller-Hinton broth
2. 10,0 g Yeast extract
3. 3,0 K₂HPO₄ Di-potassium hydrogen orthophosphate anhydrous (Potassium phosphate)
4. 1,0 g C₃H₃O₃Na Sodium pyruvate
5. 0,5 g Glucose (filter sterilized)
6. 1.000,0 ml Air destilata

Larutkan bahan-bahan ke dalam air destilata. Atur pH 7,1. Bila menginginkan medium pada tambahkan 20 g agar dan pengaduk magnetik; panaskan sampai mendidih. Sterilisasi selama 15 menit pada 121°C, 15 psi. Tambahkan Glucose setelah campuran dingin.

I. Nutrient agar

Metode : Buat 1 liter,

1. 5,0 g Peptone
2. 3,0 g Beef extract
3. 15,0 g Agar
4. 1.000,0 ml Air destilata

Larutkan bahan-bahan ke dalam air destilata. Tambahkan pengaduk magnetik; panaskan sampai mendidih. Atur pH 6,8. Sterilisasikan selama 15 menit pada 121°C, 15 psi.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

J. NYSagar

Metode : Buat 1 liter

1. 1,0 g Nutrient Broth
2. 1,0 g Tryptone
3. 2,0 g Casamino acid
4. 0,5 g Yeast extract
5. 15 g Agar.

Larutkan bahan-bahan ke dalam air destilata. Tambahkan pengaduk magnetik; panaskan sampai mendidih. Atur pH 7,2. Sterilisasikan selama 15 menit pada 121°C, 15 psi.

K. PEMBA

Metode : Buat 1 liter.

1. 1,0 g Peptone
2. 10,0 g D-Mannitol
3. 0,1 g MgSO₄·7H₂O Magnesium sulphate heptahydrate
4. 2,0 g NaCl Sodium chloride
5. 2,5 g Na₂HPO₄ Sodium phosphate (dibasic)
6. 0,25 g KH₂PO₄ Potassium dihydrogen orthophosphate
7. 0,12 g Bromothymol blue (water soluble)
8. 18,0 g Agar
9. 1.000,0 ml Air destilata.

Larutkan bahan-bahan ke dalam air destilata. Atur pH 7,4. Masukkan 90 ml ke dalam botol. Sterilisasi selama 15 menit pada 121°C, 15 psi. Tambahkan larutan berikut untuk setiap botol agar yang dicairkan dan didinginkan (50°C) :

5,0 ml 20% w/v C₃H₃O₃Na Sodium pyruvate filter sterilized

100 unit/ml Polymyxin, filter sterilized

5,0 ml emulsi kuning telur (Oxoid SR 47)

Jika sampel yang dicurigai mengandung sejumlah besar jamur harus diperiksa, 1 ml 0,4% (b/v) actidione filter sterilisasi, juga dapat ditambahkan.

Teknik Perbanyakkan Bakteri

Teknik perbanyakkan patogen serangga tergantung pada macam substrat yang dipakai dan cocok untuk tumbuhnya patogen yang bersangkutan. Sudah barang tentu bahwa patogen-patogen tersebut akan mudah tumbuh pada inangnya sendiri, akan tetapi banyak diantara inang tersebut tidaklah mudah untuk didapatkan, dan cara pemeliharaannya pun di laboratorium sukar, serta akan memakan waktu yang lama. Oleh karena itu pembiakkan pada media buatan menjadi salah satu alternatif yang dipandang lebih menguntungkan. Dewasa ini pembiakkan secara massal memakai media buatan telah digunakan untuk bakteri, jamur, protozoa, dan nematoda khususnya untuk jenis-jenis tertentu.

Mengingat sifat hubungan patogen-inang adalah spesifik, maka dibutuhkan pula kondisi yang spesifik bilamana patogen itu dibiakkan secara *in vitro*. Produksi substansi zat beracun dari sel-sel mikroba juga mempersyaratkan kondisi proliferasi yang cocok, dan menghasilkan substansi yang maksimum ada kemungkinan diperoleh dengan adanya distorsi spesifik dari pertumbuhan atau metabolisme mikroba tersebut. Produktifitas umumnya tergantung pada potensi intrinsic dari sel itu sendiri dan pada mekanisme yang menguasai dan mempengaruhi fungsi-fungsi sel. Perlakuan tertentu terhadap proses pertumbuhan untuk mempengaruhi proses metabolisme dan sifat genetik mikroba sangat diperhatikan dalam proses-proses fermentasi.

Dalam upaya menghasilkan mikro organisme atau produknya secara komersil, selalu dibutuhkan seleksi untuk mendapatkan strain tertentu yang lebih baik dan bahkan sering diperlukan modifikasi spesifik terhadap karakteristik mikro organisme yang bersangkutan. Upaya demikian itu dimaksudkan agar dengan fermentasi yang secara ekonomis diperoleh pertumbuhan yang menghasilkan peningkatan produk yang diinginkan. Hal itu dimungkinkan dengan terjadinya mutasi, yaitu terjadinya perubahan genetik pada sel-

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

sel yang disebabkan oleh unsur-unsur mutagenik, atau terjadinya pemindahan bahan genetik tertentu ke dalam sel. Jadi akan diperoleh varian-varian yang dapat diseleksi dengan metode yang tepat dan mudah dilakukan.

Sering terjadi bahwa seleksi terhadap varian-varian yang timbul sukar dilakukan, namun demikian dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi yang semakin berkembang, cara-cara seleksi varian merupakan salah satu cara yang dapat menghasilkan varian yang berkualitas “baik” yang diinginkan.

Pemeliharaan Kultur

Pemindahan biakan yang terus-menerus dilakukan pada media buatan dapat menimbulkan perubahan-perubahan yang buruk, misalnya kemampuan sporulasi menjadi menurun.

Mengenai patogen-patogen serangga yang virulensi menjadi sangat menurun karena dibiakkan di luar tubuh inangnya telah banyak dilaporkan (Dulmage dan Rhodes, 1971). Patogenisitas maupun sporogenesis umumnya dapat dipulihkan dengan cara melakukan infeksi ulang pada jenis inang aslinya dan dari sini diisolasi dan dibiakkan kembali.

Cara untuk mempertahankan mutu biakan yang sampai saat ini yang dipandang paling baik adalah cara : 1) Liofilisasi, dimana spora sel-sel vegetatif ditaruh dalam serum steril dan cepat dibekukan dalam tabung yang ditempatkan dalam karbon dioksida kering (dry ice), dan dikeringkan dalam keadaan vakum; tabungnya ditutup dengan cermat dan kemudian disimpan, cara lain adalah 2) Menyimpan biakan dalam refrigerator; 3) Dibekukan dalam nitrogen cair, dan 4) Penyimpanan spora dalam tanah kering yang steril.

Media

Sel-sel mikroba membutuhkan air, karbon untuk biosintesis dan energi, nitrogen, unsur-unsur mineral dan zat-zat pertumbuhan. Takaran dan bentuk berbagai substansi tersebut

tergantung pada proses fermentasi yang dipakai. Misalnya suatu bahan sumber karbon yang baik untuk fermentasi semi padat belum tentu baik untuk fermentasi kultur tenggelam. Tambahan pula, bahwa kebutuhan-kebutuhan untuk proses-proses spesifik sangat dipengaruhi oleh jenis organisme yang bersangkutan dan kondisi fisiologik yang diinginkan.

Ada kalanya pertumbuhan optimum atau produk yang dihasilkan hanya dapat diperoleh dengan komposisi medium yang sangat spesifik; tetapi dalam hal lain, suatu organisme dapat tumbuh baik pada media yang bervariasi tanpa menunjukkan sesuatu efek pada fermentasi.

Selanjutnya biakan kita lihat lebih mendalam mengenai berbagai kebutuhan mikroba tersebut di atas :

1. Sumber Karbon

Karbon merupakan bahan utama sintesis bahan sel atau produknya. Pada umumnya karbohidrat merupakan sumber karbon yang paling mudah didapat dan murah. Polisakarida tidak dapat masuk sel, dan organisme yang menggunakannya membentuk enzim-enzim hidrolitik ekstraseluler.

Bahan berupa pati, misalnya dapat digunakan dalam fermentasi *B. thuringiensis* karena organisme ini umumnya merupakan penghasil amylase aktif. Gula murni tidak dipakai karena pertimbangan ekonomi. Biasanya bahan padi-padian, limbah atau sisa-sisa penggilingan padi-padian, atau pati yang terhidrolisis enzim dapat mencukupi karbohidrat yang dibutuhkan.

Sel-sel merupakan produk utama dari karbon dalam fermentasi; sebanyak 3-5 gram sel jamur, atau 1-3 gram sel bakteri, dan 1-5 gram sel yeast dapat dihasilkan dari setiap 100 ml fermentasi kultur tenggelam, Jadi pada dasarnya berbagai macam karbohidrat dapat dipilih untuk digunakan sebagai sumber karbon.

2. Sumber Nitrogen

Pemenuhan kebutuhan nitrogen bagi mikroorganisme dapat diperoleh dari garam-garam amonium. Biasanya nitrogen organik harus diberikan dalam bentuk sebagai asam-asam amino tunggal ataupun kompleks, termasuk peptida-peptida spesifik, asam nukleat dan vitamin. Kelompok organisme parasitik memerlukan kebutuhan yang lebih bervariasi dibandingkan dengan organisme saprofitik.

Biasanya organisme akan tumbuh lebih cepat bila diberikan nitrogen organik, walaupun bahan itu bukan termasuk yang esensial. Bahan-bahan yang kaya protein yang berasal dari tumbuhan atau hewan, misalnya kacang, kedelai, rendaman jagung, tepung biji kapas bebas minyak, ekstrak yeast, air dadih atau hidrolisat kasein. Banyaknya sumber karbon dalam suatu medium sering sekali sangat menentukan pada takaran senyawa-senyawa nitrogen yang harus diberikan. Banyak patogen tertentu dengan karakteristiknya masing-masing untuk kebutuhannya yang kompleks mungkin memerlukan serum hewan atau hemolimfe serangga.

3. Unsur-Unsur Mineral

Garam-garam anorganik adalah esensial untuk pertumbuhan mikroorganisme. Disini termasuk kalium, magnesium, fosfor, sulfur, dan dalam jumlah yang lebih sedikit dibutuhkan kalsium, seng, besi, kobalt, tembaga, molybdenum, mangan, atau mineral-mineral lainnya. Mikroorganisme pada suatu aktivitas kehidupan tertentu di luar kebutuhan untuk pertumbuhannya.

Misalnya, mangan dibutuhkan untuk sporulasi dan kalsium untuk stabilitas panas dalam spora. Biasanya, unsur-unsur yang dibutuhkan dalam jumlah yang sangat sedikit dapat terpenuhi secara kebetulan dari air dan substrat kasar (bahan mentah fermentasi). Perlu diketahui bahwa air di alam kadang-kadang mengandung unsur-unsur yang berbahaya, dalam hal ini, air suling adalah lebih baik.

4. **Zat-zat Pertumbuhan**

Vitamin-vitamin yang esensial sebagai komponen pada sistem enzim adalah dibutuhkan oleh semua sel mikroba, vitamin tersebut harus ditambahkan bila mikroba tidak mampu mensintesisnya. Berbagai faktor lain untuk keberhasilan biakan adalah pH, O₂, dan suhu. Pertumbuhan optimum pada kebanyakan bakteri terjadi bila mendekati pH 7; yeast dan jamur dapat tahan terhadap kondisi asam yang lebih tinggi, walaupun kondisi itu belum tentu yang lebih disukai. Selama pertumbuhan, produk metabolisme mikroba sering menyebabkan perubahan pH dan perubahan lebih lanjut dapat terus terjadi bila pertumbuhan memuncak karena metabolisme produk primer berikutnya. Sering terjadi pemakaian karbohidrat akan menurunkan pH medium, sedangkan pada pemakaian protein meningkatkan pH. Dalam hal demikian, kisaran pH yang diperlukan selama fermentasi harus menjadi pertimbangan pula dalam menentukan macam dan jumlah bahan yang digunakan. pH dalam fermentasi umumnya dapat dikendalikan dengan penggunaan buffer atau penambahan asam atau basa steril secara otomatis.

Kebutuhan oksigen ternyata berbeda-beda untuk tiap mikroorganisme, bahkan untuk kebutuhan suatu fase pertumbuhan berikutnya. Suplai oksigen yang selalu sesuai biasanya sukar dipenuhi pada biakan yang pertumbuhannya cepat, dan akan dibicarakan pada sub bab fermentasi skala besar.

Selanjutnya mengenai suhu, umumnya hampir semua mikroorganisme toleran terhadap kisaran suhu yang agak lebar selama terjadi proliferasi. Suhu yang optimum, baik untuk memproduksi sel ataupun produknya haruslah ditentukan secara empiris. Biasanya, suhu optimum berada sedikit dibawah suhu maksimum untuk pertumbuhan, dan suhu yang paling baik untuk menghasilkan produknya sering sekali tidak sama dengan suhu maksimum untuk pertumbuhan. Pertumbuhan optimum patogen serangga diperkirakan terjadi pada suhu mendekati keadaan suhu pertumbuhannya pada serangga (25-32oC), ini bervariasi menurut daerah dan iklim. Mengingat bahwa strain-

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakannya dan Cara Aplikasinya

strain patogen serangga itu teradaptasi dengan suhu di lapangan, maka paling baik bila patogen tersebut diproduksi pada suhu yang kompatibel dengan daerah dimana patogen itu akan diaplikasikan.

Teknik perbanyakkan patogen tergantung pada macam substrat yang dipakai dan cocok untuk tumbuhnya patogen yang bersangkutan. Sudah barang tentu bahwa patogen-patogen tersebut akan mudah tumbuh pada inangnya sendiri, akan tetapi banyak diantara inang tersebut tidaklah mudah untuk didapatkan, dan cara pemeliharaannya pun di laboratorium sukar, serta akan memakan waktu yang lama. Oleh karena itu pembiakkan pada media buatan menjadi salah satu alternatif yang dipandang lebih menguntungkan. Dewasa ini pembiakkan secara massal memakai media buatan telah digunakan untuk bakteri, jamur, protozoa, dan nematoda khususnya untuk jenis-jenis tertentu.

Mengingat sifat hubungan patogen-inang adalah spesifik, maka dibutuhkan pula kondisi yang spesifik bilamana patogen itu dibiakkan secara *in vitro*. Produksi substansi zat beracun dari sel-sel mikroba juga mempersyaratkan kondisi proliferasi yang cocok, dan menghasilkan substansi yang maksimum ada kemungkinan diperoleh dengan adanya distorsi spesifik dari pertumbuhan atau metabolisme mikroba tersebut. Produktifitas umumnya tergantung pada potensi intrinsik dari sel itu sendiri dan pada mekanisme yang menguasai dan mempengaruhi fungsi-fungsi sel. Perlakuan tertentu terhadap proses pertumbuhan untuk mempengaruhi proses metabolisme dan sifat genetik mikroba sangat diperhatikan dalam proses-proses fermentasi.

Dalam upaya menghasilkan mikroorganisme atau produknya secara komersil, selalu dibutuhkan seleksi untuk mendapatkan strain tertentu yang lebih baik dan bahkan sering diperlukan modifikasi spesifik terhadap karakteristik mikroorganisme yang bersangkutan. Upaya demikian itu dimaksudkan agar dengan fermentasi yang secara ekonomis diperoleh pertumbuhan yang menghasilkan peningkatan

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

produk yang diinginkan. Hal itu dimungkinkan dengan terjadinya mutasi, yaitu terjadinya perubahan genetik pada sel-sel yang disebabkan oleh unsur-unsur mutagenik, atau terjadinya pemindahan bahan genetik tertentu ke dalam sel. Jadi akan diperoleh varian-varian yang dapat diseleksi dengan metode yang tepat dan mudah dilakukan. Sering terjadi bahwa seleksi terhadap varian-varian yang timbul sukar dilakukan, namun demikian dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi yang semakin berkembang, cara-cara seleksi varian merupakan salah satu cara yang dapat menghasilkan varian yang berkualitas “baik” yang diinginkan.

Pemeliharaan Kultur

Pemindahan biakan yang terus-menerus dilakukan pada media buatan dapat menimbulkan perubahan-perubahan yang buruk, misalnya kemampuan sporulasi menjadi menurun. Mengenai patogen-patogen serangga yang virulensi menjadi sangat menurun karena dibiakkan di luar tubuh inangnya telah banyak dilaporkan (Dulmage dan Rhodes, 1971). Patogenisitas maupun sporogenesis umumnya dapat dipulihkan dengan cara melakukan infeksi ulang pada jenis inang aslinya dan dari sini diisolasi dan dibiakkan kembali.

Cara untuk mempertahankan mutu biakan yang sampai saat ini yang dipandang paling baik adalah cara : 1) Liofilisasi, dimana spora sel-sel vegetatif ditaruh dalam serum steril dan cepat dibekukan dalam tabung yang ditempatkan dalam karbon dioksida kering (dry ice), dan dikeringkan dalam keadaan vakum; tabungnya ditutup dengan cermat dan kemudian disimpan, cara lain adalah 2) Menyimpan biakan dalam refrigerator; 3) Dibekukan dalam nitrogen cair, dan 4) Penyimpanan spora dalam tanah kering yang steril.

Gazali *et al.* (2017) melakukan penelitian terhadap beberapa media buatan yaitu terdiri dari a) Media J (ekstrak jagung); b) Media K (ekstrak kedelai); c) Media B (ekstrak beras); d) Campuran C (ekstrak campuran jagung, kedelai, dan beras

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

perbandingan 1:1:1); dan e) Media NB (Kontrol). Media buatan ini diproses sebagai berikut : Keempat jenis bahan masing ditumbuk sampai halus, kemudian disaring dengan menggunakan ayakan, sehingga diperoleh bubuk padat. 100 g bubuk media padat direbus ke dalam 500 ml aquades sehingga diperoleh suspensi media, kemudian disaring dengan menggunakan ayakan sehingga dihasil ekstrak masing-masing bahan. Ekstrak siap digunakan untuk percobaan.

Bakteri yang digunakan berasal dari hasil isolasi pada kegiatan eksplorasi *B. thuringiensis* yang mempunyai patogenesisitas paling tinggi diantara semua bakteri *B. thuringiensis* yang diujikan. Bakteri patogen serangga diperbanyak dengan menggunakan media Nutrient Broth (NB) yaitu dengan memindahkan bakteri pada biakan murni di media NA miring yang berumur 2 hari ke media NB dalam Erlenmeyer dengan menggunakan jarum ose secara aseptis. Biakan bakteri diinkubasikan selama 48 jam pada suhu kamar sambil dikocok dengan menggunakan shaker. Dua milliliter biakan *B. thuringiensis* dimasukkan ke dalam 50 ml masing-masing media perbanyak yang diujikan. Kemudian dilakukan pengamatan dengan hasil sebagai berikut : Hasil penelitian didapatkan bahwa terjadi pertumbuhan sel bakteri *B. thuringiensis* dari umur sel 3 hari setelah inokulasi sel pada setiap media tumbuh dan terus berkembang sampai umur sel 28 hari setelah inokulasi.

Berdasarkan hasil analisis varian di dapatkan bahwa adanya perbedaan pengaruh perlakuan jenis media tumbuh terhadap pertumbuhan sel bakteri *B. thuringiensis*. Hal ini disebabkan adanya perbedaan kandungan unsur kimia yang terkandung dalam media tersebut. Rata-rata jumlah sel *B. thuringiensis* tumbuh baik pada tiga media yaitu Media C(ekstrak campuran), media B (ekstrak beras), dan media J (ekstrak jagung). *Bacillus thuringiensis* tumbuh lebih lambat pada media K (Ekstrak kedelai). Pertumbuhan sel *Bacillus thuringiensis* pada media NB cepat pada 3 – 22 hari setelah inokulasi dan melambat pada 25 sampai 28 hari setelah inokulasi. Hal ini disebabkan media C (ekstrak campuran beras, jagung dan

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

kedelai), media J (ekstrak jagung) dan media B (ekstrak beras) memberikan ketersediaan nutrisi yang mendukung bagi pertumbuhan sel *B. thuringiensis* (Gazali *et al.* 2017).

Sel-sel mikroba membutuhkan air, karbon untuk biosintesis dan energi, nitrogen, unsur-unsur mineral dan zat-zat pertumbuhan. Takaran dan bentuk berbagai substansi tersebut tergantung pada proses fermentasi yang dipakai (Gazali, 2015). *Bacillus thuringiensis* siap melakukan proliferasi apabila kondisi lingkungan seperti temperatur dan ketersediaan nutrient mendukung, seraya formasi spora telah terbukti dipicu oleh faktor-faktor internal dan eksternal termasuk sinyal untuk kelaparan nutrisi, kepadatan sel, dan perkembangan siklus sel (Hilbert and Piggot, 2004). Siklus hidup Bt dibagi dalam fase-fase, yaitu fase I: pertumbuhan vegetative; fase II: transisi untuk sporulasi; fase III: Sporulasi; fase IV: pematangan spora dan lisis sel (Hilbert and Piggot, 2004; Berbert-Molina *et al.*, 2008). Produksi dari sifat protein Kristal disimpan dalam Kristal pada sel induk telah terbukti terutama pada awal sporulasi (Sedlak *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2005; Guidelli-Thuler *et al.*, 2009; Pérez-García *et al.*, 2010). Sejumlah Cry-gen telah terbukti ditranskripsi dari dua promotor tumpang tindih BtI dan BtII oleh RNA polimerase yang mengandung sporulasi tergantung faktor sigma σE dan σK (Sedlak *et al.*, 2000; Hilbert and Piggot, 2004). dan mutasi di wilayah konsensus dari σE telah terbukti dapat menghambat transkripsi dari promotor BtI dan BtII (Sedlak *et al.*, 2000). Ini juga telah ditunjukkan bahwa beberapa protein Bt insektisida dihasilkan dan disekresikan ke dalam media kultur selama pertumbuhan vegetatif (Estruch *et al.*, 1996; Donovan *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2004; Bhalla *et al.*, 2005; Leuber *et al.*, 2006; Milne *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010; Abdelkefi-Mesrati *et al.*, 2011).

Pattypeilohi *et al* (2004), telah mengadakan penelitian di Indonesia dengan membiakkan Bt dalam kelapa. Kelapa digunakan sebagai media karena mengandung asam amino dan karbohidrat yang diperlukan dalam pertumbuhan bakteri tersebut. Sebelum membiak, disiapkan kelapa tua yang beratnya

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

sekitar 400-700 g karena kelapa dengan ukuran berat tersebut sudah cukup mengandung asam amino dan karbohidrat sebagai unsur-unsur yang menunjang perkembangan dan pertumbuhan Bt. Kemudian, ditentukan bagian titik lembaga (tempat tunas tumbuh) yang akan dilubangi. Bagian tersebut dicuci dengan alkohol 90%. Setelah itu, dibuatlah lubang dengan diameter $\pm 1,5$ cm

Kelapa yang sudah dilubangi, diberikan 1-5 ml Bt formulasi cair (liquid). Lubang kelapa segera di tutup dan dilapisi minyak lilin (candle wax). Dibiarkan pada temperatur kamar selama 4-7 hari maksimal 20 hari untuk terjadi pertumbuhan. Air kelapa yang sudah mengandung biakkan Bt kemudian ditebarkan pada habitat larva.

Bt yang dibiakkan dalam kelapa ternyata memiliki masa kerja yang cukup lama, yaitu sekitar 55 hari. Hasil tersebut jauh lebih lama dibandingkan penggunaan Bt komersial yang hanya bertahan 6-7 hari. Penelitian Humboldt di Peru, juga memiliki hasil yang tak jauh berbeda dengan Pattypeilohi *et al*,¹⁶ yaitu efektivitas Bt yang dibiakkan dalam kelapa mencapai 12-45 hari.

Penelitian Pattypeilohi *et al*. (2004), juga membandingkan efektivitas jumlah kelapa yang digunakan. Ternyata, Bt biakkan kelapa masih dapat membunuh lebih dari 70% larva hingga hari ke-14, baik itu pada pemberian satu kelapa (79%), dua kelapa (86%), tiga kelapa (86%), maupun empat kelapa (86%). Berdasarkan data di atas, kelapa dapat dikembangkan sebagai media pembiakkan Bt yang mudah didapat dengan tidak mengurangi efektivitasnya. Sifat tanaman kelapa yang dapat tumbuh hampir di segala kondisi tanah dan cuaca, membuatnya mudah untuk didapat. Dengan demikian, masyarakat dapat menerapkan langsung di lingkungannya.

Perbanyakkan bakteri juga dapat menggunakan ekstrak umbi ganyong, umbi gembili, dan umbi garut dengan cara sebagai berikut : sebanyak 300 g umbi dimasukkan dalam 1000 ml aquades, ditambahkan gula 10 g dan agar (Swallow) 15 g ke dalam ekstrak dan setelah itu media disterilisasi agar terbebas dari mikroba. Selanjutnya sampel bakteri B. thuringiensis

diencerkan sebanyak 10^{-4} dan diinokulasi pada media perlakuan dengan metode spread plate kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Fermentasi Skala Besar

Pada setiap fermentasi aerobik terdapat hubungan timbal balik yang sangat erat antara mikroorganisme, bahan nutrisi dan udara. Di laboratorium kondisi yang optimum tidak sukar dipenuhi, akan tetapi pada fermentasi dengan skala yang semakin besar persoalan aerasi yang sesuai biasanya menjadi lebih sukar dijaga. Lagi pula dalam perhitungan secara ekonomis pada produksi skala besar dituntut ruang fermentasi yang sesempit mungkin. Fermentasi semi padat biasanya dilakukan mengingat keperluan ruang dapat dihemat, sedangkan fermentasi kultur tenggelam biasanya dilakukan bila kultur cair lebih dikehendaki.

1. Fermentasi Semi Padat

Pada fermentasi semi padat, organisme ditumbuhkan dalam suatu media nutrisi cair yang telah diabsorpsi pada permukaan partikel karier. Dengan cara ini diperoleh keuntungan menjadi tingginya rasio permukaan terhadap volume dan dalam ruang yang relatif sempit dimungkinkan terdapatnya "gasliquid interspace" yang besar. Umumnya, sekam atau dedak gandum dipakai sebagai karier dalam fermentasi ini, dan selain itu juga telah dipakai jagung giling, kacang tanah, kulit gandum atau dedak padi dan biji kapas. Karier inorganik seperti pasir atau diatoma, vermikulat, dan batu apung kadang juga digunakan. Berhubung karena bahan-bahan dedak yang lembab cenderung akan menggumpal dan mengurangi efisiensi sering dicampur dengan dedak tersebut. Karier organik sering berguna sebagai penambah nutrisi selain sebagai pengabsorpsi. Dedak terkenal sangat baik sebagai sumber pati dan protein serta telah digunakan sejak lama dalam fermentasi amylase dan proteinase.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Pada fermentasi semi padat, bahan dedak, air, dan larutan nutrisi dicampur dan disterilkan dengan uap yang dialirkan kemudian medium ini diinokulasi dengan suspensi spora yang dihasilkan dari biakan fermentasi dedak, atau dari inokulum kultur tenggelam. Kandungan air pada campuran terakhir dijadikan antara 50 dan 70 %. Pada bagian awal fermentasi, udara dengan kelembapan antara 80-100% dialirkan untuk aerasi fermentasi tanpa mengeringkan adonan dedak tersebut.

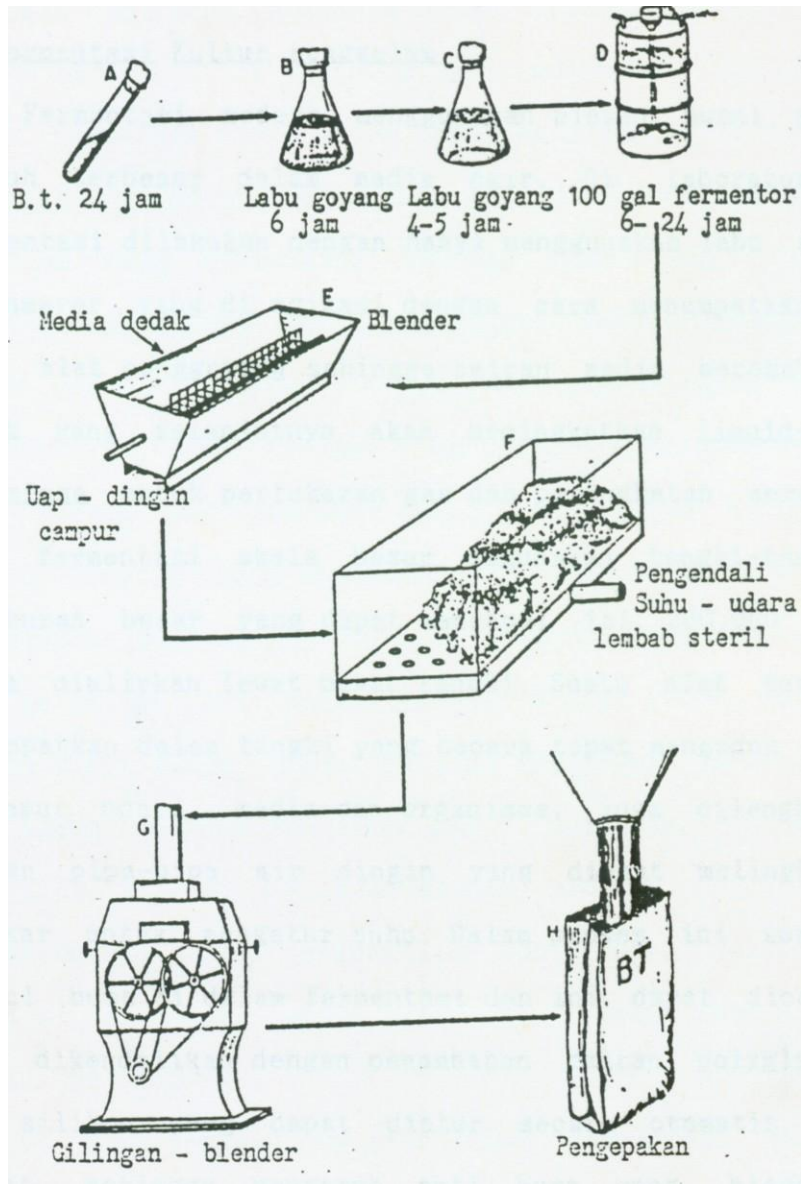
Suhu udara selalu dikendalikan dengan baik, karena udara itu juga berfungsi mengatur suhu fermentasi. Setelah fermentasi berlangsung secukupnya, udara basah, secara berangsur-angsur diganti dengan udara kering sehingga dedak menjadi kering sampai akhir fermentasi. Apabila kandungan air turun menjadi 4 %, maka gumpalan hasil fermentasi telah dapat diambil (Gambar 13).

Proses fermentasi semi padat ini biasanya tidak mahal; peralatan yang dipakai cukup sederhana dan tidak begitu rumit. Yang perlu sekali diperhatikan ialah bahwa untuk tujuan memperoleh hasil maksimum untuk sel ataupun produknya, berbagai fase perkembangan proses fermentasi harus terus-menerus diikuti dan diatur secara cermat dan hal ini merupakan faktor yang dipandang sebagai salah satu faktor pembatas. Itulah sebabnya, kebanyakan dari fermentasi moderen memilih memakai fermentasi kultur tenggelam yang akan diuraikan selanjutnya.

Pengambilan produk dari fermentasi semi padat adalah mudah dan sederhana yaitu dengan melarutkannya dalam pelarut tertentu yang sesuai dan dengan mudah produk tersebut diekstraksi.

Namun demikian dalam beberapa aplikasi, yang dimurnikan tidaklah diperlukan sepanjang aktivitas produk tersedia untuk dipakai. Jadi, dalam hal ini, hasil akhir fermentasi tadi cukup dikeringkan dan dijadikan berupa tepung. Dengan demikian biaya keseluruhan menjadi sangat murah.

Bacillus thuringiensis
Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya



Gambar Langkah-langkah dalam fermentasi semi padat.

2. Fermentasi Kultur Tenggelam

Fermentasi modern menggunakan biakan murni yang tumbuh terbesar dalam media cair. Di laboratorium fermentasi dilakukan dengan hanya menggunakan labu atau Erlenmeyer yang diagitasi dengan cara menempatkannya pada alat penggoyang sehingga cairan media berombak-ombak yang selanjutnya akan meningkatkan liquid-gas interfase untuk pertukaran gas dan peningkatan aerasi. Pada fermentasi skala besar digunakan tangki-tangki berukuran besar yang dapat mencapai isi 200.000 liter. Udara dialirkan lewat bawah tangki. Suatu alat turbin ditempatkan dalam tangki yang secara tepat mengaduk dan mencampur udara, media dan organisme, juga dilengkapi dengan pipa-pipa air dingin yang dibuat melingkar-lingkar untuk mengatur suhu. Dalam proses ini sering muncul busa di dalam fermentasi dan ini dapat dicegah atau dikendalikan dengan penambahan cairan polyglucol dan silikon yang dapat diatur secara otomatis dan cermat, sehingga pengaruh anti busa yang biasanya menurunkan kecepatan absorpsi oksigen dapat diatasi. Selama fermentasi berlangsung, harus betul-betul dijaga agar semua proses berjalan dalam kondisisteril.

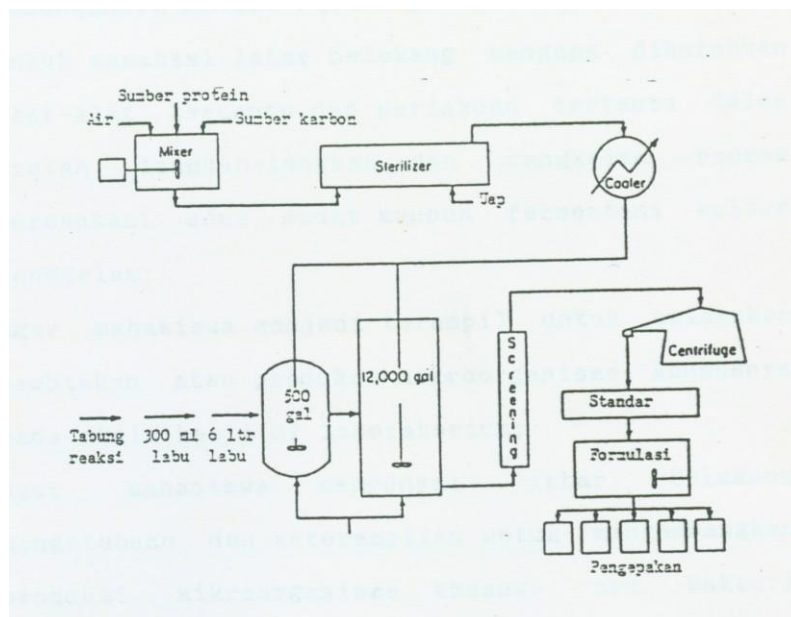
Udara harus diberi filter untuk mencegah kontaminasi dalam tangki. Alat-alat agiator, pengendali pH, dan alat pengatur pemberian anti busa dirancang secara tepat sehingga in situ semuanya dalam keadaan steril dan selama fermentasi berlangsung tidak ada kontaminan yang masuk. Media dan semua bahan campuran harus disterilkan, biasanya dengan cara pemanasan segala-galanya, kecuali inokulum yang dimasukkan sesudah sterilisasi harus betul-betul steril. Untuk fermentasi kultur tenggelam skala besar, inokulumnya dibuat dari biakan bibit yang diproduksi dengan volume yang semakin meningkat dalam labu goyang dan fermentor kecil. Pemindahan dilakukan secara aseptik pada saat organisme itu dalam stadium pertumbuhan yang sebaik-baiknya. Inokulum yang diberikan pada fermentor besar adalah sekitar 0,1-10 % dari volume biakan bibit akhir tergantung pada kebutuhan.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Penanganan yang sangat cermat dan tepat perlu dilakukan terhadap suhu, aerasi, pH, dan busa selama proses fermentasi. Kadang-kadang untuk memperoleh hasil yang maksimum, kondisi fermentasi perlu diubah pada saat fermentasi sedang berlangsung.

Pengambilan produk dari fermentasi kultur tenggelam sering mengalami kesukaran karena hanya terdapat sedikit produk yang diinginkan di dalam cairan fermentasi yang besar jumlahnya, untuk produk tidak terlarut seperti sel-sel organisme itu sendiri dapat diperoleh dengan filtrasi atau sentrifugasi. Jika sebaliknya, ekstraksi pelarut, presipitasi, atau absorpsi pada arang atau sejenisnya, harus dilakukan. Biaya fermentasi dan pengambilan produk dengan cara ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan cara fermentasi semi padat. Akan tetapi, hasil keseluruhan biasanya lebih banyak pada fermentasi kultur tenggelam dan produk itu dapat dibuat dalam konsentrasi tinggi; hal inilah yang dianggap sebagai kompensasi untuk biaya yang lebih mahal tersebut.



Gambar Langkah-langkah dalam fermentasi kultur tenggelam

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

APLIKASI BACILLUS THURINGIENSIS

Bacillus thuringiensis dan produk-produknya telah diformulasikan ke dalam berbagai bentuk untuk aplikasi sebagai agen pengendalian hayati. formulasi tersebut bisa dalam bentuk padat (tepung atau pasir) atau cairan. Saat ini ada lebih dari 400 formulasi Bt yang telah terdaftar di pasar dan sebagian besar dari mereka mengandung protein insektisida dan spora meskipun spora tidak aktif dalam beberapa produk (Ahmedani *et al.* 2008).

Formulasi produk Bt diaplikasikan secara langsung dalam bentuk semprotan (Ali *et al.* 2010). Satu alternatif, metode yang sangat sukses untuk memberikan racun untuk serangga sasaran telah mengungkapkan gen toksin-encoding dalam tanaman transgenik (Barton *et al.* 1987.; Vaeck *et al.* 1987; Qaim dan Zilberman 2003; Walter *et al.* 2010; Chen *et al.* 2011).

Sebagian besar formulasi Bt digunakan untuk mengendalikan ulat pemakan daun, termasuk hama ulat pada sayuran, larva ngengat gipsi, *Lymantria dispar* (L.), di hutan, dan larva penggerek jagung (ECB), *Ostrinia nubilalis* (HBN.), di ladang jagung. Meskipun besar keragaman strain yang

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

mengandung gen cry toksin yang berbeda hanya 2 subspecies Bt yang telah berkembang menjadi sprayable produk (kurstaki dan aizawai) untuk mengendalikan hama lepidopteran. Nama dagang yang paling umum untuk produk-produk komersial termasuk Dipel ?, Javelin ?, Thuricide ?, dan Bactospeine ?, tetapi banyak perusahaan kecil menjual produk serupa di bawah berbagai nama dagang.

Demikian pula, satu strain subspecies morrisoni (dikenal sebagai tenebrionis) sukses dikembangkan sukses sebagai produk komersial terhadap *L. decemlineata*. Penemuan pada tahun 1977 dari galur Bt H-14 - dikenal sebagai *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* (Bti) - yang sangat beracun bagi nyamuk dan larva lalat hitam (kedua vektor penyakit tropis, seperti malaria, onchocercosis dan demam berdarah) telah menyebabkan Bt banyak digunakan dalam pengendalian nyamuk di perkotaan dan pengendalian lalat hitam di pedesaan. Banyak produk Bt komersial yang memanfaatkan Bti juga tersedia; di antara mereka Vectobac ?, Teknar ?, Bactimos? dan Skeetal ?. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), melalui Program Pengendalian Onchocercosis (OCP), telah menjadi promotor penting dari penggunaan Bti terhadap larva diptera. formulasi berbasis bt telah digunakan secara intensif, sejak 1980-an, di sungai of West Afrika, dengan tujuan memerangi kompleks spesies lalat hitam, yang bertanggung jawab untuk transmisi *Onchocerca volvulus* (Leuck.), parasit mikrofilaria menyebabkan kebutaan.

Setiawati (2000), menyatakan bahwa bakteri *B. thuringiensis* efektif dalam menekan serangan *P. xylostella* dan *Crocidolomia binotalis*, mengurangi penyemprotan sebesar 60-75% dan dapat menghemat penggunaan insektisida sebesar 68,72-82,68% dengan hasil panen tetap tinggi. Insektisida ini juga tidak membahayakan bagi musuh alaminya yaitu parasitoid *Diadegma semiclausum* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Sementara itu Budi (2013), menunjukkan bahwa kepadatan *B. bassiana* 109 spora/ ml dapat menyebabkan kematian larva Spodoptera litura sebesar 31,57%. Larva yang terinfeksi jamur *B.*

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

bassiana ini akan menunjukkan gejala penurunan perkembangan dan pertumbuhan dimana larva akan lambat dalam memasuki fase pupa dan imago. Penelitian Karmawati (2007), menunjukkan bahwa penyemprotan *B. bassiana* interval seminggu sekali lebih baik hasilnya dibandingkan dua minggu sekali. Penggunaan jamur *B. bassiana* lebih baik dibandingkan dengan pestisida nabati karena populasi dari kutu daun terlihat lebih stabil dan lebih rendah. Penelitian Ilhami (2011), menyatakan bahwa larva *Spodoptera exigua* dan *Spodoptera litura* rentan terhadap infeksi *Heterorhabditis* sp.

Berdasarkan hasil penelitian Gazali *et al.* (2016) Aplikasi bakteri *B. thuringiensis* dapat menurunkan intensitas kerusakan daun sawi yang diakibatkan oleh hama pemakan daun sawi. Kerusakan tertinggi didapatkan pada pertanaman sawi yang hanya disemprot dengan air atau kontrol (24,70 %), sedangkan tanaman yang mengalami kerusakan yang terkecil adalah pada pertanaman sawi yang disemprot dengan *B. thuringiensis* dengan konsentrasi 6 ml/l air (8,80 %) dan 8 ml/l air (7,60 %) (Tabel 1).

Tabel 6. Rata-rata persentase kerusakan daun tanaman sawi akibat serangan hama pemakan daun sawi (Gazali *et al.*, 2017)

Perlakuan	Rata-rata persentase kerusakan daun sawi akibat hama pemakan daun sawi (%)
Kontrol (Diaplikasi dengan air) (Mo)	24.70 a
Aplikasi <i>B. thuringiensis</i> menggunakan konsentrasi 2 cc/liter air (M1)	13.00 ab
Aplikasi <i>B. thuringiensis</i> menggunakan konsentrasi 4 cc/liter air (M2)	11.20 bc
Aplikasi <i>B. thuringiensis</i> menggunakan konsentrasi 6 cc/liter air (M3)	8.80 cd
Aplikasi <i>B. thuringiensis</i> menggunakan konsentrasi 8 cc/liter air (M4)	7,60 d

Keterangan: Rata-rata persentase kerusakan daun sawi akibat serangan hama pemakan daun pada kolom yang sama berbeda secara nyata berdasarkan uji LSD dengan tingkat kepercayaan 95%.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Pengaruh perlakuan aplikasi *B. thuringiensis* dengan konsentrasi 2 cc/l air terhadap kerusakan oleh hama daun sawi tidak berbeda dengan aplikasi hanya dengan air (kontrol). Hal ini disebabkan konsentrasi 2 cc/l air belum dapat mematikan hama pemakan daun sawi secara maksimal karena jumlah dosis yang termakan oleh hama pemakan daun sawi masih rendah, sehingga sebagian besar hama masih belum mengalami kematian, namun pengaruh aplikasi *B. thuringiensis* terlihat pada saat aplikasi *B. thuringiensis* ditingkatkan konsentrasinya menjadi 4 cc/l air, dan pengaruhnya bertambah besar seiring dengan bertambah semakin besarnya konsentrasi *B. thuringiensis*.

Pengaruh aplikasi *B. thuringiensis* terhadap penurunan intensitas kerusakan daun sawi yang disebabkan oleh hama pemakan daun sawi terlihat setelah konsentrasi dinaikkan mencapai 4 cc/l air dan mencapai penurunan kerusakan tanaman sawi yang paling rendah yaitu pada pertanaman sawi konsentrasi yang diberi perlakuan 6 cc/l air dan 8 cc/l air. Hal ini disebabkan semakin tinggi konsentrasi *B. thuringiensis* maka akan semakin tinggi pula sel atau spora *B. thuringiensis* yang termakan hama pemakan daun. Menurut Gazali *et. al.* (2015), semakin tinggi konsentrasi *B. thuringiensis* yang diaplikasikan ke tanaman sawi semakin banyak juga ulat *Plutella xylostella* yang mengalami kematian. Konsentrasi yang paling efektif untuk menurunkan populasi ulat *P.xylostella* adalah 4 cc/l air.

Pada saat penelitian kondisi lingkungan sangat mendukung untuk perkembangan atau proliferasi dari *B. thuringiensis*. Hal ini sesuai dengan pendapat Hilbert and Piggot (2004) *Bacillus thuringiensis* siap melakukan proliferasi apabila kondisi lingkungan seperti temperatur dan ketersediaan nutrient mendukung, seraya formasi spora telah terbukti dipicu oleh faktor-faktor internal dan eksternal termasuk sinyal untuk kelaparan nutrisi, kepadatan sel, dan perkembangan siklus sel. Sehingga dengan kondisi lingkungan yang mendukung maka proses infeksi dari *B. thuringiensis* terhadap hama pemakan daun sawi semakin cepat.

Stabilitas agroekosistem yang paling tinggi didapatkan pada pertanaman sawi yang diberi perlakuan penyemprotan *B. thuringiensis* dengan konsentrasi 4 cc/liter yaitu 1,867, sedangkan stabilitas agroekosistem yang paling rendah adalah

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakannya dan Cara Aplikasinya

pada pertanaman sawi yang diberi perlakuan penyemprotan larutan *B. thuringiensis* dengan konsentrasi 8 cc/liter yaitu 1,445. Lebih tingginya stabilitas agroekosistem pertanaman sawi yang diberi perlakuan 4 cc/liter disebabkan karena pada pertanaman sawi yang diberi perlakuan 4 cc/liter menyebabkan nilai indeks kekayaan jenis yang lebih tinggi yang berakibat lebih tingginya nilai indeks keanekaragaman.

Tabel 7. Rata-rata nilai indeks keanekaragaman arthropoda, indeks dominasi, indeks kesamaan jenis dan indeks kekayaan jenis arthropoda pada pertanaman sawi yang diberi perlakuan berbagai konsentrasi larutan *Bacillus thuringiensis* (Gazali *et al.*, 2017)

Perlakuan	Indeks keanekaragaman	Indeks dominasi	Indeks Kesamaan jenis	Indeks Kekayaan jenis
Penyemprotan menggunakan air	1,603	0,303	0,717	2,313
Penyemprotan <i>Bacillus thuringiensis</i> dengan konsentrasi 2 cc/l	1,744	0,217	0,778	2,247
Penyemprotan <i>Bacillus thuringiensis</i> dengan konsentrasi 4 cc/l	1,867	0,256	0,742	2,848
Penyemprotan <i>Bacillus thuringiensis</i> dengan konsentrasi 6 cc/l	1,748	0,074	0,742	2,526
Penyemprotan <i>Bacillus thuringiensis</i> dengan konsentrasi 8 cc/l	1,455	0,355	0,689	1,883

Menurut Odum (1993) menyatakan bahwa keanekaragaman ditentukan oleh dua hal yaitu kekayaan jenis dan tingkat kesamaan. Semakin banyak jenis yang teridentifikasi maka kekayaan spesiesnya pun semakin tinggi. Sedangkan tingkat kesamaan merupakan distribusi seluruh individu yang ada dalam suatu komunitas. Semakin tinggi kekayaan jenis dan tingkat kesamaan, maka semakin tinggi juga indeks keanekaragaman.

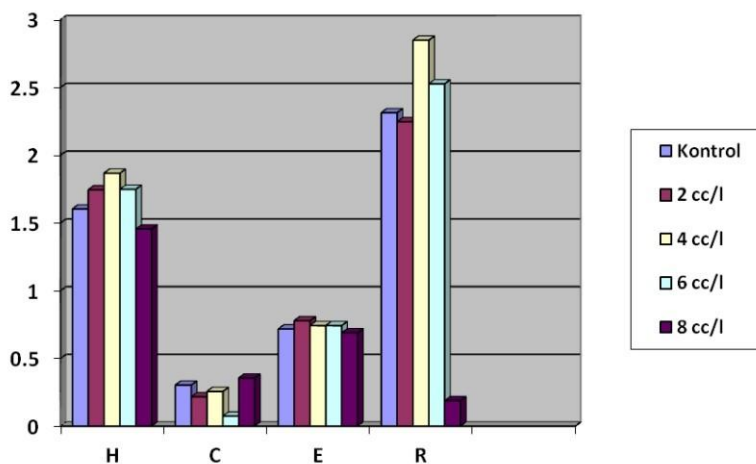
Indeks Keanekaragaman spesies dan Tingkat Kekayaan Jenis pada percobaan ini masih tergolong rendah, menurut Suana

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

dan Haryanto (2007), Tingkat keanekaragaman tergolong rendah apabila nilai indeks keragaman $1 < H < 2$, dan tingkat kekayaan tergolong rendah apabila Indeks Tingkat Kekayaan Jenis mempunyai $R < 3,5$.

Lebih rendahnya nilai indeks keanekaragaman pada pertanaman sawi yang diberi perlakuan *B. thuringiensis* dengan konsentrasi 8 cc/l, disebabkan nilai indek dominasi yang lebih tinggi. Menurut Odum (1993), komunitas yang terkendali secara biologi sering dipengaruhi oleh spesies tunggal atau satu kelompok spesies yang mendominasi lingkungan dan organisme tersebut dominan, mengakibatkan indeks dominasi yang tinggi. Perbandingan pengaruh antar perlakuan terhadap variabel populasi dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar Grafik perbandingan antar perlakuan terhadap variabel populasi.

Keterangan : H = indeks keanekaragaman; C = Indeks Dominasi;
E = Indeks Kesamaan Jenis; R = Indeks Kekayaan Jenis

KESIMPULAN

Dari hasil tulisan di atas dapat disimpulkan bahwa :

1. *Bacillus thuringiensis* mempunyai kemampuan untuk mengendalikan serangga hama dan mempunyai spesififikasi inangyangtinggi.
2. *Bacillus thuringiensis* dapat diisolasi dari serangga sakit, dari tanah dan bahan organik yang ada ditanah.
3. *Bacillus thuringiensis* dapat diperbanyak dengan menggunakan media sederhana seperti ekstrak jagung, beras, kedelai, air kelapa, dan bahan-bahan alam lain yang mengandung karbohidrat, protein, lemak dan vitamin.
4. *Bacillus thuringiensis* diaplikasikan untuk pengendalian hama dalam bentuk formulasi cair maupun padat.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelkefi-Mesrati, L., Boukedi, H., Dammak-Karray, M., Sellami-Boudawara, T., Jaoua, S., and Tounsi S. 2011. *Study of the Bacillus thuringiensis Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of Spodoptera littoralis*. J Invertebr. Pathol. 106(2):250–254.
- Abro, G. H., Soomro, T. R., and Syed, T. S. 1992. *Biology and behaviour of diamondback moth, Plutella xylostella (L.)*. Pakistan Journal of Zoology. 24(1): 7-10.
- Anonim. 1987. *Development of diamondback moth on various host plants*. Progress-Report, Asian vegetable Research and Development Center, 1985. Pp. 23-26.
- Berbert-Molina, MA., Prata, AMR., Pessanha, LG., Silveira, MM. 2008. *Kinetics of Bacillus thuringiensis var. israelensis growth on high glucose concentrations*. J Ind Microbiol Biotechnol. 35(11):1397–1404.
- Bhalla, O. P., and Dubey, J. K. 1986. 1986. *Bionomics of the diamondback moth in the northwestern Himalaya*. pp. 55-

Bacillus thuringiensis
Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

62. in. N. S. Talekar and T. D. Griggs (eds.). *Diamondback moth management*. Proceedings of the First International Workshop, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985. The Asian Vegetable Research and Development Center, Shansua, Taiwan.
- Bhalla, R., Dalal, M., Panguluri, S.K., Jagadish, B., Mandaokar, A.D., Singh, A. K. , and Kumar, PA. 2005 . *Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol Lett 243(2):467-472.
- Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Valé ro, J. R., Surampalli, R.Y. 2009. *Entomotoxicity, protease and chitinase activity of Bacillus thuringiensis fermented wastewater sludge with a high solids content*. Bioresour Technol. 100(19) : 4317-4325.
- Breed, R. S., Murray, E. G. D., Smith, N. R. 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Seventh edition. The Williams and Wilkin's Company. Baltimore.
- Bukhari D.A., Shakoori A. R. 2010. *Isolation and molecular characterization of cry4 harbouring Bacillus thuringiensis isolates from Pakistan and mosquitocidal activity of their spores and total proteins*. Pak J Zool 42: 1-15.
- Cokseys, K. E. 1971. *The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis : Biochemistry and mode of action*. Pp. 247-274. In. H. D. Burges and N. W. Hussey (Eds.). *Microbial control of insects and mites*. 4th. Academic Press. London. New York.
- Donovan, W.P., Donovan, J.C., Engleman, J.T. 2001. *Gene knockout demonstrates that vip3A contributes to the pathogenesis of Bacillus thuringiensis toward Agrotis ipsilon and Spodoptera exigua*. J. Invertebr. Pathol. 78(1):45-51.
- Croft, B. A. 1990. *Arthropod Biological Control Agents and Pesticides*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Damo, M. A. M., 1990. *Isolation and screening of Bacillus*

Bacillus thuringiensis
Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

thuringiensis Berliner against the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Thesis. University of Philippines, Los Banos.

- Dindal, D. L. and Clifford C. W. 1977. *Community Structure and Role of Macroinvertebrate Decomposers in the Rehabilitation of Limestone Quarry*. In *Limestone Quarries : Responses to Land Use Pressure Allied Chem. Corp.* (Eds. E. J. Perry and N. A. Richards), pp. 72-99. SUNY Coll. Environm. Sci. and Foretry, New York.
- Don-Fronk, W. 1971. *Vegetable crop insect*. Pp. 375-402. In. R. E. Pfadt (ed.) *Fundamental of applied entomology*. Mac Millan Publishing Co., Inc., New York.
- English, L., and Slatin, S. L. 1992. *Mode of action of delta-endotoxins from Bacillus thuringiensis a comparison with otherbacterial toxins*. *Insect Biochem. Molecul. Biol.* 22(1): 1-7.
- Estruch, J. J., Warren, GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG (1996) *Vip3A, a novel Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(11):5389–5394.
- Falcon, L. A. 1971. *Use bacterial for microbial control*. Pp. 67-81. in. H. D. Burges and N. W. Hussey (Eds.). *Microbial control of insects and mites*. 4th. Academic Press. London. New York.
- Fedhila, S., Gohar, M., Slamti, L., Nel, P., Lereclus, D. 2003. *The Bacillus thuringiensis PlcR-regulated gene inhA2 is necessary, but not sufficient, for virulence*. *J Bacteriol* 185(9):2820–2825.
- Frankenhuyzen, K. V. 2009. *Insecticidal activity of Bacillus thuringiensis crystal proteins*. *J. Invertebr. Pathol.* 101(1):1–16.
- Gazali, A. 2003. *Exploration and augmentation of natural enemies of pests, Plutella xylostella Linn.* (Lepidoptera; Plutellidae)

Bacillus thuringiensis
Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

in lowland mustard, *Brassica juncea* L. Dissertation.
Postgraduate Program of Brawijaya University. Malang.

Gazali, A. 2015. *Biological Control*. Mujahid Press. Bandung.
151 p.

Gazali, A., Jaelani, A., and Ilhamiyah. 2015. Patogenicity of
Bacillus thuringiensis which Isolated from Tidal Ecosystem
against Diamond Backmoth Larvae, *Plutella xylostella* Linn.
Asian Journal of Applied Sciences (ISSN: 2321 – 0893):03 (3): 513-
518.

Gazali, A., Jaelani, A., and Ilhamiyah. 2017. Agroecosystem
Stability and Breakdown Leaves on Mustard Cropping
after Application by the *Bacillus thuringiensis*.
International Journal of Science and Research (IJSR). 6 (4);
433-437.

Gazali, A., Jaelani, A., Ilhamiyah, and Siti Erlina. 2017. *Bacillus*
thuringiensis Berliner Cells Population Growth in Some
Naturally Media And the Patogenicity Against *Plutella*
xylostella Caterpillars. *Asian Journal of applied sciences*.

Gazali, A., Rachmadi HT., dan Ridwan. 1999. *Patogenisitas*
Bacillus thuringiensis Berl. yang diisolasi dari tanah hutan
di kabupaten Hulu Sungai Tengah terhadap ulat *Plutella*
xylostella Linn., *J. Entomol. Kalimantan*: 1 (1): 13-19.

Gominet, M., Slamti, L., Gilois, N., Rose, M., and Lereclus, D. 2001.
Oligopeptide permease is required for expression of the
Bacillus thuringiensis plcR regulon and for virulence. *Mol*
Microbiol. 40(4):963–975.

Guidelli-Thuler, A. M., De Abreu, I. L., and Lemos, M. V. F. 2009.
Expression of the sigma35 and cry2ab genes involved in
Bacillus thuringiensis virulence. *Sci Agric (Piracicaba,*
Braz). 66(3):403–409.

Hajaij-Ellouze, M., Fedhila, S., Lereclus, D., Nielsen-Leroux, C.
2006. *The enhancin-like metalloprotease from the Bacillus*
cereus group is regulated by the pleiotropic transcriptional
activator PlcR but is not essential for larvicidal activity.
FEMS Microbiol. Lett. 260(1):9–16.

Bacillus thuringiensis
Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

Ludwig, J. A. and Renold, J.F. 1988. *Statistical Ecology*. John Wiley & Sons. New York.

Hilbert, DW., and Piggot, PJ. 2004. *Compartmentalization of gene expression during Bacillus subtilis spore formation*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(2):234–262

Hofte, H. and Whiteley. 1989. *Insectisidal crystal protein of Bacillus thuringiensis*. *Microbial Rev.* 53(2):245-255.

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

- Ibarra JE, del Rincón MC, Ordúz S, Noriega D, Benintende G, Monnerat R, Regis L, de Oliveira CMF, Lanz H, Rodrigues MH, Sánchez J, Pena G, Bravo A. 2003. *Diversity of Bacillus thuringiensis strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species*. Appl Environ Microbiol 69: 5269-5274.
- Infante, I., Morel, M. A., Ubalde, M. C., Martínez-Rosales, C., Belvisi, S., Castro-Sowinski, S. 2010. *Wool-degrading Bacillus isolates: extracellular protease production for microbial processing of fabrics*. World J. Microbiol. Biotechnol. 26(6):1047-1052.
- Leuber, M., Orlik, F., Schiffler, B., Sickmann, A., Benz, R. 2006. *Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of Bacillus thuringiensis HD201: evidence for oligomer and channel formation*. Biochemistry. 45(1):283-288.
- Maeda, M., Mizuki, E., Hara, M., Tanaka, R., Akao, T., Yamashita, S., Ohba, M. 2001. *Short communication Isolation of Bacillus thuringiensis from intertidal brackish sediments in mangroves* Microbiol. Res. 156, 195-198. <http://www.urbanfischer.de/journals/microbiolres>.
- Martin, P. A. W., Gundersen-Rindal, D. E., and Blackburn, M. B. 2010. *Distribution of phenotypes among Bacillus thuringiensis strains*. Syst Appl Microbiol 33(4):204-208.
- Menzies, B. E., and Kourteva, I. 2000. *Staphylococcus aureus alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29(1):39-45.
- Milne, R., Liu, Y., Gauthier, D., Frankenhuyzen, K.V. 2008. *Purification of Vip3Aa from Bacillus thuringiensis HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (Choristoneura fumiferana) and gypsy moth (Lymantria dispar) (Lepidoptera)*. J. Invertebr. Pathol. 99(2): 166-172.
- Milner, R. J. 1994. *History of Bacillus thuringiensis*. Agric Ecosyst Environ 49(1):9-13

Bacillus thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

- Moriuti, S. 1986. *Taxonomic note on the diamondback moth*. pp. 83-88. in. N. S. Talekar and T. D. Griggs (eds.). *Diamondback moth management*. Proceedings of the First International Workshop, Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985. The Asian Vegetable Research and Development Center, Shansua, Taiwan.
- Nisnevitch, M., Sigawi, S., Cahan, R., Nitzan, Y. 2010. *Isolation, characterization and biological role of camelysin from Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. Curr Microbiol. 61(3):176-183.
- Norris, J. R. 1971. *The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis : Biosynthesis and physical structure*. Pp. 229-246. in. H. D. Burges and N. W. Hussey (Eds.). Microbial control of insects and mites. 4th. Academic Press. London. New York.
- Odum, E.P. 1993. *Dasar-dasar Ekologi*. Penerjemah Tjahjono Samingan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Ohba M., Wasano N., Mizuki E. 2000. *Bacillus thuringiensis soil populations naturally occurring in the Ryukyus, a subtropic region of Japan*. Microbiol Res 155: 17-22.
- Oka. I . N. 1995 . *Pengendalian Hama Terpadu dan Implementasinya di Indonesia*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Palvannan, T., and Boopathy, R. 2005. *Phosphatidylinositol-specific phospholipase C production from Bacillus thuringiensis serovar. kurstaki using potato-based media*. World J Microbiol Biotechnol. 21(6-7):1153-1155.
- Park HW, Hayes SR, Mangum CM (2008) *Distribution of mosquitocidal Bacillus thuringiensis and Bacillus sphaericus from sediment samples in Florida*. J Asia-Pac Entomol 11: 217-220.
- Pattypeilohi, BC., Damar, TB., Widyastuti, U. 2004. *Pengendalian vektor malaria Anopheles sundaicus menggunakan Bacillus thuringiensis 0-14 galur lokal yang*

Bacillus thuringiensis
Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

dibiakkan dalam buah kelapa dengan partisipasi masyarakat di Kampung Laut Kabupaten Cilacap. Jurnal Ekologi Kesehatan, 3(1): 24-36

- Pielou, E. C. 1975. *Ecological Diversity*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Price, P. W. 1997. *Insect Ecology*. Third Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Pérez-García, G., Basurto-Ríos, R., Ibarra, J. E. 2010. *Potential effect of a putative σH -driven promoter on the over expression of the Cry1Ac toxin of Bacillus thuringiensis*. J Invertebr Pathol. 104(2):140–146.
- Poinar, Jr. G. O., and G. M. Thomas. 2012. *Laboratory guide to insect pathogens and parasites*. Plenum Press. New York, and London. 408 p.
- Quesada-Morage E, García-Tóvar E, Valverde-García P, Santiago-A'lvarez C. 2004 *Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of Bacillus thuringiensis from soils in Spain*. Microbiol Res 159: 59-71.
- Raymond B., Johnston P. R., Nielsen-LeRoux C., Lereclus D., Crickmore N. 2010. *Bacillus thuringiensis: an important pathogen?* Trends Microbiol 18: 189-194.
- Ramarao, N., and Lereclus, D. 2006. *Adhesion and cytotoxicity of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively*. Microbes Infect 8(6): 1483–1491.
- Rasko, D. A, Altherr, M. R., Han, C. S. , Ravel, J. 2005. *Genomics of the Bacillus cereus group of organisms*. FEMS Microbiol. Rev. 29(2):303–329.
- Read, T. D., Peterson, S. N., Tourasse, N., Baillie, L. W., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Tettelin, H., Fouts, D.E., Eisen, J.A., Gill, S.R., Holtzapple, E. K., Okstad, O. A., Helgason, E., Rilstone, J., Wu, M., Kolonay, J. F., Beanan, M.J., Dodson, R.J, Brinkac, L. M., Gwinn, M., Deboy, R. T., Madpu, R., Daugherty, S. C., Durkin,

Bacillus thuringiensis
Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

- A. S., Haft, D. H., Nelson, W. C., Peterson, J. D., Pop, M., Khouri, H. M., Radune, D., Benton, J.L., Mahamoud, Y., Jiang, L. X., Hance, I. R., Weidman, J. F., Berry, K. J., Plaut, R. D, Wolf, A. M., Watkins, K. L., Nierman, W. C., Hazen, A., Cline, R., Redmond, C., Thwaite, J. E., White, O., Salzberg, S. L., Thomason, B., Friedlander, A. M, Koehler, T.M., Hanna, P.C., Kolsto, A. B., and Fraser, C. M. 2003. *The genome sequence of Bacillus anthracis Ames and comparison to closely related bacteria*. Nature 423(6935):81–86.
- Rueda and Shelton. 1995. *Diamondback moth (DBM); Information, control, laboratory rearing*. Cornell International Institute for Food, Agriculture and Development. [H t t p :
//www.nysaes.cornell.edu/ent/hortcrops/graphics/dbm/dbm5gift.html](http://www.nysaes.cornell.edu/ent/hortcrops/graphics/dbm/dbm5gift.html).
- Salamitou, S., Ramisse, F., Brehelin, M., Bourguet, D., Gilois, N., Gominet, M., Hernandez, E., and Lereclus, D. 2000 *The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus in mice and insects*. Microbiology 146(11):2825–2832.
- Sedlak, M., Walter, T., and Aronson, A. 2000. *Regulation by overlapping promoters of the rate of synthesis and deposition into crystalline inclusions of Bacillus thuringiensis δ -endotoxins*. J Bacteriol 182(3):734–741.
- Shi, Y., Xu, W., Yuan, M., Tang, M., Chen, J., and Pang, Y. 2004. *Expression of vip1/vip2 genes in Escherichia coli and Bacillus thuringiensis and the analysis of their signal peptides*. J Appl. Microbiol. 97(4):757–765.
- Simpati, I. K. 1985. *Bactospein efficacy to control of diamondback moth, Plutella xylostella Linn. (Plutellidae) and Crocidolomia binotalis Zell. (Pyralidae)*. Thesis. KPK program of UGM-UNIBRAW. Malang.
- Southwood, T. R. E. 1978. *Ecological Methods*. Second Edition. Chapman and Hall., New York.

Bacillus thuringiensis
Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya

- Srinivasan, K., and Rao, G. S. P. 1987. *Distribution patterns of diamondback moth and cabbage leaf-webber larvae on cabbage*. International Journal of Tropical Agricultura. 8(2): 203-208.
- Stapathi, C. R. 1990. *Biology of diamondback moth, Plutella xylostella (L.)*. Environment and Ecology. 8(2): 784-785.
- Suana, I. W., dan Haryato, H. 2007. *Keanekaragaman Laba-laba pada Ekosistem Sawah Monokultur dan Polikultur di Pulau Lombok*. Jurnal Biologi FMIPA UNUD Denpasar, 11(1).
- Travers, R. S., Martin, P. A. W. and Reichelderfer, C. F., 1987, *Selective process for efficient isolation of soil Bacillus species*. Appl. Environ. Microbiol., 53 : 1263-1266.
- Trizelia. 1994. *Infeksi Bacillus thuringiensis Berliner pada larva Heliothis armigera Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) dan pengaruhnya terhadap konsumsi polong kedelai*. Tesis. Progam Pascasarjana IPB. Bogor.
- Vilas-Bô as GT, Peruca APS, Arantes OMN. 2007. *Biology and taxonomy of Bacillus cereus, Bacillus anthracis and Bacillus thuringiensis*. Can J Microbiol 53: 673-687.
- Wu, W. J. 1993. *Study on the host range of Plutella xylostella L.* Entomological Knowledge. 30(5): 274-275.
- Xia, L., Sun, Y., Ding, X., Fu, Z., Mo, X., Zhang, H., and Yuan, Z. 2005. *Identification of cry-type genes on 20-kb DNA associated with Cry1 crystal proteins from Bacillus thuringiensis*. Curr Microbiol. 51(1):53-58.

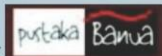
Bacillus Thuringiensis

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya



BACILLUS THURINGIENSIS

Biologi, Isolasi, Perbanyakan dan Cara Aplikasinya



Dicetak oleh:
Pustaka Banua
Jl Pramuka, Komplek Smanda,
Perum Bumi Pramuka Asri No 19
Blok D Banjarmasin
CP: 0813 5162 8292
email: opinibanua@gmail.com

ISBN: 978-602-9864-64-6

