

PEMANFAATAN

BACILLUS THURINGIENSIS BERLINER

**SEBAGAI AGEN HAYATI PENGENDALI
SERANGGA HAMA RAMAH LINGKUNGAN**



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

KATA PENGANTAR

Bacillus thuringiensis atau yang sering disingkat dengan B.t. adalah bakteri penyebab penyakit serangga pembentuk Kristal protein yang bersifat beracun bagi 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, air maupun sisa-sisa tanaman yang sudah menjadi kompos.

Buku ini membahas mengenai biologi, perbanyakkan bakteri *Bacillus thuringiensis*, khususnya mengenai pemanfaatannya untuk mengendalikan serangga hama terutama pada 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*.

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.

Banjarmasin, Agustus 2022

Penulis

**PEMANFAATAN *Bacillus thuringiensis* BERLINER
SEBAGAI AGEN HAYATI PENGENDALI SERANGGA HAMA
RAMAH LINGKUNGAN**

Penulis :

Dr. Ir. Ilhamiyah, MM

Prof. Dr. Ir. Akhmad Gazali, MS

Dr. Achmad Jaelani, S.Pt., M.Si.

Editor :

Antoni Pardede, S.Si., M.Si, Ph.D

Tata Letak :

Aris Setia Noor, S.E., M.Si

Desain Sampul :

M. Fikri Ansari, S.Kom

Penerbit :

Universitas Islam Kalimantan Muhammad Arsyad Al-Banjary Banjarmasin

Redaksi :

Jl. Adyaksa No.2 Kayutangi

Banjarmasin 70123

Cetakan Pertama 2022

ISBN : 978-623-7583-89-9

Hak Cipta dilindungi Undang-undang

Dilarang Memperbanyak karya tulis ini dengan bentuk dan dengan cara apapun

Tanpa izin tertulis dari penerbit. Isi buku diluar tanggung jawab penerbit.

DAFTAR ISI

	<i>halaman</i>
Kata Pengantar	ii
Daftar Isi	iv
Pendahuluan	1
Biologi dan Ekologi Bakteri Patogen Serangga.....	6
Cara Isolasi <i>Bacillus thuringiensis</i> dan Patogenisitasnya	38
Beberapa cara Perbanyakkan <i>Bacillus thuringiensis</i>	46
Pemanfaatan <i>Bacillus thuringiensis</i>	80
Kesimpulan	87
Daftar Pustaka	88

DAFTAR TABEL

No.	Teks	Halaman
1.	Patogen yang tersedia secara komersial sebagai biological atau mikrobial insektisida (Flint & Dreistadt, 1998)	4
2.	Nilai LC ₅₀ isolat <i>B. thuringiensis</i> yang diisolasi pada beberapa macam habitat	41
3.	Rata-rata intensitas kerusakan daun yang disebabkan oleh ulat <i>P. xylostella</i> setelah diaplikasi dengan larutan <i>Bacillus thuringiensis</i> dan pestisida klorfluazuron (Gazali <i>et al.</i> 2015)	43
4.	Rata-rata jumlah ulat <i>Plutella xylostella</i> yang mati akibat aplikas <i>Bacillus thuringiensis</i> dan pestisida Klorfluazuron (Gazali <i>et al.</i> , 2015)	45
5.	Susunan unsur-unsur penyusun sel bakteri <i>E. coli</i>	46
6.	Perbedaan ke empat golongan jasad	46
7.	Contoh Medium Dasar dan Medium Sintetik	54
8.	Rata-rata persentase kerusakkan daun tanaman sawi akibat serangan hama pemakan daun sawi (Gazali <i>et al.</i> , 2017)	83
9.	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 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Gazali <i>et al.</i> , 2017)	85

DAFTAR GAMBAR

No	Teks	Halaman
1.	Mikrograf elektron transmisi dari sel bersporulasi <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> strain C18 (x 44.000). Saring C18 diisolasi dari larva bollworm kapas mati. Ketegangannya unik di bahwa ia menyimpan 15 gen menangis. Kisaran host C18 mencakup tiga utama ordo serangga: Lepidoptera, Diptera dan Coleoptera serta nema todes. Kristal paraspora C18 bervariasi dalam bentuk dan ukuran (panah), dan mewakili 50% dari berat kering sel. (Ibrahim <i>et al</i> , 2010)	7
2.	Cabang pohon yang bergabung dalam bootstrap dari 20 galur dari spesies berbeda dari kelompok BC. Pohon itu dihasilkan berdasarkan keselarasan urutan nukleotida 16S rRNA. Volume bootstrap dilaporkan di cabang. Ke-20 galur tersebut dibagi menjadi dua kelompok utama. Kelompok A mencakup semua galur Ba, Bc dan Bpm dan Grup B mencakup galur Bw KBAB4 dan Bm galur SDANFMO448. Ada dua cluster dalam Grup A, masing-masing ditandai dengan angka Romawi I dan II. Cluster I termasuk strain Ba Sterne CDC684 dan Ames Ancestor A0248; Strain Bc AH187 dan AH 820 dan ATCC 10987 dan 14579; Bpm regangan CIP 5259; dan Bt serovar konkukian dan Bt Al-Hakm. Strain Bpm CIP 5259 dan Bc ATCC 14579 adalah yang paling banyak berbeda dalam klaster ini. Cluster II meliputi Bt serovar tenebrionis, morrisoni, kurstaki, sotto, israelensis dan berliner dan Bc G9842. Batang horizontal mewakili perbedaan 0,02% dalam kesamaan nukleotida. (Ibrahim <i>et al</i> , 2010)	20
3.	Reseptor Cadherin dan analisis pengikatan toksin Cry1Ab. (A) SDS-HALAMAN. Jalur 1, molekul penanda; jalur 2, racun Cry1Ab; jalur 3, proteinase K-dicerna Cry1Ab. (B) Imunoligan blot. Menangis1Ab toksin dan fragmen proteolitik proteinase K-nya ditrans-blot ke membran PVDF dan diuji karena kemampuannya untuk mengikat wilayah pengikatan toksin yang larut dari BT-R1 (TBR). Jalur 1, racun Cry1AB; jalur 2, proteinase K mencerna Cry1Ab. Fragmen pengikat terkecil dari Cry1Ab (~22 kDa, panah ganda) menjadi sasaran analisis urutan asam amino N-terminal. Urutan asam amino terminal-N adalah 442NSSVSIIRAPMFSWIHR. (Ibrahim <i>et al</i> , 2010)	27
4.	Struktur sekunder yang diusulkan dan model tiga dimensi untuk daerah pengikatan reseptor diduga Cry1Ab, Cry3A dan Cry4B. (SEBUAH) Penjajaran sekuens ganda dan prediksi struktur sekunder dari residu asam amino yang mencakup 10, loop 3, 11-β16 (akhir Domain II dan awal Domain III) dari Cry1Ab (residu 422–498); Cry3A (residu 466–537) dan Cry4B (residu 437–506), menggunakan database Pfam181 dan SAS182. Itu urutan merah mewakili residu yang terpapar pelarut. Residu yang digarisbawahi dan dicetak tebal pada ketiga racun Cry membentuk lingkaran 3. Simbol (*), (:), dan (.) di bawah keberpihakan masing-masing menunjukkan residu asam amino yang identik, serupa, dan kurang mirip. (B) Struktur tiga dimensi dalam format pita untuk daerah pengikatan reseptor diduga pada Cry1Ab, Cry3A dan Cry4B. Struktur Cry3A dan Cry4B berasal dari struktur kristal (kode PDB 1DLC dan 1W99, masing-masing). Struktur Cry1Ab dihasilkan sebagai model oleh server pemodelan protein SWISS-MODEL173 menggunakan struktur Kristal dari toksin Cry1Aa (identitas urutan 88%; kode PDB 1CIY) sebagai templat. Area berbayang biru, merah, dan emas	28

	menyoroti untaian dan loop yang diprediksi (Ibrahim <i>et al</i> , 2010)	
5.	Grafik perbandingan antar perlakuan terhadap variabel populasi. (Gazali et al., 2017)	35
6.	Prediksi struktur sekunder dan model tiga dimensi modul EC yang berisi TBR untuk ngengat, nyamuk, dan kumbang. (A) Beberapa penyelarasan urutan dan prediksi struktur sekunder dari residu asam amino yang mencakup TBR BT-R1 (residu 1349-1460), BT-R3 (residu 1339–1451) dan BT-R4 (residu 1292-1405). Struktur dihasilkan menggunakan database Pfam181 dan SAS182. Dua kotak hitam berisi residu yang dilestarikan di daerah hulu dan hilir dari motif pengikatan toksin Cry. Sebutan di bawah alinyemen adalah seperti yang dijelaskan dalam legenda Gambar 4. (B) Model tiga dimensi dari TBR BT-R1 , BT-R3 dan BT-R4 dihasilkan dari struktur kristal cadherin homolog domain dari mouse E-cadherin (kode PDB ledh), mouse N-cadherin (kode PDB 1ncj), dan katak C-cadherin (kode PDB 113w). Ketiga TBR itu adalah ditempelkan ke struktur kristal yang ditumpangkan dengan penyelarasan urutan menggunakan program komputer DeepView (Swiss-PdbViewer). ¹⁸³ Penyelarasan dipandu oleh prediksi struktur sekunder oleh server JPred 3184 untuk mencocokkan untaian- yang diprediksi dalam urutan reseptor dengan untaian- dalam struktur kristal cadherin. Model template kemudian disempurnakan di server pemodelan protein SWISS-MODEL. ¹⁷³ Panah emas dan garis abu-abu sorot -untaian dan loop yang diprediksi, masing-masing. Panah biru dan garis biru mewakili urutan yang mengapit TBR dan diperlukan untuk mengikat (Ibrahim <i>et al.</i> , 2010).	37
7.	Kegiatan Pengambilan Sampel Tanah	39
8.	Sampel Tanah	40
9.	Pemanasan Ekstrak Sampel Tanah	41
10.	Ulat <i>Plutella xylostella</i> yang mati karena terinfeksi	44
11.	Sel dan Kristal Protein dan <i>B. thuringiensis</i>	45
12.	Tahapan-tahapan fermentasi semi padat.	76
13.	Tahapan-tahapan dalam fermentasi kultur tenggelam	79
14.	Grafik perbandingan antar perlakuan terhadap variabel populasi. (Gazali et al., 2017)	86

PENDAHULUAN

Bacillus thuringiensis (Bt) adalah bakteri aerobik, pembentuk spora, Gram-positif, berbentuk batang yang tersebar luas di lingkungan alami dari Arktik hingga Tropis (Martin dan Travers, 1989). Tindakan entomopatogen dan insektisida ("sotto" penyakit) dari bakteri pertama kali dicatat oleh Ishiwata di Jepang pada tahun 1901. Pada tahun 1915, strain lain ditemukan di Thuringia, Jerman, oleh Berliner, yang menamakannya *B. thuringiensis*. Insektisida mikroba berbasis Bt pertama dikomersialkan di Prancis pada tahun 1938; Bt terdaftar di Amerika Serikat pada tahun 1961. Tinjauan menyeluruh tentang sejarah, biologi, penggunaan awal dan saat ini, dan (eko)toksikologi dari agen pengendalian serangga mikroba yang paling penting ini tersedia (Bravo et al., 2005; Burges, 1981; Silau dan O'Callaghan, 2000). Bagian ini akan membahas masalah yang terkait dengan penggunaan konvensional insektisida bakteri ini dan tanaman rekayasa genetika yang mengekspresikan racun insektisida Bt hanya akan disebutkan jika sesuai.

Seperti mikroorganisme infeksius lainnya, patogen 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 stadium infeksi 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 infeksi 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 pengendalian 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*.

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.

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

- a. Cepat menyebar
- b. Persisten
- c. Aman dan diterima secara estetis
- d. Dapat menekan hama sampai ke tingkat subeconomic level
- e. Hasil pengendalian dapat diramalkan
- f. Mempunyai virulensi yang tinggi
- g. Mudah diproduksi secara massal
- h. Biaya produksi mikroba yang murah
- i. Mudah disimpan dan mudah cara pemakaiannya

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

Patogen	Tipe	Hama
Autographa californica NPV	V	Alfafa looper larvae
Bacillus lentimorbus	B	Japanese beetle larvae, turf grubs, white grubs
Bacillus popilliae	B	Japanese beetle larvae, turf grubs, white grubs
Bacillus sphaericus	B	Mosquito larvae
B. thuringiensis ssp.aizawai	B	Greater wax moth caterpillar in beehives
B. thuringiensis ssp. Kurstaki	B	Caterpillar of butterflies and moths
B. thuringiensis ssp israelensis	B	Mosquito, blackfly
B.t.ssp sandiego or tenebrio	B	Leaf beetle larvae
Beauveria bassiana	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
Heliothis moth NPV	V	Bollworm, tobacco budworm
Heterorhabditis bacteriophora	N	Flea beetle, Japanese beetle larvae, root maggots, turf grubs, weevils, whitw grubs, and soil dwelling insect
Hirsutella thompsonii	F	Citrus rust mite
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
Steinernema carpocapsae	N	Carpenterworm, clearwing moth larvae, flea beetle, Japanese beetle larvae, root maggots, turf grubs, weevils, whitw grubs, and soil dwelling
S. feltiae	N	Fungus gnat larvae, and soil dwelling insect

Keterangan : B= Bakterium
F= Fungi
N=Nematoda
P= Protozoa
V=Virus

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

Bacillus thuringiensis (Bt) adalah bakteri unik karena berbagitempat umum dengan sejumlah senyawa kimia yang digunakan secara komersial untuk mengendalikan serangga yang penting bagi pertanian dan kesehatan masyarakat. Meskipun bakteri lain, termasuk *B. popilliae* dan *B. sphaericus*, digunakan sebagai insektisida mikroba, spektrum aktivitas insektisida mereka cukup terbatas dibandingkan ke Bt. Yang penting, Bt aman untuk manusia dan paling banyak menggunakan biopestisida yang ramah lingkungan di seluruh dunia. Terlebih lagi, gen Bt insektisida telah dimasukkan ke dalam beberapa tanaman utama, membuat mereka tahan serangga, dan dengan demikian menyediakan model untuk rekayasa genetika di bidang pertanian. Ulasan ini menyoroti apa yang paling dianggap penulis isu dan topik relevan yang berkaitan dengan genomik dan proteomik Bt.

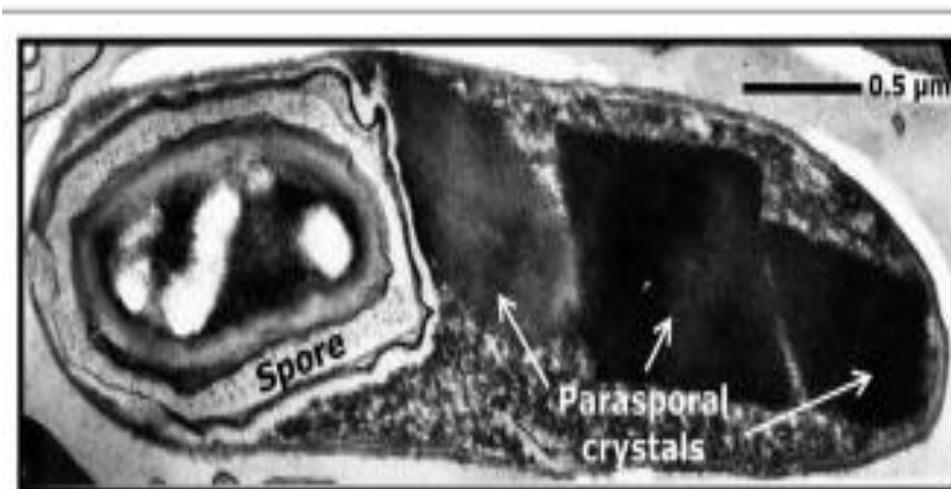
BIOLOGI DAN EKOLOGI BATERI *Bacillus thuringiensis*

Era Bt dimulai ketika, pada tahun 1901, seorang ilmuwan Jepang bernama Shigetane Ishiwata mengisolasi bakteri dari organisme mati. larva ulat sutera saat dia menyelidiki penyebab yang disebut "penyakit sotto" (penyakit kolaps mendadak). Penyakit itu bertanggung jawab atas hilangnya sejumlah besar ulat sutera di Jepang dan wilayah sekitarnya. Ishiwata menamai bakteri itu *Bacillus sotto*. Beberapa tahun kemudian, pada tahun 1911, seorang ilmuwan Jerman Ernst Berliner mengisolasi strain terkait dari Mediterania yang mati larva ngengat tepung yang dia temukan di pabrik tepung di negara bagian Jerman Thuringia. Dia dengan tepat menamai organisme itu *Bacillus thuringiensis*. Berliner mempelajari bakteri dan menemukan badan inklusi atau "Restkörper" di samping endospora.^{7,8} Tahun itu 1915.

Pada tahun 1927 kembali mengamati badan inklusi yang sama di Bt tetapi tidak lama kemudian (25 tahun) aktivitas insektisida dikaitkan dengan badan-badan yang sangat refraktil ini sekarang disebut sebagai "kristal paraspora," sebuah frasa yang diciptakan oleh Christopher Hannay pada tahun 1953. Begitu pentingnya kristal paraspora adalah disadari oleh Thomas Angus, ia segera mendemonstrasikan di tahun yang sama aktivitas insektisida dari badan inklusi. Dan, bersama dengan Philip Fitz-James, Hannay pada tahun 1955 menemukan bahwa kristal paraspora beracun terdiri dari protein.

Insektisida komersial pertama berdasarkan Bt, Sporeine, adalah diproduksi di Perancis pada tahun 1938 dan digunakan terutama untuk mengontrol tepung ngengat. Di

Amerika Serikat, Bt pertama kali diproduksi secara komersial pada tahun 1958 dan, pada tahun 1961, bioinsektisida berbasis Bt sedang dikembangkan. terdaftar oleh Badan Perlindungan Lingkungan AS. Sejak 1996, tanaman transgenik tahan serangga, yang dikenal sebagai tanaman Bt, memiliki diperluas ke seluruh dunia dan terbukti cukup efisien dan membantu dalam mengurangi penggunaan insektisida kimia. Terbaru perkiraan menunjukkan bahwa lebih dari 50% kapas dan 40% jagung yang ditanam di AS direkayasa secara genetik untuk menghasilkan Bt racun insektisida. Pasar global saat ini untuk pestisida (herbisida, insektisida, fungisida, nematisida dan fumigan) senilai \$25,3 miliar. Biopestisida hanya mewakili 2,5% dari pasar ini tetapi pangsa mereka diperkirakan akan meningkat menjadi sekitar 4,2%, atau lebih dari \$1 miliar, pada tahun 2010.



Gambar 1. Mikrograf elektron transmisi dari sel bersporulasi *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* strain C18 (x 44.000). Saring C18 diisolasi dari larva bollworm kapas mati. Ketegangannya unik di bahwa ia menyimpan 15 gen menangis. Kisaran host C18 mencakup tiga utama ordo serangga: Lepidoptera, Diptera dan Coleoptera serta nema todes. Kristal paraspora C18 bervariasi dalam bentuk dan ukuran (panah), dan mewakili 50% dari berat kering sel. (Ibrahim *et al*, 2010)

Menariknya, beberapa strain Bt menghasilkan non-insektisida protein yang mengkristal menjadi inklusi paraspora berbentuk tidak beraturan.¹⁵ Inklusi dari satu isolat yang diobati dengan protease bersifat toksik ke sel kanker manusia, termasuk leukemia T (MOLT-4) dan sel kanker serviks (HeLa). Sitotoksitas bergantung pada dosis.

Protein non-insektisida lain, parasporin, juga menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel MOLT-4 dan HeLa.¹⁷

Siklus Hidup

Siklus hidup Bt ditandai oleh dua fase yang meliputi: pembelahan sel vegetatif dan perkembangan spora, disebut juga sebagai siklus sporulasi. Sel vegetatif berbentuk batang (2–5 m panjang dan lebar sekitar 1,0 m) dan terbagi menjadi dua seragam sel anak dengan pembentukan septum divisi dimulai di tengah jalan sepanjang membran plasma. Sporulasi, di sisi lain, melibatkan pembelahan sel asimetris dan ditandai dengan tujuh tahapan¹⁹ yang meliputi (tahap I) pembentukan filamen aksial, (tahap II) pembentukan septum forespora, (tahap III) engulfment, kemunculan pertama kristal paraspora dan pembentukan forespora, (tahap IV sampai VI) pembentukan eksosporium, dinding sel primordial, korteks dan mantel spora disertai dengan transformasi spora nukleoid dan (tahap VII) pematangan spora dan lisis sporangial.

Gambar 1., menggambarkan sel Bt yang bersporulasi penuh di mana terdapat: beberapa kristal paraspora terletak di sepanjang sisi endospora. Produksi protein kristal oleh Bt selama sporulasi adalah hal yang unik fenomena biologis yang diatur

secara genetik yang, mungkin, mengurangi stres secara fisik dengan mengimbangi kehilangan air selama spora untuk pembentukan dan memberikan keuntungan kelangsungan hidup tambahan dengan mengerahkan tindakan mematikan terhadap serangga inang. Pada gilirannya, tindakan toksik memberikan nutrisi inang yang cukup untuk memungkinkan perkecambahan spora bakteri yang tidak aktif.

Klasifikasi dan Taksonomi *Bacillus thuringiensis*

Seperti ditunjukkan di atas, sel vegetatif Bt dicirikan sebagai:

batang kekar besar yang lurus atau sedikit melengkung dengan ujung membulat. Mereka biasanya terjadi berpasangan atau rantai pendek. Bt adalah Gram positif, tidak berkapsul dan motil dengan flagela peritrik.

Klasifikasi strain Bt telah dicapai dengan serotipe H, reaksi imunologis terhadap flagellar bakteri anti gen. Gen *hag* mengkode flagellin, yang bertanggung jawab untuk memunculkan reaksi imunologis dalam serotipe H. Spesifik urutan asam amino flagelin telah berkorelasi dengan serotipe Bt H dan setidaknya 69 serotipe H dan 82 serologis varietas (serovar) Bt telah dikarakterisasi.²¹ Namun, serotipe H terbatas kemampuannya untuk membedakan galur dari serotipe H yang sama atau dari serovar yang sama. Karena kepentingan ekonominya, telah menjadi perlu untuk dikembangkan alat alternatif untuk klasifikasi dan pengelompokan strain Bt dan isolat. Oleh karena itu, beberapa program penyaringan telah didirikan untuk mengisolasi strain Bt baru dengan insektisida yang unik properti. Akibatnya, banyak strain Bt dengan aktivitas melawan Serangga lepidopteran, dipteran dan coleopteran

telah diisolasi. Selain itu, strain Bt aktif terhadap serangga milik ordo Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera dan Mallophaga serta nematoda, tungau dan protozoa telah diisolasi. Penempatan Bt sebagai spesies terpisah dalam genus Bacillus telah menjadi kontroversi sejak publikasi Genus Bacillus pada tahun 1973, dan Manual of Determinative Bergey Bakteriologi pada tahun 1974. Genus Bacillus adalah salah satu yang genus yang paling beragam di kelas Bacillus dan termasuk aerobik dan anaerobik fakultatif, berbentuk batang, membentuk spora Gram-positif bakteri dengan kandungan G + C berkisar antara 32-69%. Berdasarkan pada heterogenitas filogenetik, delapan genera di kelas Bacillus telah diusulkan: Bacillus, Alicyclobacillus, Paenibacillus, Brevibacillus, Aneurinibacillus, Virgibacillus, Salibacillus dan Gracilibacillus. Banyak spesies dari genus ini praktis penting karena mereka menghasilkan antibiotik dan peptida dengan aktivitas anti-mikroba, anti-virus dan anti-tumor. Mereka juga mensintesis enzim dan molekul termotabil yang dapat menekan organisme fitopatogen yang terbawa tanah.

Dalam monograf The Genus Bacillus, Gordon et al. mempertimbangkan Bt berbagai B. cereus (Bc) bersama dengan B. anthracis (Ba) dan B. mycoides (Bm). Tentu saja, Bt, Ba dan Bc memiliki banyak kesamaan sifat fenotipik dan genotipik sejauh tiga spesies telah ditempatkan di bawah satu kelompok yang disebut Bacillus kelompok cereus (BC). Ba adalah agen penyebab antraks, penyakit akut dan seringkali penyakit mematikan pada manusia dan hewan. Bc adalah patogen manusia oportunistik dan dapat menyebabkan keracunan makanan, mata infeksi dan penyakit periodontal, di antara penyakit lainnya. Bt pos memiliki berbagai fitur khusus

termasuk (1) kemampuannya untuk hidup lingkungan bebas dan independen dari Gram-positif lainnya basil pembentuk spora, (2) produksi paraspora entomocidal protein kristal dan (3) kelangsungan hidup di ceruk lingkungan yang unik di usus tengah dan hemocoel serangga. Selain Ba, Bc, Bt dan Bm, ada dua spesies lain yang sangat berkerabat *B. pseudomy coides* (Bpm) dan *B. weihenstephanensi* (Bw) dalam kelompok BC. Anehnya, Bt telah diduga sebagai patogen oportunistik pada hewan dan manusia.³⁶⁻³⁸ Dua strain Bt, Bt 97-27 (subsp. konkukian) dan Bt Al Hakam (terisolasi di Irak oleh United Komisi Khusus Bangsa-Bangsa), awalnya ditunjuk sebagai patogen manusia. Bt 97-27 pertama kali diisolasi dari nekrotik jaringan pada pasien rumah sakit laki-laki berusia dua puluh delapan tahun. penunjukan strain 97-27 sebagai Bt didasarkan pada tes biokimia dan penampilan badan inklusi. Namun, isolat kedua dari pasien yang sama tidak memiliki badan inklusi.

Analisis urutan menunjukkan tidak ada gen insektisida (menangis) yang ada pada kromosom 97-27 atau plasmid tunggal pBT9727. Analisis urutan genom Al Hakam juga mengungkapkan tidak ORF yang dikodekan kromosom atau dikodekan plasmid dengan kesamaan yang signifikan dengan gen insektisida mana pun. Menariknya, pBT9727 strain 97-27 dan plasmid pXO2 dari Ba memiliki protein replikasi yang hampir identik dan asal mula replikasi yang sangat terjaga. Namun, wilayah pXO2 yang mengkodekan poli-c-D-glutamic kapsul asam diganti pada pBT9727 dengan elemen seluler genetik, menunjukkan bahwa pBT9727 mungkin telah berevolusi dari pXO2 untuk melakukan fungsi lain dalam strain 97-27. Penempatan garis filogenetik menggunakan polimorfisme panjang fragmen yang

diperkuat analisis (AFLP) dan analisis urutan komparatif menunjukkan bahwa strain 97-27 lebih terkait dengan Bc dan Ba daripada dengan Bt. Ke pengetahuan penulis, tidak ada penelitian lain yang dilaporkan yang mencirikan Bt sebagai patogen oportunistik manusia atau hewan berdarah panas.

Urutan genom dari sejumlah galur dalam kelompok BC telah selesai: Bc (ATCC 14579 dan 10987 dan regangan E33L), Bw-KBAB4, Ba-Ames, Ba-Ames Leluhur dan Ba-Sterne. Sekuensing dan anotasi genom Bt subsp. Kurstaki hampir selesai di laboratorium Bulla. Perbandingan semua urutan genom, termasuk subspecies kurstaki, mengungkapkan kesamaan yang sangat besar dalam hal identitas urutan nukleotida dan organisasi gen dan operon, kombinasi tidak diamati sampai sekarang di antara spesies bakteri yang berbeda. Fitur pembeda utama Bt adalah faktor virulensi dan patogenisitasnya, diwakili oleh gen insektisida yang terletak pada kromosom dan beberapa plasmid. Yang dari Ba adalah toksin tripartit dan kapsule yang dikodekan oleh plasmid saja.

Analisis urutan nukleotida 16S dan 23S rDNA, sebuah teknologi yang kuat untuk identifikasi bakteri, juga menunjukkan bahwa spesies yang termasuk dalam kelompok BC memiliki urutan yang hampir identic kesamaan. Teknik molekuler seperti enzim multi-lokus elektroforesis,^{43,44} analisis AFLP⁴⁵ dan urutan multi-lokus mengetik⁴⁶ telah membantu menyelesaikan beberapa masalah yang terkait dengan BC klasifikasi kelompok. Analisis berbagai strain Bc dan Bt mengungkapkan keragaman yang sangat tinggi dalam genotipe multi-lokus, menunjukkan bahwa Bc

dan Bt menunjukkan tingkat klonalitas yang rendah dan pertukaran materi genetik dapat sering terjadi di lingkungan alaminya. Telah disarankan bahwa Ba, Bc dan Bt harus diklasifikasikan sebagai satu spesies, atau bahwa Ba dipertimbangkan dalam garis keturunan Bc. Elektroforesis gel medan-pulsa dan analisis dendrografi menguatkan gagasan terakhir dengan menunjukkan bahwa isolat Ba termasuk dalam cluster yang sama tetapi berbeda dari Bc dan Bt. Selain itu, penggunaan gen *gyrB* (gen pemeliharaan rumah yang mengkode B subunit DNA girase, topoisomerase tipe I) telah terbukti sangat berguna untuk membedakan anggota grup BC.

Kami telah membangun pohon filogenetik, berdasarkan urutan penyelarasan 16S rRNA dari 20 galur dalam kelompok BC menggunakan metode tetangga-bergabung Bootstrapped (Gbr. 2). Bootstrap volume dilaporkan di cabang. Pohon menampilkan pembagian dari 20 strain menjadi dua kelompok besar. Grup A mencakup semua Ba, Strain Bc dan Bpm dan Grup B termasuk strain Bw KBAB4 dan Strain Bm SDANFMO448. Ada dua cluster di Grup A, masing-masing ditandai dengan angka Romawi. Cluster I termasuk strain Ba Sterne CDC684 dan Ames Ancestor A0248; Strain Bc AH187 dan AH 820 dan ATCC 10987 dan 14579; Bpm regangan CIP 5259; dan Bt serovar konkukian dan Bt Al-Hakm. Bc AH820 dan serovar konkukian di Cluster 1, keduanya diduga sebagai patogen manusia, adalah lebih erat terkait sedangkan strain Bpm CIP 5259 dan Bc ATCC 14579, keduanya tidak patogen, adalah yang paling berbeda di klaster. Cluster II meliputi Bt serovars tenebrionis, mor risoni, kurstaki, sotto, israelensis dan berliner dan Bc G9842. Kita menyimpulkan dari dendogram bahwa baik Bt serovar konkukian dan Kelompok

regangan Al-Hakm agak baik dengan galur Ba dan Bc, tetapi tidak dengan serovar Bt, seperti yang disarankan sebelumnya.

Ekspresi dan Regulasi Gen Insektisida

Salah satu aspek yang paling dramatis dari sporulasi Bt adalah pembentukan kristal paraspora. Racun insektisida (CRY Toksin) dari Bt, sering disebut sebagai Ø-endotoksin setelah Heimpe adalah agak spesifik untuk serangga tertentu. Keluarga pengkodean gen untuk racun ini adalah keluarga gen CRY. Karakteristik umum gen Cry adalah bahwa mereka diekspresikan selama fase stasioner pertumbuhan. Protein cry, produk akhir dari ekspresi gen cry, merupakan 20-30% dari berat kering sel dan umumnya terakumulasi di akhir sel induk, dimulai pada tahap III sporulasi dan berlanjut sampai tahap VII. Istilah Ø-endotoksin, relatif terhadap toksin Bt Cry, adalah keliru. Heimpe menamai protein kristal paraspora Bt seperti itu karena ia terbentuk di dalam sel dan karena ia berada di urutan keempat dalam urutan komponen beracun lainnya yang ditemukan dalam bakteri. Namun, endotoksin dikaitkan dengan lipo-polisakarida bagian dari kompleks antigen somatik "O" lengkap yang ditemukan di membran luar berbagai bakteri Gram-negatif dan merupakan faktor penting dalam kemampuannya menyebabkan penyakit. Berdasarkan cara kerja, racun Cry adalah racun "sederhana", yang didefinisikan sebagai monomer atau oligomer dari protein sederhana yang beracun. Cry toksin ada sebagai monomer toksik yang mampu oligomerisasi. Kristal paraspora Bt adalah oligomer yang tersusun dari polipeptida subunit protoksin. Protoksin adalah prekursor atoksik langsung dari toksin Cry, yaitu, setelah aktivasi protoksin, toksin Cry

serangga dihasilkan.^{57,58} Menariknya, pemrosesan protoksin menjadi toksin berbeda di antara masing-masing kelompok toksin, tergantung pada spesifisitas inang, yaitu racun yang membunuh ngengat, kumbang atau nyamuk. Misalnya, racun Cry1A dan Cry4 (~65 kDa) yang terutama membunuh ngengat dan nyamuk, masing-masing, adalah produk protoksin dalam kisaran berat molekul 125-135 kDa sedangkan racun Cry3 (~68 kDa) yang membunuh kumbang adalah produk konversi dari protoksin 72-kDa. Mekanisme toksin Cry tindakan dibahas nanti dalam ulasan ini.

Sintesis protein Cry tingkat tinggi tampaknya dikendalikan secara terkoordinasi oleh berbagai mekanisme yang terjadi pada proses transkripsi, pascatranskripsi, dan pascatranslasi tingkat. Biasanya, inisiasi proses sporulasi di Bt adalah dikendalikan oleh aktivasi berturut-turut faktor sigma yang mengikat inti RNA polimerase dan transkripsi langsung menggunakan promotor spesifik sporulasi.⁵⁹ Ada lima spesifik sporulasi faktor transkripsi, H, F, E, G dan K, yang erat diatur dan muncul dalam urutan tetap selama sporulasi. H faktor aktif dalam sel pra-divisi; E dan K aktif di sel induk; dan F dan G aktif di forespora. Beberapa promotor gen menangis telah diidentifikasi dan urutannya ditentukan.⁶⁰⁻⁶⁴ Gen cry1Aa, misalnya, diekspresikan melalui dua promotor yang tumpang tindih (BtI dan BtII). Transkripsi dari promotor hilir, BtI, aktif antara tahap II dan VI dari sporulasi dan menggunakan E. Transkripsi selanjutnya difasilitasi oleh promotor hulu, BtII, yang aktif dari tahap VI sampai akhir sporulasi, dan menggunakan K. Penggunaan berurutan dari dua promotor kemungkinan besar memastikan sintesis protoksin selama siklus sporulasi. Beberapa gen cry, Namun, tampaknya diekspresikan secara independen dari

sporulasi.

Misalnya, ekspresi gen *cry3A* ditingkatkan dan diperpanjang pada strain mutan yang tidak dapat memulai sporulasi.⁶⁶ Juga, De Souza et al. dan Malvar et al.⁶⁸ melaporkan bahwa gen *cry3A* adalah diekspresikan selama pertumbuhan vegetatif. Promotor *cry3A*, dikenali oleh A, faktor sigma sel vegetatif, diaktifkan pada akhir pertumbuhan vegetatif eksponensial dan tetap aktif melalui tahap III sporulasi.

Mekanisme pengaturan tambahan untuk ekspresi beberapa gen menangis pada tingkat transkripsi melibatkan protein pengatur yang mengikat dengan afinitas berbeda dalam pengulangan terbalik dan daerah tikungan potensial yang terletak 200–300 pasangan basa di hulu promotor *cry1* yang berbeda.⁶⁹ Protein pengatur ini diidentifikasi sebagai subunit E2 dari piruvat dehidrogenase. Sebuah chimera yang terdiri dari daerah hulu yang bermutasi dan urutan pengkodean β -galaktosidase mengakibatkan penurunan pengikatan sub unit E2 dan pengurangan sintesis β -galaktosidase. Tampaknya, keterlibatan subunit E2 piruvat dehidrogenase dalam regulasi *cry* gen berimplikasi pada hubungan antara aktivitas katabolik dan sintesis toksin Cry.

Regulasi ekspresi gen *cry* di posttranskripsional tingkat mungkin tergantung pada stabilitas mRNA. Waktu paruh *cry* mRNA kira-kira sepuluh menit, yang setidaknya lima kali lipat lebih besar dari waktu paruh mRNA bakteri rata-rata.⁷⁰ Kehadiran terminator transkripsi diduga-bertindak sebagai positif retroregulator—pada ujung 3' dari banyak gen *cry* dapat berkontribusi terhadap stabilitas mRNA.⁷¹ Dengan kata lain, terminator transkripsi dapat meningkatkan stabilitas *cry* mRNA

dengan melindunginya dari degradasi eksonuklease, dimulai dari ujung 3'. Tentu saja, aktivitas pemrosesan 3'-5' eksoribonuklease terganggu oleh 3' struktur batang-loop. Agaisse dan Lereclus mengidentifikasi Shine-Dalgarno yang sempurna (SD) urutan (GAAAAGGGAGG) dalam Bt diperlukan untuk stabilisasi dari cry3A mRNA. Urutan dipetakan pada posisi antara -125 dan -117 di wilayah 5' yang tidak diterjemahkan dan penulisnya disebut urutan stabilisasi Shine-Dalgarno (STAB-SD) motif. Sangat mungkin bahwa stabilitas mRNA dihasilkan dari interaksi ujung 3' dari 16S rRNA dari ribosom 30S subunit dan STAB-SD. Pengikatan subunit ribosom 30S untuk urutan ini mungkin melindungi mRNA dari aktivitas ribonuclease 5'-3', menghasilkan transkrip yang stabil. Potensi STAB-SD urutan juga telah diidentifikasi di posisi yang sama di hulu gen cry3Ba dan cry7Aa73,74 dan hulu cry1Ic di wilayah intergenik antara gen cry1Ac dan cry1Ic.

Mungkin pembentukan kristal paraspora yang stabil, yang terdiri dari protein Cry, mewakili regulasi pascatranslasi. Mekanisme yang melindungi toksin dari degradasi proteolitik prematur. Kehadiran daerah kaya sistein di Setengah terminal-C dari protoksin juga dapat berkontribusi pada stabil struktur kristal melalui pembentukan ikatan disulfida. Itu racun yang tidak memiliki daerah terminal-C yang kaya sistein, misalnya, racun Cry yang terpotong, dapat menghindari kesulitan dengan membentuk jembatan garam antarmolekul dan interaksi hidrofobik yang dapat menstabilkan struktur kristal. Beberapa penyelidik telah melaporkan bahwa kristal paraspora membutuhkan protein tambahan untuk menstabilkan dan mengkristal racun Cry serumpun.⁷⁶⁻⁷⁸ Protein aksesori ini dapat bertindak sebagai pendamping untuk

menstabilkan molekul protoksin yang baru lahir, memfasilitasi kristalisasi.

Salah satu fitur menarik dari gen cry adalah derajatnya yang tinggi keliatan. Karakteristik khusus ini dapat berkontribusi pada keserbagunaan racun Cry yang berkaitan dengan kisaran inang serangga mereka. Itu penjelasan yang paling mungkin untuk plastisitas genetik seperti itu adalah adanya dari banyak transposon dan elemen penyisipan yang mengakit gen menangis. Memang, elemen transposabel ini dapat memfasilitasi gen penggandaan dan evolusi toksin baru.⁷⁹ Selanjutnya, fakta bahwa gen menangis dibawa pada plasmid yang dapat ditularkan meningkat kemungkinan transfer gen horizontal di antara Bt . yang berbeda strain, yang mengarah pada penciptaan strain baru dengan sekumpulan racun cry.

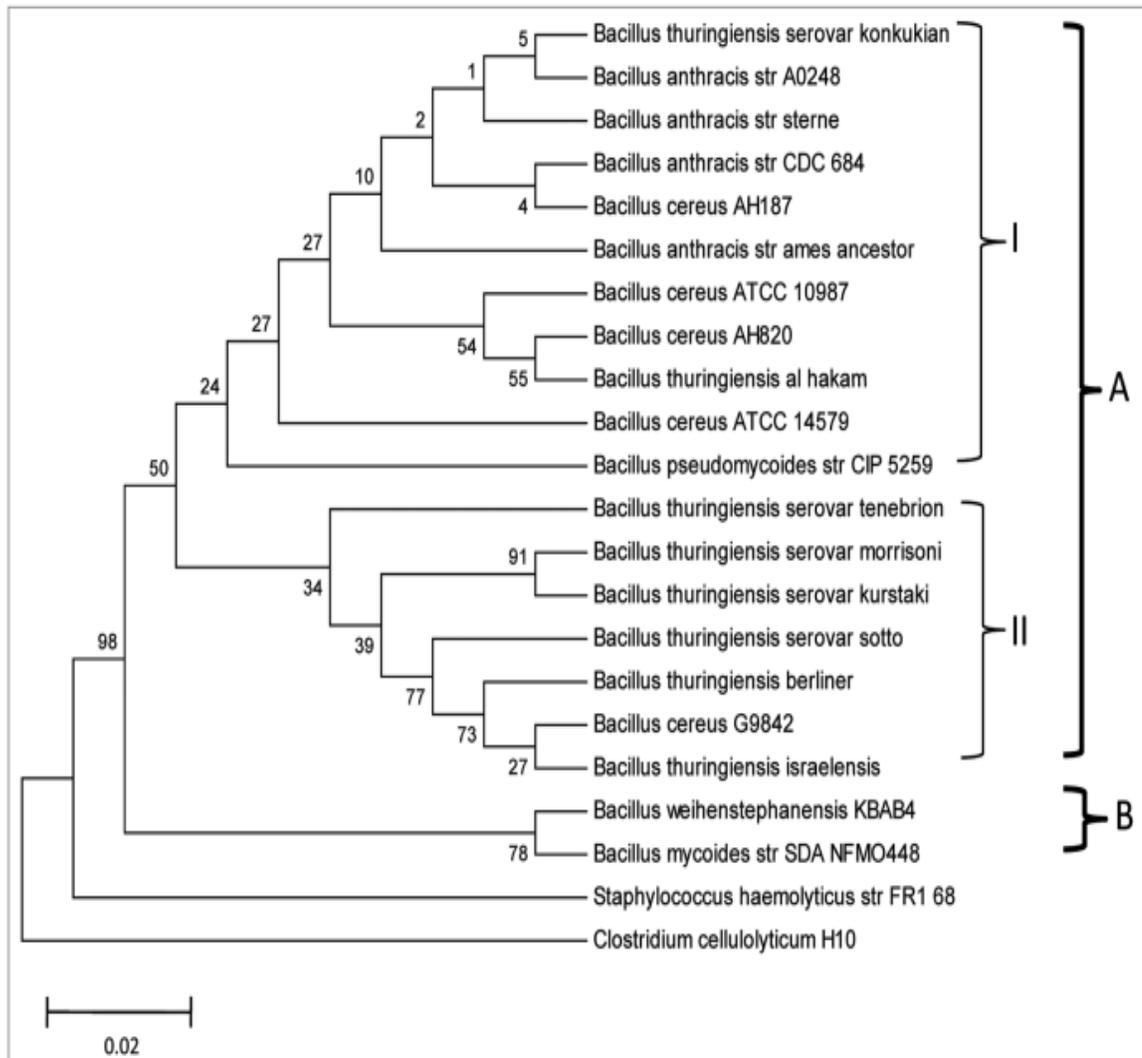
Organisasi dan pengelompokan gen cry dalam operon telah ditunjukkan dalam banyak strain Bt. Secara khusus, cry1Ac, cry1F, cry1I, cry2Aa, cry2Ac, cry9Ca dan cry11Aa adalah konstituen dari operon. Beberapa operon mencakup setidaknya upstream lainnya bingkai bacaan seperti orf1 atau p19. Orf kedua (orf2 atau p20) berada di operon cry2 dan cry11. Salah satu penjelasan kenapa berbeda adalah bahwa organisasi semacam itu memfasilitasi ekspresi gen diferensial, menghasilkan kristal paraspora yang mengandung racun Cry yang berbeda, atau kristal yang berbeda, masing-masing yang mengandung toksin individu tertentu. Sifat dan konsentrasi molar toksin yang dihasilkan oleh subspecies Bt tertentu tidak hanya mencerminkan spesifisitas serangga target tetapi juga desain struktural kristal paraspora individu. Konsekuensi dari skenario ini adalah sinergisme antara berbagai Racun cry.

Penjelasan lain yang masuk akal untuk pengaturan cry gen dalam operon

adalah peningkatan rekombinasi genetik yang mungkin menghasilkan racun baru atau kombinasinya, yang, dalam gilirannya, akan memberikan kekhususan host baru. Juga, konservasi di penggunaan faktor sigma bisa menjadi hasil potensial. Membagikan polimerase dengan banyak salinan gen menangis kemungkinan besar akan menimbulkan persaingan untuk faktor transkripsi yang sesuai, yang pada akhirnya mempengaruhi sifat struktural dan fisiologis tidak hanya dari kristal paraspora tetapi juga dari endospora itu sendiri.

Aronson et al., melaporkan bahwa plasmid-cured acrySTALLIFEROUS strain Bt memiliki mantel spora normal sedangkan strain parental kekurangan protein selubung spora. Defisiensi pada lapisan spora protein kemungkinan besar disebabkan oleh kapasitas organisme yang terbatas untuk mentranskripsi gen mantel spora yang bergantung pada K- dan E.

Secara signifikan, sebagian besar gen cry diatur dalam operon, misalnya, cry1Ic1, cry2Aa, cry2Ac dan cry11A, kode untuk racun terpotong yang tidak memiliki wilayah terminal-C kaya sistein yang diperlukan untuk pelipatan dan kristalisasi yang tepat. Dalam beberapa kasus, protoksin dapat bertindak sebagai pendamping molekuler untuk toksin yang terpotong sama seperti: protein P19 dan P20 mungkin dilakukan untuk masing-masing Cry2A dan Cry11.



Gambar 2. Cabang pohon yang bergabung dalam bootstrap dari 20 galur dari spesies berbeda dari kelompok BC. Pohon itu dihasilkan berdasarkan keselarasan urutan nukleotida 16S rRNA. Volume bootstrap dilaporkan di cabang. Ke-20 galur tersebut dibagi menjadi dua kelompok utama. Kelompok A mencakup semua galur Ba, Bc dan Bpm dan Grup B mencakup galur Bw KBAB4 dan Bm galur SDANFMO448. Ada dua cluster dalam Grup A, masing-masing ditandai dengan angka Romawi I dan II. Cluster I termasuk strain Ba Sterne CDC684 dan Ames Ancestor A0248; Strain Bc AH187 dan AH 820 dan ATCC 10987 dan 14579; Bpm regangan CIP 5259; dan Bt serovar konkukian dan Bt Al-Hakm. Strain Bpm CIP 5259 dan Bc ATCC 14579 adalah yang paling banyak berbeda dalam klaster ini. Cluster II meliputi Bt serovar tenebrionis, morrisoni, kurstaki, sotto, israelensis dan berliner dan Bc G9842. Batang horizontal mewakili perbedaan 0,02% dalam kesamaan nukleotida. (Ibrahim *et al*, 2010)

Fungsi Biokimia dan Proteomik dari Racun Cry

Setelah spora matang terbentuk, baik spora maupun paraspora kristal dilepaskan dari sel induk ke lingkungan di mana mereka tersedia untuk konsumsi larva. Racun cry yang terkandung dalam kristal adalah faktor virulensi yang benar-benar membedakan Bt dari sepupu genetiknya Ba dan Bc. Dan, itu adalah toksin cry yang membangun tempat aman bagi bakteri di bangkai serangga. Kristal paraspora yang berbeda terbuat dari protein Cry tunggal atau ganda. Misalnya, kristal paraspora Bt subsp. kurstaki HD-73 hanya mengandung protein Cry1Ac, sedangkan kristal paraspora strain HD1, yang termasuk subspecies yang sama, terdiri dari lima racun Cry yang berbeda— Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa dan Cry2Ab. Fitur lain racun Cry adalah bahwa protoksin prekursor mereka mengkristal bersama dalam berbagai bentuk dan bentuk sebagaimana dibuktikan oleh mikroskop electron (lihat Gambar 1). Racun tangisan dikodekan oleh gen tangisan yang ditemukan terutama pada plasmid besar. Namun, gen dapat diintegrasikan ke dalam kromosom. Sejak kloning dan pengurutan yang pertama gen cry, 85,86 sekuens nukleotida telah dilaporkan lebih banyak dari 300 gen cry. Höfte dan Whiteley dan Carlton mengajukan skema nomenklatur dan klasifikasi universal untuk Protein cry dan gennya berdasarkan kisaran inang. Nanti yang lain format nomenklatur, berdasarkan kesamaan urutan asam amino, diusulkan. Dalam klasifikasi yang diusulkan oleh Crickmore et al. gen cry dibagi menjadi 51 kelompok dan subkelompok dan racun Cry dipisahkan menjadi enam kelas utama menurut kekhususan inang serangga dan termasuk: Kelompok 1—lepidopteran (Cry1, Cry9 dan Cry15); kelompok 2—

lepidopteran dan dipteran (cry2); grup 3—coleopteran (Cry3, Cry7 dan Cry8); kelompok 4—dipteran (Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 dan cry20); kelompok 5—lepidopteran dan coleopteran (Cry1I); dan kelompok 6—nematoda (Cry6). Cry1I, Cry2, Cry3, Cry10 dan toksin Cry11 (73–82 kDa) unik karena muncul menjadi pemotongan alami dari protein Cry1 dan Cry4 yang lebih besar (130-140 kDa).

Struktur tiga dimensi dari sejumlah racun Cry telah dihasilkan: Cry3Aa, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Bb, Cry4Ba, Cry4Aa dan Cry8Ea1. Semua racun Cry berisi tiga domain struktural dan berbagi tingkat kesamaan topologi logis yang tinggi. Domain I terdiri dari bundel tujuh-heliks dihubungkan dengan loop. Bundel - heliks memiliki pusat amphipathic helix yang terpelihara dengan baik di antara semua racun yang dijelaskan. Berbagai mutasi di Domain I tampaknya menghilangkan toksisitas tetapi tidak mengikat reseptor seluler. Apakah ini mutasi mempengaruhi konformasi keseluruhan dari molekul toksin, com toksisitas yang menjanjikan, tidak diketahui. Domain II terdiri dari tiga set dari β -sheet antiparalel, masing-masing diakhiri dengan loop. versi beta lembaran dikemas di sekitar inti hidrofobik pusat membentuk yang disebut struktur beta-prisma. Domain III adalah sandwich dua β -sheet antiparalel yang membentuk topologi “jelly-roll”. Hasil dari mutagenesis dan analisis pemotongan yang diarahkan ke situs memberikan hasil yang kuat bukti keterlibatan Domain II dan III dalam reseptor mengikat dan aktivitas insektisida.

Domain I konon berfungsi untuk membentuk saluran ion di membran sel, dan

motif hidrofobik dalam domain ini adalah apa efek toksisitas. Setelah kontak dengan membran sel, domain mengalami pelipatan ulang untuk memfasilitasi penyisipan toksin ke dalam membran seperti toksin bakteri lainnya.^{97,98} Beberapa artikel telah melaporkan bahwa heliks -4 dan -5 hidrofobik menyisipkan ke dalam membran dan bahwa orientasi ini bertanggung jawab untuk toksisitas. Namun, tidak ada bukti in situ atau in vivo untuk mendukung klaim ini. Apa fungsi yang dimiliki heliks lain bukan jelas meskipun substitusi alanin dari empat residu aromatik yang sangat terkonservasi, Trp243, Phe246, Tyr249 dan Phe264, dalam helix 7 dari racun nyamuk Cry4B menghasilkan penurunan dramatis dalam toksisitas terhadap nyamuk *Stegomyia aegypti*. Selain itu, hilangnya toksisitas hampir lengkap ditemukan untuk Phe264Ala/Tyr249Ala mutan ganda. Analisis mutagenik lebih lanjut dari mutan ganda menunjukkan bahwa setelah penggantian dengan residu aromatik lainnya, khususnya pada Tyr249 dan Phe264, aktivitas insektisida diperoleh kembali. Dalam pekerjaan lain, penghapusan 42 residu asam amino segera hulu -helix 1 diikuti dengan penggantian residu Lys (Lys63 dan Lys64) oleh alanin dan prolin, masing-masing, ditingkatkan potensi toksin Cry2A. Penjelasan yang diberikan oleh penulis adalah bahwa penghapusan fragmen asam amino 42 mengekspos daerah toksin yang sebelumnya tersumbat yang sesuai dengan daerah pengikatan reseptor dari toksin Cry2. Domain II adalah domain yang paling divergen di antara Cry toxin dan penggantian atau peralihannya dengan domain II dan III dari racun lain dapat mempengaruhi spesifisitas inang.^{103,104} Loop yang menghubungkan untaian β -sheet antiparalel terbuka di puncak domain dan mewakili wilayah yang paling tidak

terkonservasi di antara racun menangis. Menariknya, loop apikal Cry1A, Cry2A, Racun Cry3A, Cry4A dan Cry5A sangat bervariasi panjangnya.

Toksin Cry5Aa memiliki loop terpanjang sedangkan Cry3Aa memiliki loop terpendek. Dampak panjang loop terhadap struktur domain dan fungsinya tidak diketahui. Tentu saja, rentang loop berkontribusi pada konfigurasi Domain II dan, kemungkinan besar, memengaruhi interaksi ketiga domain serta pengikatan toksin individu ke reseptor serumpunnya. Boonserm dkk. telah menyarankan bahwa loop yang lebih pendek lebih mungkin mengganggu struktur inti β -sheet Domain II dan, akibatnya, mengganggu interaksi Domain I dan II. Apapun mereka peran struktural atau fungsional, loop tampaknya menjadi elemen kunci dalam pengenalan reseptor, pengikatan dan spesifisitas.

Kontribusi loop yang terpapar permukaan di Domain II toksisitas serangga telah diperiksa di sejumlah situs-diarahkan studi mutagenesis. Keterlibatan loop 2 (khususnya Arg368-Ile375) dalam toksisitas toksin Cry1Ab terhadap ulat tanduk tembakau ditunjukkan dengan delesi asam amino tunggal atau alanine substitusi untuk Phe371 dan Gly374. Relevansi Arg368 dan Arg369 juga ditampilkan menggunakan pendekatan yang sama. Substitusi alanin dari residu loop 3, Ser438-Ser443, dalam toksin Cry1Ab menunjukkan mengurangi toksisitas dan pengikatan pada ulat tanduk tembakau dan ulat tunas tembakau. Demikian juga, penghapusan residu Ala440-Ala443 dalam loop 3 Cry1Aa menghasilkan pengurangan toksisitas terhadap ulat sutra serta ulat tanduk tembakau. Eksperimen lainnya dengan toksin Cry3A terlibat loop 1 dan 3 dari Domain II dipengikatan reseptor sedangkan mutasi

ganda loop 2 tidak berpengaruh pada pengikatan atau toksisitas. Domain II loop dalam racun pembunuh nyamuk Cry4A, Cry4B, Cry11A dan Cry11B sangat penting tidak hanya di reseptor mengikat tetapi dalam kekhususan juga. Ketika loop 3 dari Cry4B adalah dibuat untuk meniru Cry4A oleh mutagenesis yang diarahkan situs, Cry4B menjadi racun bagi *Culex pipiens* sedangkan racun tipe liar bukan. Anehnya, mutasi pada loop 1 dan 2 dari Cry4B menghilangkan toksisitas terhadap larva *Aedes* dan *Anopheles* tetapi tidak untuk *Culex*.

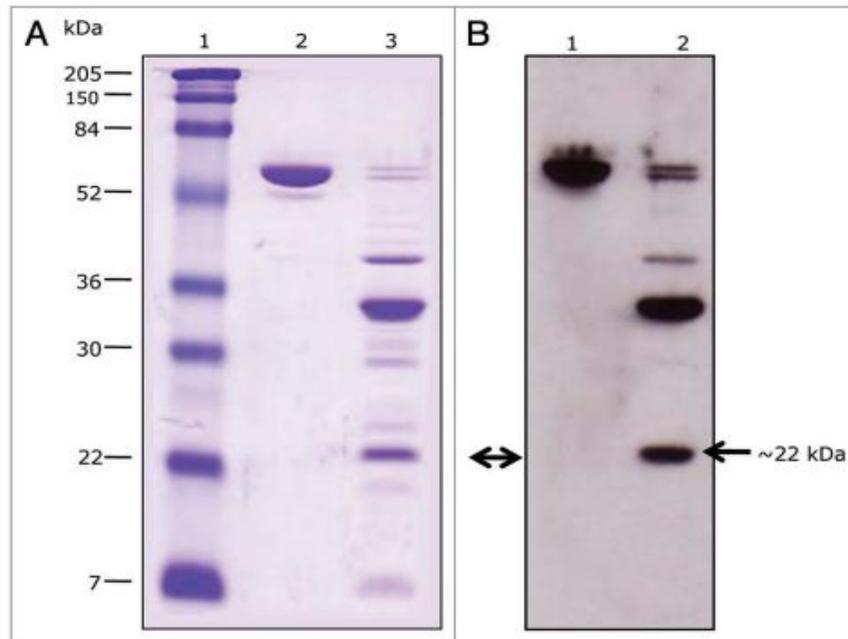
Uji pengikatan kompetisi in vitro dengan toksin Cry11A diindikasikan bahwa loop 2 dan 3 penting untuk mengikat *Aedes aegypti* vesikel membran brush-border. Peptida yang sesuai dengan loop 8, 1 dan 3, tetapi bukan loop 2, dari toksin Cry11B yang berkompetisi dengan pengikatan toksin pada membran usus tengah *Aedes* dan mutagenesis data menunjukkan bahwa loop 8, 1 dan 3 terlibat dalam toksisitas. Secara keseluruhan, semua hasil ini memberikan bukti kuat bahwa loop 3 penting untuk interaksi toksin-reseptor.

Domain III telah dikorelasikan dengan pengikatan reseptor¹¹⁵⁻¹¹⁷ dan pembentukan saluran di membran sel. Telah terjadi terkait dengan toksisitas juga. Aronson dan rekan kerja melaporkan bahwa substitusi alanin tunggal dari dua residu serin pada posisi 503 dan 504 dalam toksin Cry1Ac menurun secara signifikan mengikat afinitas toksin dan mengurangi toksisitas terhadap ulat tanduk tembakau. Pertukaran Domain III in vitro secara pasti Racun Cry1, telah menghasilkan perubahan dalam spesifisitas serangga.

Contoh racun yang mungkin ada mengalami pertukaran domain secara alami

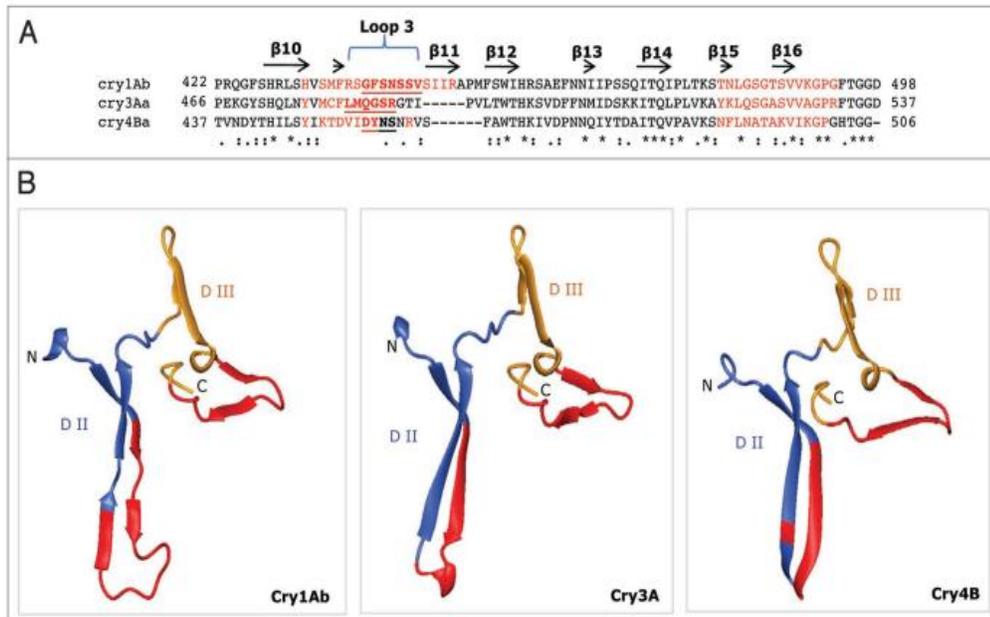
adalah racun dengan spesifisitas ganda, terutama untuk ngengat dan kumbang, seperti seperti yang dimiliki Cry1I. Domain III swapping telah disarankan sebagai evolusioner skema dan aktivitas tersebut mungkin bertanggung jawab atas munculnya toksin dengan kekhususan yang berbeda-beda. Di acara apa pun, Domain III paling pasti terlibat dalam kedua pengikatan reseptor dan tindakan insektisida.

Sejumlah besar studi pada fungsionalitas domain dan wilayah yang berbeda di dalam kerangka racun Cry menunjuk ke keterlibatan Domain II dan III dalam pengikatan reseptor dan aksi toksin. Banyak mutagenesis yang diarahkan situs percobaan menunjukkan partisipasi tiga loop yang terpapar permukaan (loop 1, 2 dan 3) dari domain II. Diduga situs pengikatan juga telah diperkirakan dengan menguji apakah pasang peptida sintesis dapat mengganggu reseptor toksin interaksi. Kesimpulan ditarik dari studi ini adalah bahwa loop 8 dan loop 2 (Domain II) dari Cry1Ab dan loop 2 dan 3 (Domain II) dari Cry1Aa adalah situs yang berpartisipasi dalam pengikatan reseptor.107.128 Domain III juga terkait dengan aksi toksin karena mutasi dalam domain ini memengaruhi toksisitas dan pengikatan reseptor. Laporan lain menunjukkan ketergantungan pada urutan spesifik di Domain II dan III untuk aktivitas insektisida.



Gambar 3. Reseptor Cadherin dan analisis pengikatan toksin Cry1Ab. (A) SDS-PAGE. Jalur 1, molekul penanda; jalur 2, racun Cry1Ab; jalur 3, proteinase K-dicerna Cry1Ab. (B) Immunoblot. Menangis1Ab toksin dan fragmen proteolitik proteinase K-nya ditrans-blot ke membran PVDF dan diuji karena kemampuannya untuk mengikat wilayah pengikatan toksin yang larut dari BT-R1 (TBR). Jalur 1, racun Cry1Ab; jalur 2, proteinase K mencerna Cry1Ab. Fragmen pengikat terkecil dari Cry1Ab (~22 kDa, panah ganda) menjadi sasaran analisis urutan asam amino N-terminal. Urutan asam amino terminal-N adalah 442NSSVSIIRAPMFSWIHR. (Ibrahim *et al*, 2010)

Untuk menghindari komplikasi yang melekat pada genesis muta terarah-situs, Natalya Griko dan Mohamed Ibrahim (laboratorium Bulla) menggunakan analisis pemotongan dalam upaya untuk melokalisasi daerah pengikatan reseptor dalam toksin Cry1Ab. Toksinnya adalah menjadi sasaran proteinase K dan fragmen proteolitik yang dihasilkan terpapar ke wilayah pengikatan toksin yang larut (TBR) dari BT-R1 Analisis immuno-ligand blot mengungkapkan beberapa fragmen yang mengikat TBR (Gbr. 3). Fragmen pengikatan minimal adalah 22 kDa. Urutan asam amino N-terminal dari ini fragmen adalah "NSSVSIIRAPMFSWIHR," yang sesuai dengan residu asam amino 442-458 di loop 3 dari Domain II (Gbr. 4).



Gambar 4. Struktur sekunder yang diusulkan dan model tiga dimensi untuk daerah pengikatan reseptor diduga Cry1Ab, Cry3A dan Cry4B. (SEBUAH) Penjajaran sekuens ganda dan prediksi struktur sekunder dari residu asam amino yang mencakup 10, loop 3, 11- $\beta 16$ (akhir Domain II dan awal Domain III) dari Cry1Ab (residu 422–498); Cry3A (residu 466–537) dan Cry4B (residu 437–506), menggunakan database Pfam181 dan SAS182. Itu urutan merah mewakili residu yang terpapar pelarut. Residu yang digarisbawahi dan dicetak tebal pada ketiga racun Cry membentuk lingkaran 3. Simbol (*), (:), dan (.) di bawah keberpihakan masing-masing menunjukkan residu asam amino yang identik, serupa, dan kurang mirip. (B) Struktur tiga dimensi dalam format pita untuk daerah pengikatan reseptor diduga pada Cry1Ab, Cry3A dan Cry4B. Struktur Cry3A dan Cry4B berasal dari struktur kristal (kode PDB 1DLC dan 1W99, masing-masing). Struktur Cry1Ab dihasilkan sebagai model oleh server pemodelan protein SWISS-MODEL173 menggunakan struktur Kristal dari toksin Cry1Aa (identitas urutan 88%; kode PDB 1CIY) sebagai templat. Area berbayang biru, merah, dan emas menyoroti untaian dan loop yang diprediksi (Ibrahim *et al*, 2010)

Rupanya kemudian, loop 3 dari Domain II dan bagian N-terminal dari

Domain III adalah penentu dalam mengikat Cry1Ab ke reseptor yang sesuai BT-R1.

Relevansi Domain III untuk mengikat toksin Cry1Ab adalah ditunjukkan beberapa

tahun yang lalu oleh de Maagd *et al.*, yang membangun hibrida khusus Cry1Ab dan

Cry1C dan menguji kemampuan pengikatannya baik secara *in vivo* maupun *in vitro*.

Hanya satu hibrida yang mengandung Domain I dan II dari Cry1C dan Domain III

dari Cry1Ab terikat pada protein 200-kDa di brush border vesikel membran dibuat dari ulat grayak bit. Hibrida tanpa Domain III tidak menunjukkan kemampuan untuk mengikat protein, menetapkan relevansi Domain III Cry1Ab dalam pengikatan reseptor. Jenis hibrida serupa yang berasal dari Cry1C dan Cry1E menunjukkan Domain III menjadi penentu utama toksisitas. Demikian juga, Domain II dari beberapa racun Cry telah didokumentasikan seperlunya, tetapi tidak cukup, untuk aktivitas toksin.¹³⁴ Dengan demikian, daerah pengikatan reseptor toksin Cry dapat menyempit ke wilayah yang mencakup loop 3 di Domain II dan bagian dari Domain III.

Domain I adalah yang paling dilestarikan di antara racun Cry. Domain II dan awal Domain III adalah yang paling tidak terkonservasi. Seperti disebutkan di atas, wilayah pengikatan reseptor diduga di

Cry1Ab dilokalisasi di loop 3 dari Domain II dan langsung Wilayah N-terminal Domain III. Berdasarkan immunoligand blot analisis (Gbr. 3) dan analisis mutasi loop 3 Domain II dijelaskan di atas, wilayah pengikatan reseptor diduga paling kemungkinan termasuk 10, loop 3 dan 11-β16 (Gbr. 4). Berdasarkan analisis struktural motif daerah ini, dua daerah diduga terkena pelarut (residu 432-449 dan 480-493) diidentifikasi (ditunjukkan dalam warna merah pada Gambar). Penyelarasan beberapa urutan dari daerah pengikatan reseptor diduga Cry1Ab, Cry3Aa dan Cry4Ba mengungkapkan bahwa 10, loop 3 dan 11 adalah yang paling berbeda, mendukung asumsi bahwa wilayah ini memiliki peran utama dalam menentukan spesifisitas.

Prediksi struktur tiga dimensi khusus ini wilayah diwakili dalam format pita pada Gambar 4B. Secara structural Cry1Ab, Cry3A dan Cry4B memiliki topologi yang sangat mirip, kecuali Cry3A dan Cry4B memiliki lebih banyak 10 helai dan loop lebih pendek. Menariknya, beberapa urutan keselarasan dari daerah pengikatan reseptor diduga Cry1Aa dan Cry1Ab (toksin yang sangat erat hubungannya) mengungkapkan bahwa loop 3 adalah yang paling tidak terkonservasi, sedangkan β 10 dan β 11- β 16 adalah yang paling terkonservasi.

Cadherin sebagai Reseptor Cognate untuk Racun Cry

Molekul reseptor yang berfungsi sebagai target toksin Cry adalah cadherin dan terlokalisasi di usus tengah serangga. Cadherin milik keluarga besar transmembran yang bergantung pada kalsium glikoprotein yang sangat beragam dan multifungsi. Beberapa fungsi utama termasuk adhesi sel-sel, migrasi sel, regulasi organisasi jaringan dan morfogenesis. Cadherin juga terlibat dalam jalur transduksi sinyal dan berinteraksi dengan molekul adhesi sel lain melalui ektodomain dan dengan protein sitoplasma spesifik melalui domain sitoplasma.136-139 Selama morfogenesis embrionik, ekspresi dari banyak anggota keluarga cadherin adalah spatio-temporally diatur dan berkorelasi dengan berbagai peristiwa morfogenetik yang melibatkan agregasi sel atau disaggregasi. Relevansi fungsional cad herin spesifik midgut pada larva serangga dimanifestasikan dalam keterlibatan mereka dalam mengendalikan pertumbuhan sel, pembelahan sel dan kematian sel melalui berbagai jalur pensinyalan. Secara signifikan, konsentrasi dari cadherin BT-R1 di

usus tengah ulat tanduk tembakau meningkat secara dramatis, seiring dengan akumulasi mRNA-nya, selama pertumbuhan larva dan perkembangan serangga. peningkatan jumlah molekul cadherin dalam mengembangkan larva menekankan pentingnya mereka dalam mempertahankan organisasi epitel dan berkorelasi langsung dengan kerentanan tembakau ulat tanduk terhadap toksin Cry1Ab.142 BT-R1 berfungsi sebagai reseptor untuk Toksin Cry1Ab dari Bt dan digabungkan dengan seperti onkotik terprogram kematian sel, 143.144 yang dipicu oleh pengikatan toksin ke amotif struktural yang sangat dilestarikan di reseptor.132 Rupanya, toksin Cry1Ab, seperti toksin Cry lainnya, memanfaatkan fenomena alam yang melibatkan ligan kematian bawaan yang bertindak untuk menghancurkan epitel usus tengah dan membersihkan larva dari jaringan yang berlebihan sebelum masuk ke tahap pupa.

Cadherin berfungsi sebagai reseptor toksin menangis pada sel-sel epithelial usus tengah pada berbagai serangga, termasuk tembakau. ulat tanduk, ulat tembakau, ulat sutra, kapas bollworm, bollworm merah muda, bollworm, 151 bollworm merah muda, penggerek jagung Eropa, western ulat akar jagung, 154 kumbang ulat tepung kuning¹⁵⁵ dan nyamuk. Baru-baru ini, Mohamed Ibrahim dan Natalya Griko (Bulla labora tory) mengkarakterisasi molekul cadherin (BT-R3) pada Anopheles gambiae, vektor nyamuk utama malaria, dan setan menyatakan bahwa, setelah terikat pada toksin Cry4Ba, kematian terjadi pada sel serangga yang ditransfeksi dengan BT-R3 cDNA (Ibrahim M dan Griko N, data tidak dipublikasikan). Jelas, ada banyak bukti untuk melibatkan cadherin sebagai target utama racun Cry dalam usus serangga.

Gahan et al., melaporkan bahwa resistensi terhadap toksin Cry1Ac oleh tembakau budworm terkait dengan gen cadherin. Demikian pula, Morin et al., menunjukkan bahwa bollworm merah muda memiliki tiga cadherin yang berbeda alel, semua terkait dengan munculnya fenotipe resistensi dalam kapas transgenik mengekspresikan toksin Cry1Ac. Mutasi dalam gen yang mengkode protein cadherin juga terkait erat dengan resistensi terhadap toksin Cry1A oleh bollworm kapas. Fabrick dkk. menunjukkan bahwa merobohkan TmCad1, pengikat Cry3A cadherin dalam ulat tepung kuning, dengan menyuntikkan serangga dengan RNA untai ganda spesifik Tmcd1 menghasilkan resistensi terhadap racun.

Cadherin terdiri dari pengulangan cad herin yang mengikat kalsium dengan panjang sekitar 110 asam amino. Itu ektodomain cadherin dapat berkisar dari lima pengulangan cadherin dalam cadherin klasik^{136,137} hingga sebanyak tiga puluh empat.¹⁵⁸ Cry tox in-binding cadherin dari ordo serangga yang berbeda, berbagi struktur yang terdiri dari empat domain: ectodomain (EC), membrane domain ekstraseluler proksimal (MPED), domain transmembran (TM), dan domain sitoplasma (CYTO) (Gbr. 5). EC terdiri dari 11–12 modul ektodomain, yang masing-masing terdiri dari dari -untai yang diatur dalam -barrel cadherin berulang terhubung satu ke yang lain oleh interdomain linker. Modul EC berdekatan dengan MPED mengandung wilayah pengikatan toksin Cry.^{155.156.159.160} Wilayah pengikatan toksin (TBRs) telah diidentifikasi untuk cadherin yang mewakili tiga ordo serangga utama: Lepidoptera (ngengat, nakhoda dan kupu-kupu),^{132.149} Coleoptera (kumbang)¹⁵⁵ dan Diptera (antara lain nyamuk dan lalat hitam). Semua TBR berada

dalam modul EC yang diposisikan pada atau dekat MPED, menunjukkan bahwa area khusus dari molekul cadherin ini sangat penting tidak hanya untuk pengikatan toksin tetapi juga untuk memediasi aksi toksin (Gbr. 5).

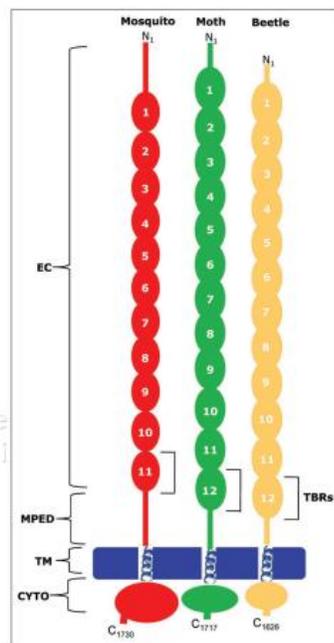
Analisis urutan komparatif dari motif pengikatan racun di BT-Rs ngengat (BT-R1), nyamuk (BT-R3) dan kumbang (BT-R4), dikombinasikan dengan struktur sekundernya dan prediksi pelipatan tiga dimensi, mengungkapkan fitur struktural yang sangat terkonservasi dalam ketiga molekul (Gbr. 6). Untuk konsistensi, kami menganggap BT-R4 ke cadherin ulat tepung kuning kumbang, yang disebut Tmcd1 dalam artikel yang diterbitkan oleh Fabrick dkk.155 BT-R2 adalah reseptor toksin Cry dalam warna pink bollworm tetapi tidak disertakan untuk perbandingan pada Gambar 6. Inspeksi tiga sekuens BT-R mengungkapkan dua hal yang sangat bentangan residu asam amino yang terkonservasi di dalam N- dan C-termini yang mengapit EC11 dari BT-R3 dan EC12 dari BT-R1 dan BT-R4 . Urutan ini disorot dalam kotak hitam (Gbr. 6A) dan mewakili tanda tangan yang menandai fungsi pengikatan toksin di ketiga BT-R. Griko et al. mengamati spenggerek jagung Eropa, western ulat akar jagung, 154 kumbang ulat tepung kuning155 dan nyamuk. Baru-baru ini, Mohamed Ibrahim dan Natalya Griko (Bulla labora tory) mengkarakterisasi molekul cadherin (BT-R3) di Anopheles gambiae, vektor nyamuk utama malaria, dan setan menyatakan bahwa, setelah terikat pada toksin Cry4Ba, kematian terjadi pada sel serangga yang ditransfeksi dengan BT-R3 cDNA (Ibrahim M dan Griko N, data tidak dipublikasikan). Jelas, ada banyak bukti untuk melibatkan cadherin sebagai target utama racun Cry dalam usus serangga. Gahan et al.147 melaporkan

bahwa resistensi terhadap toksin Cry1Ac oleh tembakau budworm terkait dengan gen cadherin. Demikian pula, Morin et al. menunjukkan bahwa bollworm merah muda memiliki tiga cadherin yang berbeda alel, semua terkait dengan munculnya fenotipe resistensi dalam kapas transgenik mengekspresikan toksin Cry1Ac. Mutasi dalam gen yang mengkode protein cadherin juga terkait erat dengan resistensi terhadap toksin Cry1A oleh bollworm kapas. Fabrick dkk. menunjukkan bahwa merobohkan TmCad1, pengikat Cry3A cadherin dalam ulat tepung kuning, dengan menyuntikkan serangga dengan RNA untai ganda spesifik Tmcd1 menghasilkan resistensi terhadap racun.

Cadherin terdiri dari pengulangan cad herin yang mengikat kalsium dengan panjang sekitar 110 asam amino. Itu ektodomain cadherin dapat berkisar dari lima pengulangan cadherin dalam cadherin klasik hingga sebanyak tiga puluh empat. Cry tox in-binding cadherin dari ordo serangga yang berbeda, berbagi struktur yang terdiri dari empat domain: ectodomain (EC), membrane domain ekstraseluler proksimal (MPED), domain transmembran (TM), dan domain sitoplasma (CYTO) (Gbr. 5). EC terdiri dari 11–12 modul ektodomain, yang masing-masing terdiri dari dari -untai yang diatur dalam -barrel cadherin berulang terhubung satu ke yang lain oleh interdomain linker. Modul EC berdekatan dengan MPED mengandung wilayah pengikatan toksin Cry.155.156.159.160 Wilayah pengikatan toksin (TBRs) telah diidentifikasi untuk cadherin yang mewakili tiga ordo serangga utama: Lepidoptera (ngengat, nakhoda dan kupu-kupu),132.149 Coleoptera (kumbang)155 dan Diptera (antara lain nyamuk dan lalat hitam). Semua TBR berada dalam modul EC yang

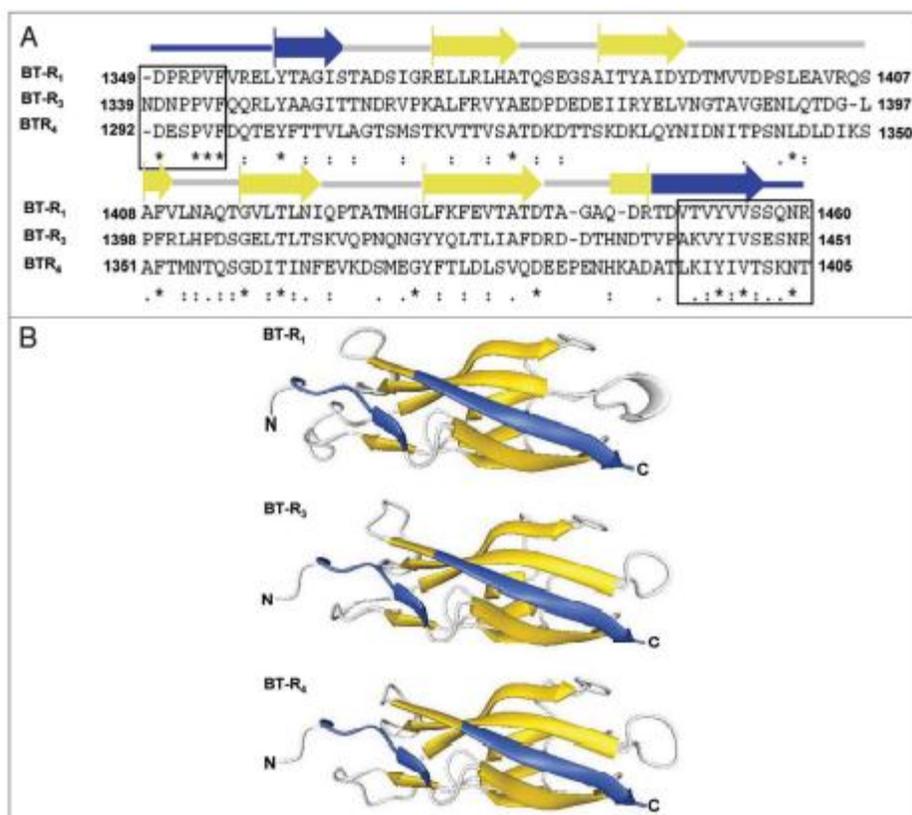
diposisikan pada atau dekat MPED, menunjukkan bahwa area khusus dari molekul cadherin ini sangat penting tidak hanya untuk pengikatan toksin tetapi juga untuk memediasi aksi toksin (Gbr. 5).

Analisis urutan komparatif dari motif pengikatan racun di BT-Rs ngengat (BT-R1), nyamuk (BT-R3) dan kumbang (BT-R4), dikombinasikan dengan struktur sekundernya dan prediksi pelipatan tiga dimensi, mengungkapkan fitur struktural yang sangat terkonservasi dalam ketiga molekul (Gbr. 6).



Gambar 5. Struktur domain dan daerah pengikatan toksin Cry diduga dalam protein seperti cadherin dari nyamuk (merah), ngengat (hijau) dan kumbang (keemasan). EC, ektodomain; MPED, membran ekstraseluler proksimal domain; TM, domain transmembran; CYTO, domain sitoplasma, TBR, daerah pengikatan toksin (Ibrahim *et al.*, 2010).

Untuk konsistensi, kami menganggap BT-R4 ke cadherin ulat tepung kuning kumbang, yang disebut Tmcad1 dalam artikel yang diterbitkan oleh Fabrick dkk. BT-R2 adalah reseptor toksin Cry dalam warna pink bollworm¹⁶¹ tetapi tidak disertakan untuk perbandingan pada Gambar 6. Inspeksi tiga sekuens BT-R mengungkap dua hal yang sangat bentangan residu asam amino yang terkonservasi di dalam N- dan C-termini yang mengapit EC11 dari BT-R3 dan EC12 dari BT-R1 dan BT-R4. Urutan ini disorot dalam kotak hitam (Gbr. 6A) dan mewakili tanda tangan yang menandai fungsi pengikatan toksin di ketiga BT-R. Griko et al., mengamati tingkat konservasi sekuens tanda tangan ini dalam sejumlah dari serangga lepidoptera.



Gambar 6. Prediksi struktur sekunder dan model tiga dimensi modul EC yang berisi TBR untuk ngengat, nyamuk, dan kumbang. (A) Beberapa penyelarasan urutan dan prediksi struktur sekunder dari residu asam amino yang mencakup TBR BT-R1 (residu 1349-1460), BT-R3 (residu 1339-1451) dan BT-R4 (residu 1292-1405). Struktur dihasilkan menggunakan database Pfam181 dan SAS182. Dua kotak hitam berisi residu yang dilestarikan di daerah hulu dan hilir dari motif pengikatan toksin Cry. Sebutan di bawah alinyemen adalah seperti yang dijelaskan dalam legenda Gambar 4. (B) Model tiga dimensi dari TBR BT-R1, BT-R3 dan BT-R4 dihasilkan dari struktur kristal cadherin homolog domain dari mouse E-cadherin (kode PDB ledh), mouse N-cadherin (kode PDB 1ncj), dan katak C-cadherin (kode PDB 113w). Ketiga TBR itu adalah ditempelkan ke struktur kristal yang ditumpangkan dengan penyelarasan urutan menggunakan program komputer DeepView (Swiss-PdbViewer).¹⁸³ Penyelarasan dipandu oleh prediksi struktur sekunder oleh server JPred ³¹⁸⁴ untuk mencocokkan unta- yang diprediksi dalam urutan reseptor dengan unta- dalam struktur kristal cadherin. Model template kemudian disempurnakan di server pemodelan protein SWISS-MODEL.¹⁷³ Panah emas dan garis abu-abu sorot - unta- dan loop yang diprediksi, masing-masing. Panah biru dan garis biru mewakili urutan yang mengapit TBR dan diperlukan untuk mengikat (Ibrahim *et al.*, 2010).

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 dipisah- pisahkan 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 MnCl₂), 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.



Gambar 7. Kegiatan Pengambilan Sampel Tanah

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.

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.

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 suhu 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 8. Sampel Tanah



Gambar 9. 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 LC₅₀ seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai LC₅₀ isolat *B. thuringiensis* yang diisolasi pada beberapa macam habitat

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	$1,25 \times 10^8$

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.

Berdasarkan hasil uji patogenisitas oleh Gazali *et al.* (2015) di dapat bahwa patogenisitas *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 patogenisitas *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*.

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 kerusakkan 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.

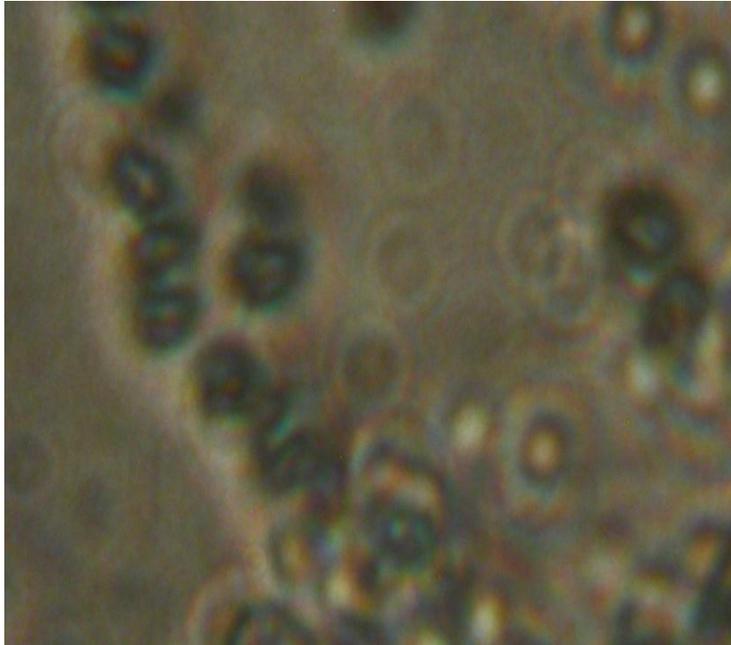


Gambar 10. Ulat *Plutella xylostella* yang mati karena terinfeksi

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 *Croccidolomia binotalis*.



Gambar 11. Sel dan Kristal Protein dan *B. thuringiensis*

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%.

BEBERAPA CARA PERBANYAKAN *B. THURINGIENSIS*

Media Kultur Mikrobial

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..

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 5.).

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

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.

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 diatomae 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, algae 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 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 H₂, NH₃, H₂S, 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:

Tabel 6. Perbedaan ke empat golongan jasad

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 Interaksi Antar Jasad dalam menggunakan Nutrien rendah dan kadar CO_2 tinggi.

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.

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 sinergistik. 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.

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 perbanyakkan 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.

Tabel 7. Contoh 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	NH ₄ Cl 1 gram	Glukosa 5 gr NH ₄ Cl 1 gr	Glukosa 5 gr NH ₄ Cl 1 gr	Glukosa 5 gr Ekstrak Khamir
MgSO ₄ 7H ₂ O 0,2 gr			Asam Nikotinat 0.1 gr	
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 miligram				

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.

Medium Patogen Serangga

1. 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

Thallos sulphate merupakan Racun ekstrem bila terhirup pernapasan sehingga dalam penggunaannya harus hati hati. Hindari 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 tahan 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

Kedua bahan tersebut dilarutkan dalam 500 ml air destilata, dengan pH sampai 7,20. K_2HPO_4 dapat digunakan untuk meningkatkan dan menurunkan pH. Tambahkan 15 g Difto agar. Tambahkan batang pengaduk magnet, panaskan sampai mendidih.

Larutan A dan larutan B disterilkan secara terpisah selama 15 menit pada suhu $121^\circ C$, 15 psi. Masukkan larutan A ke dalam larutan B secara aseptis sambil diaduk. Sebaiknya larutan tersebut dituang saat masih panas untuk mencegah pengendapan.

Trace element solution untuk CTA

1. 1,96 g H_3PO_4 Trihydrogen phosphate
2. 0,055 g $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ Ferrous sulphate hepta hydrated
3. 0,0287 g $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ Zinc sulphate hepta hydrated
4. 0,0223 g $MnSO_4 \cdot H_2O$ Manganous sulphate hydrated
5. 0,0025 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ Cupric sulphate hydrated
6. 0,003 g $Co(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$ Cobaltous nitrate hexa hydrated
7. 0,002 g H_3BO_3 Boric acid powder

Semua bahan tersebut dilarutkan dalam 1 liter air destilata yang disimpan pada suhu $4^\circ C$.

2. Deoxyribonuclease Agar (DNAse)

Untuk membuat 1 liter Deoxyribonuclease Agar (DNAse) dibutuhkan :

Larutan A :

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

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

Larutan B :

1. 90 ml Air destilata
2. 09 gram Toluidine blue O

Larutkan indikator dalam air; aduk rata. Sterilisasikan kedua larutan secara terpisah selama 15 menit pada suhu 121°C, 15 psi. Masukkan larutan B ke dalam larutan A, sambil diaduk sebelum dituang.

3. Adonitol Agar

Untuk membuat 1 liter Adonitol Agar dibutuhkan :

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

Kedua bahan tersebut dilarutkan secara sempurna ke dalam air destilata dengan pH 7,4. kemudian ditambahkan 10 ml larutan Bromothymol blue dan 5,0 g Adonitol (larutkan dalam 20 ml air destilata) kemudian ditambahkan lagi air destilata sehingga larutan menjadi 1 liter. Setelah itu ditambahkan 12,5 g Bacto agar, masukan sebuah pengaduk magnetik; lalu dipanaskan sampai mendidih. Sterilisasikan selama 30 menit

pada suhu 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 suhu 121°C, 15 psi. Simpan pada temperatur ruang.

4. Itaconate Agar

Untuk membuat 1 liter **Itaconate Agar** dibutuhkan :

- a. 6,0 g Na₂HPO₄ Sodium phosphate (dibasic)
- b. 3,0 g KH₂PO₄ Potassium phosphate (monobasic)
- c. 0,5 g NaCl Sodium chloride
- d. 1,0 g NH₄Cl Ammonium chloride

Larutkan semua bahan di atas dalam 1 liter air destilata secara berurutan, dengan pH 7,0. Kemudian diberi 15 g Difco Agar. Masukkan pengaduk magnetik, panaskan sampai mendidih. Sterilisasi selama 30 menit pada 121°C, 15 psi. Biarkan dingin. Sebelum dituang, tambahkan 10 ml 0,01 M larutan CaCl₂ (steril); 1 ml 1 M larutan MgSO₄.7H₂O (steril); 10 ml 20 % larutan itaconate (filter steril).

5. J-Medium

Untuk membuat 1 liter J-Medium dibutuhkan 5 gram Tryptone; 15 gram Yeast Ekstrak;

3 gram K_2HPO_4 Dipotassium hydrogen orthophosphate anhydrous (potassium phosphate); 1,0 g Glucose (filter sterilized); 1000 ml air destilata. Semua bahan dilarutkan ke dalam air destilata, dengan pH antara 7,3 – 7,5. Untuk medium padat, ditambahkan 20 gram agar dan sebuah pengaduk magnetik yang di panaskan sampai mendidih, kemudian disterilisasi selama 15 menit pada suhu $121^\circ C$, 15 psi. Setelah campuran bahan di atas dingin, tambahkan glukosa

6. Luria Bertani Agar

Untuk membuat 1 liter Luria Bertani Agar dibutuhkan 15 gram Agar; 10 gram Tryptone; 10 gram NaCl Sodium chloride; .5 gram Yeast extract. Larutkan semua bahan dalam air destilata. Tambahkan pengaduk magnetik dengan pH 7,5 dan disterilkan selama 15 menit pada suhu $121^\circ C$, 15 psi.

7. Luria Bertani Broth

Untuk membuat 1 liter Luria Bertani dibutuhkan 10 gram Paeatic digest of casein; 10gram; NaCl Sodium chloride; 5 gram Yeast extract. Semua bahan dilarutkan ke dalam air destilata. Tambahkan pengaduk magnetik yang dipanaskan sampai mendidih dengan pH 7,2, kemudian disterilisasi selama 15 menit pada suhu $121^\circ C$, 15 psi.

8. MYPGP Medium

Untuk membuat 1 liter MYPGP Medium diperlukan 10 gram Mueller-Hinton broth; 10 gram Yeast extract; 3 gram K_2HPO_4 Di-potassium hydrogen orthophosphate anhydrous (Potassium phosphate); 1 gram $C_3H_3O_3Na$ Sodium pyruvate; 0,5 gram Glucose (filter sterilized); 1.000 ml Air destilata. Semua bahan dilarutkan ke dalam

air destilata dengan pH 7,1. Untuk medium padat di tambahkan 20 gram Agar dan pengaduk magnetik yang dipanaskan sampai mendidih kemudian disterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C, 15 psi, setelah campuran dingin ditambahkan Glucose.

9. Nutrient Agar

Untuk membuat 1 liter Nutrien Agar diperlukan 5 gram Peptone; 3 gram Beef extract; 15 gram Agar; 1.000 ml Air destilata. Semua bahan dilarutkan ke dalam air destilata, masukan pengaduk magnetik yang di panaskan sampai mendidih dengan pH 6,8, yang disterilisasikan selama 15 menit pada suhu 121°C, 15 psi.

10. NYS Agar

Untuk membuat 1 liter NYS Agar diperlukan 1 gram Nutriet Broth; 1 gram Tryptone; 2 gram Casamino acid; 0,5 gram Yeast extract; 15 gram Agar. Semua bahan dilarutkan ke dalam air destilata kemudian masukan pengaduk magnetik yang dipanaskan sampai mendidik dengan pH 7,2, selanjutnya disterilisasikan selama 15 menit pada suhu 121°C, 15 psi.

11. PEMBA

Untuk membuat 1 liter PEMBA diperlukan 1 gram Peptone; 10 gram D-Mannitol; 0,1 gram MgSO₄.7H₂O Magnesium sulphate heptahydrate; 2 gram NaCl Sodium Chloride; 2,5 gram Na₂HPO₄ Sodium Phosphate (dibasic); 0,25 gram KH₂PO₄ Potassium Dihydrogen orthophosphate; 0,12 gram Bromothymol Blue (water soluble); 18,0 gram Agar; 1.000 ml Air destilata. Semua bahan-bahan dilarutkan ke dalam air destilata dengan pH 7,4. Masukan 90 ml ke dalam botol dan disterilisasi

selama 15 menit pada suhu 121°C, 15 psi. Tambahkan larutan berikut untuk setiap botol agar yang dicairkan dan didinginkan (50°C) : 5,0 ml 20% w/v $C_3H_3O_3Na$ Sodium pyruvate filter sterilized 100 unit/ml Polymyxin, filter sterilized 5,0 ml emulsi kuning telur (Oxoid SR 47). Harus diperiksa pada sampel yang dicurigai mengandung sejumlah besar jamur, 1 ml 0,4% (b/v) actidione filter disterilisasi, 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-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 hemalimfe serangga.

3. Unsur-Unsur Mineral

Garam- garam anorganik adalah merupakan zat yang dihasilkan dari reaksi netralisasi berupa reaksi antara senyawa yang bersifat asam dan basa yang dihasilkan dari benda mati untuk pertumbuhan mikroorganisme, berupa Kalium, Magnesium, Fosfor, Sulfur, dan dalam jumlah yang lebih sedikit dibutuhkan kalsium, seng, besi, kobalt, tembaga, molybdenum, mangan, atau mineral-mineral lainnya.

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, air suling adalah lebih baik.

4. Zat-zat Pertumbuhan

Mikroba membutuhkan vitamin-vitamin yang esensial sebagai komponen pada sistem enzim, vitamin tersebut harus ditambahkan bila mikroba tidak mampu mensintesisnya. Keberhasilan biakan tergantung pada pH, O₂, dan suhu. Kebanyakan bakteri akan tumbuh secara optimal 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. 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. Setiap mikroorganisme membutuhkan oksigen berbeda-beda, 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 berkisar 25-32°C, ini bervariasi menurut daerah dan iklim. Mengingat bahwa strain- 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 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 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 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

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 patogenisitas paling tinggi diantara semua bakteri *B. thuringiensis* yang diujikan. Media Nutrient Broth (NB) digunakan untuk perbanyak bakteri patogen serangga 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. Biakan *B. thuringiensis* sebanyak 2 ml 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 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 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.

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.

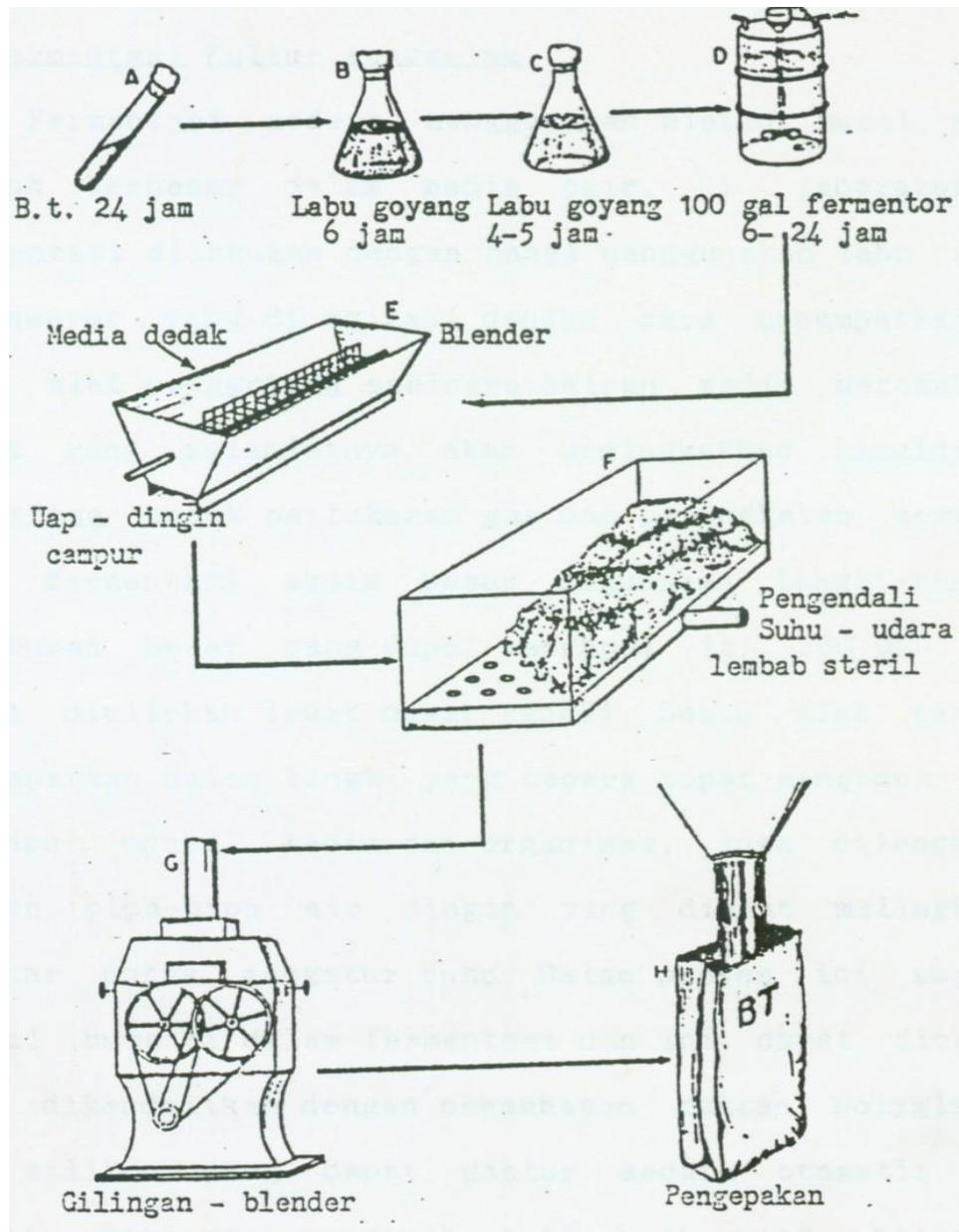
Suhu udara selalu dikendalikan dengan baik, karena udara itu juga berfungsi mengatur suhu fermentasi. Setelah fermentasi berlangsung secukupnya, udara basah, secara berangsur-angsur diganti dengan udara kering sehingga dedak menjadi kering sampai akhir fermentasi. Apabila kandungan air turun menjadi 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.



Gambar 12. Tahapan-tahapan fermentasi semi padat.

1. Fermentasi Kultur Tenggelam

Fermentasi modern menggunakan biakan murni yang tumbuh terbesar

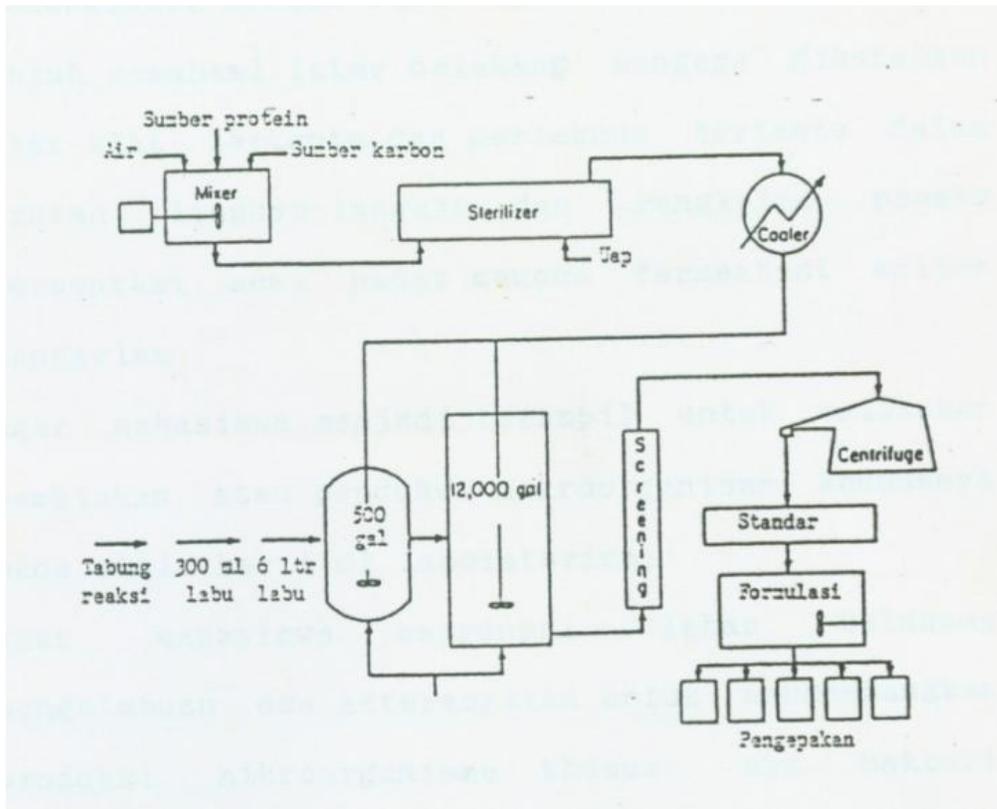
dalam media cair. Di laboratorium fermentasi dilakukan dengan hanya menggunakan labu atau Erlenmeyer yang diagitasi dengan cara menempatkannya pada alat penggoyang sehingga cairan media berombak-ombak yang selanjutnya akan meningkatkan liquid-gas interfase untuk pertukaran gas dan peningkatan aerasi. 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 kondisi steril.

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.

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 13. Tahapan-tahapan dalam fermentasi kultur tenggelam

PEMANFAATAN *Bacillus thuringiensis*

Pemanfaatan *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 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 dipteran. 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 kerapatan *B. bassiana* 109 spora/ ml dapat menyebabkan kematian larva *Spodoptera litura* sebesar 31,57%. Larva yang terinfeksi jamur *B.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 m ml/l air (7,60 %) (Tabel 8).

Tabel 8. Rata-rata persentase kerusakan daun tanaman sawi akibat serangan Hama Pemakan Daun Sawi (Gazali *et al.*, 2017)

Perlakuan	Rata-rata
Kontrol (Diaplikasi dengan air)	24.70 a
Penyemprotan <i>B.thuringiensis</i> 2 cc/liter air (M1)	13.00 ab
Penyemprotan <i>B. thuringiensis</i> 4 cc/liter air (M2)	11.20 bc
Penyemprotan <i>B. thuringiensis</i> 6 cc/liter air (M3)	8.80 cd
Penyemprotan <i>B. thuringiensis</i> 8 cc/liter air	7,60 d

Keterangan : rata-rata kerusakan daun sawi karena serangan hama pemakan daun pada kolom yang sama berbeda secara nyata berdasarkan uji LSD Dengan tingkat kepercayaan 95 %

Konsentrasi yang efektif adalah 6 cc Bt per liter air dan 8 cc Bt per liter air dengan rata-rata kerusakan tanaman sawi 8,80 % dan 7,60 % dan pengaruhnya bertambah besar seiring dengan bertambah 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 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 9. 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)

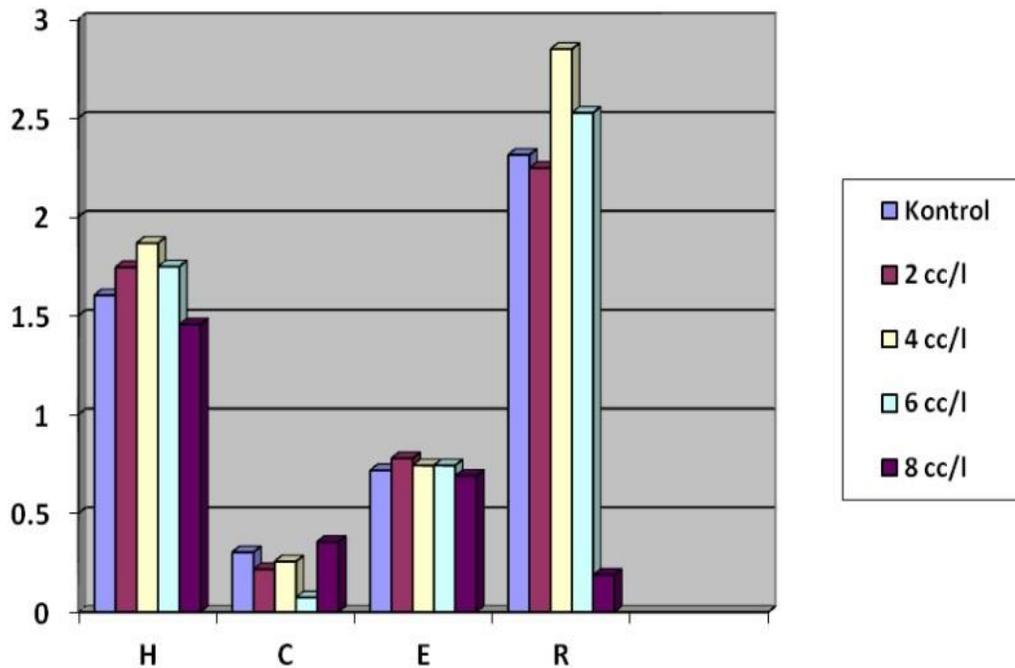
Perlakuan	Indeks keanekaragaman	Indeks dominasi	Indeks Kesamaan jenis	Indeks Kekayaan jenis
Penyemprotan menggunakan air	1,603	0,303	0,717	2,313
Penyemprotan <i>Bacillus thuringiensis</i> dengan konsentrasi 2 cc/l	1,744	0,217	0,778	2,247
Penyemprotan <i>Bacillus thuringiensis</i> dengan konsentrasi 4 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 thuri</i>	1,455	0,355	0,689	1,883

Menurut Odum (1993) menyatakan bahwa keaneka ragaman 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 Keaneka ragaman spesies dan Tingkat Kekayaan Jenis pada percobaan ini masih tergolong rendah, menurut Suana 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 11



Keterangan : H = indeks keanekaragaman; C = Indeks Dominasi;
 E = Indeks Kesamaan Jenis; R = Indeks Kekayaan Jenis
 Gambar 14. Grafik perbandingan antar perlakuan terhadap variabel populasi. (Gazali et al., 2017)

KESIMPULAN

Dari hasil tulisan di atas dapat disimpulkan bahwa :

1. *Bacillus thuringiensis* mempunyai kemampuan untuk mengendalikan serangga hama dan mempunyai spesifikasi inang yang tinggi.
2. *Bacillus thuringiensis* menghasilkan delta-endotoksin pada saat sporulasi, yang beracun bagi serangga
3. *Bacillus thuringiensis* dapat diisolasi dari serangga sakit, tanaman hidup seperti permukaan daun, tanah serta bahan organik tanah.
4. *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.
5. *Bacillus thuringiensis* diaplikasikan untuk pengendalian hama dalam bentuk formulasi cair maupun padat.

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-
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 . *I solation, 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*

sporesandtotalproteins. 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 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) 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.

Mohamed A. Ibrahim, Natalya Griko, Matthew Junker & Lee A. Bulla. 2010. *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective To cite this article: Mohamed A. Ibrahim, Natalya Griko, Matthew Junker & Lee A. Bulla (2010) *Bacillus thuringiensis*, *Bioengineered Bugs*, 1:1, 31-50, DOI: 10.4161/bbug.1.1.10519 To link to this article: <https://doi.org/10.4161/bbug.1.1.1051>

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*. *Microbiol. Rev.* 53(2):245-255.

Penerbit :

Universitas Islam Kalimantan
Muhammad Arsyad Al -Banjary

Alamat :

Gedung A UPT Publikasi dan Pengelolaan Jurnal
Universitas Islam Kalimantan
Muhammad Arsyad Al-Banjary

Jl. Adhyaksa No. 2 Kayutangi
Banjarmasin, Kalimantan Selatan
Telepon : 0511 - 3304352
FAX : 0511

ISBN 978-623-7583-89-9

