

## Eksplorasi dan Bioasai Berbagai Isolat *Bacillus thuringiensis* Lokal terhadap Larva Beberapa Jenis Serangga

### Exploration and Bioassay of Local Isolates of *Bacillus thuringiensis* from North Sumatra to Several Insect Larvae

Dwi Suryanto\*, Chairani, Deddy Rusika, Nita A. Lubis, Yurnaliza

Departemen Biologi FMIPA, Universitas Sumatera Utara, Jl. Bioteknologi No. 1, Kampus USU, Medan 20155  
E-mail: d\_suryanto2005@yahoo.co.id \*Penulis untuk korespondensi

#### Abstract

Nine isolates of *Bacillus thuringiensis* of North Sumatra have been isolated from soil and dead larvae of *Plutella xylostella*. Bioassay of these isolates to larva of *Heliothis armigera*, *Plutella xylostella*, *Aedes aegypti*, and *Culex* sp. showed that the isolates have different spectrum and ability in controlling insect larvae. Interestingly, TU1 has similar ability to that of Dipel (*B. thuringiensis* var *kurstaki* strain HD-7) in controlling Dipteran (*A. aegypti* and *Culex* sp.) and Lepidopteran (*H. armigera* and *P. xylostella*). The others were not effective to Dipteran, but have various abilities to kill Lepidopteran. This result indicated that local isolates of *B. thuringiensis* of North Sumatra were varied in ability to kill different larvae.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis*, *Culex* sp., *Heliothis armigera*, *Plutella xylostella*.

Diterima: 20 Maret 2006, disetujui: 04 Januari 2007

## Pendahuluan

Sebagai salah satu negara yang memiliki biodiversitas sangat besar, Indonesia menyediakan banyak sumber isolat mikroorganisme bernilai ekonomi. Pencarian isolat-isolat yang potensial untuk digunakan pengendalian hayati hama dan penyakit tanaman merupakan salah satu yang diharapkan. Diantaranya isolasi dan seleksi *Bacillus thuringiensis* yang dikenal dapat memproduksi senyawa toksik terhadap berbagai organisme hama target, arthropoda, dan nematoda (Schnepf *et al.*, 1998).

*Bacillus thuringiensis* merupakan bakteri bersifat Gram positif, aerob, saprofit pembentuk endospora yang terdapat di tanah, air, dan di permukaan tumbuhan (Kawalek *et al.*, 1995). Berbagai jenis isolat dan subspecies *B. thuringiensis* sangat dikenal sebagai biopestisida komersial (López-Meza & Ibarra, 1996). Bakteri ini memenuhi syarat sebagai

agen mikroba pengendali hama dan vektor penyakit tumbuhan sehingga aplikasi biopestisida ini cepat berkembang dan digunakan secara luas (Ben-Dov *et al.*, 1999).

Menurut Agaisse & Lereclus (1995), semua subspecies *B. thuringiensis* dikenal dapat memproduksi sejumlah besar protein kristal insektisida yang bersegregasi dalam tubuh paraspora ( $\delta$ -endotoksin) selama masa sporulasi. Protein kristal toksin (Cry) yang diproduksi oleh *B. thuringiensis* sangat spesifik dan sangat berguna dalam mengendalikan organisme hama target (Baum *et al.*, 1996; Lambert *et al.*, 1996). Protein ini tidak memperlihatkan toksisitas terhadap mammalia, burung, amfibia, dan reptilia. Protein CryI diketahui toksik terhadap Lepidoptera, CryII toksik terhadap Lepidoptera dan Diptera, CryIII diketahui mampu membunuh Coleoptera, dan CryIV toksik terhadap Diptera (Agaisse & Lereclus, 1995). Kebanyakan gen toksin bakteri ini berada di dalam plasmid

(Itoua-Apoyolo *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 2000).

Pada tahun 80'-an dilaporkan adanya resistensi pada organisme uji di laboratorium dan lapangan. Karena tingginya keragaman dan potensi pematihan resistensi menggunakan isolat baru dan manipulasi genetika menyebabkan penelitian tentang bioinsektida seperti kristal protein *B. thuringiensis* terus tetap dilakukan. Penyediaan isolat-isolat baru yang mampu menghasilkan beragam kristal toksin merupakan salah satu alternatif mengurangi kemungkinan resistensi organisme target terhadap toksin *B. thuringiensis* (Masson *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998).

Keragaman, spesifisitas, dan kegunaan toksin *B. thuringiensis* mendorong untuk mencari strain baru yang menunjukkan novel bioinsektisida (Bravo *et al.*, 1998). Sangat beragamnya strain *B. thuringiensis* dan toksinnya berhubungan paling tidak sebagian dengan tingginya derajat plastisitas genetik (Schnepf *et al.*, 1998). Di bidang pertanian penggunaan pestisida biologi berada di belakang penggunaan pestisida kimia. Adanya beberapa pertimbangan lingkungan dan keselamatan telah menguntungkan pengembangan bioinsektisida dari *B. thuringiensis* (Baum *et al.*, 1996).

Penelitian ini bertujuan untuk eksplorasi dan karakterisasi isolat-isolat lokal *B. thuringiensis* serta menguji spektrum mematikan dari isolat lokal tersebut terhadap larva beberapa jenis serangga.

## Metode Penelitian

### Isolasi dan karakterisasi bakteri

Sampel tanah diambil dari beberapa tempat seperti Tapanuli Utara, Langkat, Rantau Prapat, Padang Sidempuan, Medan, dan Kisaran di Sumatera Utara. Disamping itu juga diambil dari larva *P. xylostella* dan *H. armigera* mati. Isolasi sampel dilakukan sesuai dengan metode seleksi asetat (Travers *et al.*, 1987). Sampel tanah dan larva serangga mati yang sudah digerus ditumbuhkan dalam medium agar-agar LB (dalam 100 ml medium terdapat 1 g tripton, 0,5 g ekstrak yeast, 1 g NaCl, dan 1,2 g agar-agar) dengan penambahan

0,5 g Na-asetat dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Mikroba non-spora dan sel vegetatif dimatikan dengan pemanasan pada suhu 80°C selama 20 menit (Travers *et al.*, 1987). Sebagai isolat kontrol digunakan isolat dari bioinsektisida Dipel (D) (PT Abbott Indonesia) berisi isolat *B. thuringiensis* var *kurstaki* strain HD-7 yang digunakan untuk mengendalikan larva *Plutella xylostella*, *Crocidolomia binotalis*, dan *Heliothis* sp.

Isolat *B. thuringiensis* dari Dipel dibiakkan pada cawan petri berisi medium agar-agar LB digunakan sebagai pembanding dalam identifikasi. Identifikasi dilakukan berdasarkan bentuk morfologi sel, koloni, spora, pewarnaan Gram, dan reaksi biokimia (Holt *et al.*, 1994). Isolat ini juga digunakan sebagai pembanding dalam uji potensi baik dalam bentuk isolat bakteri maupun dalam bentuk bubuk insektisida.

Isolat dengan bentuk morfologi seperti isolat dari Dipel dipisahkan untuk karakterisasi lanjut. Karakterisasi morfologi isolat bakteri mencakup bentuk dan warna koloni, bentuk sel, pewarnaan Gram, dan motilitas. Motilitas diamati menggunakan medium semi solid *sulfide indole motility* (SIM). Uji biokimia dilakukan dengan menggunakan kit API20E (Biomérieux, Perancis).

### Bioasai spektrum *B. thuringiensis* pada beberapa larva serangga

Bioasai spektrum dilakukan dengan menggunakan larva uji: instar 3 *Heliothis armigera* (Lepidoptera), instar 3 *Plutella xylostella* (Lepidoptera), instar 4 *Aedes aegypti* (Diptera), dan instar 4 *Culex* sp. (Diptera) (Kawalek *et al.*, 1995; Lambert *et al.*, 1996). Karena keterbatasan jumlah larva uji, untuk larva *H. armigera* digunakan masing-masing 5 ekor larva. Untuk *P. xylostella* dan *Culex* sp., masing-masing digunakan 10 ekor larva, sedangkan larva *A. aegypti* digunakan 8 ekor larva. Setiap larva *H. armigera* dipisah dalam wadah yang berbeda untuk menghindari kanibalisme.

Perlakuan pemberian makan dilakukan dalam wadah plastik kecil tembus pandang yang berisi diet artifisial untuk larva *H. armigera* dan berisi potongan kubis untuk larva

*P. xylostella*, dan berisi air steril sebanyak 100 ml untuk larva *A. aegypti* dan *Culex* sp. Pemberian makan dilakukan dengan menambahkan  $\approx 10^6$  sel/g diet artifisial atau alami dari fase akhir pertumbuhan *B. thuringiensis*. Isolat ditumbuhkan dalam media cair Luria Bertani setengah resep yang digunakan dalam perlakuan. Sebagai kontrol digunakan isolat Dipel (D) dan Dipel bubuk.

Diet artifisial dan larva *H. armigera* diperoleh dari Balai Penelitian Biologi dan Genetika, Bogor. Pengamatan dilakukan terhadap % kematian larva selama 3 hari untuk larva *A. aegypti* dan *Culex* sp., 4 hari untuk *P. xylostella*, dan 7 hari untuk *H. armigera*. Masing-masing perlakuan dibuat 2 kali ulangan.

**Tabel 1.** Karakter morfologi sembilan isolate *B. thuringiensis*.

Isolat	Asal isolat	Bentuk koloni	Warna koloni	Bentuk sel	Gram	Motilitas	Spora
TU1	Tapanuli Utara	Bulat bergerigi	P	B	+	M	S
U1	Ulat	Bulat bergerigi	P	B	+	M	S
U2	Ulat	Bulat bergerigi	P	B	+	M	S
U3	Ulat	Bulat bergerigi	P	B	+	M	S
L2	Langkat	Bulat bergerigi	P	B	+	M	S
RP2	Rantau Prapat	Bulat berombak	P	B	+	M	S
PS3	Padang Sidempuan	Bulat berombak	P	B	+	M	S
M5	Medan	Bulat bergerigi	P	B	+	M	S
K5	Kisaran	Bulat bergerigi	P	B	+	M	S
D	Dipel	Bulat bergerigi	P	B	+	M	S

Keterangan: P = putih, B = batang, M = motil, S = membentuk spora

**Tabel 2.** Uji biokimia sembilan isolate *B. thuringiensis*

Pengujian	Isolat										
	TU1	U1	U2	U3	L2	RP2	PS3	M5	K5	D	
Ortonitrofenil $\beta$ -d galaktopiranosidase (ONPG)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Arginin dihidrolase (ADH)	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	
Lisin dekarboksilase (LDC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ornitin dekarboksilase (ODC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Penggunaan sitrat (Cit)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Produksi H <sub>2</sub> S (H <sub>2</sub> S)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Urease (Ure)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Triptofan deaminase (TDA)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Produksi indol (IND)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Produksi asetoin (VP)	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	
Gelatinase (Gel)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fermentasi Glukosa (Glu)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Mannitol (Man)	+	-	+	-	+	+	-	-	+	tu	
Inositol (Ino)	-	-	+	-	-	-	-	-	+	tu	
Sorbitol (Sor)	-	-	+	-	-	-	-	-	+	tu	
Ramnosa (Rha)	-	+	+	-	-	-	-	-	+	tu	
Sukrosa (Sac)	-	+	+	-	-	-	-	-	+	tu	
Melibiosa (Mel)	+	+	+	-	+	-	+	-	+	tu	
Amigdalin (Amy)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	tu	
Arabinosa (Ara)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	tu	
Reduksi nitrat (NO <sub>2</sub> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Keterangan: - = reaksi negatif, + = reaksi positif, tu = tidak diuji

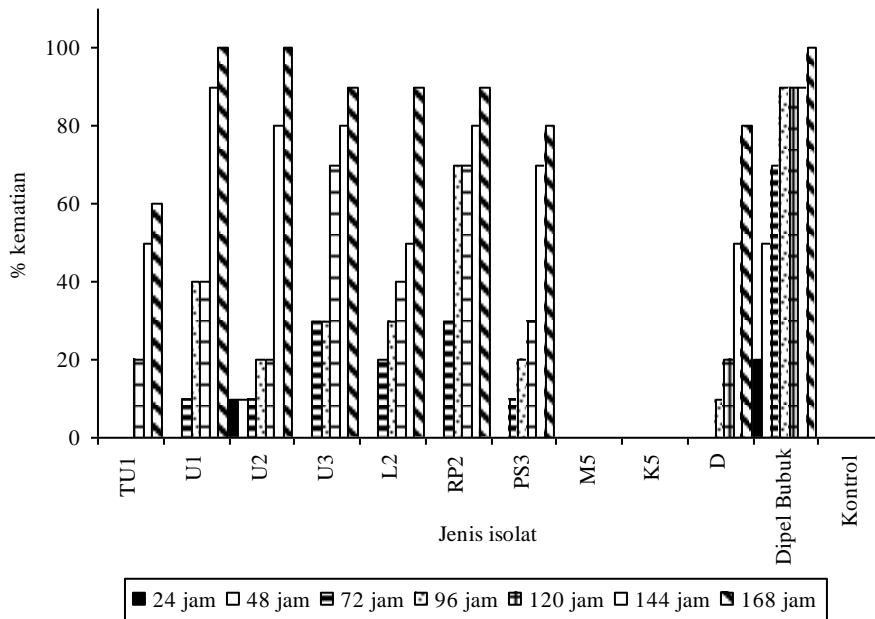
## Hasil dan Pembahasan

Isolasi *B. thuringiensis* lokal menghasilkan 9 isolat yang relatif mirip secara morfologi (Tabel 1) dan biokimia (Tabel 2). Semua isolat memiliki koloni berbentuk bulat bergerigi, warna koloni putih, sel berbentuk batang, Gram positif, membentuk spora dan motil, kecuali isolat RP2 dan PS3 yang berbeda bentuk dan warna koloni. Isolat RP2 memiliki koloni berbentuk bulat berombak berwarna putih, sedangkan isolat PS3 bentuk koloninya bulat berombak berwarna krem.

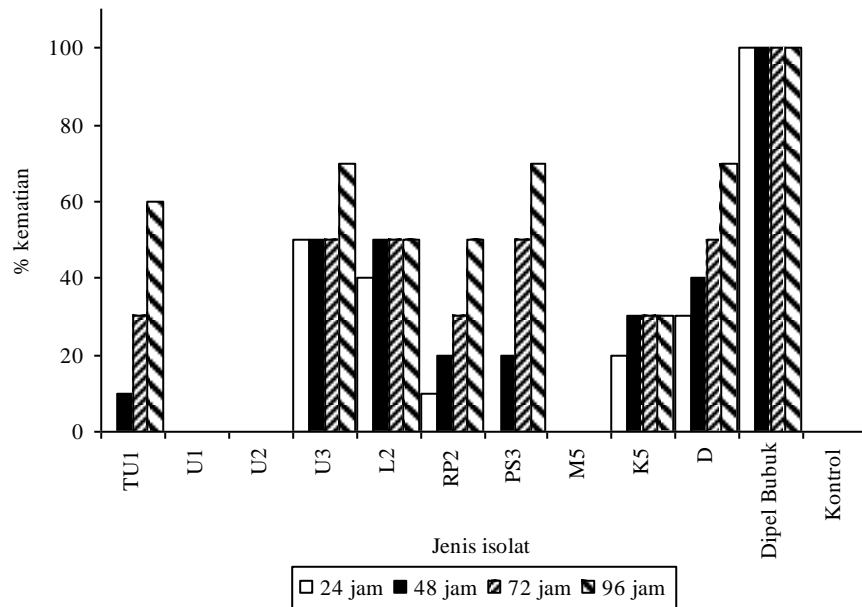
Beberapa sifat biokimia seperti ADH, ODC, VP, dan kemampuan memfermentasi gula bervariasi antarisolat. Isolat TU1, RP2, D, M5, dan K5 menunjukkan reaksi positif pada uji ADH. Isolat TU1, L2, PS3, dan D menunjukkan reaksi positif terhadap VP. Isolat M5 merupakan satu-satunya isolat yang

menunjukkan reaksi positif pada uji ODC. Hasil uji biokimia menunjukkan bahwa isolat TU1 dan D memiliki sifat morfologi dan biokimia sama. Kemungkinan kedua isolat ini secara genetik mirip. Kemiripan ini dapat diketahui jika kedua isolat dianalisis genomnya. Variasi yang tidak terlalu besar dari sifat morfologi dan biokimia antarisolat ini menunjukkan keragaman yang kecil dari isolat *B. thuringiensis* asal daerah Sumatera Utara.

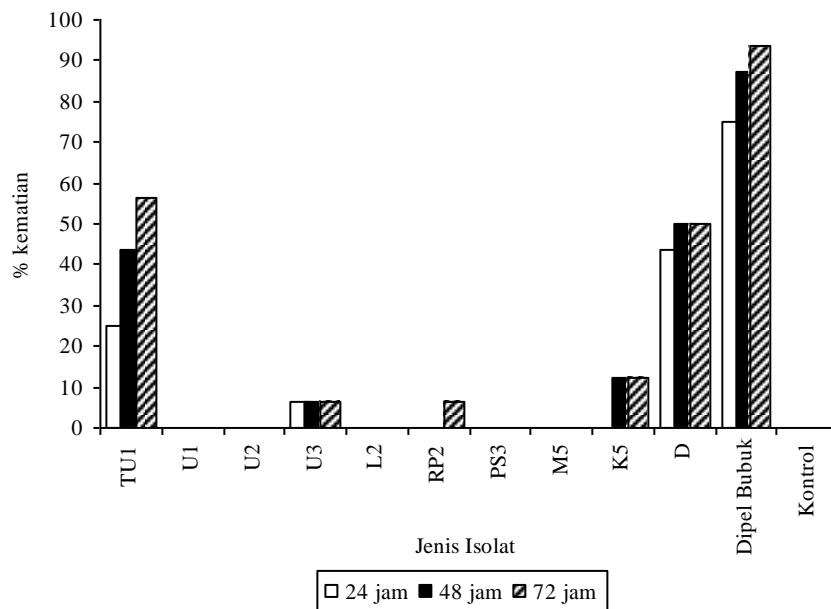
Bioasai spektrum isolat terhadap larva beberapa jenis serangga menunjukkan adanya spektrum yang berbeda (Gambar 1-4). Isolat TU1 dan Dipel menunjukkan spektrum dan kemampuan membunuh larva relatif sama. Kemampuan membunuh larva *H. armigera* kedua isolat sedikit lebih rendah dibandingkan beberapa isolat lain (Gambar 1), tetapi lebih mampu membunuh larva *P. xylostella* (Gambar 2), *A. aegypti* (Gambar 3), dan *Culex* sp. (Gambar 4).



**Gambar 1.** Persen kematian larva *H. armigera* yang diberi perlakuan isolat *B. thuringiensis*.



Gambar 2. Persen kematian larva *P. xylostella* yang diberi perlakuan isolat *B. thuringiensis*.



Gambar 3. Persen kematian larva *A. aegypti* yang diberi perlakuan isolat *B. thuringiensis*.

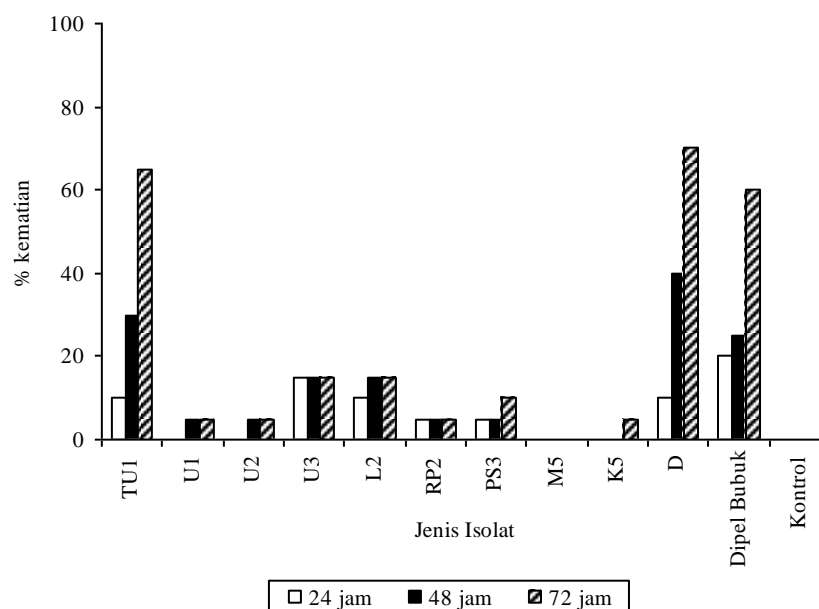
Isolat TU1 berturut-turut mampu membunuh 60, 56,25, dan 65% populasi uji larva *P. xylostella*, *A. aegypti*, dan *Culex* sp.. Boleh jadi isolat TU1 dan Dipel (D) memiliki gen *cry* dari jenis yang sama, yaitu *cryIC* (Smith & Ellar, 1994) atau gen *cryII* (Agaïsse & Lereclus, 1995). Dua gen *cry* ini spesifik terhadap larva beberapa jenis Diptera dan Lepidoptera. Isolat lain hampir tidak memiliki

daya bunuh terhadap larva Diptera, tetapi memiliki kemampuan membunuh yang bervariasi terhadap larva Lepidoptera. Isolat U3, L2, RP2, dan PS3 mampu membunuh 50-70% populasi uji larva *P. xylostella*. Isolat U1, U3, L2, RP2, dan PS3 mampu membunuh sekitar 80-100% larva *H. armigera*. Hal yang menarik adalah isolat U1 dan U2 mampu membunuh larva *H. armigera*, tetapi tidak

terhadap larva *P. xylostella*. Kemampuan spesifik strain *B. thuringiensis* semacam ini juga dilaporkan oleh Lambert *et al.* (1996). Dari hasil ini diduga bahwa isolat-isolat tersebut mungkin membawa gen *cryI* yang spesifik terhadap Lepidoptera (Agaisse & Lereclus, 1995). Kemampuan daya bunuh isolat mungkin dapat ditingkatkan dengan meningkatkan konsentrasi kristal protein saat aplikasi. Dua isolat yaitu K5 dan M5 memiliki

daya bunuh yang sangat rendah terhadap larva *H. armigera* dan *P. xylostella*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa di beberapa daerah Sumatera Utara terdapat isolat bakteri *B. thuringiensis* yang potensial untuk dikembangkan menjadi bioinsektisida. Pencarian terhadap strain-strain baru di Indonesia tetap perlu dilakukan untuk tujuan komersial.



Gambar 4. Persen kematian larva *Culex* sp. yang diberi perlakuan isolat *B. thuringiensis*.

## Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa isolat *B. thuringiensis* lokal memiliki spektrum dan kemampuan yang berbeda dalam mengendalikan larva serangga uji. Isolat TU1 memiliki spektrum dan kemampuan yang sama dengan isolat Dipel (*B. thuringiensis* var *kurstaki* strain HD-7) dalam mengendalikan larva serangga uji.

## Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Proyek Hibah Pekerti 1 DIKTI Tahun 2003 yang telah memberikan dana untuk penelitian ini.

## Daftar Pustaka

Agaisse, H. and Lereclus, D. 1995. How Does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol* 21: 6027-6032.

Baum, J.A., Kakefuda, M. and Gawron-Burke, C. 1996. Engineering *Bacillus thuringiensis* Bioinsecticides with an indigenous site-specific recombination system. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4367-4373.

- Ben-Dov, E., Wang, Q., Zaritzky, A., Manasherob, R., Barak, Z., Schneider, B., Khamraev, A., Baizhanov, M., Glupov, V. and Margalith, Y. 1999. Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3714-3716.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F.J., Pen, A.G., Nunez-Valdez, M-E., Soberon, M. and Quintero, R. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972.
- Holt, J.G, Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Itoua-Apoyolo, C., Drif, L., Vassal, J.M., Debarjac, H., Bossy, J.P., Leclant, F. and Frutos, R. 1995. Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the European sunflower moth, *Homoeosoma nebulella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4343-4347.
- Kawalek, M.D., Benjamin, S., Lee, H.L. and Gill, S.S. 1995. Isolation and identification of novel toxins from a new mosquitocidal isolate from Malaysia, *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2965-2969.
- Lambert, B., Buysse, L., Decock, C., Jansens, S., Piens, C., Saey, B., Seurinck, J., Van Audenhove, K., Van Rie, J., Van Vliet, A. and Peferoen, M. 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 80-86.
- López-Meza, J.E. and Ibarra J.E. 1996. Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1306-1310.
- Masson, L., Erlandson, M., Puzstai-Carey, M., Brousseau, R., Juárez-Pérez, V. and Frutos, R. 1998. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4782-4788.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Smith, G.P. and Ellar, D.J. 1994. Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC d-endotoxin affects insecticidal specificity. *J.Biochem.* 302: 611-616.
- Thomas, D.J.I, Morgan, J.A.W., Whipps, J.M. and Saunders, J.R. 2000. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in Lepidopteran and Coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 118-124.
- Travers, R.S., Martin, P.A.W. and Reichelderfer, C.F. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1263-1266.