

ISOLASI DAN UJI PATOGENISITAS *Bacillus thuringiensis* TERHADAP *Crocidolomia binotalis* Zell. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

Isolation and Pathogenicity Test of Bacillus thuringiensis against Crocidolomia binotalis Zell. (Lepidoptera: Pyralidae)

Jeffij V. Hasinu

Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura,
Jl. Ir. M. Putuhena Kampus Poka Ambon, 97233

ABSTRACT

Hasinu, J.V. 2009. Isolation and Pathogenicity Test of *Bacillus thuringiensis* against *Crocidolomia binotalis* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae). Jurnal Budidaya Pertanian 5: 84-88.

Isolation of *Bacillus thuringiensis* and pathogenicity test against *Crocidolomia binotalis* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae) was conducted at Entomology Laboratory Faculty of Biology Gadjah Mada University. *C. binotalis* was reared on cabbage for stock culture. The *B. thuringiensis* was isolated from Kopeng and Ngablak, Central Java using Aizawa method. Pathogenicity test using dipped method of Hamilton and Atia with multilevel concentration spores of *B. thuringiensis*. Test insect consisted of third instars larvae. Probit analysis was used to determine LC₅₀ and LT₅₀. There were two isolates of *B. Thuringiensis* obtained, namely isolate Kp from Kopeng and Nb from Ngablak. All of isolates were able killed of *C. binotalis* larva at 48 hours after treatment, ranging from 3 to 87% depending on the concentration level. The result of probit analysis showed that Kp isolate had the highest pathogenicity (LC₅₀ = 2.22 × 10⁵ spore ml⁻¹) and Nb with LC₅₀ values of 1.06 × 10⁶ spore ml⁻¹. The lowest LT₅₀ value was showed by Nb (LT₅₀ = 82.5 hours) and the highest LT₅₀ value was Kp (LT₅₀ = 92.2 hours). The two isolates are reconiced to be highly potencial for biological control agents.

Key words: Isolation, pathogenicity, *Bacillus thuringiensis*, *Crocidolomia binotalis*

PENDAHULUAN

Kubis merupakan tanaman hortikultura yang banyak diusahakan baik di dataran rendah maupun dataran tinggi di Indonesia. Kubis mengandung vitamin, mineral, karbohidrat, protein serta lemak dan berperan penting dalam menunjang perbaikan gizi masyarakat. Berbagai upaya telah dilakukan untuk meningkatkan produksi kubis. Usaha tersebut antara lain intensifikasi dan ekstensifikasi. Dalam usaha peningkatan produksi kubis banyak faktor penghambat yang dihadapi, salah satu diantaranya adalah masalah hama dan penyakit.

Hama-hama yang menyerang tanaman kubis adalah *Plutella xylostella* dan *Crocidolomia binotalis*. Hasil penelitian di Indonesia menunjukkan bahwa serangan *P. xylostella* dan *C. binotalis* pada kubis yang ditanam pada bulan juli yaitu pada pertengahan musim kemarau dapat menyebabkan kehilangan hasil sebesar 100% apabila tidak dikendalikan (Stahly, 1999). Pengendalian ulat ini telah lama dilakukan yakni secara kimiawi. Namun pengendalian dengan pestisida perlu dikurangi karena telah diketahui bahwa penggunaan pestisida secara terus-menerus mengakibatkan efek samping yang berbahaya antara lain timbulnya resistensi hama, terbunuhnya parasit dan predator hama serta berbahaya bagi manusia, hewan dan lingkungan. Mengingat besarnya bahaya

tersebut maka perlu dicari teknik pengendalian lain yang lebih aman yaitu pengendalian secara hayati salah satu diantaranya adalah penggunaan patogen.

Bacillus thuringiensis merupakan bakteri patogen yang sangat toksik terhadap hama-hama tertentu (Carlson, 2001). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa *B. thuringiensis* mematikan *Spodoptera litura* (LC₅₀ = 5,21 × 10¹⁰), *S. exiqua* (LC₅₀ = 2,24 × 10¹²) dan *P. xylostella* (LC₅₀ = 9,47 × 10¹²). Patogen ini aman terhadap organisme bukan sasaran dan tidak mencemari lingkungan. *B. thuringiensis* dapat diisolasi dari tanah dan serangga sakit (Burgess & Husey, 1981). Oleh karena itu perlu dilakukan pengujian bakteri tanah terutama *B. thuringiensis* untuk mengetahui patogenisitas bakteri tersebut terhadap larva *C. binotalis*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri *B. thuringiensis* dari sampel tanah dan mengetahui patogenisitas *B. thuringiensis* terhadap *C. binotalis*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian terdiri atas dua tahap yaitu penelitian lapangan yakni eksplorasi sampel tanah yang diduga mengandung bakteri dan penelitian laboratorium untuk isolasi dan uji patogenisitas *B. thuringiensis*.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah *B. thuringiensis* hasil isolasi, *C. binotalis* instar III sebagai serangga uji, tanaman kubis, yeast ekstrak, pepton, agar, NaCl, pewarna gram, pewarna Smirnov, Tween 20, aquades, madu dan alkohol. Alat yang digunakan adalah: kurungan kasa ukuran 40 × 40 × 60 cm, botol gelas ukuran 6,5 × 6,5 × 8 cm, autoclave, refrigerator, mikroskop fase kontras, laminar air flow, timbangan analitik, penangas air, haemocytometer, mix-mixer, alat-alat gelas, mikropipet, scapel, jarum ose, dan hand-counter.

Pelaksanaan Penelitian

Eksplorasi isolat *B. thuringiensis*

Pengambilan contoh tanah sebagai sumber isolat dilakukan dengan metode sampling secara diagonal pada lahan pertanian kubis di daerah Kopeng dan Ngablak. Pada lokasi penelitian ditentukan lima tempat yang berada pada daerah sekitar tanaman dengan kedalaman tanah yang berbeda, masing-masing sampel diambil sebanyak 500 gram.

Isolat *B. thuringiensis*

Isolat bakteri yang digunakan diperoleh dari hasil isolasi contoh tanah menggunakan metode Ohba & Aizawa (1986), Suspensi dari pengenceran 10⁻¹-10⁻⁵ diinokulasi ke medium nutrient agar, inkubasi selama 2 hari selanjutnya dilakukan karakterisasi dan pemurnian hingga diperoleh isolat *B. thuringiensis* murni. Bentuk dan warna koloni diamati secara visual, pengecatan spora dan kristal protein dilakukan berdasarkan metode Entwistle (1999).

Perbanyakan *C. binotalis*

Ulat *C. binotalis* sebagai serangga uji diperoleh dengan mengumpulkan larva dari kebun kubis, perbanyakan dengan cara rearing dengan menggunakan pakan daun kubis segar untuk pakan ulat dan madu 10% sebagai pakan imago. Stadia ulat diseleksi untuk memperoleh ulat instar III dengan umur seragam yang akan dipakai untuk pengujian.

Uji Patogenisitas

Pengujian isolat *B. thuringiensis* terhadap *C. binotalis* dilakukan dengan cara pembuatan inokulum berdasarkan metode Ohba dkk. (1981). Penghitungan jumlah spora menggunakan haemocytometer berukuran luas 0,0025 mm² dan dalam 0,1 mm sehingga volume tiap petak adalah 0,00025 mm³. Perhitungan spora dilakukan pada lima bidang pandang mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Jumlah spora tiap ml diperoleh dengan rumus berikut:

$$X = \frac{n}{0,00025 \text{ mm}^2} = \frac{400}{1 \text{ mm}^3} = \frac{4 \times 10^6}{\text{ml}}$$

Keterangan:

X = jumlah spora per mililiter suspensi.

n = jumlah rata-rata spora yang dihitung pada tiap petak.

Perlakuan pakan sesuai konsentrasi untuk pengujian menggunakan metode pencelupan daun (*leaf dipped method*) menurut Hamilton & Atia (1976) selanjutnya diperlakukan pada serangga uji yang telah disiapkan dalam botol-botol pengujian. Masing-masing isolat terdiri dari lima perlakuan dan diulang sebanyak tiga kali ditambah kontrol. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan dan tingkat mortalitas ulat.

Analisis Data

Pengamatan terhadap mortalitas *C. binotalis* dilakukan pada waktu 6, 12, 24, 72, dan 96 jam setelah perlakuan (jsp). Nilai patogenisitas dinyatakan dengan LC₅₀ dan LC₉₀, lama waktu mematikan dinyatakan dengan LT₅₀ dan LT₉₀ yang dihitung menggunakan metode Probit Analisis (Finney, 1971), bila terdapat kematian pada control dikoreksi dengan formula Abbot sebagai berikut:

$$P = \frac{(P' - C)}{(100 - C)} \times 100 \%$$

Keterangan:

P = persen mortalitas terkoreksi

P' = persen mortalitas pengamatan

C = persen mortalitas control

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat *Bacillus thuringiensis*

Berdasarkan hasil pengamatan visual terhadap ciri morfologi koloni, sel dan pewarnaan Smirnov diperoleh dua isolat yang jelas sebagai *B. thuringiensis*. Pertumbuhan bakteri pada media biakan menunjukkan bahwa morfologi koloni kedua isolat tersebut adalah bentuk ireguler, permukaan koloni kasar, datar dan agak mengkilap dan warna koloni putih kekuningan.

Berdasarkan hasil pengamatan secara mikroskopis terlihat bahwa sel vegetatif bakteri *B. thuringiensis* berbentuk batang dengan spora subterminal. Bersamaan dengan terbentuk spora terbentuk pula benda berupa Kristal yang berada dekat spora yang dikenal dengan nama kristal protein. Pada umur biakan satu hari spora dan kristal belum terbentuk, dan baru terlihat setelah umur dua hari setelah diinokulasi. Hasil pengecatan dengan metode Smirnov menunjukkan adanya spora bakteri yang berbentuk bulat dan berwarna kemerah-merahan dengan pinggirannya ungu muda, sedangkan kristalnya berwarna lebih gelap dengan bayangan ungu kebiru-biruan. Dari isolat *B. thuringiensis* tersebut dilakukan uji pendahuluan dengan lima tingkat konsentrasi, untuk menentukan kisaran konsentrasi isolat yang akan diujikan pada *C. binotalis*. Ulat yang digunakan adalah ulat instar III karena stadia ini aktif bergerak dan makan hingga bisa mengakibatkan kerusakan sampai titik tumbuh.

Patogenisitas *B. thuringiensis* terhadap ulat *C. binotalis*

Mortalitas Ulat *C. binotalis*

Dari hasil pengujian, semua perlakuan *B. thuringiensis* ternyata dapat mengakibatkan kematian pada *C. binotalis*. Kematian mulai terjadi pada 12 jam setelah perlakuan. Persentasi mortalitas perlakuan isolat Kp pada konsentrasi tertinggi (Kp-11) ialah antara 23% sampai 100% dan pada konsentrasi terendah (Kp-15) persentasi mortalitas ulat uji antara 10,00% pada pengamatan 48 jsp sampai 26,67% pada pengamatan 96 jsp (Tabel 1).

Ulat *C. binotalis* dengan perlakuan *B. thuringiensis* isolat Nb mengakibatkan mortalitas ulat pada konsentrasi tertinggi (Nb-21) berkisar antara 3,33% pada pengamatan 12 jsp dan 76,67% pada pengamatan 96 jsp. Pada pengujian dengan konsentrasi terendah (Nb-25) mengakibatkan mortalitas ulat sebesar 16,67% pada pengamatan 48 jsp dan 30,00% pada pengamatan 96 jsp.

Pengujian pada semua perlakuan menunjukkan bahwa pada pengamatan 6 jsp ulat uji belum mengalami kematian akan tetapi sudah mulai terlihat adanya gejala infeksi. Terdapat bekas gigitan pada pakan dan butiran-butiran faeses pada dasar botol. Hal ini menunjukkan bahwa ulat uji sudah memakan pakan yang sudah mengandung bakteri. Gejala awal yang nampak adalah ulat mulai kurang aktif, gerakannya mulai lamban dan aktivitas makan mulai menurun. Gejala ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Poinar & Thomas (1982), bahwa saluran pencernaan adalah organ yang mula-mula

terserang oleh bakteri. Ulat yang terinfeksi kemudian mati dengan gejala lanjut yaitu tubuh berubah warna dari hijau kecoklatan menjadi coklat kehitaman, tubuh lembek, berair namun setelah beberapa hari ulat tersebut mulai mengering dan kemudian mengerut. Perbedaan tingkat mortalitas ulat pada setiap perlakuan ada kaitannya dengan jumlah spora. Pada perlakuan dengan konsentrasi tinggi, memiliki jumlah spora yang lebih banyak, dengan demikian mengakibatkan jumlah spora yang termakan oleh ulat uji juga akan lebih besar dibandingkan dengan perlakuan yang jumlah sporanya lebih sedikit.

Nilai LC_{50} dan LC_{90} *B. thuringiensis*

Berdasarkan hasil analisa probit perlakuan *B. thuringiensis* yang diujikan terhadap ulat *C. binotalis* menunjukkan bahwa Kp mempunyai patogenisitas lebih tinggi ($LC_{50} = 2,22 \times 10^5$ spora ml^{-1} dan $LC_{90} = 1,93 \times 10^8$ spora ml^{-1}) dibandingkan dengan Nb ($LC_{50} = 4,16 \times 10^5$ dan $LC_{90} = 1,29 \times 10^{10}$ spora ml^{-1}). Persamaan garis regresi isolat Kp adalah $Y = 3,96932 + 0,43614X$ dengan sudut kemiringan 0,44 sedangkan isolat Nb garis regresi adalah $Y = 3,98673 + 0,31390X$ dengan sudut kemiringan 0,31 (Tabel 2 dan Gambar 1).

Diketahui bahwa pada pengamatan yang sama yaitu 72 jam jsp isolat Kp mempunyai patogenisitas yang lebih baik dibandingkan dengan isolat Nb. Perbedaan patogenisitas pada setiap perlakuan dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya jumlah spora dan diduga juga oleh varietas bakteri. Jumlah spora dari masing-masing isolat berbeda, isolat Kp memiliki jumlah spora

Tabel 1. Mortalitas ulat *C. binotalis* pada perlakuan *B. thuringiensis* isolat Kp dan Nb (%)

Isolat perlakuan	Konsentrasi (spora/ml)	Persentasi Mortalitas Ulat Pada Jam ke:				
		12	24	48	72	96
Kp-11	$9,65 \times 10^7$	13,33	46,47	63,33	83,33	86,67
Kp-12	$9,67 \times 10^6$	3,33	23,33	56,67	80,00	83,33
KP-13	$9,67 \times 10^5$	0,00	16,67	30,00	66,67	70,00
Kp-14	$9,67 \times 10^4$	0,00	13,33	16,67	43,33	53,33
Kp-15	$9,67 \times 10^3$	0,00	0,00	10,00	23,33	26,67
K		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nb-21	$6,30 \times 10^7$	3,33	20,00	46,67	70,00	76,67
Nb-22	$6,30 \times 10^6$	0,00	6,67	33,33	63,33	66,67
Nb-23	$6,30 \times 10^5$	0,00	3,33	30,00	46,67	53,33
Nb-24	$6,30 \times 10^4$	0,00	0,00	23,33	30,00	50,00
Nb-25	$6,30 \times 10^3$	0,00	0,00	16,67	26,67	30,00
K		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

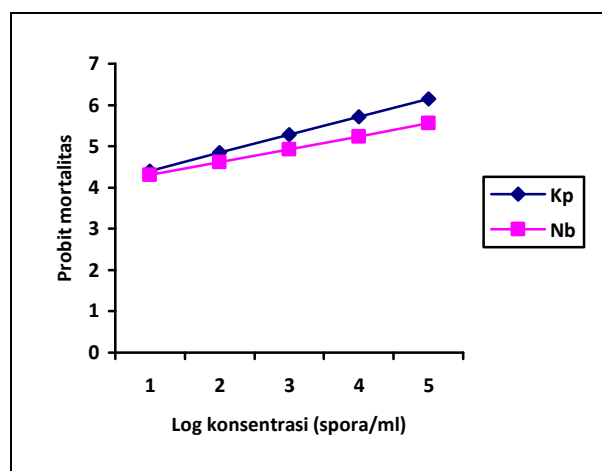
Tabel 2. Nilai LC_{50} dan LC_{90} serta garis persamaan regresi Probit pada perlakuan *B. thuringiensis* terhadap mortalitas *C. binotalis*

Isolat	Nilai LC_{50} (spora ml^{-1}) (Fiducial limit)	Nilai LC_{90} (spora ml^{-1}) (Fiducial limit)	Persamaan Garis Regresi	Slop	SE Slop
Kp	$2,22 \times 10^5$ ($5,82 \times 10^4 - 8,52 \times 10^5$)	$1,93 \times 10^8$ ($1,63 \times 10^7 - 6,82 \times 10^8$)	$Y = 3,96932 + 0,43614x$	0,436	0,089
Nb	$1,06 \times 10^6$ ($2,18 \times 10^5 - 7,83 \times 10^6$)	$1,29 \times 10^{10}$ ($7,83 \times 10^7 - 1,74 \times 10^{11}$)	$Y = 3,98673 + 0,31390x$	0,314	0,078

Tabel 3. Nilai LT_{50} dan LT_{90} Serta Garis Persamaan Regresi Probit Pada Perlakuan *B. thuringiensis* Terhadap Mortalitas *C. binotalis*

Isolat	Nilai LC_{50} (jam) (Fiducial limit)	Nilai LC_{90} (jam) (Fiducial limit)	Persamaan Garis Regresi	Slop	SE Slop
Kp	92,2 (66,1 – 128,7)	306,8 (110,3 – 517,1)	$Y = 0,17720 + 2,45466X$	2,454	0,808
Nb	82,5 (62,8 – 108,4)	244,4 (127,1 – 341,1)	$Y = 0,20995 + 2,71839X$	2,718	0,575

yang lebih besar yaitu $9,65 \times 10^7$ sedangkan isolat Nb $6,30 \times 10^7$. Perbedaan spora yang masuk sangat menentukan hubungan antara bakteri *B. thuringiensis* dengan inang. Untuk timbulnya penyakit dibutuhkan jumlah spora tertentu, tergantung jenis patogen dan jenis inang (Carlson, 2001). Infeksi akan diikuti dengan terjadinya paralisis saluran pencernaan yang disebabkan oleh kristal protein yaitu delta endotoksin. Endotoksin ini dapat merusak jaringan tubuh setelah terjadi infeksi dengan cara merusak fosfolipida esensial pada jaringan tubuh serangga yang diduga dapat membebaskan asam lemak dari molekulnya sehingga dapat menyebabkan kematian ulat *C. binotalis*. Toksin akan bekerja aktif di dalam saluran pencernaan ulat pada pH alkali yaitu 9,0 sampai 10,5 (Helgason, 2003).



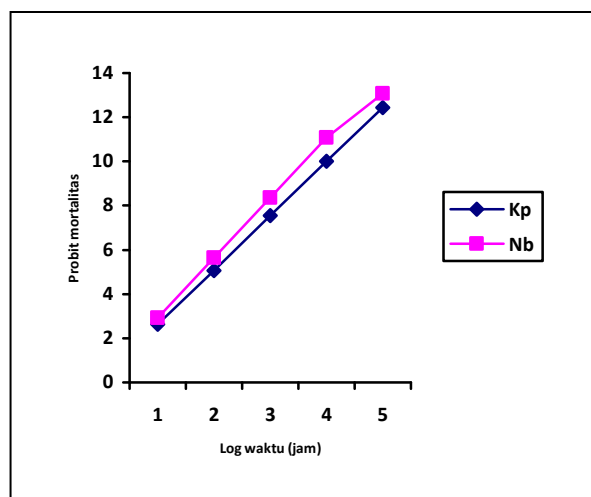
Gambar 1. Hubungan logaritma konsentrasi dan probit mortalitas ulat *C. binotalis* pada pengujian *B. thuringiensis*.

Nilai LT_{50} dan LT_{90} *B. thuringiensis*.

Berdasarkan hasil analisis probit perlakuan *B. thuringiensis* yang diujikan terhadap *C. binotalis* menunjukkan bahwa nilai LT_{50} isolat Kp lebih tinggi dibandingkan Nb. Nilai LT_{50} isolat Kp sebesar 92,2 jam, fiducial limit 66,1 – 128,7 jam, dan persamaan garis regresi probit adalah $Y = 0,1172 + 2,45466X$ sedangkan pada isolat Nb nilai LT_{50} adalah 82,5 jam, fiducial limit antara 62,8-108,4 jam dengan persamaan garis regresi probit $Y = 0,20995 + 2,71839X$ dari data tersebut diketahui bahwa isolat Nb membutuhkan waktu lebih cepat untuk mematikan ulat *C. binotalis* namun patogenisitas yang baik ditentukan oleh

seberapa besar presentasi mortalitas yang ditimbulkan (Tabel 3 dan Gambar 2).

Hubungan antara logaritma waktu *B. Thuringiensis* dengan probit mortalitas untuk tiap perlakuan menunjukkan adanya perbedaan sudut kemiringan, isolat Nb 2,72 sedangkan Kp 2,45 ini berarti bahwa untuk membunuh 50 persen serangga uji kedua isolat membutuhkan waktu kurang lebih dua jam. Jumlah spora yang termakan juga menentukan lamanya waktu yang dibutuhkan untuk membunuh. Hal ini ada hubungannya dengan aktivitas bakteri di dalam saluran pencernaan yang meliputi pembentukan spora dan kristal.



Gambar 2. Hubungan logaritma waktu dan probit mortalitas ulat *C. binotalis* pada pengujian *B. thuringiensis*.

Dari hasil analisis probit diketahui bahwa nilai LT_{50} berkisar antara 82,5 sampai 92,2 jam. Ini berarti bahwa fase kematian pada ulat uji tergolong kematian type II Pada type ini setelah ulat menelan kristal protein, beberapa menit kemudian ulat berhenti makan dan terjadi perkecambahan spora dalam usus dan kemudian menyebabkan septisemia. Perbedaan waktu mematikan dan jumlah mortalitas juga disebabkan oleh perbedaan varietas bakteri. *B. thuringiensis* dalam pengujian ini diisolasi dari tempat berbeda dengan demikian diduga ada perbedaan varietas, hal ini terlihat dari adanya aktivitas bakteri yang berbeda meskipun jenis inangnya sama.

KESIMPULAN

Hasil isolasi bakteri dari sampel tanah didapatkan dua isolat *B. thuringiensis* yang dapat mengakibatkan mortalitas cukup tinggi terhadap ulat *C. binotalis* dan isolat tersebut dapat dianggap sebagai agensia pengendali yang potensial. Isolat Kp mengakibatkan mortalitas tertinggi $LC_{50} = 2,22 \times 10^5$ spora/ml dan $LT_{50} = 92,2$ jam. Mortalitas terendah pada isolat Nb $LC_{50} = 1,0^6 \times 10^6$ dengan nilai $LT_{50} = 82,5$ jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Burges, H.D. & N.W. Husey. 1981. Microbiol Control of Insect and Mites. Akademik Press. New York. 861p.
- Carlson, C.R. 2001. The Chromosome Map of *Bacillus thuringiensis* Sub sp. *Canadensis* HD224 is Highly sililar to That of the *Bacillus cereus* Type Stain ATCC 14579. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.tgci?CMD=Display&DB=PubMed>. Diakses tanggal: 12-12-2001
- Entwistle, P. 1999. *Bacillus thuringiensis* An Enviromental Biopesticide Theori and Practice. John Willey and Sons. New York 311p.
- Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press. London. 333p.
- Hamilton, J.T. & F.I. Atia. 1976. Effect of Mixture of *B. thuringiensis* and Parasit *Trella collaris*. *Journal Economic Entomology* 70: 146-148.
- Helgason, A. 2003. Genetic Diversity of *Bacillus Cereus/Bacillus thuringiensis* Isolated from Natural Sources. <http://www.ncbi.nlm.gov/htbin.post/entrez/query?uid>. Diakses tanggal:6-10-2003.
- Ohba, M., K. Ono, K. Aizawa, & S. Iwanami. 1981. Two new subspecies of *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* (Serotype 18) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* (Serotype 19). *Journal of Invertebrate Pathology* 38:184-190.
- Ohba, M. & K. Aizawa. 1986. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 277-282.
- Poinar G.O. & G.M. Thomas. 1982. Diagnostic manual for The Identification of Insect Pathogen. Plenum Press. New York. 218p.
- Stahly, D.P. 1999. The Genus *Bacillus*: Insect Pathogens. Department of Microbiology. Iowa University. 144p.