

Efektivitas Beberapa Bakteri Rizosfer Penghasil Kristal Protein Dari Beberapa Jenis Tanaman Terhadap Hama *Spodoptera litura* F. (Lepidoptera: Noctuidae)

Indri Yanil Vajri

Prodi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Medan Area Medan Sumatera Utara
Indonesia

Email: indriyanilvajri@staff.uma.ac.id

Abstract: *The purpose of the study was to obtain bacterial isolates producing crystal proteins (p.c.p) which is able to kill the larvae of S. litura. Research was carried out in the Laboratory, using completely randomized design (CRD) with 8 treatments and 4 replications. Treatment consists of several bacterial isolates, i.e. p.c.p derived from the pepper plant rhizosphere (RZCB), corn (RZJG), onion (RZBM), long beans (RZKP), cabbage (RZKB) and soybean (RZKD), and control and insecticide cypermethrin as a comparison. Bacteria were isolated by serial dilution method. Toxicity test was conducted by immersing feed in suspension containing bacteria p.c.p with a population density 10⁸ cells/ml. Parameters measured were mortality of larvae, percentages of pupae and adults formed. Data were analyzed by analysis of variance followed by Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) at the level of 5%. The results showed that all isolates could be lethal to larvae of S. litura and able to inhibit the formation of the pupae and adults. RZKD isolates showed better results with the highest mortality (75%) and the lowest LT₅₀ (4.71 days).*

Submit:

Review:

Publish:

Keywords: *toxicity; bacteria; Spodoptera litura; rhizosphere.*

Abstrak: Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan isolat bakteri penghasil kristal protein (p.k.p) yang mampu mematikan larva *S. litura*. Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium menggunakan Rancangan Acak lengkap (RAL) dengan 8 perlakuan dan 4 ulangan. Perlakuan terdiri dari beberapa isolat bakteri p.k.p yang berasal dari rizosfer tanaman cabai (RZCB), jagung (RZJG), bawang merah (RZBM), kacang panjang (RZKP), kubis (RZKB) dan kedelai (RZKD), serta kontrol dan insektisida Sipermetrin sebagai pembanding. Bakteri diisolasi dengan metoda pengenceran berseri. Uji toksisitas dilakukan dengan metode perendaman pakan dalam suspensi yang mengandung bakteri p.k.p dengan kerapatan populasi 10⁸ sel/ml. Parameter yang diamati adalah mortalitas larva, persentasi pembentukan pupa dan imago. Data dianalisis dengan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) pada taraf 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua isolat bakteri dapat

mematikan larva *S. litura* dan mampu menghambat pembentukan pupa dan imago. Isolat RZKD menunjukkan hasil yang lebih baik dengan nilai mortalitas yang paling tinggi (75%) dan nilai LT_{50} yang paling rendah (4,71 hari).

Kata kunci: toksisitas; bakteri; *Spodoptera litura*; rizosfer.

Citation :

PENDAHULUAN

Pengendalian hama terpadu (PHT) merupakan suatu pendekatan atau cara pengendalian hama yang didasarkan pada pertimbangan ekologi dan efisiensi ekonomi dalam rangka pengelolaan ekosistem yang berwawasan lingkungan dan berkelanjutan. Strategi PHT adalah menggunakan secara kompatibel semua teknik atau metode pengendalian hama yang didasarkan pada asas ekologi dan ekonomi. Cara pengendalian yang menguntungkan secara ekonomis diperlukan untuk menghindari dampak negatif penggunaan insektisida dengan tidak mengabaikan kelestarian lingkungan.

Salah satu komponen PHT adalah pengendalian hayati dengan menggunakan musuh alami serangga hama seperti bakteri entomopatogen atau bakteri yang menyebabkan penyakit pada serangga (Jumar, 1997). Infeksi bakteri pada serangga bisa diklasifikasikan dalam arti luas seperti *bacteremia*, *septicemia* (keracunan darah) dan *toxemia*. *Bacterimia* berlangsung ketika jumlah bakteri yang banyak di dalam *haemolymph* serangga tanpa menghasilkan toksin. Pada keadaan ini berlangsung simbiosis bakteri dan jarang terjadi dengan bakteri patogen. *Septicemia* paling banyak terjadi oleh bakteri patogen, dimana mereka menyerang haemocel, memperbanyak diri, menghasilkan toksin dan membunuh serangga. *Toxemia* berlangsung ketika bakteri menghasilkan toksin hanya terbatas di dalam dinding usus (Tanada dan Kaya, 1993).

Secara garis besar bakteri dapat dibagi kedalam dua kategori yaitu bakteri yang tidak membentuk spora dan bakteri yang membentuk spora. Bakteri pembentuk spora sangat berperan dalam program pengendalian hayati karena bersifat patogen sejati yang artinya mampu menimbulkan penyakit pada serangga apabila termakan (Tanada dan Kaya, 1993). Ada dua genus bakteri patogen serangga yang membentuk spora yaitu *Bacillus* dan *Clostridium* (Habazar dan Yaherwandi, 2006). Sejauh ini kelompok bakteri pembentuk spora yang bersifat entomopatogen yang paling penting dalam pengendalian hayati adalah dari genus *Bacillus*, karena selain membentuk spora bakteri ini juga membentuk Kristal protein (p.k.p) saat sporulasi. Jika spora dan Kristal bakteri

dimakan oleh serangga yang peka maka terjadi paralisis yang mengakibatkan kematian inang. Kristal protein akan melarut dalam saluran pencernaan, dalam jaringan tersebut bakteri mengeluarkan toksin yang dapat mematikan serangga (Untung, 2010).

Bacillus memiliki kisaran pertumbuhan yang luas, kosmopolit, tahan terhadap senyawa-senyawa antiseptik, bersifat aerob atau fakultatif aerob, serta tidak membutuhkan faktor tumbuh yang relatif mahal sehingga mudah untuk dibiakkan dan tidak berbahaya bagi manusia (Hatmanti, 2000). Bakteri p.k.p yang dijadikan agen hayati dari genus *Bacillus* adalah *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) dan *Bacillus popilliae*.

Trizelia (1994) menyatakan bahwa infeksi *Bt* terhadap larva *Heliothis armigera* pada kerapatan populasi $1,6 \times 10^9$ spora/ml dapat mematikan dan menurunkan laju konsumsi larva. Penelitian Arzal (2003) menunjukkan bahwa dari kerapatan populasi $1,14 \times 10^6$ isolat *Bt* yang diisolasi dari serangga yang terinfeksi menyebabkan mortalitas larva *Spodoptera litura* sebesar 74,99%.

Bacillus popilliae merupakan jenis bakteri yang menyebabkan penyakit susu pada serangga Scarabeids. Bakteri ini bersifat obligat dan memiliki kisaran inang yang cukup banyak yakni sekitar 70 spesies serangga. Spora yang tertelan akan berkecambah dalam saluran pencernaan larva kemudian menembus *phagocytosis* dalam sel midgut. *Haemolymph* serangga akan berubah menjadi putih susu dan larva umumnya tidak bisa berganti kulit atau bermetamorfosis (Tanada dan Kaya, 1993).

S. litura merupakan salah satu serangga hama yang potensial merusak tanaman pertanian (Deptan, 2005). Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2012), serangan ulat grayak di Indonesia dapat menurunkan produksi tanaman kubis dari 83.884 ton menjadi 69.675 ton, dan tanaman bawng merah dari 32.441 ton menjadi 25.059 ton.

Salah satu keuntungan dari *Bacillus* adalah memiliki penyebaran yang luas di alam diantaranya tanah, udara dan air. Menurut Coyne (1999) (di dalam Ramadhan dan Hernowo, 2012) bakteri ini lebih mudah didapatkan di daerah rizosfer, karena tanah rizosfer merupakan daerah yang ideal bagi tumbuh dan berkembangnya mikroba tanah termasuk agensia pengendali hayati. Biasanya mikroorganisme dari kelompok bakteri yang dapat diisolasi dari tanah dan berpotensi mengendalikan serangga hama adalah dari golongan bakteri pembentuk spora. Jenis bakteri yang bersifat patogen bagi serangga biasanya hidup secara saprofit di dalam tanah dan sekali waktu jika menemukan inangnya yang rentan dapat menginfeksi sebagai parasit pada tubuh serangga.

Trizelia (2005) menyatakan bahwa ditemukan korelasi antara habitat agen hayati dengan kemampuan patogenesisnya. Agen hayati seperti bakteri entomopatogen yang berada dalam habitat yang sama dengan inangnya biasanya mempunyai patogenesis yang lebih tinggi. Namun korelasi bakteri penghasil Kristal protein yang diisolasi dari rizosfer tanaman dan patogenesisnya terhadap hama *S. litura* belum ada dilaporkan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri p.k.p yang dapat mematikan larva *S. litura*.

METODE

Koleksi dan isolasi bakteri p.k.p

Bakteri p.k.p diisolasi dari tanah dengan cara mengambil tanah sekitar perakaran tanaman pada tanaman yang telah ditentukan (Tabel 1). Sampel tanah diambil secara diagonal, pengambilan tanah dilakukan dengan cara penggalian tanah pada kedalaman 10 - 15 cm dengan menggunakan sekop tangan kecil. Contoh tanah dimasukkan ke dalam kantong plastik dan dibawa ke laboratorium untuk diproses lebih lanjut.

Tabel. Lokasi pengambilan isolat bakteri p.k.p

| Kode | Asal Isolat | Lokasi |
|------|---------------------------------|---|
| RZKD | Rizosfer tanaman kedelai | Kec. 2 x 11 Enam Lingkung, Nag. Sungai Asam, Kab. Padang Pariaman |
| RZJG | Rizosfer tanaman jagung | Kec. Kuranji, Kota Padang |
| RZBM | Rizosfer tanaman bawang merah | Kec. Lembah gumanti, Nag. Alahan Panjang, Kab. Solok |
| RZKP | Rizosfer tanaman kacang panjang | Kec. Kuranji, Kota Padang |
| RZCB | Rizosfer tanaman cabai | Nag. Sungai Pua, Kab. Agam |
| RZKB | Rizosfer tanaman kubis | Nag. Sungai Pua, Kab. Agam |

Isolasi bakteri p.k.p menggunakan metode pengenceran seri yang dilaporkan oleh Nurwidiani (1991). Masing-masing tanah ditimbang dengan timbangan analitik sebanyak 1 gr. Selanjutnya sampel tanah disuspensikan ke dalam 10 ml akuadest steril dalam tabung reaksi dan dihomogenkan selama lima menit menggunakan vortex. Suspensi tersebut dipanaskan dengan panangas air pada suhu 80°C selama 10 menit, dengan tujuan untuk membunuh sel-sel vegetatif dan memecah dormansi spora. Selanjutnya dilakukan pengenceran serial sampai dengan pengenceran 10⁴. Masing-masing diambil 0,1 ml suspensi dari pengenceran 10³ dan 10⁴ menggunakan pipet mikro, lalu dipindahkan dengan metoda cawan tuang pada media Nutrient Agar (NA) dengan tiga kali ulangan. Cawan petri diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu ruang selama 2 x 24 jam untuk selanjutnya diidentifikasi.

Koloni yang menyerupai koloni *Bacillus* yaitu koloni yang berwarna putih susu hingga putih kekuningan, pinggir koloni tidak rata atau rata, permukaan kasar dan tidak berlendir (Hatmanti, 2000), dipindahkan dengan tusuk gigi steril ke permukaan media NA dalam cawan petri dengan cara ditotolkan. Satu cawan petri dapat memuat 5- 60 goresan bakteri.

Koloni bakteri diinkubasi selama 2 x 24 jam untuk selanjutnya diidentifikasi. Dari masing-masing koloni yang tumbuh dari hasil penggoresan dibuat lekapan basah lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Koloni yang memperlihatkan sel vegetatif berbentuk batang yang mengandung spora dan struktur lain di sebelah spora yang diduga sebagai bakteri penghasil Kristal protein (p.k.p).

Karakterisasi dan Fisiologi Morfologi Isolat Bakteri

Morfologi koloni

Koloni bakteri p.k.p umur dua hari yang ditumbuhkan pada media NA diamatinya morfologinya meliputi warna koloni, pinggir koloni, bentuk koloni, dan ada atau tidak adanya lendir. Morfologi bakteri yang berhasil diisolasi berwarna putih hingga kekuningan, pinggirnya rata atau tidak rata, berbentuk bulat hingga bulat tidak beraturan, serta tidak berlendir.

Uji gram

Uji gram bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri ini bersifat gram positif atau gram negatif. Pengujian dengan menggunakan metode Klemen *et al.*, (1990) yaitu dengan cara meneteskan larutan KOH 3 % di atas kaca objek kemudian diambil biakan bakteri yang berumur dua hari dengan jarum ose lalu dicampurkan dengan larutan KOH 3%. Apabila terjadi penggumpalan maka bakteri tersebut bersifat gram negatif, sebaliknya apabila tidak menggumpal maka bakteri tersebut bersifat gram positif.

Pewarnaan differensial

Pewarnaan ini bertujuan untuk mengetahui bentuk sel bakteri dan letak endosporanya. Pengujian ini dengan metoda yang disampaikan oleh Hadioetomo (1985). Dibuat preparat bakteri pada objek glass yang telah ditetesi dengan akuadest steril. Dilakukan fiksasi dengan melewati objek glass di atas api bunsen sebanyak tiga kali dan preparat dibiarkan mengering. Preparat digenangi dengan *methilen blue* dan dibiarkan selama 1 -2 menit. Kaca objek dipegang dengan pinset dan dimiringkan. Zat warna dibilas dengan akuadest steril sampai zat warna yang terkandung dalam akuadest steril yang mengalir dari kaca objek tersebut hanya tinggal sedikit. Air yang tersisa pada permukaan objek glass diserap dengan kertas serap. Setelah itu digenangi preparat dengan *fuchsin* dan dibiarkan selama 15 – 30 detik. Preparat dicuci kembali dengan akuadest steril dan dikeringkan kembali sisa akuadest seperti yang telah dilakukan sebelumnya. Objek glass ditutup dengan cover glass dan preparat

dapat diamati setelah ditetesi dengan minyak emersi. Sel vegetatif berwarna merah dan endospora berwarna biru.

Pengadaan larva

Larva *S. litura* diperoleh dari sentra pertanaman kubis di daerah Sungai Pua, Kab. Agam. Stadia larva yang diambil berkisar antara instar 3, 4 dan 5. Larva ini dipelihara dalam kotak dan stoples plastik yang ditutup dengan kain kasa dan diberi makan dengan potongan daun kubis dan diganti setelah 24 jam dengan daun yang baru.

Ketika larva memasuki stadia prapupa dengan warna coklat gelap, larva dipindahkan ke dalam kotak plastik yang telah diberi serbuk gergaji di dalamnya. Pupa dipindahkan ke dalam stoples plastik yang telah dialas dengan kertas saring dan ditutup dengan kurungan serangga yang bagian dalamnya diberi kertas putih sebagai peletakkan telur. Imago yang keluar dari pupa tersebut diberi makan dengan madu yang telah diencerkan 10 % lalu dicelupkan dengan kapas dan kapas tersebut digantungkan di atas kurungan.

Telur yang dihasilkan dan diletakkan oleh imago pada kertas diambil dengan cara menggunting kertas tersebut dan dipindahkan ke kotak yang dialas kertas saring lalu dipelihara sampai menetas. Larva yang telah menetas dipelihara sampai instar dua dan digunakan sebagai serangga uji pada penelitian. Makanan larva yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari tanaman kubis yang dijual di pasaran dan dicuci dengan bersih.

Uji Patogenesitas Isolat Bakteri p.k.p

Pembuatan suspensi isolat bakteri p.k.p

Isolat bakteri p.k.p yang sudah disimpan di dalam petridish diremajakan dengan metode gores pada media NA dan diinkubasi 2 x 24 jam. Isolat bakteri yang tumbuh dikikis menggunakan kuas halus yang telah ditambahkan 9 ml akuadest. Suspensi bakteri tersebut dipindahkan ke dalam tabung reaksi menggunakan pipet tetes, dihomogenkan dengan *vortex*, dan dibandingkan kekeruhannya dengan larutan McFarland's skala 8, jika kekeruhannya sama maka kepadatan populasi bakteri tersebut diperkirakan 10^8 sel/ml (Habazar *et al.*, 2007). Suspensi ditambahkan dengan Triton X100 sebanyak satu tetes dan siap diujikan pada larva *S. litura* instar dua.

Pengujian toksisitas bakteri p.k.p

Metode yang digunakan dalam pengujian toksisitas adalah metode yang dilaporkan oleh Nurwidiani (1991). Daun kubis dipotong dengan ukuran 5x 5 cm lalu direndam dalam suspensi spora selama lebih kurang lima menit dan dikeringanginkan. Sepuluh larva instar dua diletakkan dalam cawan petri beralaskan lap kertas, kemudian larva-larva tersebut diberi makan daun kubis yang telah direndam dalam suspensi spora. Sebagai kontrol daun kubis

direndam dengan akuadest steril yang ditambahkan satu tetes Triton X100 dan sebagai pembanding daun kubis direndam dengan insektisida Sipermetrin dengan dosis yang telah disesuaikan dengan petunjuk pemakaian di lapangan serta ditambahkan dengan satu tetes Triton X100. Mortalitas diamati setiap hari selama tujuh hari.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakter morfologi dan fisiologi isolat bakteri p.k.p

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi keenam isolat bakteri p.k.p yang meliputi pengamatan (warna koloni, pinggir koloni, bentuk koloni, elevasi dan ada atau tidak adanya lender) dapat dilihat pada Tabel 2, dan hasil pengamatan mikroskopis (bentuk sel dan letak endospora) dan uji fisiologis (uji gram) dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2. Bentuk makroskopis isolat bakteri p.k.p 2 x 24 hrs

| Isolat | Warna koloni | Pinggir koloni | Bentuk koloni | Elevasi | Lendir |
|--------|---------------------|-----------------------|---------------------------|------------------|--------|
| RZKD | Putih susu | Tidak rata (Undulate) | Tidak teratur (Irregular) | Cembung (Raised) | - |
| RZCB | Putih susu | Tidak rata (Undulate) | Tidak teratur (Irregular) | Cembung (Raised) | - |
| RZBM | Putih susu | Rata (Entire) | Tidak teratur (Irregular) | Cembung (Raised) | - |
| RZKP | Putih susu | Rata (Entire) | Tidak teratur (Irregular) | Cembung (Raised) | - |
| RZJG | Putih kekuningan | Rata (Entire) | Teratur (Sirkuler) | Cembung (Raised) | - |
| RZKB | Putih kekuningan | Rata (Entire) | Tidak teratur (Irregular) | Cembung (Raised) | - |

Tabel 3. Bentuk mikroskopis dan sifat fisiologis (uji gram KOH 3 %) isolat bakteri p.k.p 2 x 24 hrs.

| Isolat | Bentuk Sel | Reaksi Gram |
|--------|----------------|-------------|
| RZKD | Batang (Basil) | + |
| RZCB | Batang (Basil) | - |
| RZBM | Batang (Basil) | + |
| RZKP | Batang (Basil) | + |
| RZJG | Batang (Basil) | - |
| RZKB | Batang (Basil) | + |

Morfologi bakteri dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil pengamatan morfologi menunjukkan bahwa empat isolat bakteri berwarna putih susu dan dua isolat berwarna putih kekuningan. Dua isolat mempunyai pinggir koloni yang tidak rata dan empat isolat mempunyai pinggir koloni yang rata. Pada umumnya isolat mempunyai bentuk koloni yang tidak teratur kecuali satu isolat dengan bentuk koloni yang teratur. Semua isolat mempunyai elevasi yang cembung serta tidak berlendir. Sementara dari uji gram (KOH 3%) yang dilakukan, ada empat isolat yang menunjukkan reaksi yang positif dan dua isolat yang menunjukkan reaksi yang negatif. Hasil pengamatan mikroskopis pada perbesaran 1000 kali, memperlihatkan bahwa semua isolat bakteri yang didapat bentuk selnya adalah bertipe basil, mempunyai endospora dan letaknya subterminal, serta ada struktur lain di sebelah spora yang diduga sebagai Kristal protein.

Mortalitas larva S. litura

Hasil tabel sidik ragam dan uji lanjut DNMRT 5 % terhadap mortalitas larva *S. litura* yang diinokulasikan dengan beberapa isolat bakteri p.k.p menunjukkan hasil yang beragam (Tabel 4). Dari enam isolat yang digunakan, aplikasi isolat RZKD menunjukkan hasil yang lebih baik karena mampu menyebabkan mortalitas hingga 75 %. Sedangkan aplikasi isolat RZCA menyebabkan mortalitas paling rendah yaitu 37,5 % dan hasil ini berbeda tidak nyata dengan kontrol dengan nilai mortalitas 17,5 %. Perlakuan Sipermetrin menyebabkan mortalitas sebesar 100 %.

Tabel 4. Rata-rata mortalitas larva *S. litura* 7 hsa dengan beberapa isolat bakteri p.k.p

| Kode isolat | Mortalitas (%) | Peningkatan mortalitas (%) |
|-------------|----------------|----------------------------|
| Sipermetrin | 100,0 a | 82,50 |
| RZKD | 75,0 b | 76,67 |
| RZJA | 57,5 b c | 69,57 |
| RZBM | 57,5 b c d | 69,57 |
| RZKP | 50,0 c d e | 65,00 |
| RZKB | 42,5 c d e f | 58,82 |
| RZCA | 37,5 c d e f g | 53,33 |
| Kontrol | 17,5 g | - |

KK = 26 %

Angka pada lajur yang sama diikuti huruf kecil yang sama adalah berbeda tidak nyata menurut uji lanjut DNMRT taraf 5%.

Perkembangan laju mortalitas kumulatif larva *S. litura* yang mati setelah inokulasi beberapa isolat bakteri p.k.p sudah terlihat sejak satu hari setelah aplikasi (1 hsa). Pada aplikasi isolat RZKD larva mengalami peningkatan mortalitas yang signifikan pada hari ke dua dan mortalitas naik hingga 55% pada hari ke empat pengamatan dan meningkat hingga 75% pada hari ke tujuh. Sedangkan isolat yang lainnya mortalitas tujuh hari pengamatan berkisar antara 42,5 % - 57,5 %. Di sini terlihat kecenderungan bahwa aplikasi isolat RZKD lebih baik dibandingkan aplikasi isolat yang lain. Dibandingkan dengan perlakuan Sipermetrin kematian 100 % sudah terjadi pada hari ke tiga pengamatan.

Gejala luar yang ditunjukkan oleh larva *S. litura* yang terinfeksi oleh masing-masing isolat bakteri p.k.p menunjukkan gejala yang hampir sama, apabila dibandingkan dengan kontrol aktivitas larva untuk makan mulai berkurang setelah diaplikasikan dengan isolat bakteri p.k.p, gerakannya menjadi lambat dan kurang sensitif bila disentuh. Feses larva menjadi cair dan pada mulut mengeluarkan cairan hijau kekuningan. Saat kematian, tubuh larva berwarna coklat tua hingga kehitaman, melengkung, lama kelamaan tubuh menjadi lunak dan mengeluarkan bau busuk. Kemudian larva mengering dan menyusut dengan integumen yang masih utuh. Selain itu lama stadium larva juga lebih lama bila dibandingkan dengan kontrol.

Hasil analisis probit menunjukkan adanya variasi nilai LT_{50} bakteri p.k.p terhadap *S. litura* (Tabel 5). Perlakuan dengan menggunakan insektisida sipermetrin menunjukkan hasil yang terbaik dengan nilai LT_{50} sebesar 0,52 hari.

Sedangkan diantara isolat bakteri p.k.p yang digunakan menunjukkan bahwa isolat RZKD menunjukkan hasil yang lebih baik, dengan nilai LT_{50} lebih rendah bila dibandingkan dengan isolat yang lain, yaitu sebesar 4,71 hari. Sedangkan isolat RZCB menunjukkan nilai LT_{50} yang paling tinggi yaitu sebesar 11,49 hari.

Tabel 5. Nilai LT_{50} bakteri p.k.p terhadap *S. litura*

| Kode Isolat | Nilai LT_{50} (hari) |
|-------------|------------------------|
| Sipermetrin | 0,52 |
| RZKD | 4,71 |
| RZJG | 6,13 |
| RZBM | 6,86 |
| RZKP | 7,91 |
| RZKB | 11,46 |
| RZCB | 11,49 |

Persentase pupa yang terbentuk

Hasil tabel sidik ragam dan uji lanjut DNMRT 5% terhadap pupa *S. litura* yang terbentuk dengan perlakuan beberapa isolat bakteri p.k.p menunjukkan hasil yang berbeda tidak nyata terhadap isolat yang lain, namun berbeda nyata dengan kontrol (Tabel 6). Aplikasi isolat RZJG memperlihatkan hasil yang lebih baik diantara isolat yang lain, karena mampu menghambat pembentukan pupa dan hasil ini sama dengan aplikasi menggunakan insektisida sipermetrin.

Tabel 6. Persentase pupa *S. litura* yang terbentuk setelah diperlakukan dengan beberapa isolat bakteri p.k.p.

| Kode Isolat | Pupa terbentuk (%) \pm SD |
|-------------|-----------------------------|
| Kontrol | 75,0 \pm 12,91 a |
| RZBM | 5,0 \pm 5,77 b |
| RZKD | 5,0 \pm 5,77 b |
| RZCA | 2,5 \pm 5,00 b |
| RZKP | 2,5 \pm 5,00 b |
| RZKB | 2,5 \pm 5,00 b |
| RZJA | 0,0 \pm 0,00 b |
| Sipermetrin | 0,0 \pm 0,00 b |

Angka pada lajur yang sama diikuti huruf kecil yang sama adalah berbeda tidak nyata menurut uji lanjut DNMRT taraf 5%.

Untuk larva *S. litura* yang berhasil menjadi pupa, ada yang terbentuk normal dan ada yang terbentuk abnormal. Larva yang terbentuk normal bentuknya sempurna dimana warnanya cokelat kemerahan dan bagian ekornya bergerak apabila disentuh. Sedangkan pupa yang terbentuk abnormal, bentuk tubuhnya tidak sempurna dimana ukuran tubuhnya mengecil, permukaannya mengkerut, setengah tubuhnya memipih, tidak bergerak bila disentuh, berwarna cokelat kehitaman dan lama kelamaan tubuhnya menjadi lunak, mengeluarkan cairan bila ditekan dan berbau busuk.

Persentase imago yang terbentuk

Hasil tabel sidik ragam dan uji lanjut DNMRT 5% terhadap imago *S. litura* yang terbentuk dengan perlakuan beberapa isolat bakteri p.k.p menunjukkan hasil yang berbeda tidak nyata, namun berbeda nyata terhadap kontrol (Tabel 7). Pupa *S. litura* yang berhasil menjadi imago, ada yang terbentuk normal dan ada yang terbentuk abnormal. Imago yang terbentuk normal mempunyai bentuk tubuh yang sempurna dan tidak terdapat bagian tubuh yang rusak. Sebaliknya pada imago yang abnormal ada bagian tubuh seperti sayap yang mengalami kerusakan dan hal ini diduga akibat infeksi dari bakteri p.k.p tersebut.

Tabel 7. Persentase imago *S. litura* yang terbentuk setelah diperlakukan dengan beberapa isolat bakteri p.k.p.

| Kode isolat | Imago terbentuk (%) \pm SD |
|-------------|------------------------------|
| Kontrol | 75,0 \pm 12,91 a |
| RZBM | 5,0 \pm 5,77 b |
| RZKD | 5,0 \pm 5,77 b |
| RZCB | 2,5 \pm 5,00 b |
| RZKB | 2,5 \pm 5,00 b |
| RZJG | 0,0 \pm 0,00 b |
| Sipermetrin | 0,0 \pm 0,00 b |

Hasil isolasi bakteri p.k.p dari rizosfer beberapa jenis tanaman yang telah dilakukan, diperoleh empat isolat bakteri berwarna putih susu dan dua isolat berwarna putih kekuningan. Dua isolat mempunyai pinggir koloni yang tidak rata dan empat isolat mempunyai pinggir koloni yang rata. Pada umumnya isolat mempunyai bentuk koloni yang tidak teratur kecuali satu isolat dengan bentuk koloni yang teratur. Semua isolat mempunyai elevasi yang cembung serta tidak berlendir. Koloni ini diduga sebagai koloni *Bacillus* spp. karena sesuai dengan penelitian Hatmanti (2000) bahwa *Bacillus* spp. umumnya berwarna putih sampai kekuningan, tepi koloninya bermacam-macam tapi umumnya tidak rata, permukaannya kasar dan tidak berlendir.

Pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa semua isolat bakteri berbentuk batang, mempunyai endospora dan struktur lain di sebelah endospora yang diduga sebagai Kristal protein. Reaksi yang ditimbulkan dari uji gram (KOH 3%), empat isolat memberikan reaksi yang positif dan dua isolat memberikan reaksi yang negatif. Walaupun pada umumnya *Bacillus* spp merupakan kelompok bakteri gram negatif, tapi menurut Gordon (1989) (di dalam Aditya, 2006), menyatakan bahwa ada *Bacillus* yang bersifat gram positif yaitu *Bacillus popilliae* dan *Bacillus lentimorbus*. Ditambahkan oleh Schaad (1997), bahwa *Bacillus* spp. tidak selalu gram positif. Kita tidak dapat bergantung sepenuhnya pada pewarnaan gram untuk identifikasi *Bacillus* spp.

Bakteri p.k.p yang diisolasi dari rizosfer beberapa jenis tanaman semuanya berbentuk batang, ramping atau tidak membengkak serta memiliki

endospora yang letaknya subterminal. Di dalam sel atau disebelah endospora terdapat struktur lain yang diduga sebagai tubuh paraspora (Kristal protein). Sneath (1986) (di dalam Nurwidiani, 1991) menyatakan bahwa ada tiga jenis *Bacillus* yang menghasilkan tubuh paraspora (Kristal protein) yaitu *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus popilliae* dan *Bacillus fibourgensis*. Pada *B. popilliae* dan *B. fibourgensis* pembentukan spora menyebabkan sel vegetatifnya menjadi bengkak sehingga tampak seperti telapak sepatu. Selain itu keduanya merupakan patogen obligat (Darwis, 1995). Ditambahkan oleh Sembel (2010), *B. popilliae* adalah bakteri patogen yang menyebabkan penyakit susu pada larva jenis kumbang Scarabidae. Bakteri p.k.p diisolasi dari tanah maka bakteri ini bukanlah patogen obligat. Serta larva yang digunakan berasal dari ordo Lepidoptera dan bentuk selnya yang tidak membengkak, maka bakteri ini diduga sebagai *B.thuringiensis*.

Perlakuan beberapa isolat bakteri p.k.p pada kerapatn populasi 10^8 sel/ml terhadap larva *S. litura* menyebabkan mortalitas dengan hasil yang beragam. Aplikasi isolat bakteri RZKD ternyata lebih baik atau efektif dalam menyebabkan mortalitas dibandingkan isolat bakteri yang lainnya. Secara keseluruhan mortalitas *S. litura* yang diaplikasikan dengan beberapa isolat bakteri p.k.p berkisar antara 37,5% - 75%. Larva yang mati pada kontrol tidak ada yang menunjukkan gejala kematian akibat bakteri, sehingga dapat dikatakan bahwa larva yang mati bukan disebabkan oleh bakteri namun disebabkan oleh kondisi lingkungan.

Perbedaan toksisitas antar isolat diduga disebabkan oleh strain serta bentuk atau tipe Kristal protein yang dihasilkan oleh masing-masing isolat. Tyrell *et al.*, (1981) (di dalam Trizelia, 1994) menyatakan bahwa Kristal protein mempunyai beberapa bentuk yaitu bipiramida yang pada umumnya toksik terhadap Lepidoptera, kubus, oval dan amorf yang umumnya toksik terhadap Diptera. Sejalan dengan pendapat Hofte dan Whiteley (1989) menyatakan bahwa Kristal protein yang termasuk kedalam golongan Cry I secara umum toksik terhadap Lepidoptera, sedangkan untuk golongan yang berbeda maka Kristal protein tersebut juga mempunyai serangga target yang berbeda. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat bentuk Kristal protein dari isolat bakteri p.k.p yang telah diisolasi sehingga dapat dilihat korelasi antara bentuk Kristal dengan daya toksiknya terhadap larva *S. litura*.

Banyak faktor yang mempengaruhi kemampuan membunuh dari entomopatogen seperti spesies entomopatogen, suhu, kelembapan, tanah tempat hidup serta jenis serangga yang diujikan (Benz, 1987 dalam Ramadhan dan Hernowo, 2012). Tanaman kedelai yang kaya akan protein akan mengeluarkan eksudat berupa protein yang diduga bisa dimanfaatkan untuk menambah daya toksik Kristal protein dari bakteri p.k.p tersebut. Selain itu serangga yang diujikan berasal dari ordo Lepidoptera. Menurut Chapman

(1982), pH saluran pencernaan Lepidoptera berkisar antara 8 – 10. Serangga tipe ini akan mati dengan adanya Kristal protein dan efeknya akan bertambah dengan adanya spora. Hofte dan Whiteley (1989) menambahkan bahwa spesifisitas toksin *B. thuringiensis* ditentukan oleh keadaan usus larva yang mempengaruhi kelarutan atau pemecahan protoksin serta ditentukan juga oleh adanya situs pengikatan yang spesifik dalam usus tiap-tiap serangga. Akan tetapi karena pada penelitian ini hanya digunakan satu jenis serangga saja, yaitu *S. litura*, maka faktor-faktor ini belum dapat disamakan.

Bakteri p.k.p merupakan bakteri yang bersifat racun pencernaan, sehingga efektivitasnya dalam menekan populasi *S. litura* terjadi saat serangga dalam fase larva. Pada fase ini, serangga melakukan aktivitas memakan daun tanaman sehingga bakteri yang menempel pada daun bisa masuk ke dalam saluran pencernaan. Kerusakan saluran pencernaan akan menyebabkan metabolisme menjadi terganggu dan larva akan kekurangan energi untuk melengkapi metabolisme tubuhnya agar bisa berganti kulit dan bermetamorfosis (Tanada dan Kaya, 1993).

Selain mortalitas larva, efektivitas bakteri juga terlihat dari nilai LT_{50} dan nilai peningkatan mortalitasnya. Dari penelitian diketahui bahwa isolat RZKD mempunyai nilai LT_{50} yang paling rendah dan nilai peningkatan mortalitas yang paling tinggi dibandingkan dengan isolat yang lain. Untuk membunuh 50% dari populasi serangga uji, isolat bakteri tersebut mempunyai waktu yang paling cepat. Semakin rendah nilai LT_{50} maka isolat bakteri tersebut akan semakin efektif. Tanada dan Kaya (1993) menyatakan bahwa nilai LT_{50} yang lebih singkat menunjukkan tingginya patogenesis atau virulensi patogen dan sebaliknya, nilai LT_{50} yang panjang menunjukkan rendahnya tingkat patogenesis. Isolat bakteri lain membutuhkan waktu antara 6 – 11 hari untuk membunuh serangga uji. Perbedaan waktu mematikan diduga disebabkan oleh perbedaan strain bakteri. Menurut Hasinu (2009), perbedaan waktu mematikan dan jumlah mortalitas disebabkan oleh adanya perbedaan strain bakteri. Bakteri yang diisolasi dari tempat yang berbeda akan mempunyai varietas yang tidak sama sehingga akan terlihat aktivitas yang berbeda walaupun jenis inangnya sama.

Dari pengamatan yang telah dilakukan, kematian larva yang diperlakukan dengan masing-masing isolat bakteri p.k.p sudah ada sejak hari pertama pengamatan, yaitu satu hari setelah aplikasi. Hal tersebut diduga karena Kristal protein yang telah dimakan oleh larva *S. litura* melalui pakan langsung bereaksi di dalam saluran pencernaan. Sesuai dengan pernyataan Maddox (1982) di dalam Trizelia (1994), bahwa Kristal protein yang termakan oleh larva serangga akan menyebabkan kerusakan pada struktur saluran pencernaan yaitu membran peritrofiknya menjadi hancur yang diikuti dengan

kerusakan pada sel-sel epitelium dan kematian akan terjadi satu jam hingga 4 - 5 hari setelah intoksisasi.

Gejala yang timbul setelah larva *S. litura* memakan Kristal protein bakteri p.k.p adalah konsumsi pakannya menjadi berkurang, gerakannya menjadi lambat dan kurang sensitif bila disentuh. Feses larva menjadi cair dan pada mulut mengeluarkan cairan hijau kekuningan sampai hijau pekat. Saat kematian, tubuh berwarna cokelat tua hingga kehitaman, melengkung, lunak dan mengeluarkan bau busuk. Penelitian ini sekaligus mengkonfirmasi pernyataan Tanada dan kaya (1993) yang menyatakan bahwa infeksi entomopatogen dapat menurunkan aktivitas makan larva. Rendahnya laju konsumsi juga diikuti dengan perubahan perilaku dari serangga uji, dimana pada kelompok kontrol, serangga uji terlihat normal, aktif dan reaktif jika ada gangguan. Serangga-serangga uji dari kelompok yang diberikan perlakuan menunjukkan perilaku yang lebih pasif dan kurang reaktif terhadap gangguan.

Lama stadium larva pada perlakuan berlangsung lebih lama dibandingkan dengan kontrol. Untuk larva yang berhasil menjadi pupa, lama stadium larvanya antara 28 – 30 hari setelah aplikasi, sedangkan pada kontrol antara 18 – 19 hari setelah aplikasi. Menurut Khaerudin (1996), total daur hidup ulat grayak rata-rata 32 hari, dengan stadium larvanya 20 - 25 hari. Trizelia (1994) menyatakan bahwa lebih lamanya stadium larva yang mendapat perlakuan *B. thuringiensis* diduga karena terjadinya penghambatan aktivitas makan larva sehingga pertumbuhan larva menjadi lambat dan ketersediaan hormon juvenile berlangsung lebih lama, sehingga sifat-sifat larva lebih lama bertahan.

Persentase mortalitas larva sangat berpengaruh terhadap persentase pupa yang terbentuk dan secara langsung juga mempengaruhi persentase pembentukan imago. Pada penelitian ini, didapatkan bahwa isolat RZJG dapat menghambat pembentukan pupa. Artinya isolat RZJG lebih baik diantara isolat yang lain walaupun secara statistik berbeda tidak nyata. Persentase pembentukan pupa untuk isolat yang lain berkisar antara 2,5% – 5%, sedangkan kontrol nilai persentase pembentukan pupa sebesar 75%.

Rendahnya persentase pupa yang terbentuk pada semua isolat bakteri disebabkan karena banyaknya larva yang mati serta prapupa yang tidak berhasil menjadi pupa. Terganggunya metabolisme tubuh larva akibat toksin dari Kristal protein yang dihasilkan bakteri tersebut menyebabkan larva kekurangan energi untuk masuk stadium pupa. Tanada dan Kaya (1993) menyatakan bahwa efek toksin yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis* akan mengganggu proses transkripsi RNA, sehingga mengganggu pembelahan sel khususnya selama pergantian kulit dan proses metamorphosis. Jika larva tidak mati oleh toksin, maka pupa akan terbentuk tidak normal (cacat). Ciri-ciri pupa yang tidak normal yaitu bentuk tubuhnya mengecil, permukaannya mengkerut,

warnanya menghitam, setengah tubuhnya memipih, ruas abdomennya tidak melekat satu sama lain, pembentukan dari prapupa ke pupa yang tidak sempurna, tidak bergerak bila disentuh, dan lama kelamaan tubuh menjadi lunak dan mengeluarkan cairan bila ditekan.

Rendahnya persentase pupa yang terbentuk serta adanya pupa yang tidak berhasil menjadi imago akan berpengaruh terhadap persentase pembentukan imago. Imago yang terbentuk ada yang normal dan juga yang tidak normal. Imago yang tidak normal bagian sayapnya terbentuk tidak sempurna sehingga mengalami gangguan untuk terbang dan bertahan hidup serta bentuk tubuhnya lebih kecil dibandingkan dengan imago yang lain. Hal ini diduga adanya pengaruh atau efek lanjutan dari delta endotoksin (Kristal protein) yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Toksin yang dihasilkan oleh entomopatogen dapat merusak secara langsung fungsi utama tubuh dalam pembentukan hormon yaitu hormon pergantian dan pembentukan kulit, akibatnya proses pembentukan kulit baru pada saat menjadi imago tidak berjalan sempurna sehingga tidak mampu bertahan hidup lebih lama (Samsinokova, 1968 dalam Kurnia, 1998). Tanada dan Kaya (1993) menyatakan bahwa selain mengganggu pembentukan pupa, efek toksin juga akan mengganggu pembentukan jaringan pada imago, seperti pertumbuhan yang tidak normal pada antenna, sayap, kaki atau bagian mulut dan efek lainnya adalah serangga menjadi infertile (tidak subur).

PENUTUP

Pengujian toksisitas isolat bakteri penghasil Kristal protein (p.k.p) memperlihatkan bahwa isolat bakteri p.k.p yang diisolasi dari rizosfer tanaman kedelai memberikan hasil yang lebih baik, yakni menyebabkan mortalitas sebesar 75% dengan nilai LT_{50} sebesar 4,71 hari dan peningkatan mortalitas sebesar 76,67%. Aplikasi isolat bakteri p.k.p dari rizosfer tanaman dapat menghambat pembentukan pupa dan imago.

REFERENCES

- Aditya, R. (2006). Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Rizosfer untuk Mengendalikan Penyakit Layu Bakteri pada Kacang yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* [Skripsi]. Program Sarjana Pertanian Fakultas Pertanian Institute Pertanian Bogor. Bogor.
- Arzal. (2003). Patogenesitas Isolat *Bacillus turingiensis* Barliner yang Berasal dari larva Noctuidae (Lepidoptera) Terhadap Hama Ulat Grayak *Sporoptera litura* [Tesis]. Program Pascasarjana Universitas Andalas Padang. Padang.

- Badan Pusat Statistik. (2012). Sumatera Barat dalam Angka. Badan Statistik. Padang
- Chapman, R.F. (1982). *The Insects: Structure and Function*. Harvard University Press.
- Darwis, W. (1995). *Bacillus thuringiensis* Asal Bengkulu, Riau dan Sumatera Barat Beserta Penetapan Serotipenya [Tesis]. Program Pascasarjana Institute Pertanian Bogor. Bogor.
- Departemen Pertanian. (2005). Ulat Grayak. http://www.deptan.co.id/ditlinhorti/opt/bw_merah/ulat_grayak.htm.
- Habazar, T dan Yaherwandi. (2006). Pengendalian Hayati Hama dan Penyakit Tumbuhan. Andalas University Press. Padang.
- Habazar, T., Nasrun., Jamsari., dan I. Rusli. (2007). Pola Penyebaran Penyakit Hawar Daun Bakteri (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Allii*) pada Bawang Merah dan Upaya Pengendaliannya Melalui Imunisasi Menggunakan Rizobakteria. Laporan hasil Penelitian: Padang.
- Hadioetomo, R.S. (1985). Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. Gramedia. Jakarta.
- Hasinu, J.V. (2009). Isolasi dan Uji Patogenesitas *Bacillus thuringiensis* Terhadap *Crocidolomia binotalis* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae). Jurnal Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Pattimura. 5: 84-88.
- Hatmanti, A. (2000). Pengenalan *Bacillus* spp. Jurnal Balitbang Lingkungan Laut. Puslitbang Oseanologi-LIPI. Jakarta. 31-41.
- Hofte, H., and H.R. Whiteley. (1989). Insecticidal Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Rev. 53(2): 242-255.
- Jumar. (1997). Entomologi Pertanian. Penerbit Rineka Cipta. Jakarta. 237 hal.
- Khairudin. (1996). Mengendalikan Hama dan Penyakit Kacang-kacangan. Trubus Agrisarana: Jakarta.
- Klement, Z., K. Rudolph., and D.C. Sand. (1990). Methods in Phytobacteriology. Akademia Kiado: Budapest. Hungary.
- Kurnia, D. (1998). Efektivitas *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin dan *Metharizium anisopliae* (Metchnicoff) Sorokin serta Kombinasi Keduanya Terhadap larva *Spodoptera litura* Fabricus (Lepidoptera: Noctuidae) [Skripsi]. Sarjana Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Padang. 45 hal.

- Nurwidiani. (1991). Isolasi *Bacillus thuringiensis* dan Pengujian Toksisitasnya Terhadap Larva *Plutella xylostella* [Skripsi]. Program Sarjana Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- Ramadhan, T.H., dan Hernowo, K. (2012). Isolasi Entomopatogen lahan Gambut di Kalimantan Barat dan Determinasi Virulensinya Sebagai Material Bioinsektisida. Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Tanjungpura: 51-57.
- Schaad, N.W. (1997). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- Sembel, D.T. (2010). Pengendalian Hayati Hama-hama Serangga Tropis dan Gulma. Andi Offset. Yogyakarta.
- Tanada, Y., and H.K. Kaya. (1993). Insect Pathology. Academic Press, San Diego, California.
- Trizelia. (1994). Infeksi *Bacillus thuringiensis* Berliner pada Larva *Heliothis armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) dan Pengaruhnya Terhadap Konsumsi Polong Kedelai [Tesis]. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Trizelia. (2005). Cendawan Entomopatogen *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes): Keragaman Genetik, Karakterisasi Fisiologis, dan Virulensinya terhadap *Crocidolomia pavonana* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) [Disertasi]. Institute Pertanian Bogor. Bogor.
- Untung, K. (2010). Diktat Dasar-dasar Ilmu Hama Tanaman. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.