

EFEKTIVITAS CAMPURAN PROTOKSIN *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *AIZAWAI* DAN *KONIDIA BEAUVERIA BASSIANA* TERHADAP ULAT GRAYAK *SPODOPTERA LITURA* F.

Eka Sukmawati*

*)Dosen Tetap Non-PNS Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Aluddin Makassar

Abstract: Armyworm or (*Lepidoptera:Noctuidae*) is one of main pest in plant crop. This pest might cause damage on the leaves and stems and reduce of crop production. *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and *Beauveria bassiana* have been known as biocontrol agent to this pest. This research was aimed to observe the production time of *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* toxin, measure the effect of toxin against *Be. bassiana* conidia, to test the activity of their mixture against *S. litura*. *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* was grown on specific medium for *B. thuringiensis*. Toxin production of the isolate was measured every 4 hours up to 48 hours incubation. *Be. bassiana* was grown on the white rice medium and its conidia was grown on the Potato Dextrose Agar medium. containing toxin. The activity test was done by spraying them to *S. litura* larvae. The stationary phase of *B. thuringiensis* was obtained at 16 hours incubation and the maximal toxin production at 48 hours.. The highest mortality caused the mixture of toxin *thuringiensis* and conidia *Be. bassiana* was 96,7%.

Key words: *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Beauveria bassiana*, toxin, mortality, *Spodoptera litura*..

I. PENDAHULUAN

Seperguruan hama merupakan salah satu faktor penghambat dalam usaha peningkatan produksi pertanian baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Grayak (*Spodoptera litura*) merupakan salah satu jenis hama penting yang menyerang tanaman palawija dan sayur-sayuran. Grayak bersifat polifag dan menyebabkan defoliiasi daun tanaman (Rao *dkk.* 1993). Hama ini menyerang berbagai macam tanaman penting yang bersifat ekonomis seperti beras, kentang, tembakau, tomat, jagung, cabai, kubis, padi, tebu, buncis, jeruk, bawang merah, terung, kacang-kacangan (kedelai, kacang tanah), kangkung, bayam, pisang, tanaman hias juga gulma *Limnocharis* sp., *Passiflora foetida*, *Ageratum* sp.,

Cleome sp., *Clibadium* sp., dan *Trema* sp. (Dirjen Perlindungan Tanaman Pangan 2012). Selain di Indonesia, grayak ditemukan di India, Pakistan, Banglades, Sri Lanka, China, Australia, Kepulauan Pasifik, Hawaii, dan Fiji (Hill 1993).

Hama *S. litura* menyerang tanaman budidaya pada fase vegetatif dan generatif. Pada fase vegetatif larva memakan daun tanaman yang muda sehingga tinggal tulang daun saja dan fase generatif dengan memakan polong-polong muda. Serangan *S. litura* menyebabkan kerusakan sekitar 12,5% dan lebih dari 20% pada tanaman umur lebih dari 20 hari setelah tanam. Serangan berat akan menyebabkan tanaman mati (Hennie dkk. 2003).

Usaha pengendalian oleh petani selama ini ialah dengan menggunakan insektisida kimia. Pengendalian hama dengan insektisida kimia dapat menimbulkan banyak masalah lingkungan antara lain resistensi hama terhadap insektisida kimia meningkat, ledakan populasi serangga hama sekunder, resiko keracunan pada manusia dan hewan ternak, air tanah terkontaminasi, biodiversitas menurun dan bahaya lain yang berkaitan dengan lingkungan (Soetopo dan Indrayani 2007). Masalah-masalah yang tersebut memicu penemuan alternative penanggulangan hama yang ramah lingkungan sehingga kerusakan lingkungan secara umum dapat dihindari sehingga konsep pertanian ekologi atau pertanian berkelanjutan dapat diwujudkan.

Salah satu bioinsektisida asal mikroorganisme yang telah digunakan di beberapa negara yaitu *Bacillus thuringiensis*. Bakteri ini termasuk bakteri Gram positif yang menghasilkan kristal inklusi pada saat bersporulasi yang terdiri atas satu atau lebih protein insektisidal yang dikenal sebagai δ -toksin atau protein Cry (Boncheva dkk. 2006). Protein Cry mempunyai kisaran spektrum yang sempit dan spesifik pada serangga dari ordo Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, dan Hymenoptera (Scheneopf dkk. 1998). Salah satu alternatif pengendalian hama yang cukup potensial ialah menggunakan patogen serangga seperti cendawan *Beauveria bassiana* yang merupakan fase anamorf dari *Cordyceps bassiana*. Cendawan ini memiliki kisaran inang serangga yang sangat luas, meliputi ordo Lepidoptera, Coleoptera, dan Hemiptera. Selain itu, infeksiya juga sering ditemukan pada serangga-serangga Diptera maupun Hymenoptera (Soetopo dan Inrayani 2007). dan Indrayani 2007).

Campuran *B. thuringiensis* dan cendawan insektisida seperti *Be. Bassiana* dapat dijadikan strategi untuk mengatasi masalah hama yang lebih kompleks dan meningkatkan aktivitas insektisida baik secara langsung maupun tidak langsung (Navon 2003). Kerja sinergis keduanya dapat menekan populasi *Colorado potato beetle* pada tanaman tomat, *Ostrinia nubilalis*, dan serangga Lepidoptera (Lewis

etal. 1996; Wright dan Ramos 2005; Rukmini *dkk.* 2000 dalam Ma *dkk.* 2008). Penelitian ini bertujuan efektivitas campuran protoksin *B. thuringiensis* dan *Be. bassiana* terhadap ulat grayak *Spodopteral litura* F.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Grayak (*Spodoptera litura*)

Grayak termasuk dalam ordo Lepidoptera, famili Noctuidae. Sayap ngengat bagian depan berwarna coklat atau keperakan, dan sayap belakang berwarna keputihan dengan bercak hitam. Telur berbentuk hampir bulat dengan bagian dasar melekat pada daun, berwarna coklat kekuningan, diletakkan berkelompok masing-masing 25-500 butir. Telur diletakkan pada bagian daun atau bagian tanaman lainnya. Kelompok telur tertutup bulu seperti beludru yang berasal dari bulu-bulu tubuh bagian ujung ngengat betina, berwarna kuning kecoklatan. Larva mempunyai warna yang bervariasi, memiliki kalung berwarna hitam pada segmen abdomen keempat dan kesepuluh. Pada sisi lateral dorsal terdapat garis kuning. Ulat yang baru menetas berwarna hijau muda, bagian sisi coklat tua atau hitam kecoklatan dan hidup berkelompok (Marwoto dan suharson, 2008).

Ulat grayak tersebar luas di beberapa negara seperti Jepang, Cina, Mesir, India, rilanka, Filipina, Thailand, dan Indonesia. Daerah penyebaran hama ini di Indonesia meliputi Jawa Barat, Jawa Timur, Sulawesi Selatan, dan Sumatera Selatan (Marwoto *dkk.* 2005). Kisaran tanaman inang ulat grayak sangat beragam meliputi cabai, kubis, padi, jagung, tomat, tebu, buncis, jeruk, tembakau, bawang merah, terung, kentang, kacang-kacangan (kedelai, kacang tanah), kangkung, bayam, pisang, dan tanaman hias. Hama ini juga menyerang berbagai gulma seperti *Limnocharis* sp., *Cleome* sp., *Clibadium* sp., *Passiflora foetida*, *Ageratum* sp., dan *Trema* sp. (Marwoto dan Suharsono 2008).

B. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis telah dikenal sebagai agen biokontrol sejak tahun 1950-an. Bakteri ini tersebar di hampir seluruh penjuru dunia. Perbedaan *B. thuringiensis* dengan spesies *Bacillus* lainnya yaitu produksi protein kristalin yang bersifat toksik pada berbagai invertebrata khususnya pada serangga. Protein ini sering disebut δ - endotoksin merupakan protoksin yang jika larut dalam usus serangga akan berubah menjadi polipeptida yang lebih pendek dengan berat molekul berkisar dari 25 sampai 140 kDa (Bobrowski *dkk.* 2002).

Gen protein insektisida ini telah diidentifikasi dan dibagi menjadi dua jenis, gen *cry* untuk kristal dan gen *cyt* untuk sitolitik (Hofte dan Whitely 1989). Lereclus *dkk.* (1993) mengusulkan suatu sistem tata nama dan klasifikasi δ - endotoksin berdasarkan sifat insektisidalnya serta hubungan molekulernya menjadi empat kelas utama δ - endotoksin (Cry I, II, III dan IV) serta sitolisin (Cyt). Secara umum protein-protein tersebut bersifat toksik pada jenis serangga tertentu. Cry I toksik terhadap Lepidoptera, Cry II toksik terhadap Lepidoptera dan Diptera, Cry III toksik terhadap Coleoptera, Cry IV toksik terhadap Diptera dan Cyt sitolitik terhadap serangga. Secara morfologi, protein Cry dikelompokkan menjadi lima yaitu bentuk bipiramid ditemukan pada protein Cry I, kuboid ditemukan pada protein Cry II, amorfus komposit pada protein Cry IV dan Cyt dan bentuk batang ditemukan pada protein Cry III (Lopez dan Ibarra 1996).

C. Cendawan Entomopatogen *Beauveria bassiana*

Secara taksonomi *Beauveria bassiana* termasuk dalam filum Deuteromycota, kelas Hypomycetes, ordo Moniliales dari family Clavicipitaceae (U.S Environmental Protection Agency 2006). Cendawan ini mempunyai kisaran inang serangga yang sangat luas meliputi ordo Lepidoptera, Coleoptera dan Hemiptera. Infeksi cendawan ini ditemukan pada serangga-serangga Diptera maupun Hymenoptera (Soetopo dan Indrayani 2007). *Beauveria bassiana* dapat diisolasi dari bangkai serangga maupun tanah karena tanah merupakan tempat terbaik untuk propagul infeksiif dan bertahan hidup dalam bentuk konidia atau hifa saprofit. Cendawan ini akan melakukan dormansi jika kondisi lingkungan tidak menguntungkan dan aktif apabila mendapatkan inang yang cocok untuk diinfeksi (Dhuyo dan Naheed 2008). Serangga inang utama *Be. Bassiana* antara lain kutu pengisap (aphid), kutu putih (*Whitefly*), belalang, hama pengisap, lalat, kumbang, ulat, thrips, tungau dan beberapa spesies uret. Habitat tanamannya mulai dari kedelai, sayur-sayuran, kapas, jeruk, buah-buahan, tanaman hias, hingga tanaman hutan (Soetopo dan Indrayani 2007).

Beassiana memproduksi toksin beauvericin yang menyebabkan gangguan pada fungsi hemolimfa dan nukleus serangga. Spesies *Be. Bassiana* juga dapat menginfeksi serangga melalui inokulasi atau kontaminasi pangan (Soetopo dan Indrayani 2007). Konidia yang telah berkecambah membentuk tabung kecambah dengan mengambil makanan dari integumen serangga, setelah itu menembus integument dan masuk ke dalam hemosel. Cendawan membentuk tubuh hifa yang kemudian ikut beredar dalam hemolimfa dan membentuk hifa sekunder untuk menerang jaringan lain seperti jaringan lemak, sistem syaraf, trakea dan saluran pencernaan. Konidia berkembang dalam saluran pencernaan dalam waktu 72

jam, setelah itu hifa melakukan penetrasi pada dinding usus sekitar 60-72 jam. Kerusakan saluran pencernaan terjadi dengan hancurnya pencernaan, kemudian masuk ke hemosel dan mengubah pH hemolimfa, setelah itu serangga akan kehabisan nutrisi dan mati (Tanada dan Kaya 1993).

III. METODOLOGI

1. Penentuan Kurva Tumbuh dan Produksi Kristal Protoksin *B. thuringiensis*

Isolat *B. thuringiensis* diinkubasi pada 250 ml medium pertumbuhan *B. Thuringiensis* (Atlas 1997) pada suhu 37 °C dengan kecepatan 120 rpm. Setiap 4 jam dilakukan pengambilan kultur sebanyak 10 ml untuk dilakukan pengukuran absorbansi sel pada panjang gelombang 600 nm yang berlangsung sampai 48 jam.

2. Pewarnaan Morfologi Kristal (Fadel dkk. 1988)

Biakan bakteri dibuat prepat dengan cara mengoleskan satu ose biakan pada objek gelas dan diwarnai dengan larutan *Commasie Brilliant Blue* selama tiga menit, kemudian dibilas dengan air mengalir, dan diamati dibawah mikroskop cahaya dengan minyak emersi tanpa gelas penutup.

3. Produksi Protoksin *Bacillus thuringiensis* (Ma dkk. 2008)

Koloni *B. thuringiensis* diinokulasi ke dalam media pertumbuhan dan diinkubasi pada suhu 28 °C selama waktu optimum pembentukan protoksin kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 g 4 0C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci empat kali dengan akuades steril. Pelet disimpan dalam bufer alkalin (bufer Glisin - NaOH, pH 10,5) pada suhu 28 °C selama 1 jam sampai protein kristal terlarut kemudian disentrifugasi 8000 g selama 15 menit. Supernatan dikumpulkan dan pH diatur menjadi 5-6 dengan penambahan 1 M HCl dan disimpan selama semalam pada suhu 4 °C untuk mengendapkan protoksin. Protoksin yang telah mengendap kemudian dikumpulkan dengan sentrifugasi dan dicuci tiga kali dengan akuades. Protoksin yang dipakai untuk pengujian diproduksi pada jam ke-24 dan-48. Kadar protoksin diukur dengan metode Bradford dan menggunakan *bovine serum albumin* sebagai standar (Bobrowski dkk. 2002).

4. Penyiapan Isolat *Be. bassiana*

Cendawan *Be. bassiana* ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar*(PDA) yang mengandung kloramfenikol dengan konsentrasi 250 mg dalam 500 ml media dan diinkubasi selama 14 hari pada suhu ruang untuk bersporulasi.

5. Media Kultur Beras

Media kultur beras (MKB) disiapkan dengan cara merendam beras yang telah dicuci selama 6 jam, ditiriskan kemudian dimasukkan dalam kantong plastic dan ditutup dengan sumbat kapas. Selanjutnya, MKB disterilisasi selama 15 menit.

6. Produksi Konidia *Be. bassiana*

Inokulum cendawan ditambahkan ke dalam MKB yang telah disiapkan. Selanjutnya MKB diinkubasi selama 14 hari pada suhu ruang untuk memproduksi konidia. Inokulum diperiksa setiap dua hari sekali sambil diaduk-aduk dengan menggoyang-goyangkannya. Suspensi konidia dibuat dengan mengambil konidia dari permukaan media dengan cara digoyang dengan pelan dalam larutan Tween 80 0,2% dalam akuades steril dan dihomogenkan. Suspensi konidia dibuat berseri 10^7 dan 10^8 konidia ml^{-1} (Hasyim *dkk.* 2005).

7. Pengujian Protoksin *B. thuringiensis* terhadap Konidia *Be. bassiana*.

Pengujian protoksin terhadap konidia dilakukan dengan dengan mencampurkan 1 ml protoksin kedalam 20 ml PDA yang mengandung kloramfenikol dengan konsentrasi 250 mg dalam 500 ml PDA. Kemudian sebanyak 1 ml suspensi cendawan *Be. Bassiana* diinokulasikan di atas media tersebut. Perhitungan jumlah koloni dan konidia yang dihasilkan dilakukan setelah 15 hari perlakuan.

8. Uji Antagonis *B. thuringiensis* dan Protoksin terhadap *Be. bassiana*

Uji antagonis *B. thuringiensis* terhadap *Be. Bassiana* dilakukan dengan uji antagonis koloni *B. thuringiensis* terhadap koloni *Be. Bassiana*. Uji protoksin dengan metode difusi cakram kertas terhadap koloni *Be. bassiana*. Uji antagonis koloni tunggal dilakukan dengan menggoreskan isolat *B.thuringiensis* pada cawan yang berisi media PDA. Kemudian inokulum *Be.bassiana* diinokulasikan disamping goresan isolat *B. thuringiensis* dengan jarak 1cm. Pengamatan antagonisme dilakukan setelah masa inkubasi 2 minggu. Uji difusi cakram kertas dilakukan dengan meneteskan protoksin sebanyak 0,1 ml pada kertas cakram kosong dan ditunggu sampai kering. Kemudian kertas cakram diletakkan diatas media PDA yang telah diinokulasikan 0,1 ml konidia *Be.bassiana*. Pengamatan dilakukan setelah 2 minggu masa inkubasi.

9. Pengujian Efektivitas Insektisida

Insektisida kombinasi *B. thuringiensis* dan *Be. Bassiana* dibuat dengan perbandingan yang sama, yaitu 50 ml protoksin dicampurkan dengan 50ml suspensi *Be. bassiana*. Setiap insektisida disemprotkan sebanyak 5 kalisespro

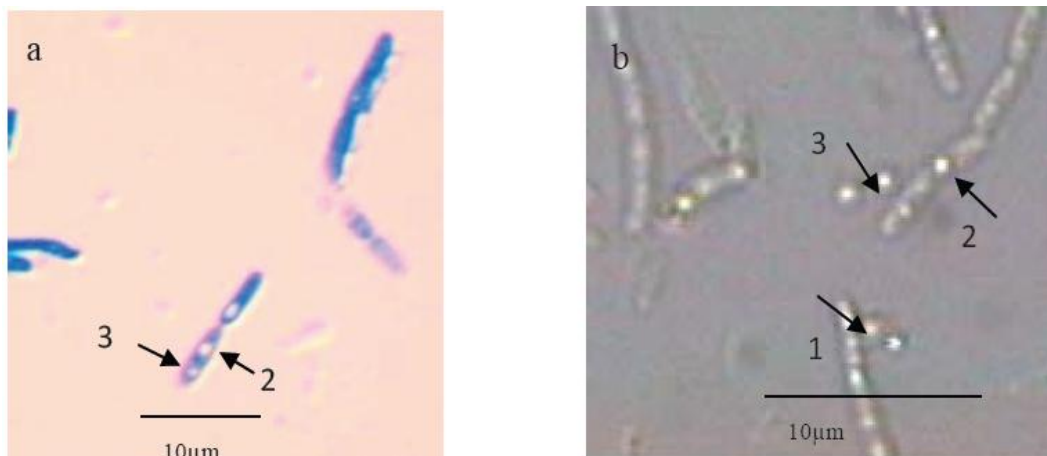
untuk setiap larva. Perlakuan dibagi menjadi 7 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri atas 3 wadah berisi 10 larva. Kelompok pertama disemprotkan dengan protoksin *B.thuringiensis*. Kelompok kedua disemprotkan dengan konidia *B. bassiana*. Kelompok ketiga disemprotkan dengan campuran insektisida protoksin *B.Thuringiensis* yang diproduksi pada jam 24 dan konidia *Be. bassiana*107. Kelompok keempat disemprotkan dengan campuran insektisida protoksin *B.Thuringiensis* yang diproduksi pada jam 48 dan konidia *Be. Bassiana* 107, Kelompok kelima disemprotkan dengan campuran insektisida protoksin *B.Thuringiensis* yang diproduksi pada jam 24 dan konidia *Be. Bassiana* 108, Kelompok keenam disemprotkan dengan campuran insektisida protoksin *B.Thuringiensis* yang diproduksi pada jam 48 dan konidia *Be. Bassiana* 108, kelompok ketujuh sebagai kontrol dan disemprot dengan akuades. Efektivitas kedua bioinsektisida tersebut dilihat dari waktu yang diperlukan untuk menyebabkan mortalitas serta banyaknya mortalitas yang ditimbulkan pada larva grayak.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Pertumbuhan dan Produksi Protoksin *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*.

Ciri-ciri morfologi *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* berdasarkan hasil pengamatan mikroskop yaitu berbentuk basil dengan panjang sekitar 5 μm , membentuk endospora yang terletak subterminal, kristal protein terletak berdampingan dengan endospora dan berukuran lebih kecil dari endospora.



Gambar 1. Sel *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. (a) Pengamatan dengan pewarnaan kristal, (b) pengamatan dengan mikroskop fase kontras dengan perbesaran 1000 x. Keterangan: (1) endospora yang terlepas, (2) endospora dalam sel, dan (3) kristal protein.

Kurva pertumbuhan *B. thuringiensis* dengan menggunakan medium selektif memperlihatkan fase logaritmik mulai pada umur kultur 4 jam sampai jam 12 jam dengan jumlah sel yang meningkat terus menerus. Memasuki umur kultur 16 jam sampai 32 jam kurva pertumbuhan menunjukkan fase stasioner selanjutnya pada umur kultur 36 jam jumlah sel cenderung menurun hingga umur kultur 48 jam pengamatan. Pembentukan protein protoksin memperlihatkan peningkatan pada umur kultur 48 jam pengamatan sebesar 1,05 mg/ml.

2. Produksi Konidia *Be. bassiana*

Produksi konidia *Be. Bassiana* dilakukan pada media beras yang telah disterilisasi setelah ditumbuhkan pada media PDA selama dua minggu. Hasil produksi konidia yang didapatkan setelah masa inkubasi selama dua minggu dengan berat media 180 g yaitu $3,6 \times 10^8$ konidia/ml.

3. Pengujian Protoksin *B. thuringiensis* terhadap Konidia *Be. Bassiana*

Hasil uji protoksin terhadap konidia *Be. Bassiana* menunjukkan bahwa protoksin menghambat pertumbuhan konidia *Be. bassiana*. Koloni yang tumbuh pada medium yang mengandung protoksin yang diproduksi pada umur kultur 24 jam lebih sedikit dibandingkan dengan koloni yang tumbuh pada medium yang mengandung protoksin yang diproduksi pada umur kultur 48 jam. Dari konidia yang dihasilkan terlihat bahwa protoksin tidak berpengaruh pada spora yang diproduksi, tetapi ada kecenderungan jumlah spora *Be. Bassiana* meningkat dengan protoksin yang dipakai pada umur kultur 48 jam.

Tabel 1. Pengaruh protoksin *B. thuringiensis* yang diproduksi pada umur kultur 24 jam dan umur kultur 48 jam terhadap konidia *Be. bassiana*

Produksi protoksin <i>B. thuringiensis</i> jam ke	Jumlah koloni <i>Be. bassiana</i> (koloni/ml)	Jumlah spora <i>Be. bassiana</i> (spora/ml)
24	9	$2,4 \times 10^7$
48	21	$4,5 \times 10^7$
Kontrol Negatif	45	$3,2 \times 10^7$

4. Uji Antagonis *B. thuringiensis* dan Protoksin terhadap *Be. Bassiana*

Hasil uji antagonis koloni *B. thuringiensis* terhadap koloni *Be. Bassiana* menunjukkan bahwa miselium *Be. Bassiana* dapat tumbuh menutupi koloni bakteri *B. thuringiensis* setelah masa inkubasi selama 2 minggu. Hal yang berbeda ditunjukkan pada uji cakram kertas yang menunjukkan bahwa protoksin *B.*

thuringiensis mengurangi jumlah konidia *Be. Bassiana* yang tumbuh dibandingkan dengan kontrol.

5. Pengujian Campuran Protoksin *B. thuringiensis* dan konidia *Be. bassiana*

Hasil uji pengujian daya insektisida kombinasi keduanya *B. thuringiensis* dan konidia *Be. Bassiana* menunjukkan bahwa campuran protoksin dan konidia menyebabkan kematian pada larva *S. litura* instar 3. Aplikasi campuran protoksin dan konidia pada pakan setelah 24 jam menunjukkan terjadinya penurunan aktivitas makan dan bergerak. Pada perlakuan Bt 24 + Bb 10^7 dan Bt 48 + Bb 10^7 belum memperlihatkan terjadinya kematian pada hari pertama dan hari ke-2, sementara pada perlakuan Bt 24 + Bb 10^8 dan Bt 48 + Bb 10^8 kematian sudah mulai terjadi pada hari ke-2. Kematian total yang diamati pada hari ke-7 yang disebabkan perlakuan Bt 24 + Bb 10^7 sebesar 76,7%, perlakuan Bt 48 + Bb 10^7 menyebabkan kematian total sebesar 80%, perlakuan Bt 24 + Bb 10^8 menyebabkan kematian total sebesar 86,7%, dan perlakuan Bt 48 + Bb 10^8 menyebabkan kematian ulat grayak paling banyak dibandingkan dengan perlakuan yang lain sebesar 96,7%.

B. Pembahasan

Bacillus thuringiensis subsp. *aizawai* yang ditumbuhkan pada medium selektif menunjukkan jumlah sel tertinggi mulai umur kultur 16 jam dan mulai turun pada umur kultur 36 jam. Waktu pertumbuhan ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menjelaskan bahwa jumlah sel tertinggi mulai setelah 3 hari masa inkubasi dengan menggunakan media NB (Wiwat *dkk.* 2000). Perbedaan waktu stasioner dan waktu pembentukan endospora *B. thuringiensis* diakibatkan pada perbedaan nutrisi pada media yang digunakan. Media yang digunakan mengandung garam-garam organik yang diperlukan untuk menstimulasi pertumbuhan dan pembentukan endospora *B. thuringiensis*. Nutrisi minimal yang diperlukan untuk pertumbuhan *B. thuringiensis* diantaranya garam-garam dasar (KH_2PO_4 , $(NH_4)_2HPO_4$, $MgSO_4$, $CaCl_2$, $MnSO_4$, $FeSO_4$, dan ammonium molibdata) (Rivera 1999). Menurut Yussof *dkk* (2003) penambahan $(NH_4)_2SO_4$ sebagai sumber nitrogen anorganik pada medium mampu meningkatkan persentase pembentukan spora *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. Keberadaan ion amonium NH_4 dan beberapa ion sulfat SO_4 ke dalam medium dilaporkan dapat menstimulasi pembentukan endospora. Medium yang mengandung ammonium sulfat juga dilaporkan meningkatkan produksi biomassa dan endoprotoksin dibandingkan dengan sumber nitrogen lainnya seperti pepton (Zuoari *dkk.* 1990).

Pengamatan mikroskop dengan mikroskop fase kontras dan pewarna *Commasie Brilliant Blue* pada umur kultur 24 jam menunjukkan terbentuknya kristal protein. Berdasarkan kurva tumbuh yang diperoleh waktu ini masih merupakan fase stasioner dari pertumbuhan *B. thuringiensis*. Pada pengamatan inikristal protein hanya terlihat sebagai bulatan dengan ukuran yang lebih kecil dibandingkan dengan ukuran endospora *B. thuringiensis* dan tidak bisa terlihat bentuk morfologinya.

Pengukuran protoksin memperlihatkan peningkatan konsentrasi pada umur kultur 48 jam yang diperoleh dari pengukuran absorbansi protein. Peningkatan terus menerus ini diasumsikan akibat protein lain selain protein Cry yang disekresikan oleh *Bacillus thuringiensis* juga ikut terukur pada panjang gelombang 595 nm dengan menggunakan reagen *Commasie Brilliant Blue*G-250 (Bradford 1976). Namun pada jam ke-32 terlihat produksi protoksin menurun. Hal ini mungkin disebabkan karena *B. thuringiensis* juga memproduksi enzim protease alkalin. Vu dkk. (2009) menyebutkan bahwa *Bacillus thuringiensis* memproduksi protease alkalin dan produksi protease tersebut meningkat setelah 24 jam. Produksi protease alkalin pada jam tersebut kemungkinan menyebabkan protoksin yang dihasilkan menjadi terdegradasi.

Uji protoksin terhadap konidia *Be. Bassiana* menunjukkan bahwa protoksin berpengaruh pada jumlah koloni konidia *Be. Bassiana* yang tumbuh pada media yang mengandung protoksin *B. thuringiensis*, namun protoksin tidak berpengaruh pada jumlah konidia yang diproduksi dari koloni yang tumbuh tersebut. Hasil ini dikuatkan dengan hasil yang diperoleh dari metode cakram kertas. Pertumbuhan koloni *Be. Bassiana* tidak dapat menutupi cawan setelah masa inkubasi 15 hari. Tidak adanya pengaruh protoksin terhadap jumlah konidia diakibatkan protoksin yang ada telah ternetralisir sehingga *Be. Bassiana* masih dapat menghasilkan konidia yang baik seperti pada kontrol.

Uji antagonis sel *B. thuringiensis* dengan koloni *Be. bassiana* menunjukkan koloni *Be. Bassiana* mampu melewati koloni dan menghambat pertumbuhan *B. thuringiensis*. Kemampuan *Be. Bassiana* dalam menghambat pertumbuhan *B. thuringiensis* karena *Be. Bassiana* menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang bersifat antimikrob seperti beauverisin dan bassianolida. Beauverisin telah dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif di antaranya *Bacillus spp*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Escherichia coli*, dan *Mycobacterium tuberculosis* (Wang dan Xu 2012).

Ulat yang mati akibat perkuluan Perlakuan campuran protoksin *B. thuringiensis* dan konidia *Be. Bassiana* menunjukkan gejala berwarna coklat

akibat kerja dari beauverisin tapi tidak mengeras seperti pada perlakuan konidia tunggal. Tubuh ulat mengkerut dan berwarna hitam di bagian tengah yang diduga akibat kerja protoksin *Bacillusthuringiensis* yang menyebabkan lisis pada usus serangga serangga. Ma dkk. (2008) yang menyebutkan bahwa antara toksin CryAc dan *Be. Bassiana* bekerja secara antagonis atau aditif. Interaksi aditif dapat dijelaskan berdasarkan gejala perhari yang ditimbulkan terlihat bahwa gejala yang ditimbulkan oleh protoksin *B. thuringiensis* konidia *Be. Bassiana* tidak muncul bersamaan. Hal ini diduga karena jalur infeksi keduanya berbeda dan terpisah di dalam tubuh larva. Konidia *Be. Bassiana* menginfeksi dari kutikula dan memasuki hemosel dan mengeluarkan beberapa senyawa protoksin seperti beauverisin, bassianolide dan oosporein sedangkan toksin *B. thuringiensis* menginfeksi melalui pencernaan dan mengikat pada reseptor glikoprotein epitel usus serangga, mengganggu membrane sitoplasmik dan menyebabkan lisis. Penelitian lainnya dilakukan oleh Costa dkk.(2008) bahwa antara Cry1Ac dan *Be. Bassiana* bekerja secara sendiri-sendiri.

DAFTAR RUJUKAN

- Atlas RM, Parks LC, editor. 1997. *Handbook of microbiological media*. Ed ke-2. Florida: Crc press.
- Bobrowski VL, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH, Pinto LM, Fiuza LM. 2002. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolate from South Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol Control* 25:129-135.
- Boncheva R, Dukiandjiev S, Minkov I, Ruud A, Naimov S. 2006. Activity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin against codling moth (*Cydia pomonella* L.) larvae. *J Invert Pathol* 92:84-87.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Dhuyo AR, Naheed MS. 2008. Pathogenicity of *beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hypomycetes) against the yellow rice stem borer, *Sciicpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae) under laboratory condition. *Pakist Entomol* 30:37-42.
- Hennie J, Puspita F, Hendra. 2003. Kerentanan larva *Spodoptera litura* terhadap virus nuclear polyhedrosis. *J Natur Indones* 15:145-151.

- Hill DS. 1993. *Agricultural insect pests of the tropics and their control*. :Cambridge : Cambridge University Press.
- Lewis LC, Berry EC, Obrycki JJ, Bing LA. 1996. Aptness of insecticides (*Bacillus thuringiensis* and carbofuran) with endophytic *Beauveria bassiana* suppressing larval populations of European corn borer. *Agric Ecosyst Environ* 57: 27–34.
- Lopez MJ, Ibarra JE. 1996. Characterization of novel strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 62:1306-1310.
- Ma X, Liu X, Ning X, Zhang B, Han F, Xiu M, Tang YF. 2008. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J Invert Pathol* 9:123-128.
- Marwoto, Suharsono. 2008. Strategi dan komponen teknologi pengendalian ulatgrayak (*Spodoptera litura fabricus*) pada tanaman kedelai. *J Lit Pertan* 27:131-136.
- Navon A. 2003. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospect. *Crop Protect* 19:669-676.
- Rao GVR, Wightman JA, Ranga Rao DV. 1993. World review of the natural enemies and diseases of *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae).
- Schenepf E *et al.* 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein. *Microbiol Mol Biol* 62: 705-806.
- Soetopo D, Indrayani I. 2007. Status teknologi dan prospek *Beauveria bassiana* untuk pengendalian serangga hama tanaman perkebunan yang ramah lingkungan. *Perpesktif* 6:29-46.
- Tanada Y, Kaya HK. 1993. *Insect Pathology*. San Diego: Academic Press. Wang Q, Xu L. 2012. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungus. *Molecule* 17:2367-2377.
- Yussof WM, Mazmira MM, Mei CC. 2003. Effect of ammonium sulphate on the sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* SN2 (a local isolate) during batch fermentation. *J Teknol* 39:53-60.
- Zouari N, Dhouib A, Allouz R, Jaoua S. 1990. Nutritional requirements of a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and use of gruel hydrolysate for the formulation of a new medium for δ -endotoxin production. *Appl Biochem Biotech* 69: 41-52.