

KATA PENGANTAR

Diagnosa Veteriner Vol. 16, No. 2, Tahun 2017

Alhamdulillah, segala puji bagi Tuhan Yang Maha Kuasa. Atas rahmat dan karuniaNya Buletin Diagnosa Veteriner Vol. 16, No. 2, Tahun 2017 dapat diterbitkan. Buletin edisi ini kami menyajikan artikel mengenai hasil “Investigasi Kasus Antraks pada Sapi di Kecamatan Cenrana, Kabupaten Maros, Provinsi Sulawesi Selatan”. Artikel kedua, review “Bioinsektisida Bakteri/ Mikroba dan Virus”. Artikel terakhir review “Mikrobiologi Molekuler Pemanfaatan dan Peningkatan Kualitas Hidup Manusia”

Redaksi membuka kesempatan kepada semua pihak yang berkepentingan dengan dunia veteriner dan peternakan untuk menyampaikan ide atau gagasan berupa karya ilmiah populer pengamatan lapangan, hasil penelitian atau review melalui buletin ini.

Redaksi mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca sebagai bahan pembelajaran untuk pengembangan Buletin Diagnosa Veteriner volume selanjutnya.

Maros, 28 Agustus 2017

Redaksi

DIAGNOSA VETERINER

Buletin Informasi Kesehatan Hewan dan
Kesehatan Masyarakat

International Standard Serial Number (ISSN) : 0216 – 1486

Volume : 16

No : 2

Tahun : 2017

SUSUNAN REDAKSI

Penanggung Jawab : Kepala Balai Besar Veteriner Maros

Pemimpin Redaksi : Kepala Seksi Informasi Veteriner

Penyunting/ editor : Kepala Bidang Pelayanan Veteriner
drh. Dini Marmansari
drh. Titis Furi Djatmikowati
drh. Hadi Purnama Wirawan, M.Kes

Sekretariat : Suryani Gesha Utami, A.Md
Marwati, S. Sos

DAFTAR ISI

Diagnosa Veteriner Vol. 16, No. 2, Tahun 2017

	Halaman
Kata Pengantar	i
Susunan Redaksi	ii
Daftar Isi	iii
Investigasi Kasus Antraks pada Sapi di Kecamatan Cenrana, Kabupaten Maros, Provinsi Sulawesi Selatan	1
Bioinsektisida Bakteri/ Mikroba dan Virus	9
Mikrobiologi Molekuler Pemanfaatan dan Peningkatan Kualitas Hidup Manusia	24

Review

Bioinsektisida Bakteri/ Mikroba dan Virus

Wahyuni dan Hadi purnama wirawan

Medik Veteriner, Balai Besar Veteriner Maros

Intisari

Negara-negara di dunia yang sedang berkembang dimana pemenuhan pangan dan sandang masih diusahakan sendiri, penggunaan bahan kimia pada pertanian dianggap penting untuk mendapatkan hasil maksimal, namun pada saat ini sudah mulai ada kesadaran bahwa bahan kimia justru sebagai bahan utama terjadinya pencemaran lingkungan. Oleh karena itu, negara berkembang mulai mengurangi penggunaan bahan kimia dan mulai menyukai produk-produk pertanian yang organik, bebas bahan kimia serta ramah lingkungan

Kata kunci : berkembang, bahan kimia, organik.

PENDAHULUAN

Di Indonesia, penerapan budidaya pertanian yang ramah lingkungan atau organik masih dirasa sulit. Adapun kendala yang dihadapi antara lain :

- Belum terjangkaunya harga untuk bahan-bahan tambahan organik oleh petani.
- Budidaya pertanian dengan menggunakan bahan dan produk organik membutuhkan penanganan yang lebih serius.
- Faktor lahan yang bersifat hamparan, di satu petak murni yang menerapkan teknik organik namun di lahan bersebelahan tetap menggunakan pestisida kimia, secara tidak langsung pestisida tersebut masuk ke dalam lahan organik dan mencemari lahan tersebut.
- Tanaman yang tidak menggunakan bahan kimia sama sekali lebih rentan terhadap hama dan penyakit, hal ini mengakibatkan rendahnya produksi.
- Produk pertanian kurang awet dan mudah busuk.
- Tingginya biaya operasional dan rendahnya produksi mengakibatkan harga jual produk pertanian juga akan semakin tinggi sehingga sulit memasuki pasar lokal.

Selain pencemaran pada lingkungan, pestisida juga dapat masuk ke dalam tubuh manusia melalui saluran pernafasan dan kulit, sehingga perlu diketahui bahwa insektisida dapat menimbulkan masalah baik bagi pekerja di lapang maupun konsumen. Ketidakpedulian pengguna pestisida akan bahaya nampak jelas pada saat bekerja tidak menggunakan pengaman seperti masker, topi, pakaian yang menutupi seluruh tubuh dan lain-lain. Apabila alat pengaman tersebut tidak digunakan, maka pestisida dapat masuk ke dalam tubuh melalui kulit dan saluran pernafasan. Pestisida dengan jenis insektisida memiliki angka persentase tertinggi di Indonesia, hal ini dikarenakan digunakan untuk lahan pertanian.

Adanya kekhawatiran akan pengaruh negatif tentang pemakaian agrokemikal telah meningkatkan perhatian masyarakat kepada bioinsektisida sebagai salah satu alternatif teknologi untuk menurunkan populasi hama. Pengendalian dengan memanfaatkan musuh alami dirasa sangat baik dan aman, karena tidak menimbulkan pencemaran lingkungan. Penggunaan agensia patogen seperti bakteri, jamur dan virus merupakan salah satu alternatif yang diharapkan dapat meningkatkan pengendalian hama secara hayati. Bioinsektisida membunuh dengan cara yang sangat berbeda dengan insektisida sintesis.

Sebagian mikroba entomopatogen memperbanyak diri di dalam tubuh serangga inang (Bahagiawati, 2007).

A. BIOINSEKTISIDA BAKTERI

Beberapa bakteri sekarang telah dikembangkan menjadi biopestisida. Secara ekologi, penggunaan biopestisida ini sangat menguntungkan jika dibandingkan dengan penggunaan pestisida. Hal ini dikarenakan adanya efek residu pestisida terhadap lingkungan termasuk manusia. Bakteri-bakteri tertentu dapat menghasilkan endotoksin yang dapat meracuni serangga hama tanaman tertentu. Sebagai contoh, di Amerika telah dikembangkan bakteri yang potensial menjadi biopestisida pada skala komersial, antara lain adalah *Bacillus popilliae* dengan merk dagang **Doom or Japidemik**, *Bacillus thuringiensis* dengan merk dagang **Dipel, Thuricide, dan Agritol**. Di Canada, pada tahun 1980 penggunaan *Bacillus thuringiensis* sebagai biopestisida mencapai 4%, dan meningkat menjadi 63 % pada tahun 1990. Endotoksin yang dihasilkan oleh *Bacillus thuringiensis* aktif mematikan sebagian besar serangga yang termasuk dalam kelas *Lepidoptera*, *Diptera* dan *Coleoptera*.

Bacillus thuringiensis merupakan family bakteri yang memproduksi kristal protein padasaat bersporulasi. Bioinsektisida ini merupakan 90–95% dari bioinsektisida yang dikomersialkan untuk dipakai oleh petani di berbagai negara. Dengan kemajuan teknologi gen insektisidal *Bacillus thuringiensis* (**Bt**) telah dapat diisolasi dan diklon sehingga membuka kemungkinan untuk diintroduksi ke dalam tanaman. Produksi bioinsektisida berkembang dengan cepat dan diperkirakan mencapai 11% per tahun. Produk ini digunakan sebanyak 10 – 50 gram per acre dan toksisitasnya berlipat kali dibandingkan *piretroid* sintetik (Fieldman, 1997). Beberapa subspecies dari bakteri **Bt** yaitu *kurstaki*, *aizawai*, *sotto*, *entomocidus*, *Berliner* dan *israelensis*. Dalam satu subspecies **Bt** dijumpai beberapa jenis strain **Bt** seperti HD-1, dan HD-5.

Umumnya lebih dari satu kristal protein ditemukan dalam strain **Bt**. Gen yang mengkode kristal protein yang dihasilkan oleh bakteri ini telah diisolasi dan dikarakterisasi, dikenal dengan sebutan gen *cry* yang berasal dari *crystal*. Kristal endotoksin **Bt** telah dikelompokkan menjadi tujuh (7) kelas utama dimana pengetahuan tentang mekanisme cara kerja dari endotoksin ini penting untuk menentukan proses kunci yang bertanggung jawab terhadap spesifikan dari kristal protein. Faktor utama yang menentukan kisaran inang dari kristal protein adalah perbedaan pada *midgut* larva yang mempengaruhi proses kelarutan dan prosesing kristal dari tidak aktif menjadi aktif pada spesies-spesies serangga. Berhasilnya isolasi strain **Bt**, tidak merupakan garansi untuk mendapatkan bioinsektisida **Bt** yang dapat digunakan oleh petani.

1) Klasifikasi *Bacillus thuringiensis* :

Kerajaan : Eubacteria
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Bacillales
Famili : Bacillaceae
Genus : *Bacillus*
Spesies : *Bacillus thuringiensis*

2) Deskripsi

B. thuringiensis dibagi menjadi 67 subspecies (hingga tahun 1998) berdasarkan serotipe dari flagela (H). Ciri khas dari bakteri ini yang membedakannya dengan spesies *Bacillus* lainnya adalah kemampuan membentuk kristal paraspora yang berdekatan dengan endospora selama fase sporulasi III dan IV. Selama pertumbuhan vegetatif terjadi, berbagai galur *B. thuringiensis* menghasilkan bermacam-macam antibiotik, enzim, metabolit, dan toksin, yang dapat merugikan organisme lain. Selain endotoksin (ICP), sebagian subspecies *B. thuringiensis* dapat membentuk

beta-eksotoksi yang toksik terhadap sebagian besar makhluk hidup, termasuk manusia dan insekta.

Bacillus thuringiensis adalah bakteri gram-positif, berbentuk batang, yang tersebar secara luas di berbagai negara. Bakteri ini termasuk patogen fakultatif dan dapat hidup di daun tanaman konifer maupun pada tanah. Apabila kondisi lingkungan tidak menguntungkan maka bakteri ini akan membentuk fase sporulasi. Saat sporulasi terjadi, tubuhnya akan terdiri dari protein *Cry* yang termasuk ke dalam protein kristal kelas endotoksin delta. Apabila serangga memakan toksin tersebut maka serangga tersebut dapat mati. Oleh karena itu, protein atau toksin *Cry* dapat dimanfaatkan sebagai pestisida alami.

Berbagai macam spesies *B. thuringiensis* telah diisolasi dari serangga golongan koleoptera, diptera, dan lepidoptera, baik yang sudah mati ataupun dalam kondisi sekarat. Bangkai serangga sering mengandung spora dan ICP *B. thuringiensis* dalam jumlah besar. Sebagian subspecies juga didapatkan dari tanah, permukaan daun, dan habitat lainnya. Pada lingkungan dengan kondisi yang baik dan nutrisi yang cukup, spora bakteri ini dapat terus hidup dan melanjutkan pertumbuhan vegetatifnya. *B. thuringiensis* dapat ditemukan pada berbagai jenis tanaman, termasuk sayuran, kapas, tembakau, dan tanaman hutan.



3) **Substansi Aktif**

Istilah substansi aktif yaitu bahan-bahan yang mempunyai aktivitas tertentu yang dihasilkan oleh makhluk hidup, dan bahan aktif ini biasanya dapat bersifat positif pada makhluknya sendiri akan tetapi dapat bersifat negatif atau positif pada makhluk hidup lain.

Substansi aktif yang dihasilkan oleh mikroorganisme umumnya digolongkan menjadi dua macam, yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder. Substansi aktif primer biasanya bersifat intraseluler atau terdapat didalam sel. Biasanya metabolit primer dihasilkan dalam jumlah yang relatif kecil. Substansi sekunder adalah hasil dari metabolisme didalam sel yang disekresikan keluar dari sel atau dikumpulkan dalam kantong-kantong khusus diantara sel atau jaringan didalam tubuhnya.

Bacillus thuringiensis membentuk spora yang membentuk kristal protein-toksin. Kristal tersebut bersifat toksik terhadap serangga. Penelitian Heimpel (1967) diketahui bahwa *B. thuringiensis* menghasilkan beberapa jenis toksin, seperti (alfa), (beta), (gamma)-eksotoksin, dan (delta)-endotoksin, serta faktor *louse*. Peneliti lain menginformasikan bahwa yang berperan penting sebagai insektisida adalah protein -eksotoksin dan -endotoksin.

4) **Berbagai Macam *B. thuringiensis* :**

1. *Bacillus thuringiensis* varietas *tenebrionis* menyerang kumbang kentang Colorado dan larva kumbang daun.
2. *Bacillus thuringiensis* varietas *kurstaki* menyerang berbagai jenis ulat tanaman pertanian.
3. *Bacillus thuringiensis* varietas *israelensis* menyerang nyamuk dan lalat hitam.
4. *Bacillus thuringiensis* varietas *aizawai* menyerang larva ngengat dan berbagai ulat, terutama ulat ngengat diamondback.

Tabel 1. Klasifikasi Kristal protein (*cry*) *Bacillus thuringiensis* dan spesifikasi terhadap serangga dan nematode (Margino dan Mangoendihardjo, 2002)

No	Klas	Contoh	Kelompok hama/nematoda
1	I	<i>Cry</i> 1Aa, <i>Cry</i> 1Ab, <i>Cry</i> 1Ac, <i>Cry</i> 1Cb, <i>Cry</i> 1F	Lepidoptera
2	II	<i>Cry</i> IIA, <i>Cry</i> IIb, <i>Cry</i> IIc	Lepidoptera
3	III	<i>Cry</i> IIIa, <i>Cry</i> IIIb, <i>Cry</i> IIIc	Coleoptera
4	IV	<i>Cry</i> IVb, <i>Cry</i> IVc	Diptera
5	V	<i>Cry</i> V	Lepidoptera dan Coleoptera
6	VI	<i>Cry</i> VI	Nematoda
7	IX	<i>Cry</i> IXF	Lepidoptera

J.V. Hasinu

5) **Isolasi**

Bt dapat diisolasi dari tanah, bagian tumbuhan, kotoran hewan, serangga, dan bangkainya dan sumber lain. Salah satu cara isolasi yang cukup efektif adalah dengan seleksi asetat. Beberapa gram sumber isolat disuspensikan ke dalam media pertumbuhan bakteri (misal LB) yang mengandung natrium asetat kemudian dikocok. Media asetat tersebut menghambat pertumbuhan spora **Bt** menjadi sel vegetatif. Setelah beberapa jam media tersebut di-panaskan pada suhu 80°C selama beberapa menit. Pemanasan ini akan membunuh sel-sel bakteri atau mikroorganisme yang sedang tumbuh termasuk spora-spora bakteri lain yang tumbuh. Kemudian sebagian kecil dari suspensi yang telah dipanaskan diratakan pada media padat. Koloni-koloni yang tumbuh kemudian dipindahkan ke media sporulasi **Bt**. Koloni yang tumbuh pada media ini dicek keberadaan spora atau protein kristalnya untuk menentukan apakah koloni tersebut termasuk isolate **Bt**.

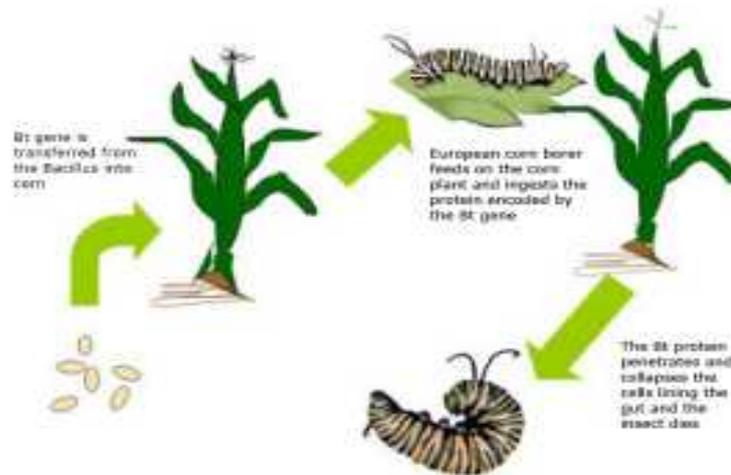
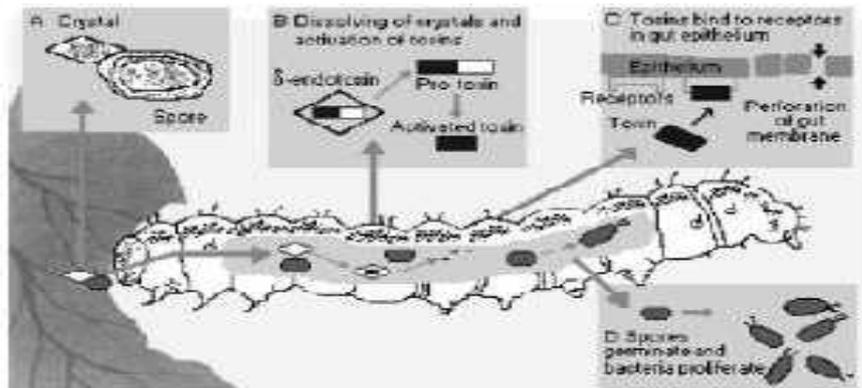
6) **Penapisan Isolat yang Toksik**

Tidak semua isolat **Bt** beracun terhadap serangga. Untuk itu perlu dilakukan penapisan daya racun dari isolat-isolat yang telah diisolasi. Ada dua pendekatan yang dapat dilakukan untuk hal ini. Pertama dengan pendekatan molekular dan kedua dengan bioasai. Pendekatan molekular dilakukan dengan *PCR* menggunakan primer-primer yang dapat mengandakan bagian-bagian tertentu dari gen-gen penyandi protein kristal (gen *cry*). Hasil *PCR* ini dapat dipakai untuk memprediksi potensi racun dari suatu isolat tanpa terlebih dulu melakukan bioasai terhadap serangga target. Dengan demikian penapisan banyak isolat untuk kandungan gen-gen *cry* tertentu dapat dilakukan dengan cepat. Untuk menguji lebih lanjut daya beracun dari suatu isolat maka perlu dilakukan bioasai dengan mengumpankan isolat atau kristal protein dari isolat tersebut kepada serangga target. Dari bioasai ini dapat dibandingkan daya racun antar isolat. Dengan pendekatan seperti ini BB-Biogen telah mengidentifikasi beberapa isolat *B. thuringiensis* lokal yang mengandung gen *cry*1 dan beracun terhadap beberapa serangga

7) **Cara Perbanyakan**

Perbanyakan bakteri **Bt** dalam media cair dapat dilakukan dengan cara yang mudah dan sederhana. Karena yang kita perlukan sebagai bioinsektisida adalah protein kristalnya, maka diperlukan media yang dapat memicu terbentuknya kristal tersebut. Media yang mengandung *tryptose* telah diuji cukup efektif untuk memicu sporulasi **Bt**. Dalam 2–5 hari **Bt** akan bersporulasi dalam media ini dengan pengocokan pada suhu 30°C. Perbanyakan **Bt** ini dapat pula dilakukan dalam skala yang lebih besar dengan fermentor.

8) **Mekanisme Patogenitas**



Kristal protein yang termakan oleh serangga akan larut dalam lingkungan basa pada usus serangga. Pada serangga target, protein tersebut akan teraktifkan oleh enzim pencernaan protein serangga. Protein yang teraktifkan akan menempel pada protein reseptor yang berada pada permukaan sel epitel usus. Penempelan tersebut mengakibatkan terbentuknya pori atau lubang pada sel sehingga sel mengalami *lysis*. Pada akhirnya serangga akan mengalami gangguan pencernaan dan mati.

9) **Potensi sebagai Bioinsektisida**

Untuk bahan dasar bioinsektisida biasanya digunakan sel-sel spora atau protein kristal **Bt** dalam bentuk kering atau padatan. Padatan ini dapat diperoleh dari hasil fermentasi sel-sel **Bt** yang telah disaring atau diendapkan dan dikeringkan. Padatan spora dan protein kristal yang diperoleh dapat dicampur dengan bahan-bahan pembawa, pengemulsi, perekat, perata, dan lain-lain dalam formulasi bioinsektisida.

10) Cara Komersial

Pengembangan industri umumnya dilakukan dengan menggunakan tahapan skala laboratorium, skala *pilot plant*, dan skala industri. Skala laboratorium merupakan tahap penyeleksian mikroba yang digunakan, skala *pilot plant* merupakan tahap penerapan kondisi operasi optimum dan skala industri merupakan tahap yang prosesnya akan dilaksanakan dengan pertimbangan perhitungan ekonomi. Penelitian skala laboratorium telah mendapatkan nisbah karbon dan nitrogen dengan media *onggok tapioca* dan urea optimum sebesar 7:1, pH dan suhu sebesar $6,90 + 0,10$ dan $26,35 + 1,50^{\circ} \text{C}$ serta laju agitasi dan laju optimum yaitu 200 rpm dan wm .

Translasi skala laboratorium ke skala *pilot plant* atau industri memerlukan patokan perhitungan yang tepat. Ada beberapa metode yang digunakan dalam penggandaan skala. Mengingat fermentasi bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* bersifat aerobik, maka digunakan patokan penggandaan skala yang berhubungan dan mengacu pada perpindahan oksigen, yaitu tekanan parsial O_2 atau Po .

Ketersediaan oksigen sangat berpengaruh pada pertumbuhan dan sintesis bioinsektisida oleh *Bacillus thuringiensis*. Parameter penting yang berpengaruh pada ketersediaan oksigen di dalam media adalah koefisien perpindahan oksigen *volumetric* dan kebutuhan tenaga per unit volume. Oleh karena itu, dalam tahap penggandaan skala dicoba dua patokan tersebut. Perhitungan penggandaan skala memerlukan data ciri reologi cairan fermentasi dan spesifikasi fermentor yang digunakan, yakni tipe pengaduk, jumlah pengaduk, diameter pengaduk, jumlah baji, tinggi fermentor, diameter tangki, dan volume tangki fermentor.

Agar penyimpangan yang terjadi selama proses penggandaan skala dapat diminimumkan sehingga tidak menyebabkan kerugian, maka kajian penggandaan skala produksi bioinsektisida dilakukan dengan mempertahankan keasaman *geometric* fermentor, menggunakan komposisi media, suhu proses, pH awal, konsentrasi kelarutan oksigen, dan galur mikroorganisme yang sama.

Langkah yang dilakukan, yaitu

1. Isolasi Mikroba

Cara untuk mendapatkan biakan murni disebut isolasi. Isolasi merupakan salah satu tahapan yang sangat penting dalam industri. Isolat yang diperoleh dan bersifat unggul akan digunakan untuk memproduksi senyawa yang bernilai ekonomi. Sumber mikroba diberi perlakuan yang dapat merangsang pertumbuhan mikroba khusus yang diinginkan dan sekaligus menghambat pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan atau mikroba ditumbuhkan dalam medium yang bersifat selektif. Untuk mendapatkan kelompok mikroba khusus digunakan media yang diberi tambahan nutrisi khusus yang sesuai dengan habitat alami, yang disebut dengan media diperkaya.

2. Seleksi Mikroba

Dari sejumlah isolat yang didapat, perlu dilakukan seleksi untuk memilih isolat terbaik atau unggul dalam produksi. Sifat-sifat yang harus dimiliki isolat terpilih adalah

- a) Murni, bebas dari segala kontaminan
- b) Dapat tumbuh dengan subur, fase adaptasi singkat atau tidak ada
- c) Dapat menghasilkan produk yang diinginkan (aktivitas spesifik)
- d) Mampu menghasilkan produk yang diinginkan dengan konsentrasi tinggi dalam waktu singkat
- e) Mudah disimpan dan dipelihara dalam jangka waktu lama

3. Karakterisasi dan Identifikasi

Karakterisasi atau penentuan sifat fisiologis mikroba, merupakan dasar dalam identifikasi mikroba secara sistematis. Beberapa karakter yang perlu diketahui dari isolat, antara lain adalah:

- a) Morfologi dan struktur sel (spora, flagel)
- b) Sifat Gram
- c) Morfologi koloni pada media padat
- d) Sifat pertumbuhan pada medium cair
- e) Kebutuhan oksigen
- f) Kebutuhan energi dan nutrient
- g) Suhu dan pH optimal untuk pertumbuhan
- h) Kurva pertumbuhan

Selanjutnya identifikasi isolat dapat dilakukan dengan berbagai cara, antara lain berdasarkan:

- a) Reaksi enzimatis/tes biokimia, yaitu fermentasi gula, TSIA, Indol, Metilred, Voges Proskauer, Citrat, Urease, katalase, oksidase dan sebagainya.
- b) Tes serologi, yakni reaksi antigen dengan antibodi
- c) Sifat genetik, yakni dengan menentukan komposisi basa, urutan basa nukleotida dan hibridisasi DNA
- d) Urutan asam amino, urutan asam amino yang menyusun protein adalah spesifik, karena merupakan refleksi dari urutan basa DNA, dan lain-lain.

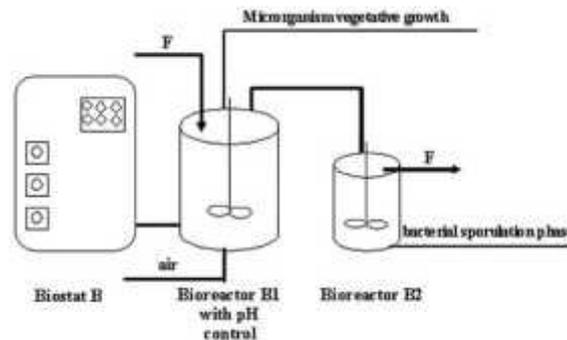
4. Pemeliharaan Kultur

Pemeliharaan kultur bertujuan untuk mencegah kontaminasi dan perubahan genetik serta untuk mempertahankan tingkat aktivitas dan viabilitas sel serta mutu genetik. Oleh karena itu, tahap ini merupakan tahap yang paling menentukan kelangsungan industri. Bila tidak dipertahankan, maka mutu dan jumlah produksi akhir juga tidak bisa dipertahankan. Mikroba mudah sekali mengalami mutasi secara spontan, sehingga mutu genetik kultur relatif sulit dipertahankan dan dapat menyebabkan penurunan kemampuan dalam menghasilkan metabolit.

5. Propagasi Kultur dan Pembuatan Starter

Propagasi kultur bertujuan untuk mendapatkan inokulum yang sehat dan aktif serta tersedia dalam jumlah mencukupi. Inokulum yang berupa kultur kerja tidak dapat langsung digunakan untuk fermentasi. Fermentasi dalam kapasitas besar memerlukan inokulum yang cukup banyak. Biasanya inokulum hasil propagasi tidak mencukupi sehingga perlu dibiakan kembali untuk mencapai jumlah yang diinginkan. Inokulum yang siap diinokulasikan ke fermentor disebut dengan *starter* (biakan aktif). Starter biasanya dibuat dalam fermentor kecil dengan kondisi medium terkendali menyerupai fermentor besar.

6. Fermentasi



Fermentasi adalah suatu proses untuk menghasilkan produk dengan melibatkan aktivitas mikroba secara terkontrol, baik dalam kondisi aerob maupun anaerob. Fermentasi dilakukan dalam fermentor yang berisi medium dengan kandungan nutrisi yang cukup dan kondisi medium yang optimal untuk pertumbuhan dan sintesis produk yang diinginkan, baik suhu, pH, aerasi maupun homogenitas. Selanjutnya fermentor dihubungkan dengan monitor untuk

mengatur parameter-parameter yang terkait dengan proses fermentasi. Prosedur perpindahan fermentasi dari skala laboratorium ke skala industri disebut juga dengan *scale-up* atau peningkatan proses. *Scale-up* perlu dilakukan karena selama fermentasi terjadi perubahan lingkungan internal fermentor, yang dapat mempengaruhi aktivitas dan produktivitas mikroba. Pada fermentasi skala laboratorium digunakan fermentor gelas 1-5 liter, skala *pilot plan* 300 – 3000 liter dan pada tahap industri digunakan fermentor 10.000 – 400.000 liter.

7. Pengembangan Mutan

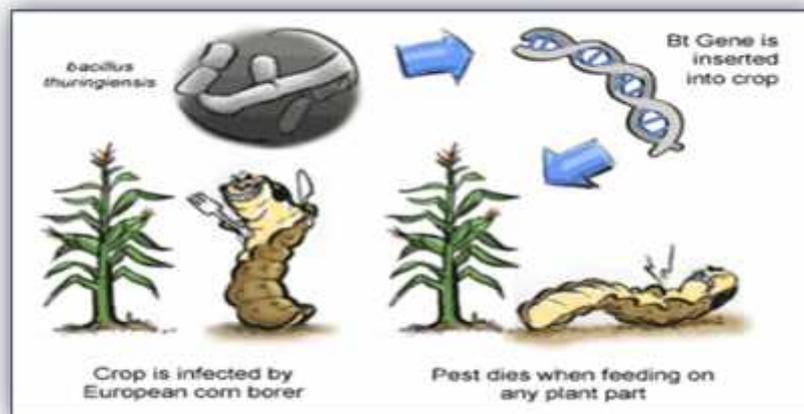
Mikroba yang berperan dalam industri perlu ditingkatkan aktivitas metabolismenya, sebab isolat alami hanya mampu menghasilkan produk dalam jumlah sedikit. Pengembangan mutan dapat dilakukan dengan transformasi lisogeni, rekombinasi dan pembuatan mutan auxotrof.

Sifat-sifat mutan yang diinginkan, yaitu waktu fermentasi lebih singkat, tidak memproduksi senyawa yang tidak diinginkan, dapat menggunakan substrat yang lebih murah, mampu menghasilkan produk dalam jumlah tinggi dan lain sebagainya.

Selanjutnya mikroba dengan sifat-sifat yang menguntungkan tersebut digunakan dalam industri, untuk menghasilkan produk yang berkualitas dalam jumlah maksimal.

11) Rekayasa Genetik

- Tanaman transgenik telah disisipi atau memiliki gen asing dari spesies tanaman yang berbeda atau makhlukhidup lainnya.
Ex : Jagung, kapas, dan kentang



Gambar Pembuatan Transgenik

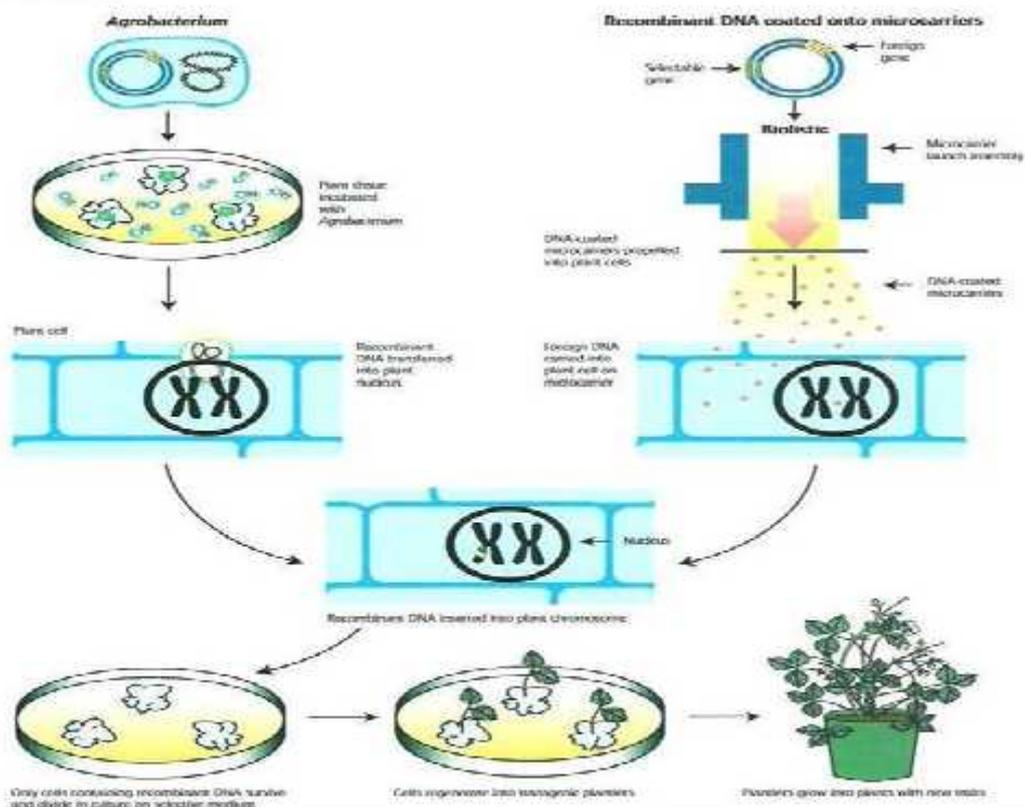


Figure 9. Plant transformation and production of transgenic plants. *Agrobacterium* and biolistic methods can be used to transfer cloned genes into plant cells. *Agrobacterium* naturally transfers genes into plant chromosomes as part of its infection process, and this ability has been adapted by scientists to shuttle cloned genes into plants. In the biolistic method, the cloned DNA is coated onto microscopic beads that are then propelled into plant tissues. Some of the beads enter cells, and in some of these cells the DNA will be incorporated into the chromosomes. In both methods, tissue culture is then used to select and regenerate the transformed cells into fertile plants.

Cara kerja *Bacillus thuringiensis* pada tanaman transgenik.

B. thuringiensis adalah bakteri yang menghasilkan kristal protein yang bersifat membunuh serangga (insektisidal) sewaktu mengalami proses sporulasinya. Kristal protein yang bersifat insektisidal ini sering disebut dengan δ -endotoksin. Kristal ini merupakan pro toksin yang jika larut dalam usus serangga akan berubah menjadi polipeptida yang lebih pendek (27-149 kd) dan bersifat insektisidal. Pada umumnya kristal **Bt** di alam bersifat protoksin, karena aktivitas proteolisis dalam sistem pencernaan serangga, mengubah **Bt** protoksin menjadi polipeptida yang lebih pendek dan bersifat toksin. Toksin yang telah aktif berinteraksi dengan sel-sel epithelium di midgut serangga. Bukti-bukti telah menunjukkan bahwa toksin **Bt** ini menyebabkan terbentuknya pori-pori (lubang yang sangat kecil) di sel membran di saluran pencernaan dan mengganggu keseimbangan osmotik dari sel-sel tersebut. Karena keseimbangan osmotik terganggu, sel menjadi bengkak dan pecah. Hal ini menyebabkan matinya serangga (Hofte dan Whiteley, 1989).

12) Aplikasi Lapangan

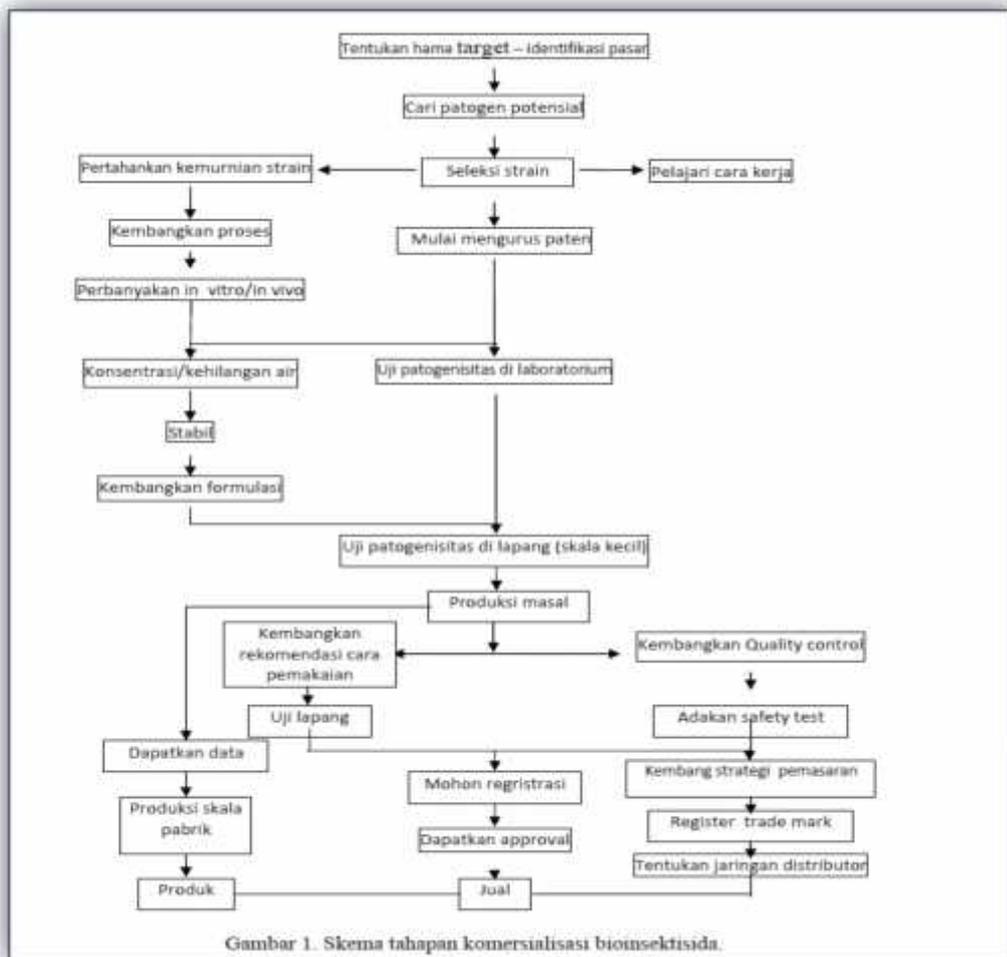
Hasil dari penelitian di lapang menunjukkan adanya variasi, tetapi umumnya menyatakan hasil yang positif terhadap hama di lapangan seperti *Spodoptera* sp, *Helicoverpa armigera*, Lepidoptera dan lain sebagainya. Beberapa faktor yang menentukan keberhasilan pemakaian *microbial* di lapangan antara lain distribusi spora yang tidak merata, laju konsumsi serangga atau larva, variasi larutan spora dalam tanki, ukuran droplet (Dent, 1993).

Aplikasi **Bt** di lapangan dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti menggunakan *cnaspack spayers*, *hand bait*, *dustblower* dan kapal terbang. Kebanyakan mikroba seperti virus, bakteri harus termakan oleh serangga untuk

mengakibatkan infeksi dan tidak merupakan racun kontak. Artinya, insektisida biologi tidak akan berpengaruh apapun terhadap serangga yang hanya menyentuhnya terkecuali pada golongan jamur. Beberapa jamur entomogeneous telah diproduksi secara komersial dewasa ini untuk digunakan sebagai agensia pengendalian secara hayati. *Metarrizium anizopliae*, telah digunakan untuk mengendalikan Homoptera, *Beauveria bassiana* dan *Nomuraea rileyi*. Sekarang ini sedang diusahakan produksinya secara besar-besaran untuk pengendalian lapangan (Kirland, 2004).

B. BIOINSEKTISIDA VIRUS

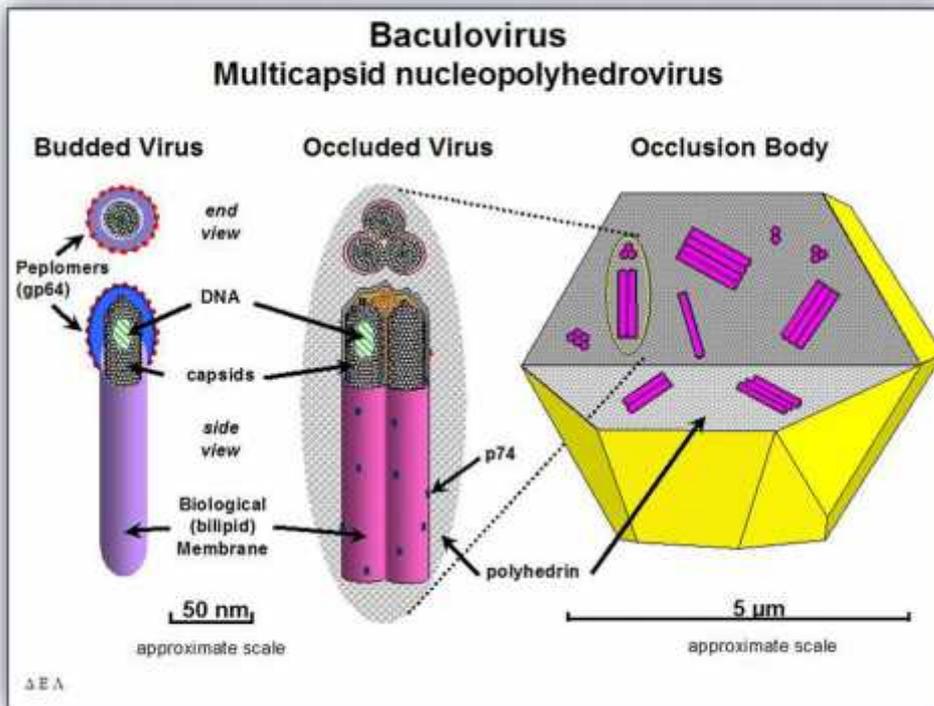
Virus serangga terutama dari Nucleopolyhedrosis Virus (NPV) diperkirakan memiliki potensi yang tinggi untuk digunakan sebagai agensia pengendali populasi serangga hama dari ordo *Lepidoptera* dan *Coleoptera*. Virus ini secara alami bersifat pathogen terhadap larva serangga dan memiliki target yang spesifik, contohnya HaNPV hanya menyerang *H. armigera*, tidak akan menyerang spesies lain sehingga tidak mengganggu spesies non-serangga serta spesies serangga yang bukan target.



Gambar 1. Skema tahapan komersialisasi bioinsektisida.

Virus serangga ini juga diketahui sangat virulen, mudah menyebar dalam suatu populasi dan persisten dalam jangka waktu lama apabila kondisi lingkungan memungkinkan (Volkman, 1996). Telah diketahui bahwa infeksi larva serangga oleh NPV akan mengakibatkan rusaknya sel-sel kolumnar yang terdapat di dalam saluran usus pencernaan bagian tengah diduga akan mengakibatkan kerusakan sistim pencernaan dan menurunkan konsumsi makan. Namun demikian sebagai agensia pengendali populasi serangga hama, patogen serangga juga memiliki beberapa kekurangan. Keberhasilan microbial pestisida tidak hanya tergantung dari faktor-faktor yang telah dikemukakan di

atas tetapi juga keberhasilan dalam menciptakan pasar. Jika pasar tidak tercipta maka usaha untuk membuat biopestisida yang memerlukan biaya mahal akan sia-sia (gambar 1. Skema tahapan komersialisasi bioinsektisida).



Gambaran umum tentang NPV adalah sebagai berikut, Virus ini berbentuk batang dan terdapat dalam inclusion bodies yang disebut polihedra. Polihedra berbentuk kristal bersegi banyak dan terdapat didalam inti sel yang rentan dari serangga inang, seperti hemolimfa, badan lemak, hypodermis dan Matriks trakea. Polihedra berukuran 0,5–15 μm dan mengandung partikel virus (virion). Virion berbentuk batang, berukuran 40–70 nm x 250–400 nm dan mengandung molekul deoxy-ribonucleid acid (DNA) (iggnoffo and Couch, 1981, Tanada dan Kaya, 1993).Morfologi polihedra dan virion dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron.

Klasifikasi NPV

Untuk klasifikasi NPV adalah sebagai berikut :

Nama umum : *Spodoptera litura* (fabricius)
Kingdom : Animalia
Filum : Arthropoda
Kelas : Insecta
Ordo : Lepidoptera
Family : Noctuidae
Subfamily : Amphipyrae
Genus : Spodoptera
Species : *Spodoptera litura*

Cara Kerja NPV

Cara penginfeksi NPV terhadap inang umumnya pada stadium larva dengan melalui saluran pencernaan sehingga inang harus menelan virus bersama pakan. Bagian tubuh yang peka dan menjadi sasaran infeksi adalah lapisan epitel saluran pencernaan, sel darah, trakea, hipodermis dan sel lemak. (<http://um.ac.id>)

Serangan NPV terhadap inang terdiri atas dua tahap:

1. Tahap pertama NPV menyerang usus tengah.

2. Tahap kedua menyerang rongga tubuh (*hemocoel*) dan organ-organ yang ada didalamnya.

Polyhedral virus yang tertelan oleh inang akan masuk ke dalam usus tengah dan virion akan dilepaskan ke cairan usus tengah. Pelepasan virion akan dibantu oleh kondisi alkali cairan pencernaan dengan pH 9,5-11,5 (Deacon, 1983, Ignoffo and Couch, 1981 dalam Indrayani, 2000).

Selanjutnya virion yang terlepas dari PIB menuju ke membran *peritropic* dari usus tengah kemudian masuk ke dalam sel usus. Proses ini diawali dengan lepasnya selubung nukleokapsid (amplop) sehingga yang masuk hanyalah nukleokapsid. Selanjutnya dalam sel-sel usus tepatnya di dalam inti sel, nukleokapsid bereplikasi. Nukleokapsid keluar dari inti dan menuju membran basal plasma kemudian keluar sel melalui proses yang disebut *budding*. Keluarnya virion dari sel-sel terinfeksi juga terjadi karena sel-sel tersebut hancur akibat serangan virus. Tahap selanjutnya, virion kemudian menyerang jaringan didalam rongga tubuh larva, terutama sel lemak, sel-sel *hemocit*, matrik trakea, yang akhirnya mengakibatkan kematian larva (Bedjo, 2007). Larva yang terinfeksi menunjukkan gejala yang khas. Satu sampai dua hari setelah infeksi, larva memendek, warna mulai berubah dan aktivitas menjadi lamban. Tetapi pada tingkat ini larva masih makan. Pada infeksi lanjut, bagian ventral larva berwarna coklat kemerahan seperti terdapat akumulasi cairan kecoklatan. Kulit menjadi mengkilat dan lembek, bila disentuh larva akan pecah dan mengeluarkan cairan berwarna coklat kemerahan, baunya menyengat dan mengandung jutaan *polyhedral*. Selanjutnya, larva yang akan mati menunjukkan perilaku yang khas. Larva akan bergerak ke pucuk tanaman dan pada saat matinya larva akan menggantung menyerupai huruf V terbalik.



Pembuatan NPV

Umumnya, NPV diperbanyak secara *in vivo* dalam tubuh ulat yang menjadi inangnya. NPV dapat juga diperbanyak secara *in vitro* dalam kultur jaringan. Cara *in vitro* lebih unggul bila dibandingkan dengan *in vivo* karena dapat mencegah terjadinya penyimpanan genetik dan kontaminasi, dan menghemat tenaga. Sebaliknya, cara *in vitro*

memiliki kelemahan karena membutuhkan fasilitas fermentasi yang mahal, tidak praktis, dan produktivitasnya rendah. Di antara kedua cara tersebut, cara *in vivo* lebih cocok untuk diterapkan di Indonesia.

Produksi bioinsektisida NPV dilakukan dalam empat ruang terpisah, yaitu ruang pembuatan dan penyimpanan pakan buatan, ruang dengan unit untuk pembiakan massal serangga dan unit lain untuk pemeliharaan ulat yang akan diinfeksi NPV, ruang perbanyak NPV, dan ruang *recovery* dan formulasi NPV. Fungsi produksi lainnya seperti *quality control*, *bioassay*, dan karakterisasi produk dilakukan di laboratorium .

Ada tiga tahap kegiatan dalam proses produksi bioinsektisida NPV yaitu :

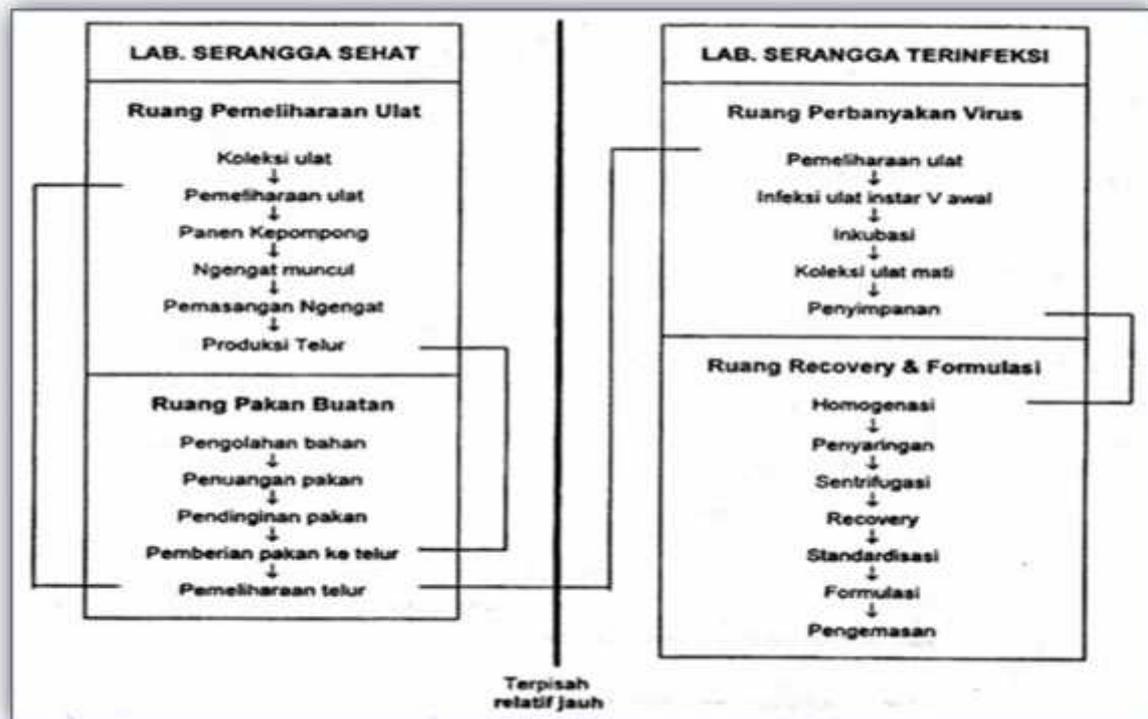
1. Pembiakan massal ulat grayak,
2. Perbanyak dan standardisasi NPV,
3. Pemformulasian NPV.

Langkah-langkah pembuatan :

1. Melarutkan NPV dengan air di dalam gelas ukur
2. Membagi larutan NPV menjadi 2 bagian, yang pertama sesuai dosis anjuran dan yang kedua setengah dosis anjuran
3. Menyiapkan wadah plastik dengan penutupnya 16 buah yang diberi lubang-lubang kecil menggunakan jarum. Wadah ini digunakan untuk tempat pemeliharaan serangga.
4. Memberikan perlakuan pada 8 wadah plastik sesuai dosis anjuran dan 8 wadah plastik setengah dosis anjuran.
5. Memasukkan *Spodoptera litura* kedalam wadah.
6. Memasukkan daun talas yang telah dipotong 3x3 cm dan yang dicelupkan ke larutan NPV sesuai anjuran menggunakan pinset.
7. Memasukkan daun kedalam wadah plastik tempat pemeliharaan serangga.
8. Mengamati selama beberapa hari samapi terdapat *Spodoptera litura* yang mati.

Cara Sederhana, yaitu:

- a. Memblender/menggerus 100 ulat yang terserang NPV
- b. Saring dengan kain kassa rapat untuk menghilangkan kulit ulat atau kaki yang telah digerus
- c. Tambahkan air secukupnya
- d. Aduk rata dengan 1 kg laktosum
- e. Kering anginkan atau dioven (agar terhindar dari jamur)
- f. Setelah formulasi kering kemudian masukkan ke dalam plastik krep
- g. Simpan di dalam freezer jika tidak digunakan secara langsung



KESIMPULAN DAN SARAN

Dari tulisan ini dapat disimpulkan bahwa pestisida kimia dapat dibuktikan dengan nyatadan jelas memberikan dampak buruk terhadap manusia dan lingkungan. Bioinsektisida dapat dikomersialkan melalui suatu proses yang dimulai dengan identifikasi hama, seleksi isolat potensial, perbanyakkan masal dengan fermentasi dan formulasi. Penggunaan bioinsektisida mempunyai prospek baik di luar maupun dalam negeri, oleh karena itu perlu dilakukan *screening* dan karakterisasi jenis-jenis pathogen asal Indonesia untuk dikembangkan menjadi agensia pengendalian hayati potensial.

Saran yang dapat diberikan pada tulisan makalh ini adalah perlu ditingkatkan pembuatan bioinsektisida secara bioteknologi molekuler, ditingkatkan pula pembuatan bioinsektisida yang sesuai dengan penyakit spesifik di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Aditya P, 2007, *Pencemaran Pestisida di Alam*. [http:// www.dizz property.blogspot.com/2007/05/ pencemaran-pestisida.html](http://www.dizzproperty.blogspot.com/2007/05/pencemaran-pestisida.html).
- Akbar w., J. C. Nechols, R.W. Howard, 2004. *Diatomoceus Earth Increases the Effikacy of Bacillus thuringiensis Agaianst Tribolium castaneum larvae and increases Conidia Attacment*. Journal of Economic Enthomology and Microbial Control. <http://www.bru.gmpro.ksu.edu/pdf/>.
- Bahagiawati, 2008, *Penggunaan Bacillus thuringiensis Sebagai Bioinsektisida* (Buletin Agrobio 5 (1)). Balai Penelitian Bioteknologi Dan Sumberdaya Genetik Pertanian Bogor. [http:// www. Biogen.deptan.go.id/terbitan/pds/agrobio_5_1_28.pds.Dent, D](http://www.Biogen.deptan.go.id/terbitan/pds/agrobio_5_1_28.pds.Dent, D).

- R. 1993, *The Use of Bacillus thuringiensis as Insecticide*. In Jones, D. G. (Ed). *Exploitation of Microorganisms*. Chapman and Hall, p. 19-44.
- Bedjo, 2007. Potensi, Peluang dan Tantangan Pemanfaatan *Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus (SINPV) untuk Pengendalian *Spodoptera litura* Fabricius pada Tanaman Kedelai. <http://www.puslittan.bogor.net/index.phpdiakses> 14 mei 2015.
- Fieldman, J. 1997. *The Development of a Comprehensive Resistance Management Plan For Potetos Expressing the cry 3A Endotoxin*. In *Carozi Insect Control. The Role of Transgenic Plants*. Taylor and .Departement of Microbiology and Cel Science University of Florida, USA. <http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/>
- Fuxa, J. R. 1996. *Insect Resistace to Viruses in Parasites and pathogens of Insect*. Academic Press. Florida. pp197-209.
- Hofte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal Crystal Proteins Of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol.Rev.* 53:42-255.
- Indrayani, I.G.A.A. 2000. Musuh Alami serangga Hama Kapas (Kelompok Organisme). Balai Penelitian Tembakau dan Serat. Malang, 26 Juni – 7 Juli 2000.
- Kirland B. H., G. S. Westwood, N. O. Keyhani, 2004. Pathogenicity of *Beauvaria bassiana* and *metarhizium anispliae* to *oxidiae* Tick Species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *Journal of Medical Entomology*
- Marti, G. A., A. C. Scorcetty, A. Siri, 2005. *Isolation of Beauvaria bassiana (Bals) Vuill, (Deuteromicotina: Hypomycetes) from the Changes Desease Vector, Triotoma Infestans (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina*. Pub Med- National Library of Medicine no 584. Argentina. <http://www.ncbi.nlm.gov/entrez>.
- Matten, S. 1998, *EPA Regulation of Resistance Management of Bt Plant pesticide*. A Seminar Presented at a Joint Annual Meeting ESA and APS, Las Vegas, Nevada. November 8-12-1998.
- Margino, S dan S. Mangoendihardjo, 2002. *Pemanfaatan Keanekaragaman Hayati Untuk Biopestisida di Indonesia*. Lokakarya Keanekaragaman Hayati Untuk Perlindungan Tanaman. Yogyakarta 7 Agustus 2002.
- Schuler, T. H. G. M. Poppy, B. R. Kerry, and I. Denholm. 1999. *Potencial Side Effects of Insectresistant Transgenic Plants of Arthropod Natural Enemies*. *Tib Tech.* 17:210-216.
- Sofia Y., 2006. *Pengaruh Pestisida Dalam Lingkungan Pertanian*. Fakultas Pertanian USU. <http://www.Library.usu.ac.id/download/fp-dian.pds>.
- Ton, S. W. 1991. *Enviromental Concidaration With Used of Pesticide on Agriculture*. Paper pada Lustrum ke-VIII. Faperta Usu Medan.
- Volkman, L. E. 1996, *Insect Protection Against Viruses in Scintific Correspondance*. *Nature* 3831-2.