

Uji Toksisitas Isolat Kristal Protein *Bacillus thuringiensis* (Bt) sebagai Agen Pengendali Hama Terpadu Wereng Hijau (*Nepotettix virescens*) Vektor Penyakit Tungro sebagai Upaya Peningkatan Ketahanan Pangan Nasional

SUWARNO, MARIDI, DEWI PUSPITA SARI

Program Studi Pendidikan Biologi, FKIP, Universitas Sebelas Maret Surakarta

*email: suwarnoswami@yahoo.com

Manuscript received: 09 Desember 2014 Revision accepted: 27 Januari 2015

ABSTRACT

Bakteri *Bacillus thuringiensis* adalah salah satu jenis mikroba yang telah dikembangkan sebagai salah satu bioinsektisida karena bersifat patogen terhadap serangga. Sifat dari Kristal protein bakteri *Bacillus thuringiensis* bersifat spesifik terhadap serangga sehingga sangat efektif dan tidak membahayakan organisme non target. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh bioinsektisida dari isolate *Bacillus thuringiensis* yang memiliki konsentrasi tepat untuk mengendalikan serangan hama wereng hijau sebagai agen virus tungro pada tanaman padi. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi isolasi, pemurnian isolat, pemurnian Kristal protein intaseluler dan aplikasi melalui LD50. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi 0,01 ppm, 0,05 ppm, 0,07 ppm, dan 0,1 ppm. Dari hasil penelitian diperoleh hasil konsentrasi LD50 adalah 0,07 ppm.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Bioinsektisida Bt, Pengendali terpadu, wereng hijau

LATAR BELAKANG

Sebagai negara yang memiliki letak didaerah katulistiwa, negara Indonesia memiliki kekayaan flora fauna yang sangat melimpah. Selain kekayaan flora fauna, negara Indonesia juga *Mega diversity* organisme mikro (bakteri dan kapang).

Sebagai negara agraris dan memiliki iklim tropis negara Indonesia memiliki potensi besar menjadi negara yang berswasembada pangan. Untuk mencapai tujuan sebagai negara berswasembada pangan sangat banyak kendala yang harus dihadapi. Sebagai tanaman pangan utama di Indonesia, padi memiliki banyak hama dari jenis serangga salah satunya adalah wereng hijau (*Nepotettix virescens*) yang menjadi vektor penyakit tungro (Brar, *et al*, 2009). Tungro adalah salah satu jenis penyakit yang menyerang tanaman padi yang disebabkan oleh virus. Kerugian yang disebabkan oleh serangan sangat besar dan mampu mengancam tercapainya tujuan sebagai negara berswasembada pangan.

Sudah semestinya untuk dicarikan solusi permasalahan tentang serangan wereng hijau sebagai agen penyakit tungro secara bijaksana. Selama ini para petani hanya menggunakan jenis insektisida kimia yang sama sekali tidak efektif karena selain dapat meracuni lingkungan sehingga mengganggu keseimbangan ekosistem juga dapat menyebabkan resistensi terhadap hama wereng hijau. *Bacillus thuringiensis* (Bt) diketahui memiliki Kristal protein yang mampu mendegradasi saluran cerna dari insekta.

Bacillus thuringiensis (Bt) adalah bakteri gram positif yang berbentuk batang, aerobik dan membentuk spora.

Banyak strain dari bakteri ini yang menghasilkan protein yang beracun bagi serangga. Sejak diketahuinya potensi dari protein kristal Bt sebagai agen pengendali serangga, berbagai isolat Bt dengan berbagai jenis protein kristal yang dikandungnya telah teridentifikasi. Sampai saat ini telah diidentifikasi protein kristal yang beracun terhadap larva dari berbagai ordo serangga yang menjadi hama pada tanaman pangan dan hortikultura. Kebanyakan dari protein kristal tersebut lebih ramah lingkungan karena mempunyai target yang spesifik sehingga tidak mematikan serangga bukan sasaran dan mudah terurai sehingga tidak menumpuk dan mencemari lingkungan.

Isolat 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 dipanaskan 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 isolat Bt.

Produksi bioinsektisida Bt berkembang dengan pesat dari 24 juta dolar Amerika Serikat pada 1980 menjadi 107 juta dolar Amerika Serikat pada tahun 1989. Kenaikan permodalan diperkirakan mencapai 11% per tahun, di

mana pada tahun 1999 mencapai 300 juta dolar Amerika Serikat. Bt yang dikomersialkan dalam bentuk spora yang membentuk inklusi bodi. Inklusi bodi ini mengandung Kristal protein yang dikeluarkan pada saat bakteri lisis pada masa *phase stationary*. Produk ini digunakan sebanyak 10-50 g per *acre* atau 1020 molekul per *acre*. Potensi toksisitasnya berlipat kali dibandingkan dengan pestisida, misalnya 300 kali dibandingkan dengan sintetik pyrethroid (Feitelson *et al.*, 1992). Penggunaan Bt tidak hanya dalam bentuk *microbial spray* yang berkembang di lapang, tetapi juga dalam bentuk tanaman transgenik Bt. Sebagai contoh luas penanaman transgenik Bt di USA meningkat hampir 3 kali lipat, yaitu dari 4 juta ha pada tahun 1997 menjadi 11,5 ha pada tahun 2000 (James, 2000).

Bt-toksin telah digunakan sebagai bahan/agen dalam pengendalian hama secara alami sejak tahun 1950-an, yaitu sebagai insektisidal mikrobial. Namun demikian, insektisidal mikrobial ini mempunyai beberapa kelemahan, antara lain peka terhadap sinar ultraviolet sehingga efektifitasnya terbatas dalam waktu yang pendek. Selain itu, beberapa hama tanaman menyerang pada lokasi yang sulit dicapai oleh insektisidal mikrobial yang umumnya berbentuk tepung atau granular. Dengan berkembangnya teknik rekombinan, beberapa gen yang mengkode Bt-toksin telah berhasil diklon dan diintroduksi ke dalam tanaman. Dengan terintegrasinya gen Bt di dalam sel tanaman dapat memperpanjang peluang Bt dalam mengendalikan hama dan meningkatkan efektifitas pengendalian. Sebagian besar usaha perakitan tanaman transgenik tahan hama menggunakan gen dari *B. thuringiensis*. Pada tahun 1995 tanaman transgenik pertama mulai tersedia bagi petani di Amerika Serikat (jagung hibrida yang mengandung *cry1A(b)*, Maximizer, yang dibuat oleh Novartis, tanaman kapas Bollgard mengandung *cry1A(c)*, yang dibuat oleh Monsanto, dan kentang Newleaf yang mengandung *cry3A*, yang dibuat oleh Monsanto. Pada tahun 1996 luas area pertanaman jagung transgenik hanya 400.000 *acre*, tetapi tahun 1997 luas area meningkat menjadi 3-4 juta *acre* dan pada tahun 1998 mencapai 17 juta *acre* (Matten, 1998).

Berdasarkan dari permasalahan di atas maka penelitian ini akan berfokus pada uji toksisitas isolat kristal protein Bt dan aplikasinya terhadap wereng hijau sebagai agen tungro pada tanaman padi sehingga ditemukan konsentrasi LD50-48 jam yang tepat. Hal tersebutlah yang menjadi kebaruan dalam penelitian ini. Data yang diperoleh dari penelitian ini nantinya dapat dijadikan sebagai dasar dalam pengembangan penelitian selanjutnya dan juga untuk pengembangan pemberantasan hama tanaman ramah lingkungan.

Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi Kristal Bt yang paling efektif sebagai bioinsektisida wereng hijau pada tanaman padi.

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Lab Biologi FKIP UNS, Lab Mikrobiologi UGM dan Lapangan di area persawahan Yogyakarta pada Bulan Juni-September 2014

METODE

Objek Penelitian

Objek penelitian ini adalah Kristal protein Bt

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, Erlenmeyer, petri disk, autoclave, Bunsen, oven, ose, shaker, media NA, media LB, kapas, aluminium foil, korek api, spektrofotometer, gelas beker, Erlenmeyer, timbangan analitik, perangkat sonikasi, pipet mikro, pipet, oven, freezer, evendoff.

Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan uji laboratorium dan data LD-50 dihitung dengan metode Thomson and Weil

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bacillus thuringiensis adalah salah satu mikroorganisme yang memiliki kemampuan sebagai agen pengendali hama hayati terpadu yang tepat guna. *Bt* mengandung Kristal protein yang bersifat toksik terhadap wereng hijau. Keberadaan Kristal *Bt* yang termakan oleh wereng hijau mampu mendegradasi saluran pencernaan sehingga dapat menyebabkan kematian.

B. thuringiensis adalah bakteri yang menghasilkan kristal protein yang bersifat membunuh serangga (insektisidal) sewaktu mengalami proses sporulasinya (Hofte dan Whiteley, 1989). Kristal protein yang bersifat insektisidal ini sering disebut dengan δ -endotoksin. Kristal ini sebenarnya hanya merupakan pro-toksin yang jika larut dalam usus serangga akan berubah menjadi poli-peptida yang lebih pendek (27-149 kd) serta mempunyai sifat insektisidal. Pada umumnya kristal Bt di alam bersifat protoksin, karena adanya aktivitas proteolisis dalam sistem pencernaan serangga dapat 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 membrane di saluran pencernaan dan mengganggu keseimbangan osmotik dari sel-sel tersebut. Karena keseimbangan osmotik terganggu, sel menjadi bengkak dan pecah dan menyebabkan matinya serangga (Hofte dan Whiteley, 1989).

Kristal protein yang termakan oleh serangga akan larut dalam lingkungan basa pada usus serangga. Pada serangga target, protein tersebut akan teraktifkan oleh enzim pencerna protein serangga. Protein yang teraktifkan akan menempel pada protein receptor 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.

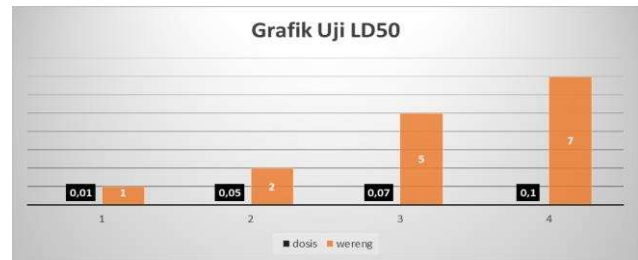
Umumnya strain Bt diseleksi berdasarkan potensinya untuk menghambat pertumbuhan serangga. Karena salah satu kelemahan yang sering dijumpai dalam pengaplikasian Bt di lapang adalah sensitivitasnya terhadap sinar ultra violet (UV) maka seleksi juga harus berdasarkan tingkat ketahanannya terhadap sinar UV. Dengan perkembangan ilmu pengetahuan, maka gen Bt dapat diisolasi. Bahkan dengan teknik rekombinan DNA telah membuka kemungkinan untuk memanipulasi gen Bt sehingga strain Bt menjadi lebih baik. Salah satu teknik yang digunakan adalah menempatkan gen Bt di vektor yang berupa plasmid. Plasmid ini berada di dalam bakteri. Perbaikan bakteri dapat dilakukan dengan cara protoplas transformasi, transduksi, dan konjugasi. Dengan teknik tersebut, tidak hanya dapat dipelajari cara kerja Bt tapi juga memperbaiki formulasi, *host range*, dan toksisitasnya. Di antara ketiga teknik tersebut, teknik konjugasi merupakan teknik yang paling banyak digunakan untuk memperbaiki sifat Bt, yaitu dengan cara mengawinkan strain-strain (*mixture culture*) untuk pertukaran plasmid di antara strain Bt. Cara ini lebih bersifat alami untuk memperbaiki aktivitas Bt dan spektrumnya daripada cara transduksi dan transformasi protoplas. Beberapa penelitian telah dilakukan, misalnya dengan mentransfer gen kristal lepidoptera-aktif ke dalam strain koleoptera aktif untuk mendapatkan strain Bt yang aktif terhadap lepidoptera dan koleoptera (Dent, 1993).

Kristal protein Bt diperoleh melalui tahapan isolasi isolate kemudian biakan yang sudah ada dimurnikan sehingga diperoleh biakan murni. Setelah biakan murni diperoleh dilakukan pemisahan Kristal protein dengan cara isolate murni dishaker selama 7 hari dengan kecepatan 150 rpp setelah itu disonikasi dan disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 3.000 rpm. Tahap selanjutnya adalah pengujian Kristal protein yang diperoleh melalui uji LD50 terhadap wereng hijau dengan konsentrasi yang digunakan adalah 0,01 ppm, 0,05 ppm, 0,07 ppm dan 0,1 ppm.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan tahapan isolasi, pemurnian, pemisahan kristal protein dan uji LD50.

Tabel hasil Uji LD50

Dosis (ppm)	Jumlah wereng	Mortalitas	Periode pengamatan (jam)	r
00,01	10	11	448	1
00,05	10	22	448	2
00,07	10	55	448	5
00,1	10	77	448	7



Grafik 1. Uji LD50

Dari hasil penghitungan dengan metode Thompson dan Weil diperoleh konsentrasi LD50 adalah 0.07 ppm.

Secara keseluruhan Bt endotoksin baik yang digunakan secara *microbial spray* maupun yang berupa tanaman transgenik mempunyai pengaruh terhadap musuh alami. Namun demikian, pengaruh Bt endotoksin terhadap musuh alami lebih kecil dibandingkan dengan pestisida buatan. Pengaruh ini sangat spesifik tergantung jenis gen tahan yang diekspresikan tanaman transgenik, jenis hama, dan jenis predator/parasitnya. Penelitian tentang pengaruh Bt-endotoksin terhadap musuh alami telah dilakukan baik di laboratorium maupun di lapang.

Bt-protoksin yang digunakan sebagai pestisida mikrobial tidak toksik terhadap parasitoid meskipun ada beberapa kasus pengecualian yang telah dilaporkan (Schuler *et al.*, 1999). Serangga parasitoid mempunyai karakteristik yang berbeda antara imago dan larvanya. Tanaman transgenik akan mempengaruhi parasitoid dalam fase larva secara tidak langsung karena parasitoid ini terekspos lebih banyak ke jaringan tubuh larva yang dimakan daripada langsung ke tanaman transgenik. Larva parasitoid akan terekspos ke berbagai protein yang ada di tubuh serangga yang diparasit secara langsung ketika memakan jaringan tubuh inangnya. Ada kemungkinan dosis sublethal dari toksin yang ada di tubuh inang akan meningkatkan daya parasitismenya, yaitu dengan melemahnya sistem imun dari inangnya. Penelitian mengenai pengaruh Bt-toksin pada dosis sublethal terhadap hama kubis *diamond backmoth (Plutella xylostella)*, ternyata ditemukan bahwa Bt dapat memperpanjang periode pupa dari parasit braconid *Cotesia plutellae*. Namun demikian, tidak dijumpai pengaruhnya terhadap braconid lainnya, yaitu *Diadegma insulare* yang juga memangsa *P. xylostella* (Schuler *et al.*, 1999).

Pengaruh negatif juga tidak dijumpai pada parasitoid hama kubis lainnya seperti hama *Helicoverpa armigera* dengan parasit *Microplitis croceipes* (Blumberg *et al.*, 1997). Percobaan lapang dengan tanaman transgenik tembakau yang mengekspresikan Bt-toksin dalam level rendah menunjukkan adanya sinergistik dengan parasitoid *C. sonorensis* dalam mengendalikan *H. virescens*. Perpanjangan periode larva pada *H. virescens* yang makan tanaman tembakau Bt memperpanjang *C. sonorensis* sebagai parasit *H. virescens* (Johnson, 1997).

KESIMPULAN

1. Bakteri *Bacillus thuringiensis* memiliki kristal protein yang memiliki kemampuan mendegradasi saluran pencernaan wereng hijau sehingga sangat tepat untuk dijadikan PHT.
2. Pada pengujian diperoleh konsentrasi LD50 adalah 0,07 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Bahagiawati. Penggunaan *Bacillus thuringiensis* sebagai Bioinsektisida. Buletin AgroBio 5 (1) 21-28.
- Blumberg, D., A. Navon, S. Keren, S. Goldenberg, & S.M. Ferkovich. (1997). Interaction among *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), its larval endoparasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), and *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 90:1181- 1186.
- Burgess, H.D. (1981). *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic press, London.
- 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
- Dunkle, R.L. & B.S. Sasha. (1989). Response of starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis* containing ultra violet screens to sunlight. Environmental Entomology 18:1035-1041.
- Fieldman, J. & Stone, T. (1997). The development of a comprehensive resistance management plan for potatoes expressing the *cry3A* endotoxin. In Carozzi, N. and M. Koziel (Eds.). *Advance in Insect Control*. The Role of Transgenic Plants. Taylor and Francis. p. 49-61.
- Feitelson, J.S., Payne, J. & Kim, L. (1992). *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. Bio/Technology 10: 271-275.
- Forcada, C.E., Alcacer, M.D. Garcera, & Martinez, R. (1996). Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one is susceptible and one resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Arch. Insect Biochem. Physiol. 3:257-272.
- Hilbeck, A., M. Baumgartner, P.M. Fried, & Bigler. F. (1998). Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Environ. Entomol. 27:480-487.
- Huang, F., Buschman, L.I. Higgins, R.A. & McGaughey, W.H. (1999). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. Science 284:965-967.
- Hofte, H. & Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53; 42-255.
- Madigan, Michael T., Martiko, John M., Dunlap, Paul V. Clark & David P. Brock: *Biology of Micoorganisms*. 12th ed. 2009. San Francisso : Pearson Benjamin Cummings
- Sutanto, R. *Penerapan Pertanian Organik*. (2002). Yogyakarta: Kanisus.
- Tortora, Gerard J., Funke, Berdell R., Case, Christine L. *Microbiology*. 10th ed. (2010). San Francisso: Pearson Benjamin Cummings.
- Van Rie, J., McGaughey, W.H., Johnson, D.E., Barnett, B. & Mellaert, H. V. (1990). Mechanism of insect resistance to microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 247:72-74.