

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PATOGEN SERANGGA DARI TANAH GAMBUT KALIMANTAN TENGAH SEBAGAI AGENS HAYATI PADA *SPODOPTERA LITURA*

Army Dita Serdani¹, Istiqomah²

¹ Prodi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Islam Balitar

² Prodi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Darul Ulum Lamongan
email: ditaarmy@gmail.com

ABSTRAK

Patogen serangga telah banyak digunakan sebagai pengendali hama yang efektif dalam mengendalikan hama sasaran. Tanah gambut memiliki kandungan bahan organik yang tinggi, sehingga sesuai bagi kehidupan bakteri patogen serangga. Hama penting di agroekosistem gambut adalah *Spodoptera litura*. Pengendalian *S. litura* dapat dilakukan dengan menggunakan bakteri patogen serangga. Tujuan mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri patogen serangga serta mengukur tingkat virulensi isolat dari tanah gambut Kalimantan Tengah terhadap larva *S. litura*. Metode penelitian adalah eksploratif dengan tiga kegiatan pokok yaitu isolasi, identifikasi dan uji virulensi bakteri patogen serangga. Hasil menunjukkan bakteri patogen serangga yang didapatkan dari lahan gambut sebanyak tujuh isolat yang merupakan bakteri Gram negatif, salah satu diantaranya adalah *Pseudomonas pseudomallei*.

Kata Kunci: isolasi, tanah gambut, patogen serangga

ABSTRACT

Insect pathogens have been widely used as effective pest controllers in controlling target pests. Peat soil has a high content of organic matter, making it suitable for bacterial insect pathogenic. An important pest in peat agroecosystem is Spodoptera litura. S. litura control can be done by using insect pathogenic bacteria. The purpose of isolating and identifying insect pathogenic bacteria and measuring the virulence level of isolates from peat soil of Central Kalimantan against S. litura larvae. The research method is exploratory with three main activities, namely the isolation and identification of insect pathogenic bacteria and fungi. The results showed that the insect pathogenic bacteria obtained from peatland extract were seven isolates which were Gram negative bacteria, one of which was Pseudomonas pseudomallei.

Keywords: isolation, peat soil, insect pathogens

PENDAHULUAN

Patogen serangga memberikan peranan dalam mengendalikan berbagai jenis hama yang ditemui di areal pertanian maupun hutan. Beberapa bakteri yang digunakan yaitu *Serratia* sp dan *Bacillus thuringiensis* (Flint dan Dreistadt, 1998). Patogen serangga dapat ditemukan di air, udara dan tanah. Tanah gambut memiliki potensi sebagai *reservoir* alami bagi pertumbuhan jamur patogen serangga (Hasyim *et al.*, 2009). Sifat unik dari tanah gambut tersebut menyebabkan mesofauna seperti jamur dan bakteri dapat didapatkan dari rizosfer gambut.

Isolasi merupakan salah satu cara untuk mendapatkan mikroorganisme bermanfaat yang ada pada suatu ekosistem. Jami'a (2013) melaporkan telah mengisolasi golongan jamur *Trichoderma* sp., *Monocilium* sp., dan *Penicillium* sp dari tanah gambut di tanah percobaan UIN Suska Riau. Sementara itu, bakteri dan jamur patogen serangga telah dilaporkan terdapat pada tanah gambut Kalimantan Barat, yaitu *B. bassiana*, *M.*

anisopliae dan *B. thuringiensis* (Ramadhan dan Kukuh, 2012). Isolat bakteri dan jamur patogen serangga dari tanah gambut Kalimantan Barat dan Riau berbeda. Hal ini sejalan dengan Fergeus dan Remaudiere (1977) bahwa keberadaan patogen serangga dipengaruhi oleh keadaan ekologi yang terjadi berdasar waktu dan wilayah (temporal dan spasial).

Kelurahan Kalamangan, Kecamatan Subangau, Kalimantan Tengah merupakan daerah tanah gambut yang dimanfaatkan sebagai sentral lahan pertanian yang bermasalah dengan adanya serangan *S. litura* (Thamrin *et al.*, 2002). Penelitian bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri dan jamur patogen serangga serta mengukur tingkat virulensi isolat dari tanah gambut Kalimantan Tengah terhadap larva *S. litura*.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang bulan Maret sampai dengan Desember 2014. Tanah gambut berasal dari Palangkaraya, Kalimantan Tengah dari tanah dengan dua sistem pola tanam yaitu polikultur (sawi dan jagung) dan monokultur (sawi) pada tanah dengan ketinggian 25 mdpl dan 28 mdpl.

Pengambilan Sampel Tanah Gambut

Pengambilan sampel tanah dilakukan di Kelurahan Kalampangan, Kecamatan Sabangau, Kota Palangkaraya, Kalimantan Tengah. Pada masing-masing daerah tanah diambil dari tanah yang telah ditanami sawi (monokultur) dan polikultur (jagung dan sawi). Terdapat 20 sampel tanah yang diamati, terdiri dari 10 sampel polikultur (T3P1, T3P2, T3P3, T3P4, T3P5, T6P1, T6P2, T6P3, T6P4, T6P5) dan 10 sampel monokultur (T3M1, T3M2, T3M3, T3M4, T3M5, T6M1, T6M2, T6M3, T6M4, T6M5). Tanah gambut diambil dengan kedalaman 5- 10 cm secara acak pada perpotongan diagonal di dekat perakaran (Purwantisari dan Rini, 2009).

Isolasi Patogen Serangga

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode umpan serangga (*insect bait method*). Isolasi merupakan modifikasi dari Hasyim dan dan Azwana (2003) dengan menggunakan ulat hongkong sebagai media umpan patogen serangga pada tanah di sekitar perakaran pisang.

Langkah yang dilakukan ialah dengan memasukkan tanah ke dalam toples dan memasukkan ulat *T. molitor* sebanyak 20 ekor. Toples dilapisi koran untuk membuat ruangan menjadi gelap. Proses inkubasi dilakukan hingga 14 hari. Ketika serangga terinfeksi disterilisasi (Sun dan Xing-Zhong, 2008). Ulat yang telah steril kemudian di tanam pada media *Natrium Agar* (NA) dan diinkubasi selama tiga hari.

Identifikasi Bakteri Patogen Serangga

Identifikasi bakteri yang didapatkan dilakukan dengan dua tahapan yaitu secara morfologis dan biokimia. Identifikasi secara morfologis dilakukan dengan pengamatan koloni. Menurut Widiyanti *et al* (2011) parameter karakter koloni meliputi bentuk koloni, permukaan, tepi dan warna koloni. Bakteri dengan kemampuan mortalitas terbaik setelah dilakukan penentuan Gram bakteri dengan pengujian KOH dan pengecatan Gram maka dilakukan uji biokimia. Pengujian

biokimia dengan memberikan sampel isolat terbaik ke Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui jenis dari bakteri tersebut hingga tingkat spesies.

Virulensi pada Larva *S. litura*. Isolat bakteri patogen serangga yang telah dibiakkan selama 1 x 24 jam pada media NA dipanen dengan menambahkan 5 ml aquades steril ke dalam cawan dan koloni bakteri diluruhkan dengan menggunakan *glass L*. Suspensi diukur Optical Density (OD)=1 dengan menggunakan spektrofotometer. Suspensi bakteri patogen serangga dengan OD=1, diambil sebanyak 0,01 ml dan dengan menggunakan metode *spread plate* diratakan pada media NA dengan menggunakan *glass L*. Setelah diketahui kerapatan konidia OD=1, maka suspensi diaplikasikan dengan kerapatan 1×10^6 cfu/ml.

Aplikasi antara bakteri patogen serangga menggunakan metode celup yaitu dengan pencelupan pakan (*food dipping*) Bakteri akan menginfeksi melalui sistem pencernaan.

Pemberian pakan dilakukan dengan memotong daun bayam dengan ukuran 5 x 5 cm sebanyak enam lembar (modifikasi metode Ramadhan dan Kukuh, 2012). Pemberian pakan pada aplikasi bakteri dan jamur patogen serangga dilakukan dan diganti setiap hari. Percobaan diulang sebanyak tiga kali. Mortalitas diamati setiap hari hingga hari ketujuh setelah aplikasi bakteri dan jamur patogen serangga.

Analisis Data Isolat bakteri patogen serangga yang diperoleh dianalisis dengan metode deskriptif berdasarkan hasil identifikasi secara mikroskopis dan makroskopis. Mortalitas dan waktu kematian serangga dianalisis menggunakan sidik ragam dengan taraf kepercayaan 5% dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Spesies Bakteri Patogen Serangga dari Tanah Gambut

Berdasarkan hasil isolasi dari tanah gambut Palangkaraya Kalimantan Tengah secara keseluruhan diperoleh tujuh isolat bakteri (Tabel 1). Terdapat tiga isolat yang memiliki kesamaan morfologi baik bentuk, warna, tepi, dan elevasi. Hal ini dapat ditemukan pada isolat T6P-1, T3P-1, dan T3M-1 yang memiliki warna pada kisaran merah-merah muda, bentuk bulat, dengan tepi rata dan elevasi cembung. Sementara itu, isolat T3M-3, T6P-2, dan T3P-1 memiliki warna putih

susu, berbentuk bulat dengan tepi rata dan elevasi cembung. Isolat T6P-3 memiliki warna putih keruh dengan bentuk tak beraturan, tepi bergerigi dan elevasi rata

Tabel 1. Morfologi Isolat Bakteri Patogen Serangga Hasil Isolasi dari Tanah Gambut

No	Isolat	Warna	Bentuk	Tepi	Elevasi
1	T6P1	Merah pekat	Bulat	Rata	Cembung
2	T3P1	Merah	Bulat	Rata	Cembung
3	T3M	Merah muda	Bulat	Rata	Cembung
4	T3M3	Putih susu	Bulat	Rata	Cembung
5	T6P3	Putih keruh	Tak beraturan	Bergerigi	Rata
6	T6P2	Putih susu	Bulat	Rata	Cembung
7	T3P1	Putih susu	Bulat	Rata	Cembung

Keterangan: T= Titik P= Polikultur M= Monokultur

Dari hasil identifikasi isolat bakteri T6P1, T3P1 dan T3M1 diduga merupakan genus *Serratia* sp. Dari hasil pengujian fisiologi dengan pengecatan Gram dapat diketahui spora isolat bakteri berwarna merah dengan bentuk spora bulat (*coccus*) Warna spora merah dan adanya benang saat pengujian KOH menunjukkan bakteri merupakan bakteri Gram negatif. Menurut Hejazi dan Falkiner (1997) *Serratia* sp. bersifat motil, dengan bentuk spora batang, bersifat Gram negatif dan merupakan bakteri fakultatif anaerob. Dari hasil pengujian biokimia isolat bakteri T6P3 merupakan *Pseudomonas pseudomallei*. Hasil biokimia menunjukkan bakteri merupakan Gram negatif yang mampu mereduksi glukosa dan urease. Bakteri *P. pseudomallei* dikenal juga dengan nama *Burkholderia pseudomallei* yang merupakan bakteri Gram negatif kelompok *Pseudomonas*.

Bakteri *P. pseudomallei* telah banyak digunakan penelitian sebagai agens pengendali serangga yaitu *P. pseudomallei* dengan letal dosis sedang dapat menyebabkan kematian pada larva *Galleria mellonella* (Wand *et al.*, 2011). Menurut Sani dan Utami (2013) menyatakan bahwa isolat kombinasi antara *P. pseudomallei* dan *Klebsiella ozaenae* dengan konsentrasi 1,5 ml dapat mengendalikan mortalitas larva dan pupa nyamuk *Aedes aegypti* sebesar 97,5% dalam 10 hari.

Virulensi dan Mortalitas Bakteri Patogen Serangga Mortalitas *S. litura* terhadap Bakteri Patogen Serangga

Berdasarkan analisa sidik ragam pemberian isolat terhadap serangga uji dapat dilihat tingkat mortalitasnya. Dari hasil uji lanjut dengan menggunakan Duncan dengan tingkat ketelitian 0,05 dapat diketahui bahwa semua isolat berbeda nyata terhadap kontrol.

Namun, antar isolat bakteri tidak berbeda nyata. Artinya masing-masing isolat memiliki kemampuan untuk membunuh serangga uji. Kemampuan bakteri patogen serangga menginfeksi serangga dipengaruhi oleh toksin yang dihasilkan. Salah satu sub kelas dari eksotoksin adalah enterotoksin, yaitu protein toksin ekstraseluler bakteri yang umumnya memberikan efek toksik pada saluran pencernaan (Akhdia *et al.*, 2007).

Ketika isolat tersebut diinfeksi melalui pakan dan termakan oleh *S. litura* maka toksin akan merusak sistem pencernaan larva, sehingga mengakibatkan nafsu makan larva menurun, malas bergerak dan berakhir dengan kematian. Isolat bakteri yang mampu menyebabkan mortalitas hingga 35% dengan waktu kematian empat hari ialah T6P-3 yang merupakan *P. pseudomallei*.

Tabel 2. Mortalitas Isolat Bakteri Patogen Serangga terhadap *S. litura*.

No	Isolat	Mortalitas (%)	Waktu Kematian (hari)
1	T6P1	28,33 b	3,05 a
2	T3P1	26,67 b	4,11 a
3	T3M1	18,33 b	3,69 a
4	T3M3	21,67 b	4,13 a
5	T6P3	35,00 b	4,03 a
6	T6P2	21,67 b	4,95 a
7	T3P1	18,33 b	5,08 a
8	Kontrol	0 a	-

Waktu kematian *S. litura* terjadi pada 3,05-5,08 hari. Dalam menyerang tubuh inang, bakteri dapat menyerang pada seluruh tubuh inang meskipun bakteri patogen hanya berkoloni disatu tempat saja. Hal ini disebabkan oleh adanya toksin yang dimiliki oleh bakteri. Ketika bakteri masuk ke dalam tubuh serangga yang rentan melalui sistem pencernaan, sel vegetatif akan tumbuh dari percambahan spora yang akan masuk ke dalam haemocoel dan berkembang dengan cepat melalui penghancuran jaringan yang mengandung fosfolipida, sehingga memenuhi seluruh rongga tubuh dan menyebabkan septicaemia (Bravo, 2007).

KESIMPULAN

1. Isolasi tanah gambut dengan metode umpan serangga didapatkan tujuh isolat bakteri yaitu T6P1, T3P1, T3M1, T3M3,

T6P2, T3P1 dan T6P3. Salah satu bakteri dari hasil pengujian biokimia merupakan bakteri *P. pseudomallei*

2. Dari hasil analisis ragam uji virulensi menunjukkan isolat bakteri patogen serangga dapat menyebabkan mortalitas pada *S.litura* namun antar isolat bakteri tidak berbeda nyata dan hasil pengujian biokimia menunjukkan bakteri T6P3 merupakan *Pseudomonas pseudomallei*.

DAFTAR PUSTAKA

- Hasyim, A. Nuraida, Trizelia. 2009. Patogenisitas Jamur Entomopatogen terhadap Stadia Telur dan Larva Hama Kubis *Crociodomia pavonana* Vuill terhadap *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera:Plutellidae). *Agritrop*. 24(2): 52-57.
- Hejazi A, Falkiner FR. 1997. *Serratia marcescens*. *J. Med. Microbiol*. 46: 903–912.
- Ramadhan, T. R. dan Kuku Hernowo. 2012. Isolasi Entomopatogen Lahan Gambut di Kalimantan Barat dan Determinasi Virulensinya sebagai Material Bioinsektisida. *J. Perkebunan & Lahan Tropika*. 2(2): 51-57.
- Schaad, N W. 1998. *Plant Pathogenic Bacteria*. 2nd Edition. The American Phytopathological Society. U.S.A. Hal 165.
- Schell, M., Lyla L., dan David D. 2008. Comparative Genomics and an Insect Model Rapidly Identify Novel Virulence Genes of *Burkholderia malle*. *J. Bacteriol*. Hal 1-2
- Thamrin, M., S.Asikin dan M.Najib. 2003. Eksplorasi Unsur Esensial Komponen Pengendalian Hama Terpadu Bagi Hama Tanaman di Lahan Gambut. *Balitran Banjarbaru*.
- Wan, M., Claudia M., Richard W., dan Stephen L. 2011. Macrophage and *Galleria mellonella* infection model reflect the virulence of naturally occurring isolates *B. pseudomallei*, *B. thailensis* and *B. oklahomensis*. *BMC Microbiology*. 11: 2-11.