

UJI PATOGENISITAS ISOLAT *ENTEROBACTER AEROGENES* B4 SEBAGAI BIOINSEKTISIDA TERHADAP HAMA KUBIS

Eunike Lisa Djojokusumo¹, Theresia Desy Askitosari^{1*}, Hari Purwanto²

¹ Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya, Raya Kalirungcut, Surabaya 60293

² Fakultas Farmasi Universitas Surabaya, Raya Kalirungcut, Surabaya 60293

*Corresponding author: desy_askito@staff.ubaya.ac.id

Abstract—Various efforts have been made to improve the quality of crop production, cabbage was one of them. Cabbage is one of the largest export horticultural commodities in Indonesia. Loss often happened because of insect pests. Armyworm (*Spodoptera litura*) is one of the pests that are often found in cabbage plants. To handle pest attacks, farmers can replace chemical insecticides uses to bioinsecticides. This study tested the pathogenicity of *Enterobacter aerogenes* B4 isolates against *Spodoptera litura* by exposing the isolates through feed and injection. In pathogenicity test through feed, isolates with concentrations of 10^5 , 10^6 , and 10^7 CFU/mL were used. The highest mortality was found in larva with exposure of isolates with a concentration of 10^7 CFU/mL as many as 9 caterpillars dies for 6 days. LC50 calculation could not be carried out because the mortality of larva with the highest concentration did not reach 50%. Then in the pathogenicity test through injection, no death was found after exposure for 2 days. The results obtained from both pathogenicity tests were *Enterobacter aerogenes* B4 isolates were not pathogenic to *Spodoptera litura*.

Keywords: armyworm (*spodoptera litura*), bioinsecticide, patogenicity test

Abstrak—Berbagai macam upaya dilakukan untuk meningkatkan kualitas produksi tanaman, salah satunya kubis. Kubis merupakan salah satu komoditas hortikultura ekspor terbesar di Indonesia. Tak jarang terjadi gagal panen disebabkan oleh serangan hama serangga. Ulat grayak (*Spodoptera litura*) merupakan salah satu hama yang sering ditemukan pada tanaman kubis. Untuk menangani serangan hama petani dapat beralih dari insektisida kimia menggunakan bioinsektisida. Penelitian ini melakukan uji patogenesis isolat *Enterobacter aerogenes* B4 terhadap *Spodoptera litura* dengan memaparkan isolat melalui pakan dan injeksi. Pada pengujian patogenesis melalui pakan digunakan isolat dengan konsentrasi 10⁵, 10⁶, dan 10⁷ CFU/mL. Didapatkan kematian ulat terbanyak pada ulat dengan paparan isolat konsentrasi 10⁷ CFU/mL sebanyak 9 ekor ulat selama 6 hari. Tidak dapat dilakukan penghitungan LC50 karena kematian ulat dengan konsentrasi tertinggi tidak mencapai 50%. Lalu pada pengujian patogenesis melalui injeksi tidak didapatkan kematian ulat setelah paparan selama 2 hari. Hasil yang didapatkan dari kedua pengujian patogenesis yaitu isolat *Enterobacter aerogenes* B4 tidak bersifat patogen terhadap *Spodoptera litura*.

Kata kunci: ulat grayak (*spodoptera litura*), bioinsektisida, uji patogenesis

Pendahuluan

Kubis merupakan salah satu produk pertanian yang sudah sangat umum ditemukan di berbagai tempat. Menurut Rukmana (1994) kubis termasuk salah satu komoditas ekspor unggulan Indonesia. Berbagai upaya dilakukan untuk meningkatkan produksi tanaman untuk memenuhi kebutuhan peminatnya, tetapi petani kubis seringkali dirugikan dengan keberadaan hama kubis. Beberapa jenis hama yang kerap kali ditemukan pada tanaman kubis adalah ulat tretep (*Plutella xylostella*), ulat grayak (*Spodoptera litura*), dan ulat krop kubis (*Crociodolomia binotalis*). Untuk mengendalikan hama tersebut petani biasanya menggunakan insektisida kimiawi karena dinilai lebih cepat dan ampuh dalam membunuh hama, tetapi penggunaannya dapat mengakibatkan resistensi hama dan terbunuhnya bakteri dan makhluk hidup lain yang dapat berdampak baik bagi tanaman kubis. Insektisida kimiawi yang digunakan secara terus menerus akan berdampak pada ekosistem menjadi tidak stabil, bahkan dapat menyebabkan ledakan populasi hama karena hama menjadi resisten terhadap insektisida.

Berdasarkan data dari Badan Pusat Statistik, pada tahun 2013 terjadi penurunan produksi kubis pada daerah Sumatra Utara, Jambi, dan Sumatra Selatan. Jika dibandingkan dengan tahun 2012. Di daerah Sumatra Utara pada tahun 2012 memproduksi tanaman kubis sebanyak 180.162 ton, sedangkan pada tahun 2013 hanya menghasilkan 165.589, sehingga pada daerah Sumatra Utara mengalami penurunan produksi sebesar 14.573 ton. Lalu di daerah Jambi dan Sumatra Selatan memproduksi kubis sebesar 26.442 ton dan 26.592 ton pada 2012, sedangkan pada 2013 di Jambi hanya memproduksi sebesar 15.220 ton dan Sumatra

Selatan 16.155 ton, sehingga pada kedua daerah tersebut berturut turut mengalami penurunan produksi tanaman kubis sebesar 11.222 ton dan 10.437. Hal ini menimbulkan kerugian yang cukup besar bagi para petani, sehingga perlu dilakukan pengendalian yang tepat agar tidak terjadi penurunan produksi terus menerus. Bioinsektisida dapat menjadi pilihan yang tepat dalam mengatasi hama. Bioinsektisida berasal dari mikroorganisme yang memiliki senyawa yang toksin bagi hama serangga maupun vektor pembawa penyakit tanaman sehingga dapat membunuh hama. Penggunaan insektisida kimia dapat digantikan dengan bioinsektisida karena memiliki banyak keunggulan seperti memiliki sifat yang spesifik terhadap hama target sehingga tidak mempengaruhi organisme yang menguntungkan bagi tumbuhan. Lalu penggunaannya yang aman dan ramah lingkungan sehingga tidak merusak lingkungan tumbuhan serta tidak adanya penumpukan residu kimia di tanah (Marwoto, 2008). Pada penelitian yang dilakukan Nathania (2015) ditemukan 2 jenis bakteri yang diuji berpotensi sebagai bioinsektisida, yaitu isolat B 3.1 dan B4. Isolat *Enterobacter aerogenes* B4 memiliki kemiripan 99% dengan *Enterobacter aerogenes* strain KCTC 2190.

Pada penelitian kali ini akan dilakukan pengujian kemampuan Isolat *Enterobacter aerogenes* B4 sebagai biopestisida larva *Spodoptera litura* F (hama pada tanaman kubis). Kemampuan Isolat *Enterobacter aerogenes* B4 dalam membunuh *Spodoptera litura* diukur dengan menentukan nilai LC50. Hal ini dapat ditentukan dari konsentrasi isolat Isolat *Enterobacter aerogenes* B4 yang dapat membunuh populasi hama hingga mencapai 50% (Andjani, 2019). Nilai LC50 diperoleh dari persamaan regresi linier dan dihitung berdasarkan jumlah total kematian hama *Spodoptera litura* F. Dengan diketahuinya kemampuan patogenisitas isolat *Enterobacter aerogenes* B4, diharapkan dapat membantu mengurangi kerugian produksi kubis akibat adanya hama *Spodoptera litura* dan juga memanfaatkan isolat *Enterobacter aerogenes* B4 dalam bioinsektisida kedepannya.

Metode Penelitian

Dilakukan pengujian patogenisitas isolat *Enterobacter aerogenes* B4 terhadap larva *S. litura*. Parameter yang diukur pada pengujian ini adalah konsentrasi isolat *Enterobacter aerogenes* B4 untuk membunuh *Spodoptera litura*, serta dilakukan analisa probit dan pengamatan morfologi larva yang mati. Metode kerja yang dilakukan pada penelitian ini meliputi *recovery* isolat *Enterobacter aerogenes* B4, analisa kultur dengan *gram staining*, penentuan Angka Lempeng Total, dan pembuatan kurva pertumbuhan. Lalu dilakukan uji patogenisitas terhadap larva *S. litura* dan dianalisa secara deskriptif serta menggunakan mikroskop fase kontras pada cairan haemolimfe ulat yang sudah mati. Data yang diperoleh dari penelitian ini diolah dan disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel untuk mengetahui kemampuan isolat *Enterobacter aerogenes* B4 dalam membunuh *S. litura*.

Recovery Isolat *Enterobacter aerogenes* B4

Isolat *Enterobacter aerogenes* B4 dibiakkan pada media Luria Bertani *broth* dan diinkubasi dengan incubator shaker pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan pewarnaan gram, pembuatan kurva pertumbuhan, serta penghitungan angka Lempeng Total (ALT). Setelah dilakukan analisa dari hasil pengujian, isolat uji ditanam pada media *Nutrient agar slant* dan siap dibawa menuju Universitas Gajah Mada Yogyakarta untuk dilakukan uji patogenisitas pada larva uji.

Persiapan Uji Patogenisitas Isolat *Enterobacter aerogenes* B4

Isolat *Enterobacter aerogenes* B4 dikulturkan pada media Luria Bertani *broth* kemudian dilakukan penghitungan ALT dan analisa isolat menggunakan mikroskop fase kontras. Hal ini dilakukan untuk memastikan ulang tidak terdapatnya kontaminan pada isolat serta mengetahui konsentrasi bakteri yang digunakan.

Pengujian Patogenisitas Isolat *Enterobacter aerogenes* B4

Pengujian patogenisitas dilakukan dengan pemberian pakan buatan yang sudah ditetaskan isolat *Enterobacter aerogenes* B4 di permukaannya dan injeksi pada *S. litura*. Untuk uji patogenisitas melalui pakan, digunakan konsentrasi isolat 10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/mL serta larutan NaCl untuk kontrol negatif dan toksin BT dari produk komersil bernama "Dipel" untuk kontrol positif yang akan ditetaskan sebanyak 100 μ L pada pakan buatan berukuran 5 mm \times 5 mm \times 5 mm. Jumlah larva uji yang digunakan pada tiap perlakuan sebanyak 30 ekor yang meliputi tiga kali ulangan dengan masing masing ulangan sebanyak 10 ekor larva. Pakan buatan yang sudah ditetaskan isolat berbagai macam konsentrasi diberikan pada 150 ekor ulat *S. litura* yang telah dilaparkan selama 6 jam. Lalu dilakukan penghitungan pada tiap larva *S. litura* yang mati dari tiap perlakuan.

Uji patogenisitas melalui injeksi dilakukan dengan menginjektikan isolat menuju saluran pencernaan ulat secara langsung. Mula mula isolat yang telah disubkultur pada media LB *broth* disentrifugasi selama 3 menit, kemudian supernatan dibuang dan dimasukkan NaCl 0,9% sebanyak 1 mL. Lalu pelet divortex hingga terlarut dengan NaCl 0,9%, setelah itu dilakukan sentrifugasi kembali selama 3 menit. Tahap ini diulang hingga 3 kali untuk mendapatkan isolat bakteri saja. Supernatan dibuang kembali dan dimasukkan 100 μ L NaCl 0,9% kemudian divortex kembali. Larutan yang didapatkan dimasukkan kedalam *syringe* dan disuntikkan pada tengah kedua kaki depan ulat sebanyak 10-20 μ L.

Analisa Data Hasil Pengujian Patogenisitas

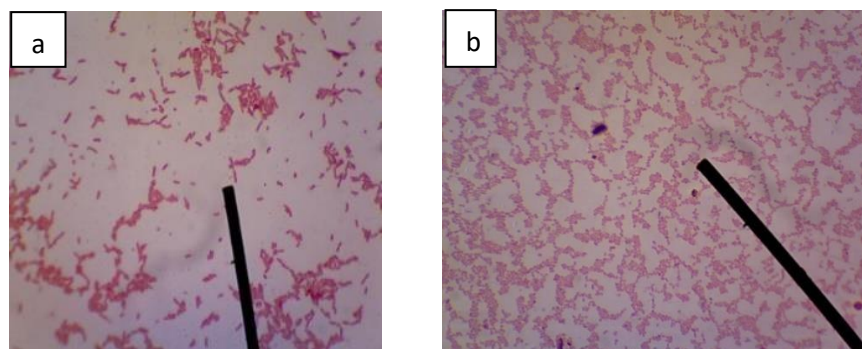
Pada uji patogenisitas melalui pakan dan injeksi dilakukan analisa yang meliputi analisa deskriptif berdasarkan hasil pengamatan morfologi larva yang mati. Jumlah ulat yang mati tiap harinya pada tiap ulangan diamati dan dilakukan analisa berdasarkan ciri kematian yang terdapat pada bangkai ulat. Kemudian dilakukan penjelasan morfologi terkait kematian ulat pada tiap harinya.

Analisa Haemolimfe Ulat Setelah Perlakuan

Analisa haemolimfe ulat dilakukan dengan membunuh ulat terlebih dahulu. Mula mula ulat yang dipilih dimasukkan kedalam *freezer* selama 10-15 menit hingga tidak bergerak lagi. Kemudian ulat diikat pada bagian ujung kepala dan anusnya untuk menghindari adanya cairan lain yang keluar dari kedua ujung sehingga hasil analisa merupakan cairan haemolimfe. Lalu ulat yang sudah diikat direndam dan digoyangkan pada larutan Bayclin 0,25%. Setelah itu ulat dikeringkan dan kaki ulat dipotong, diambil cairan yang keluar dari luka potongan tersebut menggunakan *syringe*. Lalu cairan diletakkan pada kaca objek dan siap untuk dianalisa dengan menggunakan mikroskop fase kontras.

Hasil Penelitian

Hasil Pewarnaan Gram

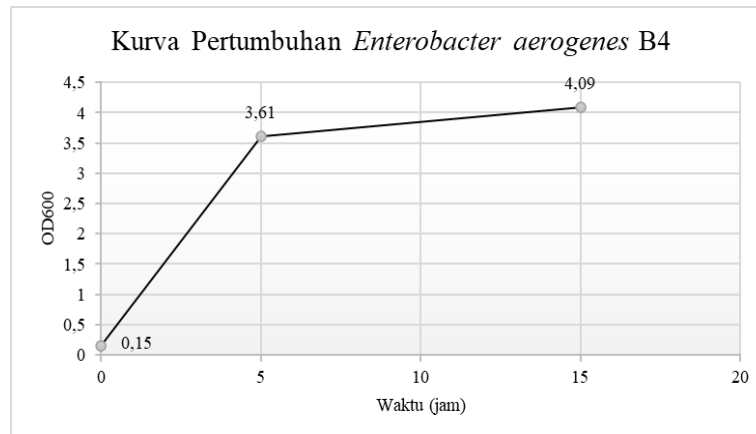


Gambar 1. Hasil Pewarnaan Gram Isolat *Enterobacter aerogenes* B4 (a) sebelum dan (b) sesudah dilakukan uji patogenisitas Perbesaran 1000x.

Dapat dilihat pada gambar (a), morfologi dari bakteri tampak seragam berbentuk *bacil*. Warna yang diserap oleh dinding sel bakteri juga sama pada tiap selnya, yaitu pewarna fuchsin. Hal ini menunjukkan keseragaman dan ciri-ciri yang dapat dilihat memiliki kesamaan dengan isolat *Enterobacter aerogenes*. Ini menunjukkan bahwa isolat yang digunakan merupakan kultur murni dari isolat *Enterobacter aerogenes* B4.

Kemudian setelah pengujian patogenisitas isolat *Enterobacter aerogenes* B4 di UGM Yogyakarta dilakukan pengecekan kembali isolat dengan pewarnaan gram untuk mengetahui apakah terdapat kontaminasi pada isolat selama pengujian berlangsung. Dari hasil pewarnaan gram (b), didapatkan koloni dengan morfologi yang sama seperti (a). Hal ini menunjukkan tidak adanya kontaminan pada isolat *Enterobacter aerogenes* B4.

Hasil Pembuatan Kurva Pertumbuhan



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Isolat *Enterobacter aerogenes* B4.

Gambar 2 merupakan gambar kurva pertumbuhan bakteri yang telah mencapai fase stasioner setelah diinkubasi selama 15 jam. Dilakukan pengukuran nilai *Optical Density* (OD) pada saat sebelum dilakukan inkubasi, setelah inkubasi selama 5 jam dan 15 jam. Waktu pengukuran nilai OD ditentukan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Nathania (2015) menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 600 nm. Hal ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat yang digunakan mengalami penurunan yang berarti atau tidak, mengingat isolat *Enterobacter aerogenes* B4 telah disimpan selama 6 hingga 7 tahun lamanya. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa pertumbuhan isolat tidak mengalami penurunan yang berarti.

Hasil Perhitungan Angka Lempeng Total (ALT)

Isolat *Enterobacter aerogenes* B4 yang telah diencerkan hingga konsentrasi 10^{-7} ditanam pada media Nutrien *Agar*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Digunakan 3 kali ulangan pada tiap konsentrasi, pada NA yang diinokulasi dengan isolat konsentrasi 10^{-5} dan 10^{-6} tidak dapat dilakukan penghitungan Angka Lempeng Total (ALT) karena konsentrasi terlalu pekat sehingga *plate* menjadi terlalu *crowded*. Pada NA dengan konsentrasi isolat 10^{-7} didapatkan jumlah koloni pada tiap *plate* sebanyak 105, 151, dan 102. Berdasarkan perhitungan ALT yang telah dilakukan, diketahui konsentrasi isolat *Enterobacter aerogenes* B4 sebesar $119,33 \times 10^7$ CFU/100 μL .

Hasil Pengujian Patogenisitas Melalui Paparan Pakan

Pada pengujian patogenisitas dengan paparan isolat melalui pakan berukuran 1 cm x 1 cm x 1 cm, ditambahkan 100 μL isolat yang telah dicampur dengan pewarna makanan kemudian dikeringkan. Cairan yang mengandung isolat uji dan pewarna makanan akan menyerap pada pakan buatan. Pemberian pewarna makanan bertujuan untuk mempermudah pengamatan pada aktivitas ulat, jika ulat sudah memakan pakan yang mengandung isolat uji maka kotoran yang dihasilkan akan sesuai dengan warna dari pewarna makanan. Pengamatan

dilakukan setiap 24 jam selama 6 hari. Digunakan produk insektisida biologis yang mengandung kristal toksin dari *Bacillus thuringiensis* "Dipel" sebagai kontrol positif, dan larutan NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif. Dilakukan penambahan pakan tanpa perlakuan untuk mencegah kematian ulat karena kekurangan nutrisi. Dilakukan pengujian dengan 3 kali replikasi, pada tiap replikasinya digunakan 10 ekor ulat, kemudian pengamatan dilakukan selama 6 hari, yaitu pada 17 Maret 2022 hingga 22 Maret 2022. Berikut hasil yang didapatkan dari pengujian tersebut.

Tabel 1.

Jumlah Kematian *S. litura* Pada Berbagai Konsentrasi

Hari Ke-	Konsentrasi Bakteri (CFU/100 μ L)			Kontrol +	Kontrol -
	10 ⁵ (ekor)	10 ⁶ (ekor)	10 ⁷ (ekor)		
1	1	1	2	2	0
2	1	0	3	8	0
3	0	0	0	15	0
4	0	0	0	0	0
5	0	1	1	1	0
6	0	1	3	0	0
Total	2	3	9	26	0

Hasil dari pengujian patogenisitas melalui pakan buatan didapatkan kematian ulat terbanyak selama 6 hari pada pakan yang ditambahkan isolat uji dengan konsentrasi tertinggi, yaitu 10⁷ CFU/100 μ L, sedangkan pada konsentrasi 10⁶ dan 10⁵ CFU/100 μ L memiliki jumlah kematian yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan paparan konsentrasi tertinggi. Kematian ulat memiliki ciri-ciri yang mirip dengan kematian yang disebabkan oleh serangan *baculovirus* yaitu tubuh ulat berwarna pucat, meleleh dan mengeluarkan cairan *creamy* jika disentuh (Samsudin dan Santoso, 2014). Oleh karena itu dilakukan pengujian patogenisitas dengan metode injeksi untuk mengetahui kematian ulat disebabkan oleh serangan *baculovirus* atau karena perlakuan yang diberikan. Hasil Pengujian Patogenisitas Melalui Injeksi

Dilakukan paparan isolat *Enterobacter aerogenes* B4 dengan cara penyuntikan pada bagian tengah kedua kaki ulat yang paling dekat dengan kepala sebanyak 10-20 μ L. Ulat dipuasakan terlebih dahulu selama 3 jam, kemudian dilakukan penyuntikan dengan bakteri uji yang telah dicuci menggunakan NaCl 0,9%.

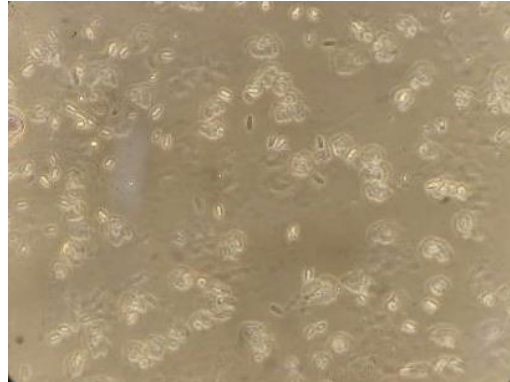


Gambar 3. Proses Injeksi Isolat *Enterobacter aerogenes* B4

Digunakan 5 ekor ulat yang diinjeksikan dengan isolat *Enterobacter aerogenes* B4 dan 5 ekor ulat diinjeksikan larutan NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif perlakuan. Ulat tetap diberi pakan buatan tanpa perlakuan untuk menghindari kematian karena kekurangan makan. Pengamatan dilakukan selama 2 hari, hasil yang didapatkan yaitu tidak adanya kematian ulat setelah dilakukan injeksi isolat *Enterobacter aerogenes* B4.

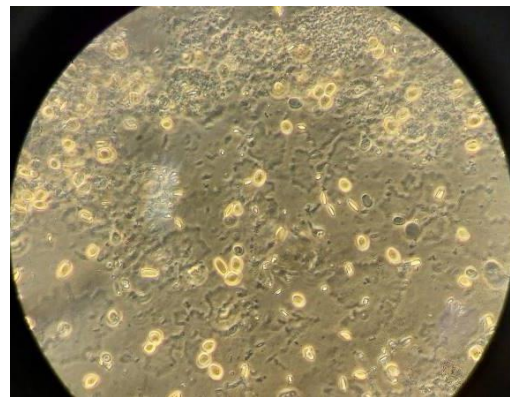
Hasil Analisa Isolat *Enterobacter aerogenes* B4 dan Haemolimfe Ulat Dengan Mikroskop Fase Kontras

Dilakukan analisa isolat murni dengan menggunakan mikroskop fase kontras, berikut hasil yang didapatkan:



Gambar 4. Analisa Isolat *Enterobacter aerogenes* B4 Sebelum Uji Patogenisitas Dengan Mikroskop Fase Kontras Perbesaran 1000x.

Digunakan 3 ulat yang berbeda dengan perlakuan yang sama, yaitu setelah dilakukan pengujian patogenisitas melalui pakan kemudian diambil cairan haemolimfe. Berikut hasil analisa haemolimfe ulat dengan mikroskop fase kontras:



Gambar 5. Analisa Haemolimfe *S. litura* Dengan Mikroskop Fase Kontras Perbesaran 1000x.

Pada hasil analisa haemolimfe ulat (Gambar 5) terdapat sel bakteri yang memiliki bentuk *bacil*. Hal ini menunjukkan kemiripan morfologi dengan isolat *Enterobacter aerogenes* B4 murni yang telah dianalisa dengan mikroskop fase kontras sebelumnya (Gambar 4.5). Didapatkan juga sel dengan bentuk polyhedral, lebih besar dibandingkan dengan ukuran isolat uji, dan berkilau. Sel ini diduga merupakan *baculovirus*.

Hasil Analisa Deskriptif

Pada hasil uji patogenisitas melalui pakan tidak ditemukan kematian pada ulat dengan pemberian pakan yang dipaparkan dengan NaCl 0,9% (kontrol negatif). Lalu pada pakan dengan paparan produk "Dipel" (kontrol positif) terdapat jumlah kematian sebanyak 26 ekor. Selama pengamatan, didapatkan jumlah kematian tertinggi kontrol positif pada tiga hari pertama. Hari pertama setelah pemberian paparan terdapat 2 ekor ulat yang mati, kemudian pada hari kedua terdapat 8 ulat, lalu memuncak pada hari ketiga sebanyak 15 ekor ulat. Ciri ciri dari bangkai ulat yang kematiannya disebabkan oleh produk "Dipel" yaitu ukuran ulat menjadi mengecil, mengering, warna ulat menjadi coklat kehitaman, serta sedikit hingga tidak ditemukan feses padawadah.

Lalu pada ulat dengan paparan isolat uji terdapat jumlah kematian ulat uji terbanyak pada perlakuan pemberian pakan dengan isolat konsentrasi 10^7 CFU/mL sebanyak 9 ekor ulat setelah pengamatan selama 6 hari. Pada hari pertama terdapat kematian sebanyak 2 ekor ulat, lalu pada hari kedua meningkat menjadi 3 ekor ulat. Pada hari ketiga dan keempat tidak

ditemukan kematian ulat, serta ulat tidak mengalami penurunan napsu makan dan mobilitas. Pada hari kelima terdapat kematian 1 ekor ulat dan pada hari keenam terdapat 3 ekor ulat yang mati. Lalu pada ulat yang diberi pakan dengan paparan isolat konsentrasi 10^6 terdapat kematian masing masing 1 ekor pada hari pertama, kelima, dan keenam sehingga jumlah kematian pada perlakuan ini sebanyak 3 ekor. Pada ulat yang diberi pakan dengan paparan isolat konsentrasi 10^5 terdapat kematian masing masing 1 ekor pada hari pertama dan kedua sehingga jumlah kematian pada perlakuan ini sebanyak 2 ekor.

Kematian ulat pada perlakuan pakan dengan isolat uji memiliki kesamaan pada tiap kematian, yaitu warna ulat menjadi pucat, tubuh ulat menjadi rapuh sehingga jika disentuh akan pecah dan mengeluarkan cairan *creamy* berwarna putih kecoklatan. Lalu tubuh ulat juga tampak menggembung serta beberapa mengeluarkan bau tidak sedap.

Diskusi

Dari penelitian yang dilakukan Nathania (2015) diketahui isolat *Enterobacter aerogenes* B4 pada uji pendahuluan yang telah dilakukan Askitosari (2014) memiliki kemiripan dengan *Enterobacter aerogenes strain* KCTC 2190. Kedua isolat telah disimpan selama ± 7 tahun, sehingga perlu dilakukan pengujian lebih lanjut. Penyimpanan isolat bakteri yang terlalu lama dapat menyebabkan adanya penurunan laju pertumbuhan sel bakteri dan hilangnya viabilitas sel sehingga terdapat kemungkinan kemampuan patogenisitas terganggu karena adanya penurunan tersebut (Beatriz et al., 2017).

Hasil Recovery Isolat *Enterobacter aerogenes* B4

Dilakukan *recovery* isolat bakteri dengan menggunakan media Luria Bertani (LB) *broth*. Media LB biasa digunakan sebagai media pemeliharaan karena kaya akan nutrisi yang dapat menumbuhkan isolat dengan cepat dengan hasil yang baik untuk banyak spesies (Wang and Koch, 1978). Isolat yang telah diinokulasikan pada media LB diinkubasi pada suhu 37°C . Suhu optimum inkubasi *Enterobacter aerogenes* berada pada 20°C hingga 37°C . Setelah diinkubasi selama 24 jam, dilakukan pengujian pada isolat yang meliputi:

Hasil Pewarnaan Gram

Identifikasi bakteri dengan menggunakan pewarnaan gram dilakukan pada saat sebelum dilakukan pengujian dan setelah dilakukan pengujian patogenisitas. Hal ini dilakukan untuk memastikan adanya kontaminan bakteri lain selama masa penyimpanan dan pengujian berlangsung. Dibutuhkan kultur murni untuk menghindari adanya pengaruh dari patogen lain. Menurut Waluyo (2008), bentuk dan morfologi yang seragam pada hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa bakteri tidak terkontaminasi oleh bakteri lain. Didapatkan morfologi bakteri yang seragam pada hasil pewarnaan gram yaitu bakteri gram negatif berbentuk basil. Hasil yang didapatkan sesuai dengan morfologi yang didapatkan pada penelitian Nathania (2015).

Hasil Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui viabilitas isolat *Enterobacter aerogenes* B4 mengalami penurunan yang berarti atau tidak. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Nathania (2015), fase eksponensial didapatkan setelah dilakukan inkubasi selama 3 hingga 18 jam dan stasioner setelah diinkubasi selama 18 hingga 23 jam, sehingga dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) pada jam ke 5 dan ke 15. Hal ini ditentukan dengan melihat kurva pertumbuhan Nathania (2015) yang memiliki *peak* pada jam ke 5 dan 15. Hasil yang didapatkan yaitu nilai OD isolat *Enterobacter aerogenes* B4 tidak mengalami penurunan yang berarti dan kurva yang dihasilkan memiliki kemiripan dengan kurva Nathania (2015). Maka dapat disimpulkan bahwa viabilitas sel isolat tidak mengalami penurunan yang berarti. Viabilitas sel bakteri yang cukup stabil dikarenakan preservasi kultur menggunakan *cryoprotectant* gliserol yang ditambahkan sehingga dapat menjaga kestabilan sel saat disimpan pada suhu -80°C (Susilawati & Purnomo, 2016). Faktor yang mempengaruhi viabilitas isolat *Enterobacter aerogenes* B4 selama penyimpanan yaitu kondisi bakteri,

kandungan pada media pembawa, pH, dan suhu serta metode penyimpanan (Yogeswara *et al.*, 2014). Kemudian dilakukan pengujian lebih lanjut dengan penghitungan Angka Lempeng Total (ALT).

Hasil Penghitungan Angka Lempeng Total (ALT)

Pada Penghitungan Angka Lempeng Total (ALT) digunakan media Nutrien Agar yang di *spread* menggunakan isolat uji. Hal ini dilakukan untuk mengetahui kuantitas sel bakteri yang akan digunakan, diketahui dari adanya koloni tunggal yang memiliki keseragaman morfologi (Mursalin, 2018). Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali pada tiap pengenceran dan media tanpa perlakuan sebagai kontrol negatif. Pada media tanpa perlakuan setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam tidak didapatkan koloni yang tumbuh, hal ini menunjukkan bahwa media yang digunakan tidak terkontaminasi dan steril.

Dari pengujian ALT yang dilakukan dapat diamati morfologi koloni bakteri yang memiliki keseragaman warna dan bentuk, yaitu koloni berwarna putih dengan bentuk bulat sempurna. Pada media NA yang telah *dispread* bakteri dengan pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} muncul terlalu banyak koloni sehingga tidak dapat dihitung, sedangkan pada pengenceran 10^{-7} ketiga replikasi dapat dilakukan penghitungan karena berada pada *range* 30-300. Digunakan *range* 30-300 untuk meminimalisir adanya kesalahan perhitungan yang besar dan juga agar dapat dihitung secara statistik (Mursalin, 2018). Hasil yang didapat dari penghitungan ALT yaitu diketahui konsentrasi isolat sebesar $119,33 \times 10^7$ CFU/100 μ L.

Hasil Pengujian Patogenisitas Isolat *Enterobacter aerogenes* B4

Pada pengujian patogenisitas dilakukan dua jenis paparan isolat kepada ulat, yaitu melalui pakan dan injeksi secara langsung menuju saluran pencernaan ulat. Pada pengujian patogenisitas melalui pakan, diketahui pola kematian kontrol positif tampak memuncak pada hari ke-tiga dan mengalami penurunan hingga hari ke-enam tidak terdapat kematian. Gejala serangan dari toksin *B. thuringiensis* sudah dapat terlihat dari hari pertama pengamatan. Larva tampak mengalami penurunan nafsu makan yang tampak dari sedikit hingga tidak ada feses yang dihasilkan. Lalu pergerakan juga melamban dan pada hari ke-dua dan ke-tiga tampak banyak ulat yang mati. Oleh karena itu kematian tertinggi pada kontrol positif terjadi pada tiga hari pertama. Ciri kematian dari ulat yang terkena serangan toksin *B. thuringiensis* adalah bangkai menjadi mengecil, warna tubuh coklat tua kehitaman, serta mengering. Pengamatan pada percobaan ini dilakukan selama 6 hari karena belum diketahui pola kematian dari isolat uji sehingga dilakukan pengamatan dengan waktu yang lebih panjang untuk mengetahui pola kematiannya.

Pada kematian yang disebabkan adanya serangan bakteri akan muncul beberapa gejala seperti menurunnya nafsu makan, pergerakan menjadi tidak aktif, serangga bergerak naik atau menyembunyikan diri pada dedaunan, serta paralisis saluran pencernaan dan regurgitasi (Salaki dan Tarore, 2018). Pada umumnya infeksi bakteri lainnya akan menunjukkan warna coklat kehitaman karena adanya dekomposisi dari infeksi bakteri, tetapi terdapat juga beberapa jenis bakteri yang menyerang dengan menunjukkan warna khas pada serangga. Contohnya pada larva yang terinfeksi *Serratia marcescens* akan membuat tubuh larva yang mati menjadi merah (Gazali *et al.*, 2017).

Berdasarkan hasil analisa deskriptif, kematian tertinggi terdapat pada konsentrasi 10^7 , tetapi pola kematian tidak beraturan, selain itu tidak ditemukan puncak kematian selama pengamatan 6 hari berturut turut. Lalu kematian pada konsentrasi 10^7 tidak mencapai 50% kematian dari serangga uji sehingga tidak dapat dilakukan penentuan LC_{50} . Dilakukan analisa hemolimfe ulat yang telah mati menggunakan mikroskop fase kontras untuk mengetahui penyebab kematian ulat. Ditemukan adanya kontaminasi dari *baculovirus* yang disebabkan oleh adanya sejarah penelitian *baculovirus* pada laboratorium yang digunakan sehingga ulat sangat rentan terpapar *baculovirus*. *Baculovirus* menginfeksi inang pada tahap larva melalui saluran pencernaan dengan menghancurkan lapisan dinding usus tengah, kemudian matriks virus masuk kedalam sirkulasi hemolimfe inang (Astuti, 2007). Dari hasil yang didapatkan dari mikroskop fase kontras, kematian ulat yang terjadi dapat disebabkan oleh adanya peran dari

baculovirus yang bersinergis dengan isolat *Enterobacter aerogenes* B4, karena pada ulat dengan paparan isolat uji konsentrasi 10^5 dan 10^6 jumlah kematian yang terjadi tidak sebanyak pada ulat dengan paparan konsentrasi tertinggi.

Menurut Samsudin (2016) serangan *baculovirus* terjadi dalam dua tahap, yaitu primer dan sekunder. Pada tahap primer, *baculovirus* menyerang *midgut* yang terjadi pada kondisi alkalis dan kemudian akan melepaskan virion. Virion yang terlepas akan menembus jaringan peritrofik di mikrovili sehingga memisahkan sel kolumnar dan goblet. Lalu pada tahap sekunder, virion yang terbentuk akan menyerang seluruh sel pada tubuh serangga dan terbentuk badan inklusi (polihedra) (Samsudin dan Santoso, 2014). Maka dari itu, ciri kematian dari ulat yang terserang *baculovirus* memiliki tubuh yang rapuh dan mengeluarkan cairan *creamy* yang mengandung sel virus.

Baculovirus menyerang serangga pada *stage* larva sehingga ulat grayak sangat rentan terinfeksi baculovirus. Digunakan ulat instar V untuk paparan injeksi karena sudah memiliki sistem imun lebih kuat dibandingkan dengan instar III atau II, selain itu injeksi juga akan mudah dilakukan pada ulat yang berukuran besar. Injeksi dilakukan untuk mengetahui apakah isolat uji menjadi lebih efektif patogenesisnya jika langsung ditujukan ke saluran pencernaan ulat. Pengamatan dilakukan tiap 24 jam selama 2 hari, hasil yang didapatkan tidak adanya kematian ulat setelah dilakukan injeksi isolat. Aktivitas ulat juga tidak mengalami penurunan serta nafsu makan yang baik. Hal ini membuktikan bahwa isolat *Enterobacter aerogenes* B4 tidak bersifat patogen terhadap *S. litura*.

Kesimpulan

Pada uji patogenesis melalui pakan terdapat kematian tertinggi pada ulat dengan paparan isolat konsentrasi 10^7 sebanyak 9 ekor, sehingga tidak dapat dilakukan penentuan LC_{50} . Tidak terdapat kematian saat dilakukan pengujian patogenesis melalui injeksi. Kesimpulan dari penelitian ini adalah isolat *Enterobacter aerogenes* B4 terbukti tidak patogen bagi *S. litura*. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji patogenesis *Enterobacter aerogenes* B4 terhadap spesies serangga hama yang lain, sebagai contoh serangga dari ordo Orthoptera atau Homoptera. Selain itu, perlu adanya analisa molekuler faktor virulensi *Enterobacter aerogenes* B4, antara lain sitotoksin yang terdapat di *outer membrane* isolat *Enterobacter aerogenes* B4 dengan metode *in silico* (PyMOL), metode *Real Time PCR* (RT-PCR), dan *DNA target sequencing*.

Pustaka Acuan

- Andjani H. A. , Y. Sentosa, K. Yati, M. Jufri, A. Fauzantoro, M. Gozan. 2019. *Determination of LC₅₀ value of Nicotiana tabacum L. extract against Gryllus bimaculatus imago and Galleria mellonella larvae.* Jakarta : Research Center for Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Astuti, A. T. 2007. Uji patogenesis isolat Spodoptera litura multiplenucleopolyhedrovirus (SplMNPV) pada ulat grayak, Spodoptera litura Fab. di laboratorium. Skripsi Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Beatriz Quintero Moreno, María Araque, and Evelyn Mendoza. 2017. "Evaluation of Two Supplemented Culture Media for Long-Term, Room-Temperature Preservation of Streptococcus pneumoniae Strains," BioMed Research International, vol. 2017, Article ID1218798, 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/1218798>.
- Gazali, A., Ilhamiyah, Jaelani, A. 2017. *Bacillus thuringiensis*: Biologi, Isolasi, Perbanyak, Dan Cara Aplikasinya. Pustaka Banua: Banjarmasin.
- Marwoto, Suharsono. 2008. *Strategi dan komponen Teknologi Pengendalian Ulat Grayak (Spodoptera litura) pada Tanaman Kedelai.* Malang: Balai Penelitian Tanaman KacangKacangan dan Umbi-umbian

- Mursalin. (2018). Pemeriksaan angka lempeng total bakteri pada minuman sari kedelai yang diperjual belikan di Kecamatan Manggala Kota Makassar. *Media Analis Kesehatan* , 56.
- Nathania, S. 2015. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Simbion Nematoda Patogen Serangga Isolat Belik II*. Skripsi. Fakultas Teknobiologi. Universitas Surabaya. Surabaya
- Rukmana, R. 1994. *Budidaya Kubis Bunga dan Brokoli*. Kanisius: Yogyakarta
- Salaki, C. L., Tarore, D. 2018. Prospek Pemanfaatan Biopestisida Bakteri Entomopatogenik Isolat Lokal Sebagai Agen Pengendali Hayati Hama Tanaman Sayuran. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Unsrat Manado.
- Samsudin, 2016. Prospek Pengembangan Bioinsektisida Nucleopolyhedrovirus (NPV) Untuk Pengendalian Hama Tanaman Perkebunan Indonesia. Balai Penelitian Tamanam Industri dan Penyegar. ISSN: 1412-8004. DOI: <http://dx.doi.org/10.21082/psp.v15n1.2016.18-30>
- Samsudin dan T. Santoso. 2014. Uji Patologi Spodoptera exigua Nucleopolyhedrovirus (SeNPV) pada Larva *S. exigua* Huebner (Lepidoptera: Noctuidae). *Jurnal Biologi Indonesia*. 10(2): 169-178.
- Susilawati, L & E. S. Purnomo. 2016. Viabilitas Sel Bakteri dengan Cryoprotectans Agents Berbeda (Sebagai Acuan dalam Preservasi Culture Collection di Laboratorium Mikrobiologi). *Biogenesis*. 4(1): 34-40.
- Waluyo, L. (2008). Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi. Malang: UMM Press, 180-182.
- Wang, C. H., and A. L. Koch. 1978. Constancy of growth on simple and complex media. *J. Bacteriol.* 136:969-975.
- Yogeswara, I. B. A., Kusumawati, I. G. A. W., Nursini, N. W. 2014. Viabilitas dan stabilitas bakteri probiotik *L. acidophilus* FNCC 0051 pada susu kedelai fermentasi selama di saluran cerna *in vitro* dan penyimpanan. Fakultas Ilmu Kesehatan, Sains dan Teknologi. Universitas Dhyana Pura, Tegal Jaya, Dalung.