

PRODUKSI MIKOINSEKTISIDA DARI PROPAGUL KAPANG *Beauveria bassiana*

THE PRODUCTION OF MYCOINSECTICIDE FROM PROPAGULES OF ENTOMOPATHOGENOUS FUNGI *Beauveria bassiana*

Priyo Wahyudi (wahyudi@bppt.go.id)
Pusat Teknologi Bioindustri
Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

ABSTRACT

Fungal insecticide or well known as mycoinsecticide is produced from propagules of entomopathogenic fungi. It is a common knowledge that fungi can kill insects, individually or in epizootics, and methods for isolation and exploration of fungi are well known. Despite these facts, production of commercial preparations with fungi comes very late. There is only one commercial product, which is produced on a large scale for several years. Beauveria bassiana is one of entomopathogenic fungus that has been used for biocontrol of many insects of crops. In this article we assess production of mycoinsecticide Beauveria bassiana through all stages of their handling, such as isolation, strain selection and optimization of production procedures both liquid and solid state fermentation. The result shows that the best way to produce mycoinsecticide in a large scale production is solid state fermentation using rice-base medium including cooked-rice and rice floor. The best incubation can be taken place in a room temperature for 7 days.

Keywords: entomopathogenic fungi, mycoinsecticide, solid substrate fermentation

Sampai saat ini pestisida memegang peranan yang penting dalam peningkatan produktivitas pertanian. Ancaman kerusakan tanaman akibat serangan hama serta berkurangnya hasil panen dapat diatasi dengan penggunaan pestisida, khususnya pestisida kimia. Upaya tersebut memberikan hasil yang cepat dan efektif dalam mengendalikan hama dan penyakit. Kenyataan itu menyebabkan kepercayaan petani terhadap kemampuan pestisida kimia sangat tinggi. Ditambah lagi dengan adanya promosi yang dilakukan perusahaan pestisida yang sangat gencar, menyebabkan semakin tinggi tingkat ketergantungan petani terhadap pestisida.

Di lain pihak harga pestisida kimiawi di Indonesia cukup tinggi, sehingga membebani biaya produksi pertanian. Dalam hitungan petani biaya komponen pestisida mencapai 25 - 50% dari total biaya produksi pertanian. Harga pestisida kimiawi yang tinggi itu disebabkan bahan aktifnya masih diimpor. Dengan demikian, secara berangsur-angsur harus segera diupayakan pengurangan penggunaan pestisida kimiawi dan mulai beralih kepada jenis-jenis pestisida yang lebih murah dan aman bagi lingkungan.

Salah satu alternatif pestisida ramah lingkungan adalah bioinsektisida dari kapang *Beauveria bassiana* (*B. bassiana*). Kapang *B. bassiana* merupakan salah satu spesies kapang entomopatogen yaitu kapang yang secara alamiah bersifat patogen terhadap serangga. Jenis bioinsektisida dengan bahan aktif kapang *B. bassiana* ini biasa disebut sebagai mikoinspektisida (Wahyudi, 1999).

Entomopatogen adalah suatu istilah yang diberikan kepada satu jenis atau satu kelompok organisme yang keberadaannya di alam menjadi patogen terhadap jenis serangga yang menjadi hama tanaman, hama hewan ternak, vektor penyakit, maupun serangga pengganggu rumah seperti kecoa atau rayap (Bradley, Wood, & Britton, 1999). Jenis kapang yang secara alami menyebabkan

penyakit (patogen) pada serangga dikelompokkan ke dalam kapang entomopatogen. Beberapa genera yang termasuk dalam kelompok kapang entomopatogen adalah: *Aschersonia*, *Beauveria*, *Conidiobolus*, *Cordyceps*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Hirsutella*, *Zoophthora*, *Metarrhizium*, *Neozygites*, *Nomuraea*, *Pandora*, *Paecilomyces*, dan *Verticillium* (Humber, 1998).

Kapang *B. bassiana* merupakan salah satu jenis entomopatogen yang telah dikenal mampu mengendalikan hama serangga tanaman dan merupakan jenis kapang tanah yang bersifat saprofitik. Kapang *B. bassiana* dalam taksonomi dikelompokkan ke dalam jenis kapang imperfecti, Divisi Deuteromycota, Kelas Hyphomycetes (Humber, 1998). Keberadaannya di alam, selalu dalam fase aseksual dan sejauh ini belum ditemukan fase seksualnya. Kapang *B. bassiana* memproduksi spora aseksual (konidia) yang mampu bertahan pada kondisi lingkungan ekstrim dan merupakan fase paling infeksiif dari siklus hidupnya (Wahyudi, 2001).

Beberapa hama yang dapat dikendalikan oleh *B. bassiana*, diantaranya *Nilaparvata lugens* (wereng), *Ostrinia nubilalis* (penggerek batang), dan *Helicoverpa armigera* (penggerek). Efektivitas *B. bassiana* dalam mengendalikan hama cukup tinggi yaitu pada semua tahap dari siklus hidup serangga yaitu mulai dari telur, larva, *immatur*, sampai serangga dewasa. Oleh karena itu, sejak ditemukan pertama kali oleh Agostino Basi de Lodi pada tahun 1835, pemanfaatan jenis kapang ini sebagai bioinspektisida atau agen biokontrol mengalami kemajuan yang amat pesat (Mahr, 1999).

Produk bioinspektisida dari kapang *B. bassiana* telah diproduksi secara massal di luar negeri dan dikomersialkan sebagai produk insektisida mikrobial yang ramah lingkungan. Keberhasilan produksi propagul *B. bassiana* antara lain tergantung pada jenis isolat *B. bassiana*, komposisi medium produksi dan kondisi fermentasi seperti pH, aerasi dan suhu (Feng, Poprawski, & Khachatourians, 1994). Produksi bioinspektisida *B. bassiana* di dalam negeri dilakukan secara lokal oleh petani organik, kelompok tani penggiat pengendalian hama terpadu ataupun dinas-dinas pertanian. Di tingkat petani lokal seperti itu, propagul *B. bassiana* yang diproduksi melalui fermentasi cair umumnya langsung diaplikasikan di lapangan, tanpa melalui formulasi ataupun immobilisasi. Oleh karenanya, kualitas produknya tidak seragam dengan tingkat efektivitas fluktuatif, dan tidak mampu untuk disimpan dalam waktu lama ataupun didistribusikan.

Melalui artikel ini akan dipaparkan beberapa hasil penelitian mengenai optimasi teknik produksi bioinspektisida dari kapang *B. bassiana*. Artikel ini menguraikan yang menyeluruh tahap isolasi, skrining kapang, optimasi proses fermentasi cair maupun padat, sampai pada pengujian aktivitasnya. Diharapkan dengan tersedianya informasi yang komprehensif ini, produksi mikoinspektisida dari propagul aktif kapang *B. bassiana* dapat tumbuh berkembang secara luas di tanah air.

Isolasi Kapang Entomopatogen *Beauveria bassiana*

Prosedur isolasi dan skrining kapang entomopatogen *B. bassiana* telah banyak diuraikan terangkan oleh para mikolog dari dalam maupun luar negeri. Kapang *B. bassiana* dapat diisolasi dari tanah pertanian, serasah maupun serangga hama tanaman. Medium yang digunakan merupakan medium selektif, artinya komposisi medium tersebut sengaja dirancang hanya untuk menumbuhkan jenis *B. bassiana*, sehingga jenis kapang lain yang tidak diinginkan tidak dapat tumbuh. Medium selektif yang digunakan terdiri atas (dalam 1.000 ml air destilasi) : glukosa 40 g, pepton (Difco) 10 g, agar 15 g, kristal ungu 0,01 g, sikloheksamida 0,25 g, dan kloramfenikol 0.5 g (tidak ikut diautoklaf) yang ditambahkan setelah dingin. Inkubasi dilakukan pada suhu 27 °C selama 5 hari (Doberski & Tribe, 1980).

Wahyudi (2003) melaporkan bahwa dari 23 buah sampel yang berasal dari tanah, pangkal batang jagung, dan lalat *Liriomyza* sp yang diambil dari Brebes Jawa Tengah diperoleh 10 isolat kapang. Sepuluh kapang yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi dengan menggunakan kunci identifikasi dari Domsch, Gams, & Anderson (1980), Humber (1998), Gandjar, Samson, Van-den Tweel-Vermeulen, Oetari, & Santoso (1999), dan Ando (2000) adalah genus: *Aspergillus*, *Beauveria*, dan *Penicillium*. Kapang genus *Aspergillus* dan *Penicillium* yang ikut tumbuh pada medium selektif *B. bassiana* kemungkinan disebabkan oleh sifat kedua kapang tersebut yang sangat kosmopolit (dapat tumbuh di semua tempat). Dua isolat kapang *B. bassiana* yang berhasil diisolasi dari sampel tanah dan serangga lalat *Liriomyza* sp. masing-masing adalah isolat B.b 10.B dan B.b W.1.1. Hasil karakterisasi terhadap sifat dan ciri morfologi kedua isolat *B. bassiana* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengamatan Morfologis 2 Isolat *B. bassiana*

Kriteria	B.b W.1.1.	B.b 10.B
Sumber	Lalat <i>Liriomyza</i> sp.	Tanah
Bentuk koloni ^a	Bulat	Bulat
Diameter koloni ^a	5 - 7 cm	4 - 5 cm
Warna koloni ^a	Putih kapur (<i>fine granular</i>)	Putih kapur (<i>fine granular</i>)
Warna reverse of colony ^a	Putih kuning kecokelatan, makin cokelat ke arah pusat koloni	Putih cokelat kemerahan, makin cokelat ke arah pusat koloni
Hifa	Bersepta	Bersepta
Konidia	- Bulat - Hialin - Diameter 2 - 3 μ m	- Bulat - Hialin - Diameter 2 - 3 μ m

Keterangan: a = setelah 7 hari inkubasi pada suhu kamar, medium PDA

Terhadap isolat B.b 10.B dan B.b W.1.1 selanjutnya ditumbuhkan pada medium Sabouraud Dextrose Agar (SDA) sebagai isolat kerja (*working culture*). Selain itu juga dilakukan liofilisasi agar tahan disimpan dalam waktu yang cukup lama. Selanjutnya terhadap isolat kerja (*working culture*) dilakukan skrining terhadap patogenisitas (virulensi) terhadap hama ulat grayak kedele (*Spodoptera litura*).

Uji Patogenisitas *B. bassiana* terhadap *Spodoptera litura*

Uji patogenisitas merupakan salah satu uji yang dilakukan untuk menskrining isolat yang mempunyai potensi sebagai kapang entomopatogen yang paling patogen. Dalam uji patogenisitas konidia kapang *B. bassiana* diujikan kepada jenis serangga hama tanaman. Pengujian dapat dilakukan terhadap berbagai jenis serangga hama, sampai diketahui karakteristik dan spesifikasi dari masing-masing isolat (Castineiras, Pena, Duncan, & Osborne, 1996; Vandenberg, 1996; Knauf & Morales, 1999). Pada bahasan ini, pengujian hanya dilakukan terhadap satu jenis serangga yaitu ulat grayak (*Spodoptera litura*).

Tingkat patogenisitas *B. bassiana* dapat dilihat dari nilai mortalitas yang berupa persentase ulat uji yang mati akibat infeksi *B. bassiana*, selama 7 hari aplikasi. Uji patogenisitas dilakukan di laboratorium dengan menempatkan larva *S. litura* instar ketiga dalam kotak plastik yang diberi pakan buatan. Pakan buatan untuk ulat berbentuk puding (resep dari Laboratorium Biopestisida - Balitbiogen Deptan) memiliki komposisi: kacang merah 250 g, gandum 200 g, kasein 100 g, ragi kering 125 g, asam askorbat 12 g, asam sorbat 6 g, campuran vitamin 20 g, metil paraben 10 g, tetrasiklin 0,025 mg, agar 48 g, dan air 3200 ml.

Sebanyak 20 ekor ulat grayak (*S. litura*) instar ketiga dicelupkan ke dalam 5 ml suspensi spora dengan kepadatan 1×10^7 cfu/ml, 1×10^6 cfu/ml, dan 1×10^5 cfu/ml (Vandenberg 1996; Geden, Arends, Rutz, & Steinkraus, 1998). Ulat uji ditempatkan dalam kotak plastik (ukuran 22 x 15 x 7 cm) yang dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70%. Pakan diberikan setiap hari. Selama 7 hari dihitung jumlah ulat yang mati. Selain ketiga perlakuan, juga dilakukan kontrol (tidak diberi suspensi spora *B. bassiana*). Masing-masing perlakuan dilakukan tiga kali ulangan.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa kedua isolat B.b 10.B dan B.b W.1.1 terbukti mempunyai patogenisitas terhadap ulat grayak yang ditandai dengan terjadinya kematian ulat uji akibat infeksi hifa *B. bassiana* (Tabel 2). Hasil pengujian terhadap dua isolat *B. bassiana*, membuktikan bahwa keduanya mempunyai tingkat patogenisitas yang tidak berbeda nyata (Wahyudi, 2002a).

Tabel 2. Data Mortalitas Hasil Uji Patogenisitas Isolat B.b 10.B dan B.b W.1.1. terhadap Ulat Grayak (*S. litura*) setelah 7 hari

Konsentrasi konidia (cfu/ml)	B.b 10.B				B.b W.1.1			
	1	2	3	Rata-rata	1	2	3	Rata-rata
1×10^5	40	45	50	45	55	40	60	51,67
1×10^6	60	55	65	60	65	70	60	65
1×10^7	70	60	70	66,67	70	65	80	71,67
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan: Mortalitas kontrol adalah 0%.

Analisis Probit menggunakan SPSS 10.01 yang dilakukan terhadap data mortalitas ulat grayak di atas menunjukkan LC_{50} dari kedua isolat B.b 10.B dan B.b W.1.1 masing-masing adalah $21,483 \times 10^4$ cfu/ml dan $5,642 \times 10^4$ cfu/ml. Hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat *B. bassiana* indigenous mempunyai tingkat patogenisitas yang cukup tinggi, karena kapang entomopatogen dinyatakan tinggi patogenisitasnya bila mempunyai nilai $LC_{50} \leq 10^5$ cfu/ml (Bradley *et al.*, 1999). Implikasi yang dihasilkan dari hasil uji tersebut adalah bahwa isolat B.b W.1.1 dan B.b 10.B dapat dikembangkan sebagai agen pengendali hayati ulat grayak (*S. litura*) (Wahyudi, 2002a).

Mekanisme infeksi kapang *B. bassiana* terhadap ulat grayak dilakukan dengan secara langsung menginfeksi lapisan kulit luar ulat (Mahr, 1999). Konidia yang menempel pada kulit ulat akan berkecambah membentuk hifa, yang terus berkembang sekaligus menghasilkan enzim kitinase dan protease yang menghancurkan kutikula. Akibat rusaknya kutikula, hifa akan menembus dan berkembang di dalam tubuh serangga. Ulat akan mati karena seluruh tubuhnya telah dipenuhi oleh miselia *B. bassiana*. Pada tingkatan lanjut, hifa akan menembus keluar dan tumbuh di bagian luar tubuh serangga, serta menghasilkan konidia yang akan disebarkan ke lingkungan dan menginfeksi serangga lainnya.

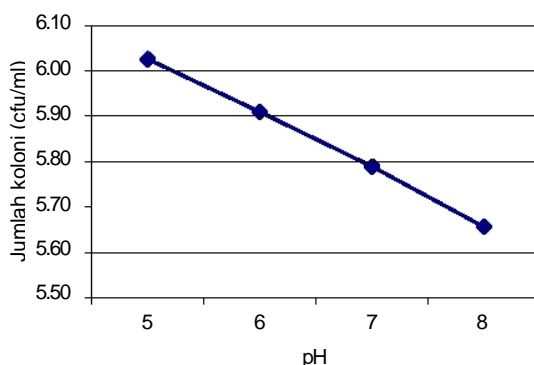
Suhu dan pH Optimal Produksi Propagul *B. bassiana*

Mikoinsektisida *B. bassiana* mengandung bahan aktif berupa propagul kapang *B. bassiana*. Propagul kapang dapat didefinisikan sebagai seluruh bentuk dan bagian dari kapang yang bersifat viabel (dapat tumbuh). Propagul kapang *B. bassiana* meliputi hifa, spora, potongan hifa, ataupun blastospora. Keberhasilan fermentasi untuk memproduksi secara massal propagul kapang *B. bassiana* ditentukan oleh banyak faktor di antaranya: nutrien, suplai oksigen, pH, suhu, dan

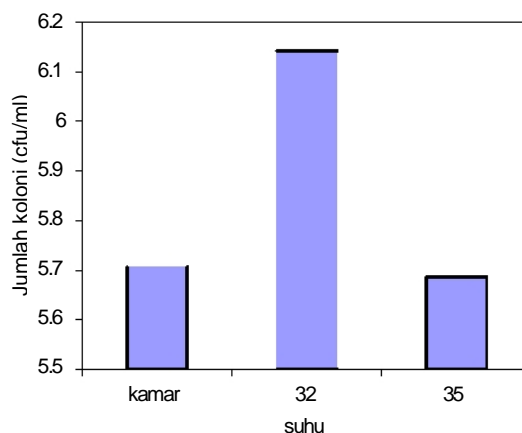
fotoperiodisitas (Feng, et al., 1994). Suhu dan pH merupakan dua faktor lingkungan yang paling utama dalam mempengaruhi pertumbuhan mikroorganismenya. Upaya pengembangan skala fermentasi harus dimulai dengan melakukan karakterisasi sifat-sifat fisiologis *B. bassiana* terhadap kedua faktor tersebut. Dengan diketahuinya kondisi optimal pH dan suhu dari suatu isolat, maka dapat dengan mudah dilakukan perencanaan pengembangan dan optimasi faktor lainnya seperti nutrisi, kebutuhan oksigen, atau fotoperiodisitas.

Dalam proses fermentasi pH dan suhu merupakan dua faktor yang cukup vital. Nilai pH medium untuk pertumbuhan kapang berkisar 5-7. Domsch *et al.* (1980) menyatakan bahwa pH optimal untuk pertumbuhan *B. bassiana* adalah 5,7-5,9 dan untuk pembentukan konidia adalah 7-8. Pada Gambar 1 terlihat bahwa semakin tinggi pH, semakin menurun jumlah propagul *B. bassiana*. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh sifat isolat *B. bassiana* yang lebih menyukai kondisi asam dibandingkan kondisi netral atau basa. Nilai pH optimal bagi pertumbuhan dan produksi propagul *B. bassiana* melalui fermentasi cair (medium PDB) adalah pH 5 (Wahyudi & Suwahyono, 2002).

Pertumbuhan optimal kapang juga ditentukan oleh kondisi suhu fermentasi yang optimal. Pada suhu yang optimal akan terjadi pertumbuhan kapang yang maksimal. Wright dan Chandler (1995) menyatakan bahwa suhu optimal pertumbuhan kapang *B. bassiana* adalah antara 4,4-35°C. Pengaruh suhu terhadap pertumbuhan kapang *B. bassiana* disajikan pada Gambar 2. Hasil yang terbaik untuk pertumbuhan kapang adalah suhu 32°C. Hal ini menandakan bahwa suhu 32°C merupakan suhu pertumbuhan *B. bassiana* yang paling baik (Wahyudi & Suwahyono, 2002). Dari hasil optimasi terhadap pH medium dan suhu tersebut dapat dijadikan dasar pengembangan produksi propagul kapang *B. bassiana* pada 32°C dengan pH medium 5, selama 7 hari.



Gambar 1. Grafik hubungan jumlah rata-rata koloni *B. bassiana* dengan pH medium setelah fermentasi selama 7 hari.



Gambar 2. Grafik hubungan jumlah rata-rata koloni *B. bassiana* dengan suhu setelah fermentasi selama 7 hari

Produksi Propagul *B. bassiana* pada Medium Glukosa dan Urea melalui Fermentasi Cair

Medium fermentasi kapang *B. bassiana* yang optimal adalah medium yang menyediakan nutrisi yang meliputi karbon, nitrogen, vitamin, dan mineral. Glukosa merupakan salah satu sumber karbon sederhana yang termasuk karbohidrat monosakarida. Glukosa mudah dicerna dan digunakan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan kapang. Urea merupakan sumber nitrogen anorganik dengan kandungan nitrogen cukup tinggi sekitar 46% (Bilgrami & Verma, 1978). Urea akan terurai menjadi NH_4^+ dan CO_2 , yang merupakan kunci perantara perubahan nitrogen anorganik menjadi nitrogen organik. Penggunaan campuran glukosa dan urea sebagai medium fermentasi diharapkan dapat dihasilkan pertumbuhan *B. bassiana* yang optimal sehingga diperoleh produksi propagul yang maksimal.

Kapang *B. bassiana* yang ditumbuhkan pada medium fermentasi cair dengan kandungan glukosa teknis (10, 20, 30 dan 40 g/l) dan urea teknis (6, 8 dan 10 g/l) diinkubasi pada suhu ruang selama 5 hari dengan penggoyangan 125 rpm. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi glukosa dan urea memberikan pengaruh nyata terhadap pertumbuhan *B. bassiana* (jumlah cfu *B. bassiana*). Kombinasi perlakuan yang memberikan hasil (jumlah cfu) maksimal diperoleh pada perlakuan glukosa 10 g/l dan urea 6 g/l. Kondisi ini menunjukkan bahwa penggunaan konsentrasi yang rendah yaitu 10 g/l glukosa dan 6 g/l urea ternyata memberikan pengaruh yang optimal terhadap pertumbuhan *B. bassiana*. Dengan demikian pada penerapan produksi propagul *B. bassiana* skala massal direkomendasikan untuk tidak menggunakan glukosa dan urea yang lebih tinggi dari konsentrasi tersebut (Wahyudi, 2002b). Hal tersebut didasarkan pada kenyataan bahwa penggunaan glukosa dan urea dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari masing-masing 10 g/l dan 6 g/l kurang bermanfaat atau bahkan hanya sia-sia, karena akan memperbesar biaya produksi dan hasil yang diperoleh ternyata tidak berbeda nyata.

Kandungan gula 10 g/l dan urea 6 g/l sebagai sumber C dan N dalam medium menjadi patokan untuk pengembangan skala produksi dalam bioreaktor (fermentor). Penggunaan fermentor dimaksudkan untuk memproduksi propagul kapang *B. bassiana* secara massal dalam waktu yang singkat dengan kondisi yang terkendali.

Pemilihan Medium Fermentasi Padat untuk Produksi Propagul *B. bassiana*

Metode umum yang digunakan untuk memproduksi propagul *B. bassiana* ada dua macam, yaitu : (1) metode fermentasi cair dan (2) metode fermentasi padat. Fermentasi substrat padat berarti penggunaan substrat atau materi padat untuk pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme (Aidoo, Hendry, & Moore, 1982). Substrat padat yang dapat dijadikan medium pertumbuhan kultur *B. bassiana* diantaranya adalah gandum, beras, barley, pati-patian, dan tepung-tepungan lainnya (Bradley, *et al.*, 1999).

Raimbault (1998) menyatakan bahwa fermentasi substrat padat memiliki beberapa keuntungan, diantaranya : (1) menggunakan substrat tunggal seperti biji-bijian atau limbah padat yang mengandung karbohidrat, protein, lemak, dan mineral sehingga penambahan lain yang diperlukan hanya air, (2) kontrol terhadap mesin-mesin dan peralatan yang terlibat pada fermentasi padat skala laboratorium maupun komersial lebih sederhana daripada yang terdapat pada fermentasi cair, (3) prosedur dan fasilitas dalam persiapan inokulum sederhana, (4) memiliki produktivitas tinggi, (5) kontrol terhadap kontaminasi bakteri lebih mudah karena kandungan air yang rendah, dan (6) kondisi medium mendekati keadaan tempat tumbuh kapang yang biasanya dijumpai di alam.

Menurut Samson (1981) pertumbuhan *B. bassiana* membutuhkan oksigen, air, bahan-bahan organik, anorganik, dan elemen tambahan seperti mineral. Kebutuhan nutrisi kapang entomopatogenik mempunyai ciri dapat hidup pada kondisi nutrisi yang rendah. Oleh karena itu *B. bassiana* dapat tumbuh pada medium yang hanya mengandung dekstrosa, nitrat, dan larutan makromineral.

Wahyudi (2002c) melaporkan percobaan menumbuhkan biakan murni *B. bassiana* pada medium dengan komposisi 1 : 1, medium A = tepung jagung + tepung beras ; B = tepung jagung + tepung tapioka ; C = tepung jagung + nasi ; D = tepung beras + tepung tapioka ; dan E = tepung tapioka + nasi. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 7 hari. Hasil pengamatan pada hari ke-7, diperoleh jumlah koloni tertinggi pada medium E (tepung tapioka + nasi) dengan rata-rata $10,49 \times 10^9$ cfu/g dan terendah pada medium A (tepung jagung + tepung beras) dengan rata-rata $6,41 \times 10^9$ cfu/g. Hasil percobaan menunjukkan bahwa antar perlakuan memberikan pengaruh sangat nyata terhadap pertumbuhan *B. bassiana* (Tabel 3). Jumlah koloni pada penelitian tersebut lebih rendah dibandingkan hasil penelitian yang dilaporkan Alves dan Perreira (1989) (dalam Feng *et al.*, 1994) jumlah koloni mencapai 2×10^{11} cfu/g dengan medium dasar nasi.

Tabel 3. ANOVA Pengaruh Komposisi Medium terhadap Jumlah Koloni Isolat *B. bassiana*

Sumber ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel	
					0.05	0.01
Antar perlakuan	4	32,26	8,065	336,04**	5,19	11,39
Galat	5	0,12	0,024			
Total	9	32,38				

Keterangan : ** = berbeda sangat nyata

Pengaruh sangat nyata terhadap jumlah koloni *B. bassiana* disebabkan komposisi medium tersebut mengandung nutrisi yang sangat dibutuhkan untuk mendukung pertumbuhan *B. bassiana*. Layaknya kapang atau mikroorganisme lain, *B. bassiana* membutuhkan unsur karbon dan nitrogen sebagai makronutrien dan mineral-mineral sebagai mikronutrien untuk pertumbuhan. Unsur-unsur tersebut terkandung dalam medium yang dicoba pada penelitian tersebut. Karbon memegang peranan yang sangat penting bagi pertumbuhan kapang. Kebutuhan karbon ini dipenuhi oleh

karbohidrat, protein, lemak dan asam nukleat serta unsur organik lain sebagai sumber energi sel (Gadd, 1988) dimana tepung beras, tepung jagung, tepung tapioka dan nasi mengandung unsur-unsur tersebut.

Selain makronutrien, *B. bassiana* juga membutuhkan unsur-unsur mineral seperti fosfor, potasium, magnesium, sulfur, besi, mangan, kalsium, molybdenum, dan seng. Kapang membutuhkan vitamin maksimal 100 mM, sebagai elemen struktural pertumbuhan, seperti Tiamin (B1), Biotin (B7), Piridoksin (B6), Riboflavin (B2), Niasin (B3), Asam pantotenat (B5), Cyanocobalamin (B12), dan inositol. Unsur-unsur mineral dan vitamin tersebut walau tidak semuanya, terdapat dalam beras, dedak, jagung dan tapioka, namun bahan-bahan tersebut dapat digunakan sebagai medium perbanyak (Griffin, 1981).

Berdasarkan hasil uji Beda Nyata Terkecil (BNT) terhadap perlakuan komposisi medium (Tabel 4) dapat diketahui bahwa medium E dan C merupakan komposisi medium yang memberikan pengaruh terbaik terhadap pertumbuhan *B. bassiana*. Hal ini disebabkan pada medium E dan C memiliki C/N ratio yang tertinggi dibandingkan dengan medium lain sehingga dapat mendukung pertumbuhan *B. bassiana* lebih baik.

Tabel 4. Uji BNT Pengaruh Komposisi Medium terhadap Jumlah Koloni Isolat *B. bassiana*

Rata-rata cfu	Perlakuan				
	E	C	B	D	A
	10,49a	10,37a	7,15b	6,82bc	6,41cd

Keterangan : Nilai rata-rata yang berhuruf sama berbeda tidak nyata

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat dilihat bahwa pertumbuhan terbaik (dilihat dari jumlah koloni tertinggi) isolat *B. bassiana* terjadi pada medium yang ratio C/N nya tinggi. Karbon yang terkandung dalam medium pati adalah polisakarida. Kebanyakan kapang menggunakan karbon yang berbentuk polisakarida dengan derajat efisiensi yang tinggi melalui aktivitas amilase. Enzim α -amilase mendegradasi fraksi amilosa dari pati dengan memotong ikatan 1,4 α glikosidik secara acak dan meningkatkan campuran dekstrin serta residu maltosa. Kemudian sistem enzim glukogenik beraksi pada dekstrin dan maltosa untuk menghasilkan glukosa. Glukosa yang diperoleh dari proses hidrolisis tersebut selanjutnya digunakan untuk metabolisme kapang *B. bassiana*.

Selain karbon, medium juga mengandung nitrogen yang dibutuhkan oleh *B. bassiana* untuk pembentukan purin, pirimidin, dan asam amino. Pelaksanaan fermentasi tersebut pada suhu kamar dan pH alami dengan tujuan untuk melihat sejauh mana *B. bassiana* dapat tumbuh tanpa ada perlakuan khusus selain komposisi medium. Apabila pada suhu kamar dan pH alami *B. bassiana* tumbuh dengan baik, maka untuk memproduksi dalam skala yang lebih besar, dapat dilakukan dengan mudah dan murah karena tidak memerlukan energi untuk menjaga suhu optimal pertumbuhannya. Dari percobaan tersebut dapat disimpulkan bahwa campuran medium yang terbaik bagi pertumbuhan *B. bassiana* adalah campuran tepung tapioka dan nasi.

Produksi Propagul *B. bassiana* dengan Substrat Tepung Beras melalui Teknik Fermentasi Padat

Terdapat empat syarat yang diperlukan untuk keberhasilan komersialisasi produk mikroinsektisida, yaitu: (1) isolat kapang mempunyai pertumbuhan yang cepat, konidia banyak, dan patogenisitas tinggi, (2) biaya produksi murah, (3) formulasi produk yang baik sehingga mempunyai

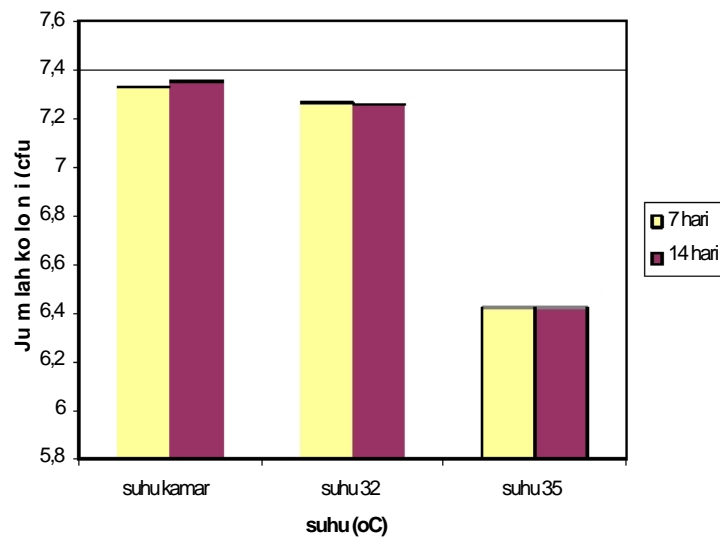
efektivitas tinggi saat diaplikasikan, dan (4) viabilitas dan infektivitas kapang tinggi untuk masa simpan yang cukup lama (Feng *et al.*, 1994). Produksi konidia *B. bassiana* menggunakan medium nasi (*rice-based medium*) pada fermentasi padat telah dilakukan oleh Stimac (1990), Nelson, Low, dan Glare (1996), Stimac dan Pereira (1997), sedangkan Bradley, *et al.* (1999) menggunakan medium *barley flakes*.

Penggunaan tepung beras didasarkan pada pertimbangan ekonomi karena dapat sekaligus digunakan sebagai bahan pembawa (*carrier*) yang relatif murah untuk formulasi produk mikoinsektisida. Hal tersebut sejalan dengan pendapat Raimbault (1998) yang menyatakan bahwa salah satu keuntungan fermentasi substrat padat adalah substrat fermentasi dapat sekaligus digunakan sebagai bahan pembawa (*carrier*). Meski medium padat yang terbaik untuk produksi propagul *B. bassiana* adalah campuran tepung tapioka dan nasi, namun dari segi biaya, penggunaan tepung beras saja tanpa penambahan bahan lain merupakan yang paling murah. Oleh karena itu pada penelitian tersebut dipilih sebagai medium fermentasinya adalah tepung beras. Hal serupa dilakukan oleh Stimac (1990) dalam memproduksi mikoinsektisida *B. bassiana* menggunakan medium beras yang ditanak setengah matang (karon), kemudian diinokulasi dan difermentasi selama 12-15 hari pada suhu ruang. Konidia dipanen dan dicampur dengan bahan talkum sebagai bahan pembawa.

Perbanyakkan propagul *B. bassiana* pada substrat tepung beras diinkubasi pada suhu kamar, 32°C dan 35°C selama 7 dan 14 hari. Hasil menunjukkan bahwa perlakuan suhu dan waktu yang dicobakan ternyata menghasilkan jumlah propagul (cfu) yang tidak berbeda nyata. Hal tersebut menunjukkan bahwa kedua isolat memberikan respons yang tidak berbeda terhadap substrat tepung beras, suhu dan waktu inkubasi yang dicobakan. Atau dengan kata lain fermentasi substrat padat khususnya tepung beras yang dilakukan pada suhu yang lebih tinggi dari pada suhu kamar yaitu 32°C dan 35°C serta waktu yang lebih lama dari 7 hari yaitu 14 hari ternyata tidak menyebabkan kenaikan jumlah cfu yang berbeda nyata. Kemungkinan hal tersebut disebabkan suhu kamar telah menjadi suhu yang cocok bagi kedua isolat untuk tumbuh dan berkembang, sehingga kenaikan suhu inkubasi tidak memberikan pengaruh yang positif, bahkan pada suhu 35°C terjadi penurunan jumlah cfu yang tinggi (Gambar 3) (Wahyudi, Pawiroharsono, & Ganjar, 2002).

Dengan mempertimbangkan efektivitas dan efisiensi, maka dapat dikatakan bahwa suhu kamar merupakan kondisi yang efektif dan efisien bagi pertumbuhan kapang *B. bassiana*. Efektivitas dinyatakan dengan jumlah cfu per gram produk yang tidak berbeda dibandingkan suhu 32°C, sementara efisiensi dapat terlihat bahwa suhu kamar lebih ekonomis dibandingkan suhu 32°C dan 35°C karena tidak memerlukan energi untuk menjaga stabilitas suhu.

Hasil bioassay menunjukkan bahwa propagul *B. bassiana* mempunyai patogenisitas terhadap ulat uji. Analisis Probit (menggunakan SPSS 10.01) terhadap mortalitas ulat grayak menunjukkan bahwa LC₅₀ dari propagul *B. bassiana* hasil adalah 2×10^6 cfu/ml. Hal ini menunjukkan kurangnya patogenisitas terhadap ulat grayak, karena nilai LC₅₀ yang lebih tinggi dari pada pada 10^5 cfu/ml. Menurut Bradley *et al.* (1999) nilai LC₅₀ yang baik untuk produk mikoinsektisida adalah $\leq 10^5$ cfu/ml.



Gambar 3. Grafik hubungan antara suhu dan jumlah cfu propagul *B. bassiana* pada inkubasi 7 dan 14 hari inkubasi

PENUTUP

Beberapa kelebihan dari potensi kapang *B. bassiana* sebagai mikroinsektisida adalah cara kerja (*mode of action*) secara kontak pada tubuh serangga hama, formulasi lebih mudah dan sederhana, biaya produksi lebih murah akibat medium fermentasi padat dapat sekaligus dijadikan bahan formulasi, dan daya tahan mikroinsektisida di lingkungan lebih lama dibandingkan bahan aktif bioinsektisida lain yang berupa protein.

Teknik produksi mikroinsektisida dari kapang entomopatogen sangat sederhana. Teknologi yang diperlukan juga tidak terlalu sulit untuk dikembangkan, diadopsi, dan dapat disebarluaskan di dalam negeri. Dari ragam teknologinya termasuk ke dalam teknologi tepat guna dengan skala kecil atau menengah.

Dari hal-hal yang telah diuraikan dalam pembahasan maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Isolasi kapang entomopatogen dari sampel yang berasal dari Brebes, Jawa Tengah diperoleh dua isolat kapang *B. bassiana* yaitu B.b 10B dan B.b W.1.1.
2. Kedua isolat *B. bassiana* mempunyai tingkat patogenisitas yang tinggi terhadap ulat grayak (*Spodoptera litura*)
3. Nilai pH medium dan suhu optimal untuk produksi propagul kapang *B. bassiana* adalah pH 5 dan suhu 32°C.
4. Medium fermentasi cair yang optimal untuk produksi propagul *B. bassiana* adalah mengandung glukosa 10 g/l dan urea 6 g/l
5. Medium fermentasi padat yang terbaik untuk produksi propagul *B. bassiana* adalah tepung tapioka dan nasi.
6. Produksi propagul *B. bassiana* dengan substrat tepung beras cukup sederhana, mudah dan murah, sehingga dapat dikembangkan untuk industri skala kecil dan menengah.

REFERENSI

- Aidoo, K.E., Hendry, R., & Moore, B.J.B. (1982). *Advanced in applied microbiology*. London: Academic Press,
- Ando, K. (2000). Isolation and identification of tropical fungi imperfecti. Dalam *Workshop isolasi dan identifikasi fungi imperfecti daerah tropis*. FNCC PAU Pangan & Gizi UGM Yogyakarta, 19-21 Januari 2000.
- Bilgrami, K.S. & Verna, R.N. (1978). *Physiology of fungi*. New Delhi: Vikas Publ.
- Bradley, C.A., Wood, P.P., & Britton, J. (1999). *Mycoinsecticide activity against grasshoppers produced by Beauveria bassiana*. United State Patent 5,939,065.
- Castineiras, A., Pena, J.E., Duncan, R., & Osborne, L. (1996). Potential of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as biological control agents of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae)". *Florida Entomologist*, 79 (3), 458-461.
- Doberski, J.W. & Tribe, H.T. (1980). Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 74 (1), 95-100.
- Domsch, K.H., Gams W., & Anderson, T.H. (1980). *Compendium of soil fungi*. London: Academic Press.
- Feng, M.G., Poprawski, T.J., & Khachatourians, G.G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. *Biocontrol Science Technology*. 4, 3-34.
- Gadd, G.M. (1988). Carbon nutrition and metabolism. In D.R. Berry, (Ed.), *Physiology of industrial fungi*. Oxford: Blackwell Scientific Publication.
- Gandjar, I., Samson, R. A., Van-den Tweel-Vermeulen, K., Oetari, A., & Santoso, I. (1999). *Pengenalan kapang tropik umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Geden, C.J., Arends, J.J., Rutz, D.A., & Steinkraus, D.C. (1998). Laboratory evaluation of *beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) against the lesser mealworm, *alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), in poultry litter, soil and a pupal trap. *Biology Control*, 13, 71-77.
- Griffin, D.H. (1981). *Fungal physiology*. New York: John Wiley and Sons.
- Humber, R.A. (1998). Entomopathogenic fungal identification. In *the APS/EPA Workshop 8-12 November 1998*, Las Vegas.
- Knauf, W. & Morales, E. (1999). *Insect control compositions comprising entomopathogenic fungi*. United State Patent 5,885,598.
- Mahr, S. (1999). The entomopathogen *beauveria bassiana*. *Midwest Biological Control News* 4 (10). Know your friends. Diambil 10 Maret 2008, dari <http://www.wisc.edu/entomology/mbcn/kyf410.html>
- Nelson, T.L., Low, A., & Glare, T.R. (1996). Large scale production of New Zealand strains of *beauveria* and *metarrhizium*. In *Proc. 49th N.Z. Plant Protection Conf.*, 257-261.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic J. Biotech*, 1 (3), 1-15.
- Samson, R.A. (1981). *Identification: Entomopathogenic deuteromycetes in microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. New York: Academic Press Inc.
- Stimac, J.L. (1990). *Biological control of imported fire ants with a fungal pathogen*. United State Patent 4,925,663.

- Stimac, J.L. & Pereira, R. (1997). *Controlling cockroaches, carpenter ants, and pharaoh ants using strains of beauveria bassiana*. United State Patent 5,683,689.
- Vandenberg, J.D. (1996). Standardized bioassay and screening of *beauveria bassiana* and *paecilomyces fumoroseus* against the Russian wheat aphid (*Homoptera: Aphididae*). *Biology, Microbiology Control*, 89 (6), 1418-1423.
- Wahyudi, P. (1999). Produksi insektisida berbahan aktif kapang entomopatogen *beauveria bassiana*: Sebuah tinjauan mengenai rancangan proses produksi. *Jurnal Sains & Teknologi Indonesia*, 1 (9), 36-42.
- Wahyudi, P. (2001). *Direktori potensi mikroorganismen: Agen biokontrol & biopestisida*. Jakarta: Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- Wahyudi, P. & Suwahyono, U. (2002). Optimasi pH dan suhu pada produksi propagul kapang *beauveria bassiana*. *Prosiding seminar teknologi untuk negeri*. Jakarta: Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- Wahyudi, P. (2002a). Uji patogenisitas kapang Entomopatogen *beauveria bassiana* indigenos terhadap ulat grayak (*Spodoptera litura*). *BIOSFERA*, 19 (1).
- Wahyudi, P. (2002b). Optimasi medium cair untuk produksi propagul kapang *beauveria bassiana*. Dipresentasikan pada *Seminar Nasional Mikrobiologi, Pertemuan Ilmiah Tahunan PERMI, 1- 2 Oktober 2002*.
- Wahyudi, P. (2002c). Kajian komposisi medium fermentasi padat untuk produksi propagul kapang entomopatogen *beauveria bassiana*. *Jurnal Biosains dan Bioteknologi Indonesia*, 2 (2), 48-52.
- Wahyudi, P. (2003). Eksplorasi dan skrining kapang entomopatogen *beauveria bassiana* dari Brebes, Jawa Tengah. *Jurnal Bioindustri Indonesia*, 1 (1), 29-32.
- Wahyudi, P., Pawiroharsono, S., & Gandjar, I. (2002). Optimasi produksi mikroinsektisida dari *beauveria bassiana* pribumi dengan substrat tepung beras. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 7 (1), 4-6.
- Wright, J.E. & Chandler, L.D. (1995). *Biopesticide composition and process for controlling insect pest*. United State Patent No. 5,413,784.