

Lipolytic-screening of *Bacillus* genera as Biocontrol candidate In Coffee Plantation

Emma Ervina*, Cristina Nugroho Ekowati, Sumardi, Emantis Rosa

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung
Jalan. Prof. Soemantri Brojonegoro, Bandar Lampung, 35145
*Email: emajung.03@gmail.com

ABSTRACT

Problem in decreasing coffee production was caused by plant pests attack. Countermeasures using pesticides and disinfectants are not effective because they have long effects and ruining the environment also pest resistance. It is necessary to prevent a more environmentally friendly way by utilizing a natural enemy in the form of a microorganism, the genus *Bacillus*. Lipase can hydrolyze lipids so that it can be used to degrade lipid substrates that complicate the body structure of pests and diseases. This research aims to detect the lipolytic activity of *Bacillus* isolates from coffee plantations. The results of this research obtained 3 isolates of *Bacillus* namely T1, T2, and T3 which have differences in cell configuration and variations in the location of endospores. Furthermore, *Bacillus* isolates were detected lipolytic activity by growing isolates on lipase selective medium. Isolates that have the largest lipolytic activity are T2 isolate codes with an average index of 6.01 and the lowest lipolytic activity, namely, isolate T1 codes with an average index of 4.58.

Keywords: bacillus, soil, lipolytic activity

PENDAHULUAN

Kopi termasuk tanaman hasil perkebunan yang memiliki nilai ekonomi tinggi baik di pasar nasional maupun internasional. Namun, produksi kopi di Indonesia mengalami penurunan terus mengalami fluktuasi. Menurut Badan Pusat Statistik (2017), produksi kopi mengalami penurunan sebesar 13,84% pada tahun 2015 dan sebesar 4,95% pada tahun 2017. Menurut Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (2015), penurunan produksi kopi ini salah satunya disebabkan oleh serangan Organisme Pengganggu Tanaman (OPT), yaitu hama dan penyakit.

Penanggulangan terhadap permasalahan tanaman kopi menggunakan pestisida dan desinfektan dinilai efektif. Namun dalam jangka panjang hal ini dapat merugikan lingkungan dan siklus biogeokimia. Oleh karena itu, diperlukan pendekatan pencegahan yang lebih ramah lingkungan. Pengendalian biologi dapat dijadikan solusi,

yaitu dengan memanfaatkan agen atau musuh alami yang dapat menekan pertumbuhan hama atau penyakit.

Menurut Mampallil *et al.*, (2017), genus *Bacillus* diketahui banyak digunakan sebagai agen pengendali hayati. Selain itu, pemanfaatan *Bacillus* sebagai agen biokontrol juga dapat mengurangi biaya pertanian dengan menekan kebutuhan pestisida dan pupuk. Hal ini dikarenakan *Bacillus* menghasilkan endospora, beberapa spesies menghasilkan toksin dan enzim ekstraseluler yang berfungsi untuk mendegradasi struktur tubuh hama maupun penyakit.

Adanya aktivitas lipolitik pada *Bacillus* dapat digunakan sebagai agent untuk mendegradasi struktur tubuh serangga hama maupun penyakit yang mengandung substrat lipid. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi aktivitas lipolitik isolat *Bacillus* dari tanah perkebunan kopi.

METODE

Pengumpulan Sampel

Sampel bakteri diisolasi dari tanah perkebunan kopi di daerah Sumberejo, Tanggamus, Lampung. Sampel diambil 5-10 cm dibawah permukaan tanah yang berada dibawah kanopi tanaman kopi. Selanjutnya sampel diisolasi di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Lampung.

Isolasi dan Pemurnian Isolat *Bacillus*

Sampel tanah sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam 9 ml larutan pengencer garam fisiologis steril 0,85% dalam tabung reaksi steril. Suspensi dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* kemudian dipanaskan pada *waterbath* dengan suhu 85°C selama 15 menit. Kemudian dibuat seri pengenceran sampai 10⁻⁶. Sebanyak 1 ml suspensi dari pengenceran 10⁻⁴ sampai 10⁻⁶ diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* menggunakan metode *pour plate agar*. Selanjutnya media yang telah diinokulasi, cawan diinkubasi secara terbalik pada suhu ruang selama 24 jam.

Koloni bakteri yang berbeda dimurnikan dengan metode *streak plate agar* pada medium *Nutrient Agar*. Koloni yang terpisah pada medium, dimurnikan kembali pada media *Nutrient Agar* miring. Isolat yang tumbuh pada media miring adalah isolat murni.

Identifikasi Isolat *Bacillus*

Dalam buku *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* marga *Bacillus* memiliki warna koloni putih susu atau krem, berbentuk batang, bersifat Gram positif, dan memiliki endospora berbentuk oval atau bulat.

Uji Lipolitik Isolat *Bacillus*

Aktivitas lipolitik isolat *Bacillus* dideteksi melalui uji kualitatif menggunakan media selektif lipase dengan komposisi bahan per liter yaitu *olive oil* steril 5 %, Tween-80 2,5%, NaCl 5 g, CaCl₂.2H₂O 0,1 g, metil merah 0,01%, pepton 10 g, dan *Nutrient Agar* (Bestari dan Suharjono, 2015). Isolat *Bacillus* berumur 24 jam diinokulasikan dengan metode titik pada media selektif lipase. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam dengan posisi cawan terbalik. Setelah inkubasi, diamati dan diukur

zona hidrolisis (zona jernih) yang terbentuk di sekitar koloni.

Penentuan indeks lipolitik (IL) dihitung menggunakan rumus menurut Nurdin dkk., 2015:

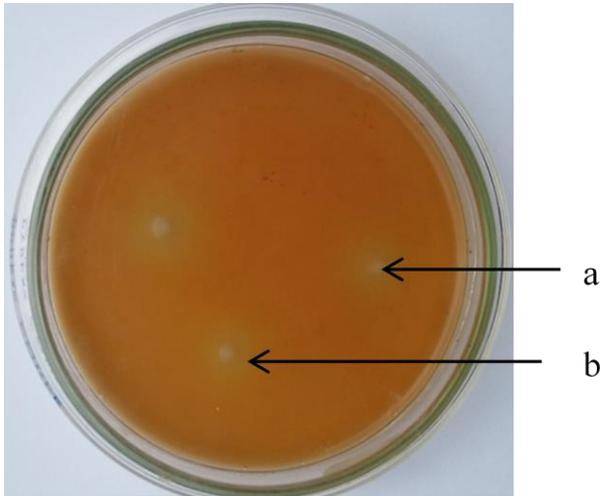
$$IL = \frac{\text{Luas zona jernih} - \text{Luas koloni}}{\text{Luas koloni}}$$

Bioassay Isolat *Bacillus* terhadap larva *Plutella xylostella* Berdasarkan Metode Uji Daya Bunuh (Salaki, 2011)

Dimasukkan 10 ekor larva ke dalam wadah dan diberi pakan daun sawi yang sudah diolesi suspensi isolat *Bacillus* dengan konsentrasi 1 x 10⁸ sel/ml. Kemudian wadah ditutup dan diberi lubang udara secukupnya. Pengamatan bioassay awal ini dilakukan selama 48 jam. Diamati perubahan perilaku dan fisik dari larva sebelum dan sesudah infeksi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri dari tanah perkebunan kopi, diperoleh 3 jenis isolat. Berdasarkan pengamatan secara mikroskopis menunjukkan bentuk sel batang, Gram positif, dan memiliki endospora berbentuk oval. Perbedaan setiap isolat terdapat pada konfigurasi sel yaitu isolat T1 (batang, diplobacil), isolat T2 (batang, monobacil) dan isolat T3 (batang, diplobacil). Selain itu terdapat variasi letak endospora yaitu isolat T1 (terminal, sub terminal dan sentral), isolat T2 (sentral) dan T3 (terminal dan sentral). Berdasarkan karakteristik tersebut, isolat yang diperoleh masuk ke dalam Marga *Bacillus* sesuai dengan ciri-ciri yang disebutkan dalam buku *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.



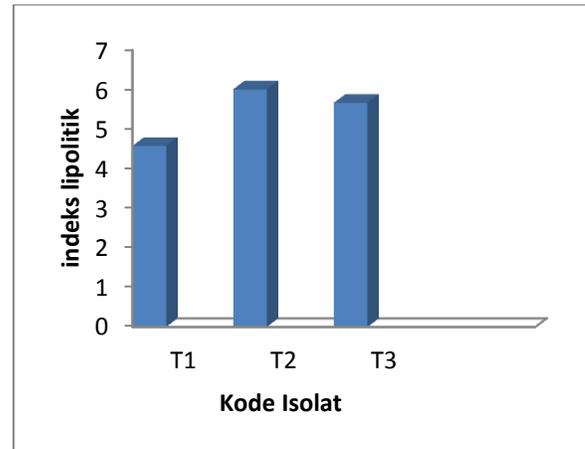
Gambar 1. Uji kualitatif lipolitik isolat *Bacillus* sp. (a) Zona jernih; (b) koloni bakteri

Ketiga isolat *Bacillus* mampu mendegradasi media selektif lipase dengan menunjukkan zona hidrolisis di sekitar koloni. Pada metode ini, tween 80 digunakan untuk mendeteksi lipase karena mengandung ester asam oleat. *Bacillus* akan menghidrolisis tween 80 menjadi asam mono-oleat. Asam mono-oleat ini akan berikatan dengan kalsium (dari $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) sehingga terbentuk kekeruhan warna di sekitar koloni. Pada penelitian ini digunakan metil red sebagai pH indikator (Gambar 1). Pada kondisi tersebut, terjadi penurunan pH dari 7 (pH media) menuju pH yang lebih asam dan menghasilkan warna dari orange menjadi kuning di sekitar koloni. Peningkatan keasaman ini dikarenakan oleh pelepasan asam lemak hasil degradasi lipid (Ramnath dkk., 2017).

Berdasarkan hasil perhitungan yang diperoleh, isolat *Bacillus* dengan kode T2 memiliki nilai indeks lipolitik terbesar yaitu 6,01. Sedangkan, isolat yang memiliki indeks lipolitik terkecil yaitu kode T1 dengan indeks 4,58 (Gambar 2).

Menurut data tersebut, setiap isolat memiliki kemampuan lipolitik dan memiliki potensi sebagai agen pengendali hayati karena mampu mendegradasi substrat lemak yang biasanya banyak terdapat pada membran sel larva dan midgut hama tanaman kopi. Enzim lipase sangat penting untuk proses awal infeksi pada degradasi kutikula serangga. Hal ini dikarenakan lapisan kutikula pada

serangga terdiri dari campuran lipid, alkana, ester dan asam lemak (Showket *et al.*, 2017).



Gambar 2. Rata-rata aktivitas lipolitik isolat *Bacillus*

Namun efektivitas isolat sebagai biokontrol maupun biodegradasi tidak hanya ditentukan oleh besarnya indeks enzimatis saja. Supaya menjadi agen biokontrol maupun biodegradasi yang efektif, perlu adanya konsorsium dengan mikroorganisme lain yang memiliki aktivitas enzimatis yang lainnya. Maka perlu dilakukannya uji lanjut untuk membuktikan kemampuan degradasi isolat terhadap substrat lemak.

Berdasarkan uji bioassay terhadap 10 ekor larva *Plutella xylostella* dengan perlakuan diberi pakan daun sawi yang telah diolesi suspensi isolat *Bacillus* menunjukkan tingkat kematian larva yang signifikan (Tabel 1).

Berdasarkan data tersebut, larva yang mengalami kematian tertinggi yaitu yang diberi perlakuan dengan isolat *Bacillus* kode T3. Namun, seluruh isolat memiliki kemampuan untuk mematikan larva *Plutella xylostella*. Kematian setiap larva ditandai dengan adanya perubahan dari bergerak aktif, tubuh berwarna hijau dan memakan daun dengan cepat menjadi bergerak pasif, warna tubuh menjadi kekuningan hingga kehitaman, berhenti makan hingga mengalami lisis pada struktur tubuhnya.

Tabel 1. Bioassay isolat *Bacillus* terhadap larva *Plutella xylostella*

Kode Isolat	Jumlah Larva Awal	Kondisi Akhir Larva (Setelah 48 jam)		
		Hidup	Lemas	Mati
T1	10	2	2	6
T2	10	3	-	7
T3	10	-	-	10

Hal ini dikarenakan pada proses infeksi pada serangga, adanya aktifitas lipolitik pada *Bacillus* dinilai mampu mendegradasi menyusun struktur serangga. Lipase merupakan enzim yang memulai proses degradasi kutikula pada infeksi serangga hama. Lipase akan mendegradasi epikutikula dengan merusak ikatan ester lipoprotein, lemak dan lilin pada kutikula. Aktivitas lipolitik pada *Bacillus* meningkatkan mortalitas pada larva. Selain itu, masuknya kristal protein dari isolat *Bacillus* ke dalam midgut larva sehingga terjadinya ketidakseimbangan osmotik dalam tubuh dan menyebabkan sel lisis. Melanisasi pada tubuh larva dapat disebabkan karena degradasi protein hemolymph dan terjadi melanisasi internal pada tubuh larva. Selain itu, perubahan warna pada tubuh larva dikarenakan kerja enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme dan menyerang tubuh larva (Indriyanti *et al.*, 2017).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan isolat *Bacillus* yang memiliki aktivitas lipolitik terbesar adalah kode isolat T2 dengan rata-rata indeks 6,01 dan aktivitas lipolitik terendah yaitu kode isolat T1 dengan rata-rata indeks 4,58.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pusat Statistik. (2017). *Statistik Indonesia*. Badan Pusat Statistik, Indonesia.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. (2015). *Teknologi*

Pengendalian Hama dan Penyakit Tanaman Kopi. Jakarta: IAARD Press.

- Bestari, Chandra, N & Suharjono. (2015). Uji Kualitatif Isolat Bakteri Lipolitik dari Limbah Cair Pabrik Pengolahan Ikan Kecamatan Muncar, Banyuwangi. *Jurnal Biotropika*, 3(3).
- Inadriyanti, D.R., Indah, B.D., Ning, S., Bambang, P. (2017). Mortalitas dan Kerusakan Jaringan pada Setiap Gejala Infeksi Larva *Oryctes rhinoceros* L. Akibat Perlakuan Cendawan *Metarhizium anisoplia*. *Unnes Journal Life Science*. 6 (1).
- Mampallil, J.L., Faizal, M.H., and Anith, K.N. (2017). Bacterial Bioagents for Insect Pest Management. *Journal of Entomology and Zoology Student*.5(6), 2237-2244.
- Nurdin, G.M., Mubarik, N.S., dan Sudirman, L.I. (2015). Selection of chitinolytic bacteria as biocontrol of *Colletotrichum capsici*. *Malaya J Microbiol*. 12(1), 35-42.
- Ramnath, L., Sithole, B., Govinden, R. (2017). Identification of lipolytic enzyme isolated from bacteria indigenous to *Eucalyptus* wood species for application in the pulping industry. *Journal Biotechnology Report*. 15,114-124
- Showket, A.D., Bashir, A.R., Ajaz, A.K. 2017. Insect pest management by entomopathogenic fungi. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 5(3), 1185-1190.