



Identifikasi *Bacillus thuringiensis* Dari Tanah Kebun Kelapa Sawit Kabupaten Batubara Menggunakan Pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB)

¹Roza Ulfayanti Siregar, ^{2*}Dwi Suryanto, ³Masitta Tanjung

^{1,2,3}Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Sumatera Utara, Medan, Indonesia

*Corresponding Author e-mail: dwisuryanto@usu.ac.id

Received: July 2025; Revised: August 2025; Accepted: September 2025; Published: September 2025

Abstrak: Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi secara sederhana isolat *Bacillus thuringiensis* dari tanah Perkebunan kelapa sawit di Kabupaten Batubara melalui pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). Sampel tanah diisolasi dengan menggunakan metode pengenceran bertingkat dan kemudian ditumbuhkan pada medium selektif. Koloni yang terbentuk diamati berdasarkan ciri morfologi Bt. Hasil penelitian ini menunjukkan beberapa isolat memiliki karakteristik morfologi yang sesuai dengan ciri *Bacillus thuringiensis*. Pewarnaan CBB berhasil mendeteksi keberadaan protein kristal pada beberapa isolat, ditandai dengan terbentuknya kristal dan mampu mengikat warna biru pada sel yang telah mengalami sporulasi yang mengindikasikan adanya delta-endotoksin. Penelitian ini menegaskan bahwa tanah perkebunan kelapa sawit di Kabupaten Batubara berpotensi sebagai sumber isolat Bt loka. Isolat Bt yang ditemukan dapat dijadikan kandidat awal dalam pengembangan biopestisida sekaligus mendukung strategi pengendalian hama yang ramah lingkungan dan berkelanjutan.

Kata Kunci: *Bacillus thuringiensis*; tanah perkebunan kelapa sawit; *coomassie brilliant blue*; bioinsektisida

Abstract: This study aims to simply identify *Bacillus thuringiensis* isolates from oil palm plantation soil in Batubara Regency through *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) staining. Soil samples were isolated using a serial dilution method and then grown on selective media. The colonies formed were observed based on the morphological characteristics of Bt. The results of this study indicate that several isolates have morphological characteristics that match the characteristics of *Bacillus thuringiensis*. CBB staining successfully detected the presence of crystalline proteins in several isolates, characterized by the formation of crystals and the ability to bind blue dye in cells that have undergone sporulation, indicating the presence of delta-endotoxin. This study confirms that oil palm plantation soil in Batubara Regency has the potential as a source of local Bt isolates. The Bt isolates found can be used as initial candidates in the development of biopesticides while supporting environmentally friendly and sustainable pest control strategies.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, soil palm plantation, *coomassie brilliant blue*, bioinsecticide

How to Cite: Siregar, R. U., Suryanto, D., & Tanjung, M. (2025). Identifikasi *Bacillus thuringiensis* Dari Tanah Kebun Kelapa Sawit Kabupaten Batubara Menggunakan Pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). *Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi*, 13(3), 2177–2183. <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v13i3.17632>



<https://doi.org/10.33394/bioscientist.v13i3.17632>

Copyright© 2025, Siregar et al
This is an open-access article under the CC-BY-SA License.



PENDAHULUAN

Produksi komersial pertama *Bacillus thuringiensis* (Bt) dilaporkan pada tahun (1938) di Perancis. Produk ini dijual dengan nama *Sporeine*. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa kemampuan Bt untuk membunuh larva serangga disebabkan oleh inklusi protein kristal atau disebut juga pembentukan struktur kristal tertentu yang terbentuk selama sporulasi (Rashki *et al.*, 2021). Bt adalah bakteri gram positif anaerobik fakultatif membentuk inklusi protein khas berdekatan dengan *parasporal body*. Beberapa Bt dapat mensintesis lebih dari satu inklusi parasporal.

Bt secara genetik tidak dapat dibedakan dengan *B. cereus*, kecuali kemampuan Bt untuk menghasilkan inklusi kristal *parasporal body*. Secara umum, racun Cry membunuh kelompok invertebrata terutama spesies larva serangga Coleoptera, Diptera dan Lepidoptera, Inklusi parasporal dibentuk oleh protein kristal insektisida yang berbeda. (Sridhara *et al.*, 2021). Bt strain menghasilkan jenis racun yaitu protein

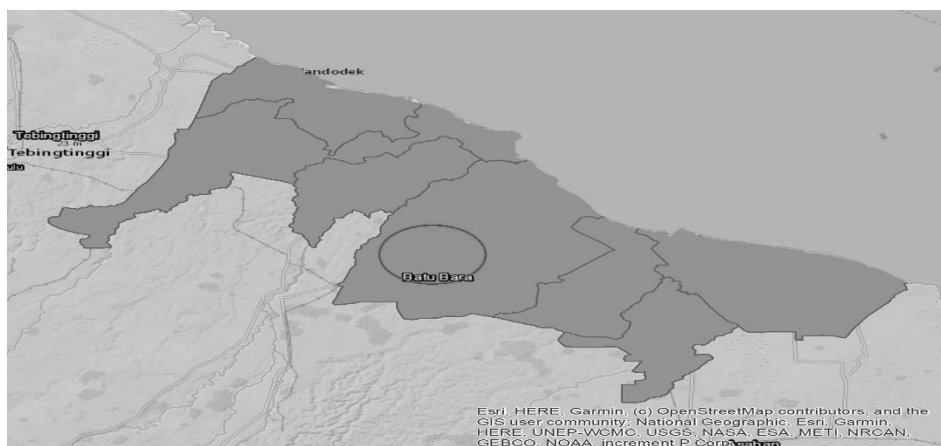
Cry dan Cyt yang dikenal sebagai delta-endotoksin. Ini disintesis oleh bakteri selama fase diam ketika sporulasi terjadi. Protein ini diproduksi sebagai inklusi kristal parasporal yang diaktifkan oleh tindakan proteolitik di dalam usus serangga setelah dikonsumsi. Inklusi kristal ini akan terbentuk di dalam sel Bt bersamaan dengan pembentukan spora, dan dapat diamati secara mikroskopis. Kristal insektisida memerlukan pelarutan di usus tengah serangga (John Shanthi & Sumathy Victor, 2023).

Tanah diperkebunan kelapa sawit biasanya mengandung berbagai jenis mikroorganisme yang dapat membantu meningkatkan kesuburan tanah serta meningkatkan pertumbuhan tanaman. Mikroba ini berperan dalam siklus nutrisi, seperti nitrogen dan fosfor sangat penting bagi tanaman kelapa sawit. Mikroorganisme seperti *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, dan *Actinomyces* memiliki peran penting dalam meningkatkan ketersediaan nutrisi dan menekan populasi patogen. Salah satu bakteri tanah yang potensial di perkebunan kelapa sawit adalah *Bacillus thuringiensis* (Bt). Bt dikenal karena kemampuannya sebagai agen biokontrol terhadap hama, serta kemampuannya dalam mendukung kesehatan tanah dan tanaman melalui interaksinya dengan tanah kelapa sawit (Zain *et al.*, 2014).

Identifikasi Bt dapat dilakukan dengan berbagai pendekatan, salah satunya melalui pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). Pewarnaan ini berfungsi untuk mendeteksi kristal protein yang dihasilkan Bt selama fase sporulasi (Gangmei, *et al* 2024). Kristal yang berikatan dengan pewarna CBB akan tampak berwarna biru dibawah mikroskop, sehingga mempermudah pengamatan dan memastikan keberadaan Bt pada isolat yang diperoleh (Palma *et al.*, 2014). Metode ini memungkinkan identifikasi Bt secara lebih cepat dan efisien. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengidentifikasi isolat Bt dari tanah perkebunan kelapa sawit di Kabupaten Batubara dengan menggunakan pewarnaan CBB. Hasil Penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai keberadaan isolat Bt lokal yang berpotensi dikembangkan sebagai bioinsektisida ramah lingkungan, mendukung upaya pengendalian hama yang berkelanjutan pada ekosistem perkebunan kelapa sawit.

METODE

Penelitian telah dilakukan pada Agustus 2024 sampai dengan April 2025. Di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Molekuler dan Genetika, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara. Sampel tanah dikumpulkan dari Desa Tanah Gambus, Kecamatan Lima Puluh, Kabupaten Batubara, Provinsi Sumatera Utara, Indonesia.



Gambar 1: Map pengambilan sampel di Kabupaten Batubara

Prosedur Penelitian

1. Isolasi Bakteri *Bacillus thuringiensis* dari Sampel Tanah

Sebanyak 500 gram sampel tanah kebun kelapa sawit dengan kedalaman 10-20 cm dari atas permukaan tanah yang berada di perkebunan kelapa sawit di Kabupaten Batubara Semua sampel tanah dipaparkan pada suhu 75 °C selama 20 menit untuk membunuh sebagian besar sel yang tidak membentuk spora. Sampel tanah disuspensikan dalam larutan NaCl 0,85% (1 g tanah/larutan garam); semua sampel homogenkan dengan menggunakan vortex. Sekitar 0,1 ml setiap suspensi tanah disemai ke dalam media Nutrient Agar (NA), dan waktu inkubasi adalah 24 jam pada suhu 30 °C (Zain *et al.*, 2014).

2. Sporulasi

Untuk menginduksi terjadinya sporulasi maka kultur murni *Bacillus thuringiensis* dipelihara pada media yang mengandung tryptose. Sel isolat potensial Bt ditumbuhkan pada medium T3 yaitu (per liter: 3 g tripton, 2 g triptosa, 1,5 g ekstrak ragi, 0,05 M natrium fosfat [pH 6,8], dan 0,005 g MnCl pada suhu 30°C dan kecepatan 200 rpm selama 7 hari untuk induksi spora (Hassan *et al.*, 2021).

3. Pewarnaan Gram

Media isolasi koloni tunggal yang digunakan dalam percobaan ini adalah media Luria-bertani (LB). Pemurnian dan pemeliharaan dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 72 jam. Isolat Bt diinokulasikan menggunakan teknik *spread plate*. Kemudian dilakukan pewarnaan Gram untuk memastikan karakteristik bakteri Gram Positif berbentuk batang sebagai ciri khas Bt (Hassan *et al.*, 2021).

Pewarnaan Coomassie Brilliant Blue (CBB)

Keberadaan kristal protein parasporal dideteksi menggunakan metode pewarnaan CBB sebagaimana dijelaskan oleh (Adeyayo & Uthman, 2021). Dengan sedikit modifikasi, suspensi kultur Bt yang mengandung spora dan kristal diambil setelah inkubasi, kemudian dibuat preparat ulas pada kaca objek dan difiksasi dengan pemanasan. Preparat diamati menggunakan mikroskop cahaya dan fase kontras dengan perbesaran 100x-1000x. Koloni yang menunjukkan keberadaan sel batang, spora, dan inklusi parasporal kristal dinyatakan positif isolat Bt.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri *Bacillus thuringiensis* (Bt) dari tiga sampel tanah Perkebunan Kelapa Sawit di Kabupaten Batubara diperoleh sejumlah varian isolat. Koloni dibedakan secara morfologi berdasarkan pengamatan mikroskopis. Identifikasi secara karakteristik morfologi dengan menggunakan media Luria-Bertani (LB).

Tabel 1. Karakteristik morfologi koloni dan pewarnaan gram isolat bakteri dari tanah Perkebunan Kelapa Sawit di Batubara

No.	Isolate	Total coloni	Shape	Edge	Elevation	Colour	Cell	Gram
1.	BTKS 01	11	Circular	Entire	Convex	White	Basil	(+)
2.	BTKS 01	11	Circular	Curred	Convex	cream	Basill	(+)
3.	BTKS 01	7	Circular	Entire	Convex	White	Basil	(-)
4.	BTKS 05	25	Irregular	Undulate	Raised	White	Basil	(+)
5.	BTKS 05	3	Circular	Entire	Purvinate	cream	Basil	(+)
6.	BTKS 05	1	Circular	Entire	Convex	White	Coccus	(-)
7.	BTKS 07	32	Irregular	Lobate	Convex	cream	Basil	(+)
8.	BTKS 07	11	Irregular	Undulate	Convex	White	Basil	(+)
9.	BTKS 07	1	Irregular	Entire	Convex	Cream	Coccus	(-)

Keterangan: Isolat 1–3 berasal dari lokasi 1, isolat 4–6 dari lokasi 2, dan isolat 7–9 dari lokasi 3.

Hasil ini sesuai dengan penelitian (Adeyemo *et al.*, 2018), mengatakan karakteristik isolat yang diduga Bakteri *Bacillus thuringiensis* isolat yang telah diperiksa umumnya, koloni berwarna krem, cenderung memiliki tampilan kaca buram yang besar, awalnya, tetapi menjadi buram dan menyebar di atas lempeng seperti yang ditunjukkan pada cawan petri. Beberapa koloni bersifat mukoid, yang lain rapuh. Delapan isolat bersifat Gram-positif dan pembentuk spora. Bakteri *Bacillus thuringiensis* adalah bakteri tanah saprofit fakultatif Gram-positif dan pembentuk spora anaerob. Toksisitasnya disebabkan oleh endotoksin, yang terbuat dari protein yang diproduksi dan dirakit saat bakteri bersporulasi. (Alba-Tercedor & Vilchez, 2023).

Penelitian lain oleh Sridhara *et al.* (2021), Mengisolasi bakteri dari tanah lahan persawahan, India. Mendapatkan karakterisasi koloni isolat yang diduga *Bacillus thuringiensis* secara morfologi memiliki warna putih hingga krem, bentuk koloni circular, permukaan yang halus hingga bergelombang, bentuk sel batang, dan bersifat gram positif, membentuk spora dan motil. Spora ditemukan ditengah sel, dan semua isolat menghasilkan protein kristal dengan berbagai bentuk.

Berdasarkan hasil identifikasi morfologi koloni dan pewarnaan gram terhadap isolat bakteri yang diperoleh dari sampel tanah kebun kelapa sawit di tiga titik lokasi berbeda, didapatkan sembilan isolat dengan karakteristik koloni yang bervariasi. Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa mayoritas isolat merupakan bakteri Gram positif, yang sesuai dengan karakteristik utama genus *Bacillus*, termasuk Bt. Dari sembilan isolat yang diuji, enam isolat menunjukkan hasil gram positif yaitu yang mewakili masing masing sampel Lokasi 1 (BTKS 01, BTKS 01) Lokasi 2 (BTKS 05, BTKS 05), dan lokasi 3 (BTKS 07, BTKS 07), sedangkan ketiga isolat lainnya menunjukkan hasil gram negatif. Pengamatan bentuk sel memperlihatkan bahwa sebagian besar isolat berbentuk basil sedangkan tiga lainnya berbentuk kokus. Hasil ini menunjukkan adanya keragaman morfologi bakteri yang diisolasi dari tanah perkebunan kelapa sawit (Golnari *et al.*, 2024).

Sporulasi

Proses induksi Sporulasi dilakukan untuk merangsang terbentuknya spora dan kristal protein (Cry/Cyt) pada isolat *Bacillus thuringiensis* (Bt) yang telah diidentifikasi sebelumnya. Isolat ditumbuhkan pada medium T3, medium ini telah terbukti mendukung pembentukan struktur parasporal secara efisien (Hassan *et al.*, 2021; Belderok *et al.*, 2022). Inkubasi dilakukan pada suhu 30° C dengan kecepatan rotasi 200 rpm selama 7 hari. Hasil inkubasi diperoleh pelet yang menunjukkan adanya kristal protein parasporal (Ortiz & Sansinenea, 2022).

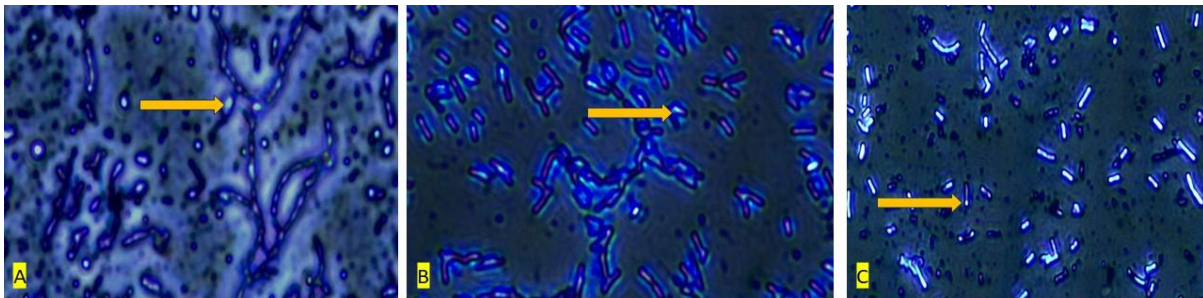
Pewarnaan Coomassie Brilliant Blue (CBB)

Pengamatan kristal protein dilakukan dengan pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) dan menunjukkan adanya endospora. Pada pewarnaan untuk keberadaan kristal protein, ditemukan 10 isolat yang menunjukkan hasil positif. Kristal protein diamati di bawah mikroskop fase kontras yang disaring dengan bentuk melingkar hingga kuboid (Kumar *et al.*, 2021).

Ketiga isolat yang telah teridentifikasi positif menghasilkan endospora. Dilakukan uji lanjut menggunakan pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) untuk mengamati keberadaan kristal protein (Cry atau Cyt). Kristal ini merupakan toksin protein yang hanya diproduksi oleh *Bacillus thuringiensis* selama fase sporulasi. Perwarnaan CBB efektif karena afinitas tinggi terhadap peptida, sehingga dapat mengikat dan memperjelas struktur kristal protein secara mikroskopis.

Hasil pewarnaan CBB menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut memberikan hasil positif, ditandai dengan tampaknya kristal sebagai struktur bercahaya atau terang

di dalam sel bakteri (Gambar 2). Hasil positif pada ketiga isolat (BTKS 01, BTKS 05, BTKS 07) memperkuat identifikasi bahwa ketiganya merupakan *Bacillus thuringiensis* dan memiliki potensi untuk digunakan sebagai agen hayati pengendali serangga.



Gambar 2. Mikrograf sel *Bacillus thuringiensis* hasil pewarnaan Coomassie Brilliant Blue dibawah mikroskop fase kontras (Perbesaran 50 μ m). (A)Isolat dari sampel pertama BTKS 01. (B) Isolat sampel kedua BTKS 05, dan (C) Isolat sampel ketiga BTKS07

Bacillus thuringiensis menunjukkan ciri-ciri yang sangat unik dibandingkan dengan bakteri lain. Morfologi dan biokimia tubuh parasporanya serta pola plasmidnya unik di antara galur *Bacillus* lainnya. Karakteristik lain, seperti kurangnya toksisitas terhadap serangga rentan yang diketahui dan serotipenya, berkontribusi pada kekhasan tersebut. Identifikasi pewarna CBB menguatkan pengamatan mikroskopis awal mengenai identitas spesies (Lo'pez et al., 1996). Hasil dari penelitian (Talat A. El-kersh, 2011), Setelah skrining awal dengan mikroskop kontras fase, semua isolat Bt memiliki banyak karakteristik morfologi dalam hal susunan rantai sel, bentuk spora elipsoid (Berkelmann et al., 2020).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa isolat *Bacillus thuringiensis* berhasil diperoleh dari tanah perkebunan kelapa sawit di Kabupaten Batubara dan berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen biokontrol hama terpadu. Hasil pewarnaan Coomassie Brilliant Blue (CBB) menunjukkan adanya kristal protein berwarna biru yang menjadi ciri khas Bt.

REKOMENDASI

Penulis merekomendasikan agar penelitian lanjutan diperlukan untuk karakterisasi molekuler dan uji toksisitas terhadap serangga sasaran guna memastikan potensi isolat sebagai kandidat bioinsektisida ramah lingkungan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP), Kementerian Keuangan Republik Indonesia atas dukungan pendanaan yang diberikan sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Adedayo, M. R., & Uthman, A. A. (2021). *Bacillus thuringiensis* Isolated from Flour Mill Soil And Its Toxicity Against Culex And Aedes Larvae. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 225–232. <https://doi.org/10.5799/jmid.1036820>
- Adeyemo, I. A., Abdul-Wahab, S. O., & Obadofin, A. A. (2018). Biocontrol potential of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil samples against mosquito larvae. *Ife Journal of Science*, 20(2), 279. <https://doi.org/10.4314/ij.s.v20i2.8>

- Alba-Tercedor, J., & Vilchez, S. (2023). Anatomical damage caused by *Bacillus thuringiensis* variety israelensis in yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (L.) larvae revealed by micro-computed tomography. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35411-1>
- Berkelmann, D., Schneider, D., Hennings, N., Meryandini, A., & Daniel, R. (2020). Soil bacterial community structures in relation to different oil palm management practices. *Scientific Data*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-020-00752-3>
- Golnari, M., Bahrami, N., Milanian, Z., Rabbani Khorasgani, M., Asadollahi, M. A., Shafiei, R., & Fatemi, S. S. A. (2024). Isolation and characterization of novel *Bacillus* strains with superior probiotic potential: comparative analysis and safety evaluation. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51823-Z>
- Gangmei K, Padmanaban H, Kunnikuruvan A, Lukose J, Bora B, Sivaprakasam M, Poopathi S. (2024). Isolation of Mosquitocidal Bacteria from Soil samples to control Mosquito vectors. *Indian Journal of Entomology*, 640-643.
- Hassan, A. A., Youssef, M. A., Elashtokhy, M. M. A., Ismail, I. M., Aldayel, M., & Afkar, E. (2021). Isolation and identification of *Bacillus thuringiensis* strains native of the Eastern Province of Saudi Arabia. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00352-8>
- John Shanthi, J. J. S., & Sumathy Victor, V. J. H. (2023). Isolation of *Bacillus thuringiensis* from soil and their impact on mosquito larvae. *Sustainability, Agri, Food and Environmental Research-DISCONTINUED*, 12(2). <https://doi.org/10.7770/safer-v13n1-art512>.
- Khotimah S, Suharjono S, Ardyati T, Nuraini Y, (2020). Isolation and identification of cellulolytic bacteria at fibric, hemic and sapric peat in Teluk Bakung Peatland, Kubu Raya District, Indonesia:-. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(5).
- Kumar P, Kamle M, Borah R, Mahato D, Sharma B, (2021). *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1):95.
- Lo'pez, J. E., Lo'pez-Meza, L., & Ibarra, J. E. (1996). Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 62, Issue 4). <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Nasution F, Suryanto D, Siregar Z, 2018. A Study on A Local *Bacillus thuringiensis* SP7 To Control Mosquito Larvae of *Aedes aegypti*. *International Journal of ChemTech Research*. 11(07):134-141.
- Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2022). The Role of Beneficial Microorganisms in Soil Quality and Plant Health. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 14, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/su14095358>
- Palma L, Munoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins* 2014, 6 (12):3296-3325.
- Rashki, M., Maleki, M., Torkzadeh-Mahani, M., Shakeri, S., & Nezhad, P. S. (2021). Isolation of Iranian *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of lepidopteran-active cry genes. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00432-3>
- Sridhara, P. B., Dharmashekara, C., Srinivasa, C., Shivamallu, C., Kollur, S. P., Gopinath, S. M., Syed, A., Patil, S. S., Prasad, A., & De, S. (2021). *Isolation, Characterization, and Optimization of Protease-Producing Bacterium Bacillus thuringiensis from Paddy Field Soil*. https://doi.org/10.4103/pr.pr_83_20

- Talat A. El-kersh. (2011). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11(8). <https://doi.org/10.5897/ajb11.2717>
- Thompson-Morrison H, Ariantiningih F, Arief M, Gaw S, Robinson B, 2023. Nutrients and contaminants in soils of current and former oil palm production systems from Indonesia. *Land*, 12(12):2144.
- Wang, X., Chi, Y., & Song, S. (2024). Important soil microbiota's effects on plants and soils: a comprehensive 30-year systematic literature review. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1347745>
- Zain N.M, Mohamad R, Sijam,K, Awang Y, 2014. Isolation and identification of microorganisms from soil in a young oil palm plantation. *J Food Agric Environ*, 12: 443-447.