

Screening Isolat *Bacillus thuringiensis* yang Berasal dari Karang Intan Kabupaten Banjar Kalsel terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti* Instar 3

Muhamat

Program Studi Biologi FMIPA Unlam, Banjarbaru

ABSTRACT

This study aimed to obtain isolates of *B. thuringiensis* pathogenic to larvae of mosquitoes *Ae. aegypti* from various habitats of mosquitoes in Karang Intan of Banjar District, South Kalimantan. The sampling has been conducted as many as 38 bags, and then isolation of *B. thuringiensis* was performed until obtained 15 isolates. Pathogenicity screening of 15 isolates against third instar larvae at a concentration *Ae. aegypti* 1×10^9 ccs (complex crystal protein spora)/ml obtained two pathogenic isolates, i.e. isolates MA17 and MA25-1. LC50 and LC90 for isolate MA17 with 24 hours of treatment time respectively were 2.63×10^9 ccs/ml and 2.04×10^{10} ccs/ml. LC50 and LC90 for isolate MA17 with 48 hours of treatment time respectively were 3.55×10^8 ccs/ml and 8.27×10^9 ccs/ml. LC50 and LC90 for MA25-1 isolates with 24 hours of treatment time respectively were 1.29×10^{10} ccs/ml and 8.51×10^{10} ccs/ml. LC50 and LC90 for MA25-1 isolates with 24 hours of treatment time respectively 2.88×10^9 ccs/ml and 2.88×10^{10} ccs/ml.

Key word :Isolat *B. thuringiensis*, *Ae.aegypti*, patogenesis, Karang Intan

PENDAHULUAN

Penyakit Demam berdarah di Indonesia adalah penyakit yang setiap tahun ditemukan penderitanya dalam jumlah yang relatif banyak dan menyebabkan meninggal dunia. Demam berdarah dengue disebabkan oleh virus arbovirus yang disebarkan oleh nyamuk *Aedes aegypti*. Oleh karena itu, cara pengendalian penyakit ini dapat dilakukan

dengan cara mengendalikan populasi nyamuk *Ae. aegypti*.

Salah satu cara mengendalikan populasi nyamuk adalah menggunakan mikrobia pembunuh serangga (entomopatogen), salah satunya mikrobia entomopatogen adalah *B. thuringiensis*. *B. thuringiensis* adalah bakteri yang melimpah di dalam tanah, bersifat kosmopolitan (Tarbosky, 1992). Bakteri ini mempunyai ciri utama adalah membentuk endospora

dan kristal protein. Kristal protein ini yang membedakan dengan bakteri *B. cereus*. *B. thuringiensis* bersifat toksik pada serangga. Sifat toksik ini terutama terdapat pada kristal protein. Spektrum racun pada kristal protein bersifat khusus terhadap serangga tertentu (Dulmage, 1981).

Isolasi *B. thuringiensis* patogenik terhadap *Ae. aegypti* pertama dilakukan oleh Goldberg dan Margalit yang diisolasi dari tanah di Israel. Isolat *B. thuringiensis* ini sekarang dikenal dengan *B. thuringiensis israelensis* (H-14). *B. thuringiensis israelensis* yang oleh WHO dijadikan standar patogenisitas (WHO, 2007). Isolasi *B. thuringiensis* dari tanah hampir dilakukan diseluruh dunia. Isolasi yang dilakukan di Brasil sudah diperoleh 6 isolat yang patogenik terhadap larva *Ae. aegypti* tetapi masih dibawah *B. Thuringiensis israelensis* (Monerrat, *et al.*, 2005). Di Vietnam, diperoleh 9 isolat *B. thuringiensis* yang patogenik pada 10^5 spora/ml (Binh, *et al.*, 2005).

Kecamatan Karang Intan adalah salah satu kecamatan di Kabupaten Banjar yang setiap tahun ditemukan penderita DBD dan chikungunya (Dinkes Banjar, 2010). Hal ini yang mendasari kecamatan ini menjadi tempat pengambilan sampel tanah untuk dilakukan isolasi *B.*

thuringiensis yang patogenik terdapat nyamuk *Ae. aegypti*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat *B. thuringiensis* dan mengkarakterisasi koloni dan sel dan daya patogenisitasnya terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*.

METODOLOGI

Pengambilan sampel tanah. Sampel tanah diambil dari endapan bagian atas yang ada di berbagai habitat nyamuk dengan sendok kecil, dimasukkan ke dalam plastik berklip lalu diberi label. Sampel tanah disimpan di kulkas atau pendingin pada suhu 4°C sebelum dilakukan isolasi *B. thuringiensis*.

Isolasi dan Identifikasi *B. thuringiensis*. Isolasi dan identifikasi *B. thuringiensis* dilakukan menurut metode Ohba and Aizawa (1986).

Penyiapan larva *Ae. aegypti* instar tiga untuk pengujian. Telur *Ae. aegypti* ditetaskan dengan cara direndam dalam nampan plastik berukuran 40 x 30 x 6 cm yang berisi 2 liter air sumur. Larva yang menetas diberi pakan *dogfood Alpo®* yang sudah dihaluskan secukupnya. Air dalam nampan dijaga tetap jernih dan bersih. Agar

pertumbuhan dan perkembangan larva tidak terganggu maka setiap nampan diisi kurang lebih 500 ekor. Larva-larva diamati pertumbuhan dan fase perkembangan larva. Larva yang ukuran tubuh tidak sama (lebih kecil atau lebih besar) diambil dengan pipet tetes. Larva instar tiga digunakan sebagai hewan uji patogenesis isolat *B. thuringiensis*.

Pengujian patogenesis isolat *B. thuringiensis*. Pengujian ini dilakukan 2 tahap, yaitu uji pendahuluan dan uji penentuan LC₅₀ dan LC₉₀. Uji pendahuluan bertujuan untuk mengetahui daya bunuh setiap isolat *B. thuringiensis* pada konsentrasi tunggal (1×10^9 kompleks kristal protein spora (kks)/ml) terhadap 25 ekor larva *Ae. aegypti* instar ketiga Walther *et al*, 1986). Isolat yang mampu membunuh lebih dari 50% selanjutnya

dilanjutkan uji penentuan LC₅₀ dan LC₉₀. Uji pendahuluan dan uji penentuan LC₅₀ dan LC₉₀ dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pada setiap uji diamati aktivitas larva uji.

Analisis data. Data dari uji penentuan LC₅₀ dan LC₉₀ dengan waktu perlakuan 24 jam dan 48 jam dianalisis menggunakan analisis probit (Finney, 1971)

HASIL PENELITIAN

Dari hasil pengambilan sampel sebanyak 38 kantong dilakukan isolasi *B. thuringiensis*. Berdasarkan ciri-ciri koloni, ciri-ciri sel, dan uji gram diperoleh isolat *B. thuringiensis* sebanyak 15 isolat (Tabel 1).

NO.	KODE ISOLAT	Hab itat	KRISTAL PROTEIN			NO.	KODE ISOLAT	Hab itat	KRISTAL PROTEIN		
			Ukur an	Posisi	bentuk				Ukura n	Posisi	bent uk
1.	MA10	Sw	S	U	R	9.	MA16-2	G	S	U	R
2.	MA11	R	K	U	R	10.	MA16-3	G	K	U	R
3.	MA12-1	G	K	U	R	11.	MA16-4	G	S	U	R
4.	MA12-2	G	S	U	R	12.	MA16-5	G	S	U	R
5.	MA12-3	G	S	U	R	13.	MA16-8	G	S	U	R
6.	MA12-4	G	K	U	R	14.	MA25-1	G	B	U	R
7.	MA12-5	G	S	U	R	15.	MA17	Su	K	U	Sp
8.	MA14	S	S	U	R						

Tabel 1. Hasil isolasi *B. thuringiensis* dari karang Intan

Ket: G=genangan; Su=sungai; Sw= Sawah; R=Rawa; K=kecil; S=sedang; B=besar; R=rhomboidal; Sp=sphaerical

Hasil screening patogenisitas dengan konsentrasi 1×10^9 kks/ml terhadap larva nyamuk *Ae aegypti* instar 3 diperoleh 2 isolat dengan tingkat patogenisitas di atas 50%, yaitu isolat MA17 dan MA25-1 (Tabel 2).

Hasil dari screening ini kemudian dilanjutkan uji patogenisitas untuk mengetahui nilai LC_{50} dan LC_{90} terhadap kedua isolat tersebut. Nilai LC_{50} dan LC_{90} seperti tercantum pada tabel 3

Tabel 2. Screening isolat *B. thuringiensis* terhadap larva *Ae. aegypti* instar 3

No.	Kode Isolat	Jumlah larva yang mati									
		24 jam					48 jam				
		ulangan			rerata	persen	ulangan			Rerata	persen
		1	2	3			1	2	3		
1.	MA10	1	2	2	1.7	7%	4	7	5	5.3	21%
2.	MA11	0	0	0	0.0	0%	0	0	0	0.0	0%
3.	MA12-1	0	0	0	0.0	0%	0	0	0	0.0	0%
4.	MA12-2	0	0	0	0.0	0%	0	1	1	0.7	3%
5.	MA12-3	0	0	0	0.0	0%	0	0	0	0.0	0%
6.	MA12-4	0	0	0	0.0	0%	0	0	0	0.0	0%
7.	MA12-5	0	0	0	0.0	0%	0	0	0	0.0	0%
8.	MA14	3	3	1	2.3	9%	10	9	8	9.0	36%
9.	MA16-2	1	2	1	1.3	5%	1	2	1	1.3	5%
10.	MA16-3	5	6	3	4.7	19%	5	9	7	7.0	28%
11.	MA16-4	0	0	0	0.0	0%	0	0	0	0.0	0%
12.	MA16-5	2	0	0	0.7	3%	2	0	0	0.7	3%
13.	MA16-8	0	0	0	0.0	0%	0	0	0	0.0	0%
14.	MA25-1	14	11	13	12.7	51%	20	20	19	19.7	79%
15.	MA17	4	3	3	3.3	13%	19	21	19	19.7	79%

Tabel 3. Nilai LC_{50} dan LC_{90} isolat MA17 dan MA25-1 terhadap Larva *Ae.aegypti* instar 3

No.	Kode Isolat	Waktu perlakuan			
		24 jam		48 jam	
		LC_{50}	LC_{90}	LC_{50}	LC_{90}
1.	MA17	$2.63 \times 10^9 \pm 0.20$	$2.04 \times 10^{10} \pm 0.20$	$3.55 \times 10^8 \pm 0.20$	$8.27 \times 10^9 \pm 0.43$
2.	MA25-1	$1.29 \times 10^{10} \pm 0.20$	$8.51 \times 10^{10} \pm 0.33$	$2.88 \times 10^9 \pm 0.20$	$2.88 \times 10^{10} \pm 0.27$

PEMBAHASAN

Dari hasil isolasi *B. thuringiensis*, hampir semua habitat yang berair diperoleh *B. thuringiensis*. Hal ini menunjukkan bahwa wilayah yang berair di Karang Intan terdapat *B. thuringiensis* terutama di daerah genangan-genangan air yang diam. Penelitian ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Araemedah, *et al.* (2010)

Pada karakterisasi morfologi koloni *B. thuringiensis* hampir semuanya mempunyai ciri-ciri yang sama. Sedangkan karakterisasi tingkat seluler ada beberapa perbedaan terutama pada bentuk dan ukuran kristal protein. Perbedaan ini mengindikasikan terdapat keanekaragaman isolat di daerah karang Intan. Keanekaragaman pada bentuk kristal protein berkaitan erat dengan daya patogenitas isolat terdapat serangga (Ohba and Aizawa, 1986; Obeidat, *et al.*, 2004)

Screening patogenitas terhadap larva *Ae.aegypti* diperoleh 2 isolat yang patogenik, yaitu: MA17 dan MA25-1. Kedua isolat tersebut mempunyai bentuk kristal protein berbentuk spherical. Kebanyakan isolat dengan kristal protein berbentuk spherical patogenik terhadap *Ae. aegypti* (Zakeel *et al.*, 2009; Monerat, *et al.*, 2005)

Nilai LC50 dan LC90 dengan waktu pengamatan 24 jam dan 48 jam isolat MA17 dan MA25-1 menunjukkan bahwa setelah tercapainya konsentrasi patogenik, bertambahnya konsentrasi menyebabkan semakin tinggi daya patogenik. Apabila

dibandingkan nilai LC50 waktu pengamatan 25 jam dengan LC50 dengan waktu pengamatan 48 jam isolat MA17 dan MA25-1, semakin lama pendedahan semakin banyak larva yang mati. Hal ini dapat disimpulkan kedua isolat mempunyai daya patogenik bersifat berlahan-lahan,

Isolat yang diperoleh sebanyak 15 isolat, yang diketahui patogenitas baru dua isolat. Spektrum patogenitas dari suatu isolat ada yang bersifat sempit (Karamandilou, 1991) dan ada yang bersifat luas (Binh *et al.*, 2005). Oleh karena itu Keanekaragaman patogenitas dari isolat *B. thuringiensis* perlu dikaji lagi terhadap serangga yang lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Aramideh, S., M. H. Saferalizadeh, A. A. Pourmirza, M. R. Bari, M. Keshavarzi and M. Mohseniazar. 2010. Characterization and Pathogenic Evaluation of *Bacillus thuringiensis* Isolates from West Azerbaijan province-Iran. *African*

- Journal of Microbiology Research* 4(12): 1224- 1229.
- Binh, Ng. D., Ng. X. Canh, Ng. Th. A. Nguyet, Ng. D. Tuan, Ph. K. Thuy, Ng. Th. Th. Hanh, S. Asano, and M. Ohba. 2005. Characterization of *Bacillus thuringiensis* Strains in the Vietnam *Bacillus thuringiensis* Collection. *6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its Environmental Impact*. Côté, J.-C., Otvos, I.S., Schwartz, J.-L. and Vincent, C. (eds) Victoria BC.
- Broderick, N.A., K.F. Raffa, and Jo Handelsman. 2006. Midgut Bacteria Required for *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Activity. *Proceeding of the National of Academy of Sciences of the United States of America*. 103(41): 15196-15199
- Dinkes Banjar. 2010. *Laporan Tahunan Kasus Kematian Demam berdarah Dengue di Wilayah Kota Banjar Tahun 2009*. Dinkes Banjar. Banjar.
- Dulmage, H.T. 1981. Insecticidal Activity of Isolates of *Bacillus thuringiensis* and their Potential for Pest Control *In Burgess. H.D.(Eds) Microbial Control of Insect and Plant Diseases*. Academic Press. New York. 193-222
- Finney, D.J. 1971. *Probit Analysis*. Cambridge Press. London 328p
- Karamanlidou, G., L A. F. Lambropoulos, L S. I. Koliais, T. Manousis, D. Ellar And C. Kastritsis. 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to Laboratory Populations of the Olive Fruit Fly (*Dacus oleae*). *Applied And Environmental Microbiology* 57(8):2277-2282
- Monnerat, R.G., D.G.S. Dias, S.F. da Silva, E. S. Martins, C. Berry, R. Falcão, A.C.M. M. Gomes, L.B. Praça, and C. M. S. Soares. 2005. Screening of *Bacillus thuringiensis* Strains Effective Against Mosquitoes. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 40(2):103-106.
- Obeidat, M., D. Hassawi, and I. Ghabeish. 2004. Characterization of *Bacillus* Strains from Jordan and Their Toxicity to the Lepidoptera, *Ephestia Kuehniella* Zeller. *African Journal of Biotechnology* 3(11):622-626
- Ohba M and Aizawa K 1986 Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 47: 277-282.
- Taborsky, V.. 1992. Small-scale Processing of Microbial Pesticides. *FAO Agricultural Services Bulletin* No. 96
- WHO. 2007. *Who Specifications And Evaluations For Public Health Pesticides Bacillus thuringiensis subspecies israelensis strain AM65-52*.
www.who.int/entity/whopes/quality/Bti_eval_spec_Jun_07.pdf diakses tanggal 22 Januari 2010
- Zakeel, M.C.M., D.M.D. Dissanayake and P.A. Weerasinghe. 2009. Molecular Characterization Of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated From a Selected Site in Nochchiyagama, Anuradhapura In Sri Lanka *Tropical Agricultural Research & Extension* 12(1): 31-34