

Efektifitas *Bacillus Thuringiensis* yang Diisolasi dari Sampel Tanah di Yogyakarta Terhadap Larva *Culex Quinquefasciatus* Invitro

Effectivity Bacillus thuringiensis soil isolate from Yogyakarta against Culex Quinquefasciatus Invitro

Lilis Suryani

Department of Microbiology, School of Medicine, Muhammadiyah University Yogyakarta, Jl. Pendidikan, Sonopakis Yogyakarta.

Abstract

Filariasis disease is a public health problem, especially in rural areas. One kinds of mosquitoes that transmited it is *Culex quinquefasciatus*. Since 1972 chemical insecticides has been used for vector control in Indonesia. However, in 1987 it was reported that there are many areas has been resistant against chemical insecticides.

Bacillus thuringiensis is a gram positif bacteria, rod, aerobic and spore shape. There are many strain of this bacteria produces a toxic protein to insect. This research try to reveal the effectivity of *Bacillus thuringiensis* soil isolate from Yogyakarta, Bantul, Sleman, Kulonprogo and Wonosari area, as larvacide against *Culex quenuquefasciatus*. This study is an experimental laboratory, as subject research is *Bacillus thuringiensis* which tested it's pathogenecity against *Culex quinquefasciatus* larvae .

The result of this study shows that *Bacillus thuringiensis* soil isolate from Wonosari has a high effectivity as larvacide against *Culex quinquefasciatus* with pathogenecity activity 100%, *Bacillus thuringiensis* soil isolate from Sleman has a low effectivity with pathogenecity activity 38,7%.

It is concluded that *Bacillus thuringiensis* isolate Wonosari has a high effectivity as larvacide against *Culex quinquefasciatus* larvae.

Key word: *Bacillus thuringiensis*, *Culex quinquefasciatus* larvae, pathogenecity activity

Abstrak

Penyakit filariasis merupakan masalah kesehatan masyarakat, terutama di daerah rural. Salah satu jenis nyamuk yang menularkan penyakit ini adalah *Culex quinquefasciatus*. Sejak tahun 1972 insektisida kimiawi telah banyak digunakan untuk pengendalian vektor di Indonesia. Namun pada tahun 1987 dilaporkan di beberapa daerah telah terjadi resistensi nyamuk vektor terhadap beberapa jenis insektisida kimiawi.

Bacillus thuringiensis adalah bakteri gram positif yang berbentuk batang, aerobik dan membentuk spora. Banyak strain dari bakteri ini yang menghasilkan protein yang beracun bagi serangga.

Penelitian ini mencoba mengungkapkan efektifitas *Bacillus thuringiensis* yang diisolasi dari sampel tanah di daerah Istimewa Yogyakarta, meliputi wilayah Bantul, Sleman, Kota Yogyakarta, Wonosari dan Kulonprogo sebagai larvasida *Culex quinquefasciatus*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium, dengan subyek penelitian berupa kuman *Bacillus thuringiensis*

yang diuji patogenesisnya terhadap larva *Culex quinquefasciatus*, sebagai pembanding digunakan bakteri standar *Bacillus thuringiensis* H-14.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Bacillus thuringiensis* isolat Wonosari memiliki efektifitas yang tinggi sebagai larvasida terhadap nyamuk *Culex quinquefasciatus* dengan daya patogenesisitas 100%. *Bacillus thuringiensis* isolat Sleman memiliki efektifitas yang rendah sebagai larvasida terhadap nyamuk *Culex quinquefasciatus* dengan daya patogenesisitas 38,7%.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah *Bacillus thuringiensis* isolat Wonosari memiliki efektifitas tinggi sebagai larvasida terhadap nyamuk *Culex quinquefasciatus*.

Kata Kunci : *Bacillus thuringiensis*, daya patogenesisitas Larva *Culex quinquefasciatus*

Pendahuluan

Daerah tropis seperti Indonesia, nyamuk merupakan serangga yang sering mengganggu kehidupan manusia. Di samping itu nyamuk juga dapat menyebarkan penyakit seperti malaria, demam berdarah dengue dan filariasis. Untuk mengatasi hal tersebut, manusia lebih cenderung menggunakan insektisida misalnya etofenprox untuk penyemprotan rumah-rumah. Selain itu dapat pula menggunakan obat pembasmi nyamuk yang dijual bebas seperti obat nyamuk bakar, tissue, oles, elektrik dan sebagainya. Mengingat banyaknya bahan aktif insektisida yang mudah diperoleh, dan kemungkinan besar dapat menyebabkan pencemaran lingkungan, mendorong dikembangkannya jasad hayati seperti *Bacillus thuringiensis*. Salah satu kelebihan bakteri ini adalah sifatnya yang dapat menekan populasi jentik nyamuk, narnun tidak mencemarkan lingkungan, atau mematikan organisme lain yang bukan sasaran. Salah satu karakteristik dari *Bacillus thuringiensis* adalah dapat memproduksi kristal protein di dalam sel bersama-sama dengan spora pada waktu sel mengalami sporulasi

Bacillus thuringiensis adalah bakteri pembentuk spora yang banyak tersebar di tanah. Selama proses sporulasi bakteri ini menghasilkan kristal paraspora yang dikenal sebagai delta endotoksin. Delta endotoksin mempunyai sifat toksik bagi larva serangga terutama dari kelompok Coleoptera, Diptera, dan Lepidoptera (1).

Bacillus thuringiensis adalah bakteri gram positif yang berbentuk batang, aerobik dan membentuk spora. Banyak strain dari bakteri ini yang menghasilkan protein yang beracun bagi serangga. Sejak diketahuinya potensi dari protein kristal *Bt* sebagai agen pengendali serangga, berbagai isolat *Bt* dengan berbagai jenis protein kristal yang dikandungnya telah teridentifikasi. Sampai saat ini telah diidentifikasi protein kristal yang beracun terhadap larva dari berbagai ordo serangga yang menjadi

Hama pada tanaman pangan dan hortikultura. Kebanyakan dari protein kristal tersebut lebih ramah lingkungan karena mempunyai target yang spesifik sehingga tidak mematikan serangga bukan sasaran dan mudah terurai sehingga tidak menumpuk dan mencemari lingkungan (2).

Penelitian ini mencoba mengungkapkan efektifitas *Bacillus thuringiensis* yang diisolasi dari sampel tanah di daerah Yogyakarta sebagai larvasida *Culex quinquefasciatus*.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat murni *Bacillus thuringiensis* yang diisolasi dari sampel tanah di berbagai tempat di DIY dan mengetahui patogenesisitas isolat *B. thuringiensis* (100 PS) tersebut terhadap larva nyamuk *Culex quinquefasciatus* di laboratorium.

Bahan dan Cara

Penelitian ini menggunakan medium agar Nutrien, medium Brain Heart Infusion (BHI). Media KIA, media LIA, Cat Gram. Bahan lain yang dipakai dalam penelitian ini adalah, larutan NaCl fisiologis, akuades steril.

Alat-alat yang digunakan adalah cawan petri berdiameter 10 cm, tabung reaksi, rak tabung reaksi, lampu spiritus, ose, pipet ukur, kolf Erlenmeyer, autoklaf Jericho JE-350A, oven Memmert, *Laminar Air Flow*, inkubator Memmert, timbangan Sartorius BP 160P, plastik polibag dan kapas.

Bakteri uji dalam penelitian ini digunakan bakteri strain baku (standar) *Bacillus thuringiensis* H-14. larva nyamuk yang digunakan adalah larva *Culex quinquefasciatus*.

Cara Penelitian

Pengambilan sampel tanah : sampel tanah diambil secara acak pada 5 kabupaten di DIY, yaitu Kota Yogyakarta, Bantul, Sleman, Kulonprogo dan Wonosari. Tiap-tiap kabupaten sampel diambil secara acak di lokasi penumpukan akhir sampah. Masing-masing tempat diambil 3 sampel tanah sebanyak 2 kg dengan kedalaman 10-15 cm dari permukaan tanah. Tanah dimasukkan kedalam plastik polybag.

Pembiakan mikroba dalam medium perbenihan : sampel tanah pada masing-masing tempat, dicampur dan diaduk merata. Ditimbang sebanyak 1 gram, diencerkan dengan akuades steril hingga diperoleh konsentrasi 1:10 sampai 1:10.000, selanjutnya suspensi tersebut dipanaskan pada suhu 80°C selama 15 menit. Sebanyak 1 ml dari masing-masing enceran sampel, dituangkan ke dalam cawan petri yang telah berisi medium perbenihan nutrien agar. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24jam (3).

Pengamatan morfologi dan identifikasi : biakan murni mikroba yang telah diperoleh diamati morfologinya di bawah mikroskop dan dilakukan dengan

identifikasi: pengecatan gram dan pengecatan spora, reaksi biokimia (uji gula-gula, KIA, LIA) dan juga dibandingkan dengan strain murni untuk menentukan kuman yang diisolasi adalah *B.thuringiensis*.

Uji Patogenesitas *B.thuringiensis* terhadap larva nyamuk *Culex quinquefasciatus* di laboratorium Mikrobiologi FK-UMY : pertumbuhan dan Uji Patogenesitas Isolat *B. thuringiensis* (100 PS) sebagai berikut : Isolat *B. thuringiensis* (100 PS) yang ditemukan dibuat kultur murni pada media Nutrien agar miring dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 4 hari. Sesudah diinkubasi dari media Nutrien agar diambil 10 ose penuh (*loopfull*) dan dimasukkan ke dalam 50 ml Broth heart Infusion (BHI). Sesudah itu media BHI di *shake* (goyang) pada temperatur kamar selama 48 jam. Sesudah 48 jam, dilakukan pengujian patogenesitas menurut metode Chilcott dan Wigley, sebagai berikut : diambil 15 ml *broth* (diambil dari 50 ml BHI) dan dimasukkan ke dalam mangkok plastik berisi 100 ml air suling dan 25 jentik *Culex quinquefasciatus instar III* (umur 6-7 hari). Sebagai kontrol, mangkok plastik hanya diisi 150 ml air suling dan 25 jentik *Culex quinquefasciatus*. Untuk setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan. Pengamatan dilakukan selama 24 dan 48 jam pengujian (4).

Hasil

Penelitian mengenai efektifitas *Bacillus thuringiensis* sebagai larvasida terhadap nyamuk *Culex quinquefasciatus* ini terdiri atas enam kelompok, yaitu isolat *Bacillus thuringiensis* yang diperoleh dari wilayah Bantul, Sleman, Kota Yogyakarta, Kulonprogo, Wonosari dan *Bacillus thuringiensis* standar H-14.

Hasil pengujian patogenesitas isolat *B. thuringiensis* (100 PS), setelah ditumbuhkan dalam media BHI terhadap berbagai jentik nyamuk instar III pada 24 dan 48 jam pengujian, disajikan pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Prosentase kematian larva *Culex quinquefasciatus* pada uji patogenesis isolat *Bacillus thuringiensis* dari berbagai sampel tanah di wilayah DIY setelah pemaparan selama 24 jam

No	Isolat <i>B thuringiensis</i> dari berbagai wilayah di DIY											
	Standar H-14		Bantul		Kota Yogya		Sleman		Wonosari		Kulonprogo	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	23	92	9	36	15	60	16	64	23	92	11	44
2	24	96	18	72	21	84	5	20	22	88	12	48
3	24	96	15	46,9	17	68	5	20	24	96	9	36
Rerata	23,7	94,7	14	51,6	17,7	70,7	8,7	34,7	23	92	10,7	42,7

Tabel 2. Prosentase kematian larva *Culex quinquefasciatus* pada uji patogenesis isolat *Bacillus thuringiensis* dari berbagai sampel tanah di wilayah DIY setelah pemaparan selama 48 jam

No	Isolat <i>B thuringiensis</i> dari berbagai wilayah di DIY											
	Standar H-14		Bantul		Kota Yogya		Sleman		Wonosari		Kulonprogo	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	25	100	12	48	17	68	18	72	25	100	13	52
2	25	100	23	92	23	92	6	24	25	100	15	46,9
3	25	100	17	68	21	84	5	20	25	100	11	44
Rerata	25	100	17,3	69,3	20,3	81,3	9,7	38,7	25	100	13	47,6

Uji patogenesis isolat *B. thuringiensis* (100 PS) yang ditumbuhkan dalam media brain heart infusion (BHI) terhadap jentik *Culex quinquefasciatus* masing-masing instar III, pada 24 dan 48 jam pengujian dapat dilihat pada tabel 1 dan 2. Prosentase kematian jentik *Cx. quinquefasciatus*, berturut-turut 94,7% (strain standar H-14), 51,6% (isolat Bantul), 70,7% (isolat Kota Yogyakarta), 34,7% (isolat Sleman), 92% (isolat Wonosari) dan 42,7% (isolat Kulonprogo) selama 24 jam pengujian (Tabel 1).

Prosentase kematian jentik *Culex quinquefasciatus*, berturut-turut 100% (strain standar H-14), 69,3% (isolat Bantul), 81,3% (isolat Kota Yogyakarta), 38,7%

(isolat Sleman), 100% (isolat Wonosari) dan 47,6% (isolat Kulonprogo) selama 48 jam pengujian (Tabel 2).

Diskusi

Pada pengujian 24 jam prosentase kematian larva nyamuk *Culex quinquefasciatus*, tertinggi pada perlakuan dengan isolat *Bacillus thuringiensis* standar (94,7%) dan terendah pada perlakuan dengan isolat Sleman (34,7%). Dari 5 sampel tanah yang diambil dari lima wilayah di DIY prosentase kematian larva nyamuk tertinggi pada perlakuan dengan isolat Wonosari (92%) dan terendah dengan perlakuan isolat Sleman (34,7%). Dari lima isolat bakteri tersebut yang mampu

membunuh nyamuk lebih dari 50% hanya 3 isolat yaitu dari Bantul, Kota Yogyakarta dan Wonosari.

Pada pengujian 48 jam prosentase kematian larva nyamuk *Culex quinquefasciatus*, tertinggi pada perlakuan dengan isolat *Bacillus thuringiensis* standar dan isolat Wonosari (100%) dan terendah pada perlakuan dengan isolat Sleman (38,7%). Dari 5 sampel tanah yang diambil dari lima wilayah di DIY prosentase kematian larva nyamuk tertinggi pada perlakuan dengan isolat Wonosari (100%) dan terendah dengan perlakuan isolat Sleman (38,7%). Dari lima isolat bakteri tersebut yang mampu membunuh nyamuk lebih dari 50% hanya 3 isolat yaitu dari Bantul, Kota Yogyakarta dan Wonosari.

Uji yang dilakukan terhadap persentase kematian jentik *Culex quinquefasciatus* dari isolat masing-masing perlakuan menunjukkan beda nyata pada 24 maupun 48 jam pengujian ($p > 0,05$). Pada pengujian 24 jam, perlakuan isolat Sleman menunjukkan beda nyata dengan isolat wonosari dan isolat standar H-14. Isolat Kulonprogo dan menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan Wonosari dan isolat standar. Perlakuan antara isolat Sleman, Kulonprogo, Bantul dan Kota Yogyakarta tidak menunjukkan beda nyata. Dari 5 isolat *Bacillus thuringiensis* lokal tersebut yang menunjukkan tidak ada beda nyata dengan kuman standar adalah isolat Wonosari.

Pada pengujian 48 jam perlakuan yang menunjukkan beda nyata dengan isolat bakteri standar dan isolat Wonosari adalah isolat Sleman dan Kulonprogo. Dari data tersebut dan hasil uji statistik menunjukkan bahwa *Bacillus thuringiensis* isolat Wonosari mempunyai daya patogenesitas yang sama besar dengan bakteri standar. Isolat bakteri dari wonosari ini mempunyai prospek untuk dikembangkan sebagai larvasida terhadap nyamuk *Culex quinquefasciatus*, disusul isolat bakteri Kota Yogyakarta.

Bacillus thuringiensis isolat Wonosari dan Kota Yogyakarta memiliki daya patogenesitas yang tinggi untuk membunuh larva nyamuk *Culex*

quinquefasciatus. Kemampuan bakteri membunuh larva nyamuk ini banyak ditentukan oleh toksin yang dihasilkan oleh bakteri. Kemampuan bakteri *Bacillus thuringiensis* dalam membunuh larva nyamuk sangat ditentukan oleh strain isolat dari daerah asal. Isolat dari Sleman dan Kulonprogo daya patogenesitasnya rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan karena bakteri yang diisolasi dari tanah di kedua daerah tersebut bukan merupakan strain yang bersifat toksik. Selain itu juga struktur tanah yang berbeda akan menyebabkan strain bakteri memiliki karakteristik yang berbeda pula dalam membunuh larva nyamuk. Wonosari memiliki struktur tanah yang berbeda diantara lima wilayah di DIY. Tanah di daerah Wonosari banyak yang berkapur dan banyak hutan pohon jati. Ini menyebabkan tanah di daerah tersebut banyak yang tertutup humus dan seresah dari sampah organik. Dibanding daerah Sleman yang merupakan daerah perkotaan dimana tanahnya banyak tertutup sampah anorganik seperti plastik. Sampah anorganik tentu tidak mendukung pertumbuhan bakteri tanah.

Bacillus thuringiensis mempunyai sifat karakteristik mampu membentuk benda inklusi seperti kristal para spora yang bersifat toksik terhadap larva berbagai macam serangga (5).

Kristal yang dihasilkan oleh *Bacillus thuringiensis* tersusun dari protein dengan berat molekul 130-140 kda, bersifat sebagai protoksin (menimbulkan efek jika diaktivasi terlebih dahulu). Pada kondisi normal protein tersebut mempunyai tingkat kelarutan yang tinggi dan kelarutannya akan berkurang pada pH tinggi. Dalam usus larva protoksin dipecah oleh enzim protease menjadi toksin aktif yang disebut delta endotoksin. Delta endotoksin berikatan dengan sel epithelium usus membentuk pori pada membren dan mengubah keseimbangan ion. Akibatnya usus bergerak cepat, sel epithelium lisis dan larva berhenti makan. PH dalam usus lebih rendah daripada pH cairan tubuh larva, mengakibatkan spora bakteri menjadi bentuk sel vegetatif yang mampu menginvasi jaringan inang dan

mengakibatkan septikemi yang bersifat lethal (6).

Struktur delta endotoksin tersusun oleh 3 domain yaitu domain I, domain II dan domain III. Domain I terdiri atas 1 berkas dari 7 alpha-heliks yang dapat menyusup ke dalam membran sel usus dan membentuk pori yang dapat dilewati ion-ion dengan bebas. Domain II terdiri atas lembaran anti paralel beta sebagai antigen binding region dari imunoglobulin, berperan dalam pengikatan dengan reseptor usus. Domain III sebagai packed beta-sandwich, melindungi sisi aktif toksin pada saat dipecah oleh enzim protease usus (6).

Kesimpulan

- (1) *Bacillus thuringiensis* isolat Wonosari memiliki efektifitas yang tinggi sebagai larvasida terhadap nyamuk *Culex quinquefasciatus* dengan daya patogenesis 100%.
- (2) *Bacillus thuringiensis* isolat Sleman memiliki efektifitas yang rendah sebagai larvasida terhadap nyamuk *Culex quinquefasciatus* dengan daya patogenesis 38,7%.

Saran

Penelitian ini akan dikembangkan lebih lanjut untuk identifikasi *Bacillus thuringiensis* isolat Wonosari dan Kota Yogyakarta yang memiliki daya patogenesis yang tinggi sehingga dapat

digunakan untuk pengendalian jentik nyamuk di lapangan.

Ucapan Terima kasih

Peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada ketua LP3M UMY yang telah membiayai seluruh penelitian ini melalui program penelitian kemitraan.

Daftar Pustaka

1. WHO. 1999, Environmental health criteria: *Bacillus thuringiensis*, B.thuringiensis/EHC 217,.
2. Kristian Bayu K dan Alvonsus. 2007, *Bacillus thuringiensis*. <http://www.indobiogen.or.id/produk/bacillus.php>.
3. Lindquist, J., 2000, Isolation of Bacillus, Departement of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison.
4. Chilcott CN, Wigley PJ. Technical note: an improved method for differential staining of *Bacillus thuringiensis* crystals. Letters in Appl Microbiol 1988;7: 67-70.
5. Jenssen, G.B., Larsen, P., Jacobsen, B et al., 2002. *Bacillus thuringiensis* infecal samples from greenhouse workers after exposure to B. thuringiensis based pesticides. Journal Virology Applied and Environmental Microbiology. Vol 68. No. 10. p.4900-4905.
6. Li, J., Carroll, Ellar., 1991. The Microbial World : *Bacillus thuringiensis*, Nature 353. p. 815-821.