

# Patogenisitas Isolat *B. thuringiensis* setelah Dikeringkan pada Suhu Dingin (Lyophilisasi) terhadap Jentik *Aedes aegypti* di Laboratorium

Blondine Ch.P, Umi Widyastuti

Stasiun Penelitian Vektor Penyakit, Pusat Penelitian Ekologi Kesehatan  
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI, Salatiga

## ABSTRAK

Suatu upaya telah dilakukan untuk mengetahui patogenisitas isolat *Bacillus thuringiensis* setelah dikeringkan pada suhu dingin (lyophilisasi) terhadap jentik nyamuk *Aedes aegypti instar III* di laboratorium.

*Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14) yang diproduksi oleh Abbott, dengan nama dagang Vectobac 12 AS sebagai bahan pembandingan, diuji dengan cara yang sama dengan kelima isolat tersebut.

Hasil pengujian patogenisitas 5 isolat *B. thuringiensis* terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti instar III*, menunjukkan bahwa isolat 44TK mampu membunuh 50 dan 90% jentik nyamuk tersebut dengan konsentrasi paling rendah dibandingkan dengan isolat-isolat lain pada 24 jam pengujian (LC50=13,69 ml/100 ml dan LC90=37,84 ml/100ml) maupun 48 jam pengujian (LC50=11,95 ml/100 ml dan LC90=36,69 ml/100 ml).

Isolat 44 TK membutuhkan konsentrasi 7469 sampai 12230 kali lebih besar dibandingkan dengan *B. thuringiensis israelensis* (H-14), untuk membunuh 50 dan 90% jentik nyamuk *Ae. aegypti instar III*.

## PENDAHULUAN

*Bacillus thuringiensis* merupakan salah satu bakteri patogen serangga yang sekarang sudah dikembangkan menjadi salah satu bioinsektisida yang potensial. Salah satu karakteristik dari *B. thuringiensis* adalah dapat memproduksi kristal protein di dalam sel bersama-sama dengan spora, pada waktu sel mengalami sporulasi<sup>(1)</sup>.

*Bacillus thuringiensis* bersifat kosmopolitan, antara lain ditemukan pada tanah, *soil aquatic system*, tempat perindukan jentik nyamuk ataupun pada jentik nyamuk yang sakit<sup>(2)</sup>.

Laboratorium jasad hayati Stasiun Penelitian Vektor Penyakit (SPVP), telah berhasil mengisolasi *B. thuringiensis* dari tanah dan jentik nyamuk<sup>(3,4)</sup>. Akan tetapi pemeliharaan isolat *B. thuringiensis* yang ditemukan cukup kompleks karena me-

nyangkut media, suhu dan pH penyimpanan. Beberapa kultur bakteri sudah dapat disimpan selama 10 tahun dalam bentuk kering, sedangkan *B. thuringiensis* yang telah di "lyophilisasi" dapat disimpan selama 15 tahun tanpa kehilangan perubahan warna<sup>(5)</sup>. Banyak metoda yang digunakan untuk pengeringan kultur *B. thuringiensis* misalnya pengeringan spora pada kertas filter, pengeringan suspensi kultur dalam laktose atau dalam bentuk kering yang bebas lemak dan susu<sup>(5)</sup>.

Dalam penelitian ini kultur isolat *B. thuringiensis* akan dipelihara dalam bentuk lyophilisasi. Berdasarkan hal tersebut di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui patogenisitas isolat *B. thuringiensis* setelah dikeringkan pada suhu dingin (lyophilisasi) terhadap jentik nyamuk *Aedes aegypti instar III* di laboratorium.

## METODOLOGI PENELITIAN

### A) Bahan

Jazad hayati yang diteliti adalah 5 isolat *B. thuringiensis* yang telah di lyophilisasi di laboratorium Mikrobiologi Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga. Sebelum di lyophilisasi isolat-isolat tersebut telah diuji patogenitasnya menurut metoda Chilcott & Wigley (1988)<sup>(6)</sup>. Sebagai pembanding adalah *B. thuringiensis israelensis* (H14) yang diproduksi oleh Abbott, dengan nama dagang Vectobac 12 AS, USA.

Jentik nyamuk vektor yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Ae. aegypti*, hasil koloni laboratorium.

### B) Pelaksanaan

Proses lyophilisasi dilakukan menurut metoda Dulmage et al (1990)<sup>(5)</sup>. Lima isolat (8TC, 12TL, 22TP, 43TG, dan 44TK) *B. thuringiensis* yang ditemukan, diperbanyak dengan cara membuat kultur pada media NYSMA miring, dan diinkubasi pada suhu 30°C. Masing-masing isolat diperbanyak menjadi 10 isolat. Pada umur 4 hari kultur dipanen dengan memakai larutan garam faal (NaCl 0,85%) steril dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus steril. Hasil panen di sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang hingga yang tertinggal adalah pelet. Ke dalam tabung sentrifus ditambahkan lagi larutan NaCl 0,85% secukupnya dan sekali lagi disentrifus dengan kecepatan dan waktu yang sama. Supernatan dibuang lagi sehingga yang tertinggal pelet. Ke dalam tabung sentrifus ditambahkan larutan NaCl secukupnya. Kemudian dengan menggunakan pipet Pasteur suspensi kultur yang akan di lyophilisasi dipindahkan ke dalam tabung lyophilisasi dan ditempatkan dalam tempat pengeringan yang bersuhu -50°C. Kemudian dikeringkan selama 12-24 jam. Apabila pengeringan telah selesai, tabung-tabung lyophilisasi diambil dan dimasukkan ke dalam stoples plastik yang berisi *silicagel*, dan disimpan dalam refrigerator (- 4°C) sampai digunakan.

Pengujian patogenitas di laboratorium dilakukan menurut prosedur WHO (1985)<sup>(7)</sup>, untuk mendapatkan konsentrasi isolat *B. thuringiensis* efektif (LC50 & LC90) dalam membunuh jentik nyamuk *Ae. aegypti*.

Larutan stok dibuat dengan cara menambahkan 1 gram isolat *B. thuringiensis* yang telah di lyophilisasi ke dalam Erlenmeyer berukuran 250 ml, dengan 100 ml Tryptose Phosphate Broth (TPB). Inkubasi pada temperatur 30°C selama 48 jam. Kemudian dikocok (*shake*) pada temperatur kamar selama 48 jam. Sesudah 48 jam, dari larutan stok ini dibuat seri pengenceran sampai diperoleh konsentrasi yang dibutuhkan (dalam ml/100 ml). Pengujian dilakukan dengan menggunakan mangkok plastik yang diisi dengan 100 ml aquadest dan 20 ekor jentik nyamuk *Ae. aegypti instar III* akhir. Masing-masing konsentrasi pengujian diulang sebanyak 3 kali. Sebagai kontrol, mangkok plastik hanya diisi dengan 100 ml aquadest dan 20 ekor jentik nyamuk *Ae. aegypti*. Pengamatan kematian jentik nyamuk dihitung selama 24 dan 48 jam pengujian.

Sebagai pembanding untuk pengujian isolat *B. thuringiensis* hasil isolasi laboratorium jazad hayati SPVP, digunakan *B. thuringiensis israelensis* (H-14) dengan nama Vectobac 12 AS, USA<sup>(8)</sup>.

Larutan stok dibuat dengan cara menambahkan 1 gram *B. thuringiensis israelensis* yang telah di lyophilisasi ke dalam Erlenmeyer berukuran 250 ml yang sudah diisi dengan 100 ml TPB. Inkubasi pada temperatur 30°C selama 48 jam. Kemudian dikocok (*shake*) pada temperatur kamar selama 48 jam. Sesudah 48 jam, dari larutan tersebut diambil 0,1 ml dan ditambah dengan 99,9 ml aquadest. Dari larutan stok ini selanjutnya dibuat seri pengenceran sampai diperoleh konsentrasi yang dibutuhkan. Prosedur selanjutnya sama dengan pengujian isolat *B. thuringiensis* di laboratorium.

Untuk menentukan nilai LC50 dan LC90 digunakan analisis probit<sup>(9)</sup>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian patogenitas isolat *B. thuringiensis* setelah di lyophilisasi terhadap jentik nyamuk vektor *Ae. aegypti instar III* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Patogenitas isolat *B. thuringiensis* setelah di lyophilisasi terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti instar III* di laboratorium.

Isolat	Jentik nyamuk <i>Ae. aegypti instar III</i>			
	24 jam		48 jam	
	LC 50 (ml/100 ml)	LC 90 (ml/100 ml)	LC 50 (ml/100 ml)	LC 90 (ml/100 ml)
8 TC	52,98	105,95	38,50	77,00
12 TL	28,59	57,17	22,53	45,05
22 TP	34,20	68,39	16,67	37,33
43 TG	17,13	62,88	14,32	49,83
44 TK	13,69	37,84	11,95	36,69
<i>Bti</i> (H-14)	0,0016	0,0031	0,0016	0,0030.

Hasil analisis probit menunjukkan bahwa isolat 44TK mampu membunuh 50 dan 90% jentik nyamuk *Ae. aegypti* dengan konsentrasi paling rendah, dibandingkan dengan isolat-isolat yang lain. Patogenitas isolat 44TK, selama 24 jam pengujian, menunjukkan bahwa konsentrasi 13,69 dan 37,84 ml/100 ml, mampu membunuh jentik nyamuk *Ae. aegypti* berturut-turut sebesar 50% dan 90%. Sedangkan pada 48 jam pengujian, dibutuhkan sebesar 11,95 dan 36,69 ml/100 ml.

Isolat tersebut dibandingkan dengan *B. thuringiensis israelensis* (H-14), maka *Bti* jauh lebih efektif membunuh 50% dan 90% jentik nyamuk *Ae. aegypti*. Nilai LC50 dan LC90 isolat 44TK ternyata 7469 sampai 12230 kali lebih besar dibandingkan dengan pembanding *Bti* yaitu LC50=0,0016 ml/100 ml dan LC90=0,0031 ml/100 ml pada 24 jam pengujian. Pada 48 jam pengujian nilai LC50=0,0016 ml/100 ml dan LC90=0,0030 ml/100 ml. Melihat hasil yang diperoleh, maka penelitian ini perlu dilanjutkan dengan cara meningkatkan konsentrasi isolat *B. thuringiensis* sehingga diharapkan dapat diperoleh isolat yang mempunyai konsentrasi mendekati standar (pembanding *Bti*). Selain itu dilanjutkan dengan pengujian patogenitas isolat-isolat setelah di lyophilisasi selatna 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu dan seterusnya, dengan tujuan untuk mengetahui efektivitas dari isolat-isolat tersebut. Hasil pengujian patogenitas berbagai isolat *B. thuringiensis* terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti* sangat bervariasi, karena adanya berbagai macam faktor yang dapat mempengaruhi

patogenisitas isolat-isolat tersebut. Salah satu faktor adalah perbedaan serotipe di antara isolat isolat yang diuji, dapat mempengaruhi patogenisitasnya. Misalnya *B. thuringiensis* serovar *israelensis*, menunjukkan patogenisitas tinggi terhadap jentik nyamuk, dibandingkan dengan 13 serotipe lain yang menunjukkan patogenisitas tinggi terhadap jentik Lepidoptera<sup>(10)</sup>. Oleh karena itu test serologi dari isolat-isolat tersebut perlu dilakukan untuk mengetahui serotipenya. Selain itu patogenisitas dapat dipengaruhi oleh kebiasaan dan perilaku makan jentik, formulasi (khususnya tingkat pengendapan/sedimentasi) serta adanya toksin di daerah makan jentik (*larval feeding zone*)<sup>(11)</sup>. Berdasarkan faktor daerah makan jentik (*larval feeding zone*), jentik *Ae. aegypti* biasa mengambil makanan di dasar dan dinding penampungan air<sup>(12)</sup>.

## KESIMPULAN

Isolat *B. thuringiensis* (44TK) mampu membunuh jentik nyamuk *Ae. aegypti* instar III dengan konsentrasi paling rendah dibandingkan dengan isolat-isolat yang lain (LC50=13,69 ml/100 ml dan LC90=37,84 ml/100 ml pada 24 jam pengujian, LC50=11,95 ml/100 ml dan LC90=36,69 ml/100 ml pada 48 jam pengujian).

Untuk membunuh 50% dan 90% jentik nyamuk *Ae. Aegypti* dibutuhkan konsentrasi isolat 44TK, 7469 sampai 12230 kali lebih besar dibandingkan dengan *B. thuringiensis israelensis*.

Penelitian perlu dilanjutkan, sehingga dapat diperoleh konsentrasi *strain* lokal yang mendekati standar internasional.

---

## UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada DR. Sustriayu Nalim, Pjh. Kepala Stasiun Penelitian Vektor Penyakit yang telah membimbing dan

memberi saran-saran sehingga selesainya makalah ini. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada rekan-rekan di laboratorium jazad hayati SPVP atas bantuan yang yang diberikan.

## KEPUSTAKAAN

1. Ali AS. Analisis Strain *Bacillus thuringiensis* secara serologi: Kumpulan Makalah Seminar *Bacillus thuringiensis*. Jakarta, 20 Januari. 1994. 12h.
2. Lee HL. Isolation and evaluation of two isolates of *Bacillus thuringiensis* for the control of mosquitoes of public health importance in Malaysia. Mosq. Borne. Disease. Bull. 1998; 5(3-4): 39-47.
3. Blondine Ch.P, Widyastuti U. Isolasi *Bacillus thuringiensis* dari tanah pada pohon di Kotamadya Salatiga. Pros Seminar Ilmiah dan Kongres Nasional Biologi X. Bogor. 1991.
4. Blondine Ch.P, Widyastuti U, Widiarti. Isolasi *Bacillus thuringiensis* dari larva dan pengujian patogenisitasnya terhadap larva nyamuk vektor. Bull. Penelit. Kes. 1992; 20(3): 20-4.
5. Dulmage T, Yousten AA, Singer S, Lacey LA. Guidelines for Production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. 1990. UNDP/ WORLD BANK/WHO. 58p.
6. Chilcott CN, Wigley PJ. Technical note: an improved method for differential staining of *Bacillus thuringiensis* crystals. Letters in Appl Microbiol 1998; 7: 67-70.
7. WHO. Informal consultation on the development of *B. sphaericus* a microbial larvicide. TDR/BCV/Sphaericus/85.1985; 3: 1-24.
8. Anonim. Testing protocol: Laboratory Bioassay for vectobac *Bacillus thuringiensis israelensis*.
9. Finney DJ. Probit analysis 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge University Press, London. 1971.
10. WHO. Data sheet on the biological control agent *Bacillus thuringiensis* serotype H-14. WHO/VBC/79. 750. 1979. 13p.
11. Aly C, Mula MA, Xu Bo-Zhao, Schnetter W. Rate of ingestion by mosquito larvae (*Diptera, Culicidae*) as a factor in the effectiveness of a bacterial stomach toxin. J. Med. Entomol. 1988; 25(3): 191-196.
12. Becker N, Djakaria S, Kaiser A, Zulhasril O, Ludwig HW. Efficacy of a new tablet formulations of an Asporogenous strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*. Bull. Soc. Vector Ecol. 1991; 16(1): 1-7.