

Pertumbuhan Isolat *B. thuringiensis* pada Media Kelapa dan Uji Patogenitasnya terhadap Jentik Nyamuk Vektor

Blondine Ch.P, Umi Widyastuti, Sukarno, Subiantoro
Stasiun Penelitian Vektor Penyakit Departemen Kesehatan RI, Salatiga, Indonesia

ABSTRAK

Pertumbuhan isolat *Bacillus thuringiensis* pada media kelapa, dan uji patogenitasnya terhadap jentik beberapa nyamuk, telah dilakukan di Laboratorium Jazad Hayati, Stasiun Penelitian Vektor Penyakit Salatiga. Enam contoh tanah diambil dari 2 habitat yaitu lubang pohon kweni, kelapa dan trembesi serta tanah yang berada di bawah pohon kelapa di 3 lokasi penelitian yaitu desa Teluk Dalam, Bawonifaoso, dan Legoksari. Isolasi 6 contoh tanah, memperoleh 9 isolat *B. thuringiensis*. Uji patogenitas 9 isolat tersebut yang ditumbuhkan pada media air kelapa dan endosperm kelapa, terhadap jentik *Aedes aegypti* dan *Culex p. quinquefasciatus instar III*, menunjukkan 88,9–100,0% mempunyai patogenitas > 50% selama 24 dan 48 jam pengujian. Media kelapa (air kelapa dan endospermnya) dapat digunakan untuk menumbuhkan *B. thuringiensis*.

PENDAHULUAN

Bacillus thuringiensis var israelensis (H-14) secara umum diproduksi sebagai larvisida jentik nyamuk dan jentik lalat hitam⁽¹⁾. Salah satu karakteristik dan *B. thuringiensis* adalah dapat memproduksi kristal protein dalam sel selama fase sporulasi Kristal toksin memegang peranan penting karena aktivitasnya sebagai insektisida⁽²⁾. Untuk menumbuhkan dan memperbanyak kristal dan spora *B. thuringiensis* telah digunakan berbagai media kimia seperti agar nutrisi, media NYSMA, NYPC dan Tryptose Phosphate Broth^(3,4). Beberapa peneliti tidak menggunakan media kimiawi untuk menumbuhkan *B. thuringiensis*, melainkan menggunakan media alami seperti berbagai media kelapa (air dan endospermnya)⁽⁵⁻⁹⁾. Media kelapa relatif murah, dapat diperoleh setiap saat dan terdapat di mana-mana, sedangkan media kimia harganya mahal dan tidak mudah diperoleh. Air kelapa dan endosperm kelapa (santan) kaya akan asam amino, gula dan garam serta merupakan media yang cocok untuk pertumbuhan *B. thuringiensis*⁽¹⁰⁻¹²⁾. Berdasarkan informasi di atas, maka penelitian ini dilakukan untuk menumbuhkan isolat *B. thuringiensis* pada media kelapa serta uji patogenitasnya terhadap jentik

nyamuk *Aedes aegypti* dan *Culex p. quinquefasciatus*.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan Penelitian

Sembilan isolat *B. thuringiensis* diisolasi dari berbagai habitat tanah di 3 lokasi penelitian, yaitu desa Teluk Dalam dan Bawonifaoso (Kecamatan Teluk Dalam) dan desa Legoksari (Kecamatan Sidorejo), dengan metoda Chilcott dan Wigley⁽³⁾. Sebelum digunakan, isolat-isolat ini disimpan pada media NYSMA, pada suhu 4°C.

Jentik nyamuk yang digunakan adalah *Ae. aegypti* dan *Cx. p. quinquefasciatus*.

Media

Media yang digunakan adalah air kelapa dan endosperm kelapa (santan) serta media *tryptose phosphate broth* (TPB) sebagai media standar.

Cara

A) Media air kelapa

Kepala yang digunakan adalah kelapa kering. Sebelum di-

gunakan, terlebih dahulu dilubangi dan ambil 150 ml air kelapa dengan cara dituangkan langsung ke dalam gelas Erlenmeyer steril berukuran 250 ml. Sebelum air kelapa digunakan, disimpan di refrigerator pada suhu 4°C.

B) Media endosperm kelapa

Endosperm kelapa 15 gram diparut. Sebelum diparut, dicuci terlebih dahulu dengan alkohol 70%. Ke dalam parutan kelapa, ditambahkan 150 ml *distilled water* (DW) dan dipanaskan selama 2 menit, kemudian disaring menggunakan penyaring yang sudah disterilkan. Santan kelapa yang belum digunakan, disimpan pada temperatur -20°C.

C) Pertumbuhan dan Uji patogenisitas isolat *B. thuringiensis*

Isolat *B. thuringiensis* yang disimpan pada media NYSMA, diambil 2 ose penuh (*loopful*), kemudian dimasukkan ke dalam 50 ml tryptose phosphate broth (TPB), dan diinkubasikan pada suhu 30°C selama 24 jam. Sesudah inkubasi, ke dalam media air kelapa dan endosperm kelapa masing-masing ditambahkan 5 ml *broth* (diambil dari 50 ml TPB). Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Media air kelapa dan endosperm kelapa, digoyang pada temperatur kamar selama 48 jam. Sesudah 48 jam, masing-masing media diberi 25 jentik *Ae. aegypti instar III*. Pengamatan dilakukan selama 24 dan 48 jam pengujian. Sebagai kontrol, masing-masing media hanya diberi 25 ekor jentik *Ae. aegypti*. Uji patogenisitas terhadap *Cx. p. quinquefasciatus* dilakukan seperti cara yang sama.

Sembilan isolat *B. thuringiensis* ditumbuhkan pada media *tryptose phosphate broth* (media standar) dan uji patogenisitasnya dilakukan menurut metoda Chilcott & Wigley⁽³⁾, sebagai berikut :

Biakan murni dan masing-masing isolat diambil 2 ose penuh dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer berukuran 250 ml yang diisi dengan 50 ml TPB (Oxoid, Unipath Ltd. Basingstoke, Hampshire, England). Isolat-isolat tersebut digoyang pada suhu kamar selama 48 jam. Masing-masing isolat diuji patogenisitasnya dengan cara sebagai berikut : Diambil 15 ml biakan murni dimasukkan ke dalam mangkok plastik berisi 100 ml air suling dan 25 jentik *Ae. aegypti instar III* (umur 6–7 hari). Sebagai kontrol, mangkok plastik hanya diisi 150 ml air suling dan 25 jentik *Ae. aegypti instar III*. Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Pengamatan dilakukan 24 dan 48 jam sesudah pengujian. Uji patogenisitas terhadap *Cx. p. quinquefasciatus* dilakukan dengan cara yang sama.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari enam sampel tanah yang diisolasi di 3 lokasi penelitian, ditemukan 9 isolat positif *B. thuringiensis* (Tabel 1). Isolat-isolat ditumbuhkan pada media air kelapa, endosperm kelapa (santan) dan media TPB. Uji patogenisitas 9 isolat terhadap jentik *Ae. aegypti instar III*, disajikan pada Tabel 2.

Uji patogenisitas 9 isolat yang ditumbuhkan pada media endosperm kelapa, terhadap jentik *Ae. aegypti instar III*, menunjukkan 9 isolat (100,0%) mempunyai patogenisitas > 50% (82,7–100,0%) pada 24 jam pengujian dan 100% selama 48 jam pengujian. Uji patogenisitas 9 isolat yang ditumbuhkan pada media air kelapa terhadap jentik *Ae. aegypti instar III*, menun-

Tabel 1. Hasil isolasi *Bacillus thuringiensis* dan tanah di tiga lokasi penelitian

No.	Lokasi	Habitat	Jumlah sampel tanah	Hasil isolasi <i>B. thuringiensis</i>
1	Teluk Dalam	Lubang pohon kweni	1	+
		Bawah pohon kelapa	2	+
2	Bawonifauso	Lubang pohon kelapa	1	+
		Bawah pohon kelapa	1	+
	Legoksari	Lubang pohon trembesi	1	+

jukkan 9 isolat (100,0%) yang mempunyai patogenisitas >50% (100,0%) selama 24 dan 48 jam pengujian. Uji patogenisitas 9 isolat *B. thuringiensis* yang ditumbuhkan pada media TPB, terhadap jentik *Ae. aegypti instar III*, menunjukkan 9 isolat (100,0%) mempunyai patogenisitas > 50% yaitu 70,0–93,3% pada 24 jam pengujian, serta 81,3–100,0% selama 48 jam pengujian. Uji terhadap persentase kematian jentik *Ae. aegypti* dari 9 isolat yang ditumbuhkan pada media endosperm kelapa dan media TPB, tidak menunjukkan beda nyata ($p > 0,05$) pada 24 dan 48 jam pengujian. Demikian pula uji t yang dilakukan terhadap persen tase kematian jentik *Ae. aegypti* dari 9 isolat yang ditumbuhkan pada media air kelapa dan media TPB, tidak menunjukkan beda nyata ($p > 0,05$) pada 24 dan 48 jam pengujian. Hal ini berarti bahwa media kelapa dapat digunakan sebagai pengganti media TPB. Uji patogenisitas 9 isolat yang ditumbuhkan pada media endosperm kelapa (santan), terhadap jentik *Cx. p. quinquefasciatus instar III*, menunjukkan 8 isolat (88,9%) mempunyai patogenisitas > 50% (65,0–100%) dan 1 isolat (11,1%) <50% (36,0%), selama 24 jam pengujian. Pada 48 jam pengujian, diperoleh 9 isolat (100,0%) mempunyai patogenisitas >50% yaitu 78,7–100,0% (Tabel 3). Uji patogenisitas 9 isolat yang ditumbuhkan pada media air kelapa terhadap jentik *Cx. p. quinquefasciatus instar III*, menunjukkan 9 isolat (100%) mempunyai patogenisitas >50% (61,3–100,0%) pada 24 jam pengujian dan 92,0–100,0%, selama 48 jam pengujian. Uji patogenisitas 9 isolat *B. thuringiensis* yang ditumbuhkan pada media TPB, terhadap jentik *Cx. p. quinquefasciatus instar III*, menunjukkan 5 isolat (55,56%) mempunyai patogenisitas > 50% yaitu 56,0–78,7% serta 4 isolat (44,44%) kurang dari 50% (40,0–48,0%) pada 24 jam pengujian. Pada 48 jam pengujian, menunjukkan 7 isolat (77,78%) mempunyai patogenisitas > 50% (61,3–93,3%) dan 2 isolat (22,22%) kurang dari 50% (46,7–48,0%). Tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) terhadap persentase kematian jentik *Cx. p. quinquefasciatus* dari 9 isolat yang ditumbuhkan pada media endosperm kelapa dan media TPB, maupun antara media air kelapa dengan media TPB, pada 24 dan 48 jam pengujian. Walaupun tidak ada perbedaan yang bermakna, akan tetapi isolat-isolat yang ditumbuhkan pada media kelapa (air kelapa dan endosperannya) menunjukkan patogenisitas tinggi terhadap jentik *Ae. aegypti* dan *Cx. p. quinquefasciatus*, yaitu lebih besar dari 50% pada 24 dan 48 jam pengujian. Begitu pula pH yang tinggi (7,5–8,4) tidak berpengaruh pada aktivitas larvisidanya.

Tabel 2. Hasil uji patogenisitas isolat *Bacillus thuringiensis* yang ditumbuhkan pada berbagai media terhadap jentik *Aedes aegypti* Instar III

No.	Lokasi	Habitat tanab	Jumlah sampel/ Isolat	Media	Kematian jentik nyamuk <i>Ae. aegypti</i> (%)****					
					24 jam			48 jam		
					I		II	I		II
					n	%		n	%	
1	Teluk Dalam	Lubang pohon kweni	1/1	CE*	1	100,0		1	100,0	
				CW**	1	100,0		1	100,0	
				TPB***	1	72,0		1	81,3	
2	Bawonifaoso	Lubang pohon kelapa	1/2	CE*	3	89,3-100,0		3	100,0	
				CW**	3	100,0		3	100,0	
				TPB***	3	80,0-93,3		3	93,3-100,0	
3	Legoksari	Lubang pohon trembesi	1/2	CE*	2	97,3-98,7		2	100,0	
				CW**	2	100,0		2	100,0	
				TPB***	2	72,0-81,3		2	82,3-88,3	
Jumlah			6/9	CE*	9	82,7-100,0		9	100,0	
				CW**	9	100,0		9	100,0	
				TPB***	9	70,0-93,3		9	81,3-100,0	

Keterangan : * = Santan kelapa (...) = Persentase kematian jentik
 ** = Air kelapa I = Kematian jentik > 50%
 *** = Tryptose Phosphate Broth II = Kematian jentik > 50%
 **** = Rata-rata 3 ulangan

Tabel 3. Hasil uji patogenisitas isolat *Bacillus thuringiensis* yang ditumbuhkan pada berbagai media terhadap jentik *Culex quinquefasciatus* instar III

No.	Lokasi	Habitat tanab	Jumlah sampel/ Isolat	Media	Kematian jentik nyamuk <i>Ae. aegypti</i> (%)****							
					24 jam				48 jam			
					I		II		I		II	
					n	%	n	%	n	%	n	%
1	Teluk Dalam	Lubang pohon kweni	1/1	CE*	1	100,0			1	100,0		
				CW**	1	61,3			1	92,0		
				TPB***	1	56,0			1	62,7		
2	Bawonifaoso	Lubang pohon kelapa	1/2	CE*	3	65,3-80,0			3	80,0-100,0		
				CW**	3	100,0			3	100,0		
				TPB***	2	61,3-78,7	1	48,0	3	80,0-93,3		
3	Legoksari	Lubang pohon trembesi	1/2	CE*	2	69,3-98,7			2	81,3-100,0		
				CW**	2	72,0-98,7			2	97,3-100,0		
				TPB***	1	71,7		40,0	1	82,3	1	46,7
Jumlah			6/9	CE*	8	65,0-100,0	1	36,0	9	78,7-100,0		
				CW**	9	61,3-100,0			9	92,0-100,0		
				TPB***	5	56,0-78,7	2	40,0-44,0	1	61,3	1	48,0

Keterangan : * = Santan kelapa (...) = Persentase kematian jentik
 ** = Air kelapa I = Kematian jentik > 50%
 *** = Tryptose Phosphate Broth II = Kematian jentik > 50%
 **** = Rata-rata 3 ulangan

Bacillus thuringiensis varietas *israelensis* (H- 14) dapat tumbuh dengan baik pada berbagai media kelapa, karena air kelapa mengandung 2,2mg protein/ml, endosperm kelapa (santan)

1-4 mg protein/ml dan karbohidrat berkisar antara 6-38,4 mg/ml⁽¹³⁾.

Bila dilihat dan persentase kematian jentik *Ae. aegypti* dan

Cx. p. quinquefasciatus, maka ada perbedaan di antara isolat-isolat yang diuji. *Bacillus thuringiensis* varietas *israelensis* (H14), menunjukkan patogenisitas tinggi terhadap jentik nyamuk dibandingkan dengan 13 serotipe lain yang menunjukkan patogenisitas tinggi terhadap jentik Lepidoptera⁽¹⁾. Karena itu uji serologi dari isolat-isolat yang ditemukan akan dilakukan untuk mengetahui serotipenya; tetapi sampai dengan saat ini uji serologi belum dilakukan karena kesulitan memperoleh antisera.

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)^(13,14). Berdasarkan faktor daerah makan jentik dan tingkat sedimentasi/pengendapan, dapat diduga bahwa toksin *B. thuringiensis* lebih banyak berada di dasar yang merupakan daerah makan jentik *Ae. aegypti* daripada di bawah permukaan air (*suspension feeders*) yang merupakan daerah makan bagi jentik *Cx. p. quinquefasciatus*⁽¹⁵⁾.

KESIMPULAN

Berbagai media kelapa (air kelapa dan endospermnya) dapat digunakan untuk menumbuhkan isolat *Bacillus thuringiensis*.

Sejumlah 88,9% – 100% dan 9 isolat yang ditumbuhkan pada media air kelapa dan endosperm kelapa (santan) mempunyai patogenisitas > 50% terhadap jentik *Ae. aegypti* dan *Cx. p. quinquefasciatus instar III* pada 24 dan 48 jam pengujian.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Sustriyu 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 jasad hayati SPVP atas bantuan yang diberikan.

KEPUSTAKAAN

1. WHO. Data sheet on the biological control agent *Bacillus thuringiensis* serotype H-14. 1979. WHO/VBC/79.750.13p.
2. Soesanto. Prospek *Bacillus thuringiensis* dalam Pengendalian Hama. Kumpulan Makalah Seminar *B. thuringiensis*. Komisi Pestisida Departemen Pertanian. 1994; hal 1–14.
3. Chilcott CN, Wigley PJ. Technical note: an improved method for differential staining of *Bacillus thuringiensis* crystals. Letters in Applied Microbiology 1988; 7: 67–70.
4. Yousten AA, Janes ME, Robert EB. Development of Selection/Differential Bacteriological Media for the Enumeration of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (H-14) and *Bacillus sphaericus* 1593.1982.WHOIVBC/82.844.
5. Dulmage HT. Production of deltaendotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 3, in three fermentation media. J Invertebrate Pathol 1971; 18: 353–58.
6. Nagamma MV, Ragunathan AN, Majumder SK. A new medium for *Bacillus thuringiensis* Berliner. J Appl Bacteriol 1972; 35: 367–70.
7. Hertlein BC, Hornby J, Levy R, Miller TJ Jr. Prospects of spore forming bacteria for vector control with special emphasis on their local production potential. Document.1980.WHO/VBC/791pp.1 1.
8. Salama HS, Foda MS, Dulmage IIT, El-Sharaby A. Novel fermentation media for production of delta endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. J Invertebrate Pathol 1983; 41: 8–19.
9. Obeta JAN, Okafor N. Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis*. Appl. Environment. Microbiol 1984; 47: 863–67.
10. Child R, Nathanael WRW. Changes in the sugar composition of coconut water during maturation and germination. J Sci Food Agriculture 1950; 1: 326–29.
11. Kuberski T, Roberts A, Lineham B, Bryden RN, TeburaeM. Coconut water as a rehydration fluid. NZ Med J 1979; 190: 98–100.
12. Pradera ES, Fernandez B, Calderin O. A clinical and experimental study. Am J Dis Child 1942;64: 977–96.
13. AlyC, MullaMA, Bo-chaoXu, 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): 191–96.
14. Chilcott CN, Pillai JS. The use of coconut wastes for the production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. 1985.
15. 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;



A fool may sometimes have talent, but he never has judgement
(la Rochefouauld)