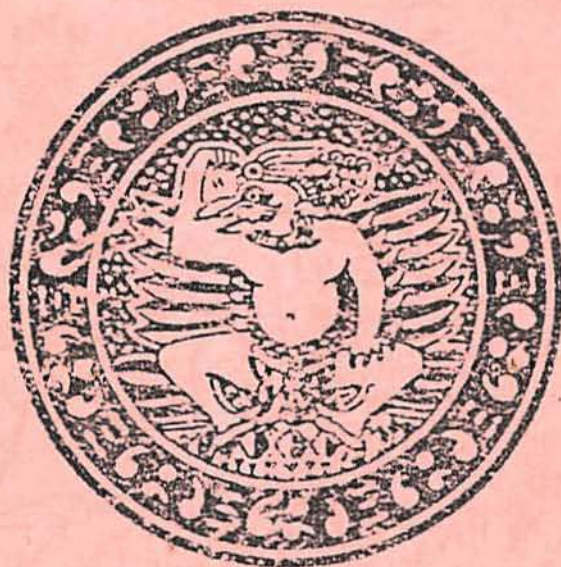


DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

ISOLASI BAKTERI TANAH ENTOMOPATOGENIK
JENIS *Bacillus thuringiensis* YANG BERPOTENSI
SEBAGAI AGENSIA HAYATI TERHADAP LARVA NYAMUK

Ketua Peneliti :

Drs. Ratna Agung Samsumaharto



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DRK DPP Unair 1994/1995

SK.Rektor Nomer : 4815/PT03.II/N/1994

Nomor Urut : 26

MICROBIOLOGY

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Kke
Kke
579
Sam
i

**ISOLASI BAKTERI TANAH ENTOMOPATOGENIK
JENIS *Bacillus thuringiensis* YANG BERPOTENSI
SEBAGAI AGENSIA HAYATI TERHADAP LARVA NYAMUK**

Ketua Peneliti :

Drs. Ratna Agung Samsumaharto

3000 134993141

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DRK DPP Unair 1994/1995

SK.Rektor Nomor : 4815/PT03.H/N/1994

Nomor Urut : 26

MILITIA
PELUSIHKANAN
UNIVERSITAS ABLANGON
SURABAYA

000 134 93 141



DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

LEMBAGA PENELITIAN

Jl. Darmawangsa Dalam 2 Telp. (031) 42322 Surabaya 60286

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. a. Judul Penelitian : Isolasi Bakteri Tanah Entomopatogenik Jenis *Bacillus Thuringiensis* Yang Berpotensi Sebagai Agensia Hayati Terhadap Larva Nyamuk
- b. Macam Penelitian : Fundamental, Terapan, Pengembangan
 Instiusional
- c. Kategori Penelitian : I II III IV
2. Kepala Proyek Penelitian
- a. Nama Lengkap Dengan Gelar : Drs. Ratna Agung Samsumaharto
- b. Jenis Kelamin : Laki-Laki
- c. Pangkat/Golongan dan NIP : Penata Muda/IIIa/132 061 817
- d. Jabatan Sekarang : Staf Pengajar
- e. Fakultas / Jurusan : FMIPA/Biologi
- f. Univ./Inst./Akademi : Universitas Airlangga
- g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Mikrobiologi
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Biologi Medis/Mikrobiologi FMIPA Unair
5. Kerjasama dengan Instansi Lain
- a. Nama Instansi : -
- b. Alamat : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 6 (enam) bulan
7. Biaya Yang Diperlukan : Rp 2.000.000,00
8. Seminar Hasil Penilaian
- a. Dilaksanakan Tanggal : 27 Desember 1994
- b. Hasil Penilaian : Baik Sekali Baik
 Sedang Kurang

Surabaya, 11 Februari 1995

Mengetahui/ Mengesahkan :
a.n. Rektor
Ketua Lembaga Penelitian,

Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
NIP. 130 355 372

Judul : Isolasi Bakteri Tanah Entomopatogenik Jenis
Bacillus thuringiensis yang Berpotensi sebagai
Agensia Hayati Terhadap Larva Nyamuk

Ketua : Drs. Ratna Agung Samsumaharto
Peneliti

Anggota : Drs. Salamun, M. Kes.
Peneliti : Dra. Alfiah Hayati

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Sumber : SPP-DPP Unair Tahun 1994/1995
Biaya : S.K. Rektor 4815/PT03 H/N/1994
Tanggal 27 Juni 1994

RINGKASAN

Bakteri entomopatogenik adalah agensia mikrobial yang berpotensi sebagai pengendali nyamuk vektor penyakit. Agensia ini mempunyai sifat yang spesifik terhadap serangga sasaran serta tidak berdampak negatif terhadap lingkungan hidup, sehingga mempunyai prospek dikembangkan sebagai pengendali hayati vektor penyakit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri entomopatogenik dapat diisolasi dari tanah kolam. Berdasarkan sifat morfologi dan fisiologi dalam "Bergeys Manual of Determinative Bacteriology" termasuk jenis *Bacillus thuringiensis*. Sampel tanah diambil pada bagian tengah bekas kolam sumber mata air yang telah mengering di kawasan Taman Nasional Baluran, Banyuwangi Jawa Timur. Hal ini bertujuan, tanah yang akan diisolasi jenis bakteri *B. thuringiensis* belum banyak mengalami pencemaran.

Isolasi bakteri tersebut menggunakan teknik kultur diperkaya yaitu medium minimal yang dimodifikasi dengan ekstrak larva nyamuk. Selanjutnya isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* dilakukan pengujian hayati menggunakan larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III. Dari uji hayati diketahui bahwa isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* mampu membunuh larva uji lebih dari 50% selama 24 jam dan diperoleh nilai dosis kematian (LD_{50}) sebesar 5.834×10^5 spora/ml, LD_{90} : $99,342 \times 10^5$ spora/ml dan waktu kematian (LT_{50}) sebesar 3,158 jam, LT_{90} : 4,449 jam. Penentuan nilai dosis kematian dan waktu kematian dari isolat *B. thuringiensis* terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* menggunakan analisis probit.

Hubungan antara mortalitas larva instar III nyamuk *Aedes aegypti* dengan log konsentrasi probit didapatkan persamaan garis linear yaitu: $Y = 4,202 + 1,041 X$, yang menunjukkan bahwa jumlah larva uji yang mati bertambah sejalan dengan penambahan konsentrasi inokulum.

KATA PENGANTAR

Penyusun mengucapkan puji dan syukur ke hadirat Allah subhanallohuwata'ala, yang telah menganugerahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada penyusun, sehingga penyusun dapat menyelesaikan laporan penelitian yang berjudul :

"ISOLASI BAKTERI TANAH ENTOMOPATOGENIK JENIS *Bacillus thuringiensis* YANG BERPOTENSI SEBAGAI AGENSIA HAYATI TERHADAP LARVA NYAMUK"

Selanjutnya penyusun menyadari dengan tersusunnya laporan penelitian ini tentunya tidak luput dari bantuan dan dorongan dari berbagai pihak. Untuk itu penyusun mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Rektor Universitas Airlangga Surabaya melalui Lembaga Penelitian, yang telah memberi kesempatan dan bantuan dana untuk melaksanakan penelitian dan penyusunan laporan penelitian ini.

Penyusun juga menyadari dalam laporan penelitian ini tentunya masih banyak kekurangan-kekurangan. Oleh karena itu dengan lapang dada penyusun menerima saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan laporan penelitian ini. Akhir kata, penyusun berharap semoga laporan penelitian ini bermanfaat bagi penyusun dan semua pihak

Surabaya, Desember 1994

Penyusun

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
BAB I. PENDAHULUAN	
I.1 Latar Belakang Masalah.....	1
I.2 Rumusan Masalah.....	3
I.3 Tujuan Penelitian.....	3
I.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Dampak Penggunaan Insektisida.....	5
II.2 Bakteri Entomoptogenik <i>Bacillus sp.</i>	6
II.3 Nyamuk <i>Aedes aegypti</i> , L.....	14
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	
III.1 Pengambilan Sampel dan Isolasi Bakteri Entomopatogenik.....	17
III.2 Kolonisasi Larva Uji.....	24
III.3 Uji Hayati.....	28
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	31
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
V.1 Kesimpulan.....	39
V.2 Saran.....	39
DAFTAR PUSTAKA.....	41
LAMPIRAN.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil pengujian morfologis dan fisiologis dari isolat <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
2. Nilai lethal dose dan lethal time isolat <i>Bacillus thuringiensis</i>	35
3. Hasil analisis probit dari aktifitas entomopatogen <i>Bacillus thuringiensis</i> untuk menentukan nilai LD ₅₀ dan LD ₉₀	44
4. Hasil analisis probit dari aktifitas entomopatogen <i>Bacillus thuringiensis</i> untuk menentukan nilai LT ₅₀ dan LT ₉₀	44

Gambar	
Halaman	
1. Penelitian fisiologis isolat <i>Bacillus thuringiensis</i>	45
2. Lokasi Taman Nasional Baluran, Banyuwangi Jawa Timur.....	46

DAFTAR GAMBAR

BAB I
PENDAHULUAN



I.1 Latar Belakang Masalah

Penggunaan insektisida kimiawi terbukti banyak menimbulkan dampak negatif berupa perkembangan ke arah resistensi serangga sasaran, membunuh serangga non sasaran dan mengganggu kualitas lingkungan hidup (Soedarto,1992). Sejak tahun 1908 telah diketahui adanya resistensi serangga terhadap insektisida kimia. *Quadispidiotus penicosus* ditemukan mempunyai daya resistensi terhadap sulfur (Sastroutomo,1992).

Kenyataan ini membuat para ahli pengendalian hayati menyarankan untuk dikembangkan penggunaan bioinsektisida dan dicari agen-agen pengendalian hayati sebagai salah satu alternatif untuk pengendalian hama dan vektor penyakit, karena sasaran yang dituju lebih spesifik, lebih aman dan berwawasan lingkungan (Anonim,1991).

Salah satu agen hayati yang mendapat prioritas pertama untuk dikembangkan sebagai bioinsektisida pengendali hayati adalah marga *Bacillus* yang bersifat entomopatogenik (Anonim, 1991). Berbagai jenis bakteri dari marga *Bacillus* telah dinyatakan bersifat patogen terhadap berbagai jenis serangga. *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus larvae*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus thuringiensis* dan *Bacillus sphaericus* merupakan jenis bakteri yang sebagian besar jenisnya telah dinyatakan bersifat patogen (Stahly et al.,1990). Marga *Bacillus* yang

... sifat entomopatogeni) sangat efektif untuk digunakan sebagai bahan pemberantas berbagai jenis nyamuk yang berada di berbagai tempat di dunia karena jenis-jenis bakteri tersebut mampu membentuk toksin. Toksin yang dihasilkan oleh setiap jenis bakteri berbeda-beda dan sifatnya spesifik. Jenis-jenis bakteri semacam itu banyak ditemukan terutama dari tanah karena tanah merupakan habitat asli dari berbagai jenis bakteri yang bersifat patogen terhadap serangga (Stahly et al., 1990).

Di antara agensia bakteri yang telah dimanfaatkan secara meluas adalah *B. thuringiensis* serotipe H-14. Agensia tersebut telah diperdagangkan dan dimanfaatkan untuk memberantas beberapa jenis nyamuk. Pemanfaatan jenis bakteri tersebut dan juga jenis-jenis bakteri yang lain adalah sangat ideal, karena mudah cara memproduksinya, tidak menimbulkan pencemaran lingkungan, tidak berbahaya bagi jasad lain yang bukan sasarannya, ampuh daya toksisitasnya, dapat tahan lama di alam dan mudah cara penggunaannya (Hiempel dan Angus, 1963). Akan tetapi penggunaan *B. thuringiensis* yang di-datangkan dari luar negeri tidak terlepas dari permasalahan, antara lain : proses produksi, macam kemasan, lamanya waktu perjalanan dan penyimpanan agensia dapat menyebabkan turunnya virulensi dari bakteri tersebut (Situmorang, 1985).

Oleh karena itu, upaya mencari jenis-jenis bakteri tapah yang mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai agensia pengendali populasi serangga, terutama nyamuk sangat menarik

tan perlu untuk dilakukan suatu penelitian.

Pengambilan sampel tanah pada penelitian ini dilakukan di kawasan Taman Nasional Baluran, Banyuwangi Jawa Timur, pada bagian tengah bekas kolam sumber mata air yang telah mengering. Hal ini bertujuan sampel tanah yang akan diisolasi bakteri jenis *Bacillus thuringiensis* belum banyak mengalami pencemaran.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan tersebut, penelitian ini dirancang untuk menjawab permasalahan sebagai berikut.

1. Dapatkah bakteri entomopatogenik jenis *Bacillus thuringiensis* yang berpotensi sebagai agensia hayati terhadap larva nyamuk diisolasi dari tanah bekas kolam sumber mata air yang telah mengering di kawasan Taman Nasional Baluran, Banyuwangi Jawa Timur ?
2. Berapakah dosis kematian dan waktu kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III terhadap isolat bakteri tanah yang bersifat entomopatogenik hasil isolasi jenis *Bacillus thuringiensis* ?

I.3 Tujuan Penelitian

Penelitian Isolasi Bakteri Tanah Entomopatogenik jenis *Bacillus thuringiensis* yang berpotensi sebagai Agensia Hayati terhadap Larva Nyamuk, bertujuan untuk:

- (1). menemukan dan mengisolasi bakteri tanah entomopatogenik

jenis *Bacillus thuringiensis* dari sampel tanah yang diambil pada bagian tengah kolam bekas sumber mata air yang telah mengering di kawasan Taman Nasional Baluran, Banyuwangi Jawa timur, yang berpotensi sebagai agensia hayati terhadap larva nyamuk.

- (2). mengetahui dosis kematian dan waktu kematian dari larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III terhadap isolat bakteri tanah entomopatogenik jenis *Bacillus thuringiensis* melalui uji aktivitas biolarvasida bakteri tersebut terhadap larva uji.

I.4 Manfaat Penelitian

Memberikan informasi ilmiah mengenai data-data dasar cara pengisolasian bakteri tanah entomopatogenik jenis *Bacillus thuringiensis* yang mempunyai potensi sebagai agensia hayati terhadap larva nyamuk dan aktivitas biolarvasida bakteri tanah entomopatogenik jenis *Bacillus thuringiensis* hasil isolasi dari kolam bekas sumber mata air yang telah mengering di kawasan Taman Nasional Baluran, Banyuwangi Jawa Timur, terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Dampak Penggunaan Insektisida

Masalah serius yang diakibatkan oleh penggunaan insektisida adalah timbulnya strain hama dan vektor penyakit yang resisten terhadap insektisida kimia (Knipling, 1979; Sill, 1982). Biasanya resistensi akan terjadi apabila insektisida kimia digunakan secara intensif (Brown, 1978). Akibat timbulnya resistensi ini maka anggaran belanja yang dibutuhkan untuk mengendalikan hama tersebut menjadi meningkat karena dosis yang biasa digunakan harus ditingkatkan atau senyawa kimianya harus diganti (Sastroutomo, 1992). Mekanisme resistensi serangga hama dan vektor penyakit terhadap insektisida dapat terjadi secara morfologis, perubahan perilaku dan secara fisiologis (Green et al., 1979).

Dampak negatif penggunaan insektisida kimia adalah meningkatnya resistensi terhadap daya bunuh insektisida terhadap beberapa hama serangga. Sejak tahun 1908 telah diketahui adanya resistensi serangga terhadap insektisida kimia. *Quadspidiotus penicosus* ditemukan mempunyai daya resistensi terhadap sulfur (Sastroutomo, 1992). Tahun 1914 terjadi kasus resistensi serangga bersisik dari San Jose terhadap penyemprotan kapur sulfat. Pada tahun 1916 terjadi

resistensi serangga bersisik merah dan hitam di California (Flint dan Bosch, 1990).

Pada tahun 1947 DDT juga mengalami kegagalan untuk mengendalikan nyamuk *Culex pipiens* di Italia dan *Aedes sollicitans* di Florida (Brown dan Pal, 1971). Kasus toleransi terhadap Dikloro Difenil Trikloroetana yang pertama dilaporkan di Swedia tahun 1946, dari 224 species serangga dan akarina yang tercatat menjadi resisten, 127 merupakan hama di bidang pertanian dan 97 di bidang peternakan (Flint dan Bosch, 1990).

II.2 Bakteri Entomopatogenik *Bacillus* sp

Tanah merupakan habitat dari berbagai berbagai jenis bakteri, beberapa jenis di antaranya bersifat patogen terhadap berbagai jenis serangga. Jenis-jenis bakteri yang bersifat patogen terhadap serangga tersebut biasanya dapat hidup secara saprofit di tanah dan sekali waktu bila menemukan hospes yang rentan dapat pula hidup secara parasit pada tubuh serangga tersebut. Jenis-jenis bakteri semacam itu pada umumnya adalah jenis bakteri yang mampu membentuk spora (Alexander, 1977).

Jenis-jenis bakteri dari genus *Bacillus* merupakan salah satu jenis bakteri tanah yang jumlahnya cukup melimpah. Jenis-jenis bakteri tersebut di tanah dapat berkisar antara 10^6 hingga 10^7 sel tiap gram tanah. Selain dapat ditemukan di tanah, jenis bakteri dari marga *Bacillus* juga banyak yang di

isolasi dari air maupun tubuh hospes yang terinfeksi (Edmonds, 1978). Pada tahun 1986 Ohba dan Aizawa telah berhasil mengisolasi 189 strain *Bacillus thuringiensis* dari berbagai sumber, terutama di tanah-tanah pertanian.

Berbagai jenis bakteri dari marga *Bacillus* telah dinyatakan bersifat patogen terhadap berbagai jenis serangga. *B. lentimorbus*, *B. larvae*, *B. popilliae*, *B. thuringiensis* dan *Bacillus sphaericus* merupakan jenis-jenis bakteri yang telah dinyatakan bersifat patogen dan memenuhi postulat Koch (Stahly et al., 1990). Bakteri jenis *Bacillus thuringiensis* dapat bersifat patogen terhadap 137 jenis serangga bangsa Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera dan Diptera. *B. popilliae* hanya bersifat patogen terhadap serangga dari familia Scarabaeidae. *Bacillus moritai* dan *Bacillus cereus* juga terbukti bersifat patogen terhadap beberapa jenis serangga tertentu (Norris dan Richmond, 1981). *Bacillus sphaericus* dapat menginfeksi dan membunuh berbagai jenis larva nyamuk dari marga *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* dan *Mansonia* (Maurice dan Pearce, 1987).

Di Indonesia juga telah ditemukan beberapa jenis bakteri, yaitu *B. sphaericus*, *B. cereus* dan *Bacillus pumilus* yang mampu membunuh larva nyamuk *Culex quinquefasciatus* Say (Situmorang et al., 1989)

Berdasar sifatnya, jenis-jenis bakteri patogen, khususnya terhadap serangga dapat dibedakan antara bakteri yang patogen obligat dan bakteri patogen yang fakultatif.

Bakteri patogen obligat hanya bisa hidup pada hospes spesifik dengan habitat yang sangat terbatas, sedangkan bakteri patogen fakultatif dapat hidup bebas di alam secara saprofit dan pada waktu-waktu tertentu dapat juga hidup berassosiasi dengan satu jenis serangga atau lebih (Anonim,1979; Huffaker dan Messenger,1979)..

Infeksi bakteri, terutama jenis-jenis bakteri anggota marga *Bacillus* pada tubuh serangga biasanya terjadi melalui sistem pencernaan dan kadang-kadang melalui luka. Untuk berlangsungnya infeksi biasanya bakteri mengeluarkan toksin dan enzim, terutama yang dapat membantu berlangsungnya infeksi. Jumlah maupun macam toksin dan enzim yang dihasilkan oleh masing-masing jenis bakteri berbeda-beda sehingga memiliki tingkat patogenitas dan jenis hospes yang berbeda pula (Yousten,1984). Beberapa faktor yang mempengaruhi proses infeksi suatu jenis bakteri pada hospes tertentu, yaitu cara masuknya bakteri pada tubuh serangga, virulensi dan dosis bakteri yang menginfeksi. Virulensi suatu jenis bakteri patogen ditentukan oleh daya infeksi, kemampuan penyebaran dan pertumbuhannya pada hospes serta tingkat patogenitasnya (Frobisher,1962).

Umur serangga hospes ternyata berpengaruh terhadap proses infeksi bakteri patogen. Pada umumnya larva nyamuk yang lebih muda lebih mudah terinfeksi oleh *Bacillus thuringiensis* maupun *Bacillus sphaericus* (Stahly et al.,1990). Selain itu keadaan lingkungan yang buruk , kondisi

stress dan populasi yang terlalu padat dari serangga juga menyebabkan serangga tersebut lebih mudah terinfeksi (Poinar dan Thomas, 1982). Beberapa faktor abiotik ternyata berpengaruh terhadap patogenitas suatu jenis bakteri. Sinar ultraviolet dapat menghancurkan spora dan kristal parasporal body dari *B. thuringiensis*. Temperatur dan kelembaban serta macam kemasan, lamanya penyimpanan bioinsektisida yang dibuat dari berbagai jenis bakteri juga berpengaruh pada stabilitas bakteri tersebut (Poinar dan Thomas, 1982).

Infeksi bakteri patogen pada serangga menimbulkan gejala-gejala yang berbeda pada proses kematian serangga tersebut. Proses kematian serangga dapat dibedakan menjadi tiga tipe, yaitu tipe I, II dan III. Pada tipe I, setelah beberapa menit menelan bakteri, bagian usus tengah dari serangga yang terinfeksi mengalami paralisis. Biasanya dalam waktu satu sampai tujuh jam kemudian seluruh tubuh serangga juga mengalami paralisis yang disertai dengan peningkatan pH darah, terjadi septisemia dan serangga akan mati. Pada tipe II, paralisis hanya terjadi pada usus dan tidak disertai dengan peningkatan pH darah. Serangga mati dalam waktu dua sampai empat hari setelah terinfeksi. Pada tipe III, bakteri biasanya tidak dapat menembus atau melumpuhkan pertahanan tubuh serangga dan toksin yang dimiliki akan efektif hanya jika kondisi tubuh serangga tidak baik, misalnya sedang dalam kondisi stress atau kelaparan. Bagian-bagian tubuh tidak mengalami paralisis dan serangga akan mati dalam waktu dua

sampai empat hari atau lebih setelah terinfeksi (Heimpel dan Angus, 1963).

Beberapa jenis bakteri, misalnya *B. popilliae* menyebabkan kematian serangga karena jumlah sporanya yang sangat melimpah pada tubuh hospesnya. Akan tetapi pada umumnya kematian serangga yang diakibatkan oleh infeksi bakteri patogen disebabkan oleh adanya aktivitas toksin yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Sebagai contoh *B. thuringiensis* dan *B. sphaericus* dapat menyebabkan kematian beberapa jenis serangga karena memiliki toksin yang disebut dengan "delta endotoksin" atau sering disebut dengan *parasporal body*. Toksin tersebut berdaya racun ganas dan bersifat spesifik terhadap beberapa jenis serangga bangsa Diptera. Bahan toksik tersebut setelah tertelan oleh larva serangga akan terhidrolisis karena aktivitas dari usus larva tersebut. Hidrolisis toksin hanya terjadi pada usus dalam kondisi basa, pH sekitar 10 hingga 12 (Stahly et al., 1990). Racun yang terhidrolisis terikat oleh reseptor khusus pada epithelium dinding usus sehingga dinding usus kehilangan permeabilitasnya, berlobang-lobang dan akhirnya mengalami paralisis. Bersamaan dengan terjadinya paralisis dinding usus tersebut, spora bakteri telah mengalami perkecambahan menjadi sel vegetatif dan berlipat ganda jumlahnya. Sel-sel vegetatif segera memasuki peredaran darah melalui dinding usus yang telah mengalami paralisis. Penyebaran bakteri ke dalam sistem peredaran darah menyebabkan kenaikan pH darah

dan akan terjadi septisemia. Oleh karena berbagai kerusakan bagian tubuh tersebut maka dalam beberapa jam kemudian serangga akan mati (Frobisher, 1962).

Selain kristal parasporal body *B. thuringiensis* juga memiliki sedikitnya tiga macam toksin lagi, yaitu "alfa eksotoksin", yang berupa fosfolipase C yang dapat menghancurkan fosfolipida esensial dalam jaringan tubuh serangga; "beta eksotoksin", yang merupakan molekul-molekul yang mudah larut tetapi tahan panas, dapat mengalami dialisis dan bersifat toksik terhadap jenis-jenis serangga dari bangsa Diptera dan Lepidoptera; dan "gamma eksotoksin", merupakan fosfolipase yang belum teridentifikasi dan diduga berfungsi untuk membebaskan asam-asam lemak. Akan tetapi untuk pemunculan sifat patogenik dari jenis bakteri tersebut, hanya dua toksin yang terpenting, yaitu "beta eksotoksin" dan "delta eksotoksin" (Quraishi, 1977).

Terbentuknya kristal parasporal body tidak dapat dipisahkan dengan proses sporulasi jenis-jenis bakteri yang memilikinya. Pada *Bacillus thuringiensis*, parasporal body terbentuk dan terletak di sisi spora secara terpisah, sedangkan pada *B. sphaericus* parasporal body biasanya selalu melekat pada eksosporium. Kristal toksin tersebut terbentuk bersamaan dengan proses sporulasi dan terbebaskan dari sporangiumnya jika spora mengalami perkecambahan (Stahly, et al., 1990).

Untuk berlangsungnya proses sporulasi pada jenis-jenis

bakteri anggota *Bacillus* pada umumnya diperlukan keadaan lingkungan tertentu yang berbeda-beda untuk masing-masing jenis. Faktor-faktor yang mempengaruhi antara lain : adanya ion-ion logam tertentu, suhu pertumbuhan, oksigen dan asam-asam amino tertentu. Biasanya endospora terbentuk ketika sel mengalami kekurangan sumber karbon dan nitrogen. Endospora bakteri-bakteri yang bersifat patogen banyak terbebaskan dari bangkai serangga yang terinfeksi dan tersebar di lingkungan sekitarnya (Singleton dan Sainsbury, 1981).

Fase endospora bukan merupakan fase perkembangbiakan, melainkan hanya merupakan fase untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan (Timotius, 1978). Dengan dimilikinya endospora oleh bakteri anggota marga *Bacillus* menyebabkan bakteri-bakteri tersebut dapat resisten dan bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang beraneka ragam selama bertahun-tahun (Hadioetomo, 1985).

Endospora dari bakteri terbentuk secara intraseluler; sangat refraktil; mempunyai masa dormansi yang lama; tahan terhadap panas, kering, radiasi dan suasana asam (Timotius, 1978). Bentuk ukuran serta posisi endospora pada sporangiumnya berbeda-beda pada masing-masing jenis bakteri. Bentuk endospora adalah bulat atau sferik. Posisi endospora pada sporangiumnya ada yang terminal, subterminal, parasentral dan sentral. Variasi bentuk, ukuran maupun posisi endospora sering dijumpai pada beberapa jenis bakteri. Bentuk

endospora sering dijumpai pada beberapa jenis bakteri. Bentuk sporangium pada bakteri anggota marga *Bacillus* biasanya seperti sel vegetatifnya, akan tetapi kadang-kadang endosporanya mempunyai diameter sangat besar sehingga sporangium nampak membengkak ("swollen") (Frobisher, 1962).

Perkecambahan endospora secara sederhana prosesnya terdiri dari tiga tahap, yaitu: aktivasi, inisiasi dan pertumbuhan sel vegetatif awal. Perkecambahan endospora diawali dengan imbibisi air. Pada awal proses tersebut resistensi terhadap panas dan kering berkurang, sedangkan kemampuannya untuk bereaksi dengan cat meningkat. Setelah itu kulit endospora pecah dan sel anakan yang baru akan muncul sebagai sel vegetatif yang aktif (Timotius, 1978).

Perkecambahan endospora bisa terjadi diberbagai tempat yang sesuai, tempat tersebut tersedia nutrien yang cukup untuk pertumbuhannya. Bakteri yang bersifat patogen fakultatif, endosporanya dapat berkecambah dengan baik pada tubuh hospes ataupun pada tempat lain yang cukup tersedia nutrien, sedangkan endospora dari bakteri yang bersifat patogen obligat biasanya hanya berkecambah dengan baik pada tubuh hospesnya (Edmonds, 1978).

Kebanyakan bakteri anggota marga *Bacillus* menunjukkan sistem enzim pada endosporanya, baik endoenzim maupun eksoenzim. Jenis-jenis bakteri tersebut dapat bertahan hidup pada berbagai macam substrat karena memiliki eksoenzim yang berfungsi untuk mereduksi senyawa-senyawa kompleks menjadi

senyawa-senyawa yang lebih sederhana sehingga dapat dimanfaatkan untuk pertumbuhannya (Steinhaus, 1963)

Untuk mengisolasi jenis-jenis bakteri anggota marga *Bacillus* dari tanah dilakukan dengan teknik khusus, yaitu dengan memanaskan suspensi tanah pada suhu sekitar 65°C hingga 80°C selama kira-kira 30 menit dengan maksud untuk memacu pembentukan endospora, sedangkan sel-sel vegetatif bakteri lain yang tidak tahan panas dan tidak mampu membentuk endospora akan mati. Kultur diinkubasikan di atas shaker dengan tujuan untuk memberikan aerasi sehingga bakteri pembentuk spora yang bersifat anaerobik, yaitu *Clostridium sp* tidak dapat tumbuh. Jenis-jenis bakteri anggota marga *Bacillus* juga sering diisolasi dengan menggunakan medium nutrisi agar dengan komposisi: ekstrak daging, pepton, agar dan air suling dengan pH 6,8 (Gordon et al, 1973).

II.3 Nyamuk *Aedes aegypti*, L

Nyamuk *A. aegypti*, Linn. (Diptera: Culicidae) disebut black-white mosquito, karena tubuhnya ditandai dengan pita atau garis-garis putih keperakan di atas dasar hitam (James dan Harwood, 1969). Di Indonesia, nyamuk ini sering disebut sebagai salah satu nyamuk-nyamuk rumah. Masa pertumbuhan dan perkembangan nyamuk *A. aegypti* dapat dibagi menjadi 4 tahap,

yaitu telur, larva, pupa dan dewasa.

Telur, larva dan pupa nyamuk *A. aegypti* tumbuh dan berkembang di dalam air. Genangan air yang disukai sebagai tempat perindukan nyamuk *A. aegypti* berupa genangan-genangan air yang tertampung disuatu wadah yang biasa disebut kontainer, bukan genangan air di tanah. Survei yang telah dilakukan di beberapa kota di Indonesia menunjukkan bahwa tempat perindukannya yang paling potensial adalah di tempat penampungan air (TPA) yang digunakan sehari-hari, seperti drum, tempayan, bak mandi dan lain-lainnya. Nyamuk *A. aegypti* lebih tertarik untuk meletakkan telurnya pada kontainer berair yang berwarna gelap, paling menyukai warna hitam, terbuka lebar dan terutama yang terletak di tempat-tempat terlindung sinar matahari langsung (Anonim,1990).

Nyamuk *A. aegypti* dewasa hidup domestik, lebih senang tinggal di dalam rumah daripada di luar rumah. Nyamuk betina menggigit dan menghisap darah lebih banyak di siang hari terutama pagi atau sore hari antara pukul 08.00-12.00 dan 15.00 - 17.00. Kesukaan menghisap darah lebih bersifat antropofilik, menggigit dan menghisap beberapa kali karena pada siang hari orang sedang aktif, sehingga sebelum kenyang, orang sudah bergerak, orang sudah bergerak, nyamuk terbang dan menggigit orang lagi sampai cukup darah untuk pertumbuhan dan perkembangannya telurnya. Telur nyamuk *Aedes aegypti* di letakkan di dalam air dengan suhu 20-40°C akan menetas menjadi larva dalam waktu 1-2 hari (Anonim,1990).

Kecepatan pertumbuhan dan perkembangan larva sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu : temperatur, tempat, keadaan air, dan kandungan zat makanan yang ada di tempat perindukannya. Pada kondisi optimum, larva berkembang menjadi pupa dalam waktu 4-9 hari, kemudian pupa menjadi dewasa dalam waktu 2-3 hari. Jadi pertumbuhan dan perkembangan dari telur, larva, pupa sampai menjadi nyamuk dewasa memerlukan waktu kurang lebih 7-14 hari (Anonim,1990).

Nyamuk *A. aegypti* bersifat kosmopolitan. diduga berasal dari Afrika Timur, kemudian menyebar ke arah timur dan barat (Bates,1949). Salah satu hal yang menarik perhatian adalah nyamuk *A. aegypti* merupakan salah satu nyamuk yang berperan sebagai vektor penyakit, antara lain : Yellow Fever, Virus Encephalitis dan Dengue Haemorrhagic Fever (Harinasuta,1984).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 1994, dengan pengambilan sampel tanah di kawasan Taman Nasional Baluran, Banyuwangi Jawa Timur pada bagian tengah kolam bekas sumber mata air yang telah mengering. Hal ini bertujuan agar sampel tanah yang akan diisolasi bakteri jenis *Bacillus thuringiensis* belum banyak mengalami pencemaran. Selanjutnya dilakukan secara eksperimental di dalam laboratorium yang meliputi: isolasi bakteri entomopatogenik, kolonisasi larva nyamuk uji dan uji hayati. Setiap tahap, bahan, alat dan cara kerja yang digunakan pada penelitian ini dirincikan sebagai berikut.

III.1 Pengambilan sampel dan Isolasi Bakteri Entomopatogenik

Bahan-bahan yang digunakan adalah :

1. sampel tanah dari Taman Nasional Baluran yang akan diisolasi bakteri entomopatogeniknya;
2. larva nyamuk *A. aegypti* yang digunakan untuk uji hayati aktifitas entomopatogeniknya;
3. media minimal untuk isolasi dan pemeliharaan isolat bakteri;
4. medium nutrien agar untuk pemeliharaan isolat bakteri;
5. medium untuk pengujian sifat-sifat fisiologis, yaitu: medium uji fermentasi karbohidrat, uji

hidrolisis pati, uji hidrolisis protein, uji reaksi katalase, uji reduksi nitrat, uji methyl-red, uji Voges Proskauer, uji sitrat.

Alat-alat yang digunakan adalah :

1. autoclave untuk sterilisasi alat dan bahan;
2. timbangan analitik untuk menimbang bahan kimia;
3. waterbath untuk pemanasan sampel tanah;
4. shaker inkubator untuk membiakkan kultur bakteri;
5. sentrifuge untuk pengendapan kultur bakteri;
6. mikroskop untuk pengamatan sel bakteri.

Cara kerja pengambilan sampel dan isolasi bakteri entomopatogenik dari tanah.

1. Pengambilan sampel

Sampel tanah yang digunakan sebagai sumber isolat diambil pada bagian tengah kolam bekas sumber mata air yang telah mengering di kawasan Taman Nasional Baluran, Banyuwangi Jawa Timur. Hal ini bertujuan agar sampel tanah yang diambil belum banyak mengalami pencemaran. Selanjutnya sampel tanah yang telah diambil dimasukkan ke dalam botol steril dan diberi label untuk digunakan dalam penelitian laboratorium (Lampiran, Gambar 2, Halaman 46).

2. Isolasi bakteri entomopatogenik dari tanah kolam

a. Tahap semai.

Satu gram sampel tanah disuspensikan dalam 10 ml air steril kemudian larutan supernatan dipisahkan dan dipanaskan selama 30 menit pada suhu 70°C agar bakteri-bakteri yang tidak mempunyai endospora mati. Selanjutnya 5 ml suspensi tersebut ditanam dalam 100 ml media minimal dengan komposisi, D-glukosa 1 gram; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 gram; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 gram; MnSO_4 0,1 gram; CaCl_2 0,08 gram; K_2HPO_4 0,025 gram dilarutkan dalam air suling hingga volume 1 liter dan ditambahkan 5 gram ekstrak larva nyamuk kering, agar isolat bakteri yang diperoleh hanyalah bakteri yang mampu menggunakan zat-zat penyusun tubuh larva nyamuk sebagai sumber nutriennya, selama 72 jam pada suhu 37°C .

b. Tahap seleksi isolat bakteri

Seleksi bakteri dilakukan untuk mendapatkan jenis-jenis bakteri pembentuk endospora yang mampu membunuh larva nyamuk, larva nyamuk yang digunakan sebagai uji hayati pada penelitian ini adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III. Dari medium minimal diambil 1 ml untuk diinokulasikan pada medium minimal tanpa glukosa ditambah ekstrak larva

nyamuk, kasein dan kitin serta diinkubasikan selama 48 jam pada suhu kamar.

Selanjutnya ditumbuhkan pada nutrien agar miring dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 72 jam.

c. Tahap identifikasi

Pada tahap identifikasi terdiri atas beberapa tahapan uji.

1. Uji fisiologis

a. Uji fermentasi gula

1 ose dari biakan nutrien agar miring diinokulasikan ke dalam media laktosa, glukosa, sukrosa, arabinosa, mannitol, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji dikatakan positif jika dapat merubah warna media dari merah menjadi kuning dan di dalam media akan tampak adanya gas atau tanpa gas. Terbentuknya gas dapat ditandai dengan adanya ruang kosong dalam tabung durham. Sedangkan uji dikatakan negatif jika tidak dapat merubah warna merah.

b. Uji hidrolisis pati

Isolat bakteri pada media nutrien agar miring diinokulasi pada medium untuk uji hidrolisis pati dan diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Kemudian dituangkan 2-3 tetes larutan gram B di atas kultur tersebut. Aktivitas

bakteri untuk menghidrolisis pati ditandai dengan terbentuknya zone jernih di sekitar koloni bakteri tersebut.

c. Uji katalase

Isolat bakteri pada media nutrisi agar miring diambil 1 ose kultur dan dioleskan pada gelas benda steril kemudian ditetesi 3 tetes larutan hidrogen peroksida 3%.

Aktivitas enzim katalase yang dimiliki oleh isolat bakteri ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung oksigen.

d. Uji Indole

Isolat bakteri pada media nutrisi agar miring, diinokulasikan ke dalam media MIO, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Ditambahkan 0,2 ml pereaksi indol ke dalam tabung biakan tersebut, kemudian digojog dan didiamkan selama 10 menit. Uji dikatakan positif bila menunjukkan warna merah tua di atas permukaan media. Sedangkan uji indol negatif bila tidak terbentuk warna merah tua.

e. Uji Reduksi Nitrat

Isolat bakteri pada media nutrisi agar miring diinokulasikan pada 10 ml medium untuk uji reduksi nitrat dan diinkubasikan pada

suhu kamar selama 72 jam. Kemudian dituangkan 1 ml asam sulfanilat dan alfa-naftilamin pada kultur tersebut dan digojog.

Reduksi nitrat oleh isolat bakteri ditandai dengan terbentuknya warna merah pada kultur tersebut.

f. Uji Methyl-Red

Isolat bakteri pada media nutrien agar miring, diambil 1 ose biakan tersebut kemudian dinokulasikan ke dalam media MRVP dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Dengan menggunakan pipet ditambahkan 5 tetes pereaksi methyl-red dan dikocok.

Uji dikatakan positif bila menunjukkan warna merah dan uji dikatakan negatif bila menunjukkan warna kuning.

g. Uji Voges Proskauer

Isolat bakteri pada media nutrien agar miring, diinokulasikan ke dalam media MRVP. Lalu diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam, kemudian dengan menggunakan pipet diambil beberapa tetes pereaksi VP, lalu ditambahkan ke dalam biakan media MRVP tersebut. Dikocok dan didiamkan selama 10 menit. Uji dikatakan positif bila reaksi menunjukkan warna merah muda sampai merah. Sedangkan uji dikatakan

negatif tidak terjadi perubahan warna.

h. Uji Sitrat

Isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media nutrien agar miring, diambil 1 ose kemudian diinokulasikan ke dalam media sitrat, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji dikatakan positif bila menunjukkan warna biru dan dikatakan negatif bila menunjukkan warna hijau.

i. Uji Pertumbuhan Anaerobik

Isolat bakteri umur 48 jam dinokulasikan pada 10 ml medium tripton-agar secara tusukan dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Kemampuan tumbuh isolat bakteri secara anaerobik bisa dilihat dengan tumbuhnya koloni bakteri pada bagian tengah dan dasar medium.

2. Uji Morfologis

Uji morfologis dilakukan dengan cara pengamatan morfologi koloni bakteri dan pengecatan Gram, dengan prosedur sebagai berikut.

Pengamatan morfologi koloni bakteri dengan mengambil 1 ose isolat bakteri yang telah disuspensikan dengan akuades steril sebanyak 10 ml pada media pertumbuhan media nutrien agar miring dan ditumbuhkan kembali pada nutrien agar secara taburan. Diinkubasikan selama 24 jam pada suhu

37°C. Koloni bakteri yang tumbuh diamati bentuk dan sifat morfologinya. Selanjutnya dari isolat bakteri yang telah disuspensikan dibuat preparat pengecatan Gram, yaitu :

- a. diambil 1 ose isolat bakteri yang telah disuspensikan pada media pertumbuhan bakteri nutrien agar miring;
- b. dibuat hapusan pada gelas benda steril dan dibiarkan kering;
- c. hapusan isolat bakteri difiksasi dengan cara di panaskan di atas api bunsen;
- d. ditetesi dengan Gram A dan dibiarkan selama 2-3 menit, lalu dicuci dan dikeringanginkan;
- e. ditetesi dengan Gram B dan dibiarkan selama 2-3 menit, lalu dicuci dan dikeringanginkan;
- f. ditetesi dengan Gram C dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dan dikeringanginkan;
- g. ditetesi dengan Gram D dan dibiarkan selama 2-3 menit, lalu dicuci dan dikeringanginkan.

III.2 Kolonisasi Larva Uji

Larva uji yang digunakan adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III yang sudah dikolonisasi di laboratorium.

Bahan utama yang digunakan untuk kolonisasi nyamuk adalah :

1. madu (Royal Jelly), untuk makanan nyamuk;
2. larutan gula (Sukrosa) 10%, untuk makanan nyamuk;
3. marmot, sumber makanan darah untuk nyamuk;
4. pelet pakan lele 521, untuk makanan larva;
5. air PAM, untuk media penetasan telur, kolonisasi larva dan pupa;

Alat utama yang digunakan untuk kolonisasi nyamuk adalah :

1. sangkar nyamuk, ukuran 30x30x30 cm, untuk pemeliharaan nyamuk;
2. aspirator, untuk pemindahan nyamuk;
3. loyang plastik ukuran 30x20x6 cm, untuk pemeliharaan larva dan pupa;
4. pipet, untuk pemindahan larva dan pupa;
5. kertas saring, untuk koleksi telur;
6. cangkir plastik dan kapas, untuk tempat makanan nyamuk;
7. cangkir plastik, untuk tempat pupa;
8. sangkar kayu, ukuran 40x40x80 cm, untuk pemeliharaan nyamuk;
9. gelas dicat hitam, untuk koleksi telur;
10. sangkar kawat, ukuran 20x10x5 cm, untuk fiksasi marmot pada saat digigit nyamuk.

Cara kerja kolonisasi nyamuk *A. aegypti* dilakukan menurut petunjuk Limsuwan et al. (1987) dan Mardihusodo (1988). Urutan kerja kolonisasi nyamuk *Aedes*

aegypti dikelompokkan menjadi 4 tahap, yaitu tahap koleksi telur, pemeliharaan larva, pemeliharaan pupa dan pemeliharaan nyamuk.

Koleksi telur dilakukan dengan cara kerja sebagai berikut.

1. Gelas hitam diisi air sampai permukaan air kurang lebih 3 cm dari bibir atas gelas.
2. Kertas saring, ukuran 3x18 cm diletakkan secara melingkar di atas permukaan air pada dinding bagian dalam gelas bercat hitam.
3. Gelas tersebut diletakkan di dalam sangkar nyamuk yang sebelumnya nyamuk-nyamuk tersebut sudah diberi makanan darah marmot 3-4 hari sebelumnya, dan gelas dibiarkan 4-6 hari.
4. Gelas diambil dari dalam sangkar nyamuk, dibuang kelebihan air dan dibiarkan kertas saring yang sudah mengandung telur di dalam gelas selama 24 jam.
5. Kertas saring diambil dari dalam gelas dan dikeringkan pada suhu kamar.
6. Telur pada kertas saring yang sudah kering disimpan di dalam wadah plastik dan ditutup rapat-rapat.

Pemeliharaan larva dilakukan dengan cara kerja sebagai berikut.

1. Telur pada kertas saring diambil dari tempat

penyimpanan, ditetaskan pada loyang plastik yang sudah diisi 2 liter air PAM.

2. Menyiapkan loyang-loyang plastik yang sudah diisi dengan 2 liter air PAM.
3. Memindahkan 400-500 larva yang baru menetas dari hasil penetasan telur ke dalam loyang-loyang plastik dengan pipet.
4. Ditambahkan 4 butir makanan larva pada bagian pojok loyang, dan diulangi setiap 2 hari sampai menjadi pupa.
5. Menghilangkan lapisan lemak yang terbentuk pada permukaan air dalam loyang dengan selembur kertas saring setiap 2 hari sebelum pemberian makanan larva.

Pemeliharaan pupa dilakukan dengan cara kerja sebagai berikut.

1. Pupa yang terbentuk dari hasil pemeliharaan larva diambil satu-persatu dengan pipet dan dipindahkan ke dalam cangkir-cangkir plastik yang berisi air PAM.
2. Cangkir-cangkir plastik dengan jumlah kurang lebih 400 pupa diletakkan di dalam sangkar nyamuk dan dibiarkan 2-3 hari.
3. Cangkir-cangkir plastik tersebut diambil dari dalam sangkar jika semua pupa sudah menjadi nyamuk.

Pemeliharaan nyamuk dilakukan dengan cara kerja sebagai berikut.

1. Nyamuk *A aegypti* dari hasil pemeliharaan pupa diberi makan dengan 10% larutan gula dan madu pada kapas yang diletakkan di cangkir-cangkir plastik dan makanan tersebut diganti setiap 3 hari.
2. Setelah 6-7 hari nyamuk diberi makanan darah dengan jalan memasukkan marmot yang sudah difiksasi ke dalam sangkar nyamuk dan dibiarkan 3-4 jam.
3. Setelah diberi makanan darah, 3-4 hari berikutnya dilakukan koleksi telur.

Pekerjaan kolonisasi nyamuk dilakukan secara rutin selama penelitian berlangsung.

III.3 Uji Hayati

Uji hayati dilakukan untuk menentukan dosis kematian (LD_{50} , LD_{90}) dan waktu kematian (LT_{50} , LT_{90}).

Bahan utama untuk uji hayati adalah entomopatogen yang akan diteliti sensitivitas larvasidalnya, larva uji dan air awaion. Entomopatogen yang ditemukan dan dipakai adalah *Bacillus thuringiensis* dan larva uji yang dipakai adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III.

Alat utama yang digunakan untuk uji hayati adalah

sebagai berikut.

1. Tabung reaksi ukuran 25 ml, untuk tempat homogenisasi entomopatogen.
2. Bola-bola getar diameter 6 mm, untuk homogenisasi entomopatogen.
3. Vortex mixer, untuk homogenisasi entomopatogen.
4. Cangkir plastik ukuran 250 ml, untuk tempat uji hayati.
5. Mikropipet ukuran 1-10 ml, untuk mengukur konsentrasi entomopatogen.
6. Mikropipet ukuran 5-200 ml untuk mengukur konsentrasi entomopatogen.

Cara kerja uji hayati untuk penentuan LD_{50} dan LD_{90} dilakukan menurut petunjuk dari Institut Pasteur Paris (Anonim, 1988). Urutan cara kerja sebagai berikut.

Isolat bakteri yang dapat membunuh larva nyamuk uji lebih dari 50 % diisolasi kembali dari larva uji yang mati. Larva nyamuk tersebut dikumpulkan dan digerus, kemudian disuspensikan ke dalam 5 ml garam fisiologis. Bagian atas suspensi dipisahkan dan dipanaskan pada suhu $70^{\circ}C$ selama 30 menit, kemudian diencerkan hingga 10 kalinya. Diambil 1 ml suspensi tersebut untuk diinokulasikan pada medium nutrien agar secara

taburan dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 48 jam, dengan maksud untuk melihat keseragaman bentuk koloni bakteri. Untuk melihat kemurnian kultur juga dilakukan pengamatan mikroskopis. Kultur diunduh dan dipelihara lagi pada 100 ml medium minimal yang mengandung ekstrak larva nyamuk. Setelah berumur 96 jam, 10 ml kultur diunduh dengan cara disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Endapan dicuci dengan garam fisiologis 0,85% sebanyak 3 kali. Endapan yang telah dicuci kemudian disuspensikan ke dalam garam fisiologis dalam beberapa tingkat konsentrasi dan diujikan pada larva nyamuk *Aedes aegypti*. Penghitungan jumlah bakteri pada tiap-tiap tingkat konsentrasi dihitung secara langsung dengan alat haemocytometer dan pengamatan gejala-gejala kematian larva uji dilakukan pada hari pertama dan kedua inkubasi. Selanjutnya jumlah mortalitas larva uji selama 48 jam dianalisis dengan metode "Probit Analysis" untuk menentukan nilai LD_{50} , LD_{90} , LT_{50} , LT_{90} .

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penggunaan insektisida terbukti menimbulkan dampak yang buruk yaitu, mengakibatkan terjadinya resistensi hama dan vektor penyakit, membunuh serangga non sasaran serta menurunkan kualitas lingkungan (Soedarto, 1992). Sehingga dewasa ini mulai dikembangkan penggunaan bioinsektisida untuk pengendalian hama dan vektor penyakit.

Salah satu agen hayati yang mendapatkan prioritas pertama untuk dikembangkan sebagai bioinsektisida pengendali hayati adalah marga *Bacillus* yang bersifat entomopatogenik. Beberapa jenis bakteri dari marga *Bacillus* yang telah dinyatakan bersifat patogen terhadap berbagai jenis serangga adalah *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus larvae*, *Bacillus thuringiensis* dan *Bacillus sphaericus* (Stahly et al., 1990). Marga *Bacillus* yang bersifat entomopatogenik terbukti efektif untuk memberantas hama dan vektor penyakit karena jenis-jenis bakteri tersebut mampu membentuk toksin. Toksin yang dihasilkan oleh setiap jenis bakteri berbeda-beda dan mempunyai sifat yang spesifik. Jenis-jenis bakteri *Bacillus* yang bersifat entomopatogenik banyak ditemukan di tanah karena tanah merupakan habitat asli dari berbagai jenis bakteri yang bersifat patogen terhadap hama dan vektor penyakit.

Penelitian mengenai usaha mengisolasi bakteri tanah entomopatogenik jenis *Bacillus thuringiensis*, pengambilan sampel tanah dilakukan di kawasan Taman Nasional Baluran, Banyu-

wangi Jawa Timur, pada bagian tengah kolam bekas sumber mata air yang telah mengering. Hal ini bertujuan sampel tanah yang akan diisolasi bakteri jenis *Bacillus thuringiensis* belum banyak mengalami pencemaran.

Dari pengambilan sampel tanah di lingkungan Taman Nasional Baluran, Banyuwangi Jawa Timur pada bagian tengah kolam bekas sumber mata air yang telah mengering, melalui pengamatan sifat morfologis tiap-tiap koloni bakteri yang ditumbuhkan secara taburan pada media nutrien agar, diperoleh 15 isolat bakteri yang mampu membentuk spora. Menurut Gordon et al. (1973), mengisolasi jenis-jenis bakteri anggota marga *Bacillus* dari tanah dilakukan dengan memanaskan suspensi tanah pada suhu sekitar 65°C hingga 80°C selama kira-kira 30 menit dengan maksud untuk memacu pertumbuhan endospora, sedangkan sel-sel vegetatif bakteri lain yang tidak tahan panas dan tidak mampu membentuk endospora akan mati. Kultur diinkubasikan di atas shaker dengan tujuan untuk memberikan aerasi sehingga bakteri pembentuk spora yang bersifat anaerobik, yaitu *Clostridium* sp tidak dapat tumbuh. Jenis-jenis bakteri anggota marga *Bacillus* juga sering diisolasi dengan menggunakan medium nutrien agar. Pada penelitian ini, cara isolasi bakteri tanah yang mempunyai sifat entomopatogenik melalui teknik kultur diperkaya dengan menggunakan medium minimal yang mengandung ekstrak larva nyamuk, pemanasan 70°C selama 30 menit dan inkubasi kultur di atas shaker dengan kecepatan 80 rpm. Metode ini merupakan cara yang selektif untuk memperoleh jenis-jenis bakteri tanah yang

diduga mampu membunuh jenis-jenis serangga. Berdasarkan jumlah isolat yang diperoleh melalui cara tersebut, menunjukkan bahwa keanekaragaman bakteri tanah yang mampu membentuk spora cukup tinggi dan jumlahnya melimpah.

Setelah melalui uji pendahuluan dari 15 isolat bakteri yang mampu membentuk spora terdapat 1 isolat bakteri tanah mempunyai kemampuan entomopatogen atau daya bunuh terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*. Isolat bakteri tanah yang mempunyai kemampuan entomopatogen atau daya bunuh terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*, kemudian diuji secara morfologis dan fisiologis untuk mengidentifikasi jenis bakteri entomopatogenik yang terbukti mempunyai sifat dapat membunuh larva nyamuk *A. aegypti*. Hasil pengujian fisiologis dan morfologis menghasilkan data sebagai berikut.

Tabel 1. Hasil pengujian fisiologi dan morfologi dari isolat *Bacillus thuringiensis*.

No.	Macam Pengujian	Hasil pengujian
1.	Uji fermentasi gula-gula :	
	a. Arabinosa	Gas - Asam -
	b. Glukosa	Gas - Asam +
	c. Sukrosa	Gas - Asam -
	d. Mannitol	Gas + Asam -

e. Sukrosa	Gas	+
	Asam	+
2. Uji Hidrolisis Pati		+
3. Uji Indole		-
4. Uji Katalase		+
5. Uji Reduksi Nitrat		+
6. Uji Methyl-Red		-
7. Uji Voges-Proskauer		+
8. Uji Sitrat		-
9. Uji Pertumbuhan Anaerobik		+
10. Uji Morfologis	Bentuk batang	
	Gram positif	

Selanjutnya deskripsi secara menyeluruh dari isolat bakteri tanah yang ditemukan mempunyai sifat entomopatogen adalah sebagai berikut: bentuk koloni bulat, elevasi menyerupai tombol, bagian tepi rata dan struktur dalam opaque, diameter koloni 2-3 mm; sel berbentuk batang, bersifat sifat gram positif, sifat bakteri aerobik fakultatif; spora elipsoid, subterminal dan memiliki kristal parasporal body; menunjukkan reaksi positif pada pengujian pati, reaksi nitrat, reaksi katalase; uji voges-proskauer; membentuk gas hidrogen sulfida, pembentukan gas dari fermentasi mannitol dan sukrosa, pembentukan asam pada fermentasi glukosa dan sukrosa menunjukkan reaksi negatif pada pengujian indole, reduksi methyl-red, sitrat, pembentukan gas pada fermentasi glukosa, laktosa dan arabinosa, pembentukan asam pada fermentasi laktosa, arabinosa dan mannitol; mempunyai sifat patogen terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*. Menurut "Bergeys

"Manual of Descriptive Bacteriology" dari ciri tersebut isolat bakteri yang ditemukan mempunyai sifat-sifat yang dipunyai oleh jenis bakteri *Bacillus thuringiensis* (Gambar 1, Halaman 45).

Hasil pengujian aktivitas biolarvasida isolat *Bacillus thuringiensis* hasil isolasi dari tanah terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* terbukti mampu membunuh lebih dari 50 % larva nyamuk *A. aegypti* dan dapat diisolasi kembali dari larva uji yang terinfeksi serta dapat dikulturkan kembali. Kemurnian kultur dapat dilihat pada keseragaman bentuk-bentuk koloni bakteri pada medium nutrisi agar dan melalui pengamatan bentuk sel bakteri secara mikroskopis.

Melalui analisis probit untuk menentukan nilai lethal dose dan lethal time isolat *Bacillus thuringiensis* terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* didapat data sebagai berikut:

Tabel 2. Nilai dosis kematian dan waktu kematian isolat

Bacillus thuringiensis terhadap larva instar III *Aedes aegypti*.

Nilai dosis kematian dan waktu kematian	<i>Bacillus thuringiensis</i>
LD ₅₀ (95% CL) spora/ml (10^5)	5,834 x 10^5 spora/ml (2,705 x 10^5 - 12,584 x 10^5)
LD ₉₀ (95% CL) spora/ml (10^5)	99,342 x 10^5 spora/ml (26,223 x 10^5 - 376,351 x 10^5)
LT ₅₀ (95% CL) (jam)	3,158 jam (2,073 - 3,690 jam)

LT ₉₀ (95% CL) (jam)	4,449 jam (4,248 - 6,424 jam)
LD : Lethal Dose CL : Confidence Limits (Lamp., LT : Lethal Time Tabel 3 & 4, Hal: 44)	

Dari data nilai dosis kematian dan waktu kematian di atas menunjukkan isolat *B. thuringiensis* hasil isolasi dari tanah kolam bekas sumber mata air yang telah mengering di kawasan Taman Nasional Baluran, Banyuwangi Jawa Timur, mempunyai daya patogenitas terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III. Pada dosis $5,839 \times 10^5$ spora/ml telah dapat membunuh 50 % dari 20 larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III dan dapat membunuh 90 % larva uji pada dosis $99,342 \times 10^5$. Sedang waktu yang dibutuhkan untuk dapat untuk dapat membunuh 50 % dari 20 larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III adalah 3,158 jam dan 4,449 jam isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* dapat membunuh 90 % larva uji.

Kemampuan entomopatogenik dari isolat *Bacillus thuringiensis* disebabkan oleh bakteri tersebut mampu membentuk toksin yang disebut dengan *delta toksin* atau *parasporal body*. Toksin tersebut berdaya racun ganas terhadap serangga dari bangsa Diptera. Bahan toksin tersebut setelah tertelan oleh larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III akan terhidrolisis karena aktivitas dari usus larva tersebut. Hidrolisis toksin di usus terjadi pada kondisi basa, dengan pH sekitar 10 hingga 12. Selanjutnya racun yang terhidrolisis terikat oleh reseptor khusus pada epithelium dinding usus dari larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III, sehingga dinding usus kehilangan permeabi-

litasnya yang mengakibatkan usus terjadi perlobangan dan akhirnya mengalami paralisis. Bersamaan dengan terjadinya paralisis dinding usus, spora bakteri mengalami perkecambahan menjadi sel vegetatif dan berlipat ganda jumlahnya. Sel-sel vegetatif segera memasuki peredaran darah larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III melalui dinding usus yang telah mengalami paralisis. Penyebaran bakteri ke dalam sistem peredaran darah menyebabkan kenaikan pH darah dan akan terjadi septisemia. Oleh karena berbagai kerusakan bagian tubuh tersebut maka dalam beberapa jam kemudian larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III akan mati. Kematian larva nyamuk tersebut didahului dengan tanda-tanda malas bergerak, aktivitas makan berkurang, cenderung berkumpul di permukaan dan tubuh larva nyamuk tampak putih pucat.

Selain delta toksin ternyata *Bacillus thuringiensis* juga menghasilkan toksin yang lain yaitu, alfa eksotoksin yang berupa fosfolipase C yang dapat menghancurkan fosfolipida esensial dalam jaringan tubuh larva nyamuk *Aedes Aegypti*; beta eksotoksin yang merupakan molekul-molekul yang mudah larut tetapi tahan panas, dapat mengalami dialisis dan bersifat toksik terhadap larva nyamuk uji; gamma eksotoksin, merupakan fosfolipase yang belum teridentifikasi dan diduga berfungsi untuk membebaskan asam-asam lemak.

Pembentukan kristal-kristal toksin oleh isolat *Bacillus thuringiensis* bersamaan dengan berjalannya proses sporulasi untuk membentuk endospora bakteri tersebut dan endospora akan terlepas dari sporangium jika endospora mengalami

perkecambahan. Pembentukan endospora serta kristal-kristal toksin terjadi karena isolat *Bacillus thuringiensis* ditumbuhkan pada medium minimal tanpa glukosa yang jumlah kandungan nutriennya terbatas sehingga cenderung kekurangan nutrisi terutama sumber karbon dan nitrogen. Hal ini disebabkan fase endospora bukan merupakan fase perkembangbiakan melainkan hanya merupakan fase untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan.

Selanjutnya dari persamaan garis hubungan antara mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti* dengan log konsentrasi-probit dari isolat *Bacillus thuringiensis* yaitu $Y = 2,095 + 5,816 X$, menggambarkan isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* mempunyai nilai positif dan jumlah larva uji yang mati semakin bertambah seiring dengan penambahan konsentrasi inokulum (Lampiran, Tabel 3, Halaman 44).

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan :

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil isolasi bakteri tanah yang diambil dari Taman Nasional Baluran, Banyuwangi Jawa Timur dapat diisolasi 15 isolat bakteri yang mampu membentuk spora dan satu di antaranya mempunyai kemampuan entomopatogen terhadap larva uji dari nyamuk *Aedes Aegypti*, teridentifikasi sebagai *Bacillus thuringiensis*.
2. Aktivitas biolarvasida isolat bakteri entomopatogenik jenis *Bacillus thuringiensis* terhadap larva nyamuk *Aedes Aegypti* instar III diketahui mampu membunuh lebih dari 50 % selama 24 jam dan diperoleh nilai dosis kematian (LD_{50}) sebesar $5,834 \times 10^5$ spora/ml, (LD_{90}) : $99,342 \times 10^5$ spora/ml serta waktu kematian (LT_{50}) sebesar 3,158 jam, (LT_{90}) : 4,449 jam.

V.2 Saran :

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang mempunyai kemampuan entomopatogen terhadap larva nyamuk, dari jenis *Bacillus thuringiensis* dapat diisolasi dari sampel tanah yang diambil dari kolam bekas sumber mata air

yang telah mengering. Sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai serotipe dari isolat bakteri jenis *Bacillus thuringiensis* yang diketemukan melalui uji serologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. Second edition, John Wiley & Sons, New York. 467
- Anonim. 1979. Microbial Processes: Promising Technologies for Developing Countries, Rep. Ad Hoc Panel of Adv. Commit. Technol. Innov. Bostid. Commision on International Relations NRC, National Academy of Sciences, Washington D.C. 196.
- Anonim. 1990. Survy Entomologi Demam Berdarah Dengue. Dit. Jen. PPM dan PLP, Dep. Kes. RI, Jakarta.
- Anonim. 1991. Biological Control of Vectors. UNDP/World Bank WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases, WHO, Jenewa.
- Bates, M. 1949. The Natural History of Mosquitoes. First edition The Macmillan Company, New York. 577.
- Brown, H.W. 1978. Dasar Parasitologi Klinis, terjemahan Bintari Rukmono dkk. Edisi ketiga, PT Gramedia, Jakarta. 535.
- Brown, A.W.A. dan R. Pal. 1971. Insecticide Resistance to Arthropods. WHO, Geneva.
- Edmonds, P. 1978. Microbiology: An Environmental Perspective. First edition, The Macmillan Publishing C.O. INC., New York. 370.
- Flint, M.L. dan V.D. Bosch. 1990. Pengendalian Hama Terpadu, Sebuah Pengantar Program Nasional Pengendalian Hama Terpadu. Penerbit Kanisius, Jakarta.
- Frobisher, M. 1962. Fundamentals of Microbiology. Seventh edition, W.B. Saunders Company, London. 617.
- Green, M.B., G.S. Hartley and T.F. West, 1979. Chemicals for Crop Protection and Pest Control, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris and Frankfurt.
- Gordon, R.E., Haynes, W.C. and Nay-Pang, C.H. 1973. The Genus *Bacillus*. United States Department of Agriculture, Washington D.C. 126.
- Hadioetomo, R.S. 1985. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek. PT Gramedia, Jakarta. 126.

- Marincowitz, C. 1964. Mosquito-Borne Diseases in South-east Asia Mosq. Borne. Dis. Bull. 1(1): 1-11.
- Neupel, A.H. and Angus, T.A. 1963. Disease Caused by Certain Sporeforming Bacteria In Steinhaus, E.A. (ed.) Insect Pathology An Edvanded Treatise, Academic Press, London.
- Huffaker, C.B. dan P.H. Messenger. 1989. Teori dan Praktek Pengendalian Biologis, diterjemahkan S. Mangoen-dihardjo, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- James, M.T. and R.F. Harwood. 1969. Herms's Medical Entomology. Sixth Edition, The Macmillan Company, USA.
- Knipling, E.F. 1979. The Basic Principle of Insect Population Suppression and Management U.S.D.A. Agric. Handbook No. 512.
- Maurice, J.R. and Pearce, M.H. 1987. Tropical Disease Research. WHO, Geneva. 98.
- Norris, J.R. and Richmond, M.H. 1981. Essays in Applied Microbiology. John Wiley & Sons Ltd., Toronto. 155.
- Poinar, J.R. and Thomas, G.M. 1982. Diagnostic Manual for The Identification of Insect Pathogens. Plenum Press, New York. 184.
- Quarishi, M.S. 1977. Biochemical Insect Control. John Wiley & Sons INC., Toronto. 280.
- Sastroutomo, S.S. 1992. Pestisida Dasar-Dasar dan Dampak Penggunaannya, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Singleton, P. and Sainsbury, D. 1981. Introduction to Bacteria. John Wiley & Sons, Toronto. 167.
- Sill, M.H. 1982. Plant Protection An Integreted Inter Disiplinary Approach. The IOWA State Univ. Press, Ames, IOWA.
- Situmorang, J. 1985. Mortalitas Larva Nyamuk dengan Perlakuan Isolat-Isolat *Bacillus thuringiensis* Berliner dari Nyamuk Terinfeksi dan Streak Langsung *Bacillus thuringiensis* H-14. Laporan penelitian, Lembaga Penelitian UGM, Yogyakarta. 270-275.
- Situmorang, J., Yuwono, S., Romas, M. and Ibnu Hajar, M. 1989. Isolation of *Bacillus sphaericus* and Related form Pathogenic to *Culex quinquefasciatus*

- Say. Bul. Penelitian Kesehatan. 17(2): 270-275.
- Soedarto. 1992. Entomologi Kedokteran. Cetakan Pertama, Penerbit EGC, Jakarta.
- Stahly, D.P., Andrew, R.E. and Yousten, A.A. 1990. The Genus *Bacillus*: Insect Pathogen. Unpublished. 144.
- Steinhaus, E.A. 1963. Insect Microbiology. Comstock Publishing Company, Inc., New York. 763.
- Timotius, K.H. 1978. Mikrobiologi Dasar. Edisi Percobaan, Fakultas Ilmu Hayat, UKSW, Salatiga. 283.
- Yousten, A.A. 1984. *Bacillus sphaericus*: Microbiological Factors Related to Its Potential as Mosquito Larvacide. *Advanc. Biotechnol. Processes* 3:315-343.

Tabel 3. Hasil analisis probit dari aktifitas entomopatogen *Bacillus thuringiensis* untuk menentukan LD₅₀ dan LD₉₀

PROBIT ANALYSIS

THE INSECT : *Larva Aedes aegypti*
 THE INSECTICIDE : *Bacillus thuringiensis*
 REPLICATION NUMBER : 3
 THE HOURS AFTER EXPOSURE : 24
 DOSAGES = 420 22 1.1 .55 .028 (10⁵)
 spora/ml

SLOPE OF LINE (B)= 1.041087 , INTERSEPT(A)= 4.202543
 HETEROGENETY INSIGNIFICANT,CHI SQUARE= 6.425282
 DEGREES OF FREEDON= 3 - Y= 4,202 + 1,041

VARIANCE= 5.825124E-02
 X= .1 LDX= .3426363
 95% LIMITS= .1152874 AND 1.018322

VARIANCE= 2.900894E-02
 X= .5 LDX= 5.834248
 95% LIMITS= 2.704939 AND 12.58381

VARIANCE= 8.710246E-02
 X= .9 LDX= 29.34271
 95% LIMITS= 26.32278 AND 376.351

Tabel 4. Hasil analisis probit dari aktifitas entomopatogen *Bacillus thuringiensis* untuk menentukan LT₅₀ dan LT₉₀

PROBIT ANALYSIS

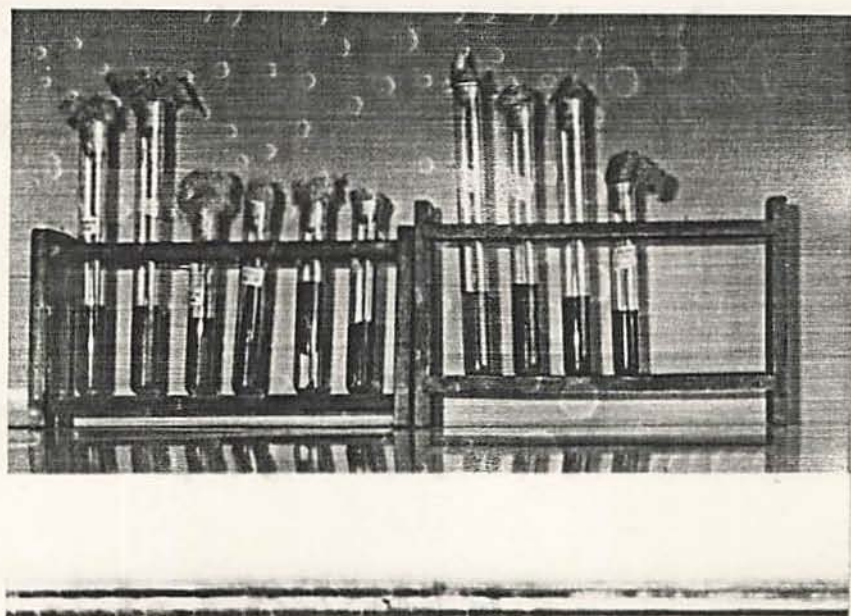
THE INSECT : *Larva Aedes aegypti*
 THE INSECTICIDE : *Bacillus thuringiensis*
 REPLICATION NUMBER : 3
 THE HOURS AFTER EXPOSURE : 24
 TIME = 7 6 5 4 3 2 1

SLOPE OF LINE (B)= 5.81579 , INTERSEPT(A)= 2.095163
 HETEROGENETY SIG AT LEAST AT 5
 CHI SQ= 24.47295 CHI SQ TABLE= 11.07 DF= 5

VARIANCE= 4.016815E-03
 X= .1 LDX= 1.901451
 95% LIMITS= 1.428445 AND 2.531085

VARIANCE= 1.187901E-03
 X= .5 LDX= 5.138452
 95% LIMITS= 2.703466 AND 3.690009

VARIANCE= 2.01441E-03
 X= .7 LDX= 5.246422
 95% LIMITS= 4.284441 AND 6.424395



Gambar 1. Pengujian fisiologis isolat *Bacillus thuringiensis*