

Karakterisasi Bakteri *Bacillus thuringiensis* asal Hutan Lindung Kampus Uncen Jayapura, serta Deteksi Toksisitasnya terhadap Larva Nyamuk *Anopheles*

DANIEL LANTANG* DAN DIRK Y. RUNTUBOI
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih, Jayapura-Papua

Diterima: tanggal 1 Januari 2012 - Disetujui: tanggal 2 April 2012
© 2012 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

ABSTRACT

Study of isolate characterization of *Bacillus thuringiensis* Berliner collected from soil was done at UNCEN Campus. The aims of the study were to explore the local isolate of *B. thuringiensis* and to study the toxicity of the isolates on larvae of *Anopheles* as a vector of malaria and filariasis diseases in Papua. Data was analyzed by Hadioetomo & Rusmana method (1977). The results showed that 383 colonies are relatively closed to *B. thuringiensis* whereas 290 of them are indicated as local isolates of *B. thuringiensis*. Based on toxicity detection on larvae of *Anopheles* found that 19 isolates have toxicities levels 50% or more. Among the 19 isolates 3 of them has 80%, 85% and 90% toxicity levels separately.

Key words: Characterization, local isolate, *B. thuringiensis*, toxicity, and soil.

PENDAHULUAN

Pengendalian biologi dapat dilakukan dengan memanfaatkan organisme hidup dalam mengendalikan hama atau vektor penyakit pada tanaman, hewan dan manusia (Gama *et al.*, 2010). Organisme yang telah digunakan untuk pengendalian biologi adalah meliputi virus, jamur dan bakteri (Huffaker & Messenger, 1989; Hadioetomo & Rusmana, 1996).

Huffaker & Messenger (1989) mengungkapkan bahwa istilah pengendalian biologi pertama kali digunakan oleh Smith pada tahun 1919, yang bertujuan untuk menunjukkan pentingnya penggunaan berbagai musuh alami sebagai pengendali terhadap hama sebagai vektor penyakit pada

tanaman. Pengendalian biologi merupakan pengaturan populasi vektor oleh beberapa musuhnya di alam, antara lain pemangsa dan parasit, seperti cacing, jamur, bakteri dan virus. Debach (1974) dan Mangoendihardjo (1989) mengungkapkan pula bahwa pengendalian biologi dapat dilakukan dengan cara menyebarkan di tempat perkembangbiakan vektor, sehingga dapat menurunkan populasi vektor dan di samping itu dampak terhadap lingkungan dapat diperkecil.

Salah satu organisme yang sedang dikembangkan penggunaannya sebagai pengendali biologi adalah bakteri *Bacillus*. Huffaker & Messenger (1989) mengatakan bahwa strain-strain bakteri dari marga *Bacillus* yang bersifat patogen dapat dimanfaatkan dalam mengendalikan larva nyamuk *C. quinquefasciatus*, dan menurut Rukmono (1991) dan Gama *et al* (2010) salah satunya adalah *Bacillus thuringiensis* yang dimanfaatkan sebagai pengendali nyamuk secara alami.

*Alamat Korespondensi:
Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Cenderawasih,
Jayapura. Jln. Kamp Wolker, Waena, Jayapura.
Telp.: +62 967-573166/572115.
e-mail: d_lantang@yahoo.co.id

Bakteri ini merupakan mikroorganisme bersifat patogen terhadap insekta dari Ordo Lepidoptera, Coleoptera dan Diptera. Selain itu, tidak dapat menyebabkan penyakit pada vertebrata termasuk manusia.

B. thuringiensis terdapat di alam dan dapat dijumpai diberbagai macam habitat, seperti tanah, air dan lumpur (Krieg, 1961). *B. thuringiensis* merupakan bakteri entomopatogen, maka bakteri ini paling umum digunakan sebagai pelaku biokontrol dalam mengendalikan serangan hama oleh serangga (Rukmono, 1991). Bioinsektisida berbahan aktif *Bt* (*B. thuringiensis*) pertama kali dipublikasikan oleh Berliner pada tahun 1911, sedangkan di Indonesia dikenal sebagai bioinsektisida oleh petani pada tahun 1970-an (Salamun, 1993; Permatasari, 1998; Oktavina, 1999).

Beberapa penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Nadrawati *et al.* (1994) menemukan 45 isolat *B. thuringiensis* dari beberapa lokasi di Daerah Istimewa Yogyakarta. Empat (4) isolat diantaranya dapat menyebabkan mortalitas lebih dari 50% pada ulat *Litura*. Hadioetomo & Rusmana (1996) telah mengisolasi *B. thuringiensis* dari berbagai daerah di Sulawesi Selatan dan Jawa Barat, menemukan isolat dari peternakan sutera di Sulawesi Selatan yang patogenitasnya paling tinggi terhadap larva *Crocoidolomia binotalis*. Blondine *et al.* (2004), mengisolasi *B. thuringiensis* pada habitat tanah di Salatiga dan menemukan 12 isolat, satu isolat diantaranya mempunyai toksisitas yang tinggi terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*.

B. thuringiensis merupakan bakteri yang keberadaannya secara alamiah pada habitat tanah yang kaya akan bahan organik sebagai substrat yang baik sebagai media tumbuh di alam. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian karakterisasi *Bacillus thuringiensis* di Hutan Lindung Kampus Universitas Cenderawasih (Uncen) Waena serta mengetahui toksisitasnya terhadap larva nyamuk Anopheles sebagai vektor utama penyakit malaria dan filariasis di Papua. Kedepan, isolat yang diperoleh dapat dikembangkan sebagai agen pengendali biologi khususnya terhadap larva nyamuk Anopheles sebagai vektor utama malaria yang

diketahui endemik di Papua. Demikian pula dengan pengembangan pengendali biologi terhadap filariasis.

METODE PENELITIAN

Waktu dan tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 10 bulan, sampel tanah diperoleh beberapa habitat tanah Hutan Lindung Kampus Uncen Waena, Jayapura. Sampel tanah yang diambil adalah yang kaya serasah sebanyak 100 gram setiap titik sampel. Penelitian isolasi, karakterisasi dan deteksi toksisitas dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Cenderawasih, Jayapura.

Isolasi Bakteri *Bacillus thuringiensis*

Sampel tanah yang diambil merupakan bagian dari tanah yang banyak mengandung serasah. Pengambilan sampel dilakukan pada 20 titik lokasi yang dipilih secara acak (Tabel 1)(Lantang, 2005). Setiap titik pengambilan sampel diambil masing-masing 100 gram, selanjutnya ditimbang 1 gram dan dimasukkan ke dalam 10 ml tabung reaksi, dipanaskan dalam pemanas air dengan suhu 75°C selama 10 menit. Selanjutnya 0,5 ml diinokulasikan dengan metode taburan ke dalam media *endo agar* dan diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan identifikasi koloni, koloni yang terpilih adalah warna putih, permukaan tidak rata.

Karakterisasi isolat *Bacillus thuringiensis*

Koloni yang terpilih dikarakterisasi dengan metode pengecatan kristal protein, endospora, dan biokimia. Isolat yang dikarakterisasi dimurnikan ulang pada medium *nutrien agar* sebagai stok biakan murni. Setiap stok biakan murni diambil 1 ose ke dalam 10 ml nutrient Broth selanjutnya dinkubasikan pada *shaker incubator* selama 72 jam dengan kecepatan 100 rpm (Blondine & Widyastuti, 1997; Hadioetomo & Rusmana, 1996; Blondione & Susanti, 2000).

Uji toksisitas

Uji toksisitas dilakukan dengan menginokulasikan 1 ml biakan *B. thuringiensis* ke dalam 200 ml air steril yang berisi 20 ekor larva *Anopheles* instar 3. Toksisitas ditentukan berdasarkan persentase kematian larva setelah 24 jam dengan mengacu pada metode menurut (Munif, 1997; Hadioetomo *et al.*, 1996; Blondine & Widyastuti, 1997; Lantang, 2010).

Analisis Data

Data yang diperoleh yaitu jenis-jenis isolat lokal *B. thuringiensis* serta toksisitasnya terhadap larva nyamuk *Anopheles* dibahas secara deskriptif dan komprehensif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

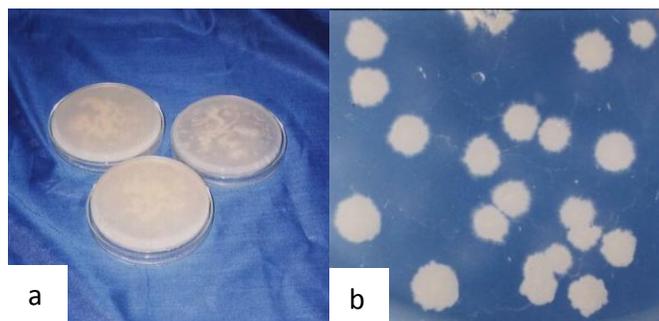
Hasil penelitian diperoleh 383 koloni menunjukkan ciri-ciri koloni kasar, warna putih

Tabel 1. Jumlah isolat *B. thuringiensis* teridentifikasi dari jenis tegakan pohon di Hutan Kampus Uncen Waena, Jayapura.

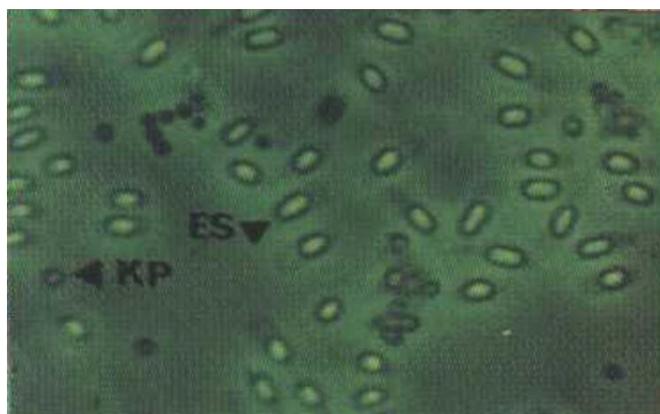
Lokasi	Jenis tegakan pohon	Jumlah sampel	Jumlah isolat
1	<i>Comersonia bartromia</i>	5	5
2	<i>Casuarina</i> dan <i>Callophylum</i> sp	5	15
3	<i>Parinari</i> sp	5	15
4	<i>Callophylum</i> sp	5	15
5	<i>Pranea papuana</i>	5	15
6	<i>Guioa</i> sp	5	15
7	<i>Bagera seratta</i>	5	15
8	<i>Baringtonia</i> sp	5	15
9	<i>Bucanania</i> sp	5	15
10	<i>Callophylum</i> sp	5	15
11	<i>Comersonia</i> sp	5	15
12	<i>Comersonia</i> sp	5	15
13	<i>Casuarina</i> sp	5	15
14	<i>Pranea papuana</i>	5	15
15	<i>Callophylum</i> sp	5	15
16	<i>Callophylum</i> sp	5	15
17	<i>Callophylum</i> sp	5	15
18	<i>Casuarina</i> sp	5	15
19	<i>Bucanania</i>	5	15
20	<i>Comersonia bartromia</i>	5	15
	Jumlah	100	290

seperti lilin, elevasi timbul, bentuk bundar dengan tepian menyebar (Gambar 1). Ciri-ciri koloni tersebut sama dengan yang dikemukakan oleh Krieg (1961), Hadioetomo & Rusmana (1996), Blondine *et al.* (2004), Lantang (2005), dan Nethravathi *et al.* (2010). Ciri tersebut antara lain adalah koloni kasar, berwarna putih atau krem, elevasi timbul, bentuk koloni bundar dengan tepian menyebar merupakan salah satu ciri khas *B. thuringiensis*.

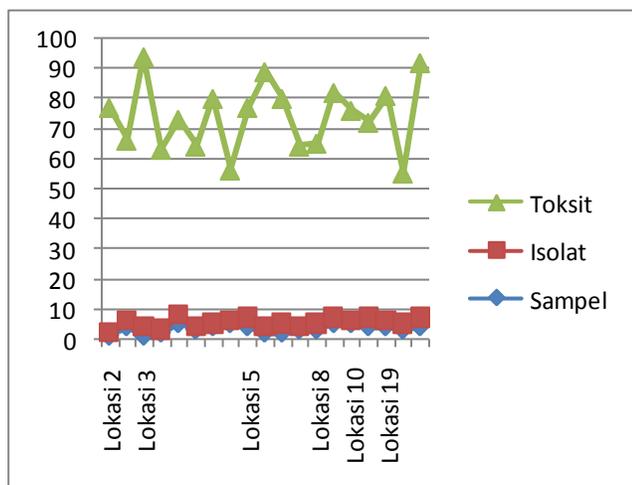
Hasil pengamatan mikroskopik menunjukkan bahwa sel berbentuk batang, gram positif, ramping, endospora letak diujung atau dekat ujung dengan bentuk lonjong. Hal ini sama dengan yang dikemukakan oleh Subiantoro (1997) dan Blondine *et al.* (2004) bahwa *B. thuringiensis* tergolong gram positif, mempunyai sel berbentuk batang, dan spora berbentuk elips dengan lokasi sentral, subterminal atau terminal. Dari 383 koloni yang teridentifikasi yang mirip koloni *B.*



Gambar 1. Koloni Isolat *B. thuringiensis* yang diisolasi dari hutan lindung Kampus Uncen, Jayapura.



Gambar 2. Koloni Sel dan kristal protein *B. thuringiensis* yang diisolasi dari Hutan Lindung Kampus Uncen, Jayapura (ES: sel dan KP: kristal protein).



Gambar 3. Toksistas isolat *B. thuringiensis* yang teridentifikasi di hutan lindung Kampus Uncen Waena, Jayapura.



Gambar 4. Larva nyamuk yang mati akibat toksisitas *B. thuringiensis*.

thuringiensis, terdapat 290 koloni yang teridentifikasi sebagai *B. thuringiensis* dengan ciri spesifik pada permukaan luar endospora terdapat kristal protein yang tampak berwarna lebih gelap dari endospora (Gambar 2).

Jumlah isolat *B. thuringiensis* yang teridentifikasi di setiap titik pengambilan sampel tanah yang berada di bawah berbagai jenis tegakan pohon jumlahnya bervariasi. Dari 290 isolat yang teridentifikasi sebagai bakteri *B. thuringiensis* diantaranya yang mempunyai toksisitas sama dengan atau lebih dari 50% terhadap larva nyamuk Anopheles (Gambar 3; Tabel 2). Isolat tersebut adalah UC3-11: 90%; UC6-22: 85%; dan UC20-43: 85%. Isolat UC3-11 di isolasi dari bawah tegakan pohon *Parinarium* sp., UC6-22 dari bawah tegakan pohon *Guioa* sp., dan

Tabel 2. Tingkat toksisitas isolat *B. thuringiensis* asal Hutan Kampus Uncen Waena, Jayapura.

Lokasi	Sampel	Isolat	Toksik (%)
2	1	UC2-11	75
	4	UC2-42	60
3	1	UC3-11	90
	2	UC3-21	60
	5	UC3-53	65
4	3	UC4-31	60
	4	UC4-41	75
	5	UC4-51	50
5	4	UC5-43	70
6	2	UC6-22	85
	2	UC6-23	75
	3	UC6-31	60
8	3	UC8-32	60
	5	UC8-52	75
10	5	UC10-51	70
11	4	UC11-43	65
19	4	UC19-42	75
20	3	UC20-32	50
	4	UC20-43	85

isolat UC20-43 dari bawah tegakan pohon *Comersonia bartromia*.

Adanya perbedaan toksisitas dapat disebabkan oleh beberapa faktor antara lain pH usus vektor atau target jika pH usus vektor atau target tidak dapat melarutkan kristal protein dalam usus tengah atau lambung vektor, maka kristal protein tersebut tidak bersifat toksit. Perbedaan serotipe sangat menentukan tingkat toksisitas, sebagaimana dilaporkan oleh Munif (1997), Hadioetomo & Rusmana (1997) Blondine & Widyastuti (1997), serta Lantang (2005) dalam penelitian yang telah dilakukan menunjukkan setiap serotipe toksisitasnya pada vektor atau insekta target berbeda-beda. Ukuran kristal protein sangat menentukan konsentrasi toksin yang larut dalam usus tengah serangga. Bila ukuran kristal protein besar, maka konsentrasi kristal protein yang terlarut juga besar.

Larva nyamuk yang mati akibat terinfeksi oleh bakteri *B. thuringiensis* mengalami pembengkakan (Gambar 4), warna hitam kecokelatan, selanjutnya dalam waktu 2-3 hari larva tersebut akan mulai hancur. Hal ini diperkuat dengan pendapat yang disampaikan oleh Blondine &

Widyastuti (1997) dan Munif (1997) yang menemukan bahwa larva yang terinfeksi oleh bakteri *B. thuringiensis* tubuhnya mengalami pembengkakan, dan berwarna hitam kecokelatan serta dalam waktu beberapa hari akan mengalami kehancuran.

Potensi isolat lokal cukup baik terhadap efek jentik nyamuk. Penelitian yang dilakukan oleh Blondine & Widyastuti (1997) mengungkapkan bahwa Isolat *B. thuringiensis* (44TK) mampu membunuh jentik nyamuk *Ae. aegypti instar 3* 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).

Menurut Gama *et al.* (2010) serangga yang peka terhadap bakteri *Bacillus thuringiensis* termasuk mempunyai saluran pencernaan yang bersifat alkali, menghasilkan mineral dan enzim yang dapat menghidrolisis kristal protoksin menjadi toksin. Kerusakan tubuh serangga terutama terjadi pada usus bagian tengah. Tahap awal infeksi terjadi ketika toksin menembus dinding peritrofik, mikrofilik kemudian memisahkan sel-sel kolumnar dan sel goblet, sehingga epitel usus nyamuk rusak dan akhirnya seluruh jaringan usus menjadi rusak. Kemudian *pathogen* tersebut memasuki *hemolimfe* di dalam *hemocoel*, ke sel tabung Malpighi, syaraf, *trachea*, badan lemak dan integumen, akhirnya dapat membunuh inangnya.

Pada penelitian lain dengan sumber isolat *Bacillus sphaericus* 2362 (Spherimos PP) pada skala laboratorium, diketahui bahwa efektivitasnya sangat dipengaruhi oleh *strain* dan jenis nyamuk yang diuji. Beberapa *strain B. sphaericus* dilaporkan menunjukkan patogenisitas tinggi terhadap jenis nyamuk pada kondisi laboratorium maupun lapangan, antara lain terhadap jentik nyamuk *Culex* spp. dan beberapa *Anopheles* spp. Menurut Widyastuti (1997), efikasi dalam formula *powder B. sphaericus* (Spherimos PP) terhadap jentik *Anopheles* spp lebih dari 50% dapat bertahan selama 21 hari pada dosis 0,0 16 ppm dan 35 hari pada dosis 0,08 ppm dan 0,8 ppm.

Santosa & Widyastuti (1996) pernah melakukan penelitian *B. thuringiensis* yang berpengaruh terhadap hama penggerek buah kakao. Dengan demikian, potensi *B. thuringiensis* sebagai bioinsekta perlu dikembangkan secara luas.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa isolasi dan karakterisasi secara mikroskopis dengan metode pewarnaan spora dan kristal protein teridentifikasi 290 isolat *B. thuringiensis* dari habitat tanah Hutan Lindung Kampus Uncen Waena, Jayapura. Deteksi toksisitas terhadap larva nyamuk *Anopheles*, diperoleh 19 isolat *B. thuringiensis* yang toksisitasnya sama dengan atau lebih dari 50%, 3 isolat diantaranya mempunyai toksisitas di atas 80% (UC3-11: 90%; UC6-22: 85%; dan UC20-43: 85%). Perlu dilakukan uji serologi untuk mengetahui serotipe serta deteksi toksisitasnya terhadap berbagai larva vektor lain terhadap isolat lokal unggul *B. thuringiensis* yang diperoleh dari Hutan Kampus Uncen Waena, Jayapura.

DAFTAR PUSTAKA

- Blondine, Ch.P. dan U. Widyastuti. 1997. Patogenisitas isolat *B. thuringiensis* setelah dikeringkan pada suhu dingin (Lyophilisasi) terhadap jentik *Aedes aegypti* di laboratorium. *Cermin Dunia Kedokteran*. 131: 10-12.
- Blondine, Ch.P. dan L. Susanti. 2010. Pengembangbiakan bakteri *Bacillus thuringiensis* H-14 galur lokal pada berbagai macam pH media air kelapa dan toksisitasnya terhadap jentik nyamuk vektor *Aedes aegypti* dan *Anopheles aconitus*. *Media Litbang kesehatan*. 20(1): 9-16.
- Blondine, Ch.P., T.B. Damar dan U. Widyastuti. 2004. Pengendalian vektor malaria *Anopheles sundaius* menggunakan *Bacillus thuringiensis* 0-14 galur lokal yang dibiakkan dalam buah kelapa dengan partisipasi masyarakat di Kampung Laut Kabupaten Cilacap. *Jurnal Ekologi Kesehatan*. 3(1): 24-36.
- Debach, P. 1974. Biological control by N enemies. Cambridge University Press. London.
- Gama, Z.P., B. Yanuwadi, dan T.H. Kurniati. 2010. Strategi pemberantasan nyamuk aman lingkungan: Potensi *Bacillus thuringiensis* isolat Madura sebagai musuh alami nyamuk *Aedes aegypti*. *Jurnal Pembangunan dan Alam Lestari*. 1(1): 1-10.

- Hadioetomo, R.S., dan I. Rusmana. 1996. Isolasi *Bacillus thuringiensis* Berl. dari peternakan ulat sutra dan toksisitasnya terhadap larva *Crocidolomia binotalis* Zell, dan Spodoptera. *Jurnal Hayati*. 1(1): 21-23.
- Hadioetomo, R.S., Darmono dan U. Widyastuti. 1996. Uji patogenesis *Bacillus thuringiensis* yang di isolasi dari beberapa tempat serta uji toksisitasnya terhadap larva *Hyposida talaca*. *Menara Perkebunan*. 64(2): 65-78.
- Huffaker, C.B., dan P.S. Messenger. 1989. *Teori dan praktek pengendalian biologis*. Penerbit UI Press. Jakarta.
- Krieg, A. 1961. *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Mitt. Boil. Bundesantatt land- Forstwirtsch, Berlin- Dahlem*. 103: 3-79.
- Kurniasari. 1994. Patogenitas *Bacillus thuringiensis* asal Indonesia terhadap larva *Crocidolomia binotalis* (Zeil) *Spodoptera litura*. Lap. Pen. IPB-Bogor. Hal. 1-6.
- Lantang, D. 2005. The toxicity of *Bacillus thuringiensis* Isolates from several soil habitat on the some area in Papua Province At Mosquito Larvae of *Anopheles farauti* Laveran and several its characteristics. *Jurnal Posimapas*. 11: 78-99.
- Lantang, D. 2010. Uji toksisitas isolat lokal *B. thuringiensis* sandi 18 terhadap larva *Culex* serta lama efektivitasnya di dalam air terhadap larva nyamuk *Anopheles farauti* Laveran. *Jurnal Biologi Papua*. 2(2): 53-56.
- Mangoendihardjo. 1989. *Teori dan praktek pengendalian biologi*. Edisi 1. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Prees), Jakarta. Hal. 13-70.
- Munif, A. 1997. Pengaruh *Bacillus thuringiensis* H-14 formula tepung pada berbagai instar larva nyamuk *Aedes aygepti* di laboratorium. *Cermin Dunia Kedokteran* 144: 78-91.
- Nadrawati, J. Situmorang, dan Mahrub. 1994. Isolasi *Bacillus thuringiensis* di Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta dan uji patogenitasnya terhadap *Spodoptera litura* (Fabricus) dan *Plutella xylostella* Curt. *Jurnal BPPS-UGM*. 7(Ib): 3-5.
- Nethravathi, C.J., P.S. Hugar, P. U. Krishnaraj, A. S. Vastrad and J. S. Awaknavar. 2010. Bioefficacy of native sikkim *Bacillus thuringiensis* (Berliner) isolates against Lepidopteran insects. *Journal of Biopesticides*. 3(2): 448-451.
- Oktavina, D.M. 1999. Stabilitas beberapa formulasi Bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* Subsp Aizawai, Laporan Penelitian. IPB Bogor. Hal 1-6.
- Permatasari, A.U. 1998. Kinerja *bacillus thuringiensis* subsp, aizawai dalam medium glukosa mineral dengan dua macam sumber nitrogen yang berbeda. [Skripsi] IPB Bogor.
- Rukmono. 1991. Perkembangan baru dalam Pemberantasan Malaria. *MAJ. Kedok*. 41: 189-193.
- Rumiyantie, R. 1999. Fermentasi *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai skala pilot dengan urea sebagai sumber nitrogen tambahan. Laporan Penelitian. IPB Bogor. Hal: 1-7.
- Salamun. 1993. Efek residual *Bacillus thuringiensis* H-14 dan *Bacillus sphaericus* H-5a5b terhadap larva *Aedes Aegypti* L. pada beberapa tipe tempat penampungan air. [Thesis] UGM Yogyakarta.
- Santosa dan H. Widyastuti. 1996. Toksisitas beberapa isolat *Bacillus thuringiensis* terhadap penggerek buah kakao dan karakteristik Gen Cry-nya. *Jurnal Menara Perkebunan*. 64: 123-132.
- Subiantoro. 1997. Pertumbuhan isolat *Bacillus thuringiensis* pada media air kelapa dan uji patogenitasnya terhadap jentik nyamuk vektor. *Bul. Pen. Kesehat*. 26(2): 95-102.
- Widyastuti, U., Blondine ChP., dan Mujiyono. 1997. Uji Coba *Bacillus sphaericus* 2362 (Spherimos PP) terhadap Jentik *Anopheles* spp. di Desa Bawonifaoso, Teluk Dalam, Nias. *Cermin Dunia Kedokteran*. 118: 28-32.