

Uji Daya Bunuh Ekstrak Kristal Endotoksin *Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14) terhadap Jentik *Aedes aegypti*, *Anopheles aconitus* dan *Culex quinquefasciatus*

Bactericidal Test of Endotoxin Crystal Extract of *Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14) on The Larvae of *Aedes aegypti*, *Anopheles aconitus* and *Culex quinquefasciatus*

Yusnita Mirna Anggraeni¹, Blondine Christina. P¹, Rendro Wianto¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit, Salatiga
 Email: raennita@gmail.com

Abstract

Bacillus thuringiensis israelensis (H-14) has been known as toxin-forming biolarvacide (δ -endotoxin) which effectively kills the larvae of *Aedes aegypti*, *Anopheles aconitus* and *Culex quinquefasciatus*. The crystal of δ -endotoxin is target specific and has high toxicity to the organism of target. The objective of the study was to obtain the crystal of δ -endotoxin by extracting it from *Bt* (H-14) which is able to kill the larvae of *Ae. aegypti*, *An. aconitus* and *Cx. quinquefasciatus*. The research was conducted in the Laboratory of Microbiology Research Center for Disease Vector and Reservoir Salatiga for nine months in 2010. The lethal concentration (LC) value of δ -endotoxin against the larvae of *Ae. aegypti*, *An. aconitus* and *Cx. quinquefasciatus* respectively were 0.06 (LC₅₀); 0.17 ppm (LC₉₀); 0.21 (LC₅₀); 0.49 ppm (LC₉₀); 3.58 (LC₅₀) and 9.19 ppm (LC₉₀).

Key words: *Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14), δ -endotoxin, mosquito larvae, biolarvacide, LC50 and LC 90

Abstrak

Bacillus thuringiensis israelensis (H-14) telah dikenal sebagai biolarvasida pembentuk kristal protein toksin (δ -endotoksin) yang efektif membunuh jentik *Aedes aegypti*, *Anopheles aconitus*, dan *Culex quinquefasciatus*. Kristal toksin ini memiliki keunggulan dibandingkan larvasida sintetik karena bersifat target spesifik dan memiliki toksisitas yang tinggi terhadap organisme sasaran. Tujuan umum penelitian ini untuk memperoleh ekstrak kristal δ -endotoksin *B. thuringiensis israelensis* (H-14) yang mampu membunuh jentik *Ae. aegypti*, *An. aconitus*, dan *Cx. quinquefasciatus*. Tujuan khususnya adalah menentukan LC₅₀ dan LC₉₀ serta menentukan efek residu dari LC₉₀ kristal endotoksin terhadap larva *Ae. aegypti*, *An. aconitus*, dan *Cx. quinquefasciatus*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga pada bulan April-Desember 2010. Nilai LC kristal endotoksin berturut-turut terhadap jentik *Aedes aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, dan *Anopheles aconitus* adalah 0,06 (LC₅₀) dan 0,17 ppm (LC₉₀); 3,58 (LC₅₀) dan 9,19 ppm (LC₉₀); serta 0,21 (LC₅₀) dan 0,49 ppm (LC₉₀).

Kata kunci: *Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14) H-14, endotoksin, jentik nyamuk, biolarvasida, LC50 dan LC 90.

Pendahuluan

Berbagai penyakit yang dibawa oleh nyamuk dapat ditemukan di Indonesia, antara lain demam berdarah dengue, malaria, dan filariasis. Nyamuk *Aedes*, *Anopheles*, dan *Culex* adalah nyamuk yang berperan sebagai vektor dalam penularan penyakit tersebut. Pengendalian vektor penyakit tersebut dapat dilakukan secara biologis yaitu dengan menggunakan *Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14) atau *Bt* (H-14). Penggunaan endotoksin *B. thuringiensis* telah direkomendasikan oleh WHO pada tahun 1978 untuk mengendalikan jentik *Anopheles*, *Aedes* dan *Culex* (Blondine *et al.*, 1998/1999).

Penggunaan bioinsektisida *B. thuringiensis* di Amerika Serikat berkembang dengan pesat. *Bacillus thuringiensis* dikomersialkan dalam bentuk spora yang membentuk inklusi bodi. Inklusi bodi ini mengandung kristal protein yang dikeluarkan pada saat bakteri lisis pada fase stasioner. Produk bioinsektisida granul ini digunakan sebanyak 10-50 g per hektar atau 1020 molekul per hektar. Potensi toksisitasnya lebih besar dibanding pestisida sintetik, yakni 300 kali lebih besar dibanding pyrethroid sintetik (Feitelson *et al.*, 1992). *Bacillus thuringiensis* memiliki toksisitas yang lebih rendah daripada larvasida sintetik seperti *temephos*, *fenoxycarb*, *diflubenzuron*, dan *methoprene* terhadap organisme non-sasaran di perairan (Lee and Scott, 1992).

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) Salatiga mulai melakukan eksplorasi *B. thuringiensis* dari berbagai habitat tanah termasuk tanah yang berada di lokasi endemik malaria dan telah diperoleh isolat *Bt*

(H-14) galur lokal yang menghasilkan endotoksin. Melalui uji bioassay diketahui bahwa isolat hasil seleksi toksisitas sangat toksik terhadap nyamuk *Anopheles*, *Ae. aegypti* dan *Culex* (Blondine *et al.*, 1998/1999).

Bakteri tersebut membunuh jentik melalui kristal toksin (δ -endotoksin) yang dihasilkan sebagai biolarvasida dan menjadi aktif pada kondisi basa di dalam perut jentik. Toksin ini menyebabkan terbentuknya pori-pori pada membran sel di saluran pencernaan sehingga mengganggu keseimbangan osmotik dari sel-sel tersebut. Karena keseimbangan osmotik terganggu, maka sel membengkak dan pecah dan mengakibatkan jentik mati. Sifat toksisitas *Bt* (H-14) sangat spesifik, masing-masing subspecies memiliki target yang spesifik. *Bacillus thuringiensis* (H-14) diketahui toksik terhadap nyamuk dan lalat. Selain memiliki daya bunuh tinggi, bakteri ini tidak berbahaya bagi lingkungan (Schnepf *et al.*, 1998; Anonymous, 1997; WHO, 1982).

Ekstraksi kristal δ -endotoksin *Bt* (H-14) dilakukan dengan cara memisahkan kristalnya dari sel dan spora pada saat produksi kristal telah terjadi, yaitu pada saat sporulasi (fase stasioner). Kristal murni yang diperoleh diharapkan memiliki efektivitas yang lebih tinggi karena sel dan spora tidak membutuhkan waktu yang lama untuk tumbuh dan menghasilkan kristal δ -endotoksin.

Penelitian dilakukan dengan mengekstraksi kristal δ -endotoksin dari kultur *B. thuringiensis israelensis* (H-14) dengan menggunakan metode gradien sukrosa untuk mengetahui daya bunuhnya (LC_{50} dan LC_{90}). Kristal yang diperoleh diujikan terhadap jentik *Ae. aegypti*, *An. aconitus*, dan *Cx. quinquefasciatus*. Tujuannya adalah untuk

memperoleh ekstrak kristal δ -endotoksin kultur *B. thuringiensis israelensis* (H-14) yang ditentukan dalam nilai LC_{50} dan LC_{90} kristal δ -endotoksin terhadap jentik *Ae. aegypti*, *An. aconitus*, dan *Cx. quinquefasciatus*.

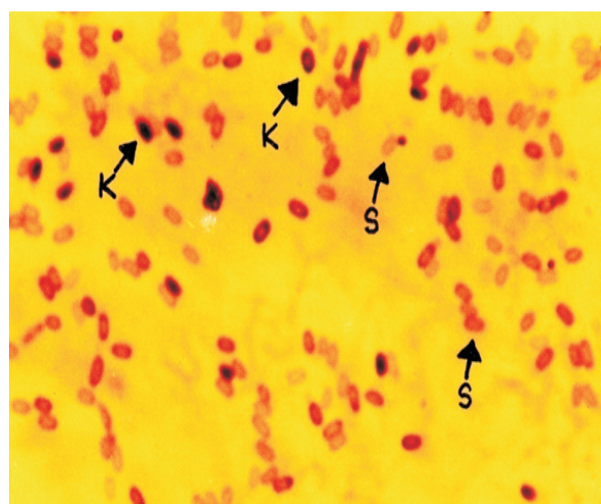
Materi dan Metode

Isolasi dan purifikasi *Bt* (H-14) dilakukan berdasarkan metode Lisansky *et al.* (1993) dengan modifikasi media menggunakan Nutrien Agar (NA). Koloni bakteri yang tumbuh diidentifikasi dengan metode Chilcot & Wigley (1988). Koloni yang mengandung sel batang pembentuk spora dan kristal diinokulasikan pada 30°C selama 2 hari untuk memperoleh kultur murni.

Produksi kristal dilakukan dengan cara inokulasikan isolat bakteri sesuai metode Lisansky *et al.* (1993) dengan modifikasi medium (TPB) dan digoyang pada 175 rpm selama 5-7 hari. Ekstraksi kristal dilakukan dengan metode Takebe *et al.* (2005). Kristal dapat diperiksa dengan pewarnaan kristal menggunakan Metode Chilcott dan Wigley (1988). Uji efektivitas kristal endotoksin dilakukan dengan metode WHO (2005). Kematian jentik diamati selama 24 jam pengujian. Untuk mendapatkan LC_{50} dan LC_{90} kristal endotoksin dilakukan analisis probit. Pengukuran temperatur dan kelembaban udara ruangan dilakukan selama pengujian. Data primer yang diperoleh dari hasil uji laboratorium, meliputi LC_{50} dan LC_{90} dianalisis menggunakan analisis Probit.

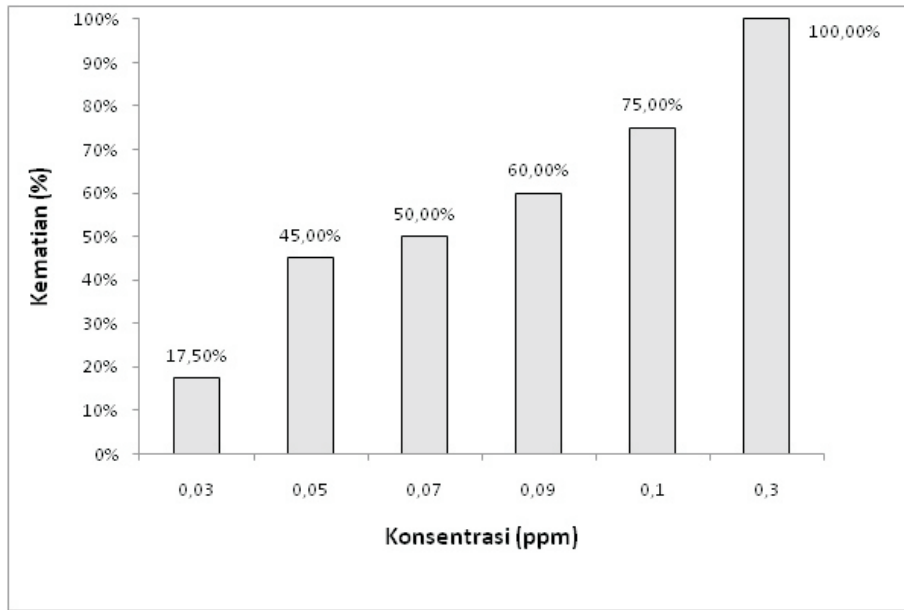
Hasil dan Pembahasan

Isolat murni *Bt* (H-14) yang diperoleh dari hasil isolasi dan purifikasi memiliki kenampakan seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Isolat *Bt* (H-14) dengan kristal (K) dan spora (S)

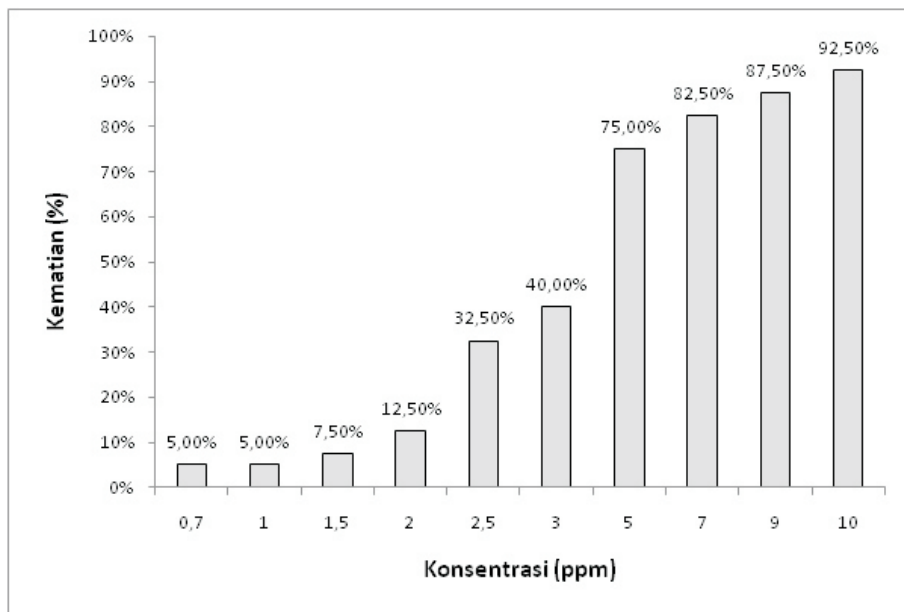
Uji hayati yang dilakukan terhadap tiga spesies jentik nyamuk vektor *Ae. aegypti*, *An. aconitus*, dan *Cx quinquefasciatus* menunjukkan hubungan linier antara kematian dengan peningkatan konsentrasi kristal endotoksin. Hubungan antara kematian jentik *Ae. aegypti* dengan konsentrasi kristal endotoksin ditampilkan pada Gambar 2. Enam konsentrasi kristal endotoksin (0,03; 0,05; 0,07; 0,09; 0,1 dan 0,3 ppm) telah diujikan terhadap jentik *Ae. aegypti*. Persentase kematian terendah (17,5%) dihasilkan oleh konsentrasi 0,03 ppm dan persentase kematian tertinggi (100%) dihasilkan oleh konsentrasi 0,3 ppm.



Gambar 2. Kematian jentik *Ae. aegypti* (%) dengan aplikasi kristal endotoksin pada berbagai konsentrasi (ppm)

Hubungan antara kematian jentik *An. aconitus* dengan konsentrasi kristal endotoksin ditampilkan pada Gambar 3. Sepuluh konsentrasi kristal endotoksin yang diujikan terhadap jentik *An. aconitus* (0,7; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 5; 7; 9 dan 10

ppm) menunjukkan bahwa konsentrasi 0,7 ppm menghasilkan persentase kematian terendah (5%) dan konsentrasi 10 ppm menghasilkan persentase kematian tertinggi (92,5%).



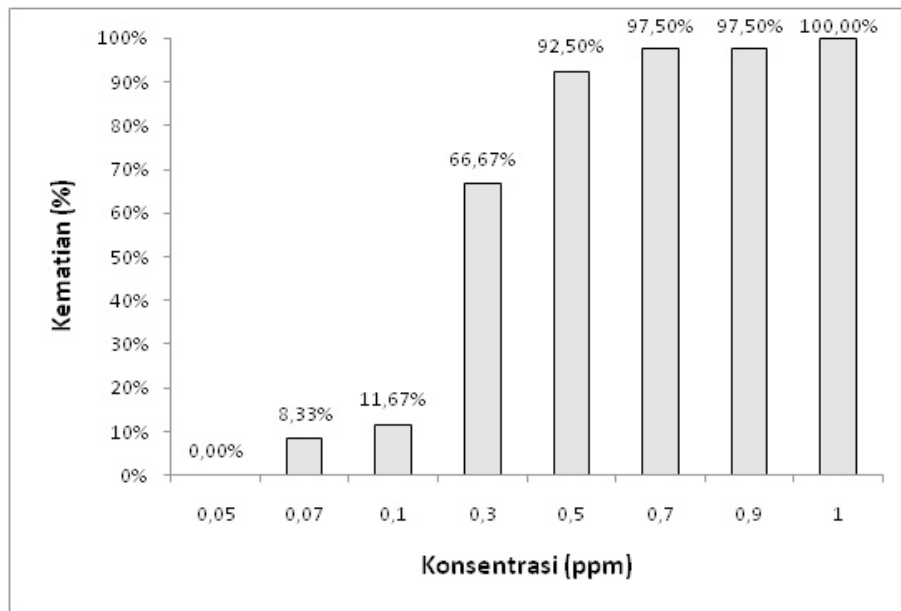
Gambar 3. Kematian jentik *An. aconitus* (%) dengan aplikasi kristal endotoksin pada berbagai konsentrasi (ppm)

Hubungan antara kematian jentik *Cx. quinquefasciatus* dengan konsentrasi kristal endotoksin ditampilkan pada Gambar 4. Delapan konsentrasi kristal endotoksin (0,05; 0,07; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 dan 1 ppm) telah diujikan terhadap jentik *Cx. quinquefasciatus*. Konsentrasi 0,05 ppm menghasilkan persentase kematian terendah (0%) dan konsentrasi 1 ppm menghasilkan persentase kematian tertinggi 100%.

Pengujian kristal endotoksin *B. thuringiensis* H-14 selama 24 jam terhadap jentik *Ae. aegypti* menunjukkan bahwa dibutuhkan konsentrasisebesar 0,06 ppm (LC_{50}) dan 0,17 ppm (LC_{90}). Konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh jentik *An. aconitus* berturut-turut sebesar 3,58 ppm (LC_{50}) dan 9,19 ppm (LC_{90}). Sedangkan pada *Cx. quinquefasciatus* dibutuhkan konsentrasi 21 ppm (LC_{50}) dan 0,49 ppm (LC_{90}).

Kemampuan kristal endotoksin dalam membunuh jentik ditunjukkan dengan nilai *Lethal Concentration* (LC), yakni semakin rendah nilai LC, semakin tinggi daya bunuhnya.

Nilai LC_{50} dan LC_{90} kristal endotoksin *B. thuringiensis* H-14 terhadap masing-masing nyamuk vektor lebih rendah daripada nilai LC_{50} dan LC_{90} *Bt* H-14 yang belum diekstraksi (Maharani, 2005; Blondine, 2004; Bahagiawati, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa kristal endotoksin *Bt* H-14 memiliki daya bunuh yang lebih tinggi daripada *Bt* H-14 yang belum diekstraksi terhadap jentik ketiga jenis nyamuk vektor. Dalam kondisi murni, daya bunuh terhadap jentik akan lebih tinggi daripada dalam bentuk campuran (sel bakteri dan spora) (Blondine dan Yuniarti, 2001).



Gambar 4. Kematian jentik *Cx. quinquefasciatus* (%) dengan aplikasi kristal endotoksin pada berbagai konsentrasi (ppm)

Tabel 1. Nilai LC₅₀ dan LC₉₀ kristal endotoksin terhadap jentik *Ae. aegypti*, *An. aconitus*, dan *Cx. quinquefasciatus*

	LC (ppm)		Level of Confidence	Range		
<i>Ae. aegypti</i>						
	LC ₅₀	0.06	0.95	0.05	< LC <	0.08
	LC ₉₀	0.17	0.95	0.12	< LC <	0.31
<i>An. Aconitus</i>						
	LC ₅₀	3.58	0.95	3.05	< LC <	4.23
	LC ₉₀	9.19	0.95	7.27	< LC <	12.97
<i>Cx. Quinquefasciatus</i>						
	LC ₅₀	0.21	0.95	0.17	< LC <	0.26
	LC ₉₀	0.49	0.95	0.38	< LC <	0.67

Jentik *Ae. aegypti* mati pada konsentrasi kristal endotoksin *Bt* H-14 paling rendah dibanding jentik *Cx. quinquefasciatus* dan *An. aconitus*. Becker (1991) dan Aly (1993) menyatakan bahwa berdasarkan faktor zona makan jentik (*larval feeding zone*) dan tingkat sedimentasi/pengendapan, diduga bahwa toksin *Bt* H-14 lebih cepat mengendap di dasar yang merupakan daerah makan jentik *Ae. aegypti* daripada di bawah permukaan air (*suspension feeders*) yang merupakan daerah makan bagi jentik *Cx. quinquefasciatus* maupun di daerah permukaan (lebih kurang 1-2 mm) yang merupakan daerah makan bagi jentik *Anopheles*. Oleh sebab itu jentik *Ae. aegypti* tampak paling peka terhadap kristal endotoksin *Bt* H-14 daripada kedua spesies jentik lainnya.

Perbedaan kepekaan di antara beberapa spesies jentik nyamuk selain dipengaruhi oleh perbedaan zona makan, juga disebabkan oleh kemampuan mengaktifkan protoksin, dan mengikat toksin pada reseptor sel pada rongga pencernaan jentik. Jentik

Cx. quinquefasciatus 2-4 kali kurang peka terhadap *Bt* H-14 daripada jentik *Ae. aegypti* pada instar yang sama (Weyai, 2004).

Telah diperoleh ekstrak kristal endotoksin dari kultur *Bt* H-14 yang mampu membunuh jentik *Ae. aegypti*, *An. aconitus*, dan *Cx. quinquefasciatus*. Nilai LC kristal endotoksin *Bt* H-14 berturut-turut dari yang terendah (menunjukkan daya bunuh tertinggi) diperoleh terhadap jentik *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, dan *An. aconitus*. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai penentuan berbagai macam formulasi biolavasida kristal endotoksin *Bt* H-14 sesuai dengan spesies jentik sasaran.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis ucapkan kepada Kepala Badan Litbang Kesehatan dan Kepala B2P2VRP yang telah memberikan kesempatan hingga terlaksananya penelitian. Ucapan terima kasih juga penulis haturkan kepada Dr. Happy Widiastuti (Balai

Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor) atas bimbingannya mengenai ekstraksi kristal endotoksin.

Daftar Pustaka

- Aly (1993) Diet feeding periodicity of larval anopheline mosquitos on microorganisms and microinvertebrates: A spatial and temporal comparison of *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae) diets in a Michigan pond. In: Wallace, J.R. and Merritt, R.W. 2004. *J. Med. Entomol.* 41: 853-860.
- Anonymous (1997) The Pesticide Manual: A World Compendium. Editor: Tomlin, C. D. S. 11th Ed. British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, UK.
- Bahagiawati (2002) Penggunaan *Bacillus thuringiensis* sebagai Bioinsektisida. *Bul. Agro. Bio.* 5: 21-28
- Becker. (1991) Efektivitas Vectobac 12AS (*Bt* H-14) dan (*Bt* H-14) terhadap Vektor Malaria *Anopheles maculatus* di Kobakan Desa Hargotirto, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo. In: Blondine, Ch.P. 2004. *Bul. Penel. Kes.* 32: 17-28.
- Blondine, Ch.P. (2004) Efektivitas Vectobac 12AS (*Bt* H-14) dan (*Bt* H-14) terhadap Vektor Malaria *Anopheles maculatus* di Kobakan Desa Hargotirto, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo. *Bul. Penel. Kes.* 32: 17-28.
- Blondine Ch. P, Widyastuti, U., Widiarti, Sukarno and Subiantoro (1998/1999) Uji Serologi Isolat *Bacillus thuringiensis* dan Patogenisitasnya Terhadap Jentik Nyamuk Vektor., *Buletin Penelitian Kesehatan*, 26: 91-98.
- Blondine Ch. .P. and Yuniarti, R.A. (2001) Uji Patogenisitas Isolat *B. thuringiensis* yang Ditumbuhkan dalam Buah Kelapa terhadap berbagai Jentik Nyamuk di Laboratorium. *Cermin Dunia Kedokteran* 131: 20-22.
- Chilcott, C. N. and Wigley, P.J. (1988) Technical note: an improved method for differential staining of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Lett. Appl. Microbiol.* 7: 67-70.
- Feitelson, J.S., Payne, J. and Kim, L. (1992) *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond, *Bio/Technology* 10: 271-275.
- Lee, B.M. and Scott, G.I. (1989) Acute toxicity of temephos, fenoxycarb, diflubenzuron, and methoprene and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to the mummichog (*Fundulus heteroclitus*), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 827-832.
- Lerdthusnee, K., Kong-ngamsuk, W., Phan-Urai, P. and Chareonviriyaphap, T. (1996) Development of *Bti*-formulated Products and Efficacy Test against *Aedes aegypti* Populations, Proceedings First International Symposium on Biopesticides, October 27-31, Phitsanulok, Thailand.
- Lisansky, S.G., Quinlan, R. and Tassoni, G. (1993) The *Bacillus thuringiensis* Production Handbook, CPL Press, Newbury, UK.
- Maharani, A.I.P. (2005) Pengendalian Vektor Malaria *Anopheles maculatus* Menggunakan *Bacillus thuringiensis* H-14 Galur Lokal di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, DIY, *J. Ked. YARSI.* 13: 11-23.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Feitelson, J. *et al.* (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein. *Microbiol. Mol. Biol Rev.* 62: 775-806.
- Takebe, S., Morinaga, S., Mizuhashi, A. and Komano, T. (2005) Improved Technique for Refining the Crystal of *Bacillus thuringiensis* by NaBr Gradient Centrifugation, 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact, Victoria B.C.
- Wallace, J.R. and Merritt, R.W. (2004) Diet feeding periodicity of larval anopheline mosquitos on microorganisms and microinvertebrates: A

spatial and temporal comparison of *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae) diets in a Michigan pond. *J. Med. Entomol.* 41: 853-860.

Weyai, M.N. (2004) Efikasi *Bacillus thuringiensis* H-14 (Vectobac WDG) terhadap Jentik *Aedes aegypti* di Laboratorium, Skripsi, Universitas Diponegoro, Semarang.

WHO (1982) Biological Control of Vectors of Disease, Sixth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. USA.

WHO (2012) Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides, 2005, <http://www.who.int/whopes/guidelines/en/> Diakses pada tanggal 24 Januari 2012.