

**STUDI LABORATORIUM UJI TOKSISITAS ISOLAT *Bacillus thuringiensis israelensis* DALAM MEDIA AIR PERASAN SINGKONG TERHADAP LARVA NYAMUK *Aedes aegypti***

**Wulan Kusuma Jati**

**Email : wulankusumajati@gmail.com**

**Abstract**

*Bacillus thuringiensis israelensis* is a toxic bacteria for *Aedes aegypti*. However, raw materials of media for biopesticide production still imported. So, we need an alternative grower media, one of them by using the juice of cassava. The purpose was to determine the toxicity of *B. thuringiensis israelensis* isolates were cultured in the cassava juice against larvae of *Ae. aegypti*. This type of research is experimental research with posttest - only control group design. The population in this study were all third instar larvae of *Aedes aegypti*. Parameters observed that the number of spores of *Bacillus thuringiensis israelensis* were grown on cassava juice and mortality  $LC_{50}$  and  $LC_{90}$  of *Ae. aegypti* with probit regression analysis. The concentration used in toxicity tests is  $0,89 \times 10^{-3}$  ppm;  $1,30 \times 10^{-3}$  ppm;  $1,49 \times 10^{-3}$  ppm;  $1,69 \times 10^{-3}$  ppm;  $2,20 \times 10^{-3}$  ppm;  $3,22 \times 10^{-3}$  ppm and  $5,43 \times 10^{-3}$  ppm. The results showed the number of spores that grow on the medium cassava juice of 1 %  $230 \times 10^5$  spores / ml.  $LC_{50}$  and  $LC_{90}$  concentration of *B. thuringiensis israelensis* which  $3,674 \times 10^{-3}$  ppm and  $14,254 \times 10^{-3}$  ppm. From this study it can be concluded that *B. thuringiensis israelensis* were cultured in the cassava juice toxic to the larvae *Ae. aegypti*.

Keywords : toxicity, *Bacillus thuringiensis israelensis*, cassava juice, *Aedes aegypti*

**Pendahuluan**

Indonesia merupakan negara beriklim tropis yang didalamnya hidup berbagai macam nyamuk dimana banyak diantaranya merupakan nyamuk vektor. Salah satu vektor yang dominan di Indonesia adalah nyamuk *Aedes aegypti*.

*Ae. aegypti* merupakan nyamuk yang dapat berperan sebagai vektor berbagai macam penyakit diantaranya Demam Berdarah Dengue (DBD), Chikungunya dan Demam Kuning (Yellow Fever). Pengendalian vektor

dapat dilakukan dengan berbagai metode seperti pengelolaan lingkungan secara fisik atau mekanis, penggunaan agen biotik, dan kimiawi. Penggunaan bahan kimia untuk mengendalikan vektor yang dilakukan secara berulang-ulang dapat menimbulkan resistensi vektor, matinya hewan lain yang bukan merupakan target serta menimbulkan pencemaran lingkungan.<sup>1,2</sup> Oleh karena itu perlu adanya upaya lain untuk mengendalikan vektor penyakit. Salah satu cara yang paling banyak

diteliti dan potensial serta dipandang mempunyai prospek dimasa mendatang adalah menggunakan bakteri *B. thuringiensis* yang toksik terhadap larva nyamuk.<sup>3</sup>*Bacillus thuringiensis israelensis* adalah bakteri yang mempunyai sel vegetatif berbentuk batang dengan ukuran panjang 3-5 um dan lebar 1,0-1,2 µm, memiliki flagella dan membentuk spora. Bersifat gram positif, umumnya aerob fakultatif, dan dapat tumbuh pada berbagai media dengan kisaran suhu pertumbuhan 15°C-40°C.<sup>4</sup>Bakteri *B. thuringiensis israelensis* dapat memproduksi kristal protein toksik (*delta endotoksin*) di dalam sel bersama-sama dengan spora pada waktu sel mengalami sporulasi. Efek letal *B. thuringiensis israelensis* terhadap larva nyamuk disebabkan oleh aktivitas delta endotoksin yang terkandung dalam kristal protein toksik.<sup>5</sup>

Untuk menumbuhkan dan memperbanyak kristal spora *B. thuringiensis* dapat dipakai berbagai media kimia. Namun kendala utama dalam produksi bioinsektisida adalah bahan bakumedia a pembiak yang masih impor. Selain menggunakan media kimia tersebut *B. thuringiensis israelensis* dapat pula ditumbuhkan pada media lokal yang mudah didapat, relatif murah dan dapat tersedia setiap saat.<sup>6</sup>Pada umumnya, *B. thuringiensis israelensis* akan tumbuh apabila di dalam suatu media terdapat sumber Carbon (C) dan Nitrogen (N). Sumber Carbon pada media air perasan singkong

berasal dari dekstrosa yang terdapat pada singkong karena dekstrosa kaya akan sumber karbon. Sementara untuk sumber Nitrogen berasal dari kandungan asam amino. Sumber dari dekstrosa dapat digunakan bahan-bahan yang memiliki kadar pati yang cukup tinggi, misalkan pati singkong.<sup>7</sup>Selain karena kandungan nutrisinya, singkong merupakan bahan pangan nasional dan dibutuhkan sebagai bahan berbagai industri makanan serta bahan pakan (ransum) ternak. Selain itu, singkong merupakan tanaman yang dapat hidup di tanah yang tidak subur, tidak memerlukan banyak pupuk ataupun pestisida sehingga mudah didapat dengan harga yang relatif murah.<sup>8</sup>

## Metode

Metode penelitian ini menggunakan metode eksperimen (*experimental research*) dengan rancangan sesudah dengan kelompok control (*posttest-only control group design*). Sampel yang digunakan adalah larva nyamuk *Ae. aegypti* instar III hasil kolonisasi sebanyak 25 larva per unit percobaan. Banyaknya dosis yang dipakai pada uji pendahuluan adalah 9 dosis (0,08 ppm, 0,04 ppm, 0,02 ppm, 0,01 ppm, 0,008 ppm, 0,005 ppm, 0,001 ppm, 0,0007 ppm dan 0,0005 ppm) dengan 3 kali ulangan dan pada uji toksisitas digunakan 6 dosis dengan ulangan yang dilakukan adalah 4 kali.

A. Pembuatan media air perasan singkong

- Singkong dikupas kemudian di rendam selama 1 jam untuk menghilangkan kandungan HCN dalam singkong kemudian diparut tanpa penambahan air kemudian di peras. Air perasan singkong ditambahkan aquades untuk memperoleh konsentrasi air perasan singkong 1%, 3%, 5%, 10%, 30%, 50%, 75% dan 100%. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf.
- B. Penanaman isolat *B. thuringiensis israelensis* ke dalam media air perasan singkong dengan berbagai konsentrasi Koloni *B. thuringiensis israelensis* diambil menggunakan osse sebanyak 2 osse. Kemudian dimasukkan ke dalam air perasan singkong berbagai konsentrasi. Digoyang atau digojlog menggunakan shaker selama 2 x 24 jam pada suhu kamar
- C. Penghitungan jumlah spora isolat *B. thuringiensis israelensis* dalam perasan air singkong Satu ml biakan *B. thuringiensis israelensis* pada perasan air singkong ditambahkan 9 ml akuades pada tabung reaksi, dikocok agar homogen. Dilakukan pengenceran  $10^{-1}$  –  $10^{-5}$ , dipanaskan pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Pemanasan dilakukan untuk mematikan kuman bentuk vegetatif. Diambil 0,1 ml dan diinokulasi pada 20 ml medium Nutrient Agar dalam cawan petri, lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ . Kemudian dihitung jumlah spora *B. thuringiensis israelensis* yang tumbuh pada cawan petri yang berisi agar nutrient. Jumlah spora dihitung menggunakan metode *Plate Count* (hitungancawan) dimana *plate count* atau *viable count*.<sup>50</sup> Konsentrasi yang memiliki kepadatan paling tinggi pada tingkat pengenceran yang sama yang akan digunakan dalam uji pendahuluan dan uji toksisitas
- D. Uji Pendahuluan Tiga gelas plastik yang sudah diberi label kontrol dan 27 gelas plastik lainnya yang diberi label perlakuan diisi dengan 100 ml aquades kemudian diukur pH dan suhunya kemudian 25 ekor larva dimasukkan ke dalam masing-masing gelas plastik tersebut. Untuk kelompok perlakuan diberi dosis 0,2 ml, 0,1 ml, 0,08 ml, 0,04 ml, 0,02 ml, 0,01 ml, 0,008 ml, 0,005 ml, 0,001 ml air perasan singkong yang sudah berisi isolat *B. thuringiensis israelensis*, sedangkan kelompok kontrol tidak diberi air perasan singkong yang berisi *B. thuringiensis israelensis*. Jumlah kematian tiap gelas plastik di hitung setelah 24 jam pengamatan. Dilakukan regresi probit dari hasil kematian larva. Setelah didapatkan nilai  $\text{LC}_{50}$  dan  $\text{LC}_{90}$  kemudian dinaikkan dan diturunkan untuk acuan dosis yang akan dipakai untuk uji toksisitas
- E. Uji toksisitas  $\text{LC}_{50}$  dan  $\text{LC}_{90}$  untuk larva nyamuk *Ae. aegypti* Berdasarkan pedoman teknis uji insektisida laboratorium, maka nilai yang harus diambil dari uji lanjutan adalah nilai  $\text{LC}_{50}$  dan

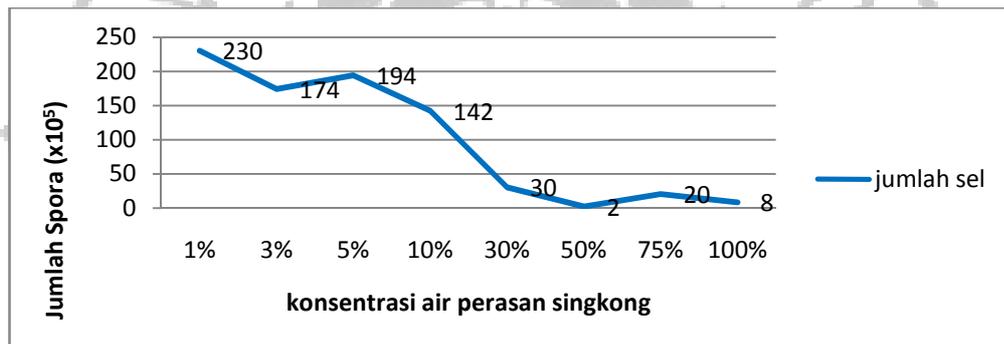
$LC_{90}$ . Selanjutnya, rentang nilai ini dinaikkan dan diturunkan untuk acuan dosis pengujian lanjutan dengan menggunakan  $LC_{10}$ ,  $LC_{30}$ ,  $LC_{40}$ ,  $LC_{50}$ ,  $LC_{70}$ ,  $LC_{90}$  dan  $LC_{99}$ . Empat gelas plastik yang sudah diberi label kontrol dan 28 gelas plastik lainnya yang diberi

label perlakuan. Pada kelompok perlakuan, setiap gelas plastik diisi dengan 100ml aquades kemudian diukur pH dan suhunya. Dua puluh lima ekor larva dimasukkan ke dalam masing-masing gelas plastik tersebut.

## Hasil

### A. Hasil penghitungan spora

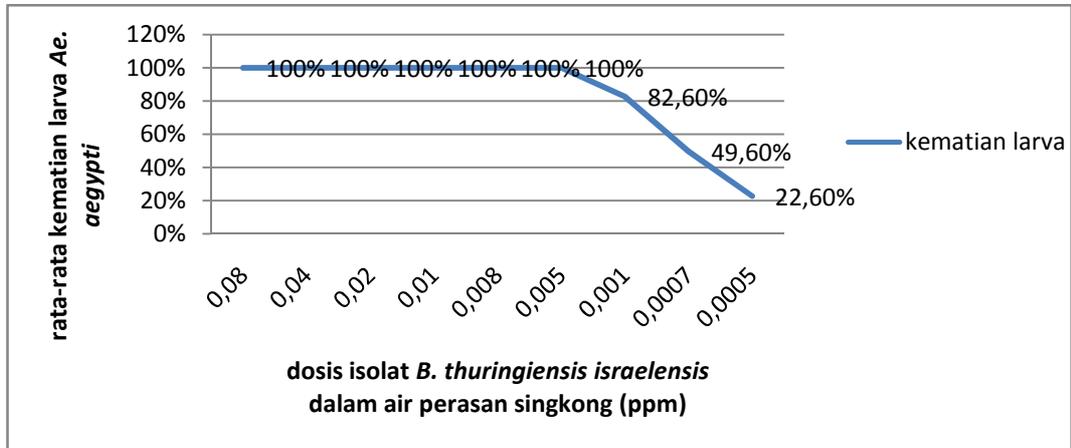
Jumlah spora yang terhitung pada masing-masing konsentrasi air perasan singkong pada pengenceran  $10^{-4}$  adalah sebagai berikut:



Gambar 1. Grafik Penghitungan spora *B. thuringiensis israelensis*

Dari uraian diatas, *B. thuringiensis israelensis* yang ditumbuhkan dalam media air perasan singkong dengan konsentrasi 1%.

B. Hasil pengamatan uji pendahuluan

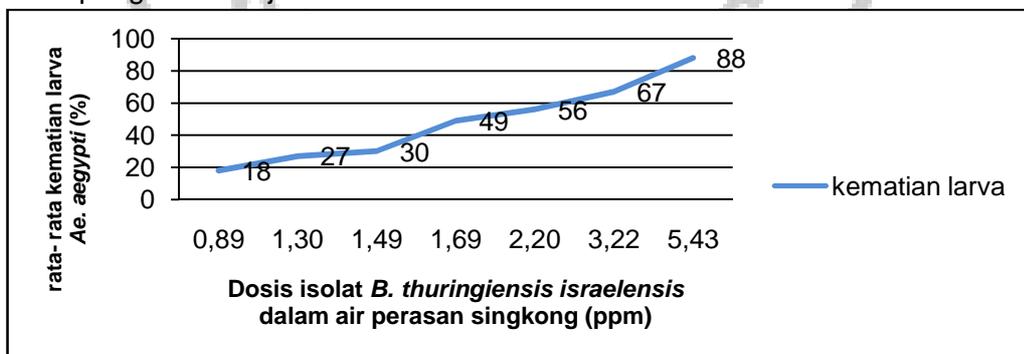


Gambar 2. Kematian Larva *Ae. aegypti* pada uji pendahuluan setelah 24 jam dipaparkan dengan *Bacillus thuringiensis israelensis* dalam media air perasan singkong 1%

Kematian larva *Ae. aegypti* dari berbagai serial dosis mengalami peningkatan rata – rata seiring penambahan dosis yang dilakukan ada peningkatan kematian larva *Ae. aegypti*. Sehingga kematian larva berbanding lurus dengan peningkatan dosis yang diberikan. Dari hasil uji pendahuluan dilakukan regresi probit menggunakan SPSS 16 dengan tingkat kepercayaan 95%.

Analisis Probit dilakukan untuk menentukan  $LC_{50}$  dan  $LC_{90}$  dari uji pendahuluan. Kemudian akan dijadikan dasar untuk menentukan dosis yang akan dipakai dalam uji toksisitas. Dosis yang akan digunakan dalam pengujian lanjutan adalah  $0,89 \times 10^{-3}$  ppm;  $1,30 \times 10^{-3}$  ppm;  $1,49 \times 10^{-3}$  ppm;  $1,69 \times 10^{-3}$  ppm;  $2,20 \times 10^{-3}$  ppm;  $3,22 \times 10^{-3}$  ppm dan  $5,43 \times 10^{-3}$  ppm.

C. Hasil pengamatan uji toksisitas



Gambar 3. Kematian Larva *Ae. aegypti* pada uji toksisitas setelah 24 jam dipaparkan dengan *B. thuringiensis israelensis* dalam media air perasan singkong 1%

Berdasarkan Gambar 3. diatas dapat dilihat bahwa setelah diberikan perlakuan dengan *B. thuringiensis israelensis* dalam media air perasan singkong 1% selama 24 jam dalam uji toksisitas, seiring bertambahnya dosis yang diberikan ada peningkatan kematian larva *Ae. aegypti*. Sehingga kematian larva berbanding lurus dengan peningkatan dosis.

Setelah dilakukan regresi probit menggunakan SPSS 16 dengan tingkat kepercayaan 95% diketahui nilai  $LC_{50}$  dan nilai  $LC_{90}$  dari uji toksisitas *B. thuringiensis israelensis* dalam air perasan singkong 1% terhadap Kematian Larva *Aedes aegypti* adalah  $3,674 \times 10^{-3}$  ppm dan  $14,254 \times 10^{-3}$  ppm.

## Pembahasan

Dari hasil penelitian yang ada, terdapat aktivitas pertumbuhan spora setelah penanaman pada media air perasan singkong yang kemudian di isolasi pada media NA selama 2x 24 jam. Sehingga dapat disimpulkan bahwa air perasan singkong dapat digunakan sebagai media penumbuh untuk isolat *B. thuringiensis* subsp *israelensis*. Penghitungan spora yang dilakukan pada konsentrasi 1%, 3%, 5%, 10%, 30%, 50%, 75% dan 100% air perasan singkong diperoleh jumlah spora antara  $8 \times 10^5$  spora/ml sampai dengan  $230 \times 10^5$  spora/ml.

Konsentrasi air perasan singkong yang dapat menumbuhkan *B. thuringiensis israelensis* paling banyak adalah pada konsentrasi 1%. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah spora yang tumbuh dan besarnya konsentrasi air perasan singkong berbanding terbalik dimana semakin kecil konsentrasi air perasan singkong yang digunakan semakin banyak jumlah spora yang dihasilkan. Dengan adanya fakta bahwa media air perasan singkong dengan konsentrasi 1% dapat menumbuhkan lebih banyak spora *B. thuringiensis israelensis* dibandingkan seluruh konsentrasi diatasnya, dimungkinkan apabila konsentrasi kurang dari 1 % dapat menumbuhkan spora *B. thuringiensis israelensis* lebih banyak lagi. Hal ini dapat terjadi karena adanya berbagai macam faktor yang mempengaruhi pertumbuhan *B. thuringiensis israelensis* dalam media air perasan singkong. Pertumbuhan *B. thuringiensis israelensis* dipengaruhi oleh komponen nutrisi media pertumbuhan, kondisi untuk pertumbuhan misalnya suhu, pH dan kadar air, juga adanya akumulasi *metabolite products* serta hambatan pertumbuhan yang disebabkan

Pada uji pendahuluan yang dilakukan menggunakan *B. thuringiensis israelensis* dalam media air perasan singkong 1%, rata-rata kematian larva *Ae. aegypti* berbanding lurus dengan besar konsentrasi *B. thuringiensis*

*israelensis* yang digunakan. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam setelah perlakuan dengan dosis yang dipakai 0,0005 sampai 0,08 ppm dapat membunuh larva *Ae. aegypti* dari 22,6% sampai 100%.

Sama halnya dengan uji pendahuluan, pada uji toksisitas didapatkan bahwa rata-rata kematian larva *Ae. aegypti* berbanding lurus dengan besar konsentrasi *B. thuringiensis israelensis* yang digunakan. Hal ini dimungkinkan dapat terjadi karena semakin tinggi konsentrasi maka akan semakin banyak spora *B. thuringiensis israelensis* yang mengalami kontak secara langsung dengan larva, sehingga akan membuat proses larva memakan kristal endotoksik akan lebih cepat terjadi. Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Purnama (2012) di mana rentan dosis yang diberikan yaitu 0,025 ppm, 0,05 ppm dan 0,07 ppm dapat membunuh larva sebanyak 76,7%, 98,3% dan 100%, semakin besar dosis yang diberikan maka kematian larva semakin besar pula.<sup>16</sup> *B. thuringiensis israelensis* dikatakan efektif apabila pada konsentrasi 1 ppm dapat membunuh >70% larva dalam 24 jam pengujian.<sup>3</sup> Dalam penelitian ini *B. thuringiensis israelensis* dapat membunuh >70% larva nyamuk *Ae. aegypti* pada konsentrasi 0,001 ppm dalam 24 jam pengujian sehingga dapat dikatakan bahwa *B. thuringiensis israelensis* dalam media air perasan singkong 1% efektif untuk larva nyamuk *Ae. aegypti*. Nilai  $LC_{50}$  dan nilai  $LC_{90}$  dari uji toksisitas *B. thuringiensis israelensis* dalam air

perasan singkong 1% terhadap Kematian Larva *Aedes aegypti* adalah  $3,674 \times 10^{-3}$  ppm dan  $14,254 \times 10^{-3}$  ppm setelah 24 jam perlakuan.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Purnama (2012) yang menggunakan media limbah cair tahu sebagai media membiak *B. thuringiensis israelensis* menunjukkan bahwa konsentrasi terendah untuk membunuh 100% jentik dibutuhkan dosis sebesar 0,025 ppm. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Darwis (2012) yang menggunakan tapioka sebagai media membiak *B. thuringiensis israelensis* dimana hasilnya menyatakan bahwa nilai  $LC_{50}$  produk bioinsektisida adalah sebesar 7,015 ppm.<sup>7</sup>

Perbedaan kematian larva yang disebabkan oleh pemberian *B. thuringiensis israelensis* yang ditumbuhkan pada berbagai macam media di pengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor utama yang menyebabkan perbedaan ini adalah tingkat toksisitas yang dimiliki oleh *B. thuringiensis israelensis*. Tingkat toksisitas dipengaruhi oleh proses sporulasi yang sempurna *B. thuringiensis israelensis* yang membutuhkan perimbangan yang serasi antara sumber nitrogen dan sumber karbon. Faktor lain adalah kebiasaan makan dari larva, tingkat kerentanan larva terhadap toksik yang dihasilkan dan kemampuan cairan usus untuk melarutkan kristal toksik.<sup>16, 17, 18</sup>

## Kesimpulan

Media air perasan singkong dapat digunakan sebagai media pembiak untuk isolat *B. thuringiensis israelensis*. Hal ini dibuktikan dengan adanya aktifitas pertumbuhan spora dengan jumlah spora yang tumbuh pada media air perasan singkong 1 % yaitusebanyak  $230 \times 10^5$  spora/ml. *B. thuringiensis israelensis* dalam media air perasan singkong 1% efektif untuk larva nyamuk *Ae. Aegypti* karenadapat membunuh >70% larva pada konsentrasi 0,001 ppm dalam 24 jam pengujian. Dari analisis Probit didapatkan nilai  $LC_{50}$  dan nilai  $LC_{90}$  dari uji toksisitas *B. thuringiensis israelensis* dalam air perasan singkong 1% terhadap Kematian Larva *Aedes aegypti* adalah  $3,674 \times 10^{-3}$  ppm dan  $14,254 \times 10^{-3}$  ppm setelah 24 jam perlakuan.

### Saran

Bagi peneliti lainMelakukan penelitian lanjutan terhadap produksi *B. thuringiensis israelensis* dalam media air perasan singkong dengan menggunakan media pembanding sehingga akan terlihat efektivitas dari media tersebut. Serta menghitung kandungan C dan N yang dimiliki air perasan singkong yang sebagai media penumbuh dan melakukan penelitian lanjutan dengan menguji kandungan kimia pada air perasan singkong untuk mengetahui apakah dapat menjadi penghambat ataukah yang dapat mematikan larva uji.

### DaftarPustaka

1. Komariah, Pratita S, Malaka T. Pengendalian Vektor. Jurnal Kesehatan Bina Husada vol.6 no.1, 2011
2. Palgunadi BU, Rahayu A. *Aedes aegypti* Sebagai Vektor Penyakit Demam Berdarah Dengue. (Online) [elib.fk.uwks.ac.id/.../AEDES%20AEGYPTI%20SEBA](http://elib.fk.uwks.ac.id/.../AEDES%20AEGYPTI%20SEBA) diakses pada 11 Maret 2014
3. Blondine ChP. Patogenitas *Bacillus thuringiensis* H-14 dalam Media Air Cucian Beras Terhadap Larva Nyamuk *Anopheles aconitus* dan *Aedes aegypti*. Jurnal Ekologi Kesehatan Vol. 7 No. 3 : 808-812, 2008
4. Blondine ChP, Susanti . Pengembangbiakan *Bacillus Thuringiensis* H-14 Pada Berbagai Macam Ph Media Air Kelapa dan Toksisitasnya Terhadap Jentik Nyamuk Vektor *Aedes .aegypti* dan *Anopheles aconitus*. Jurnal Media Litbang Kesehatan Vol.20 No.1 tahun 2010
5. Mardihusodo SJ. Sensivitas Larva Nyamuk *Aedes aegypti* terhadap *Bacillus thuringnesis* H-14 dan *Bacillus sphaericus* 1593. Jogjakarta : Fakultas Kedokteran UGM, 1991
6. Chilcott CN, Wegley PJ. Technical Modes: An Improved Methode Of Differential Staining Og Bt Crystal. Letter In Applied Microbiology, 1988
7. Darwis AA, Khaswar S, Ummi S. Kajian Produksi Bioinsektisida dari *Bacillus thuringiensis* *israelensis* Pada Media Tapioka.

- Jurnal Teknologi Industri Pertanian Vol. 14(1) hal 1-5, 201
8. Darwis AA, Khaswar S, Ummi S. Kajian Produksi Bioinsektisida dari *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Pada Media Tapioka. Jurnal Teknologi Industri Pertanian Vol. 14(1) hal 1-5, 201
  9. Sigit SH, Upik K, Hadi. Hama pemukiman indonesia; pengenalan, biologi dan pengendalian. Unit kajian pengendalian hama pemukiman-bogor. hal 23-51, 2006
  10. Soedarmo, Sumarmo SP. Demam Berdarah (Dengue) Pada Anak. Jakarta: UI-Press, 2005
  11. Soedarmo, Sumarmo SP. Demam Berdarah (Dengue) Pada Anak. Jakarta: UI-Press, 2005
  12. WHO. Chemical Methods For Control Of Arthropoda Of Public Health Importance. Geneva. WHO publications, 1984
  13. Anggraeni YM, Christina P, Wianto R. Uji Daya Bunuh Ekstrak Kristal Endotoksin *Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14) terhadap Jentik *Aedes aegypti*, *Anopheles aconitus* dan *Culex quinquefasciatus*. Jurnal Sain Veteriner Vol.31 No.1, Juli 2013
  14. Suryaningtyas NH. Berbagai Cara Pengendalian Larva Nyamuk. (Online) <http://www.ejournal.litbang.depkes.go.id/index.php/.../640>, 2011
  15. Singer S, Rogoff SG. Inhibition of Growth of *Bacillus thuringiensis* by amino acid in defined media. Invert path, 1968
  16. Purnama SG, Pandi DS, Sudian IG. Pemanfaatan Limbah Cair Industri Pengolahan Tahu Untuk Memproduksi Spora *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Dan Aplikasinya Sebagai Biokontrol Larva Nyamuk. Indonesian Journal of Public Health Vol. 1 No. 1: 1-9, Juli 2012
  17. Blondine ChP. Efektivitas Berbagai Konsentrasi Formulasi Cair *Bacillus Thuringiensis* H-14 Galur Lokal Dalam Media Infus Kedelai terhadap Jentik *Anopheles Maculatus* di Kecamatan Kokap Kabupaten Kulon Progo Diy. Jurnal Kedokteran Yarsi. Januari-April; 12 (1): 22-28. 2004
  18. Burges HD, Hussey NW. Microbial Control Of Insects And Mites, Volume 4. London, New York. Academic Press. hlm. 507-540. Dulmage, T. 1993