

**Strategi Pemberantasan Nyamuk Aman Lingkungan:
Potensi *Bacillus thuringiensis* Isolat Madura Sebagai Musuh Alami
Nyamuk *Aedes aegypti***

***Safe Strategy to Control Mosquito: The Potential of
Bacillus thuringiensis Isolate Indogenous from Madura as a Natural
Enemies of Mosquito (Aedes aegypti)***

Zulfaidah Penata Gama^{1*}, Bagyo Yanuwadi¹, Tri Handayani Kurniati²

¹Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya, Malang

²Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Jakarta, Jakarta

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui toksisitas *Bacillus thuringiensis* isolat Madura terhadap berbagai instar larva nyamuk *Aedes aegypti* dan pengaruh toksin yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis* isolat Madura terhadap struktur epitel dan jaringan usus larva nyamuk *A. aegypti*. Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan percobaan faktorial, dengan kombinasi perlakuan ditempatkan menurut RAK dan diulang 3 kali. Setelah *rearing* larva nyamuk, dilanjutkan dengan pembuatan suspensi bakteri dengan seri pengenceran 10^0-10^{-5} . Jumlah bakteri dihitung, diikuti perhitungan jumlah spora bakteri dengan metode TVSC, kemudian dilanjutkan uji toksisitas bakteri terhadap berbagai instar larva nyamuk. Setelah 24 jam kemudian dihitung jumlah larva yang mati. Tingkat kerusakan yang ditimbulkan oleh bakteri dilihat dengan cara dibuat irisan melintang larva nyamuk dengan metode parafin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa toksisitas bakteri *B. thuringiensis* isolat Madura dalam membunuh larva nyamuk instar I sampai 88,89%. Toksisitas yang tinggi tersebut terdapat pada kepadatan bakteri sebanyak $1,51 \times 10^8$ selml⁻¹, tetapi untuk kepadatan bakteri di bawahnya kurang efektif dalam membunuh larva nyamuk *Aedes aegypti*. Pada kepadatan bakteri tertinggi, semakin tua umur stadium larva nyamuk maka semakin resisten terhadap serangan toksin yang dihasilkan oleh bakteri *B. thuringiensis* isolat Madura. Nilai LC_{50-24 jam} untuk instar I sebesar $8,08 \times 10^7$ selml⁻¹, instar II sebesar $9,09 \times 10^7$ selml⁻¹, instar III sebesar $3,94 \times 10^8$ selml⁻¹ dan instar IV sebesar $2,66 \times 10^8$ selml⁻¹. Pengaruh kristal toksin *B. thuringiensis* isolat Madura terhadap struktur epitel dan jaringan usus tampak pada jaringan usus yang tidak utuh dan inti sel epitel hancur serta bagian dalam usus berlubang-lubang, sedangkan bagian luarnya berwarna hitam.

Kata kunci: *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis*, musuh alami, pemberantasan

Abstract

The aim of this study is to investigate toxicity of *Bacillus thuringiensis* which is isolated from Madura Island as natural enemy of *Aedes aegypti* larvae. The larvae of *Aedes aegypti* were reared to provide F2 generation in the laboratory. Larvae selection was carried out by exposing the first, second, third and fourth instar larvae of *Aedes aegypti* (15 larvae in each dilution) for 24 hour to each concentration of *Bacillus thuringiensis* was isolated from Madura island which had been determined LC_{50-24 h} to cause about 50% larvae mortality. Number of bacteria spora is known with TVSC method. Cross section of larvae is made with paraffin method to know level of destruction due to bacteria. The result of the study indicated that *Bacillus thuringiensis* isolated from Madura Island able to kill first instar of *Aedes aegypti* larvae until 88,89%. High toxicity of bacteria in the density of bacteria cell is $1,51 \times 10^8$ cellml⁻¹. The bacteria cell density less than $1,51 \times 10^8$ cellml⁻¹ not effective. In the highest density, the older stadium of larvae more resistance than the younger stadium larvae. Average of LC_{50-24 h} for first instar larvae is $8,08 \times 10^7$ cellml⁻¹, second instar is $9,09 \times 10^7$ cellml⁻¹, third

instar is $3,94 \times 10^8 \text{ cell ml}^{-1}$ and fourth instar is $2,66 \times 10^8 \text{ cell ml}^{-1}$. The toxin's of *Bacillus thuringiensis* effects affect structure of epitel and intestine tissue of *Aedes aegypti* larvae are not complete. This phenomena indicates that *Bacillus thuringiensis* from Madura Island have its potential to become biocontrol of *Aedes aegypti*.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis*, biocontrol, natural enemy

PENDAHULUAN

Di daerah tropis seperti Indonesia, nyamuk merupakan serangga yang sering mengganggu kehidupan manusia. Selain itu nyamuk juga dapat menyebarkan penyakit Malaria, Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Filariasis. Pada tahun 2001, wabah Demam Berdarah Dengue masih menyerang hampir seluruh daerah di Indonesia, baik daerah perkotaan maupun pedesaan. Wabah DBD juga menyerang pada bayi, anak-anak serta orang dewasa, sehingga tidak sedikit penderita tersebut yang meninggal dunia (Santoso, 2003). Menurut Mapata (2000) penyakit Demam Berdarah Dengue termasuk penyakit yang disebabkan oleh virus dari golongan *Arbovirus* dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti*.

Untuk mengatasi hal tersebut, manusia lebih cenderung menggunakan insektisida atau obat pembasmi nyamuk yang dijual bebas seperti obat nyamuk bakar, *tissue* oles, elektrik dan sebagainya. Semua usaha pemberantasan nyamuk tersebut hanya bersifat sesaat dan tidak memiliki efek pencegahan. Penggunaan bahan-bahan kimia untuk mengendalikan nyamuk *Aedes aegypti* secara terus menerus dapat menyebabkan peningkatan resistensi serangga terhadap insektisida kimia, polusi lingkungan serta meningkatnya biaya yang dikeluarkan untuk pestisida (Blondine dan Yuniarti, 2001). Menurut Arronson dan Geisser (1992), salah satu cara yang dapat dilakukan untuk memberantas nyamuk dan aman bagi lingkungan adalah menggunakan musuh alami nyamuk, yaitu dengan menggunakan bakteri *Bacillus thuringiensis* (Dulmage, et al., 1990).

Salah satu karakteristik dari *Bacillus thuringiensis* adalah dapat memproduksi

kristal protein di dalam sel bersama-sama dengan spora pada waktu sel mengalami sporulasi (Blondine dan Yuniarti, 2001). Kristal protein tersebut bersifat toksis terhadap anggota Diptera baik larva atau dewasa (Soesanto, 1992). Pada fase sporulasi, bakteri tersebut membentuk spora pada salah satu ujung sel dan kristal protein pada ujung lainnya. Kristal ini disebut *badan paraspora* atau *delta endotoksin* yang toksis apabila terhidrolisis di dalam tubuh inang. Gliko-protein yang toksis tersebut sebenarnya masih berupa protoksin di dalam sel *B. thuringiensis*, artinya belum mempunyai sifat toksis.

Serangga yang peka terhadap bakteri tersebut adalah yang 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 Malphigi, syaraf, *trachea*, badan lemak dan integumen, akhirnya dapat membunuh inangnya (Abdel-Hammed et al., 1991).

Penelitian dengan menggunakan *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* sudah sering dilakukan untuk pengendali nyamuk, baik dalam bentuk produk komersial maupun isolat murni tetapi *Bacillus thuringiensis* isolat lokal jarang sekali dipergunakan sebagai musuh alami. Pada penelitian yang dilakukan oleh Gama, et al. (2000), menunjukkan bahwa daya bunuh *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* lebih kecil daripada daya bunuh *Bacillus thuringiensis* isolat Madura. Oleh karena hal tersebut maka pada penelitian ini yang digunakan sebagai pengendali nyamuk *Aedes aegypti* adalah *Bacillus thuringiensis* isolat Madura yang dihitung jumlah sporanya

* Alamat Korespondensi:

Zulfaidah Penata Gama

E-mail : Zulfaidah@ub.ac.id

Alamat : Laboratorium Ekologi dan Biodiversitas
Hewan, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas
Brawijaya, Jl. Veteran, Malang, 65154

terlebih dulu sebagai indikasi bahwa jumlah toksinnya telah memenuhi target untuk uji toksisitas bakteri terhadap larva nyamuk, sehingga pengaruhnya pada berbagai instar larva nyamuk juga dapat diamati. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui toksisitas bakteri *Bacillus thuringiensis* isolat Madura terhadap berbagai instar larva nyamuk *Aedes aegypti* dan pengaruh toksin yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus thuringiensis* isolat Madura terhadap struktur epitel dan jaringan usus (jika diamati dari irisan melintang atau *Cross Section*) larva nyamuk *Aedes aegypti*.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai instar larva *Aedes aegypti* yang rentan terhadap *Bacillus thuringiensis* isolat Madura serta pengaruh toksin (kristal paraspora) yang dihasilkan bakteri tersebut terhadap epitel dan jaringan usus dalam tubuh larva nyamuk *Aedes aegypti*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Ekologi dan Biodiversitas Hewan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Bahan yang digunakan adalah larva dan telur nyamuk *Aedes aegypti* yang diperoleh dari Stasiun Penelitian Vektor Penyakit (SPVP) Salatiga, akuades, pakan anjing kering, marmut (*Cavia cobaya*), biakan bakteri *Bacillus thuringiensis* isolat Madura, media nutrisi cair ekstrak khamir, media nutrisi agar, kertas saring, etanol 70%, kertas *tissue*, air sumur, malakit hijau, safranin, air gula, kapas.

Pemeliharaan Larva Nyamuk

Proses aklimatisasi nyamuk *Aedes aegypti* dilakukan terlebih dulu agar nyamuk dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru (kondisi laboratorium). Telur yang diperoleh dari SPVP Salatiga ditetaskan pada bak plastik berukuran (20x30x5) cm³ yang telah diisi air sumur setinggi $\frac{3}{4}$ bak plastik. Selama proses penetasan sampai akhir pengamatan, masing-masing bak plastik disinari lampu 15 watt untuk mempercepat proses siklus hidup nyamuk. Setelah telur menetas menjadi larva, maka larva dipindahkan ke bak plastik lain yang telah diisi air sumur setinggi $\frac{3}{4}$ bak plastik tersebut dan diberi makanan berupa pakan anjing yang dilakukan setiap 24 jam. Telur nyamuk yang dipergunakan untuk uji

toksitas adalah dari generasi F-2 yang sudah beradaptasi dengan lingkungan laboratorium.

Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan untuk berbagai tingkat pengenceran yaitu pengenceran 10^0 – 10^{-5} , kemudian dilanjutkan dengan penghitungan jumlah endospora bakteri dengan metode TVSC.

Uji Toksisitas Bakteri terhadap Larva Nyamuk

Uji toksisitas dilakukan dengan cara menempatkan 15 larva nyamuk dari berbagai instar ke dalam cawan petri dan ditambahkan suspensi bakteri untuk masing-masing seri pengenceran. Selanjutnya dihitung jumlah larva yang mati setelah 24 jam perlakuan.

Pembuatan Cross Section Larva

Setelah didapatkan jumlah larva nyamuk yang mati setelah 24 jam perlakuan maka dilakukan pembuatan preparat irisan melintang larva nyamuk dengan metode parafin untuk mengamati kerusakan yang terjadi pada epitel dan jaringan usus larva nyamuk.

Analisa Data

Nilai *Lethal Concentration* 50 dalam jangka waktu 24 jam ($LC_{50-24jam}$) dari hasil uji toksisitas *Bacillus thuringiensis* isolat Madura terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* dan hasilnya dianalisa dengan analisa *probit for windows release* 11.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Toksisitas

Hasil analisis ragam uji toksisitas *Bacillus thuringiensis* isolat Madura terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* (Tabel 3) menunjukkan bahwa stadia larva dan pengenceran yang digunakan untuk uji toksisitas memiliki pengaruh yang berbeda nyata. Demikian juga dengan interaksi antara stadia larva dengan pengenceran juga memiliki pengaruh yang berbeda.

Hasil uji beda nyata jujur antara seri pengenceran bakteri terhadap toksisitas *B. thuringiensis* isolat Madura terhadap larva nyamuk *A. aegypti* menunjukkan bahwa seri pengenceran bakteri yang digunakan memiliki pengaruh yang berbeda nyata terhadap larva nyamuk. Berdasarkan hasil analisis tersebut (Tabel 4) didapatkan bahwa tanpa pengen-

ceran (10^0) dengan jumlah bakteri 10^8 selml⁻¹, tingkat toksisitas *B. thuringiensis* isolat Madura lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-5} . Hal ini disebabkan kepadatan bakteri masih tinggi (belum mengalami pengenceran) sehingga jumlah kristal protein yang terbentuk juga lebih banyak dibandingkan dengan konsentrasi bakteri setelah mengalami pengenceran dengan akuades. Perbedaan ini juga menunjukkan bahwa pada kepadatan bakteri sebanyak 10^8 selml⁻¹ atau tanpa pengenceran (10^0) merupakan kepadatan bakteri yang mampu membunuh larva nyamuk dengan baik dibandingkan dengan seri pengenceran di atasnya (10^{-1} sampai 10^{-5}). Hal ini sesuai jika dilihat dari kepadatan bakteri (selml⁻¹) dari masing-masing pengenceran (Tabel 5), yang menunjukkan semakin banyak pengenceran maka kepadatan bakteri semakin berkurang.

Rata-rata kepadatan bakteri pada pengenceran 10^0 yaitu $1,51 \times 10^8$ selml⁻¹ memang lebih banyak jika dibandingkan dengan kepadatan bakteri pada pengenceran sesudahnya. Semakin banyak jumlah bakteri *B. thuringiensis* isolat Madura maka diperkirakan semakin banyak pula kristal protein yang dihasilkan untuk membunuh larva nyamuk *A. aegypti*.

Pada Tabel 1 di atas menunjukkan bahwa dari seri pengenceran yang paling banyak menyebabkan larva mati adalah pada tingkat pengenceran bakteri 10^0 . Pada tingkat pengenceran 10^0 dengan kepadatan bakteri sebesar $1,51 \times 10^8$ selml⁻¹ tersebut, dari keempat instar larva nyamuk *A. aegypti* yang paling peka adalah pada instar I, karena persentase kematiannya paling besar yaitu 88,89%. Pada instar II, persentase kematiannya adalah 64,44% kemudian persentase kematian larva instar III dan IV masing-masing adalah 26,67% dan 11,11%. Pada kepadatan bakteri $1,51 \times 10^8$ selml⁻¹ juga menunjukkan bahwa semakin tua umur instar larva nyamuk, maka semakin resisten terhadap *B. thuringiensis* isolat Madura. Hal ini disebabkan adanya perbedaan perkembangan jumlah sel penyusun saluran pencernaan larva pada setiap instarnya. Instar I dan II mengalami perkembangan sel-sel saluran pencernaan, terutama usus tengah (*midgut*) yang hampir sama jika dibandingkan dengan instar III dan IV yang telah mengalami perkembangan lebih lanjut.

Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang tampak pada tabel 2 di atas, karena instar I, II dan III berbeda nyata, sedangkan instar III dan IV memiliki persentase yang hampir sama. Masing-masing sel epitel usus tengah hanya berumur pendek dan secara tetap akan diganti dan akan bertambah jumlahnya seiring dengan bertambahnya umur larva (Borror *et al.*, 1992), sehingga semakin banyak jumlah sel penyusun saluran pencernaan larva nyamuk maka semakin resisten larva nyamuk tersebut terhadap serangan toksin. Selain itu resistensi larva nyamuk akan bertambah dengan adanya perkembangan selaput peritrofik yang membatasi epitel usus tengah dan makanan di dalam usus tersebut. Diduga selaput ini berfungsi untuk membatasi kerusakan epitel, untuk menghambat gerakan patogen-patogen dari makanan menuju jaringan-jaringan larva. Selaput peritrofik merupakan suatu jaringan yang tidak hidup dan terbuat dari khitin dan protein yang disekresikan oleh epitel (Borror *et al.*, 1992).

Pada pengenceran 10^0 (jumlah sel bakteri $\pm 1,51 \times 10^8$ selml⁻¹) dapat membunuh lebih banyak larva *A. aegypti* dibandingkan dengan tingkat pengenceran di atasnya (10^{-1} – 10^{-5}). Hal ini disebabkan oleh spora yang terbentuk pada konsentrasi 10^0 maksimal atau banyak sekali dibandingkan dengan jumlah spora pada pengenceran di atasnya. Semakin banyak spora yang terbentuk pada *B. thuringiensis* diperkirakan semakin banyak pula kristal toksin atau protein yang dilepaskan untuk membunuh larva *A. aegypti*. Hal ini menurut Trizelia (2001), kristal protein tersebut akan dilepaskan 2-3 jam setelah akhir fase eksponensial dan baru keluar dari sel pada waktu sel mengalami *autolisis* setelah spora terbentuk (*Sporulasi* sempurna). Jumlah spora yang terbentuk untuk masing-masing seri pengenceran dapat dilihat dari hasil uji TVSC (Tabel 6).

Pada Gambar 5, di atas tampak bahwa epitel dan jaringan usus masih utuh dan belum mengalami kerusakan (lisis). Demikian juga dengan bentuk *muscularis* usus bagian tengah (*midgut*) masih tampak bagus dan utuh. Berdasarkan Gambar 5, diketahui adanya selaput peritrofik, tetapi tidak utuh karena terputus saat proses *embedding*. Penelitian ini hanya mampu membuat irisan melintang larva nyamuk *A. aegypti* instar IV

saja, karena struktur tubuh dari larva instar I, II dan III sangat lunak dan berukuran kecil sekali sehingga saat dilakukan proses *embedding* atau penanaman akan mengalami kerusakan dan akhirnya hancur. Pada proses penanaman tersebut posisi larva untuk masuk ke parafin harus diatur sedemikian rupa sehingga saat dilakukan pemotongan dapat teriris dengan baik. Pengaturan ini yang terlalu sulit, sehingga untuk instar yang berukuran kecil tersebut dapat hancur dan setelah dilakukan pengirisan tampak ada bagian yang terputus seperti selaput peritrofik. Hal ini diduga disebabkan ada posisi yang tidak lurus saat penanaman larva ke dalam parafin, sehingga saat parafin mengeras bagian dalam larva ada yang rusak.

Pada Gambar 6, tampak tanda-tanda kerusakan epitel dan saluran pencernaan yang timbul akibat aktivitas kristal protein (toksin) yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis* isolat Madura. Pada jaringan usus tampak berlubang dan pada tepi lubang-lubang tersebut tampak warna gelap (hitam) yang mengelilingi jaringan tersebut. Hal ini disebabkan karena aktivitas kristal protein yang dihasilkan oleh bakteri *B. thuringiensis* isolat Madura, sedangkan bentuk usus tengah (*midgut*) sudah tidak utuh lagi dan selaput peritrofik serta *muscularis*-nya sudah tidak tampak lagi. Hal ini disebabkan oleh larva nyamuk mempunyai saluran pencernaan yang bersifat alkali (basa) dan menghasilkan mineral serta enzim protease yang dapat menguraikan kristal protein, yang bersifat protoksin menjadi toksin (Schlegel, 1984; English dan Slatin, 1992 dalam Trizelia, 2001). Menurut Hoffe dan Whiteley (1989), English dan Slatin (1992), Dai dan Gill (1993) dalam Trizelia (2001), beberapa menit setelah masuk ke dalam saluran pencernaan larva nyamuk, toksin melewati membran tropik dan kemudian terikat pada reseptor khusus yang terdapat pada mikrovili sel epitel mesenteron. Setelah berikatan, toksin akan membentuk pori-pori kecil berukuran 0,5-1,0 nm. Akibatnya keseimbangan osmotik dari sel menjadi terganggu, sehingga ion-ion dan air mudah masuk ke dalam sel dan menyebabkan sel mengembang kemudian pecah sehingga akhirnya menyebabkan lisis atau hancur. Sel-sel epitel yang telah hancur

tersebut akan terpisah dari membran dasar dan terlepas ke dalam lumen. Sebagai akibat adanya kerusakan dan kehancuran dari sel-sel epitel menyebabkan membran dasar mudah dirusak oleh *B. thuringiensis* (Faust, 1974; Trizelia, 1994 dalam Trizelia, 2001). Hal ini jelas sekali terlihat dari irisan melintang larva nyamuk yang sudah mendapatkan perlakuan *B. thuringiensis* isolat Madura (Gambar 6). Toksin juga menghambat pembentukan ATP, merusak transportasi ion dan glukosa dan menghambat gerakan kontraksi otot-otot mesenteron (Trizelia, 2001).

Akibat terjadinya kerusakan pada struktur dan fungsi usus, zat-zat metabolik seperti ion akan keluar dari lumen dan masuk ke dalam hemolimfa yang menimbulkan *paralysis* dan akhirnya larva mati. Kematian akan terjadi satu jam hingga 4 sampai 5 hari setelah intoksikasi, tergantung pada konsentrasi bakteri, ukuran dan jenis larva serta varietas bakteri yang digunakan (Trizelia, 2001).

Berdasarkan hasil pengamatan menunjukkan bahwa setelah larva mati, larva tersebut kelihatan berwarna lebih muda daripada larva yang sehat, karena pada bagian yang lisis tampak lebih transparan dan perubahan warna biasanya dimulai dari bagian anterior kemudian ke bagian posterior. Tetapi pada bagian-bagian tertentu, seperti pada epitel tampak adanya warna hitam sebagai akibat serangan toksin bakteri *B. thuringiensis* isolat Madura. Ukuran tubuh larva semakin lama semakin mengkerut dengan kepala yang masih utuh. Larva yang tidak mati atau mampu bertahan hidup dari serangan toksin yang dihasilkan *B. thuringiensis* isolat Madura dapat berhasil menjadi pupa dan imago. Menurut Trizelia (2001), setelah serangga mati, serangga kelihatan berwarna coklat tua atau hitam dan perubahan warna dimulai dari bagian anterior lalu ke bagian posterior. Tubuh serangga kemudian mengering dan mengkerut dengan integumen yang masih utuh. Infeksi *B. thuringiensis* pada kasus tertentu tidak mematikan larva, tetapi larva masih mampu bertahan hidup dan berhasil menjadi pupa dan imago. Imago yang terbentuk tersebut biasanya berukuran kecil, cacat, lama hidupnya lebih pendek dan kemampuan meletakkan telurnya berkurang atau mandul (Trizelia, 2001).

Tabel 1. Hasil Uji Beda Nyata Jujur pada Interaksi antara Tingkat Pengenceran Bakteri *Bacillus thuringiensis* Isolat Madura dengan Persentase Kematian Larva Nyamuk *Aedes aegypti* (pada masing-masing instar)

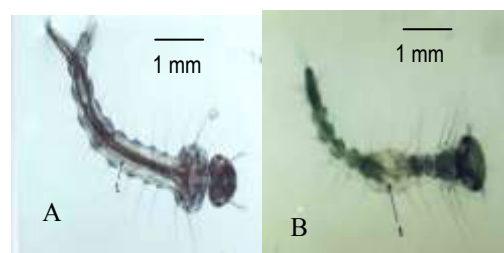
Pengenceran	Persentase Kematian Larva Nyamuk pada			
	Instar I	Instar II	Instar III	Instar IV
10^0	88,89 d	64,44 c	26,67 b	11,11 ab
10^{-1}	2,22 a	0,00 a	2,22 a	4,44 ab
10^{-2}	2,22 a	2,22 a	4,44 a	0,00 a
10^{-3}	0,00 a	0,00 a	2,22 a	0,00 a
10^{-4}	6,67 ab	0,00 a	0,00 a	0,00 a
10^{-5}	2,22 a	0,00 a	2,22 a	0,00 a

Keterangan: Huruf yang sama di belakang angka menunjukkan bahwa pengenceran tersebut tidak berbeda nyata pada uji beda nyata jujur dengan $\alpha = 0,05$

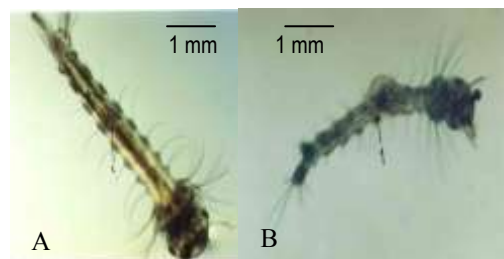
Tabel 2. Hasil Uji Beda Nyata Jujur untuk $LC_{50-24jam}$ pada Masing-masing Instar Larva *A. aegypti*.

Instar	N	Subset untuk $\alpha = 0,05$
1	3	80765494 a
2	3	$1,24 \times 10^8$ a
3	3	$3,94 \times 10^8$ a
4	2	$2,66 \times 10^8$ a

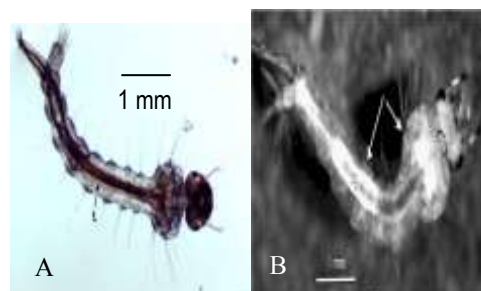
Keterangan: Huruf yang sama di belakang angka menunjukkan bahwa $LC_{50-24 jam}$ tersebut tidak berbeda nyata pada uji beda nyata jujur dengan $\alpha = 0,05$



Gambar 1. (A) Larva *Aedes aegypti* Instar I Sehat (B) Larva *A. aegypti* Instar I Setelah Perlakuan



Gambar 2. (A) Larva *Aedes aegypti* Instar II Sehat (B) Larva *Aedes aegypti* Instar II Setelah Perlakuan



Gambar 3. (A) Larva *Aedes aegypti* Instar III Sehat (B) Larva *Aedes aegypti* Instar III Setelah Perlakuan



Gambar 4. (A) Larva *Aedes aegypti* Instar IV Sehat (B) Larva *Aedes aegypti* Instar IV Setelah Perlakuan



Gambar 5. Irisan Melintang Larva Nyamuk *A. aegypti* Instar IV Sehat
(A) Irisan seluruh jaringan usus (B) Sebagian irisan jaringan usus larva

Keterangan :

- Ep = Epitel
- L = Lumen
- M = Muscularis
- MT = Membran tubuh larva
- S = Selaput peritrofik
- = 1 skala = 21,26 μm (A)
- = 1 skala = 20,64 μm (B)

Hasil Analisa Probit untuk $LC_{50-24\text{jam}}$

Berdasarkan data pada Tabel Lampiran 2, tersebut menunjukkan bahwa *B. thuringiensis* isolat Madura mampu membunuh 50% dari larva nyamuk *A. aegypti* yang dicobakan dalam waktu 24 jam pada masing-masing instar larva yang dinyatakan dalam $LC_{50-24\text{jam}}$. Nilai $LC_{50-24\text{jam}}$ untuk instar IV ulangan 1 tidak dapat ditentukan karena pada instar IV tersebut kemungkinan sudah resisten terhadap *B. thuringiensis* isolat Madura sehingga tidak ditemukan larva yang mati setelah 24 jam perlakuan dengan *B. thuringiensis* isolat Madura.

Nilai $LC_{50-24\text{jam}}$ untuk masing-masing instar relatif sama, meskipun nilai $LC_{50-24\text{jam}}$ untuk instar I adalah yang paling kecil dibandingkan dengan $LC_{50-24\text{jam}}$ untuk ketiga instar yang lebih tua umurnya (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa untuk membunuh 50% larva nyamuk *A. aegypti* instar I dibutuhkan

jumlah bakteri yang lebih sedikit dibandingkan untuk membunuh 50% larva nyamuk instar II, III dan IV.

Hal ini disebabkan karena instar I lebih peka terhadap toksin yang dihasilkan *B. thuringiensis* isolat Madura daripada larva instar II, III dan IV yang telah mempunyai lebih banyak jumlah epitel dalam saluran pencernaan, sehingga sulit ditembus oleh kristal protein yang dihasilkan *B. thuringiensis* isolat Madura.

Hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Gama et al. (2000), diketahui bahwa *B. thuringiensis* isolat Madura juga mampu membunuh larva nyamuk *A. aegypti* pada konsentrasi pengenceran bakteri 10^{-1} dalam waktu 24 jam terhadap larva instar I sebesar 37%. Sedangkan pada penelitian ini, pada konsentrasi yang sama didapatkan daya bunuh hanya sebesar 2,22%. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh virulensi bakteri

Bacillus thuringiensis isolat Madura sudah mulai menurun karena stok bakteri yang digunakan untuk penelitian ini adalah stok yang lama sudah mengalami beberapa kali peremajaan.

Persamaan hasil penelitian di atas dengan hasil penelitian Gama et al., (2000) adalah pada pengenceran terendah (untuk penelitian di atas adalah tanpa pengenceran [10^0] dan untuk penelitian Gama et al., pada pengenceran 10^{-1}) jumlah larva mati lebih banyak dibandingkan dengan pengenceran di atasnya. Perbedaan tingkat kepekaan instar larva nyamuk terhadap *B.thuringiensis* isolat Madura diduga dipengaruhi oleh perkembangan sel penyusun saluran pencernaan pada setiap instarnya. Efektivitas strain *B.thuringiensis* dapat dipengaruhi oleh berbagai macam faktor, yaitu instar larva nyamuk, makanan, periode pemaparan, kualitas air, strain bakteri, suhu air (Becker dan Margalit, 1992 dalam Sukarno et al., 2000), adanya toksin di daerah makan larva dan perilaku makan dari larva nyamuk sasaran (Mulla et al., 1986 dalam Sukarno et al., 2000).

KESIMPULAN

Daya toksisitas bakteri *Bacillus thuringiensis* isolat Madura cukup besar yaitu dapat membunuh larva nyamuk *Aedes aegypti* instar I sampai 88,89%. Daya toksisitas yang tinggi tersebut terdapat pada kepadatan bakteri sebanyak $1,51 \times 10^8$ selml⁻¹, tetapi untuk kepadatan bakteri di bawahnya kurang efektif dalam membunuh larva nyamuk *Aedes aegypti*. Pada kepadatan bakteri tertinggi ($1,51 \times 10^8$ selml⁻¹), semakin tua umur stadium larva nyamuk maka semakin resisten terhadap serangan toksin yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus thuringiensis* isolat Madura. Hal ini dibuktikan dengan adanya rata-rata nilai $LC_{50-24 jam}$ yaitu untuk instar I sebesar $8,08 \times 10^7$ selml⁻¹, instar II sebesar $9,09 \times 10^7$ selml⁻¹, instar III sebesar $3,94 \times 10^8$ selml⁻¹ dan instar IV sebesar $2,66 \times 10^8$ selml⁻¹.

Pengaruh kristal protein atau toksin *Bacillus thuringiensis* isolat Madura terhadap struktur epitelium dan jaringan usus sangat nyata, karena setelah perlakuan dengan *Bacillus thuringiensis* isolat Madura struktur epitelium dan jaringan usus menjadi berlubang, hancur dan tidak tersusun rapi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Hammed, A.G. Carlberg, O.M. El-Tayeb, 1991. Composition and Toxicity of the Mosquitocidal Parasporal Inclusions. *J.Microbial Biotechnol.* 7:237-243.
- Arronson, I.A., M. Geisser. 1992. Properties of *Bacillus thuringiensis* and Its Intracellular Crystal Protein. In Biology of Bacilli. Doi. H.R., Martina Mc. Gloughin (Eds). Butterworth-Heinemann. Washington.
- Becker, N., J. Margalit. 1993. *Uses of Bacillus thuringiensis israelensis against Mosquitoes and Black Flies*. An Environmental Biopesticide Theory and Practice. John Wiley and Sons. England.
- Blondine Ch. P., R.A. Yuniarti. 2001. Uji Patogenisitas Isolat *B. thuringiensis* yang Ditumbuhkan dalam Buah Kelapa terhadap berbagai Jentik Nyamuk di Laboratorium. Stasiun Penelitian Vektor Penyakit, Salatiga. *J. Cermin Dunia Kedokteran*. 131:20-22.
- Blondine, Ch. P., U. Widyastuti, 2001. Patogenisitas Isolat *B. thuringiensis* setelah Dikeringkan pada Suhu Dingin (*Lyophilisasi*) terhadap Jentik *Aedes aegypti* di Laboratorium. Stasiun Penelitian Vektor Penyakit, Salatiga. *J. Cermin Dunia Kedokteran*. 131:10-12.
- Brown, H.W. 1979. *Dasar Parasitologi Klinis*. terjemahan, Bintari Rukmono. Gramedia. Jakarta.
- Burges, H.D. 1981. Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press. London.
- Dulmage, T.H, A.L. Lacey, S. Singer, A.A. Yousten. 1990. Guidelines for Production *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/WHO World Research and Training in Tropical Disease. New York.
- Gama, Z.P., Suharjo, G. Ekowati. 1998. Potensi Patogenitas *Bacillus thuringiensis* var. israelensis serotype H-14 dan *Bacillus thuringiensis* Isolat Madura terhadap Larva Nyamuk. Laporan Penelitian. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- Gama, Z.P. 2000. Usaha Pengendalian Secara Biologis Terhadap Bahan (Organisme)

- Pencemar Perairan. *J.Natural.* 4(2):136-141.
- Ibarra, J.E., B.A. Federici. 1987. Comparison of The Toxicity, Parasporal Body Protein Composition and Plasmid Complement of Nine Isolates of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. *J.Econ.Entomol.* 80(6):1131-1136.
- Lane, R.P., W.C. Roger. 1993. *Medical Insect and Arachnids*. Chapman and Hall. London.
- Mapata, S. 2000. *Pengenalan Dini Demam Berdarah Dengue*.
- Morris, O.N., M. Trottier, V. Converse, P. Kanagaratman. 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* for *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Nuctuidae). *J. Econ.Entomol.* 80 (2):359-365.
- Richards, O.W., R.G. Davies. 1960. *A General Textbook of Entomology*. Methuen & CO LTD. London.
- Santoso, M. 2003. *Partisipasi Masyarakat Perlu Digiatkan, Demam Berdarah Terus Telan Korban. Pikiran Rakyat*, 17 Januari 2003.
- Soedarto. 1990. *Entomologi Kedokteran*. Penerbit Buku Kedokteran. EGC.
- Jakarta.
- Soesanto. 1992. *Bacillus thuringiensis sebagai Bioinsektisida*. UGM. Yogyakarta.
- Storer, T.I., R.L. Usinger. 1957. *General Zoology*. 3th edition. McGraw-Hill Book Company. INC. New York.
- Sukarno, Blondine Ch. P., R. Wiranto. 2000. Pengendalian Vektor (Jentik) Demam Berdarah, Malaria, Filariasis menggunakan Strain Lokal *Bacillus thuringiensis* Varietas *Israelensis*. *Medika*. 26(1):16-19.
- Trizelia. 2001. Pemanfaatan *Bacillus thuringiensis* untuk Pengendalian Hama *Crocidolomia binotalis*. Makalah Falsafah Sains (PPs 702) Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Widyastuti, U., D.T. Boewono, S. Nalim. 1996. Efikasi *Bacillus thuringiensis* H-14 (Vectobac 12 AS) terhadap Jentik *Anopheles*. *Majalah Kesehatan Masyarakat Departemen Kesehatan*.
- Widyastuti, U., R.A. Yuniarti, Y. Ariati, Ch.P. Blondine. 2001. Uji coba Culinex T untuk Pengendalian Jentik *Aedes aegypti* di Kecamatan Ambarawa, Jawa Tengah. *Cermin Dunia Kedokteran*. 131:16-19.

Lampiran

Lampiran 1. Hasil Analisa Statistik terhadap Uji Toksisitas *Bacillus thuringiensis* Isolat Madura terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti*

Tabel 3. Analisis Ragam Uji Toksisitas *Bacillus thuringiensis* Isolat Madura terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F	Sig.
Instar Larva (I)	3	1807,40	602,46	13,56	0,0*
Pengenceran (P)	6	222271,9	3711,9	83,5	0,0*
I * P	18	9651,8	536,21	12,07	0,0*
Galat Percobaan	57	2488,8	44,444		
Total	84	41511,1			

Keterangan: *: Berbeda Nyata

Tabel 4. Hasil Uji Beda Nyata Jujur antara Seri Pengenceran Bakteri terhadap Toksisitas *B. thuringiensis* Isolat Madura terhadap Larva Nyamuk *A. aegypti* dengan $\alpha = 0,05$

Pengenceran	N	Subset untuk $\alpha = 0,05$	
Kontrol	12	0,0000	a
10^{-5}	12	1,1111	a
10^{-4}	12	1,6667	a
10^{-3}	12	0,5556	a
10^{-2}	12	2,2222	a
10^{-1}	12	2,2222	a
10^0 (tanpa pengenceran)	12	47,7778	b

Keterangan: Huruf yang sama di belakang angka menunjukkan bahwa pengenceran tersebut tidak berbeda nyata pada uji beda nyata jujur dengan $\alpha = 0,05$

Lampiran 2. Kepadatan Sel Bakteri dan Jumlah Endospora *Bacillus thuringiensis* isolat Madura

Tabel 5. Kepadatan Sel Bakteri *Bacillus thuringiensis* isolat Madura (sel/ml) pada Masing-masing Seri Pengenceran

Ulangan	Kepadatan Sel Bakteri (sel/ml) pada tingkat pengenceran					
	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1	$1,75 \times 10^8$	$9,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	6×10^5	3×10^5	5×10^4
2	$1,39 \times 10^8$	$9,2 \times 10^6$	$8,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	5×10^4
3	$1,38 \times 10^8$	$8,2 \times 10^6$	$8,5 \times 10^5$	6×10^5	$4,5 \times 10^5$	5×10^4
Rerata	$1,51 \times 10^8$	9×10^6	$1,27 \times 10^6$	$6,17 \times 10^5$	4×10^5	5×10^4

Tabel 6. Jumlah endospora *Bacillus thuringiensis* isolat Madura (sel/ml) dengan Metode TVSC

Ulangan	Jumlah endospora pada tingkat Pengenceran Bakteri (sel/ml)						Jumlah Endospora (sel/ml)
	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
1	>300	>300	218	23	5	3	$21,80 \times 10^3$
2	>300	>300	187	77	7	0	$47,85 \times 10^3$
3	>300	>300	182	59	12	2	$38,60 \times 10^3$
Rerata							$36,08 \times 10^3$