

Efektivitas *Bacillus thuringiensis* dalam Pengendalian Larva Nyamuk *Anopheles* sp

Citra Inneke Wibowo¹

¹Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman
Email: citrainneke01@gmail.com

Abstract

Anopheles mosquito is a vector of malaria. Malaria vector control can be done biologically by using *Bacillus thuringiensis* mechanism of controlling that parasite is works by producing a toxin that can kill larvae of mosquito. The purpose of the study was to determine the effectiveness of of *Bacillus thuringiensis* concentration in the control of larvae of *Anopheles* sp. This research was carried out experimentally using factorial completely randomized design (RAL Factorial) consisting of two factors: the concentration of bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Anopheles* larval stage with three replications. The treatment is carried out for 3 weeks at a concentration of *Bacillus thuringiensis* (A) will be done in this study are as follows: A0: concentration of *B.thuringiensis* 0 CFU.mL⁻¹, A1: the concentration of *B.thuringiensis* 10² CFU.mL⁻¹, A2: the concentration of *B.thuringiensis* 10⁴ CFU.mL⁻¹, A3: concentration of *B.thuringiensis* 10⁶ CFU.mL⁻¹, A4: the concentration of *B.thuringiensis* 10⁸ CFU.mL⁻¹. 1st instar larval stages while treatment *Anopheles* sp. (B) are as follows: B1: the first instar larval stage, B2: second instar larval stage, B3: the third instar larval stage, B4: IV instar larval stage so that there are 60 experimental unit. Parameters measured were death *Anopheles* mosquitoes each experimental unit and the number of existing *B.thuringiensis* on larvae. The results showed the concentration of *B. thuringiensis* isolates CK and CC IPB most influential in controlling larvae of *Anopheles* sp is 10⁸ CFU.mL⁻¹. Instar larvae are most sensitive to *B. thuringiensis* isolates IPB CC is instar I and II while instar sensitive bacterial isolation results (CK) is the second instar, treatment concentration of isolates of *B. thuringiensis* and level instar larvae of most good in controlling the larvae of *Anopheles* sp, is 10⁸ CFU.mL⁻¹, and instar I and II.

Keywords: *Anopheles* sp., *Bacillus thuringiensis*, biocontrol

Abstrak

Nyamuk *Anopheles* sp adalah vektor penyakit malaria. Pengendalian vektor penyakit malaria dapat dilakukan secara biologis yaitu dengan menggunakan *Bacillus thuringiensis*. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui efektivitas konsentrasi *Bacillus thuringiensis* dalam pengendalian larva nyamuk *Anopheles* sp. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL Faktorial) yang terdiri atas dua faktor yaitu konsentrasi *Bacillus thuringiensis* dan stadia larva *Anopheles* dengan pengulangan tiga kali. Perlakuan yang dicobakan adalah konsentrasi *Bacillus thuringiensis* (A) yang terdiri atas 5 taraf: A0: konsentrasi *B.thuringiensis* 0 CFU.mL⁻¹, A1: konsentrasi *B.thuringiensis* 10² CFU.mL⁻¹, A2: konsentrasi *B.thuringiensis* 10⁴ CFU.mL⁻¹, A3: konsentrasi *B.thuringiensis* 10⁶CFU.mL⁻¹, A4: konsentrasi *B.thuringiensis* 10⁸CFU.mL⁻¹. Perlakuan tahapan instar larva *Anopheles* sp. (B) adalah sebagai berikut: B1: stadia larva instar I, B2: stadia larva instar II, B3: stadia larva instar III, B4: stadia larva instar IV sehingga terdapat 60 satuan percobaan. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi *B. thuringiensis* isolat CK dan IPB CC yang paling berpengaruh dalam pengendalian larva *Anopheles* sp adalah 10⁸ CFU.mL⁻¹. Instar larva yang paling peka terhadap *B. thuringiensis* isolat IPB CC adalah instar I dan II sedangkan instar yang peka terhadap isolat CK adalah instar II, Perlakuan konsentrasi isolat *B. thuringiensis* dan tingkat instar larva yang paling baik dalam pengendalian larva *Anopheles* sp. adalah 10⁸ CFU.mL⁻¹, dan instar I dan II.

Kata kunci: *Anopheles* sp., *Bacillus thuringiensis*, biokontrol

Pendahuluan

Pengendalian vektor menggunakan agen pengendali hayati mikroba adalah cara yang paling tepat untuk menekan jumlah vektor malaria (Dylo et al, 2014). Agen pengendali yang biasa digunakan adalah *Bacillus thuringiensis* karena tidak bersifat toksik terhadap organisme non-target (Dylo et al 2014). *B. thuringiensis* (*B.t*) terdiri atas berbagai strain yang dilaporkan mampu menyintesis lebih dari satu jenis δ –endotoksin, namun hanya strain tertentu yang digunakan sebagai insektisida alami yaitu *B.t. israelensis* (Bti), *B.t. kurstaki*, *B.t. berlinier*, dan *B.t. alesti* (Ben-Dov, 2014).

B. thuringiensis bekerja dengan cara memproduksi toksin ketika membentuk spora

sebagai bentuk adaptasi terhadap keadaan yang tidak kondusif. Larva nyamuk yang memakan toksin *B. thuringiensis israelensis* maka saluran pencernaannya akan terganggu sehingga mengakibatkan kematian larva (Poopathi and Abida, 2011). Konsentrasi *B.thuringiensis* sangat berpengaruh terhadap toksisitas dan lama residunya di dalam air. Hal ini dimungkinkan karena semakin tinggi konsentrasi *B.thuringiensis* yang diinokulasikan semakin banyak peluang untuk termakan oleh larva semakin besar. Konsentrasi *B. thuringiensis* yang diperlukan untuk membunuh larva tergantung pada tempat berkembang biak nyamuk (Darnely, 2010). Konsentrasi *B. thuringiensis* yang dapat membunuh 50% populasi larva adalah 10 ng.mL⁻¹ atau 1mg/m³ yang mengandung \pm 10³ sel bakteri.

Semakin tua umur instar larva nyamuk, maka semakin resisten terhadap *B. thuringiensis* karena terdapat perbedaan perkembangan jumlah sel penyusun saluran pencernaan larva pada setiap instarnya (Gama et al., 2010).

Larva mempunyai 4 tahapan dan mengalami pergantian kulit (molting) sebanyak 4 kali yang disebut instar. Larva bernapas melalui 2 lubang yang disebut *spiracle* yang terletak pada ruas *abdomen* yang kedelapan (pada ujung *posterior*). Larva *Anopheles* spp. Hanya mampu berenang ke bawah permukaan air paling dalam 1 meter, maka ditempat-tempat dengan kedalaman lebih dari 1m tidak ditemukan larva ini. Perkembangan larva ini dipengaruhi oleh sinar matahari dan kondisi air yaitu temperatur, pergerakan air, salinitas, dan organisme lain yang ada dalam air (Achille et al., 2010).

Penggunaan *Bacillus* spp terutama dosis efektif untuk membunuh jentik nyamuk *Anopheles* spp telah diteliti di Indonesia. Pengujian terhadap *Anopheles barbirostris* menunjukkan formulasi liquid larvasida *B.sphaericus* 2362 (Spherimos FC) mampu membunuh 90 % jentik dalam 24 jam pada dosis 2 ppm. Dosis aplikasi 30 ppm dapat dipertahankan sampai hari ke-35 dengan reduksi kepadatan jentik sampai 50 % (Yusuf 2006, 1996). Sedangkan uji *Bacillus sphaericus* (vectolex WDG) terhadap *Anopheles maculatus* di kabupaten Purworejo menunjukkan dosis yang mampu membunuh 50 % jentik dalam 24 jam pada suhu air 22-25°C adalah 0,0082 ppm dan 95 % jentik adalah 0,03 ppm. Sedangkan aplikasi *Bacillus sphaericus* pada kobakan di sungai dengan dosis 500 g/ha menunjukkan reduksi populasi jentik hingga > 70 % selama 21 hari. Reduksi populasi dengan dosis 100 g/ha secara statistik tidak berbeda dengan dosis 500 g/ha (Blondin and Widyastuti, 2013). Namun demikian pengujian terhadap instar larva yang berbeda belum banyak dilakukan di Indonesia, khususnya Jawa Tengah. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas konsentrasi *Bacillus thuringiensis* dalam pengendalian larva nyamuk *Anopheles* sp. Pada instar larva yang berbeda.

Metode

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto selama 7 bulan dari bulan Mei-November 2016.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap Pola Faktorial yang terdiri dari dua faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi *Bacillus thuringiensis* yang terdiri atas 5 taraf yaitu konsentrasi 0, 10^2 , 10^4 , 10^6 , dan 10^8 CFU. mL⁻¹. Faktor kedua adalah stadia larva *Anopheles* sp. yang terdiri atas 4 taraf yaitu instar I, instar II, instar III dan instar IV. Masing-masing

perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kalisehingga terdapat 60 satuan percobaan.

1. Isolasi *B. thuringiensis* (Solihat, 2005)

B. thuringiensis diisolasi dari tanah. Sampel tanah diperoleh disekitar area peternakan, pembuangan sampah dan selokan. Masing-masing sampel tanah sebanyak 100 gram, disimpan dalam *refrigerator* yang bersuhu 4° C. Sebanyak 10 gram sampel tanah disuspensikan ke dalam 90 mL akuades steril dalam tabung Erlenmeyer secara aseptik, dikocok 3-5 menit pada *shaker incubator*, dan dipanaskan pada suhu 80° C selama 5 menit. Sebanyak 1 mL *supernatant suspense* sampel tanah tersebut dipindahkan ke tabung berisi akuades steril dan diencerkan sampai diperoleh seri pengenceran 10^{-5} . Sebanyak 1 mL supernatant dari seri pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} diinokulasi tuang pada medium NA (*Nutrient Agar*) yang diperkaya ekstrak yeast 0,3%. Cawan-cawan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 30° C selama 1-2 hari.

2. Pemurnian *Bacillus thuringiensis* (Solihat, 2005)

Sebanyak 1 ose koloni bakteri *Bacillus* sp. dari medium *Nutrient Agar* (NA) modifikasi yang diperkaya ekstrak yeast 0,3% diinokulasikan ke dalam 10 mL medium cair *Luria Bertani* (LB) dapar asetat (0,25M, pH 6,8). Medium ini merupakan media selektif bagi pertumbuhan *B. thuringiensis*. Kultur cair tersebut diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang selama 1 hari. Kultur selanjutnya dipanaskan pada suhu 80° C selama 5 menit. Setelah dingin, sebanyak 1 ml kultur cair tersebut diinokulasi tuang di atas media *Luria Bertani* (LB) padat pH 7,2 kemudian disimpan pada suhu 30° C selama 1-2 hari. Koloni bakteri yang tumbuh dan diduga sebagai *B.thuringiensis* dimurnikan kemudian dibuat kultur tunggal pada media agar miring. Ciri koloni *B. Thuringiensis* adalah hampir menyerupai *B. cereus* yaitu koloni berwarna putih susu dan koloninya berbentuk rizhoid.

3. Karakterisasi Isolat *Bacillus thuringiensis* (Solihat, 2005)

Koloni yang diduga bakteri *Bacillus thuringiensis* tersebut dipindahkan ke media NA (*Nutrient Agar*) modifikasi yang diperkaya ekstrak yeast 0,3% baru dan disimpan dalam *refrigerator* bersuhu 4°C untuk selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi sel meliputi:

Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara isolat yang diduga bakteri *Bacillus thuringiensis* terpilih diulas pada *object glass* dan difiksasi dengan cara dilewatkan di atas pembakar spiritus. Hal pertama yang dilakukan adalah ulasan

ditetesi dengan Gram A (*chrysal violet*) selama 60 detik dan dicuci menggunakan akuades kemudian dikeringanginkan, kemudian ulasan ditetesi dengan Gram B (*lugol's iodine*) selama 60 detik dan dicuci dengan akuades lalu dikeringanginkan, lalu ulasan ditetesi Gram C (*ethanol 96%*) sampai tetesan berwarna jernih dan dicuci menggunakan akuades kemudian dikeringanginkan. Terakhir, ulasan ditetesi Gram D (*safranin*) selama 45 detik dan dicuci menggunakan akuades mengalir kemudian dikeringanginkan. Selanjutnya, ulasan diamati menggunakan mikroskop. Bakteri *Bacillus thuringiensis* merupakan bakteri Gram positif yang ditandai dengan warna sel yang berwarna ungu, bentuk sel batang, dan endospore berbentuk oval.

Pembuatan standar konsentrasi inokulum *Bacillus thuringiensis*

Isolat *Bacillus thuringiensis* yang berumur 24 jam diambil sebanyak 1 ose kemudian ditanam dalam 10 ml LB yang ditempatkan pada tabung reaksi steril secara terpisah. Tabung diinkubasi selama 24 jam. Penentuan konsentrasi inokulum dilakukan berdasarkan pengukuran nilai turbiditas menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm pada setiap nilai OD diinokulasikan pada media NA kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Koloni yang tumbuh dihitung dengan metode TPC. Inokulum yang akan diuji pada percobaan uji efektivitas *Bacillus thuringiensis* adalah konsentrasi 0, 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 CFU.ml⁻¹. Konsentrasi *B. thuringiensis* dibuat dengan menyesuaikan nilai OD yang telah dibuat sebelumnya.

Biakan murni *Bacillus thuringiensis* diregenerasi dalam tabung reaksi berisi NA miring, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebanyak 1 ose kultur murni diambil dan dimasukkan ke dalam 9 mL NaCl Fisiologis 0,85% dan dihitung sebagai pengenceran pertama (10^{-1}), kemudian diambil 3 mL untuk spektrofotometri. Pengenceran pertama dihomogenisasi dengan vortex kemudian diambil 1 mL kultur dan dimasukkan ke dalam 9 mL NaCl fisiologis 0,85% dan dihitung sebagai pengenceran kedua (10^{-2}) begitu seterusnya hingga pengenceran keenam. Hasil dua pengenceran terakhir (10^5 dan 10^6) kemudian diambil sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam plate dan media NA dituang ke dalamnya dengan metode tuang, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, dan dihitung jumlah selnya. Masing-masing diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UVVis pada panjang gelombang 660 nm. Panjang gelombang tersebut digunakan karena berdasarkan percobaan dapat menunjukkan nilai absorbansi terhadap kultur bakteri *Bacillus thuringiensis* dengan ketelitian tertinggi dibanding panjang gelombang lainnya. Menurut Dewi

(2010), nilai absorbansi dapat menunjukkan jumlah sel bakteri, dengan cara memasukan ke dalam persamaan garis kurva standar:

$$y = bx + a$$

$$y = \text{jumlah sel}$$

$$x = \text{besarnya nilai absorbansi}$$

Konsentrasi *B. thuringiensis* Isolat IPB CC ditentukan menggunakan spektrofotometer dan diperoleh hasil 0,206 nm, 0,314 nm, 0,492 nm dan 0,803 nm (konsentrasi 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 berturut-turut), hasil TPC berturut-turut $6,9 \times 10^2$ CFU.ml⁻¹, $9,4 \times 10^4$ CFU.ml⁻¹, $10,73 \times 10^6$ CFU.ml⁻¹, $11,9 \times 10^8$ CFU.ml⁻¹ untuk hasil spektro isolat hasil isolasi tanah selokan diperoleh hasil OD 0,219 nm, 0,289 nm, 0,451 nm, dan 0,729 nm (konsentrasi 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 berturut-turut), hasil TPC berturut-turut $2,1 \times 10^2$ CFU.ml⁻¹, $10,2 \times 10^4$ CFU.ml⁻¹, $5,6 \times 10^6$ CFU.ml⁻¹, $15,15 \times 10^8$ CFU.ml⁻¹.

Uji Efektivitas *Bacillus thuringiensis* terhadap Larva *Anopheles* sp.

Uji efektivitas *B. thuringiensis* dilakukan dengan cara inokulum *B. thuringiensis* dengan masing-masing konsentrasi (0, 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 CFU's.ml⁻¹) diambil sebanyak 5 ml dilakukan untuk menguji efektifitas *B. thuringiensis* terhadap larva *Anopheles* sp. kemudian dimasukkan ke dalam 95 ml akuades steril yang di dalamnya terdapat 10 ekor larva nyamuk sesuai stadia larva yang digunakan yaitu stadia I, II, III, dan IV. Larva nyamuk yang diujikan didapatkan dari hasil pemeliharaan larva di laboratorium. Pengamatan dilakukan 4x24 jam (4 hari) sesudah perlakuan. Larva yang mati dihitung dan diamati ciri morfologinya. Larva dihitung dengan rumus :

$$\frac{\text{Jumlah larva mati sesudah aplikasi}}{\text{Jumlah larva sebelum aplikasi}} \times 100\%$$

Reisolasi *Bacillus thuringiensis* dari Larva *Anopheles* sp. (Blondine et al., 1992).

Reisolasi *B. thuringiensis* dilakukan dengan mengambil larva yang mati kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril. Larva tersebut dimaserasi dengan batang gelas kecil kemudian ditambahkan 9 ml NaCl fisiologis 0,85% dan diinkubasi selama 5 menit. Sampel diencerkan bertingkat hingga 10^{-6} masing-masing dipanaskan pada suhu 80°C selama 15 menit. Sebanyak 1 ml dari dua pengenceran terakhir diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* (NA) kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30° C. Selanjutnya dilakukan penghitungan menggunakan metode TPC.

Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi bakteri dari sampel tanah (tempat pembuangan akhir sampah, selokan jalan gunung slamet, dan exfarm UNSOED) di

Purwokerto diperoleh 3 koloni yang diduga sebagai *Bacillus* spp. yang diberi kode isolat CS (sampel asal sumber dari tanah pembuangan akhir sampah), CK (sampel asal sumber dari selokan jalan gunung slamet), dan CE (sampel asal dari tanah exfarm UNSOED) Koloni-koloni tersebut berbeda dari koloni spesies bakteri lainnya berdasarkan bentuk koloni bulat, tidak ada lender, tidak mengkilap, warna putih suram dan permukaan seperti kulit jeruk. Berdasarkan kenampakan pertumbuhan koloni pada medium LB padat ketiga koloni tersebut diduga memiliki kemiripan dengan koloni *B. thuringiensis* isolat IPB CC Kemiripan lainnya terlihat dari koloni yang tumbuh memiliki permukaan yang kasar, agak mengkilat, tepi rhizoid dan warna koloni putih kekuningan seperti yang terlihat pada gambar 1 dan 2.

Hasil pengujian awal efektivitas ketiga isolat dalam membunuh larva menunjukkan bahwa hanya isolat CK yang mampu membunuh larva nyamuk dengan hasil yang baik dibandingkan dengan isolat lainnya. Hasil yang ditunjukkan oleh isolat CK sama atau menyerupai seperti yang ditunjukkan oleh isolat IPB CC maka dari itu tidak semua isolat hasil isolasi digunakan dalam penelitian ini. Hal ini disebabkan karena pada saat pengujian untuk larva, hanya bakteri dari tanah selokan (CK) yang menunjukkan hasil serupa dengan *B. thuringiensis* isolat IPB CC.



Gambar 1. Isolat *B. thuringiensis* IPB CC dan Isolat Hasil Isolasi pada media LB padat.

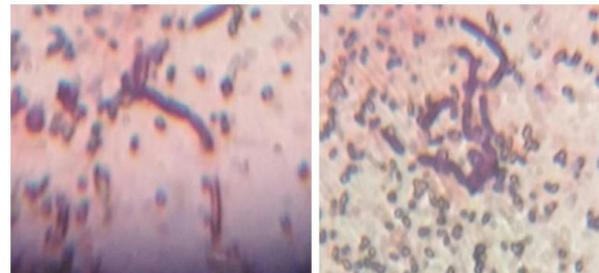


Gambar 2. Isolat Bakteri Hasil Isolasi Tanah Selokan pada Media LB Dapar Asetat.

Hasil pengujian pada medium selektif LB dapar asetat menunjukkan bahwa isolat CK pada

medium tersebut tidak tumbuh dan hanya sporanya saja yang tumbuh, sebaliknya spesies *Bacillus* sp. lain akan menyebabkan medium menjadi keruh (tumbuh). Hasil tersebut memperkuat bahwa isolat CK adalah *Bacillus thuringiensis*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Salaki et al., (2009) bahwa larutan LB dapar asetat menunjukkan hasil bening yang menandakan bahwa didalam sampel tanah selokan mengandung bakteri *B. thuringiensis*, karena media LB dapar asetat merupakan media selektif untuk *B. thuringiensis*. Hal ini dikarenakan spora *B. thuringiensis* tidak mampu bergerminasi dalam media yang mengandung natrium asetat dengan konsentrasi yang tinggi (0,25 M), sedangkan spora *Bacillus* sp. maupun non *B. thuringiensis* tetap dapat bergerminasi oleh karena itu, koloni yang non *B. thuringiensis* akan menyebabkan media LB dapar asetat menjadi keruh.

Koloni-koloni dari sampel CK yang memiliki kesamaan dengan koloni *Bacillus thuringiensis* isolat IPB CC diseleksi kembali dengan pemilihan beberapa koloni. Pengamatan kemiripan morfologi sel secara mikroskopis antara isolat CK dan isolat IPB CC menunjukkan bahwa kedua isolat sangat identik (Gambar 3). Hal ini dapat diamati dari hasil pewarnaan Gram pada kedua isolat yang menunjukkan hasil warna biru ungu pada koloni, koloni berbentuk batang dan sporanya berbentuk oval setelah diamati dibawah mikroskop. Pengujian mikroskopik ini bertujuan untuk melihat karakteristik dan kenampakan sel bakteri *Bacillus thuringiensis* tersebut. Berikut merupakan hasil pengujian mikroskop dengan perbesaran 50x10 pada koloni isolat CK dan *B. thuringiensis* IPB CC.



Gambar 3. Kenampakan Morfologi Sel Antara Isolat CK dan Isolat IPB CC

Hasil pengamatan perlakuan *B. thuringiensis* isolat CK terhadap Larva nyamuk *Anopheles* sp. menunjukkan bahwa konsentrasi 10^8 CFU. mL⁻¹ berpengaruh secara nyata terhadap kematian semua tahapan larva, baik larva instar I sampai IV .

Tabel 1 Presentase kematian larva nyamuk *Anopheles* sp. yang diberi *Bacillus thuringiensis* isolat dan dosis berbeda

Isolat B.th	Dosis	Instar larva					
		1	2	3	4	Rata-rata	stdev
CK	10 ⁰	12,9 %	8,8 %	7,07 %	7,07 %	8,96%	2,9
	10 ²	12,3 %	13,4 %	11,7 %	12,3 %	12,43%	3,31
	10 ⁴	14,6 %	17,7 %	16,8 %	15,8 %	16,23%	1,2
	10 ⁶	18,7 %	21,1 %	21,1 %	22,7 %	20,90%	1,5
	10 ⁸	21,2 %	27,7 %	26,7 %	24,1 %	24,93%	1,1
IPB CC	10 ⁰	10,52 %	11,71 %	7,07 %	7,07 %	9,09%	3,0
	10 ²	15,59 %	11,71 %	12,25 %	12,25 %	12,95%	2,1
	10 ⁴	17,61 %	16,77 %	13,43 %	13,43 %	15,31%	0,9
	10 ⁶	21,67 %	19,54 %	16,77 %	14,46 %	18,11%	1,3
	10 ⁸	27,34 %	24,13 %	22,70 %	20,37 %	23,64%	1,1

Asile et al. (2014) menyatakan bahwa waktu pemaparan yang lama *B. thuringiensis* dengan konsentrasi yang tinggi berpengaruh terhadap kematian larva. Daya bunuh *B. thuringiensis* paling tinggi dalam waktu pemaparan 4 hari dan apabila lebih dari itu toksin yang dihasilkan bakteri akan mengendap di dasar tempat hidup larva. Waktu pemaparan yang lama (>4 hari), efektivitas *B. thuringiensis* akan menurun. Hal ini disebabkan karena ketersediaan nutrisi bakteri pada air menurun, maka populasi bakteri juga menurun. Larva pada perlakuan kontrol (tidak mengandung *Bacillus thuringiensis*) ternyata menyebabkan kematian larva instar I Hal ini diduga karena sistem imun larva instar I masih lemah. Faktor lingkungan juga berpengaruh terhadap viabilitas larva, seperti temperatur, tempat hidup, keadaan air dan kandungan zat makanan yang ada di dalam tempat perindukan larva (substrat) semakin tidak sesuai faktor lingkungan dengan syarat kelangsungan hidup larva maka jumlah larva yang mati akan semakin banyak.

Hasil analisis ragam kematian larva nyamuk *Anopheles* sp. yang diperlakukan dengan isolat CK menunjukkan bahwa perlakuan berbagai konsentrasibakteri dan interaksi antara konsentrasi dan instar larva berpengaruh sangat nyata terhadap tingkat kematian larva *Anopheles* sp., sedangkan perlakuan berbagai macam instar tidak berpengaruh terhadap tingkat kerentanan dan kematian larva Hal ini disebabkan karena kecepatan pertumbuhan dan perkembangan larva dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu temperatur, tempat, keadaan air dan kandungan zat makanan yang ada di dalam tempat perindukan. Oleh karena itu pertumbuhan dan perkembangan dari instar 1 sampai instar 4 sangat variatif pada tiap individu (Soegijanto, 2006).

Hasil uji BNJ menunjukkan bahwa konsentrasi *B. thuringiensis* CK sebanyak 10⁸ CFU.mL⁻¹ (A4) berpengaruh secara nyata (P<0,05) dalam meningkatkan kematian larva nyamuk *Anopheles* sp. dibandingkan dengan

perlakuan konsentrasi lainnya. Perlakuan konsentrasi (A) *B. thuringiensis* yang berbeda menunjukkan bahwa tingkat kematian larva *Anopheles* sp. bervariasi. Tabel 2 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka kematian larva juga akan semakin tinggi. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi bakteri yang digunakan maka semakin banyak bakteri yang termakan oleh larva (Gama et al., 2010). Spora yang terbentuk pada konsentrasi 10⁸ CFU.mL⁻¹ (tertinggi) lebih banyak dibandingkan dengan jumlah spora pada konsentrasi yang lebih rendah. Spora *B. thuringiensis* semakin banyak, kristal toksin atau protein yang dilepaskan untuk membunuh larva juga akan semakin banyak (Dambach et al., 2014).

Interaksi antara berbagai konsentrasi *B. thuringiensis* isolat CK dan instar terhadap jumlah kematian larva berpengaruh sangat nyata berdasarkan uji BNJ (Tabel 3). Hasil perlakuan Kombinasi (Interaksi) antara konsentrasi dan instar larva terbaik ditunjukkan pada perlakuan Instar II dan Konsentrasi 10⁸ (B2A4). Trizelia (2001) menyatakan bahwa semakin rendah konsentrasi bakteri yang diaplikasikan kepada larva maka tingkat kematian larva juga akan rendah, begitupun sebaliknya jika konsentrasi bakteri yang digunakan tinggi maka tingkat kematian larva juga akan semakin tinggi.

Hasil perhitungan reisolasi *B.thuringiensis* dalam tubuh larva menunjukkan bahwa kematian larva disebabkan oleh infeksi *B. thuringiensis*. Hasil perhitungan TPC sebaliknya menunjukkan bahwa jumlah sel bakteri tertinggi (10⁸ CFU. mL⁻¹) terdapat pada larva instar III. Menurut Darneli (2010), larva instar III merupakan larva yang paling aktif dan paling banyak makan, larva tersebut memakan *B. thuringiensis* dalam jumlah besar ke dalam sistem pencernaannya. Hal tersebut menyebabkan populasi bakteri dalam usus larva tinggi. Larva instar III memiliki imunitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan larva instar I dan II sehingga ketahanannya terhadap infeksi *B. thuringiensis* lebih tinggi (Gama et al., 2010).

Hasil analisis ragam jumlah kematian larva nyamuk *Anopheles* sp. yang diberi perlakuan isolat IPB CC pada berbagai konsentrasi menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi dan instar berbeda sangat nyata terhadap kematian larva *Anopheles* sp. (Lampiran 11). Interaksi konsentrasi dan instar larva juga menunjukkan hasil berbeda nyata yang berarti bahwa terdapat interaksi antara konsentrasi dan instar pada setiap perlakuan.

Hasil uji BNJ menunjukkan *B. thuringiensis* konsentrasi 10^8 CFU.mL⁻¹ (A4) berpengaruh paling baik dalam meningkatkan jumlah kematian larva *Anopheles* sp. dibandingkan dengan konsentrasi lainnya (Tabel 5). Hal ini menunjukkan bahwa hipotesis diterima. Aplikasi konsentrasi bakteri dengan kepadatan yang tinggi menyebabkan kematian larva dalam jumlah besar. Tingginya jumlah *B. thuringiensis* yang termakan oleh larva menyebabkan kerusakan pada larva nyamuk dalam waktu yang singkat. Efektivitas *B. thuringiensis* selain dipengaruhi oleh instar larva nyamuk, makanan, periode pemaparan, kualitas air, strain bakteri, suhu air (Demach et al, 2014) juga oleh adanya toksin pada substrat dan perilaku makan larva (Jahan et la 2013).

Menurut Dyllo et al (2014) daya bunuh *B. thuringiensis* dipengaruhi oleh keberadaan toksin di tempat perindukan larva. Semakin lama toksin pada suatu substrat maka akan terjadi pengendapan larvasida *B. thuringiensis*. Perilaku makan larva juga mempengaruhi daya bunuh *B. thuringiensis* karena *Anopheles* sp. biasa mengambil makanan (termasuk toksin) di permukaan air (bukan di dasar perairan).

Hasil uji BNJ rataan pada perlakuan Instar Larva menunjukkan bahwa stadia larva instar I dan II paling rentan terhadap *B. thuringiensis* isolat IPB CC. Hal ini ditunjukkan oleh tingginya kematian larva instar I dan II. Hasil ini menunjukkan bahwa hipotesis ditolak. Perlakuan kontrol (tidak mengandung *Bacillus thuringiensis*) menyebabkan kematian pada larva instar I. Hal ini disebabkan karena instar muda tersebut memiliki sistem imun yang lemah dan untuk hidupnya sangat tergantung pada berbagai faktor lingkungan seperti ketersediaan makanan, udara untuk pernafasan, pH habitat atau perairan yang netral. Larva instar 4 tidak mengalami kematian karena daya tahan tubuhnya lebih kuat terhadap serangan patogen (Dyllo et al, 2014, Jahan et al, 2013). Umur instar larva nyamuk semakin tua maka semakin resisten terhadap *B. thuringiensis*, hal ini disebabkan adanya perbedaan perkembangan jumlah sel penyusun saluran pencernaan larva pada setiap instarnya.

Hasil uji BNJ rerata instar yang mati pada perlakuan Interaksi konsentrasi bakteri dan instar menunjukkan bahwa perlakuan Instar 1 dan Konsentrasi 10^8 CFU.mL⁻¹ (B1A4) meningkatkan

jumlah kematian larva dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi bakteri yang diaplikasikan kepada larva maka tingkat kematian larva juga semakin rendah, demikian sebaliknya. Trizelia (2011) menyatakan bahwa semakin banyak bakteri termakan oleh larva maka akan meningkatkan kematian larva. Menurut Yusuf (2010), larva tidak bersifat pemilih dalam cara dan tingkah laku makannya, bakteri yang tercampur dengan makanan dalam habitat (perairan) akan termakan oleh larva dan apabila terdapat dalam jumlah yang banyak maka kemungkinan untuk termakan akan semakin besar.

Hasil reisolasi *B. thuringiensis* isolat IPB CC dalam tubuh larva menunjukkan bahwa larva yang mati dikolonisasi oleh bakteri tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa *B. thuringiensis* menginfeksi larva dengan baik. Hasil perhitungan TPC sebaliknya menunjukkan bahwa populasi bakteri tertinggi didapatkan pada larva instar III. Menurut Darneli (2010), Larva instar III merupakan larva yang paling aktif dan paling banyak makan, maka kemungkinan larva tersebut memakan *B. thuringiensis* dalam jumlah banyak ke dalam sistem pencernaannya. Hal ini memicu tingginya populasi bakteri dalam usus larva, sehingga ketika direisolasi jumlah bakteri tumbuh lebih besar dibandingkan dengan instar lainnya.

Ciri-ciri larva yang terinfeksi oleh bakteri adalah berwarna coklat kehitaman dan mengalami paralisis usus (Gambar 5), indikasi lainnya dapat dilihat dari aktifitas makan larva yang menurun bahkan dapat berhenti, larva menjadi lemah dan kurang tanggap terhadap sentuhan. *B. thuringiensis* yang menginfeksi larva tidak secara langsung dapat mematikan larva, larva masih mampu bertahan hidup dan berhasil menjadi pupa sampai serangga dewasa. Serangga dewasa terinfeksi yang terbentuk biasanya berukuran kecil, cacat, masa hidupnya lebih pendek dan mandul (Suwahyono, 2010).



Gambar 4. Larva Nyamuk *Anopheles* sp. yang terinfeksi *B. thuringiensis*

Keterangan: A = Larva *Anopheles* sp. instar 4 mengalami paralisis usus (usus rusak), B = Pupa Larva Nyamuk *Anopheles* sp. yang mati (busuk) karena terinfeksi *B. thuringiensis*, C = Usus Larva yang rusak karena *B. thuringiensis*.

Kematian larva nyamuk *Anopheles* sp. diduga disebabkan oleh paraspora kristal protein d-endotoksin yang dihasilkan oleh *B.thuringiensis* isolate CK dan IPB CC. Bakteri yang termakan oleh larva akan mengalami lisis karena kondisi yang tidak sesuai bagi syarat kehidupan *B. thuringiensis*, sehingga kristal paraspora dan spora terbebas. Toksin kemudian akan melisis epitel dinding midgut larva (Wabiko et al., 1985). Toksin yang dihasilkan *B. thuringiensis* (kristal protein) berbentuk protoksin (tidak aktif) jika beradadi lingkungan (Sjamsuriputra, 1987). Toksin akan menjadi aktif jika berada dalam kondisi pH basa antara 10-12 sesuai dengan kondisi pada saluran pencernaan insekta.

Hasil reisolasi *B. thuringiensis* isolat IPB CC dan isolate CK pada larva *Anopheles* sp. yang mati (Lampiran 17 dan 18) mengindikasikan bahwa kematian larva instar I, II, III, dan IV disebabkan oleh infeksi bakteri tersebut. Populasi *B. thuringiensis* isolat IPB CC dan isolat CK pada larva yang mati berturut-turut adalah $1,3 \times 10^7$ CFU.mL⁻¹ dan $2,9 \times 10^7$ CFU.mL⁻¹. Hasil Reisolasi

pada larva *Anopheles* sp. yang mati dapat dikatakan efektif, kematian tertinggi dengan kepadatan bakteri $1,3 \times 10^7$ sel.ml⁻¹. Hasil perhitungan reisolasi tersebut membuktikan bahwa aplikasi *B. thuringiensis* dalam pengendalian larva nyamuk *Anopheles* sp. dapat dikatakan efektif.

Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan, maka dapat disimpulkan bahwa (1). Konsentrasi *B. thuringiensis* isolat CK dan IPB CC yang paling berpengaruh dalam pengendalian larva *Anopheles* sp adalah 10^8 CFU.mL⁻¹. (2). Instar larva yang paling peka terhadap *B. thuringiensis* isolat IPB CC adalah instar I dan II sedangkan instar yang peka terhadap bakteri hasil isolasi adalah instar II (3).Perlakuan konsentrasi isolat *B. thuringiensis* dan tingkat instar larva yang paling baik dalam pengendalian larva *Anopheles* sp. adalah 10^8 CFU.mL⁻¹, dan instar I dan II.

Daftar Referensi

- Achille, GN, Christophe, HS and Yilian, L.2010. Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) on Culex, Aedes and Anopheles larvae (Cotonou; Benin). Journal of Stem Cell 60-66
- Anggraeni, Y. M., Christina, B., & Wianto, R., 2013. Uji Daya Bunuh Ekstrak Kristal Endotoksin *Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14) terhadap Jentik *Aedes aegypti*, *Anopheles aconitus* dan *Culex quinquefasciatus*. *Journal Sain Veteriner*, 31 (1).
- 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.
- Ben-Dov, E.2014.*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins* 6, 1222-1243.
- Dambach, P, Louis, VR, Kaiser A, Ouedraogo, S, Sié, A, Sauerborn, A, and Becker N, 2014.Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against malaria mosquitoes in northwestern Burkina Faso. *Parasites & Vectors*, 7:371
- Dylo, P, Martin,C and Mhango, M. .2014. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bt*) on *Culex* and Anopheline mosquito larvae in Zomba. *Malawi Journal of Science and Technology*. Vol 10 no 1 41-52
- Darnely., 2010. Penggunaan *Bacillus thuringiensis israelensis* untuk Memberantas *Aedes aegypti*. *Majalah Kedokteran FK UKI 2010 XXVII No.4.*
- Yusuf, Y. 2009. Penggunaan Bakteri *Bacillus spp* untuk Pengendalian Jentik Nyamuk *Anopheles spp* (*Application of Bacillus spp as Microbial Larvicides to Control Anopheles Larvae*). *Bionature Vol. 10 (2): Hlm: 102 - 105,*
- Gama, Z.P., Yanuwadi, Bagyo., Tri Handayani Kurniati. 2010. Strategi Pemberantasan Nyamuk Aman Lingkungan: Potensi *Bacillus thuringiensis* Isolat Madura Sebagai Musuh Alami Nyamuk *Aedes aegypti*. *Journal Pembangunan dan Alam Lestari.*
- Jusniar Ariati, I. N., 2014. Sebaran Habitat Perkembangbiakan Larva *Anopheles spp* Di Kecamatan Bula, Kabupaten Seram Bagian Timur Provinsi Maluku. *Jurnal Ekologi Kesehatan*, 10-22.
- Marwoto, H.. 1999. Korelasi Kepadatan Populasi *A. barbirotris* dengan prevalensi Malaria di Kecamatan Cineam, Kabupaten Tasikmalaya.
- Obeidat, Maher., Dhia Hassawi, Ihab Ghabeish., 2004. Characterization Of *Bacillus Thuringiensis* Strains From Jordan And Their Toxicity to the Lepidoptera, *Ephestia*

- Kuehniella Zeller. African Journal of Biotechnology. 3 (11): 622-22.
- O'Connor, C.T dan A. Soepanto, 1999. Kunci Bergambar Jentik Anopheles di Indonesia. Jenderal P3M DEPKES, Semarang.
- Poopathi, S and Abidha, S 2011. Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis serovar israelensis*): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. Journal of Physiology and Pathophysiology Vol. 1(3), pp. 22-38.
- Sjamsuriputra, A. A., I., Sastramihardja dan U. S. Sastramihardja. 1984. Pengaruh Beberapa Faktor Lingkungan Dalam Optimasi Produksi Insektisida *Bacillus thuringiensis*. ITB., Bandung.
- Soegijanto, S., 2006. Demam Berdarah Dengue Edisi 2. Penerbit Airlangga University Press, Surabaya.
- Suwahyono, Untung. 2010. Biopestisida. Jakarta : Penebar Swadaya
- Suwita, C. S., 2013. Efektivitas *Bacillus thuringiensis israelensis* dalam Pemberantasan Larva *Aedes aegypti* di Kecamatan Cempaka Putih, Jakarta Pusat. eJKI.