

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) merupakan bakteri Gram-positif yang berbentuk batang dengan ukuran lebar 1,0-1,2 μm dan panjang 3-5 μm . Bakteri *B. thuringiensis* dapat membentuk suatu rantai yang terdiri dari 5-6 sel. *Bacillus thuringiensis* merupakan bakteri anaerob fakultatif yang secara alami ditemukan di dalam tanah, di permukaan tanaman dan di dalam saluran pencernaan Insekta (Pray dkk., 2002; Madigan dkk., 2009). Bakteri *B. thuringiensis* bersifat motil dan menghasilkan spora dengan kristal protein parasporal. Bakteri *B. thuringiensis* telah diklasifikasikan berdasarkan karakteristik morfologi, biokimia dan genetik (Sansinenea, 2012).

Bacillus thuringiensis memiliki toksin yang spesifik terhadap Invertebrata khususnya dari Nematoda dan Insekta. Beberapa Insekta yang mendapatkan dampak negatif toksin *B. thuringiensis* yaitu Lepidoptera, Diptera dan Coleoptera (Sansinenea, 2012). Toksin *B. thuringiensis* memiliki dampak terhadap beberapa Insekta yang berada dalam fase larva. Toksin *B. thuringiensis* akan efektif membunuh Insekta pada saat fase larva. Umumnya, larva Insekta memiliki perbedaan morfologi, fisiologi dan perilaku dengan Insekta fase dewasa. Fase larva memiliki fisiologi dan morfologi yang lebih sederhana sehingga sangat berpengaruh terhadap dampak toksin *B. thuringiensis* (Pray dkk., 2002).

Bakteri *B. thuringiensis* menghasilkan spora dengan kristal protein parasporal (delta-endotoksin) yang bersifat toksin bagi beberapa serangga. Aktivitas insektisida ini dapat dijadikan sebagai strategi alternatif kimia di bidang pengendalian hama dan pengendalian larva nyamuk sebagai vektor beberapa penyakit. Aktivitas insektisida bergantung pada protein yang diproduksi oleh subspecies *B. thuringiensis* (Sanahuja dkk., 2011).

Subspecies *B. thuringiensis* dapat menghasilkan toksin yang spesifik terhadap jenis serangga tertentu karena bentuk kristal protein parasporal yang berbeda misalnya *B. thuringiensis* subspecies *tenebrionis* yang menyerang kumbang kentang Colorado dan larva kumbang daun. Bakteri *B. thuringiensis* subspecies *kurstaki* dapat dimanfaatkan untuk mengontrol populasi berbagai jenis ulat yang menyerang tanaman pertanian, dan *B. thuringiensis* subspecies

israelensis yang bersifat patogen untuk nyamuk dan lalat hitam (Pray dkk., 2002). Kristal parasporal *B. thuringiensis* merupakan protein yang dikode oleh jenis gen *Cry* yang spesifik. Gen *CryI* dan *CryIV* merupakan toksin yang spesifik terhadap larva Lepidoptera dan Diptera (Tabel 1). Gen lain yang terdapat pada *B. thuringiensis* adalah *Cyt* untuk sitolitik. Gen *Cyt* ini mengkode faktor *cytolytic* yang bersifat nonspesifik (De Maagd dkk., 2003).

Tabel 1. Spektrum gen *Cry* terhadap Insekta

| Gen | Bentuk Kristal | Berat Protein (kDa) | Insekta yang dipengaruhi |
|----------------|---------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>CryI</i> | Bipiramida | 130-138 | Larva Lepidoptera |
| <i>CryII</i> | Kuboid | 69-71 | Lepidoptera dan Diptera |
| <i>CryIII</i> | Datar/tidak teratur | 73-74 | Coleoptera |
| <i>CryIV</i> | Bipiramida | 73-134 | Diptera |
| <i>CryV-IX</i> | Berbagai macam | 35-129 | Coleoptera dan Lepidoptera |

(Sanahuja dkk., 2011)

2.2 MOSNON™

Produk komersial *Bacillus thuringiensis* (Bt) merupakan agen pengontrol hama yang mengandung *Insektisidal Crystal Proteins* (ICP). MOSNON™ merupakan biolarvasida berbahan aktif *B. thuringiensis* D-142 sangat baik untuk mengendalikan jentik atau larva nyamuk *Aedes aegypti* sehingga dapat menekan penyebaran penyakit Demam Berdarah *Dengue* (DBD) pada manusia (PT. Harvest Ariake Indonesia, 2014). Berdasarkan studi semi lapang, penggunaan MOSNON™ pada kontainer yang berada di sekitar rumah warga menunjukkan bahwa MOSNON dengan konsentrasi 2 ppm efektif untuk membunuh 100 % larva nyamuk dalam waktu 24 jam (Dewi, 2016). Studi lain menunjukkan bahwa *B. thuringiensis* D-142 yang terkandung dalam MOSNON lebih efektif membunuh larva nyamuk dibandingkan dengan *B. thuringiensis* asal kota Lamongan, Malang dan Madiun di

Jawa Timur (Triprisila dkk., 2013; Gama, 2014; Abinurizzaman, 2016). Bakteri *B. thuringiensis* D-142 dengan konsentrasi 3×10^2 sel/mL mampu membunuh 50 % larva nyamuk dalam waktu 96 jam (Abinurizzaman, 2016). Bakteri *B. thuringiensis* asal Malang dan Madiun masing-masing mampu membunuh 50 % larva nyamuk pada konsentrasi $22,79 \times 10^7$ dan $2,21 \times 10^7$ sel/mL dalam waktu 48 jam (Gama & Nobukazu, 2014). Bakteri *B. thuringiensis* D-142 memiliki karakteristik morfologi bentuk koloni bulat, pinggirannya beralun, tekstur yang kasar, konsistensi yang berkerut. Koloni *B. thuringiensis* memiliki pigmen berwarna putih (Abinurizzaman, 2016).



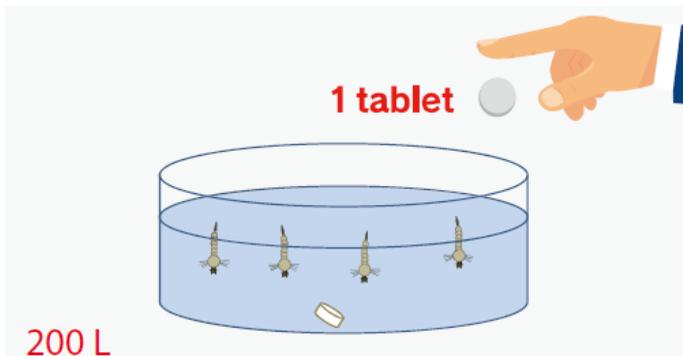
(PT. Harvest Ariake Indonesia, 2014)

Gambar 1. Produk MOSNON™

MOSNON™ merupakan biolarvasida berbentuk tablet *effervescent* dengan aplikasi yang sangat mudah yaitu dengan cara dimasukkan ke dalam wadah atau genangan air yang terdapat jentik atau larva nyamuk MOSNON™ dikemas dalam botol yang berisi 200 tablet (PT. Harvest Ariake Indonesia, 2014). Pada kemasan MOSNON™, tercantum komposisi bahan yaitu bahan aktif *B. thuringiensis* 2 %, media pertumbuhan bakteri 90 % dan *effervescent* 8 %. Protein kristalin sebesar 2 % dari *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* strain D-142 10^9 CFU/g. *Effervescent* 8 % merupakan zat aktif dapat menyebar dengan

cepat ke seluruh permukaan air dengan buih yang dihasilkan ketika diaplikasikan.

Penggunaan MOSNON™ dalam bentuk tablet dilarutkan dalam air yang diduga terdapat larva nyamuk. Satu tablet dengan berat 4 g untuk 200 Liter air (Gambar 2). Tujuan penggunaan *B. thuringiensis* pada lingkungan perairan untuk mengontrol populasi nyamuk (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles*) dan lalat yang terdapat pada penampung air (PT. Harvest Ariake Indonesia, 2014).



(PT. Harvest Ariake Indonesia, 2014)

Gambar 2. Cara penggunaan MOSNON™

2.3 Studi Toksisitas *B. thuringiensis* terhadap Organisme Target

Bakteri *B. thuringiensis* dapat memproduksi dua jenis toksin, yaitu toksin kristal (*Crystal*, Cry) dan toksin sitolitik (*cytolytic*, Cyt). Toksin Cry termasuk ke dalam protein kristal kelas endotoksin delta. *Bacillus thuringiensis* menghasilkan beberapa jenis toksin, seperti α (alfa), β (beta), γ (gamma)-eksotoksin, dan δ (delta)-endotoksin. Protein β -eksotoksin dan δ -endotoksin merupakan toksin yang sangat berperan penting sebagai komponen bioinsektisida. Pada umumnya toksin di alam bersifat protoksin, karena adanya aktivitas proteolisis di dalam sistem pencernaan atau usus insekta, maka mengubah protoksin menjadi polipeptida yang lebih pendek (27-149 kd) sehingga menjadi toksin aktif. Toksin aktif bersifat insektisidal sehingga dapat membunuh serangga (hama) termasuk larva nyamuk (Wennona, 2003).

Tanda-tanda awal toksin *B. thuringiensis* bersifat patogen pada larva nyamuk dapat dilihat dari aktivitas makan yang menurun bahkan dapat

berhenti, akibatnya larva nyamuk menjadi lemah dan kurang peka terhadap sentuhan kemudian larva mengalami kematian. *Bacillus thuringiensis* terkadang tidak langsung mematikan larva nyamuk. Larva nyamuk instar IV masih mampu bertahan hidup jika mendapat pengaruh toksin *Bacillus thuringiensis* dan berhasil menjadi pupa sampai serangga dewasa namun serangga dewasa umumnya berukuran kecil, cacat, masa hidupnya lebih pendek dan mandul (Pray dkk., 2002).

Toksin Cry merupakan protoksin yang harus diaktifkan terlebih dahulu sebelum memberikan efek negatif. Aktivasi protoksin dilakukan oleh protease di dalam saluran usus sehingga terbentuk toksin aktif dengan berat 60 kDA (delta-endotoksin). Toksin tersebut tidak larut pada kondisi normal sehingga tidak membahayakan manusia, hewan tingkat tinggi, dan sebagian insekta (WHO, 1999). Namun, pada kondisi pH tinggi (basa) 9,5 toksin tersebut akan aktif. Toksin akan menyebabkan lisis (pemecahan) pada saluran pencernaan (Sansinenea, 2012). Bakteri *B. thuringiensis* dengan spora ICP harus dicerna oleh larva serangga. Toksisitas ICP tergantung pada solubilisasi di saluran pencernaan, konversi protoksin menjadi toksin aktif oleh enzim proteolitik, reseptor membran spesifik beikatan dengan domain C-terminal dari toksin aktif, dan pembentukan pori oleh domain N-terminal kemudian sel-sel epitel akan lisis sehingga menyebabkan kematian (De Maagd dkk., 2003).

2.4 Studi Toksisitas *B. thuringiensis* terhadap Organisme Non-target

Bakteri *B. thuringiensis* hanya bersifat toksik pada golongan Insekta tertentu seperti Lepidoptera, Diptera dan Coleoptera. Beberapa studi menunjukkan bahwa *B. thuringiensis* tidak toksik terhadap beberapa golongan Invertebrata dan Vertebrata. Menurut WHO (1999), *B. thuringiensis* tidak menimbulkan efek toksik bagi hewan golongan Vertebrata. Laboratorium Organisasi Kesehatan Dunia (WHO, 1999) melakukan studi lapangan tentang dampak *B. thuringiensis* pada katak (*Hyla regilla*, *Rana temporaria*), ikan (*Carassius auratus*, *Gambusia affinis*), dan kadal air (*Taricha torosa*, *Triturus vulgaris*). Organisme non-target tersebut menunjukkan hasil efek samping negatif terhadap dampak *B. thuringiensis*. Bakteri *B. thuringiensis* tidak memiliki toksisitas kontak eksternal di bagian kulit mencit betina yang diinjeksi *B. thuringiensis* dengan konsentrasi $5,1 \times 10^7$ CFU selama 48 jam. Hasil tersebut menunjukkan tidak ada kematian dan tidak ada tanda

peradangan pada kulit. Studi lain menunjukkan bahwa *B. thuringiensis* tidak beracun atau patogen terhadap kelinci yang mendapat injeksi dari berbagai subspecies *B. thuringiensis*.

Studi toksisitas *B. thuringiensis* terhadap hewan golongan Vertebrata dengan konsentrasi tinggi juga membuktikan bahwa *Bacillus thuringiensis* tidak mengakibatkan kematian hewan non-target. Konsentrasi *B. thuringiensis* yang sangat tinggi tidak mempengaruhi kelangsungan hidup ikan *Rainbow trout*. Ikan *Rainbow trout* memiliki angka kematian 20 % selama 4 hari akhir penelitian (WHO, 1999). Efek ini disebabkan oleh kompetisi yang berlebihan untuk mendapatkan makanan sehingga pergerakan ikan semakin sempit serta pergerakan lambat karena kekeruhan dan adanya padatan tersuspensi ditemukan di dalam air (Land & Matilda, 2014). Survei analisis lainnya tentang dampak biolarvasida berbahan aktif *B. thuringiensis* yang telah dilakukan pada organisme non-target ikan *Oncorhynchus mykiss* pada konsentrasi 100 mg/L menunjukkan tidak adanya efek samping.

Tabel 2. Toksisitas *Bacillus thuringiensis* terhadap beberapa organisme non-target

| Taksa | Spesies | Keterangan | Hasil |
|------------------|--|--|-------------------------|
| <i>Crustacea</i> | Udang (<i>Streptocephalus seali</i>) | Uji laboratorium toksisitas akut selama 96 jam | Tidak ada efek kematian |
| <i>Decapoda</i> | Kepiting (<i>Uca</i> sp.) | Uji laboratorium toksisitas akut selama 96 jam | Tidak ada efek kematian |
| <i>Decapoda</i> | Udang air tawar (<i>Palaemonetes paludosus</i>) | Uji laboratorium toksisitas akut selama 96 jam | Tidak ada efek kematian |
| Coleoptera | Serangga air (<i>Berosus metalliceus</i>) | Uji laboratorium toksisitas akut selama 96 jam | Tidak ada efek kematian |
| Ephemeroptera | Serangga terbang (<i>Callibaetis pacificus</i>) | Uji laboratorium toksisitas akut selama 96 jam | Tidak ada efek kematian |
| Gastropoda | <i>Siput</i> (<i>Physa</i> sp.) | Uji laboratorium toksisitas akut selama 96 jam | Tidak ada efek kematian |
| Annelida | Polychaete (<i>Laonereis culveri</i>) | Uji laboratorium toksisitas akut selama 96 jam | Tidak ada efek kematian |

(Wennona, 2003)

Selain itu, *B. thuringiensis* tidak memiliki dampak negatif terhadap beberapa makroinvertebrata. Berdasarkan penelitian Jackson dkk. (2002) *B. thuringiensis* tidak memiliki efek negatif terhadap organisme non-target makroinvertebrata dan ikan dalam studi lapang di sungai. Hewan non-target lainnya dari golongan Invertebrata seperti Crustacea, Decapoda, Molusca dan Annelida tidak menunjukkan efek kematian selama 96 jam uji di laboratorium (Tabel 2).

2.5 Siput Air (*Lymnaea rubiginosa*)

Siput air *L. rubiginosa* (Linnaeus, 1758) merupakan hewan dari golongan Gastropoda, dari Famili Lymnaeidae dan Genus Lymnaea. *Lymnaea rubiginosa* merupakan hewan yang banyak hidup di sungai, kolam, danau, rawa dan perairan di daerah persawahan (Dillon, 2004). Siput air ini hanya dapat hidup di perairan tawar dengan pergerakan yang lambat di dalam air. Hewan ini termasuk golongan invertebrata yang hidup secara heterotrop dengan memakan daun di sekitar habitatnya (Andries dkk., 2007).

Lymnaea rubiginosa memiliki cangkang tunggal dengan bentuk cangkang kerucut berpilin dan bulat memanjang. Pada bagian bibir cangkang melengkung tanpa *operculum* untuk yang melekat untuk menutup cangkangnya (Dillon, 2004). Tubuhnya berwarna gelap dan pada bagian ventral terdapat kaki yang melebar dan pipih sebagai alat bergerak. *Lymnaea rubiginosa* bergerak akibat kontraksi otot poterior dan anterior di bagian ventralnya. Siput air *L. rubiginosa* memiliki sepasang tentakel yang berfungsi sebagai indra peraba dan membedakan gelap atau terang di lingkungannya. Sepasang mata yang terletak di dasar tentakel sebelah luar. Siput air *L. rubiginosa* memiliki radula (lidah parut) seperti gigi yang berfungsi memakan dedaunan. Ukuran panjang cangkang *L. rubiginosa* dewasa yaitu 30-45 mm dan lebar cangkang sekitar 2-8 mm (Widjajanti, 1998).

Siput air *L. rubiginosa* tidak memiliki siklus hidup tahunan sehingga tidak dipengaruhi oleh musim. Ukuran siput muda sekitar 8 mm dengan mengalami pertumbuhan yang cepat. Ketika siput sudah dewasa, tingkat pertumbuhannya menjadi berkurang. *Lymnaea rubiginosa* termasuk Gastropoda yang memiliki saluran yang tersusun atas mulut, faring dengan radula, kerongkongan, perut, saluran usus (*midgut*) dan anus (*hindgut*). Faring, esofagus dan anus berasal dari ektoderm. Epitel saluran pencernaan Gastropoda berupa silinder memanjang berdiameter 6-10 μm dengan permukaan yang bersilia dan mikrovilar. Sistem

pencernaan Gastropoda dapat mewakili hewan Vertebrata dan Invertebrata lainnya karena sebagian besar saluran pencernaan mengandung banyak sel saraf intra dan sub epitel serta sel granular jaringan ikat. Sel saraf di saluran pencernaan *Lymnaea rubiginosa* dapat merangsang berbagai perilaku diantaranya perilaku makan akibat respon lapar (Dillon, 2004).

2.6 Uji Safety

Uji *safety* merupakan uji keamanan suatu bahan atau produk untuk memperkirakan risiko dan efek sampingnya ketika diaplikasikan. Uji *safety* meliputi uji toksisitas akut, sub akut dan kronik pada hewan uji. Uji toksisitas akut umumnya mengamati mortalitas hewan uji selama 4 hari atau 96 jam sedangkan uji toksisitas sub akut (sub lethal) mengamati respon atau gejala yang nantinya akan menimbulkan kematian. Uji toksisitas digunakan pada obat, herbisida, insektisida, dan bahan toksikan lainnya. Toksisitas dapat terjadi pada manusia, hewan dan mikroorganisme (parasit dan non-parasit). Efek toksik dapat mengganggu kesehatan tubuh dan mengganggu lingkungan. Uji efek terhadap lingkungan dapat diukur dengan uji toksisitas akut terhadap organisme air yang mewakili rantai makanan di dalam ekosistem. Bakteri, alga, zooplankton, invertebrata dan ikan dapat digunakan sebagai hewan uji (Wibiwo, 2012).

Uji toksisitas bertujuan untuk mendeteksi adanya efek toksik terhadap sistem biologi. Data yang diperoleh merupakan respon khusus dari berbagai dosis atau konsentrasi. Konsentrasi tinggi dapat mengakibatkan kematian hewan. Toksikan dapat menyebabkan kerusakan materi membran sel sehingga terjadi kerusakan materi genetik pada DNA, RNA, protein dan bahan organik lainnya. Faktor fisiko-kimia menjadi faktor penting aktivitas toksisitas karena menyebabkan pergantian kation-kation yang berperan penting dalam metabolisme (Wibiwo, 2012). Konsentrasi bahan uji sangat berpengaruh terhadap besarnya efek toksik yang dihasilkan. Konsentrasi tinggi dapat menyebabkan toksin yang lebih tinggi (EPA, 2002). Konsentrasi rendah tidak dapat menyebabkan efek toksik yang teramati. NOEL (*No Observe Effect Level*) menunjukkan tidak adanya efek yang teramati pada dosis atau konsentrasi tertentu (Wibiwo, 2012).

Data uji toksisitas umumnya menggunakan LD₅₀ atau LC₅₀ yaitu konsentrasi atau dosis yang dapat menyebabkan mortalitas 50 % populasi hewan uji dalam waktu tertentu. LD₅₀ merupakan dosis zat yang

dilakukan pada uji toksisitas secara oral maupun injeksi yang dapat menyebabkan 50 % kematian sedangkan LC_{50} merupakan konsentrasi zat di luar tubuh hewan uji yang dapat menyebabkan 50 % kematian. Dosis yang mematikan 50 % hewan uji dan dosis maksimum yang ditoleransi. Umumnya, sebanyak 2 jenis kelompok hewan uji digunakan untuk uji toksisitas dengan pemberian dosis tunggal pada awal perlakuan. Uji toksisitas sub akut dilakukan dengan pemberian dosis secara tunggal selama 2 minggu dengan 3 dosis (EPA, 2002).

Uji toksisitas pada hewan akuatik biasanya menggunakan media air dengan konsentrasi zat tertentu. Uji toksisitas di lingkungan akuatik menggunakan organisme dari kelompok Crustacea, Molusca dan Pisces. Untuk menjaga homogenitas data, maka hewan uji diambil dari daerah asal yang sama dengan ukuran dan umur yang relatif sama. Organisme yang digunakan diharapkan sangat bersifat sensitif terhadap perubahan lingkungan Tahapan uji toksisitas meliputi tahap pemeliharaan, aklimatisasi, dan uji toksisitas (EPA, 2002).