

**POTENSI *Bacillus thuringiensis* ISOLAT BARENG TENES,
MALANG SEBAGAI AGEN PENGENDALI LARVA *Aedes
aegypti* DAN IDENTIFIKASI BERDASARKAN SEKUEN 16S
rDNA**

SKRIPSI

**oleh
NIHAYATUL LUTFIANA
135090100111005**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017**

**POTENSI *Bacillus thuringiensis* ISOLAT BARENG TENES,
MALANG SEBAGAI AGEN PENGENDALI LARVA *Aedes
aegypti* DAN IDENTIFIKASI BERDASARKAN SEKUEN 16S
rDNA**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

**oleh
NIHAYATUL LUTFIANA
135090100111005**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017**

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

**POTENSI *Bacillus thuringiensis* ISOLAT BARENG TENES,
MALANG SEBAGAI AGEN PENGENDALI LARVA *Aedes
aegypti* DAN IDENTIFIKASI BERDASARKAN SEKUEN 16S
rDNA**

**NIHAYATUL LUTFIANA
135090100111005**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 27 Juli 2017
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Zulfaidah Penata Gama, S.Si., M.Si., Ph.D
NIP 19720201 199702 2 001

Mengetahui
Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodliyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP 19700128 199412 2 001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nihayatul Lutfiana

NIM : 135090100111005

Jurusan : Biologi

Penulis Skripsi berjudul: Potensi *Bacillus thuringiensis* Isolat Bareng
Tenes, Malang sebagai Agen Pengendali
Larva *Aedes Aegypti* dan Identifikasi
berdasarkan Sekuen 16S rDNA

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung segala resiko

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 27 Juli 2017
Yang menyatakan

Nihayatul Lutfiana
135090100111005

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

**Potensi *Bacillus thuringiensis* Isolat Bareng Tenes, Malang
sebagai Agen Pengendali Larva *Aedes aegypti* dan Identifikasi
Berdasarkan Sekuen 16S rDNA**

Nihayatul Lutfiana, Zulfaidah Penata Gama
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya
2017

ABSTRAK

Demam Berdarah *Dengue* merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus *Dengue* dan nyamuk *Aedes* sp. betina sebagai vektornya. Jumlah kasus penyakit ini mengalami peningkatan di berbagai daerah termasuk Indonesia, salah satunya di Bareng Tenes, Malang, Jawa Timur. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi potensi isolat *B. thuringiensis* dari Bareng Tenes, Malang sebagai agen pengendali larva *Ae. aegypti* instar ketiga dan identifikasi berdasarkan sekuen 16S rDNA. Nyamuk *Ae. aegypti* dipelihara di Laboratorium Ekologi dan Diversitas Hewan, sedangkan sampel dianalisis di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Sampel air dan tanah diambil di 12 titik di area Bareng Tenes. Bakteri diisolasi menggunakan media selektif *B. thuringiensis*. Isolat yang mirip *B. thuringiensis* diuji toksisitasnya terhadap larva *Ae. aegypti* instar ketiga. Nilai $LC_{50-96 \text{ jam}}$ ditentukan dengan analisis probit. Uji beda hasil penelitian menggunakan ANOVA jika terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan Tukey HSD ($\alpha : 0,05$). Isolat yang paling unggul diidentifikasi berdasarkan sekuen 16S rDNA. Urutan sekuen DNA yang diperoleh disejajarkan dengan bakteri acuan menggunakan program BLAST, kemudian dibuat pohon filogeni menggunakan program MEGA ver. 6.06. Berdasarkan penelitian diperoleh dua isolat yang berpotensi sebagai agen pengendali larva *Ae. aegypti* instar ketiga yaitu BA02b dan BA03a. Isolat BA02b merupakan isolat yang paling efektif ($LC_{50-96 \text{ jam}} = 2,75 \times 10^7 \text{ sel/mL}$). Sekuen 16S rDNA isolat BA02b teridentifikasi sebagai *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* BGSC4Q2 (similaritas sebesar 99 %).

Kata kunci: *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis*, Bareng Tenes, uji toksisitas, 16S rDNA

Potency of *Bacillus thuringiensis* was Isolated from Bareng Tenes, Malang as a Biological Agent to Control *Aedes aegypti* Larvae and Identify Based on 16S rDNA Sequence

Nihayatul Lutfiana, Zulfaidah Penata Gama
Biology Department, Mathematics and Natural Sciences Faculty,
Brawijaya University
2017

ABSTRACT

Dengue is mosquito-borne viral disease that rapidly spread in all regions in recent years. Dengue virus is transmitted by female *Aedes* species. The number of dengue fever cases increased in many geographic regions including Indonesia and one of them occurred in Bareng Tenes, Malang, East Java. The objectives of this research were to identify the potency of *B. thuringiensis* from Bareng Tenes, Malang as biological agent to control third instar of *Ae. aegypti* larvae and to identify the potential *B. thuringiensis* isolate based on 16S rDNA sequence. *B. thuringiensis* was isolated from water and soil which carried out from 12 sites in Bareng Tenes area. Bacterial isolation was performed using *B. thuringiensis* selective media. Some isolates had similar phenotypic characters with *B. thuringiensis* were continued to toxicity test against third instar of *Ae. aegypti* larvae. The value of LC_{50-96h} determined using probit regression. The mean difference of *B. thuringiensis* was analyzed by ANOVA, then it was continued using Tukey HSD ($\alpha : 0,05$). The most effective isolate was identified based on 16S rDNA sequence, then these local isolate aligned to reference isolate using BLAST program. Phylogeny tree was constructed using MEGA ver 6.06 program. Based on this research, BA02b and BA03a isolates were potential agent to control *Ae. aegypti* larvae. BA02b isolate was the most effective *B. thuringiensis* ($LC_{50-96h} = 2,75 \times 10^7$ cell/mL). Based on 16S rDNA sequence, BA02b already identified as *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* BGSC4Q2 (99 % similarities).

Keywords: *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis*, Bareng Tenes, toxicity test, 16S rDNA

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil Aalamiin, dengan ungkapan rasa syukur pada Allah Yang Maha Kuasa akhirnya skripsi yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang dapat diselesaikan.

Ungkapan terima kasih yang sedalam-dalamnya disampaikan kepada:

1. Ibu Zulfaidah Penata Gama, M.Si., Ph.D yang telah membimbing dengan sabar mulai awal penelitian hingga akhir penulisan naskah serta Bapak Dr. Bagyo Yanuwiadi dan Bapak Dr. Suharjono, MS selaku penguji I dan II, atas saran yang diberikan, baik untuk pelaksanaan penelitian serta perbaikan penulisan naskah.
2. Kedua orang tua dan seluruh keluarga di rumah yang senantiasa memberikan doa, dukungan dan semangat.
3. Purnomo, S.Si dan Nanik Dwi Rahayu selaku laboran Ekologi dan Mikrobiologi, Nunung Laili, Nur Hardiyanti, Alifia Isabella, Imanda Nurul S., Hadiatullah dan M. Alif Fauzi atas bantuan dan saran dalam penyelesaian penelitian.
4. Anggita Ratih I., Ramdhani Faradilla I. N., Dea Esaayu M., Restu Ulfa S., Chalissa N. serta seluruh civitas akademik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penulisan skripsi ini merupakan upaya optimal sebagai sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, 27 Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xv
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 4
2.1 Demam Berdarah Dengue	4
2.2 Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	11
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
 BAB III METODE PENELITIAN	 19
3.1 Waktu dan Tempat	19
3.2 Deskripsi Area Bareng Tenes	19
3.3 Pengambilan Sampel	19
3.4 Pemeliharaan Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	20
3.5 Isolasi <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
3.6 Pewarnaan Gram	22
3.7 Pewarnaan Endospora	22
3.8 <i>Screening</i> Endospora	23
3.9 Uji Toksisitas <i>B. thuringiensis</i> terhadap <i>Ae. aegypti</i>	23
3.10 Ekstraksi DNA Bakteri	24
3.11 Amplifikasi Sekuen DNA	25
3.12 Uji Verifikasi DNA dengan Elektroforesis	26
3.13 Analisis Hasil Sekuensing dan Konstruksi Pohon Filogeni	26

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Isolat yang Diperoleh dari Bareng Tenes Malang dan Seleksi Isolat yang Potensial Membunuh Larva <i>Ae. aegypti</i> Instar Ketiga	27
4.2 Isolat yang Potensial Membunuh Larva <i>Ae.</i> <i>aegypti</i> Instar Ketiga	29
4.3 Faktor Fisiko-kimia dalam Uji Toksisitas Isolat yang Potensial Membunuh Larva <i>Ae.aegypti</i> Instar Ketiga	32
4.4 Spesies Isolat BA02b berdasarkan Sekuen 16S rDNA	35
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	38
5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	43

DAFTAR TABEL

No		Halaman
1	Gejala Demam Berdarah <i>Dengue</i> yang Terlihat Pada Fase Demam, Kritis dan Penyembuhan	7
2	Komposisi Larutan <i>Master Mix</i> PCR	25
3	Program Reaksi PCR 16S rDNA	26
4	Prevalensi Spora <i>B. thuringiensis</i>	28
LT 5	Isolat Bakteri yang Memiliki Karakter Mirip <i>B. thuringiensis</i> dari Sampel Sedimen Tanah dan Air dari RW. 02 Bareng Tenes Malang	44
LT 6	Uji Normalitas Data Mortalitas Larva dalam Uji <i>Screening</i>	47
LT 7	Uji Homogenitas Data Mortalitas Larva dalam Uji <i>Screening</i>	47
LT 8	Uji Beda Mortalitas Larva dalam Uji <i>Screening</i>	47
LT 9	Uji Beda Lanjutan Mortalitas Larva dalam Uji <i>Screening</i>	48
LT 10	Hasil Analisis Probit BA02b 48 Jam	49
LT 11	Uji Beda Nilai LC ₅₀	50
LT 12	Uji Beda Data Persen Mortalitas Larva <i>Ae. aegypti</i> dalam Uji Toksisitas	51

LT 13	Uji Beda Lanjutan Data Persen Mortalitas Larva <i>Ae. aegypti</i> dalam Uji Toksisitas	52
LT 14	Uji Beda Data pH Air dalam Uji Toksisitas	53
LT 15	Uji Beda Lanjutan Data pH Air dalam Uji Toksisitas	54
LT 16	Korelasi Mortalitas Larva, Suhu dan pH pada Isolat BA02b	55
LT 17	Korelasi Mortalitas Larva, Suhu dan pH pada Isolat BA03a	55
LT 18	Hasil <i>Alignment</i> Isolat BA02b dengan <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> BGSC4Q2 16S rDNA Menggunakan Program BLASTN 2.6.1+	57

DAFTAR GAMBAR

No		Halaman
1	Siklus Persebaran Virus <i>Dengue</i>	5
2	Fase Penyakit <i>Dengue</i>	7
3	Jumlah Kasus DBD di Kota Malang Selama Tahun 2010 – 2015	9
4	Jumlah Kasus DBD di Kelurahan Bareng Kecamatan Klojen Kota Malang Selama Tahun 2010 – 2015	10
5	Siklus Hidup Nyamuk <i>Ae.aegypti</i>	12
6	Sel <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>israelensis</i> yang Mengalami Sporulasi	14
7	Spora dan Kristal Protein pada <i>B. thuringiensis</i>	15
8	Mekanisme Kerja Toksin <i>Cry</i> Pada Saluran Pencernaan Larva Nyamuk	16
9	Pengelompokan Toksin <i>Cry</i> dalam Melawan Organisme Target	17
10	Titik Pengambilan Sampel di Bareng Tenes RW.02, Klojen, Malang	20
11	Mortalitas Larva <i>Ae.aegypti</i> Instar Ketiga pada Beberapa Perlakuan/Isolat dalam Uji Seleksi Isolat yang Potensial pada Waktu Pendedahan 96 Jam	27

12	Mortalitas Larva <i>Ae.aegypti</i> Instar Ketiga pada Isolat BA02b dalam Uji Toksisitas pada Beberapa Watu Pendedahan	29
13	Mortalitas Larva <i>Ae.aegypti</i> Instar Ketiga pada Isolat BA03a dalam Uji Toksisitas pada Beberapa Waktu Pendedahan	30
14	Nilai LC ₅₀ Isolat yang Potensial Membunuh Larva <i>Ae.aegypti</i> instar ketiga pada Beberapa Waktu Pendedahan	31
15	Suhu Media dalam Uji Toksisitas terhadap Larva <i>Ae.aegypti</i> Instar Ketiga pada Beberapa Waktu Pendedahan	33
16	pH Media dalam Uji Toksisitas terhadap Larva <i>Ae.aegypti</i> Instar Ketiga pada Beberapa Waktu Pendedahan	34
17	Pohon Filogeni Isolat BA02b dengan Isolat Pembanding	36
LG 18	Sel Bakteri dengan Mikroskop Perbesaran 1000x	45
LG 19	Hasil Pengamatan Morfologi Larva <i>Ae. aegypti</i> Instar Ketiga dalam Uji Toksisitas	46
LG 20	Hasil Elektroforesis Produk PCR Sekuen 16S rDNA Isolat BA02b	56

DAFTAR LAMPIRAN

No		Halaman
1	Komposisi Media	43
2	Isolat yang Diperoleh dari Bareng Tenes Malang	44
3	Hasil Pengamatan Sel Bakteri yang Mirip <i>B. thuringiensis</i>	45
4	Morfologi Larva <i>Ae. aegypti</i> Instar Tiga dalam Uji Toksisitas	46
5	Analisis Statistik Mortalitas Larva dalam Uji <i>Screening</i> Isolat yang Berpotensi Membunuh Larva <i>Ae. aegypti</i>	47
6	Analisis Probit untuk Menentukan Nilai LC_{50-48} jam Isolat BA02b	49
7	Analisis Statistik Nilai LC_{50} Isolat yang Berpotensi Membunuh Larva <i>Ae. aegypti</i>	50
8	Analisis Statistik Persen Mortalitas Larva <i>Ae. aegypti</i> dalam Uji Toksisitas	51
9	Analisis Statistik pH Air dalam Uji Toksisitas	53
10	Analisis Statistik Korelasi Mortalitas Larva, Suhu dan pH	55
11	Hasil Elektroforesis Sekuen 16S rDNA	56
12	Hasil <i>Alignment</i> Isolat BA02b dengan <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> BGSC4Q2 16S rDNA	57

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>Ae. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
<i>B.thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry	Crystal
Cyt	Cytosol
DBD	Demam Berdarah <i>Dengue</i>
DD	Demam <i>Dengue</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DSS	<i>Dengue Shock Syndrome</i>
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetat
F2	Filial kedua (generasi kedua)
IGR	<i>Insect Growth Regulator</i>
KLB	Kejadian Luar Biasa
LB	Luria Bertani
LC ₅₀	<i>Lethal Concentration</i> yang efektif membunuh hewan coba sebanyak 50 %
NA	<i>Nutrient Agar</i>
NaCl	<i>Sodium Chloride</i>
NB	<i>Nutrinet Broth</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RALF	Rancangan Acak Lengkap Faktorial
rDNA	<i>ribosomal-DNA</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
sp.	Spesies
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris-EDTA
UV	Ultraviolet
WHO	<i>World Heath Organization</i>

<u>Simbol/Singakatan</u>	<u>Nama Unit</u>
μL	mikroliter
μm	mikrometer

δ	Delta
nm	nanometer
mL	mililiter
mm	milimeter
cm	centimeter
kDa	kiloDalton
L	Liter
m	Meter
M	Molar
°C	Derajat Celcius
%	Persen
rpm	<i>rotation per minutes</i>
pmol	picomol
ng	nanogram