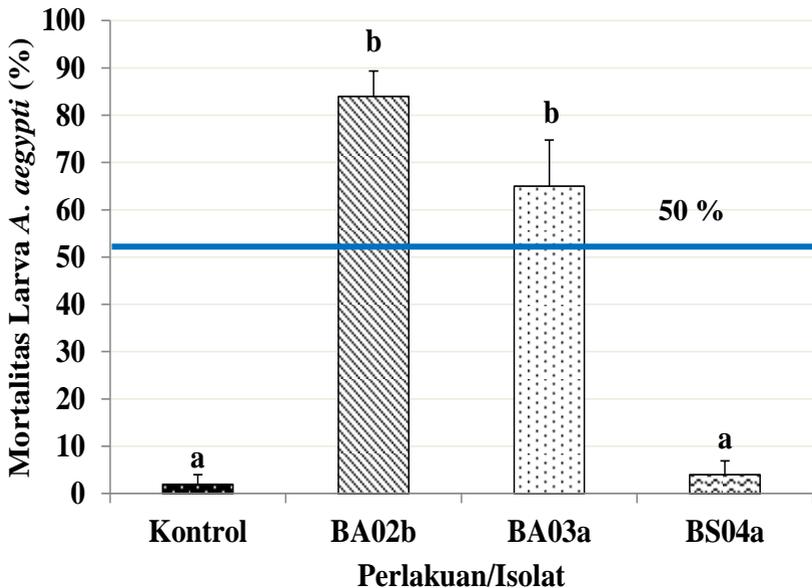


BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolat yang Diperoleh dari Bareng Tenes Malang dan Seleksi Isolat yang Potensial Membunuh Larva *Ae. aegypti* Instar Ketiga

Hasil isolasi bakteri dari RW.02 Bareng Tenes Malang, diperoleh total 22 isolat ditampilkan pada Lampiran 2, yang memiliki karakter koloni mirip *B. thuringiensis*. Bakteri *B. thuringiensis* memiliki karakter koloni berbentuk bulat, tepian berkerut, berwarna putih, elevasi timbul dan permukaan kasar. Selain itu sel *B. thuringiensis* berbentuk batang, Gram positif dan memiliki endospora pada bagian subterminal (Tripsila & Suharjono, 2013).



Gambar 11. Mortalitas larva *Ae.aegypti* instar ketiga pada beberapa perlakuan/isolat dalam uji seleksi isolat yang potensial pada waktu pendedahan 96 jam. Keterangan: Huruf yang sama di atas balok menunjukkan bahwa mortalitas antar perlakuan/isolat tidak berbeda secara signifikan ($p>0,05$)

Berdasarkan pengamatan morfologi sel dan pewarnaan Gram diperoleh lima isolat berbentuk batang dan merupakan Gram positif yaitu BS01b, BA02b, BA03a, BS04a dan BS04c. Isolat yang berbentuk batang dan Gram positif, selanjutnya dilakukan pewarnaan endospora dan diperoleh tiga isolat yang menunjukkan adanya endospora yaitu BA02b, BA03a dan BS04a seperti pada Lampiran 3.

Tiga isolat dengan karakteristik mirip *B. thuringiensis* yaitu BA02b, BA03a dan BS04a, dilakukan penghitungan persentase spora selama 96 jam seperti ditampilkan pada Tabel 4 dan diseleksi untuk menentukan potensinya dalam membunuh larva *Ae. aegypti* instar ketiga. Berdasarkan uji seleksi dalam waktu pendedahan 96 jam seperti ditunjukkan Gambar 11, isolat BA02b dan BA03a memiliki kemampuan membunuh larva *Ae. aegypti* instar ketiga lebih dari 50 % yaitu berturut-turut 84 % dan 65 %, sedangkan isolat BS04a hanya mampu membunuh larva *Ae. aegypti* instar ketiga sebesar 4 % dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol. Berdasarkan uji prevalensi spora selama 96 jam, isolat BS04a memiliki persentase prevalensi spora yang cukup tinggi yaitu mencapai 100 %, namun tidak dapat membunuh larva *Ae. aegypti* instar ketiga. Hal tersebut karena kristal protein yang dihasilkan tidak sesuai dengan reseptor pada sel saluran pencernaan larva *Ae. aegypti*. Menurut Argolo-Filho & Loguercio (2014) aktivitas insektisida pada *B. thuringiensis* terjadi karena adanya kristal protein atau biasa disebut δ -endotoksin yang terdiri atas dua famili yaitu protein *Cry* (kristal) dan protein *Cyt* (sitolitik). Protein δ -endotoksin yang diproduksi *B. thuringiensis* memiliki target yang spesifik karena tersusun atas beberapa jenis protein (*Cry* dan *Cyt*) yang bervariasi. Virulensi *B. thuringiensis* dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain enzim pada hewan target, keberadaan senyawa antimikroba, struktur kristal protein dan konsentrasi toksin.

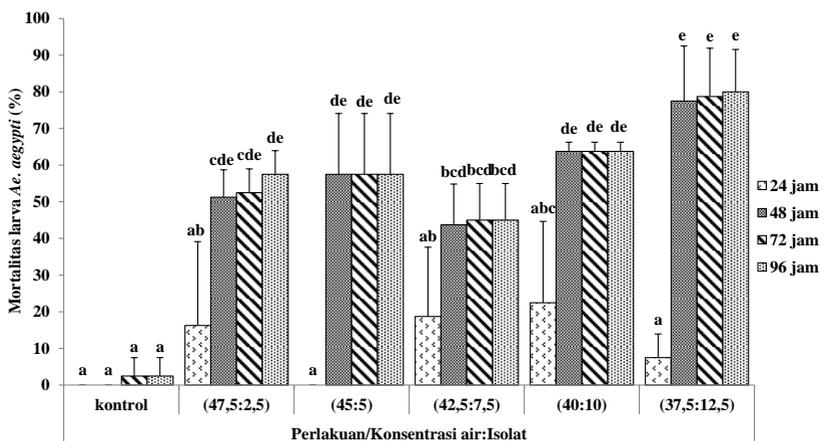
Tabel 4. Prevalensi spora *B. thuringiensis*

No	Nama Isolat	Prevalensi spora (%)			
		24 Jam	48 Jam	72 Jam	96 Jam
1	BA02b	0	54,69	74,76	100
2	BS04a	0	35,64	64,82	100
3	BA03a	18,75	51,90	64,69	91,25

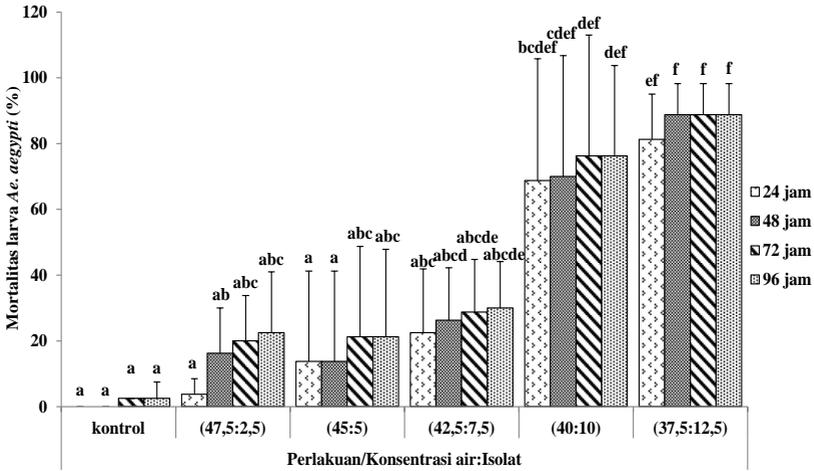
Menurut Ibrahim dkk. (2010) pembentukan spora (sporulasi) terdiri atas beberapa fase yaitu pembentukan filamen aksial, pembentukan sekat spora bagian depan, pembentukan kristal protein, pembentukan eksospora, pembentukan dinding sel primordial, pembentukan korteks dan mantel yang disertai dengan perubahan nukleoid spora, pematangan spora dan pelepasan spora dari sel. Sepanjang sisi endospora *B. thuringiensis* yang sudah matang terdapat kristal protein yang bervariasi. Kristal protein tersebut memiliki jenis dan susunan yang bervariasi serta bersifat toksik bagi serangga spesifik. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi persentase prevalensi spora suatu isolat, maka semakin tinggi toksisitasnya karena pembentukan spora diikuti dengan pembentukan kristal protein.

4.2 Isolat yang Potensial Membunuh Larva *Ae.aegypti* Instar Ketiga

Isolat yang memiliki kemampuan membunuh larva *Ae. aegypti* instar ketiga lebih dari 50 % yaitu BA02b dan BA03a, selanjutnya dilakukan uji toksisitas untuk menentukan nilai LC_{50} .



Gambar 12. Mortalitas larva *Ae.aegypti* instar ketiga pada isolat BA02b dalam uji toksisitas pada beberapa waktu pendedahan. Keterangan: Huruf yang sama di atas balok menunjukkan bahwa mortalitas antar perlakuan/isolat tidak berbeda secara signifikan ($p>0,05$)

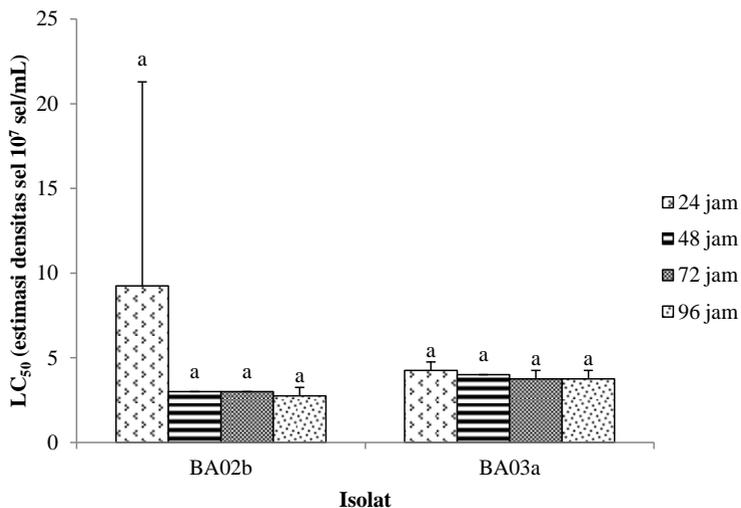


Gambar 13. Mortalitas larva *Ae.aegypti* instar ketiga pada isolat BA03a dalam uji toksisitas pada beberapa waktu pendedahan. Keterangan: Huruf yang sama di atas balok menunjukkan bahwa mortalitas antar perlakuan/isolat tidak berbeda secara signifikan ($p>0,05$)

Persentase mortalitas larva *Ae. aegypti* instar ketiga seperti ditampilkan pada Gambar 12 dan 13. Berdasarkan hasil uji diperoleh bahwa pada waktu pendedahan 24 jam efektivitas isolat BA02b dalam membunuh larva *Ae. aegypti* instar ketiga rendah, setelah waktu pendedahan 48 jam efektivitasnya meningkat, namun pada waktu pendedahan 48 – 96 jam tidak menunjukkan peningkatan efektivitas yang signifikan. Selain itu, semakin tinggi peningkatan konsentrasi maka efektivitas isolat juga semakin tinggi. Hal tersebut dapat dilihat dari semakin tingginya persen mortalitas larva *Ae. aegypti* instar ketiga pada setiap peningkatan konsentrasi isolat.

Berdasarkan hasil uji toksisitas diperoleh nilai $LC_{50-96 \text{ jam}}$ seperti ditampilkan pada Gambar 14 yang menunjukkan bahwa tidak ada beda nilai LC_{50} antar isolat dan antar waktu pendedahan. Nilai $LC_{50-96 \text{ jam}}$ isolat BA02b yaitu $2,75 \times 10^7$ sel/mL, sedangkan BA03a $3,75 \times 10^7$ sel/mL. Berdasarkan WHO (2009) penggunaan *B. thuringiensis* sebagai agen pengendali larva nyamuk perlu adanya standardisasi, dimana nilai potensinya dinyatakan dalam ITU/mg produk, sedangkan aktivitas larvasidanya biasa dinyatakan sebagai LC_{50} . Konsentrasi *B. thuringiensis* dalam bentuk kultur yang

berpotensi membunuh larva nyamuk tidak boleh lebih dari 10^9 sel/ml, sehingga isolat BA02b dan BA03a termasuk berpotensi sebagai agen pengendali larva *Ae. aegypti*.



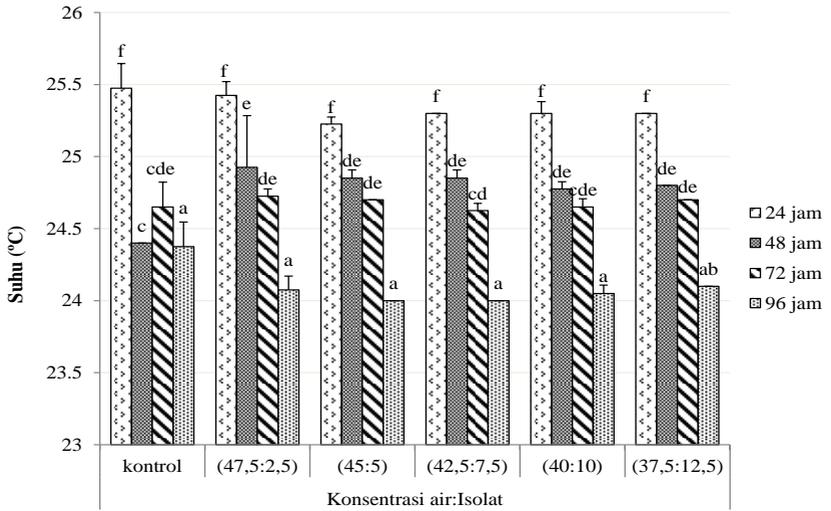
Gambar 14. Nilai LC_{50} Isolat yang potensial membunuh larva *Ae.aegypti* instar ketiga pada beberapa waktu pendedahan. Keterangan: Huruf yang sama di atas balok menunjukkan bahwa mortalitas antar perlakuan/isolat tidak berbeda secara signifikan ($p>0,05$)

Menurut penelitian Gama dkk. (2013) isolat PWR_{4-32} memiliki nilai $LC_{50-72 \text{ jam}}$ sebesar $2,3 \times 10^8$ sel/mL. Isolat ini merupakan isolat yang diperoleh dari area Malang, sehingga berdasarkan nilai LC_{50} isolat BA02b lebih efektif dibandingkan dengan isolat PWR_{4-32} yang juga diisolasi dari area Malang karena berdasarkan uji statistik nilai LC_{50} isolat BA02b pada setiap waktu pendedahan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Menurut Orsine dkk. (2012) LC_{50} merupakan indeks statistika yang menunjukkan konsentrasi suatu senyawa yang dapat menyebabkan kematian sebesar 50 % hewan coba pada populasi di dalam suatu penelitian eksperimental.

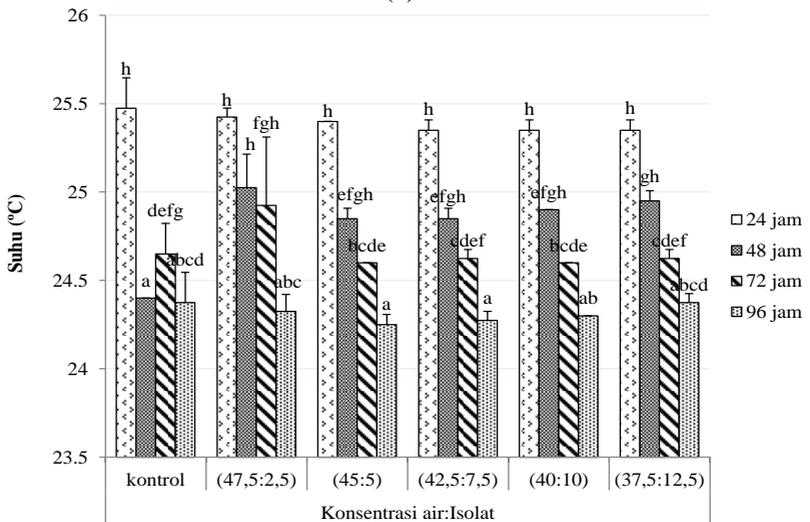
4.3 Faktor Fisiko-kimia dalam Uji Toksisitas Isolat yang Potensial Membunuh Larva *Ae.aegypti* Instar Ketiga

Uji toksisitas isolat BA02b dan BA03a juga dilakukan pengukuran faktor fisika dan kimia, yaitu suhu dan pH media. Berdasarkan analisis korelasi Pearson seperti pada Lampiran 10 menunjukkan bahwa pada isolat BA02b mortalitas menunjukkan adanya korelasi dengan suhu dan pH. Suhu menunjukkan korelasi negatif dengan mortalitas yang berarti bahwa penurunan suhu dapat meningkatkan mortalitas larva *Ae. aegypti* atau sebaliknya, sedangkan pH menunjukkan korelasi positif dengan mortalitas yang berarti bahwa pH yang semakin tinggi menyebabkan peningkatan mortalitas larva *Ae. aegypti* atau sebaliknya. Pada Isolat BA03a suhu tidak memiliki korelasi dengan mortalitas larva, namun menunjukkan korelasi negatif dengan pH, yang berarti bahwa semakin rendah suhu media, maka nilai pH semakin tinggi atau sebaliknya. Selain itu, pH menunjukkan korelasi positif dengan mortalitas yang berarti bahwa pH yang semakin tinggi menyebabkan peningkatan mortalitas larva *Ae. aegypti* atau sebaliknya.

Berdasarkan Mukaka (2012) korelasi merupakan metode statistik yang digunakan untuk menentukan hubungan antar dua variabel secara linier. Meskipun demikian korelasi hanya menjelaskan kekuatan hubungan tanpa memperhatikan kausalitas (mana yang mempengaruhi dan dipengaruhi. Kedua variabel bisa berperan sebagai variabel x atau y. Oleh karena itu, korelasi antara mortalitas larva, suhu dan pH dalam uji toksistas ini hanya menunjukkan korelasi linier. Korelasi tersebut tidak dapat menjelaskan variable mana yang mempengaruhi atau dipengaruhi.

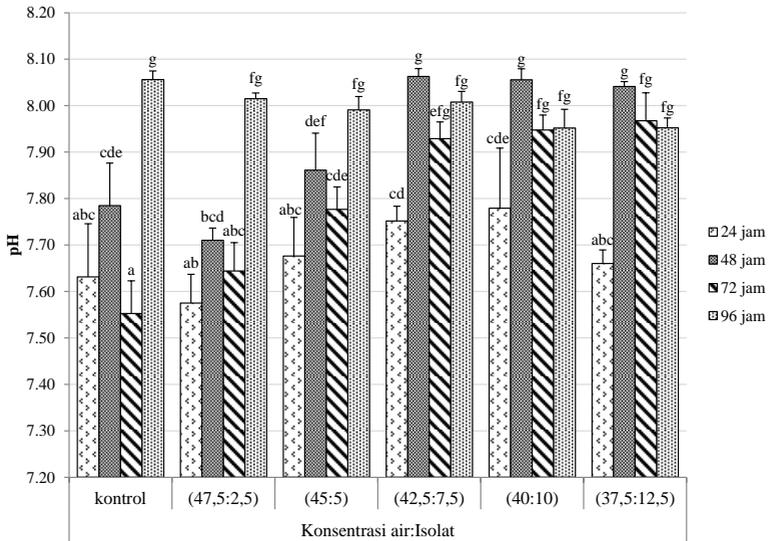


(a)

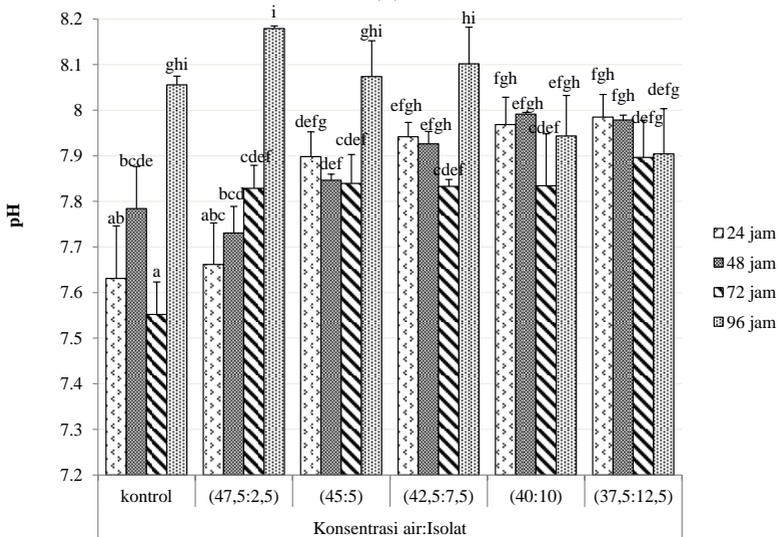


(b)

Gambar 15. Suhu media dalam uji toksisitas terhadap larva *Ae.aegypti* instar ketiga pada beberapa waktu pendedahan. Keterangan: (a) Isolat BA02b, (b) Isolat BA03a, Huruf yang sama di atas balok menunjukkan bahwa mortalitas antar perlakuan/isolat tidak berbeda secara signifikan ($p > 0,05$)



(a)



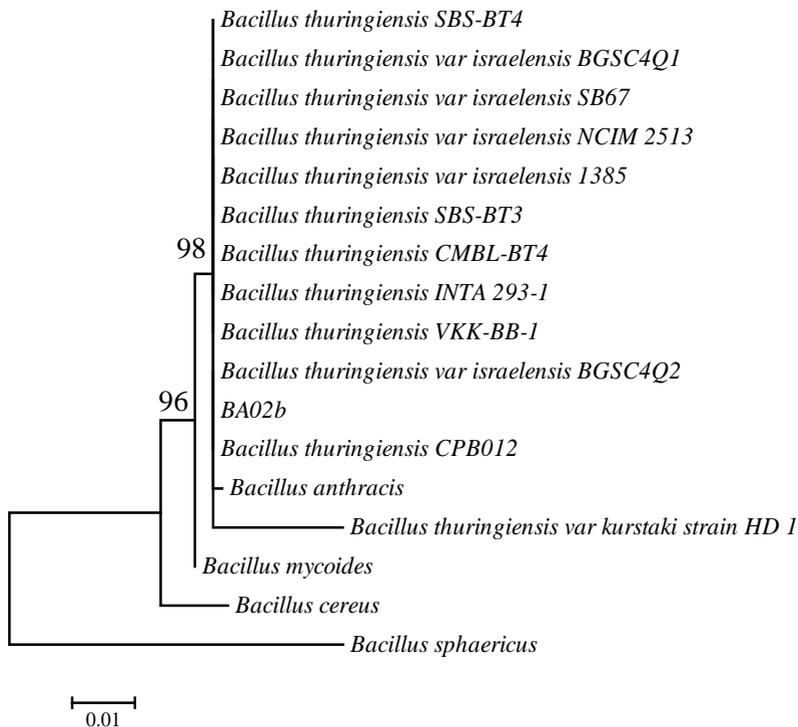
(b)

Gambar 16. pH media dalam uji toksisitas terhadap larva *Ae.aegypti* instar ketiga pada beberapa waktu pendedahan. Keterangan: (a) Isolat BA02b, (b) Isolat BA03a, Huruf yang sama di atas balok menunjukkan bahwa mortalitas antar perlakuan/isolat tidak berbeda secara signifikan ($p>0,05$)

Berdasarkan hasil pengukuran faktor fisika-kimia yang ditampilkan pada Gambar 15 dan 16 pada kedua isolat, nilai suhu media bervariasi dan menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar waktu pengamatan, namun sebagian besar tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan konsentrasi isolat. Suhu media pada kedua isolat berkisar antara 24,1 – 25,47 °C. Menurut Yasuoka dan Levin (2007) suhu air yang optimum untuk hidup larva *Aedes* sp. adalah sekitar 20 – 25 °C. Hal tersebut menunjukkan bahwa kematian larva *Ae. aegypti* tidak disebabkan karena perubahan suhu. Nilai pH media pada kedua isolat bervariasi antar waktu dan konsentrasi isolat, dengan nilai berkisar antara 7,55 – 8,17. Menurut Ningsih dkk. (2016) pH optimum untuk pertumbuhan larva *Ae. aegypti* yaitu antara 6 – 8. Pada isolat BA02b, media dengan pH >8 menunjukkan tidak berbeda signifikan dengan perlakuan kontrol, pada pH tersebut hewan coba pada perlakuan kontrol tidak mengalami kematian. Pada Isolat BA03a, media dengan pH >8 terjadi pada waktu pendedahan 96 jam, sedangkan pada waktu tersebut tidak ditemukan penambahan kematian larva *Ae. aegypti*. Berdasarkan penjelasan tersebut menunjukkan bahwa faktor fisika dan kimia masih dalam batas normal serta tidak menyebabkan kematian pada hewan coba. Sehingga satu-satunya penyebab kematian dari hewan coba adalah toksin yang diproduksi oleh isolat *B. thuringiensis* yang juga didukung dengan adanya bukti kerusakan pada saluran pencernaan larva akibat toksin tersebut seperti ditunjukkan pada gambar di Lampiran 4.

4.4 Spesies Isolat BA02b berdasarkan Sekuen 16S rDNA

Berdasarkan uji toksisitas isolat yang paling efektif, dipilih isolat BA02b dengan nilai LC₅₀ yang lebih kecil untuk diidentifikasi secara molekular. Sekuen 16S rDNA isolat BA02b teridentifikasi sebagai *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* BGSC4Q2 dengan similaritas sebesar 99 %, hasil analisis ditampilkan pada Lampiran 12.



Gambar 17. Pohon filogeni isolat BA02b dengan isolat pembandingan

Menurut Drancourt dkk. (2000) hasil identifikasi sekuen 16S rDNA termasuk dalam tingkat spesies apabila nilai similaritasnya $\geq 99\%$ dan tingkat genus apabila nilai similaritasnya $98 - 97\%$. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat BA02b termasuk dalam spesies *B. thuringiensis*. Hal tersebut juga didukung dengan pohon filogeni yang ditampilkan dalam Gambar 17 bahwa isolat BA02b memiliki kekerabatan erat dengan *B. thuringiensis*. Menurut Brian dkk. (2010) *B. thuringiensis* var. *israelensis* memiliki toksisitas yang tinggi terhadap sebagian besar spesies nyamuk. Bakteri *B. thuringiensis* var. *israelensis* memiliki toksin parasporal yang berbentuk seperti bola dan terdiri atas empat protein utama yaitu *Cry4Aa*, *Cry4Ba*, *Cry11Aa* dan *Cyt1Aa*. Toksin parasporal pada *B. thuringiensis* terdiri atas dua jenis, yaitu kristal protein (*Cry*) dan sitolitik protein (*Cyt*). Sebagian besar toksin *Cry* aktif melawan Lepidoptera, beberapa

Diptera, Coleoptera atau Nematoda. Toksin *Cyt* umumnya hanya toksik bagi larva nyamuk, lalat hitam dan beberapa kumbang dan biasanya terdapat pada bakteri yang memproduksi larvasida seperti *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

Toksin parasporal yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis* bekerja dengan cara merusak saluran pencernaan larva sehingga menyebabkan kematian, seperti pada Lampiran 2. Mekanisme toksin *Cry* dalam membunuh larva *Ae. aegypti* antara lain, spora dan kristal protein tertelan oleh larva, selanjutnya kristal protein larut pada kondisi alkalin di saluran pencernaan. Enzim protease dalam pencernaan serangga target memecah kristal protein menjadi *peptides- δ -endotoxins* lebih kecil yang aktif. Toksin yang telah aktif berikatan dengan reseptor spesifik pada sel di saluran pencernaan larva *Ae. aegypti*, kemudian toksin masuk ke dalam membran sehingga terjadi pembentukan pori-pori yang menyebabkan kerusakan sel karena lisis. Paralisis dari saluran pencernaan dan bagian mulut menyebabkan serangga tidak dapat lagi menelan makanan. Rusaknya bagian saluran pencernaan juga menyebabkan germinasi dari endospora *B. thuringiensis* yang telah tertelan dan *septicemia* yang disebabkan proliferasi *B. thuringiensis* dan menyebabkan larva mati (Argolo-Filho & Loguercio, 2014).