

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2016 sampai Mei 2017. Pemeliharaan nyamuk *Ae. aegypti* dan uji toksisitas dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Diversitas Hewan, sedangkan analisis sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

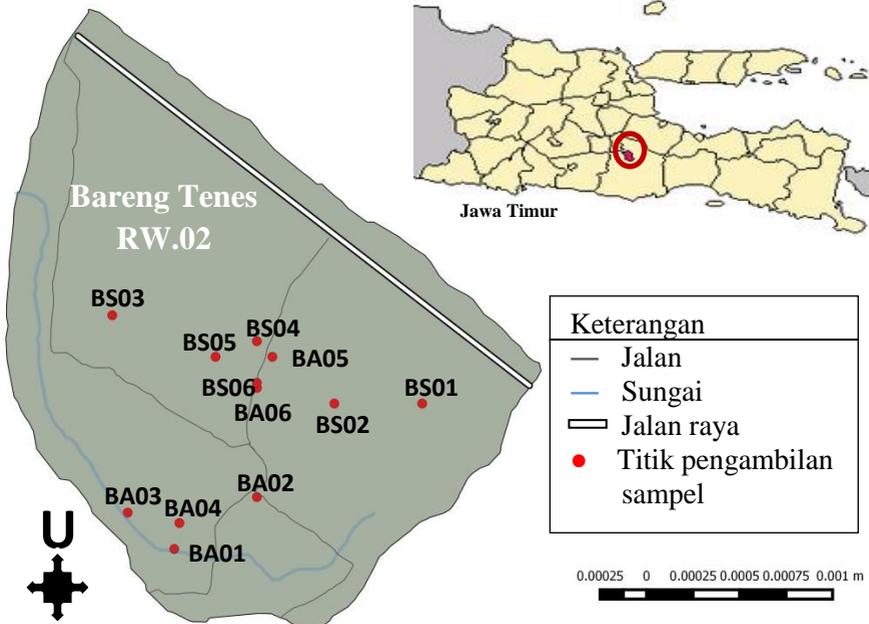
3.2 Deskripsi Area Bareng Tenes

Bareng Tenes merupakan daerah padat penduduk yang termasuk dalam Kelurahan Bareng, Kecamatan Klojen, Kota Malang, Provinsi Jawa Timur. Bareng Tenes terletak pada ketinggian 440 - 667 meter di atas permukaan air laut. Sebagaimana masyarakat di area perkotaan, penduduk Bareng Tenes sangat dinamis yang memungkinkan persebaran penyakit lebih cepat. Kondisi iklim Kelurahan Bareng selama tahun 2010 tercatat rata-rata suhu udara berkisar antara 23,2 - 24,5 °C, sedangkan suhu maksimum mencapai 29,2 °C dan suhu minimum 19,8 °C. Curah hujan antara 30 – 526 mm. Kelembaban rata-rata udara berkisar 78 – 86 %, dengan kelembaban maksimum 99 % dan minimum mencapai 46 % (BPS, 2011).

3.3 Pengambilan Sampel

Penentuan lokasi pengambilan sampel dilakukan secara acak. Pengambilan sampel dilakukan di 12 titik dari RW.02 seperti pada Gambar 10. Sampel yang diambil berupa air dari selokan dan tanah. Sampel tanah diambil pada kedalaman 0 - 10 cm dari permukaan tanah, kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik steril. Sampel air diambil dari permukaan air selokan dan dimasukkan dalam botol kultur steril berukuran 140 mL hingga penuh. Sampel yang telah dibungkus selanjutnya dimasukkan ke dalam *ice box* dan segera dibawa ke laboratorium untuk dianalisis (Tripsila & Suharjono, 2013). Selain pengambilan sampel juga dilakukan pengukuran parameter fisika dan kimia di lokasi tempat pengambilan sampel antara lain suhu udara, suhu tanah, kelembaban udara dan pH. Suhu

diukur menggunakan termometer (*Leybold Didactic GMBH 667984*), kelembaban diukur menggunakan higrometer (*Hygrometer supraterm % rel Feuchte, Germany*), sedangkan pH diukur menggunakan pH meter (*Leybold Didactic GMBH 667984, Germany*).



Gambar 10. Titik pengambilan sampel di Bareng Tenes RW.02, Klojen, Malang

3.4 Pemeliharaan Nyamuk *Ae. aegypti*

Larva *Ae. aegypti* yang digunakan untuk uji toksisitas adalah generasi kedua (F2) karena sebelumnya hewan coba perlu diaklimatisasi terlebih dahulu di laboratorium, sehingga untuk mendapatkan generasi ke dua (F2) perlu dilakukan *rearing* nyamuk. *Rearing* nyamuk yaitu pengembangbiakan nyamuk dari telur, larva hingga dewasa dan bertelur kembali. Prosedur *rearing* nyamuk yaitu telur nyamuk ditetaskan dengan cara meletakkannya di ember berukuran 2000 cm³ yang telah berisi air sumur ½ bagian, kemudian

ditutup kelambu untuk mencegah nyamuk keluar bila sudah menjadi nyamuk tanpa diketahui, ditambahkan dengan penerangan (lampu 10 Watt) untuk membantu proses *molting*.

Setelah sekitar 1 – 2 hari telur akan menetas dan memasuki fase larva. Larva terdiri atas empat fase yaitu instar I, II, III dan IV. Pada fase larva diberikan pakan berupa *dogfeed* yang telah dihaluskan sebanyak 0,5 gram dan diberikan satu kali sehari antara pukul 09.00 – 15.00 WIB, sedangkan setelah memasuki fase pupa tidak diberi makan karena mulut sudah tereduksi dan merupakan fase inaktif. Setelah memasuki fase pupa, pupa dipindahkan ke gelas plastik kecil yang telah berisi air sumur $\frac{1}{2}$ bagian, kemudian diletakkan pada kotak *rearing* (*barraub box*). Pakan nyamuk di dalam kotak *rearing* berupa air gula dengan konsentrasi 5 – 10 % yang diteteskan pada kapas dan diletakkan pada kotak plastik, sedangkan untuk mematangkan telur pada nyamuk betina diberi pakan darah pada siang hari atau sore hari (Fritz dkk., 2014). Selain itu, di dalam kotak *rearing* juga disediakan kertas saring yang dibasahi air dan diletakkan pada kotak plastik sebagai tempat bertelur.

3.5 Isolasi Bakteri *B. thuringiensis*

Metode isolasi bakteri berdasarkan Gama dkk. (2013) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 25 gram tanah atau 25 mL air ditambahkan ke dalam 225 mL NaCl 0,85 %, kemudian dipanaskan pada suhu 80 °C selama 15 menit untuk membunuh sel vegetatif dan bakteri non-spora. Selanjutnya dari larutan tersebut dibuat serial dilusi 10^{-1} sampai 10^{-6} dengan cara menambahkan 1 mL larutan seri pengenceran sebelumnya ke dalam 9 mL NaCl 0,85 %. Masing-masing seri pengenceran dituang sebanyak 0,1 mL dengan cara *pour plate* ke cawan petri yang telah berisi media selektif. Media selektif dengan komposisi (glukosa 3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, *yeast extract* 2 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,08 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, agar 15 g dalam 1 L akuades). Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 - 96 jam. Setelah tumbuh, diambil koloni tunggal dan diinokulasikan pada cawan petri berisi media selektif dengan cara *streak plate*. Selanjutnya cawan petri diinkubasi pada suhu ruang selama 48- 72 jam. Isolat yang tumbuh diinokulasikan pada media NA.

3.6 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram berfungsi untuk menentukan jenis Gram, bentuk dan ukuran sel bakteri. Prosedur pewarnaan Gram menurut Prakash (2014) antara lain, gelas obyek ditetesi ethanol 70% dan dibersihkan menggunakan tisu. Biakan bakteri yang berumur 24 jam diambil menggunakan jarum ose dan diletakkan pada permukaan gelas obyek. Selanjutnya bakteri difiksasi dengan cara melewatkan gelas obyek di atas api secara cepat. Bakteri yang telah terfiksasi selanjutnya ditetesi dengan Gram A (kristal violet) dan didiamkan selama 1 - 3 menit, kemudian dibilas dengan air dan dikeringanginkan. Setelah kering selanjutnya bakteri ditetesi dengan Gram B (iodin) selama 1 menit, lalu dibilas dengan air dan dikeringanginkan. Selanjutnya bakteri ditetesi dengan Gram C (ethanol) selama 30 detik, lalu dibilas dan dikeringanginkan. Setelah kering, bakteri lalu ditetesi dengan Gram D (safranin) selama 1 - 2 menit, kemudian dibilas dan dikeringanginkan. Preparat selanjutnya diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 x. Sel *B. thuringiensis* menunjukkan Gram positif (ungu), berbentuk batang dan berukuran sekitar 1,0 - 2,0 μm .

3.7 Pewarnaan Endospora

Metode pewarnaan endospora berdasarkan Prakash (2014) yaitu gelas obyek ditetesi dengan ethanol 70 % dan dibersihkan dengan tisu. Biakan bakteri yang berumur 72 - 120 jam diambil dengan jarum ose dan diletakkan pada gelas obyek. Bakteri pada gelas obyek difiksasi dengan cara melewatkannya pada api dengan cepat. Selanjutnya gelas obyek diletakkan di atas penangas dan ditutup dengan kertas saring. Pewarna *Malachite green* diteteskan pada gelas obyek sampai timbul uap kira-kira 10 menit dan pewarna tidak boleh kering. Selanjutnya pewarna pada gelas obyek dibilas dengan air dan dikering anginkan. Setelah itu, bakteri ditetesi dengan safranin dan dibiarkan 1 - 2 menit, lalu dibilas dan dikering anginkan. Preparat bakteri diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 x dan ditetesi minyak imersi. Bakteri *B. thuringiensis* memiliki endospora berbentuk oval dengan ukuran 1,0 - 1,3 μm dan terletak di subterminal.

3.8 Screening Endospora

Koloni bakteri diinokulasikan pada media sporulasi (10 g glukosa, 7,5 g pepton, 6,8 g KH_2PO_4 , 123 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 320 mg FeSO_4 dalam 1 mol/L NH_4Cl). Suspensi bakteri diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm. Sebanyak 3,75 mL suspensi diinokulasikan ke dalam 25 mL media sporulasi dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 96 jam dengan kecepatan 120 rpm. Setiap 24 jam dihitung jumlah endospora, berdasarkan jumlah endospora dibagi jumlah sel vegetatif hidup dikali 100 % (Gama dkk., 2013).

3.9 Uji toksisitas *B. thuringiensis* terhadap Larva *Ae. aegypti*

Uji toksisitas *B. thuringiensis* terhadap larva *Ae. aegypti* ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF) dengan faktor konsentrasi *B. thuringiensis* dan waktu pendedahan. Masing-masing perlakuan sebanyak tiga ulangan. Parameter yang diamati yaitu persentase kematian larva *Ae. aegypti*. Uji toksisitas *B. thuringiensis* ini dilakukan dua tahap yaitu tahap pertama seleksi isolat yang mampu membunuh larva *Ae. aegypti* dan kemudian dilanjutkan penentuan nilai $\text{LC}_{50-96 \text{ jam}}$. Nilai LC_{50} menunjukkan konsentrasi toksin yang dapat menyebabkan kematian 50 % hewan coba.

3.9.1 Seleksi *B. thuringiensis* patogen terhadap larva

Isolat diinokulasikan ke dalam 50 mL media NB, kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 72 - 96 jam. Kultur bakteri ini diambil setiap 24 jam untuk diamati jumlah selnya menggunakan *haemocytometer*, untuk mendapatkan suspensi dengan densitas sel sekitar $10^6 - 10^7$ sel/ml. Kultur bakteri sebanyak 5 mL diletakkan pada mangkuk plastik yang berisi air sumur steril sebanyak 45 mL. Pada larutan tersebut ditambahkan larva *Ae. aegypti* yang berada pada fase instar ketiga sebanyak 20 ekor dan diberi pakan berupa *dogfeed*, sedangkan pada perlakuan kontrol tidak diberikan kultur bakteri. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah kematian larva dalam waktu pendedahan 24, 48, 72 dan 96 jam.

3.9.2 Uji toksisitas akut (Penentuan nilai LC₅₀)

Isolat yang mampu membunuh larva *Ae. aegypti* lebih dari 50 % berdasarkan uji seleksi *B. thuringiensis* patogen terhadap larva *Ae. aegypti*, dilanjutkan dengan penentuan nilai LC_{50-96 jam}. Nilai LC₅₀ diperoleh dengan analisis probit berdasarkan persamaan 1. Karakter Y merupakan % kematian larva, sedangkan x adalah log konsentrasi *B. thuringiensis*. Nilai a dan b diperoleh dari kurva hubungan antara Y dan x (Kucukgul dkk., 2012):

$$Y = a + bx \dots\dots\dots(1)$$

Isolat *B. thuringiensis* yang telah diremajakan dan diinkubasi selama 24 jam, diinokulasikan ke dalam media *Nutrient broth* sebanyak 250 mL. Selanjutnya kultur dimasukkan ke dalam inkubator *shaker* pada suhu ruang (28 – 30 °C) selama 96 jam. Setiap 24 jam sekali dilakukan penghitungan densitas sel bakteri menggunakan *haemocytometer* dan pengamatan endospora. Kultur bakteri dengan densitas 10⁶ – 10⁷ sel/mL siap digunakan untuk uji toksisitas. Berdasarkan Pratiwi dkk. (2013) uji toksisitas ini menggunakan botol plastik dengan perbandingan air sumur dan suspensi bakteri yaitu 50:0 (kontrol), 47,5:2,5, 45:5; 32,5:7,5, 40:10, dan 37,5:12,5 mL masing – masing 4 ulangan. Volume total larutan pada botol plastik yaitu 50 mL, kemudian ditambahkan dengan 20 ekor larva *Ae. aegypti* instar ketiga dan diberikan *dogfeed* satu kali sehari antara pukul 09.00 – 15.00 WIB. Jumlah kematian larva diamati pada 4 waktu yang berbeda yaitu 24 jam, 48 jam, 72 jam dan 96 jam. Setiap waktu pengamatan dilakukan pengukuran suhu dan pH media uji.

Nilai LC₅₀ ditentukan dengan analisis probit menggunakan program SPSS 16.0 *for Windows*. Nilai LC₅₀, Suhu dan pH media uji tiap waktu pengamatan dan konsentrasi dianalisis menggunakan ANOVA, jika terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan Tukey HSD ($\alpha : 0,05$).

3.10 Ekstraksi DNA Bakteri

Ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan protokol iNtRON Biothecnology, Inc. Biakan *B. thuringiensis* berumur 48 jam pada NA diambil sebanyak 5 ose dan dipindahkan ke dalam *microtube* yang berisi 50 µL akuades steril. Sampel ditambah dengan 300 µL

buffer EG dan *inhibitor remover*, selanjutnya dihomogenkan dengan vortex selama 10 menit. Sampel selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm, 18 °C selama 1 menit. Sampel membentuk dua lapisan berupa busa dan bening, lapisan bening diambil dan dipindahkan pada *microtube* baru. Sampel ditambahkan dengan 100 µL bufer EPT, lalu dihomogenkan dengan vortex selama 5 detik dan diinkubasi dalam es selama 10 menit. Sampel disentrifugasi pada suhu 18 °C dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit, kemudian supernatan dipindah ke dalam *microtube* baru dan ditambahkan dengan buffer EB sebanyak 300 µL, lalu diinvert (dibolak-balik) sebanyak 6 kali. Selanjutnya sampel ditambahkan dengan EtOH absolut sebanyak 300 µL dan diinvert (dibolak-balik) sebanyak 6 kali.

Sampel dipindah ke dalam *spin column* dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm, 18 °C selama 1 menit. Supernatan dibuang, pelet ditambahkan dengan 300 µL buffer EWA, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm, 18 °C selama 1 menit. Residu dibuang, lalu sampel ditambahkan dengan 300 µL buffer EWB, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm, 18 °C selama 1 menit. Sampel dipindah ke dalam *microtube* baru, lalu ditambah dengan 50 µL buffer EE, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, lalu disentrifugasi lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm, 18 °C selama 1 menit.

3.11 Amplifikasi Sekuen DNA

Amplifikasi sekuen DNA menggunakan primer universal 27f dan 1495r. Suspensi *Master mix* PCR dibuat dengan komposisi pada Tabel 2 sebanyak 50 µL, setiap penambahan komposisi *Master mix* PCR digoyang secara perlahan agar homogen, selanjutnya tabung *thinwall* dimasukkan ke dalam mesin PCR dan di-*running* sesuai program pada Tabel 3.

Tabel 2. Komposisi larutan *Master mix* PCR

No	Larutan	Konsentrasi	Volume (µL)
1	Go green taq		25
2	Primer 27f	10 pmol	2
3	Primer 1495r	10 pmol	2
4	DNA <i>template</i>	450 ng	2
5	ddH ₂ O/ <i>nuclear free</i>		19

Tabel 3. Program reaksi PCR 16S rDNA

Tahapan	Suhu (°C)	Waktu (detik)	Jumlah siklus
<i>Hot-start</i> awal)	(denaturasi 94	300	1
Denaturasi	94	30	35
Anneling	52	30	35
Ekstensi	72	90	35
Ekstensi akhir	72	420	1

3.12 Uji Verifikasi DNA dengan Elektroforesis

Gel Agarosa 1,5 % dibuat dengan cara memanaskan bubuk agarosa dengan TBE hingga mendidih. Setelah mendidih, Agarosa + etidium bromida selanjutnya dituangkan ke dalam cetakan yang telah dipasang sisir pembuat sumuran sampel. Setelah mengeras, gel dan cetakannya dimasukkan ke dalam *chamber* dan ditambahkan buffer TBE sampai gel terendam, kemudian DNA, larutan *loading dye* dan sampel hasil PCR dimasukkan pada masing – masing sumur. Elektroda dihubungkan dengan *power supply*, voltase 100 V dinyalakan hingga 30 menit. Setelah selesai alat elektroforesis dimatikan dan gel diambil. Gel yang telah diambil dipindahkan ke UV-transiluminator dan diamati hasilnya. Hasil yang didapat didokumentasikan dengan kamera (Fatchiyah dkk., 2011).

3.13 Analisis Hasil Sekuensing dan Konstruksi Pohon Filogeni

Sekuensing dilakukan di IndoSeq GATC, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Malang. Urutan sekuen DNA yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan penyejajaran dalam fasilitas *Basic Local Allignment Search Tool* (BLAST). Pohon filogeni dikonstruksi menggunakan program MEGA ver. 6.06 dengan metode *Maximum Likelihood Tree*, jarak evolusi dianalisis menggunakan alogaritma *Tamura-Nei*, bootstrap 1000.