

Aktivitas Bakteri Kitinolitik Akuatik Isolat Lokal Terhadap Perkembangan dan Mortalitas Larva Nyamuk *Aedes Aegypti*

Sri Pujiyanto¹, RS Ferniah dan R Rahardian

Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro

Tembalang Semarang Telp. 024-70799494

E-mail: spujiyanto@hotmail.com

ABSTRAK

Pengendalian populasi nyamuk *Aedes aegypti* sangat penting dalam rangka pencegahan terjadinya wabah penyakit demam berdarah. Beberapa bakteri memiliki aktivitas kitinolitik sehingga berpotensi digunakan sebagai agen biokontrol terhadap nyamuk *Aedes aegypti*, karena komponen eksoskeleton larva nyamuk tersebut tersusun dari bahan kitin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri kitinolitik akuatik lokal yang dapat digunakan sebagai biokontrol larva nyamuk *Aedes aegypti*. Bakteri kitinolitik diisolasi menggunakan media selektif agar kitin. Sumber isolat diperoleh dari berbagai sampel air yang diperoleh dari daerah Klaten, Boyolali dan Jepara. Isolat yang diperoleh diseleksi untuk mendapatkan isolat dengan aktivitas tinggi. Uji aktivitas bakteri terhadap larva nyamuk menggunakan media air mineral. Hasil penelitian diperoleh satu isolat dengan kode B6 yang mampu menyebabkan kematian larva nyamuk sebesar 97% dalam waktu 108 jam. Isolat ini berpotensi digunakan sebagai agen bioinsektisida untuk pengendalian larva nyamuk *A. aegypti*.

Keywords: Bakteri kitinolitik, demam berdarah, Aedes aegypti, biokontrol

PENDAHULUAN

Pengendalian populasi nyamuk *Aedes aegypti* sangat penting dalam rangka pencegahan terjadinya wabah penyakit demam berdarah, karena tanpa perantara nyamuk ini, virus dengue penyebab demam berdarah tidak akan dapat menginfeksi tubuh manusia. Berbagai tindakan yang telah dilakukan masyarakat dalam rangka pencegahan terjadinya wabah demam berdarah antara lain melalui pengasapan (*fogging*), gerakan “pemberantasan sarang nyamuk” dan abatisasi. Meskipun tindakan-tindakan tersebut sudah sangat sering dilakukan di masyarakat, namun sampai saat ini wabah demam berdarah belum juga dapat teratasi. Penyakit demam berdarah adalah penyakit daerah tropis, disebabkan oleh virus dengue yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti*.

Seluruh wilayah di Indonesia mempunyai resiko untuk terjangkau penyakit demam berdarah

dengue sebab baik virus penyebab maupun nyamuk penularnya sudah tersebar luas di seluruh wilayah Indonesia. Berjangkitnya penyakit demam berdarah dengue di berbagai wilayah Indonesia terjadi hampir di sepanjang waktu dalam satu tahun, terutama pada musim hujan (Darmowandowo, 2004).

Dalam rangka pencegahan mewabahnya demam berdarah perlu adanya diversifikasi metode pengendalian nyamuk *Aedes aegypti* dengan metode yang ramah lingkungan yaitu pengendalian hayati dengan menggunakan musuh alami nyamuk tersebut. Beberapa bakteri tanah seperti: *Streptomyces* (Okazaki *et al.*, 1995), *Bacillus* (Mitsutomi *et al.*, 1995), *Enterobacter* (Chernin *et al.*, 1995) dan *Arthrobacter* (Okazaki *et al.*, 1999) dilaporkan memiliki aktivitas kitinolitik (mampu menguraikan kitin).

Kemampuan bakteri kitinolitik dalam mendegradasi kitin menyebabkan kelompok bakteri ini memiliki potensi besar untuk

¹ To whom any correspondence should be addressed.

dimanfaatkan bagi kepentingan manusia, misalnya: sebagai penghasil enzim kitinase yang berguna dalam industri pangan, kosmetik, farmasi, serta dan lain-lain. Bakteri kitinolitik berpotensi pula digunakan sebagai pengendali hayati beberapa jenis fungi patogen (Pujiyanto, *et al.*, 2004).

Potensi lain dari bakteri kitinolitik yang sampai saat ini belum pernah dilaporkan adalah kemungkinannya digunakan sebagai agen pengendali hayati terhadap nyamuk khususnya *Aedes aegypti* yang merupakan vektor penyebab penyakit demam berdarah. Hal ini didasarkan bahwa komponen eksoskeleton nyamuk tersebut tersusun dari bahan kitin sehingga secara logika dapat didegradasi oleh enzim kitinase yang dihasilkan oleh bakteri kitinolitik. Kerusakan struktur eksoskeleton larva nyamuk dapat berakibat pada gangguan pertumbuhan dan kematian.

Mengingat besarnya potensi pemanfaatan bakteri kitinolitik sebagai agen pengendali hayati larva nyamuk *Aedes aegypti*, perlu dilakukan penelitian awal tentang kemampuan bakteri kitinolitik akuatik isolat lokal khususnya dari beberapa daerah di Jawa Tengah. Penelitian ini bertujuan untuk menguji kemampuan bakteri kitinolitik akuatik isolat lokal untuk mengendalikan populasi larva nyamuk *Aedes aegypti* pada skala laboratorium. Tujuan jangka panjangnya adalah untuk mendapatkan isolat unggul yang dapat digunakan sebagai agen bioinsektisida untuk mengendalikan nyamuk *Aedes aegypti* sehingga dapat digunakan sebagai cara pencegahan timbulnya wabah demam berdarah.

METODE PENELITIAN

Bahan dan isolat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: media Agar Kitin (0.1% MgSO₄.7H₂O, 0.02% K₂HPO₄, 0.1% ekstrak yeast, 1.5% Agar), Media kultur (0.3 % koloid kitin, 1% pepton, 0.5% ekstrak yeast, 0.1% NaCl, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄.7H₂O, 0.001% FeSO₄.7H₂O, 0,001% ZnSO₄.7H₂O, dan masing-masing 0.0001% CuSO₄.5H₂O, MnSO₄.nH₂O dan CaCl₂.2H₂O pH 7), larva nyamuk *Aedes aegypti* (diperoleh dari BPVRP Salatiga).

Isolasi dan seleksi bakteri kitinolitik

Bakteri kitinolitik diisolasi dan dikoleksi dari sampel air yang diambil dari beberapa daerah di Jawa Tengah. Satu mililiter sampel diencerkan dalam larutan garam fisiologis steril lalu dicawankan pada media Agar Kitin dan diinkubasi selama 48-72 jam pada suhu 30 °C. Koloni-koloni yang tumbuh dan membentuk daerah halo disekitarnya merupakan isolat kitinolitik. Isolat yang diperoleh disimpan pada suhu 4 °C untuk pemeliharaan (Pujiyanto, 2001).

Seleksi isolat dilakukan dengan cara menumbuhkan kembali secara serentak semua isolat dengan cara ditotolkan pada media Agar Kitin. Setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C, ditentukan indeks kitinolitiknya. Sepuluh isolat yang memiliki nilai tertinggi ditetapkan sebagai isolat terpilih untuk diuji kemampuannya dalam mengendalikan larva nyamuk *Aedes aegypti*.

Pembuatan media kultur bakteri

Media kultur terdiri dari 0.3 % koloidal kitin, 1% pepton, 0.5% ekstrak yeast, 0.1% NaCl, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄.7H₂O, 0.001% FeSO₄.7H₂O, 0,001% ZnSO₄.7H₂O, dan masing-masing 0.0001% CuSO₄.5H₂O, MnSO₄.nH₂O, CaCl₂.2H₂O. Selain koloid kitin semua bahan tersebut disterilkan selama 15 menit pada suhu 121 °C lalu pH media ditepatkan 7. Koloid kitin disterilkan secara terpisah dan baru dicampur dalam keadaan steril.

Perbanyak sel bakteri kitinolitik

Satu persen starter masing-masing isolat diinokulasikan ke dalam 100 ml media kultur (perbanyak), dan diinkubasi dengan kecepatan 120 rpm dengan *rotary shaker* pada suhu 30 °C sampai mencapai OD 0,5 pada panjang gelombang 600 nm.

Bioassay kemampuan bakteri kitinolitik

Uji pengendalian larva nyamuk dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Sebagai perlakuan adalah jenis isolat bakteri kitinolitik (6 isolat) dan konsentrasi inokulum mikroba. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Sepuluh ekor larva nyamuk *Aedes aegypti* stadium instar kedua dalam 150 mL medium di dalam wadah plastik diinokulasi dengan biakan mikroba sebanyak 0,1; 0,5 dan 1 mL (May and VanderGheynst, 2002).

Parameter yang diamati adalah mortalitas larva nyamuk selama 5 hari. Viabilitas bakteri kitinolitik dievaluasi dengan menggunakan metode “Total Plate Count” (TPC) pada medium Agar Kitin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri kitinolitik akuatik dilakukan dari sampel yang diperoleh dari beberapa daerah di Jawa Tengah yaitu: Klaten, Boyolali dan Jepara. Pada penelitian ini berhasil diisolasi bakteri kitinolitik sebanyak 45 isolat, tetapi pada sub kultur selanjutnya tidak semua isolat menunjukkan aktivitas kitinase pada media Agar Kitin. Dari 45 isolat, hanya 18 isolat yang masih menunjukkan aktivitas kitinase. Pada sub kultur berikutnya tinggal 10 isolat yang masih menunjukkan aktivitas kitinasenya. Dari 10 isolat ini dipilih 6 isolat unggulan yang digunakan untuk penelitian lebih lanjut.

Tabel 1. Hasil isolasi bakteri kitinolitik akuatik

Asal sampel	Jumlah isolat yang diperoleh			
	Tahap 1	Tahap 2	Tahap 3	Isolat unggulan
Klaten	22	9	4	3
Jepara	18	4	4	2
Boyolali	15	5	2	1
Jumlah	45	18	10	6

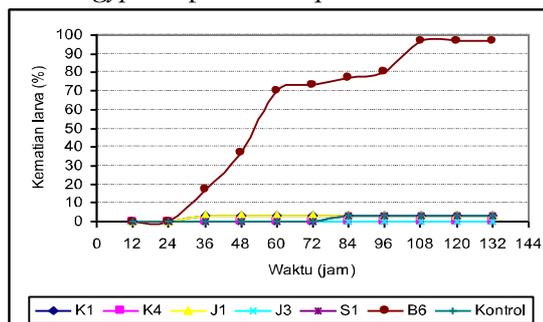
Pada pengujian lebih lanjut digunakan isolat K1, K4, J1, J3, S1 dan B6 karena isolat-isolat ini menunjukkan adanya aktivitas kitinase yang stabil meskipun disubkultur berkali-kali, sedangkan isolat yang lain tidak selalu menunjukkan adanya aktivitas kitinase pada cawan Agar Kitin.

Keenam isolat tersebut selanjutnya diuji kemampuannya dalam mengendalikan larva nyamuk *Aedes aegypti*. Sebelum diuji cobakan kemampuannya dalam mengendalikan larva nyamuk, keenam isolat ini terlebih dahulu diperbanyak dalam medium cair selama 18 jam. Tujuannya adalah untuk mendapatkan sel aktif bakteri dalam jumlah yang cukup. Hasil pengujian isolat bakteri kitinolitik dalam mengendalikan larva nyamuk dapat dilihat pada Tabel 2 serta diagram pada Gambar 1.

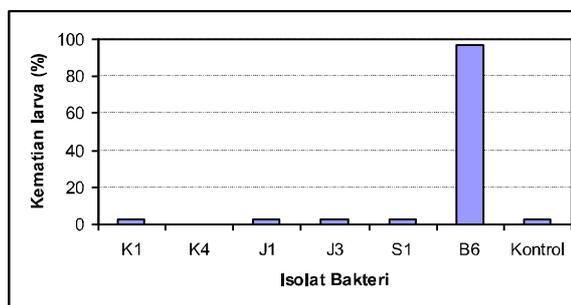
Tabel 2. Prosentase kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* setelah perlakuan bakteri kitinolitik

Prosentase kematian larva oleh isolat bakteri						
K1	K4	J1	J3	S1	B6	Kontrol
3.33	0.00	3.33	0.00	3.33	97	3.33

Dari hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat B6 merupakan isolat yang paling berpotensi menyebabkan kematian larva nyamuk. Sementara itu lima isolat yang lain tidak menunjukkan adanya kemampuan dalam mengendalikan larva nyamuk. Kemampuan isolat B6 dalam mengendalikan populasi larva sudah terlihat mulai 36 jam perlakuan. Pada perlakuan 36 jam, isolat ini telah dapat menyebabkan mortalitas larva sebesar 40%, dan seterusnya meningkat terus sampai mencapai 97% pada jam ke 108. Perbandingan kemampuan masing-masing isolat dalam mengendalikan populasi larva nyamuk *Aedes aegypti* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Kematian larva nyamuk setelah pemberian bakteri kitinolitik



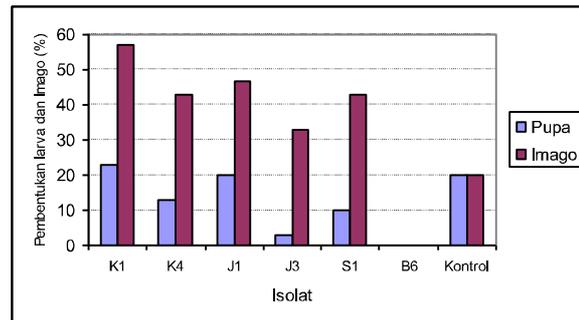
Gambar 2. Kemampuan masing-masing isolat dalam mengendalikan larva nyamuk *Aedes aegypti*.

Berdasarkan data jumlah kematian larva nyamuk, terlihat bahwa isolat B6 merupakan isolat yang sangat berpotensi digunakan sebagai

bioinsektisida. Kematian larva ini diduga disebabkan larva mengalami kerusakan struktur eksoskeleton akibat terdegradasi oleh aktivitas kitinase yang dihasilkan oleh bakteri kitinolitik. Degradasi kitin ini, terutama dilakukan oleh mikroorganisme, dimana kitin dapat merupakan sumber karbon dan nitrogen untuk pertumbuhannya (Gooday, 1990). Menurut Gooday (1990), terdapat dua macam lintasan perombakan kitin. Lintasan perombakan kitin yang belum diketahui disebut kitinoklastik, sedangkan jika lintasan tersebut melibatkan hidrolisis ikatan β (1,4) glikosida, maka prosesnya disebut kitinolitik. Hidrolisis ikatan ini dilakukan oleh enzim kitinase. Eksokitinase memecah bagian diasetilkitobiosa dari ujung non reduksi dari suatu rantai kitin, sedangkan endokitinase memecah bagian ikatan glikosida rantai kitin secara acak dan menghasilkan diasetilkitobiosa sebagai hasil utama yang bersama-sama dengan triasetil kitobiosa akan dirombak secara perlahan menjadi disakarida dan monosakarida.

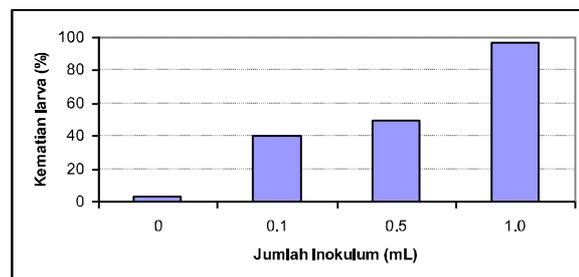
Kerusakan struktur eksoskeleton pada larva dapat berakibat pada terganggunya proses pertumbuhan dan proses metabolisme tubuh lainnya (May et al., 2002). Terganggunya proses metabolisme sangat memungkinkan menyebabkan terjadinya kematian larva. Kerusakan struktur ini dapat diamati pada larva yang mati akibat perlakuan bakteri kitinolitik dengan bantuan mikroskop

Selain berpengaruh terhadap kelangsungan hidup larva, bakteri kitinolitik juga berpengaruh terhadap perubahan morfologi larva yaitu terbentuknya pupa dan imago. Pada perlakuan dengan bakteri isolat B6 sampai akhir penelitian tidak ada satu ekorpun larva yang dapat berubah menjadi pupa dan imago. Hal ini semakin memperkuat dugaan bahwa eksoskeleton dari larva telah mengalami kerusakan sehingga tidak memungkinkan larva mengalami metamorfosis. Pada perlakuan larva dengan bakteri selain isolat B6, menunjukkan adanya perubahan morfologi larva yang dapat ditunjukkan oleh banyaknya jumlah larva yang bermetamorfosis menjadi pupa dan imago (Gambar 3).



Gambar 3. Perubahan morfologi larva setelah pemberian isolat bakteri kitinolitik

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi inokulum bakteri yang ditambahkan ke dalam media pemeliharaan larva, maka semakin tinggi mortalitas larva. (Gambar 4). Pemberian 0,1 mL inokulum menyebabkan kematian larva sebesar 40%, meningkat menjadi 57% pada pemberian inokulum 0,5 mL dan pada pemberian 1 mL inokulum menyebabkan kematian larva sebesar 97% dalam waktu 108 jam.



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi inokulum isolat bakteri B6 terhadap kematian larva nyamuk

Potensi bakteri isolat B6 ini juga didukung oleh viabilitas yang tinggi dari bakteri ini. Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat B6 ini memiliki viabilitas yang tinggi. Setelah diperlakukan untuk mengendalikan larva nyamuk selama 132 jam, populasi bakteri ini dalam media menunjukkan jumlah $8,7 \times 10^6$ /mL. Hal ini menunjukkan bahwa viabilitas bakteri ini dalam media air sangat bagus. Viabilitas ini sangat penting jika suatu mikroba akan diaplikasikan di lapangan (Banani et al., 2002)

Berdasarkan sifat-sifat yang dimiliki isolat bakteri B6 yang terlihat selama pengujian yaitu: memiliki kemampuan tinggi dalam mengendalikan larva nyamuk, mudah diaplikasikan, mudah diperbanyak serta memiliki viabilitas yang tinggi maka isolat B6 ini sangat

berpotensi dikembangkan sebagai galur pengendali nyamuk *Aedes aegypti* sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pencegahan timbulnya wabah demam berdarah.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi satu isolat bakteri kitinolitik (isolat B6) yang memiliki kemampuan besar dalam mengendalikan larva nyamuk *Aedes aegypti*. Bakteri ini dapat menyebabkan kematian larva sebesar 97% dalam waktu 108 jam. Isolat bakteri kitinolitik B6 ini sangat berpotensi dikembangkan sebagai galur untuk pemberantasan larva nyamuk *Aedes aegypti* untuk mencegah timbulnya wabah demam berdarah.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Axtell R. C., and D.R. Guzman. 1987. Encapsulation of the mosquito fungal pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes:Lagenidiales) in calcium alginate. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3: 450-459
- [2] Banani S., V. Bihari, A. Sharma and A.K. Joshi. 2002. Studies on physiology, zoospore morphology and entomopathogenic potential of the aquatic oomycete: *Lagenidium giganteum*. *Mycophatologia*. 154: 51-54.
- [3] Chernin, L., Z. Ismailov, S. Haran and I. Chet. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans*, antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1720-1726.
- [4] Darmowandono, W. 2004. Demam Berdarah Dengue. Lab/SMF Ilmu Kesehatan Anak. Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga. Surabaya.
- [5] Gooday, G.W. 1990. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. in *Physiology of Biodegradative Microorganisms*. Radledge, C. (ed). KA Publishers. Netherland.
- [6] Krishnan H.B., K.Y. Kim and A.H. Krishnan. 1999. Expression of *Serratia macescens* chitinase gene in *Sinorhizobium fredii* USDA 191 and *S. meliloti* RCR 201 impedes soybean and alfalfa nodulation. *MPMI*. 12: 748-751.
- [7] May, B.A., and J. S. V.Geynst. 2002. A predictor variable for efficacy of *Lagenidium giganteum* produced in solid-state cultivation. *J. Industrial Microbiol. and Biotechnol.* 27: 203-207
- [8] Mitsutomi, M., H.Kidoh, H.Tomita and T. Watanabe. 1995. The action of *Bacillus circulans* WL-12 chitinases on partially N-acetylated chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 529-531.
- [9] Ogawa K and T. Yui. 1994. Effect of explosion on the crystalline polymorphism of chitin and chitosan. *Biosci Biotech Biochem.* 58: 968-969.
- [10] Okazaki, K., F. Kato, N. Watanabe, S. Yasuda, Y. Masui and S. Hayakawa. 1995. Purification and properties of two chitinases from *Streptomyces* sp. J-13-3. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 1586-1587.
- [11] _____, T. Kawabata, M. Nakano and S. Hayakawa. 1999. Purification and Properties of Chitinase from *Arthrobacter* sp. NHB-10. *Biosci. Biotech. Biochem.* 63: 1644-1646.
- [12] Pan C.H., S.L. Rhim and S. Kim. 1996. Expression of two cDNA encoding class I chitinases of rice in *Escherichia coli*. *Biosci Biotech Biochem* . 60:1346-1348.
- [13] Panda, F.T. 1999. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 141-151.
- [14] Pujiyanto, S., A. Supriyadi, Wijanarka dan S. Purwantisari. 2004. Potensi bakteri kitinolitik isolat lokal untuk memproduksi enzim kitinase dan mengendalikan kapang patogen. Laporan Penelitian. FMIPA Undip. Semarang.
- [15] Robinson, S.P., A. K. Jacobs and I.A. Dry. 1997. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiol.* 114: 771-778.
- [16] Sakai K., M. Narihara, Y. Kasama, M. Wakayama and M. Moriguchi. 1994. Purification and characterization of thermostable β -N-acetyl hexosaminidase of *B. stearothermophilus* CH-4 isolatd from chitin containing compost. *Biosci Biotech Biochem.* 60: 2911-2915.
- [17] Service, M.W. 1996. *Medical Entomology*. Chapman and Hall. London.
- [18] Svitil A. L., S.M. Chadhain, J. A. Moore and D. L. Kirchman. 1997. Chitin degradation

- proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *Appl Environ Microbiol.* 63: 408-413.
- [19] Tokuyasu, K., M.O. Kameyama and K. Hiayashi. 1996. Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotricum lindemuthianum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1598-1603.
- [20] Tsujibo H., H. Endo, K. Miyamoto and Y. Inamori. 1995. Expression in *E. coli* of a gene encoding a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 145-146.
- [21] Ueda, M., M. Shiro, T. Kawaguchi and M. Arai. 1996. Expression of chitinase III gen of *Aeromonas* 10S-24 in *E. coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1195-1197.
- [22] Wang, S.L., S.H. Chiou and W.T. Chang. 1997. Production of chitinase from shellfish waste by *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Proc. Nat. Sci. Council. ROC.* 21: 71-78.
- [23] Watanabe A., V.H. Nong, D. Zhang, M. Arahira, N.A. Yeboah, K. Udaka and C. Fukazawa. 1999. Molecular cloning and ethylene-inducible expression of *Chib1* chitinase from soybean (*Glycine max* L.). *Biosci Biotech Biochem.* 63: 251-256.