

# Isolasi dan Seleksi Bakteri Kitinolitik Isolat Lokal yang Berpotensi untuk Mengendalikan Larva Nyamuk *Aedes aegypti* L.

## Isolation and selection of local isolates of chitinolytic bacteria that potent to biocontrol of larva stadia of *Aedes aegypti* L.

SRI PUJIYANTO\*, ENDANG KUSDIYANTINI, MOCHAMMAD HADI

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Diponegoro (UNDIP) Semarang 50275

Diterima: 30 Nopember 2007. Disetujui: 30 Januari 2008.

### ABSTRACT

The dengue fever was the most dangerously epidemic in Indonesia, so it is important to prevent the population of *Aedes aegypti* L. The larva stages of *Ae. aegypti* had an exoskeleton from chitin, so if its exoskeleton had been degraded the larva would be died. Many bacteria had chitin degradation activities, and the bacteria had potential as a biocontrol for *Ae. aegypti* larva stages. This research was got many of the local chitinolytic bacteria that had been potential as a biocontrol for *Ae. aegypti* larva stages. The chitinolytic bacteria were isolated with selective agar medium. The sources of isolates were collected from Central Java and West Java water resources. Selected isolates was done to get the higher chitinolytic activity in mineral water medium. The isolate LMB1-5 was potential as a bioinsecticide for *Ae. aegypti* larva stages. This isolate decreased 86.7% of the larva population in 7 days.

© 2008 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

**Key words:** chitinolytic bacteria, dengue fever, *Aedes aegypti* L, biocontrol.

### PENDAHULUAN

Penyakit demam berdarah dengue merupakan masalah kesehatan paling besar di Indonesia. Penyakit ini adalah penyakit daerah tropis, disebabkan oleh virus dengue yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* L. Seluruh wilayah di Indonesia mempunyai resiko untuk terjangkit penyakit demam berdarah dengue sebab baik virus penyebab maupun nyamuk penularnya sudah tersebar luas di seluruh wilayah Indonesia. Laporan yang ada sampai saat ini penyakit demam berdarah dengue sudah menjadi masalah yang endemis pada 122 daerah tingkat II, 605 daerah kecamatan dan 1800 desa/kelurahan di Indonesia. Berjangkitnya penyakit demam berdarah dengue di berbagai wilayah Indonesia terjadi hampir di sepanjang waktu dalam satu tahun, terutama pada musim hujan (Darmawandono, 2004).

Pengendalian populasi nyamuk *Ae. aegypti* sangat penting dalam rangka pencegahan terjadinya wabah penyakit demam berdarah, karena tanpa perantara nyamuk ini, virus dengue penyebab demam berdarah tidak 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. Untuk itu perlu adanya diversifikasi metode pengendalian nyamuk *Ae. aegypti* dengan metode yang ramah lingkungan, yaitu pengendalian hayati dengan menggunakan musuh alami nyamuk tersebut (Axtell dan Guzman, 1987). Siklus hidup nyamuk ini dari telur sampai dewasa sedikitnya membutuhkan waktu 7 hari, tetapi pada umumnya berkisar antara 10-12 hari (Service, 1996). Pengendalian populasi pada tahap larva lebih mudah dilakukan dibandingkan tahap lain dari fase hidup nyamuk. Pengendalian hayati yang telah dilaporkan pada larva nyamuk ini antara lain menggunakan jamur air *Lagenidium giganteum* (Banani *et al.*, 2002; May dan Gheynst, 2002).

Beberapa bakteri tanah seperti: *Streptomyces* (Okazaki *et al.*, 1995, Tsujibo *et al.*, 1995), *Bacillus* (Mitsutomi *et al.*, 1995), *Aeromonas* (Ueda *et al.*, 1996), *Serratia* (Krishnan *et al.*, 1999), *Enterobacter* (Chernin *et al.*, 1995), *Pseudomonas* (Wang *et al.*, 1997), *Arthrobacter* (Okazaki *et al.*, 1999) dan *Vibrio* (Svitil *et al.*, 1997) dilaporkan memiliki aktivitas kitinolitik, yakni mampu menguraikan kitin. Kemampuan ini menyebabkan kelompok bakteri tersebut berpotensi besar untuk dimanfaatkan, misalnya: sebagai penghasil enzim kitinase yang berguna dalam industri pangan, kosmetik, farmasi, dan lain-lain. Bakteri kitinolitik berpotensi pula 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 *Ae. 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.

#### ▼ Alamat korespondensi:

Kampus UNDIP Tembalang Semarang 50275  
Tel.: +62-24-70799494. Fax.: +62-24-76480923  
e-mail: spujiyanto@hotmail.com

Kerusakan struktur eksoskeleton larva nyamuk dapat berakibat pada gangguan pertumbuhan dan kematian.

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

## BAHAN DAN METODE

**Bahan dan isolat.** Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: media agar kitin (0,5 % koloid kitin, 0,1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,02%  $K_2HPO_4$ , 0,1% ekstrak yeast, 1,5% agar), Media kitin cair (0,3 % koloid kitin, 1% pepton, 0,5% ekstrak yeast, 0,1% NaCl, 0,1%  $K_2HPO_4$ , 0,05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,001%  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,001%  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , dan masing-masing 0,0001%  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot nH_2O$  dan  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  pH 7), larva nyamuk *Ae. aegypti* (koleksi Balai Penelitian Vektor dan Reservoir Penyakit, Salatiga)

**Isolasi dan seleksi bakteri kitinolitik.** Bakteri kitinolitik diisolasi dan dikoleksi dari sampel air yang diambil dari beberapa daerah di Jawa Tengah dan Jawa Barat. 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 zona bening (*halozone*) di sekitarnya merupakan isolat kitinolitik. Isolat yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C untuk pemeliharaan (Pujianto *et al.*, 2002). 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 *Ae. aegypti*.

**Pembuatan media kultur bakteri.** Media kultur terdiri dari 0,3% koloidal kitin, 1% pepton, 0,5% ekstrak yeast, 0,1% NaCl, 0,1%  $K_2HPO_4$ , 0,05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,001%  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,001%  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , dan masing-masing 0,0001%  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot nH_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ . Selain koloid kitin semua bahan tersebut disterilkan selama 15 menit pada suhu 121°C lalu pH media ditetapkan 7. Koloid kitin disterilkan secara terpisah dan baru dicampur dalam keadaan steril.

**Perbanyakkan sel bakteri kitinolitik.** Sebanyak 1% starter masing-masing isolat diinokulasikan ke dalam 100 mL media kultur (perbanyakkan), 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 *Ae. aegypti* stadium instar kedua dalam 150 mL medium di dalam

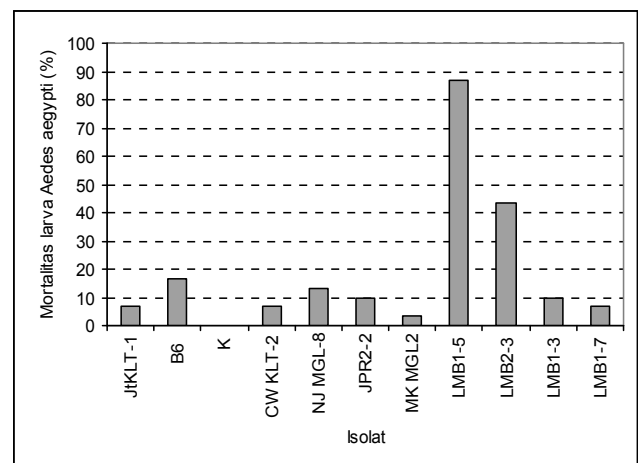
wadah plastik diinokulasi dengan biakan mikroba sebanyak 0,1, 0,5 dan 1 mL (May dan Gheynst, 2002). Parameter yang diamati adalah mortalitas larva nyamuk selama 5 hari. Viabilitas bakteri kitinolitik dievaluasi dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) pada medium agar kitin.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri kitinolitik dilakukan dari sampel air yang diperoleh dari beberapa daerah di Jawa Tengah dan Jawa Barat. Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi bakteri kitinolitik dari 72 contoh air. Dari 72 contoh air tersebut telah diperoleh 151 isolat bakteri kitinolitik. Ke-151 isolat bakteri tersebut dipelihara dalam medium agar kitin dan disimpan pada suhu 4°C sebelum diuji lebih lanjut. Hasil seleksi ini diperoleh 10 isolat yang memiliki nilai tertinggi dan ditetapkan sebagai isolat untuk diuji kemampuannya dalam mengendalikan larva nyamuk. Kesepuluh isolat tersebut selanjutnya diuji kemampuannya dalam mengendalikan larva nyamuk *Ae. aegypti*. Sebelum diujicobakan kemampuannya dalam mengendalikan larva nyamuk, kesepuluh isolat ini terlebih dahulu diperbanyak dalam medium cair selama 18 jam. Tujuannya adalah untuk mendapatkan sel aktif bakteri dalam jumlah yang cukup. Hasil pengujian kesepuluh isolat bakteri kitinolitik dalam mengendalikan larva nyamuk *Ae. aegypti* dapat dilihat pada Tabel 1 serta diagram pada Gambar 1.

**Tabel 1.** Mortalitas larva nyamuk *Ae. aegypti* setelah perlakuan bakteri kitinolitik selama 7 hari

No Kode	Mortalitas (%)
JiKLT-1	6,67
B6	16,67
Kontrol	0,00
Cw KLT-2	6,67
NjMGL-8	13,33
JPR2-2	10,00
MkMGL-2	3,33
LMB1-5	86,67
LMB2-3	43,33
LMB1-3	10,00
LMB1-7	6,67



**Gambar 1.** Kematian larva nyamuk *Ae. aegypti* setelah perlakuan bakteri kitinolitik selama 7 hari.

Dari hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat LMB1-5 merupakan isolat yang paling berpotensi menyebabkan kematian larva nyamuk *Ae. aegypti*. Sementara itu sembilan isolat yang lain tidak menunjukkan adanya kemampuan yang tinggi dalam mengendalikan larva nyamuk. Kemampuan isolat LMB1-5 dalam mengendalikan populasi larva sudah terlihat mulai 48 jam perlakuan. Pada perlakuan 48 jam, isolat ini telah dapat menyebabkan mortalitas larva sebesar 76,7% dan seterusnya meningkat terus sampai mencapai 86,7% pada hari ke 7. Perbandingan kemampuan masing-masing isolat dalam mengendalikan larva nyamuk disajikan pada Gambar 1.

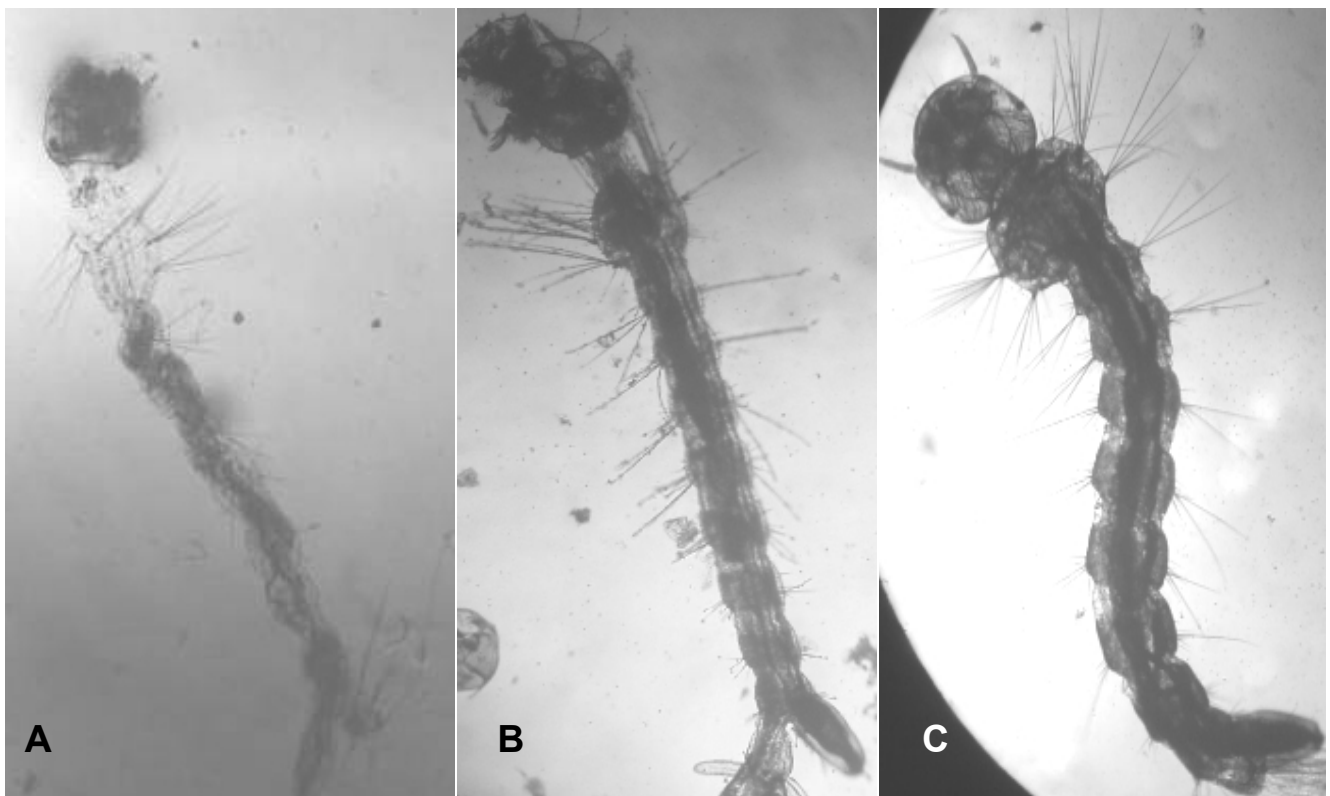
Berdasarkan data jumlah kematian larva nyamuk, terlihat bahwa isolat LMB1-5 merupakan isolat yang sangat berpotensi digunakan sebagai bioinsektisida. Kematian larva ini diduga disebabkan larva mengalami kerusakan struktur eksoskeleton akibat terdegradasi oleh aktivitas kitinase yang dihasilkan oleh bakteri 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  $\beta$  (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 dan Vander Gheynst, 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 (Gambar 2).

Selain berpengaruh terhadap kelangsungan hidup larva, bakteri kitinolitik juga berpengaruh terhadap perubahan morfologi larva yaitu terbentuknya pupa dan imago. Pada perlakuan dengan bakteri isolat LMB1-5 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 LMB1-5, menunjukkan adanya perubahan morfologi larva yang dapat ditunjukkan oleh banyaknya jumlah larva yang bermetamorfosis menjadi pupa dan imago (Gambar 3).

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi inokulum bakteri yang ditambahkan ke dalam media pemeliharaan larva, semakin tinggi mortalitas larva (Gambar 4). Pada larva *Ae. aegypti*, pemberian 0,1 mL inokulum menyebabkan kematian larva sebesar 56,3%, meningkat menjadi 66,7% pada pemberian inokulum 0,5 mL dan pada pemberian 1 mL inokulum menyebabkan kematian larva sebesar 100%.

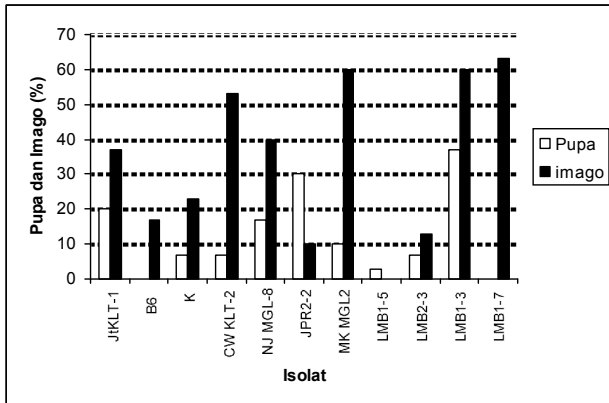
Potensi bakteri isolat LMB1-5 ini juga didukung oleh viabilitas yang tinggi dari bakteri ini. Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat LMB1-5 ini memiliki viabilitas yang tinggi. Setelah diperlakukan untuk mengendalikan larva nyamuk selama 132 jam, populasi bakteri ini dalam media menunjukkan jumlah  $5,3 \times 10^8$ . Hal ini menunjukkan



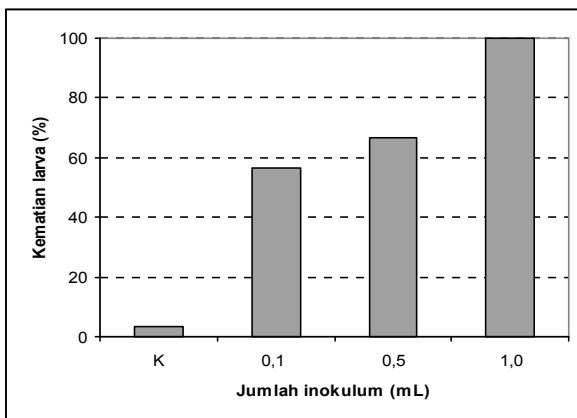
**Gambar 2.** Kerusakan struktur eksoskeleton pada larva yang mati karena perlakuan bakteri kitinolitik (A), larva mati pada kontrol (B), larva hidup (C).

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 LMB1-5 yang terlihat selama pengujian yaitu: memiliki kemampuan tinggi dalam mengendalikan larva nyamuk, mudah diperbanyak serta memiliki viabilitas yang tinggi maka isolat LMB1-5 ini sangat berpotensi untuk dikaji dan dikembangkan sebagai galur pengendali nyamuk *Ae. aegypti* sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pencegahan timbulnya wabah demam berdarah.



Gambar 3. Perubahan morfologi larva *Ae. aegypti* setelah pemberian isolat bakteri kitinolitik.



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi inokulum isolat bakteri LMB1-5 terhadap kematian larva *Ae. Aegypti*.

### KESIMPULAN DAN SARAN

Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi satu isolat bakteri kitinolitik (isolat LMB1-5) yang memiliki kemampuan besar dalam mengendalikan larva nyamuk *Ae. aegypti*. Bakteri ini dapat menyebabkan kematian larva sebesar 86,7% dalam waktu 7 hari. Isolat bakteri kitinolitik LMB1-5

ini sangat berpotensi dikaji dan dikembangkan sebagai galur untuk pengendalian larva nyamuk *Ae. aegypti*. Perlu dilakukan penelitian untuk melihat potensi kitinase dari isolat kitinolitik LMB1-5 ini, dalam mengendalikan larva nyamuk *Ae. aegypti*.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Negara Riset dan Teknologi melalui Program Insentif Riset Dasar yang telah membiayai penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Axtell, R. C., and D.R. Guzman. 1987. Encapsulation of the mosquito fungal pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes:Lagenidiales) in calcium alginate. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3: 450-459
- 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*. *Mycopathologia*. 154: 51-54.
- Chernin, L., Z. Ismailov, S. Haran and I. Chet. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans*, antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1720-1726.
- Darmowandono, W. 2004. *Demam Berdarah Dengue. Lab/SMF Ilmu Kesehatan Anak*. Surabaya: Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga.
- Gooday, G.W. 1990. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation* 1 (2-3): 177-190.
- Krishnan, H.B., K.Y. Kim and A.H. Krishnan. 1999. Expression of *Serratia marcescens* chitinase gene in *Sinorhizobium fredii* USDA 191 and *S. meliloti* RCR 201 impedes soybean and alfalfa nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 748-751.
- May, B.A., and J. S. Vander Gheynst. 2002. A predictor variable for efficacy of *Lagenidium giganteum* produced in solid-state cultivation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 27: 203-207.
- 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.
- 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.
- Okazaki, K., T. Kawabata, M. Nakano and S. Hayakawa. 1999. Purification and Properties of Chitinase from *Arthrobacter* sp. NHB-10. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63: 1644-1646.
- Pujianto, S., D.A. Santosa dan M.T. Suhartono. 2002. Kloning *shotgun* gen penyandi enzim kitinase dari isolat kitinolitik ICBB232 asal ekosistem air hitam, Kalimantan Tengah. *Bioma*. 4:7-12
- Pujianto, S., D.A. Supriyadi, Wijanarka dan S. Purwantisari. 2004. *Potensi Bakteri Kitinolitik Isolat Lokal untuk Memproduksi Enzim Kitinase dan Mengendalikan Kapang Patogen*. [Laporan Penelitian]. Semarang: FMIPA UNDIP.
- Service, M.W. 1996. *Medical Entomology*. Chapman and Hall. London.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 408-413.
- 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. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59: 145-146.
- Ueda, M., M. Shiro, T. Kawaguchi and M. Arai. 1996. Expression of chitinase III gen of *Aeromonas* 10S-24 in *E. coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60: 1195-1197.
- Wang, S.L., S.H. Chiou and W.T. Chang. 1997. Production of chitinase from shellfish waste by *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Proceeding of the National Science Council of R.O.C.* 21: 71-78.