

# Efikasi Formula Mikro-enkapsulasi Isolat Lokal *Bacillus thuringiensis* sebagai Bio-insektisida terhadap Penanggulangan Larva *Chrysomya bezziana* Penyebab Myiasis

Muharsini S<sup>1</sup>, Wardhana AH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Jln. Raya Padjajaran Kav E59, Bogor

<sup>2</sup>Balai Besar Penelitian Veteriner, Jln. RE Martadinata 30, Bogor 16114

(Diterima 27 November 2013 ; disetujui 14 Maret 2014)

## ABSTRACT

Muharsini S, Wardhana AH. 2014. Efficacy of micro-encapsulated of local isolate *B. thuringiensis* as bio-insecticide for control of myiasis caused by *Chrysomya bezziana* larvae. *JITV* 19(1): 67-73. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v19i1.996>

*B. thuringiensis* produces toxic crystal proteins ( $\delta$ -endotoxin) which is specific for insect target, but non-toxic to human or non-target organism. Local isolate of *B. thuringiensis* have been collected from Kediri Regency where endemic area of myiasis. The aim of this study was to formulate the micro-encapsulated of *B. thuringiensis* using Freund Incomplete Adjuvant (FIA) for protecting crystal in the field and environmentally friendly. The formulae was then tested in vitro and in vivo. The result of in vitro trial towards seven local isolates of *B. thuringiensis* showed a decreased in the toxicity of those several isolates. In vivo trial of nine thin tail sheep using chosen isolate of 45.5A and 47.3A, resulted is no significant different for treatment sheep compared to control sheep ( $P > 0.05$ ). It is concluded that micro-encapsulation method need to be developed according to the way of living the *C. bezziana* larvae in animal tissues.

**Key Words:** *Chrysomya bezziana*, *Bacillus thuringiensis*, Freund Incomplete Adjuvant, Micro-encapsulated

## ABSTRAK

Muharsini S, Wardhana AH. 2013. Efikasi formula mikro-enkapsulasi isolat lokal *B. thuringiensis* sebagai bio-insektisida terhadap penanggulangan larva *Chrysomya bezziana* penyebab myiasis. *JITV* 19(1): 67-73. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v19i1.996>

*Bacillus thuringiensis* menghasilkan protein kristal toksik ( $\delta$ -endotoksin) yang spesifik terhadap insek sasaran, namun tidak toksik terhadap manusia maupun organisme yang bukan sasaran. Isolat lokal *B. thuringiensis* telah diperoleh dari Kabupaten Kediri di daerah endemik myiasis. Tujuan dari penelitian ini adalah membuat formulasi dengan cara mikro-enkapsulasi *B. thuringiensis* dengan *Freund Incomplete Adjuvant* (FIA) agar dapat tahan digunakan di lapang dan ramah lingkungan. Formula ini selanjutnya diuji secara in vitro dan in vivo. Hasil uji in vitro terhadap tujuh isolat lokal *B. thuringiensis* dengan mikro-enkapsulasi ternyata menurunkan toksisitas beberapa isolat tersebut. Hasil uji in vivo pada sembilan ekor domba ekor tipis terhadap dua isolat terpilih 45.5A dan 47.3. A menyatakan bahwa tidak ada perbedaan nyata antara domba yang diobati dengan kedua isolat terpilih tersebut dengan domba yang tidak diobati ( $P > 0,05$ ). Disimpulkan bahwa metoda mikro-enkapsulasi perlu dikembangkan sesuai dengan cara hidup larva lalat *C. bezziana* dalam jaringan hewan.

**Kata Kunci :** *Chrysomya bezziana*, *Bacillus thuringiensis*, *Freund Incomplete Adjuvant*, Mikro-enkapsulasi.

## PENDAHULUAN

Salah satu penyakit ternak yang masih menjadi kendala di lapang adalah myiasis atau belatungan, yaitu infestasi larva lalat (Diptera) pada jaringan hidup. Penyakit ini disebabkan oleh lalat *Crysomya bezziana* yang bersifat obligat parasit. Myiasis tidak hanya menyerang ternak yang dipelihara secara ekstensif dan semiintensif seperti di daerah Nusa Tenggara Barat (NTB), Nusa Tenggara Timur (NTT), Sulawesi Selatan dan Utara, melainkan juga pada peternakan intensif seperti di Pulau Jawa bahkan kasusnya dilaporkan

cenderung meningkat dari tahun ke tahun (Wardhana et al. 2003).

Upaya pengendalian myiasis sudah banyak dilakukan, namun masih memberikan hasil yang bervariasi. Ahmad (2002) melaporkan bahwa pemberian *organophosphate* 3-4% efektif untuk membunuh larva, tetapi perlu dilakukan berulang untuk mencegah terjadinya reinfestasi. Uji coba pelepasan lalat jantan *C. bezziana* steril di Malaysia (440 ekor jantan steril/km<sup>2</sup> selama 4 bulan) pada tahun 2000 juga belum memberikan hasil yang memuaskan (Mahon 2002). Insektisida organik berbasis herbal seperti ekstrak daun

mimba, biji srikaya, dan minyak atsiri daun sirih juga mempunyai efek larvasidal yang beragam (Wardhana et al. 2004; Muharsini et al. 2006a; Muharsini et al. 2006b; Wardhana et al. 2011 ). Adapun pengembangan vaksin myiasis rekombinan juga dilaporkan masih kurang protektif (Sukarsih et al. 2000a; Riding et al. 2000). Oleh karena itu, perlu dikembangkan pengobatan myiasis dengan senyawa aktif yang lain dan bersifat ramah lingkungan, salah satunya dengan penggunaan bioinsektisida.

*Bacillus thuringiensis* adalah bakteri Gram positif yang telah dikarakterisasi secara intensif dan bersifat entomopatogenik sehingga dikembangkan sebagai bioinsektisida. Selain itu, bakteri ini bersifat ramah lingkungan dan mampu menghasilkan protein kristal toksik ( $\delta$ -endotoksin) yang spesifik terhadap insek sasaran, namun tidak toksik terhadap manusia maupun organisme yang bukan sasaran (Armengol et al. 2006). Beberapa strain *B. thuringiensis* dilaporkan mampu menyintesis lebih dari satu jenis  $\delta$ -endotoksin. Endotoksin tersebut sangat toksik terhadap serangga hama dan telah berhasil digunakan sebagai bioinsektisida pada pertanian dan perkebunan (Rizali et al. 1998). Menurut Van Frankenhuyzen (2000) bahwa toksisitas  $\delta$ -endotoksin pada *B. thuringiensis* mempunyai kesamaan dengan pestisida golongan organophospat.

Beberapa isolat *B. thuringiensis* dari beberapa daerah di Indonesia telah dikoleksi dan diuji efektifitasnya terhadap serangga tanaman (Jusuf 2009). Muharsini et al. (2003) berhasil mengisolasi bakteri *B. thuringiensis* isolat lokal yang mempunyai gen *cry IV* dari beberapa daerah lokasi peternakan di Indonesia terbanyak dari propinsi Jawa Barat, Yogyakarta dan Sulawesi Selatan.

Lysyk & Selinger (2012) melaporkan bahwa efikasi *B. thuringiensis* sangat dipengaruhi oleh suhu, dosis dan umur larva lalat. Sanahuja et al. (2011) dan Cao et al. (2012) juga menyatakan bahwa kristal protein sangat peka terhadap sinar UV, cuaca dan kondisi lingkungan sekitar. Efikasi kristal protein dapat dipertahankan dengan strategi enkapsulasi sehingga tahan terhadap lingkungan, panas dan mempunyai masa aktif yang lama. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji efikasi baik secara *in vitro* dan *in vivo* terhadap larva lalat *C. bezziana* dengan cara mikro-enkapsulasi kristal protein *B. thuringiensis*. Cheung & Hammock (1985) membuktikan bahwa penggunaan *Freund Incomplete Adjuvant* (FIA) untuk *B. thuringiensis* yang diaplikasikan pada larva nyamuk *Aedes aegypti* memberikan hasil yang memuaskan, karena selain meningkatkan sensitivitas juga meningkatkan toksisitas. Selain itu FIA adalah larutan air dalam emulsi minyak yang tidak dapat dimetabolisir tubuh dan umum digunakan di dalam riset (Lindblad 2000). Dengan dasar pertimbangan tersebut, maka diharapkan formula

mikro-enkapsulasi pada kristal protein *B. thuringiensis* menggunakan FIA dapat diaplikasikan sebagai bioinsektisida untuk pengendalian myiasis di lapang secara efektif dan ramah lingkungan.

## MATERI DAN METODE

### Sampel larva *C. bezziana*

Larva lalat *C. bezziana* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koloni laboratorium Entomologi yang dipelihara di Departemen Parasitologi, Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor. Koloni tersebut dipelihara berdasarkan metode Sukarsih et al. (2000b).

### Koleksi dan isolasi isolat *B. thuringiensis*

Sebanyak 25 sampel tanah dikoleksi dari kandang ternak di beberapa daerah di Kabupaten Kediri, Jawa Timur. Isolasi dan pemurnian bakteri dilakukan berdasarkan Widyasari (2001) yang telah dirinci dalam Muharsini et al. (2003). Isolat *B. thuringiensis* dipisahkan dari koloni isolat *Bacillus spp* mengikuti metode yang telah dilakukan Muharsini et al. (2003), yaitu sebanyak satu ose koloni bakteri *Bacillus spp* dari medium Natrium Agar (NA) diinokulasikan ke dalam 10 mL medium cair Luria Bertani (LB) dapar asetat. Kultur bakteri dikocok menggunakan *shaker* selama 1 hari (150 rpm, 28°C), kemudian dipanaskan didalam *water bath* (80°C, 5 menit). Setelah dingin, kultur sebanyak 0,1 ml disebar di medium LB padat. Selanjutnya, 1-2 hari setelah inokulasi, koloni bakteri diperiksa di bawah mikroskop fase kontras dengan perbesaran 1000x untuk mengamati spora dan kristal protein. Bakteri *B. thuringiensis* disimpan dalam kamar pendingin suhu 4°C sampai digunakan selanjutnya.

### Perbanyakan isolat *B. thuringiensis* serta pemisahan kristal protein dan spora

Isolat *B. thuringiensis* yang akan digunakan dalam uji efikasi diinokulasikan ke dalam medium LB cair, pH 6,8 dan diinkubasikan selama lima sampai tujuh hari pada suhu kamar dengan dikocok berkecepatan 150 rpm menggunakan *shaker*. Setelah mengalami lisis, kultur cair *B. thuringiensis* tersebut disentrifus. Endapan yang diperoleh (sebagian besar terdiri dari campuran spora dan kristal protein) dicuci sebanyak 3 kali dengan air suling steril, kemudian dicuci satu kali dengan larutan 1 M NaCl steril dan dicuci sekali lagi dengan air suling steril. Endapan yang sudah dicuci tersebut lalu disuspensikan ke dalam 1 ml air suling steril dan dimasukkan ke dalam tabung mikro steril, ditutup dan disimpan di dalam *freezer* yang bersuhu -20°C sampai diperlukan untuk uji selanjutnya (Widyasari 2001).

### Estimasi protein

Konsentrasi kristal protein *B. thuringiensis* dihitung dengan menggunakan Pierce BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, Illinois) dengan modifikasi. Standard yang digunakan adalah *Bovine Serum Albumin* (BSA). Masing-masing sampel protein sebanyak 20 µl ditambahkan 200 µl reagen BCA dalam ELISA plate dan diinkubasi (37°C, 1 jam). Perubahan warna diukur dengan absorban 540 nm (Titretrek Multiskan Plus, UK). Kurva standard dari konsentrasi BSA digunakan untuk menghitung protein sampel.

### Mikro-enkapsulasi kristal protein *B. thuringiensis*

Metode yang digunakan mengacu pada Cheung & Hammock (1985). Suspensi kristal (1 mg/ml) dicampur dengan *Freund incomplete adjuvant* (FIA) dengan volume yang sama dan dikocok dengan vorteks. Emulsi yang dihasilkan kemudian digunakan dengan perbandingan 1:100 untuk uji *in vitro* terhadap tujuh isolat lokal *B. thuringiensis* patogen, yang selanjutnya dipilih dua isolat untuk dilakukan uji secara *in vivo*.

### Uji *in vitro*

Uji *in vitro* dibagi dua, yaitu *in vitro* pertama (tanpa mikro-enkapsulasi) dan *in vitro* lanjutan (dengan mikro-enkapsulasi). Kedua uji tersebut mengacu pada metode yang dilakukan oleh Kumarasinghe et al. (2002). Beberapa isolat *B. thuringiensis* yang patogen/toksitas tinggi (hasil uji *in vitro* pertama) diperbanyak proteinnya dan dipisahkan kristalnya, sehingga mendapatkan kristal protein yang cukup untuk uji-uji berikutnya.

Untuk uji *in vitro* lanjutan (mikro-enkapsulasi), dibuat suspensi kristal *B. thuringiensis* dan *Freund Incomplete Adjuvant* (FIA) sebanyak 120 µl (1 mg/ml) ditambahkan 12 ml H<sub>2</sub>O steril (perbandingan 1:100) dimasukkan ke dalam lima cawan petri masing-masing berisi 2 ml. Sebanyak sepuluh larva *C. bezziana* instar II (L2) ditanam di dalam cawan petri dan diamati selama 24 jam. Setiap isolat dilakukan 5 kali ulangan (5 cawan petri). Dua kontrol digunakan pada uji ini, yaitu air steril yang digunakan untuk mengetahui daya hidup larva, dan adjuvant + air digunakan sebagai kontrol negatif tanpa menggunakan isolat *B. thuringiensis*. Penambahan adjuvant berfungsi sebagai zat pembawa (karier). Dengan menggunakan kriteria Kumarasinghe et al. (2002), maka isolat yang dapat membunuh larva di atas 80% digolongkan mempunyai toksitas tinggi, apabila membunuh larva 50-80% disebut moderat dan apabila hanya membunuh kurang dari 50% tergolong mempunyai toksitas rendah. Larva dinyatakan mati apabila tidak ada gerakan setelah disentuh dengan

jarum. Berdasarkan hasil uji *in vitro* lanjutan ini, maka dipilih dua isolat untuk diuji secara *in vivo* pada domba.

### Uji *in vivo*

Metode uji *in vivo* mengacu pada Sukarsih et al. (2000b). Hewan yang digunakan adalah sembilan ekor domba ekor tipis umur 1,5-2 tahun dibagi dalam tiga kelompok (masing-masing kelompok 3 ekor). Domba dipelihara di kandang dan diadaptasi selama dua minggu sebelum perlakuan. Sehari sebelum larva diinfestasikan, punggung domba dicukur kemudian ditempelkan empat buah *ring* (kanan depan, kiri depan, kanan belakang dan kiri belakang) dari logam aluminium berdiameter luar 4 cm dan diameter dalam 2,5 cm dengan cara di lem. Setiap hewan dibuat empat luka sayatan menyilang (ukuran 2x2 cm). Sayatan ini dibuat sedemikian rupa sehingga terjadi luka insisi pada lapisan superfisial otot yang ditandai dengan keluarnya rembesan darah segar. Setiap luka buatan diinfestasikan 25 larva instar I (L1). Luka buatan tersebut kemudian ditutup dengan kasa nilon yang bagian atasnya diberi pelembab kotak bergabus, agar luka tetap lembab dan larva tidak lolos keluar. Domba kelompok I diobati dengan isolat *B. thuringiensis* 1 (Bt 1), kelompok II diobati dengan isolat *B. thuringiensis* 2 (Bt 2) dan kelompok III adalah kontrol. Pengobatan dilakukan dua kali, yaitu hari ke tiga dan ke empat pasca infestasi. Larva dikoleksi dari luka myiasis pada hari ke lima dan dilakukan penghitungan dan penimbangan. Larva yang masih hidup dimasukkan ke dalam *vermiculite* dan diinkubasi pada suhu 37°C sampai menjadi pupa. Setelah hari ke sepuluh, bobot pupa ditimbang.

### Parameter dan analisis data

Parameter yang diamati adalah mortalitas larva, bobot larva dan pupa. Data dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf kepercayaan 95%. Semua data tersebut dianalisis menggunakan program STAT versi 2,6 (Santoso et al. 1991).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi *B. thuringiensis*

Isolasi *B. thuringiensis* dipilih dari sampel tanah kandang ternak yang berasal dari lokasi-lokasi yang sebelumnya dilaporkan pernah terjadi kasus myiasis. Penentuan lokasi ini menjadi penting karena terkait dengan sifat *B. thuringiensis*, yaitu spesies spesifik sehingga diharapkan isolat yang diperoleh spesifik untuk lalat *C. bezziana*. Dari 25 sampel tanah yang diuji, sebanyak (11/25) 48% positif mengandung

bakteri *B. thuringiensis*, sedangkan dari 11 sampel tersebut diperoleh 121 isolat yang memiliki kristal protein dalam sporanya. Hasil isolat ini terbilang cukup banyak karena tanah lokasi pengambilan sampel tersebut mempunyai kelembaban yang cukup tinggi. Kemampuan spora untuk bergerminasi tidak dipengaruhi oleh pH tanah, melainkan oleh kelembaban tanah. Muharsini et al. (2003) melakukan isolasi *B. thuringiensis* dari lokasi dengan geografis yang berbeda dan sebagian besar isolat yang diperoleh adalah berasal dari dataran tinggi yang umumnya tanahnya lembab. Studi ini sesuai dengan hasil dari penelitian Chack et al. (1994) yang menunjukkan bahwa 93,5% isolat *B. thuringiensis* diperoleh dari sampel tanah di dataran tinggi, sedangkan hanya 6,5% diperoleh dari dataran rendah. Tingginya keberadaan *B. thuringiensis* pada tanah kandang mungkin juga berasal dari feses ternak. Maheswaran et al. (2010) berhasil mengisolasi *B. thuringiensis* dari feses hewan pemakan tumbuhan atau herbivora pada beberapa peternakan.

#### Perbanyak isolat *B. thuringiensis* serta pemisahan kristal protein dan spora

Perbanyak isolat dilakukan untuk memperoleh jumlah kristal protein yang cukup untuk uji *in vitro* dan *in vivo* dari satu *batch* produksi yang sama. Tahapan perbanyak kristal protein dilakukan kembali pada isolat-isolat yang mempunyai toksisitas tinggi (membunuh larva lebih dari 80%) pasca uji *in vitro* yang pertama. Dari hasil perhitungan estimasi protein diperoleh kurva standar dengan persamaan  $Y = 0,0011x + 0,1074$  ( $R^2 = 0,9968$ ), kemudian setiap sampel protein dihitung jumlah proteinnya, sehingga diperoleh nilai tertentu dengan satuan  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Jumlah (volume) protein dihitung dan dikalikan dengan nilai yang telah diperoleh dari kurva standar sehingga diperoleh nilai total protein dalam miligram (Tabel 1). Hasil perhitungan protein menunjukkan bahwa terdapat tiga isolat yang menghasilkan protein kristal tinggi, yaitu 47.3A (8,92 mg), 45.5A (7,45 mg) dan 46.4A (6,74

mg). Perbedaan ini diduga disebabkan oleh jumlah koloni bakteri yang terdapat pada masing-masing isolat.

#### Uji *in vitro*

Berdasarkan hasil uji *in vitro* pertama terpilih tujuh isolat yang mempunyai toksisitas tinggi terhadap larva *C. bezziana* (Tabel 1 dan 2). Ketujuh isolat tersebut mampu membunuh larva *C. bezziana* sebanyak 96-100% pasca pemberian kristal protein *B. thuringiensis* tanpa mikro-enkapsulasi selama 24 jam.

Umumnya larva yang mati mengkerut, berwarna kecoklatan dan tidak bergerak ketika disentuh dengan ujung jarum, sementara larva yang normal berwarna putih kekuningan dan mempunyai motilitas yang tinggi yang ditunjukkan dengan gerakan lincah mengelilingi petri dish. Kematian larva diduga disebabkan oleh reaksi kristal protein *B. thuringiensis* dalam saluran pencernaannya. Secara fisiologis toksin ini akan berikatan dengan reseptor spesifik yang ada dipermukaan sel-sel epitel pada usus bagian tengah dan diaktivasi oleh enzim protease sehingga terjadi ketidakseimbangan pengambilan glukosa dan oksigen oleh sel-sel epitelium tersebut. Akibatnya terjadi pembengkakan mikroplasma pada sel-sel epitel usus yang diikuti paralisis usus dan berubahnya keseimbangan pH hemolimpa. Kondisi tersebut menyebabkan larva kehilangan nafsu makan, berhenti makan dan kelaparan akhirnya mati (Sanahuja et al. 2011).

Dari ketujuh isolat yang telah dilakukan mikro-enkapsulasi menggunakan FIA tersebut, isolat 45.5A dan 46.5A tetap menunjukkan patogenitas yang tinggi (toksisitas tinggi), isolat 46.5B, 47.3A dan 47.3B menjadi moderat sedangkan isolat 45.5B dan 46.4A menjadi tidak patogen. Hal tersebut diduga proses enkapsulasi dengan FIA mempengaruhi daya patogenitas kristal protein terhadap larva *C. bezziana*. Uji yang dilakukan pada *B. thuringiensis Israelensis* terhadap larva nyamuk *Aedes freeborni* dan *A. aegypti* menunjukkan bahwa mikro-enkapsulasi dengan FIA selain meningkatkan sensitivitas juga meningkatkan

**Tabel 1.** Isolat lokal *B. thuringiensis* yang diperbanyak kristalnya dan konsentrasi protein yang diperoleh

No. Isolat	Asal isolat (Kecamatan, Kabupaten)	Sifat isolat (toksisitas)	Konsentrasi protein (mg)
45.5A	Dukuh, Kediri	Tinggi	7,45
45.5B	Dukuh, Kediri	Tinggi	2,85
46.4A	Dukuh, Kediri	Tinggi	6,74
46.5A	Dukuh, Kediri	Tinggi	4,59
46.5B	Dukuh, Kediri	Tinggi	4,66
47.3A	Dukuh, Kediri	Tinggi	8,92
47.3B	Dukuh, Kediri	Tinggi	5,92

**Tabel 2.** Rata-rata persentase mortalitas larva *C. bezziana* pasca pemberian kristal protein *B. thuringiensis* selama 24 jam

No. isolat	Mortalitas larva	
	Tanpa mikro-enkapsulasi (%) ± SE	Dengan mikro-enkapsulasi (%) ± SE
45.5A	100,00±0,00	84,00 <sup>a</sup> ±9,80
45.5B	100,00±0,00	26,00 <sup>c</sup> ±14,35
46.4A	98,00±1,99	48,00 <sup>abc</sup> ±17,72
46.5A	96,00±3,99	82,00 <sup>a</sup> ±8,00
46.5B	100,00±0,00	52,20 <sup>ab</sup> ±11,11
47.3A	96,00±3,99	71,40 <sup>a</sup> ±6,71
47.3B	96,00±1,99	64,00 <sup>ab</sup> ±11,22
Kontrol (air)	08,00±2,45	26,00 <sup>bc</sup> ±10,30
Kontrol (air + adjuvant)	-	50,00 <sup>abc</sup> ±12,65

toksitas (Cheung & Hammock 1985). Metoda mikro-enkapsulasi dengan FIA memungkinkan toksin tetap terapung, sehingga meningkatkan efisiensi. Perbedaan hasil yang ditunjukkan pada uji *in vitro* ini diduga karena larva nyamuk secara alami hidup di air, berbeda dengan larva *C. bezziana* yang secara alami hidup di jaringan. Berdasarkan hasil ini dan dengan pertimbangan jumlah protein yang tersedia untuk uji *in vivo*, maka isolat 45.5A (Bt-1) dan 47.3A (Bt-2) digunakan untuk uji *in vivo*. Meskipun isolat 46.5A memiliki daya patogenitas yang tinggi terhadap larva *C. bezziana*, tetapi hasil kristal protein yang dihasilkan tidak cukup untuk uji *in vivo*.

### Uji *in vivo*

Dari tahapan uji *in vitro* mikro-enkapsulasi bahwa pemberian adjuvant berpengaruh terhadap daya patogenitas toksin kristal protein. Oleh karena itu, pada uji *in vivo* tidak menggunakan *adjuvant*.

Bobot rata-rata larva *C. bezziana* dan pupa pasca uji *in vivo* dapat dilihat pada Tabel 3. Dari 25 larva yang diinfestasikan pada setiap luka buatan, jumlah larva yang dapat dipanen rata-rata sekitar 50%. Hal ini umum terjadi pada uji-uji yang telah dilakukan sebelumnya oleh Sukarsih et al. (2000b). Pengurangan jumlah larva ini disebabkan oleh beberapa faktor antara lain, larva instar I (L1) yang diinfestasikan tidak semuanya dapat berkembang dengan baik karena diperlukan kondisi yang baik sesuai dengan luka yang alami, walaupun luka buatan tersebut telah dibuat lembab dengan pemberian busa basah. Selain itu, kadangkala luka buatan menutup dan mengering setelah 2-3 hari, sehingga infestasi larva tidak terjadi. Pada uji ini, tiga luka menutup dan kering terjadi pada hewan nomer 2 (Kanan Depan dan Kiri Belakang) dan nomer 5 (Kiri

Depan), sehingga larva tidak dihitung, karena tidak ada larva yang berkembang (larva mati).

Hasil analisis statistika menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bobot larva dan pupa yang nyata antara kelompok hewan coba yang diterapi Bt-1 dan Bt-2 dengan kelompok kontrol ( $P > 0,05$ ). Kendati demikian, kelompok hewan yang diterapi dengan Bt-2 menghasilkan bobot pupa rendah (kurang dari 26 mg) sehingga tidak dapat menetas menjadi lalat dewasa seperti pada studi yang telah dilakukan terdahulu, sedangkan pada kelompok hewan yang diterapi Bt-1 dan kontrol bobot pupa masih dalam kategori normal.

Rendahnya efikasi kristal protein *B. thuringiensis* pada uji *in vivo* ini diduga disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain pertumbuhan larva pada lokasi luka sangat cepat dalam area yang luas dan berusaha menuju ke jaringan yang lebih dalam. Keadaan ini memungkinkan larva menghindar dari kristal protein dan lebih banyak memakan jaringan hidup yang segar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa larva yang dikoleksi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan memiliki bobot rata-rata yang sama, yaitu 67-71 mg. Berbeda dengan perlakuan pada tanaman dan jentik nyamuk, kristal protein relatif pada posisi yang tepat dan statis, yaitu dipermukaan daun atau air sehingga memungkinkan untuk termakan oleh insekta.

Alasan efikasi yang rendah pada uji *in vivo* diduga banyak kristal protein telah menempel pada jaringan-jaringan yang rusak dipermukaan luka, sementara larva *C. bezziana* adalah obligat parasit yang mutlak memerlukan jaringan hidup yang segar untuk perkembangannya dan posisinya selalu berada di dalam jaringan. Di samping itu, umur larva pada hari keempat telah cukup dewasa dan bersiap untuk meninggalkan lokasi luka untuk jatuh ke tanah dan membentuk pupa. Lysyk et al. (2010) menyebutkan bahwa kristal protein

**Tabel 3.** Rata-rata jumlah larva, bobot larva dan pupa *C. bezziana* pasca diobati dengan micro-enkapsulasi *B. thuringiensis* pada uji *in vivo*

No. Isolat	Jumlah larva $\pm$ SE	Bobot larva (mg) $\pm$ SE	Bobot pupa (mg) $\pm$ SE
45.5A (Bt-1)	37,00 $\pm$ 4,00	67,52 $\pm$ 1,72	26,63 $\pm$ 0,99
47.3A (Bt-2)	38,00 $\pm$ 7,77	71,52 $\pm$ 2,61	23,35 $\pm$ 4,40
Kontrol	45,00 $\pm$ 2,03	70,32 $\pm$ 2,38	25,11 $\pm$ 1,72

*B. thuringiensis* lebih toksik pada larva yang muda dibandingkan yang telah dewasa atau imago.

Namun demikian, berdasarkan uji *in vitro* terbukti bahwa setidaknya dua isolat memiliki patogenitas yang tinggi dan perlu dipikirkan kembali metode yang lebih tepat dengan bahan pembawa (karier) yang sesuai sehingga kristal protein berada pada lokasi yang tepat sehingga apabila termakan oleh larva *C. bezziana* pada luka myiasis dapat cepat beraksi dan mengakibatkan kematian.

### KESIMPULAN

Hasil uji *in vitro* dengan metode mikro-enkapsulasi menggunakan FIA mampu menurunkan beberapa patogenitas isolat terpilih, sehingga metode tersebut perlu dimodifikasi dan disesuaikan dengan cara hidup alami larva lalat dalam jaringan. Pengobatan domba yang diinfestasi dengan larva *C. bezziana* menggunakan dua isolat Bt terpilih 45.5A (Bt-1) dan 47.3A (Bt-2) kurang efektif, karena tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Eko Setyo Purwanto dan Lilis Solihat atas bantuannya secara teknis di laboratorium selama penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad H. 2002. Treatment in screwworm fly infestation. Proceedings of screwworm fly emergency preparedness conference Canberra. Department of agriculture fisheries and forestry Australia. OCVO, Canberra, 12-13 November 2001. p. 111-113.
- Armengol G, Hernandez J, Velez JG, Orduz S. 2006. Long lasting effects of a *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis experimental tablet formulation for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control. J Economic Entomol. 99:1590-1595.
- Cao CW, Li LS, Rong RW, Xiao PL, Hong QW, Zhi YW. 2012. Toxicity and affecting factors of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis on *Chironomus kiiensis* larvae. J Insect Sci. 12:1-8.
- Cheung PYK, Hammock BC. 1985. Micro-lipid-droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin for control of mosquito larvae. Appl Environment Microbiol. 50:984-988.
- Chack KF, Chao DC, Tseng MY, Kao SS, Tuan SJ, Feng TY. 1994. Determination and distribution of *cry*-type gene of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. Appl Environment Microbiol. 60:2415-2420.
- Jusuf E. 2009. Exploration of *Bacillus thuringiensis* a-endotoxin derived from bacterial isolates in Jabodetabek Region. Microbiology. 3:51-55.
- Kumarasinghe SPW, Karunaweera ND, Ihalamulla RL, Arambewela LSR, Dissanayake DSCTR. 2002. Larvicidal effects of mineral turpentine, low aromatic white spirits, aqueous extracts of *Cassia alata*, and aqueous extracts, ethanolic extracts and essential oil of betel leaf (*Piper betle*) on *Chrysomya megacheopala*. Int J Dermatol. 41:877-880.
- Lindblad EB. 2000. Freund's adjuvants. In: Vaccine adjuvants : Preparation methods and research protocols. Totowa (NJ): Humana Press.
- Lysyk TJ, Kalischuk-Tymensen LD, Rochon K, Selinger LB. 2010. Activity of *Bacillus thuringiensis* isolates against immature horn fly and stable fly (Diptera: Muscidae). J Economic Entomol. 103:1019-1029.
- Lysyk TJ, Selinger LB. 2012. Effects of temperature on mortality of larval stable fly (Diptera: Muscidae) caused by five isolates of *Bacillus thuringiensis*. Entomol Soc Am. 105:732-737.
- Maheswaran S, Sreeramanan S, Reena Josephine CM, Marimuthu K, Xavier R. 2010. Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in faeces of herbivorous farm animals. Afr J Biotechnol. 9:8013-8019.
- Mahon R. 2002. A trial of the sterile insect release method against the Old World Screwworm fly in Malaysia. Proceedings of the International Conference on Control of Old World Screwworm Fly in some Countries of the Middle East. Bahrain: AOAD Bahrain.
- Muharsini S, Wardhana AH, Habib R, Bahagiawati A. 2003. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from several localities of Java and South Sulawesi for Biological Control of myiasis, *Chrysomya bezziana*. JITV. 8:256-263.

- Muharsini S, Sulistyaningrum, Wardhana AH. 2006a. Uji efektifitas ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap larva lalat penyebab myiasis *Chrysomya bezziana*. Prosiding Seminar Nasional dan Pameran Tumbuhan Obat Indonesia XXVIII. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan 2006. hlm. 331-335.
- Muharsini S, Wardhana AH, Yuningsih. 2006b. Uji keefektifan biji sirsak (*Annona muricana*) dan akar tuba (*Derris elliptica*) terhadap larva lalat *Chrysomya bezziana* secara *in vitro*. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor (Indonesia): Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. hlm. 1013-1017.
- Riding G, Muharsini S, Pearson R, Sukarsih, Satria E, Wijffels G, Willadsen P. 2000. Fractionation, identification and vaccination of efficacy native antigen from the screwworm fly, *Chrysomya bezziana*. JITV Special Edition. 5:150-159.
- Rizali A, Asano S, Sahara K, Lay BW, Hastowo S, Lizuka T. 1998. Novel *Bacillus thuringiensis* serovar aizawal strains isolated from mulberry leaves in Indonesia. Appl Entomol Zool. 33:111-114.
- Sanahuja G, Raviraj B, Richard MT, Teresa C, Paul C. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. Plant Biotechnol. 9:283-300.
- Santoso RD, Hasanuddin, Jamaro A. 1991. Program STAT Versi 2.6 (tesis S2). [Bandung (Indones)]: Universitas Padjajaran.
- Sukarsih, Partoutomo S, Wijffel G, Willadsen P. 2000a. Vaccination trials in sheep againts *Chrysomya bezziana* larvae using the recombinant peritrophin Antigens Cb 15, Cb 42, and C 48. JITV Special Edition. 5:192-196.
- Sukarsih, Partoutomo S, Tozer R, Satria E, Wijffels G, Ridding G. 2000b. Establishment and maintenance of a colony of the old world screwworm fly *Chrysomya bezziana* at BALITVET in Bogor, West Java, Indonesia. JITV Special Edition. 5:144-149.
- Van Frankenhuyzen K. 2000. Applications of *Bacillus thuringiensis* in forestry, in: Charles JF, Dececluse A, Nielsen-Leroux C. Entomopathogenic bacteria: From Laboratory to Field Application. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, The Netherlands. p. 371-382.
- Wardhana AH, Muharsini S, Suhardono. 2003. Koleksi dan kejadian myiasis yang disebabkan oleh Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana* di daerah endemik di Indonesia. Mathius IW, Setiadi B, Sinurat AP, Ashari, Darmono, Wiyono A, Purwadaria T, Murdiati TB, penyunting. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor (Indonesia): Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. hlm. 235-239.
- Wardhana AH, Widyastuti E, Wiratmana AWA, Muharsini S, Darmono. 2004. Uji efikasi ekstrak heksan daging biji srikaya (*Annona squamosa* L) terhadap pertumbuhan larva lalat *Chrysomya bezziana* secara *in vitro*. JITV: 9:272-285.
- Wardhana AH, Muharsini S, Santoso S, Arambewela LSR, Kumarasinghe SPW. 2011. Pengobatan myiasis dengan sediaan krim minyak atsiri daun sirih hijau (*Piper betle* L) pada domba yang diinfestasi dengan larva *Chrysomya bezziana*. Prasetyo LH, Damayanti R, Iskandar S, Herawati T, Priyanto D, Puastuti W, Anggraeni A, Tarigan S, Wardhana AH, Darmayanti NLPI, penyunting. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor (Indonesia): Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. hlm. 568-597.
- Widyasari E. 2001. Deteksi gen *cry 3 Bacillus thuringiensis* Berliner dari Cibinong dan Lampung dengan tehnik PCR. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. Depok. hlm. 78.