

**234**

**LIT**

Salatiga

## **LAPORAN AKHIR PENELITIAN**

**DETEKSI GEN Cry *Bacillus thuringiensis* H-14 GALUR LOKAL dan  
TOKSISITASNYA TERHADAP JENTIK NYAMUK VEKTOR MALARIA  
*Anopheles maculatus***

**(untuk kalangan terbatas)**



**Oleh**

**Blondine Ch. P**

**Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit  
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan  
Kementerian Kesehatan RI**

**2012**

## LAPORAN AKHIR PENELITIAN

**DETEKSI GEN *Cry Bacillus thuringiensis H-14* GALUR LOKAL dan  
TOKSISITASNYA TERHADAP JENTIK NYAMUK VEKTOR MALARIA  
*Anopheles maculatus***

(untuk kalangan terbatas)



Oleh

**Blondine Ch. P**



Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit  
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan  
Kementerian Kesehatan RI

2012

## SUSUNAN TIM PENELITI

No.	Nama	Keahlian / Kesarjanaan	Kedudukan dalam Tim	Uraian Tugas
1.	Dra. Blondine Christina P., M.Kes	Epidemiologi Klinis S2	Ketua Pelaksana	Bertanggung jawab atas pelaksanaan penelitian
2.	Yusnita Mima Anggraeni, S.Si	S1 Biologi	Peneliti Pertama	Membantu pelaksanaan penelitian dalam segala aspek mikrobiologi
3.	Esti Rahardianingyas, S.Si	S1 Biologi	Pembantu Peneliti	Membantu pelaksanaan penelitian mikrobiologi dan entomologi di laboratorium
4.	Rendro Wianto	D3 Analis Kesehatan	Pembantu Peneliti	Membantu pelaksanaan operasional penelitian
5.	Rima Tunjungsari D.A, AMKL	D3 Kesehatan Lingkungan	Pembantu Peneliti	Membantu pelaksanaan operasional penelitian
6.	Warido	SLTA	Pembantu Peneliti	Membantu pelaksanaan operasional penelitian
7.	Drs. Bambang Heriyanto, M.Kes	S2 Epidemiologi	Koordinator Penelitian	Mengkoordinasi peneliti dalam pelaksanaan penelitian
8.	Suharti	SMA	Sekretariat Penelitian	Melaksanakan administrasi penelitian



# KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA

## BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

### BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721  
Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107  
E-mail : b2p2vrp@litbang.depkes.go.id

#### SURAT KEPUTUSAN

#### KEPALA BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN

#### VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT

#### NOMOR: HK.00.07/VII/628/2012

#### TENTANG

Penelitian dengan judul "Deteksi Gen Cry *Bacillus thuringiensis* H-14 Galur Lokal dan Toksisitasnya Terhadap Jentik Nyamuk Malaria *Anopheles maculatus*"

#### MENIMBANG:

1. Bahwa dalam rangka peningkatan kinerja riset di lingkungan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan yang berfokus pada bidang prioritas teknologi kesehatan khususnya program pengendalian vektor dan reservoir penyakit, maka dipandang perlu dilakukan penelitian.
2. Bahwa mereka yang namanya tercantum dalam Surat Keputusan ini dipandang cakap untuk melaksanakan penelitian tersebut.

#### MENGINGAT:

1. Surat Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 2347/MENKES/PER/XI/2011 tertanggal 22 November 2011 tentang Organisasi dan Tata Kerja Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit.
2. Surat Persetujuan Pelaksanaan Penelitian No. LB.02.05/VII/601/2012 tertanggal 23 Februari 2012 dengan judul penelitian Deteksi Gen Cry *Bacillus thuringiensis* H-14 Galur Lokal dan Toksisitasnya Terhadap Jentik Nyamuk Malaria *Anopheles maculatus*.
3. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (DIPA B2P2VRP) Tahun Anggaran 2012 Revisi ke-1 Nomor 0813/024-11.2.01/13/2012 tertanggal 22 Februari 2012.

#### MENETAPKAN:

- Pertama : Membentuk tim pelaksanaan penelitian dengan susunan sebagai berikut:
- |                            |   |   |
|----------------------------|---|---|
| a. Peneliti Utama          | : | 1) Dra. Blondine Christina P., M.Kes<br>(Ketua Pelaksana)       |
| b. Peneliti Pertama        | : | 2) Yusnita Mirna Anggraeni, S.Si                                |
| c. Peneliti Non Fungsional | : | 3) Esti Rahardianingtyas, S.Si                                  |
| d. Pembantu Peneliti       | : | 4) Rendro Wianto<br>5) Rima Tunjungsari D.A., AMKL<br>6) Warido |
| e. Pembantu Administrasi   | : | 7) Suharti  |
| f. Koordinator Penelitian  | : | 8) Drs. Bambang Heriyanto, M.Kes                                |

- Kedua : Tim pelaksanaan penelitian bertugas:
- a. Melaksanakan penelitian sampai selesai dan menyerahkan laporan kepada Kepala menurut Surat Persetujuan Pelaksanaan Penelitian No. LB.02.05/VII/601/2012 tertanggal 23 Februari 2012.



# KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA

## BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

### BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721

Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107

E-mail : b2p2vrp@litbang.depkes.go.id

- b. Menurut pertanggungjawaban keuangan menurut ketentuan yang berlaku.

- Ketiga : Semua pengeluaran untuk pelaksanaan Surat Keputusan ini dibebankan pada Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (DIPA B2P2VRP) Tahun Anggaran 2012 Revisi ke-1 Nomor 0813/024-11.2.01/13/2012 tertanggal 22 Februari 2012.
- Keempat : Surat Keputusan ini berlaku mulai tanggal 02 Januari 2012 sampai 31 Desember 2012 dengan catatan segala sesuatu akan ditinjau kembali apabila dikemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini.

Ditetapkan di : Salatiga  
Pada tanggal : 27 Februari 2012

Kepala,



Tembusan:

1. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan di Jakarta
2. Bendaharawan Rutin Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit di Salatiga
3. Yang bersangkutan



**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN**  
**BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT**

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721  
Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107  
E-mail : b2p2vrip@litbang.depkes.go.id

**SURAT PERSETUJUAN PELAKSANAAN PENELITIAN**  
**NO. LB. 02.05/VII/601/2012**

Persetujuan pelaksanaan penelitian ini diberikan atas dasar ketentuan yang diatur dalam pasal di bawah ini:

**B A B I**  
**I K H T I S A R**

- |                      |   |
|----------------------|---|
| 1. Judul penelitian  | : Deteksi Gen Cry <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14 Gatur Lokal dan Toksisitasnya Terhadap Jentik Nyamuk Malaria <i>Anopheles maculatus</i>                    |
| 2. Tujuan            | : Mengidentifikasi gen Cry strain <i>B. Thuringiensis</i> H-14 galur lokal dan toksisitasnya terhadap jentik <i>Anopheles aconitus</i> dan <i>An. maculatus</i> |
| 3. Ketua Pelaksana   | : Dra. Blondine Christina PattiPeilohy, M.Kes   |
| 4. Waktu pelaksanaan | : 02 Januari 2012 s/d 31 Desember 2012  |

**B A B II**  
**B I A Y A**

1. Seluruh pembiayaan yang timbul sebagai akibat dari pelaksanaan kegiatan penelitian dibebankan pada Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (DIPA B2P2VRP) Tahun Anggaran 2012 berdasarkan surat revisi ke-1 Nomor 0813/024-11.2.01/13/2012 tertanggal 22 Februari 2012.
2. Biaya tersebut diperinci dalam pos pengeluaran sebagai berikut:

a. Belanja Bahan	: Rp 33.079.000,-
b. Honor yang terkait dengan output kegiatan	: Rp 25.800.000,-
c. Belanja Barang Non Operasional Lainnya	: Rp 24.646.000,-
d. Belanja Perjalanan Lainnya	: <u>Rp 166.475.000,-</u>
e. Jumlah seluruhnya	: Rp 250.000.000,-
3. Penyediaan biaya untuk keperluan penelitian tersebut akan diberikan secara bertahap dan merupakan uang yang harus dipertanggungjawabkan oleh Ketua Pelaksana. Cara pertanggungjawaban harus sesuai dengan peraturan yang berlaku dan atas petunjuk pelaksanaan yang diberikan oleh Kepala.

**B A B III**  
**P E L A K S A N A A N**

Mengenai pelaksanaan pembiayaan diatur sebagai berikut :

1. Ketua Pelaksana mengajukan Surat Permintaan Pembayaran kepada Kepala melalui Kepala Sub Bagian Tata Usaha.



# BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721  
Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107  
E-mail : b2p2vnp@litbang.depkes.go.id

2. Kepala memberikan persetujuan pembayaran setelah persyaratan yang dikaitkan dengan pengajuan surat permintaan pembayaran dipenuhi secara lengkap oleh Ketua Pelaksana.

## BAB IV PENGAWASAN

1. Pengawasan terhadap pelaksanaan penelitian Tahun 2012 dilakukan oleh Kepala selaku Penanggungjawab yang bertanggung jawab kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
2. Pengawasan dapat dilakukan sewaktu-waktu dan Ketua Pelaksana wajib memberikan kesempatan serta memberikan keterangan yang diminta.
3. Apabila dipandang perlu, Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan dapat melakukan atau menunjuk pejabat lain untuk melakukan pengawasan.

## BAB V PELAPORAN

1. Ketua Pelaksana wajib memberikan laporan pertanggungjawaban keuangan setiap 3 (tiga) bulan dan harus diterima oleh Kepala paling lambat tanggal 5 (lima), bulan berikutnya dan melaporkan kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
2. Ketua Pelaksana wajib memberikan laporan kemajuan penelitian setiap 3 (tiga) bulan dan sesuai dengan ketentuan pelaporan yang berlaku.
3. Ketua Pelaksana wajib membuat laporan akhir penelitian yang terdiri dari:
  - a. Laporan Administrasi
  - b. Laporan Hasil Penelitian
  - c. Abstrak Hasil Penelitian
  - d. *Executive Summary* (ringkasan untuk pengambilan keputusan pimpinan) dan paling lambat diserahkan pada Januari 2013.

## BAB VI PERSYARATAN LAIN

1. Segala penemuan dan hasil penelitian ini menjadi milik Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
2. Hasil penelitian ini harus diterbitkan di dalam "Bulletin Penelitian Kesehatan", apabila naskah ilmiah hendak diajukan ke majalah lain, supaya terlebih dahulu dimintakan persetujuan dari Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
3. Apabila naskah ilmiah tersebut hendak diajukan di dalam suatu pertemuan ilmiah supaya terlebih dahulu dimintakan persetujuan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.



**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN**  
**BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN VEKTOR DAN RESERVOIR PENYAKIT**

Jl. Hasanudin No. 123 PO. BOX 200, Salatiga 50721  
Telepon : (0298) 327096 ; 312107, Faksimile : (0298) 322604 ; 312107  
E-mail : b2p2vip@litbang.depkes.go.id

**B A B VII**  
**S A N K S I**

1. Apabila laporan pertanggungjawaban keuangan dan laporan kemajuan penelitian tidak masuk pada waktu yang telah ditentukan, maka tidak akan diberikan uang muka pada bulan berikutnya.
2. Selama Ketua Pelaksana belum menyelesaikan laporan akhir, maka ia tidak akan dipertimbangkan menjadi Ketua Pelaksana untuk penelitian berikutnya.

**B A B VIII**  
**KETENTUAN PENUTUP**

Apabila penyelesaian penelitian tidak dapat dilaksanakan pada waktunya karena suatu hal yang berada di luar kekuasaan Ketua Pelaksana, Kepala dapat mengusulkan kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan untuk meninjau kembali dan mempertimbangkan kemungkinan perpanjangannya.

23 Februari 2012

Menerima dan menyetujui

Kepala,



Drs. Bambang Heriyanto, M.Kes  
NIP 195406201981101002

Ketua Pelaksana,

Dra. Blondine Christina Pattipeilohy, M.Kes  
NIP 194903251976112001

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa yang telah memberikan rahmat serta karunia-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan laporan akhir penelitian dengan sumber dana DIPIA, Badan Litbangkes Kementerian Kesehatan tahun anggaran 2012. Laporan akhir penelitian “**Deteksi Gen Cry Bacillus thuringiensis H-14 Galur Lokal dan Toksisitasnya Terhadap Jentik Nyamuk Vektor Malaria Anopheles maculatus**” disusun sebagai pertanggungjawaban ilmiah dan berakhirmnya kegiatan penelitian yang penulis lakukan pada tahun anggaran 2012.

Penulis menyadari dalam menyelesaikan penelitian ini banyak kelemahan dan jauh dari sempurna, maka saran dan kritik ke arah kesempurnaan sangat penulis harapkan. Harapan penulis penelitian ini dapat bermanfaat dan digunakan bagi pengelola program sebagai bahan pertimbangan dalam manajemen penggunaan larvasida mikroba *B. thuringiensis* serotipe 14 (H-14) galur lokal sebagai tindakan alternatif terhadap pengurangan dan selektivitas penggunaan insektisida kimia.

Salatiga, Desember 2012  
Penulis

Blondine Ch. Pattipeilohy

## RINGKASAN EKSEKUTIF

### Deteksi Gen Cry *Bacillus thuringiensis* H-14 Galur Lokal dan Toksisitasnya Terhadap Jentik Nyamuk Vektor Malaria *Anopheles maculatus*

Blondine Ch. P, Yusnita Mirna Anggraeni, Esti Rahardianingtyas, S.Si

Dalam rangka pencapaian target MDGs kesehatan Indonesia dan fokus prioritas pembangunan kesehatan tahun 2010-2014 yaitu mengenai pengendalian penyakit menular antara lain demam berdarah dengue, malaria dan filariasis maka dilakukan penelitian pengendalian jentik nyamuk menggunakan enkapsulasi delta endotoksin *Bacillus thuringiensis* H-14 galur lokal. Nyamuk *Aedes*, *Anopheles* dan *Culex* adalah nyamuk yang berperan penting dalam penularan penyakit tersebut. Penggunaan insektisida kimia merupakan metode yang dikenal berhasil membunuh nyamuk. Namun demikian terdapat dampak negatif yaitu sifatnya yang tidak spesifik sehingga dapat membunuh organisme bukan target serta menimbulkan resistensi vektor, di samping dampak negatif lainnya terhadap lingkungan. Timbulnya resistensi nyamuk terhadap insektisida kimia dan adanya pertimbangan terhadap keamanan lingkungan mendorong dikembangkannya biolarvasida *B. thuringiensis* H-14 yang efektif dan bersifat target spesifik. Pada tahun 1978, WHO telah merekomendasikan penggunaan endotoksin *B. thuringiensis* untuk mengendalikan jentik nyamuk *Anopheles* sp, *Aedes* dan *Culex* sp. Pengendalian vektor secara hayati menggunakan bioinsektisida berbahan aktif *Bacillus thuringiensis* H-14 tampaknya sangat memberikan harapan sebagai alternatif untuk insektisida kimiawi pada pengendalian penyakit-penyakit yang tertularkan oleh ingkungan. Untuk mengurangi efek yang kurang baik tersebut, dikembangkanlah larvasida alami. Salah satu larvasida alami yang dikembangkan adalah bakteri *B. thuringiensis* strain H-14 (*Bt* H-14). Bakteri ini mampu menghasilkan kristal endotoksin yang toksik terhadap jentik nyamuk. Kristal endotoksin ini diinisiasi oleh gen, yang lazim disebut gen *Cry* dan gen *Cyt*. Gen *Cry* yang terdapat dalam *B. thuringiensis israelensis* produk luar adalah Gen *Cry* 4Aa, 4Ba, 11Aa, *Cyt* 1Aa. Salah satu cara deteksi adanya keberadaan sekuens gen *Cry* dan *Cyt* tersebut pada bakteri adalah menggunakan analisis molekuler. Karena itu dalam penelitian ini akan mendeteksi dan mengidentifikasi gen *Cry* berapa yang diperoleh *B. thuringiensis* H-14 galur lokal. Tujuan penelitian adalah 1). mendeteksi ada tidaknya gen *Cry* 4Aa, 4Ba, 11 dan *Cyt* 1Aa pada isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal 2). Menentukan toksisitas *B. thuringiensis* H-14 galur lokal terhadap jentik *Anopheles maculatus*. Jenis penelitian adalah penelitian intervensi dengan

rancangan eksperimental murni (*true experiment*) untuk penelitian laboratorium dan eksperimental semu (penelitian lapangan). Lokasi penelitian di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) Salatiga, dan di Kabupaten Kulon Progo, DIY. Bentuk keluaran penelitian ini adalah diperoleh gen *Cry B. thuringiensis* H-14 galur lokal yang efektif dan potensial untuk membunuh jentik nyamuk vektor. Dengan analisis molekuler tersebut kita dapat mengetahui potensi bakteri tersebut untuk dikembangkan menjadi salah satu alternatif larvasida alamami.. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal mengandung keempat macam gen yaitu *Cry* 4Aa, 4Ba, 1I dan *Cyt* 1Aa pada isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal. Setelah dilakukan uji toksitas di laboratorium, isolat ini membunuh jentik *Anopheles maculatus* dari laboratorium pada konsentrasi 25,62 ppm (LC90) dan membunuh jentik *An. maculatus* dari lapangan pada konsentrasi 28,81 ppm (LC90). Penebaran dilapangan menunjukkan dengan konsetrasi 300 ppm, isolat ini mampu membunuh jentik > 80% pada pengamatan hari ke 5. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dan digunakan bagi pengelola program sebagai bahan pertimbangan dalam manajemen penggunaan larvasida mikroba *B. thuringiensis* serotipe 14 (H-14) galur lokal sebagai tindakan alternatif terhadap pengurangan dan selektivitas penggunaan insektisida kimia dan dapat digunakan sebagai agen pengendali hayati

## ABSTRAK

Pengendalian biologi vektor malaria dapat dilakukan menggunakan *Bacillus thuringiensis* H-14. Bakteri ini mematikan larva nyamuk dengan menghasilkan kristal toksin ( $\delta$ -endotoksin) yang menjadi aktif pada kondisi basa di dalam perut larva. Gen yang mengkode kristal protein yang dhasilkan oleh bakteri adalah gen *Cry*. Gen lain yang terdapat dalam *B. thuringiensis* dan memiliki aktifitas sitotik disebut gen *Cyt*. Gen *Cry* dan Gen *Cyt* *B. thuringiensis israelensis* produk luar adalah gen *Cry* 4Aa, 4Ba, 11Aa dan *Cyt* 1Aa. Berdasarkan permasalahan tersebut, maka dilakukan penelitian untuk mendeteksi gen *Cry* kultur *B. thuringiensis* H-14 galur lokal sehingga dapat ditentukan dan diklasifikasi gen *Cry* mana bakteri tersebut. Penelitian secara molekuler dilakukan di laboratorium B2P2VRP Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal mengandung keempat macam gen dan setelah dilakukan uji toksitas di laboratorium, isolat ini membunuh jentik *Anopheles maculatus* dari laboratorium berturut-turut pada konsentrasi 25,62 ppm (LC90) dan membunuh jentik *An. maculatus* dari lapangan dengan konsentrasi 28,81 ppm (LC90). Penebaran dilapangan menunjukkan dengan konsentrasi 300 ppm, isolat ini mampu membunuh jentik  $> 80\%$  pada pengamatan hari ke 5, dengan konsentrasi 300 ppm. *Bacillus thuringiensis* H-14 dapat digunakan sebagai agen pengendali hayati. dan penelitian lapangan dilakukan di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo.

Kata kunci : *Bacillus thuringiensis* H-14, deteksi, gen *cry*, gen *cyt*

## DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL PENELITIAN .....	i
SUSUNAN TIM PENELITI .....	ii
SURAT KEPUTUSAN PENELITIAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	v
RINGKASAN EKSEKUTIF .....	v
ABSTRAK.....	vii.
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR GRAFIK.....	xi
DAFTAR DIAGRAM.....	xii
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA .....	2
3. TUJUAN DAN MANFAAT.....	4
4 HIPOTESIS.....	4
3. TUJUAN DAN MANFAAT.....	4
4 HIPOTESIS.....	4
5. METODE.....	4
6 HASIL.....	11
7 PEMBAHASAN.....	19
8. KESIMPULAN DAN SARAN.....	21
9 UCAPAN TERIMA KASIH.....	22
10. DAFTAR KEPUSTAKAAN.....	22
LAMPIRAN	

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Uji efikasi <i>B. thuringiensis</i> H-14 galur lokal formulasi cair terhadap jentik <i>An. maculatus</i> instar III akhir.....	14
Tabel 2. Kepadatan jentik <i>An. maculatus</i> sebelum dan sesudah aplikasi formulasi cair <i>B. thuringiensis</i> H-14 galur lokal konsentrasi 30 ppm (1 x LC92) di kobakan Desa Hargowilis,Kecamatan .Kokap, Kabupaten Kulon Progo.....	15
Tabel 3. Kepadatan jentik <i>An. maculatus</i> sebelum dan sesudah aplikasi formulasi cair <i>B. thuringiensis</i> H-14 galur lokal konsentrasi 300 ppm (10 x LC92) di kobakan Desa Hargowilis,Kecamatan .Kokap, Kabupaten Kulon Progo.....	17
Tabel 4. Kepadatan jentik <i>An. maculatus</i> sebelum dan sesudah aplikasi formulasi cair <i>B. thuringiensis</i> H-14 galur lokal konsentrasi 3000 ppm (100 x LC92) di kobakan Desa Hargowilis,Kecamatan .Kokap,Kabupaten Kulon Progo.....	18

## **DAFTAR GAMBAR**

Gambar 1a.. Hasil amplifikasi DNA gen <i>cry</i> 4 Asp dan 4BSpe .....	11
Gambar 1b. Hasil amplifikasi DNA gen <i>cry</i> 11gral dan cyt1gral .....	12
Gambar 1c. Kobakan (habitat perkembangbiakan jentik <i>An.maculatus</i> di antara batu, Kokap, Kabupaten Kulon Progo.....	13
Gambar 1 d.. Kobakan (habitat perkembangbiakan jentik <i>An.maculatus</i> di sungai Kokap, Kabupaten Kulon Progo.....	14

## **DAFTAR GRAFIK**

Grafik 1. Jumlah jentik <i>An. maculatus</i> yang tertangkap di Desa Hargowilis,Kecamatan Kokap ,Kabupaten Kulon Progo .....	13
Grafik 2.Persen penurunan kepadatan.jentik <i>An. maculatus</i> setelah diaplikasi formulasi cair <i>Bt H-14</i> galur lokal konsentrasi 30ppm di kobakan Desa Hargowilis, Kabupaten Kulon Progo.....	16
Grafik 3.Persen penurunan kepadatan.jentik <i>An. maculatus</i> setelah diaplikasi formulasi cair <i>Bt H-14</i> galur lokal konsentrasi 30oppm di kobakan Desa Hargowilis, Kabupaten Kulon Progo.....	17
Grafik 4.Persen penurunan kepadatan.jentik <i>An. maculatus</i> setelah diaplikasi forinulasi cair <i>Bt H-14</i> galur lokal konsentrasi 3000 ppm di kobakan Desa Hargowilis, Kabupaten Kulon Progo.....	18.

## **DAFTAR DIAGRAM**

Diagram 1. Nyamuk *An. maculatus* yang tertangkap Di Desa Hargowilis, Kecamatan Kokap,Kabupaten Kulon Progo, Juni –Juli 2012.....12

## 1. PENDAULUAN

Vektor nyamuk dikenal berperan penting dalam penularan berbagai macam penyakit di Indonesia, antara lain demam berdarah dengue, malaria, dan filariasis. Beberapa genus nyamuk yang memiliki peranan tersebut antara lain adalah *Aedes*, *Anopheles*, dan *Culex*. Pengendalian terhadap penyebaran penyakit tersebut telah dilakukan melalui berbagai cara, di antaranya secara biologis, yaitu dengan memanfaatkan *Bacillus thuringiensis* H-14. Pada tahun 1978, WHO telah merekomendasikan penggunaan endotoksin *B. thuringiensis* untuk mengendalikan larva nyamuk *Anopheles* sp, *Aedes* dan *Culex* sp. Sedangkan pada tahun 1991, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) Salatiga telah melakukan eksplorasi *B. thuringiensis* dari berbagai habitat tanah termasuk tanah yang berada di lokasi endemik malaria. Hasil uji serologi menunjukkan bahwa salah satu isolat yang diperoleh merupakan isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal yang menghasilkan endotoksin<sup>1</sup>. Hasil seleksi toksisitas isolat yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat tersebut sangat toksik terhadap nyamuk *Anopheles* sp, *Aedes aegypti* dan *Culex* sp.

Sebagai biolarvasida, bakteri ini mematikan larva nyamuk dengan menghasilkan kristal toksin ( $\delta$ -endotoksin) yang menjadi aktif pada kondisi basa di dalam perut larva. Toksin ini menyebabkan terbentuknya pori-pori (lubang yang sangat kecil) di sel membran di saluran pencernaan dan mengganggu keseimbangan osmotik dari sel-sel tersebut. Karena keseimbangan osmotik terganggu, sel menjadi bengkak dan pecah yang menyebabkan matinya serangga. Sifat toksisitasnya sangat spesifik, masing-masing subspecies memiliki target spesifiknya masing-masing. *Bacillus thuringiensis* H-14 diketahui toksik terhadap nyamuk dan lalat. Selain itu bakteri ini memiliki daya bunuh tinggi dan tidak berbahaya bagi lingkungan<sup>2,3,4</sup>.

Gen yang mengkode kristal protein yang dhasilkan oleh bakteri ini dikenal dengan sebutan gen *Cry* yang berasal dari kata Crystal. Gen lain yang terdapat dalam *B. thuringiensis* dan memiliki aktifitas sitolitik disebut gen *Cyt*, yang ini berasal dari kata cytolitic. Gen ini mengkode non spesifik sitolitik factor. Kristal endotoksin *B. thuringiensis* dikelompokkan menjadi delapan kelas utama, yaitu *CryIA* sampai *CryX* berdasarkan homologi sekuen asam amino di N-terminalnya, berat molekulnya, dan aktivitas insektisidalnya. Keberadaan gen tersebut pada bakteri *B. thuringiensis* digunakan dalam

penanamanan bakteri tersebut. Gen *Cry* dan Gen *Cyt* *B. thuringiensis israelensis* produk luar adalah gen *Cry* 4Aa, 4Ba, 11Aa dan *Cyt* 1Aa.

Berdasarkan hal-hal yang diperoleh, maka dianggap perlu untuk dilakukan deteksi gen *Cry* kultur *B. thuringiensis* H-14 galur lokal sehingga dapat diketahui, gen *Cry* yang dimiliki oleh bakteri ini dapat diklasifikasikan pada kelas yang mana.

Penelitian dilakukan secara biomolekuler dengan mengisolasi DNA isolat *B. thuringiensis* H-14 dan mendeteksi keberadaan gen *Cry* dan *Cyt* dengan primer spesifik khusus untuk gen *Cry* dan *Cyt* akan dilihat band-nya dengan metode elektroforesis.

Berdasarkan uraian di atas diajukanlah permasalahan yang perlu dijawab adalah: apakah gen *Cry* dan *Cyt* *B. thuringiensis* H-14 galur lokal dapat terdeteksi dan teridentifikasi dan toksik terhadap jentik *An. maculatus*?

## 2.TINJAUAN PUSTAKA

*Bacillus thuringiensis* adalah bakteri berbentuk batang, hidup secara aerobik, bersifat gram positif, dapat bergerak karena terdapatnya flagelum, serta menghasilkan spora dan kristal protein<sup>5</sup>.

*Bacillus thuringiensis* bersifat kosmopolitan antara lain dapat diisolasi dari tanah misalnya tanah yang berada di bawah pohon, cabang dan lubang pohonyang sudah tua umurnya, tanah yang berbecek, tempat perindukan larva nyamuk maupun larva yang sakit<sup>6,7</sup>.

Salah satu karakteristik *b. thuringiensis* adalah dapat memproduksi kristal protein toksin (delta endotoksin) di dalam sel bersama-sama dengan spora pada waktu sel mengalami sporulasi<sup>8</sup>. Kristal toksin memegang peranan penting karena aktivitasnya sebagai insektisida.

Ditemukan galur lokal *B. thuringiensis* H-14 yang diisolasi dari habitat tanah di laboratorium Balai Penelitian Vektor dan Reservoir Penyakit, Salatiga<sup>9</sup>. Galur lokal tersebut dapat mengendalikan larva *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* dan *Anopheles aconitus* lebih besar dari 90 % selama 24 jam dan 48 jam pengujian.

Pengendalian vektor secara hayati menggunakan bioinsektisida yang dibentuk dari *B. thuringiensis* H-14 tampaknya sangat memberikan harapan sebagai alternatif untuk insektisida kimia pada pengendalian penyakit-penyakit yang tertular oleh nyamuk.

Bioinsektisida *B. thuringiensis israelensis* (H14) telah diproduksi secara komersial oleh beberapa negara dalam formula cair (liquid), bubuk (powder) dan granul yang terdaftar di komisi pestisida di Indonesia.

Dalam memenuhi akan bioinsektisida *B. thuringiensis* H-14 galur lokal agar tidak tergantung dari luarluar dan menghemat biaya, diproduksi formulasi cair, bubuk dan granul *B. thuringiensis* H-14 galur lokal menggunakan media standar TPB (*Tryptose Phosphate Broth*). Selain itu *B. thuringiensis* H-14 galur lokal dapat dikembangbiakan dalam media kelapa (air kelapa dan endospermnya), air rendaman kedelai dan air cucian beras yang relatif murah harganya<sup>10</sup>.

Kelebihan penggunaan larvisida mikroba *B. thuringiensis* H-14 karena daya racun yang tinggi terhadap larva nyamuk dan larva lalat hitam, ikan dan serangga air lainnya tidak terpengaruh<sup>11</sup>. bersifat spesifik target, tidak toksik terhadap lingkungan dan organisme bukan sasaran khususnya predator larva nyamuk dan vertebrata lain, juga aman bagi manusia<sup>12</sup>. Kekurangan dari larvasida ini adalah tidak berdaur ulang dan tidak stabil dalam penyimpanan<sup>13</sup> serta interval waktu yang dibutuhkan untuk penyemprotan hanya berkisar 1 minggu. Selain itu tidak dapat mengendalikan pupa serangga sasaran, karena bakteri tersebut hanya dimakan larva.

*Bacillus thuringiensis* H-14 galur lokal yang diperoleh kemungkinan mempunyai gen berbeda sehingga diperoleh daya racun yang lebih tinggi dan efektivitsnya juga lebih lama daripada yang berasal dari daerah subtropik.

Gen yang mengkode kristal protein yang dhasilkan oleh bakteri ini dikenal dengan sebutan gen *Cry* yang berasal dari kata Crystal. Gen lain yang terdapat dalam *B. thuringiensis* dan memiliki aktifitas sitolitik disebut gen *Cyt*, yang ini berasal dari kata cytolitic. Gen ini mengkode non spesifik sitolitik factor. Kristal endotoksin *B. thuringiensis* dikelompokkan menjadi delapan kelas utama, yaitu *Cry1A* sampai *CryX* berdasarkan homologi sekuen asam amino di N-terminalnya, berat molekulnya, dan aktivitas insektisidalnya. Keberadaan gen tersebut pada bakteri *B. thuringiensis* digunakan dalam penatanamaan bakteri tersebut. Gen *Cry* dan Gen *Cyt* *B. thuringiensis israelensis* produk luar adalah gen *Cry 4Aa, 4Ba, 11Aa* dan *Cyt 1Aa*.

Berdasarkan permasalahan tersebut, maka dianggap perlu untuk dilakukan deteksi gen *Cry* kultur *B. thuringiensis* H-14 galur lokal sehingga dapat diketahui, gen *Cry* yang dimiliki oleh bakteri ini dapat diklasifikasikan pada kelas yang mana.

Penelitian dilakukan secara biomolekuler dengan mengisolasi DNA isolat *B. thuringiensis* H-14 dan mendeteksi keberadaan gen *Cry* dan *Cyt* dengan primer spesifik khusus untuk gen *Cry* dan *Cyt* akan dilihat band-nya dengan metode elektroforesis.

### 3. TUJUAN dan MANFAAT

Tujuan umum :

- a. Mendeteksi ada tidaknya gen *Cry* 4Aa, 4Ba, 11 dan *Cyt* 1Aa pada isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal
- b. Menentukan toksitas gen *Cry* *B. thuringiensis* H-14 galur lokal yang diperoleh terhadap jentik *Anopheles maculatus*

Tujuan khusus :

- a. Menentukan variasi keberadaan gen *Cry* yang terdapat pada *B. thuringiensis* H-14 galur lokal
- b. Menentukan LC (*Lethal Concentration*) 50 % dan 90 % *B. thuringiensis* H-14 galur lokal yang telah ditentukan gen *Cry*nya terhadap jentik nyamuk *An. maculatus*

Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan di bidang pengendalian vektor.

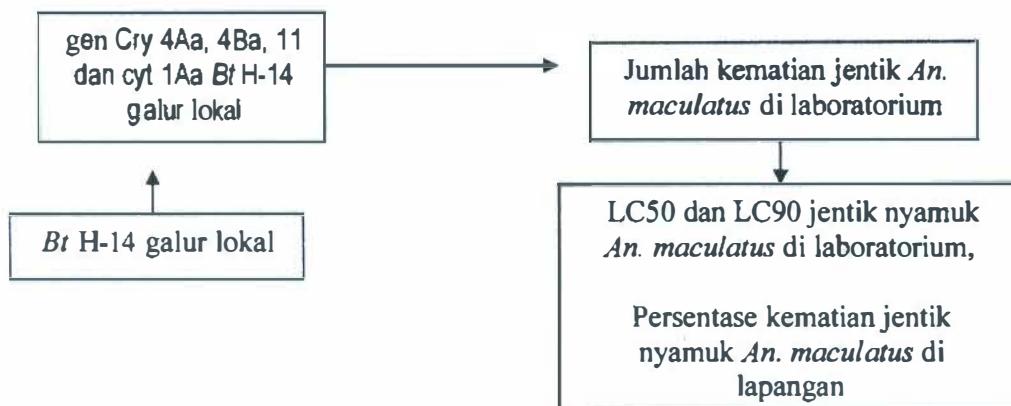
### 4. HPOTESIS

Gen *Cry* dan *Cyt* *B. thuringiensis* H-14 galur lokal dapat terdeteksi dan teridentifikasi serta toksik terhadap jentik *An. maculatus*

### 5. METODE

#### Kerangka Konsep

Dalam penelitian ini akan diidentifikasi gen *Cry* *B. turingiensis* H-14 galur lokal. Gen *Cry* dari *B.thurigiensis* H-14 galur lokal yang diperoleh akan diuji toksitasnya terhadap jentik *An. maculatus*, untuk memperoleh LC50 dan LC90. Kerangka konsep adalah sebagai berikut:



## **Tempat dan Waktu Penelitian**

Penangkapan dan pengambilan jentik dilakukan di Kelurahan Hargowilis, Kecamatan Kokap Kabupaten Kulon Progo. Deteksi gen Cry dan cyt serta uji toksisitas akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Biologi Molekuler Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP). pada bulan Februari – November 2012.

## **Jenis Penelitian dan Desain Penelitian**

Jenis penelitian adalah penelitian terapan dengan rancangan eksperimental murni (*true experiment*) bagi penelitian laboratorium karena semua variabel dapat dikendalikan. Sedangkan penelitian lapangan adalah kuasi eksperimental

## **Populasi**

*Bacillus thuringiensis* H-14 galur lokal

Semua jentik nyamuk *An. maculatus*, hasil pemeliharaan B2P2VRP.

## **Sampel**

*Bacillus thuringiensis* H-14 galur lokal yang telah ditentukan gen *Cry*nya

Sampel penelitian adalah jentik *An. maculatus* instar II akhir atau III awal.

Pengambilan sampel pada kelompok perlakuan dan kontrol dilakukan secara completely randomized sampling. Hal ini disebabkan percobaan bersifat homogen. Randomisasi dilakukan dengan menempatkan perlakuan secara random terhadap unit percobaan<sup>14</sup>.

## **Ulangan atau replikasi**

Banyaknya konsentrasi perlakuan dihitung secara RAK (Rancangan Acak Kelompok).

Banyaknya ulangan untuk uji toksisitas *B. thuringiensis* H-14 galur lokal yang telah ditentukan gen *Cry* dalam formulasi cair di laboratorium dihitung menurut rumus<sup>15</sup> sebagai berikut :

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$(9 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$r - \geq 2.8 \sim 3$$

Keterangan: t = jumlah perlakuan

r = jumlah ulangan

## **Estimasi Besar Sampel, Cara Pemilihan dan Penarikan Sampel**

1. Besar sampel yang diambil adalah Jentik *An. maculatus* instar II akhir atau III awal. Masing-masing ulangan dalam perlakuan diberikan sebanyak 25 jentik
2. Kriteria inklusi: jentik *An. maculatus* instar II akhir atau III awal.
3. Kriteria eksklusi: jentik *An. maculatus* instar II akhir atau III awal yang tidak sehat, hal ini ditunjukkan dengan pengamatan secara makroskopis warna jentik tidak kehitaman ataupun ada bercak kuning .

## **Variabel**

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah gen *Cry* isolat *Bacillus thuringiensis* H-14 galur lokal.

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kematian jentik *An. maculatus*

## **Instrumen dan Cara Pengumpulan Data**

Data yang diperoleh berupa hasil elektroforesis, menunjukkan hasil positif apabila terdapat pita DNA yang sejajar dengan control positif dan negative apabila tidak terdapat pita DNA yang sejajar dengan control positif. Data primer kematian jentik *An. maculatus*, yang meliputi LC50 dan LC90 diperoleh dari hasil uji laboratorium. Persen penurunan kepadatan jentik *An. maculatus* di lapangan.

## **Bahan dan Prosedur Kerja**

1. **Bahan dan alat untuk mengidentifikasi gen *Cry***

Bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah 2 isolat (isolat A dan B) *B. thuringiensis* H-14 galur lokal B2P2VRP, media TPB, aquades, spiritus, nuclei lysis solution, protein kinase, RNase solution, protein precipitation solution, isopropanol, etanol, DNA rehydration solution, Go Taq Green master mix, Primer CryIVa, CryIVB, CryIVD dan Cytla DNA template, agarose, TBE 10 X, aquabides, EtBr, parafilm, sarung tangan, spidol marker, micropipette tip 0,1 – 10  $\mu$ L, micropipette tip 10 – 100  $\mu$ L, micropipette tip 100 – 1000  $\mu$ L, plastic zipper, alumunium foil, whatman paper.

Alat yang digunakan meliputi tube 1,5  $\mu$ L, rak tube 1,5  $\mu$ L, rak tube PCR, beker glass 250 ml, gelas ukur 500 mL sentrifuge, inkubator, timbangan analitik, waterbath, hotplate, masker, thermometer, cetakan gel elektroforesis, bak rendaman untuk EtBr, elektroforesis, GelDoc, pipet tetes, dan mangkok plastic.

## 2. Prosedur Kerja

Pelaksanaan penelitian sebagai berikut:

### a. Aktivasi Isolat *Bacillus thuringiensis* H-14

Dua ose penuh kultur murni *B. thuringiensis* H-14 pada media NA berusia 48 jam diambil dan diinokulasikan pada 200 ml media TPB steril, kemudian diputar pada rotary shaker dengan kecepatan 175 rpm selama 48 jam.

### b. Isolasi DNA

Biakan murni *B. thuringiensis* H-14 galur lokal yang telah diaktivasi dengan volume 200  $\mu\text{L}$  disaring menggunakan whatman paper dengan ukuran pori 1  $\mu\text{m}$ . Whatman paper digunting kecil-kecil, lalu dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml, ditambahkan 300  $\mu\text{l}$  nuclei lysis solution 1,5  $\mu\text{l}$  protein kinase. Tube kemudian diputar dengan menggunakan vortex dan di-spinning down. Sampel di dalam tube diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 65°C. Setelah inkubasi berakhir, sampel ditambah RNAse solution, dihomogenkan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah itu sampel ditambah protein precipitation solution dan disimpan di suhu – 20°C selama 5 menit. Sampel lalu disentrifuge pada kecepatan 13000 g pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dipisahkan dan dimasukkan pada tube 1,5 ml yang baru. Isopropanol sebanyak 200  $\mu\text{l}$  ditambahkan pada tube tersebut secara perlahan melalui dinding tube. Tube disentrifuge pada 13000 g dengan suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang dengan menggunakan mikropipet. Pelet dicuci dengan isopropanol dingin sebanyak 200  $\mu\text{l}$ , lalu disentrifuge kembali pada 13000 g, 4°C selama 5 menit. Langkah pencucian ini diulang 3 kali. DNA hasil pencucian ini dikeringkan dan dilarutkan pada DNA rehydration solution sebanyak 50 $\mu\text{l}$ , lalu disimpan pada suhu 20°C.

### c. Pembuatan Agarose

Serbuk agarose ditimbang sebanyak 0,6 gram, lalu diletakkan di beker glass dan dicampurkan dengan TBE 1 % sebanyak 60 ml. *Magnetic stearer* dimasukkan ke dalam beker glass, selanjutnya diletakkan di atas hot plate, dididihkan hingga larutan bening. Larutan agarose yang telah bening kemudian diangkat dan dicetak di cetakan gel elektroforesis yang telah dipasang sisir. Larutan didinginkan dan didiamkan hingga mengeras.

d. Polimerase Chain Reaction (PCR)

DNA template yang dihasilkan pada proses isolasi DNA kemudian dimasukkan ke dalam tabung PCR yang telah dilabeli, lalu secara berturut-turut ditambahkan Go Tag Green Master Mix 12,5  $\mu$ l, primer F 10 M 1  $\mu$ l, primer R 10 M 1  $\mu$ l, nuclease free water 5,5  $\mu$ l. Urutan sekuen dari masing-masing primer yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. cyt 1Aa  
 5' CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT (d), pada 477 bp  
 5' TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT (r)
  2. Cry4aA  
 5' TCAAAGATCATTCAAAATTACATG (d) pada 459 bp
  3. Cry4Ba  
 5' CGTTTCAAGACCTATAATATAATACC (d), pada 321 bp  
 5' CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r)
  4. Cry11  
 5' CGCTTACAGGATGGATAGG (d), pada 342 bp  
 5' GCTGAAACGGCACGAATATAATA (r)

Sampel di-spinning down sebentar, kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR yang telah diset tahapannya sesuai gen Cry yang akan dideteksi. Tahapan PCR yang digunakan adalah sebagai berikut :

- Pre denaturation 95 °C selama 2 menit,
  - Denaturation 95 °C selama 1 menit
  - Anneling :
    1. Cyt 1Aa pada suhu 52 °C
    2. Cry4aA pada suhu 50 °C
    3. Cry4Ba pada suhu 50 °C
    4. Cry11Aa pada suhu 50 °C
  - Elongation 72 °C selama 1 menit
  - Extend 72 °C selama 5 menit
  - Dilakukan sebanyak 30 siklus

e. Elektroforesis

e. Elektroforesis

Sampel dikeluarkan dari mesin PCR. Secara berturut-turut DNA ladder, kontrol (+), kontrol (-), dan sampel sebanyak masing-masing 7  $\mu\text{l}$  disuntikkan pada sumuran yang tercetak pada gel. Gel dimasukkan pada mesin elektroforesis yang telah diset pada 120 volt selama 30 menit. Gel yang telah selesai dielektroforesis direndam pada larutan EtBr dengan konsentrasi 0,01 M selama 15 menit. Gel kemudian diletakkan di Gel Doc untuk dibaca hasilnya.

f. Uji toksitas gen Cry isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal formulasi cair terhadap jentik *An. maculatus* sebagai berikut:

Isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal yang memiliki satu macam atau lebih gen penyandi pembentukan kristal endotoksin tersebut, diencerkan menggunakan akuades kemudian diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam beaker glass yang berisi 99 ml akuades, dikocok sampai homogen kemudian larutan diambil 30  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 70  $\mu\text{l}$ , 90  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 300  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 700  $\mu\text{l}$  dan 900  $\mu\text{l}$  dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam mangkok plastik berisi 25 ekor jentik *An. maculatus* dengan volume total 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi 3, 5, 7, 9, 10, 30, 50, 70, dan 90 ppm. Sebagai kontrol, mangkok plastik hanya diisi dengan 100 ml akuades dan jentik.

Kematian jentik diamati selama 24 dan 48 jam setelah pengujian. Untuk mendapatkan nilai LC50 dan LC90 *B. thuringiensis* H-14 galur lokal dilakukan analisis Probit<sup>16</sup>.

g. Uji skala lapangan gen Cry isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal formulasi cair terhadap jentik *An. maculatus* sebagai berikut:

Dalam penelitian ini digunakan 3 konsentrasi *B. thuringiensis* H-14 galur lokal formulasi cair yang telah ditentukan gen Crynya. Adapun konsentrasi *B. thuringiensis* H-14 galur lokal yang digunakan adalah konsentrasi kematian jentik *An. maculatus* diantara kematian 90 % (LC90) sampai LC 95 % (LC 95) dari hasil uji efikasi jentik laboratorium dan lapangan yaitu pada konsentrasi 30 ppm (LC92). Uji efikasi *B. thuringiensis* H-14 galur lokal menggunakan 3 konsentrasi yaitu konsentrai 30 ppm, 300 ppm ( $10 \times 30$  ppm) dan 3000 ppm ( $100 \times 30$  ppm). Digunakan 18 kobakan perlakuan yaitu 6 kobakan perlakuan dengan luas  $0,35 \text{ m}^2 - 1,78 \text{ m}^2$  diaplikasi dengan konsentrasi 30 ppm formulasi cair *B. thuringiensis* H-14 galur lokal dan 1 kobakan kontrol dengan luas 0,26

$m^2$ . Enam kobakan berikutnya dengan luas antara  $0,42\ m^2 - 1,08\ m^2$  diaplikasi dengan konsentrasi 300 ppm formulasi cair *B. thuringiensis* H-14 galur lokal dengan 1 kobakan kontrol seluas  $0,35\ m^2$ . Sedangkan konsetrasi 3000 ppm formulasi cair *B. thuringiensis* H-14 galur lokal diaplikasikan pada 6 kobakan dengan luas  $0,13\ m^2 - 0,36\ m^2$  dan 1 kobakan kontrol dengan luas  $1,78m^2$ . Aplikasi formulasi cair *B. thuringiensis* H-14 galur lokal dengan cara disemprot menggunakan alat semprot (*Hand sprayer*) kecil yang terbuat dari plastik berukuran 1 liter. Kondisi lingkungan seperti pH dan suhu air diukur baik sebelum, selama maupun sesudah aplikasi formulasi cair *B. thuringiensis* H-14 galur lokal. Pengamatan kepadatan populasi jentik dilakukan dengan pencidukan secara acak menggunakan dipper volume 100 ml. Pengamatan dilakukan sebelum aplikasi, 1,2,4,7 dan 14 hari sesudah aplikasi (dihentikan sampai kepadatan populasi jentik naik kembali seperti semula) yaitu kepadatan populasi sampai mencapai lebih besar dari 70 %. Padat populasi dihitung dalam satuan per 10 ciduk. Semua jentik *An. maculatus* dihitung jumlahnya untuk menentukan kepadatan populasinya. Untuk mengetahui efektivitas enkapsulasi granul *B. thuringiensis* H-14 galur lokal terhadap jentik *An. maculatus*, persentase reduksi dihitung dengan menggunakan formula Mulla dkk<sup>17</sup>.

- h. Bahan dan alat penangkapan nyamuk dan jentik seperti aspirator, dipper, tray, kandang, kain kasa dll.

#### Penangkapan nyamuk dan pengambilan jentik

1. Survei dilakukan dengan melakukan penangkapan nyamuk yang istirahat di luar rumah (habitat asli) pada pagi hari (06.00 – 08.00) dan malam hari di luar rumah (kandang dan sekitarnya) pada jam 18.00 – 24.00. Untuk menangkap nyamuk digunakan aspirator dengan bantuan lampu senter oleh 6 orang. Nyamuk yang tertangkap dimasukan ke dalam paper cup untuk dipelihara sampai menjadi jentik di laboratorium insektarium.
2. Pengambilan jentik dilakukan di tempat-tempat genangan air yang diduga dapat digunakan sebagai tempat perindukan potensial bagi *An. maculatus* misalnya tempat-tempat yang berupa kobakan (cekungan air). Pengambilan jentik dapat menggunakan ciduk berukuran 100 ml, 250 ml dan 350 ml. Jentik yang tertangkap dipindahkan ke botol vial dengan menggunakan pipet untuk kemudian dipelihara di laboratorium insektarium.

## Manajemen dan Analisa Data

Data hasil pembacaan Gel Doc yang positif dinyatakan sebagai isolat positif gen *Cry*.

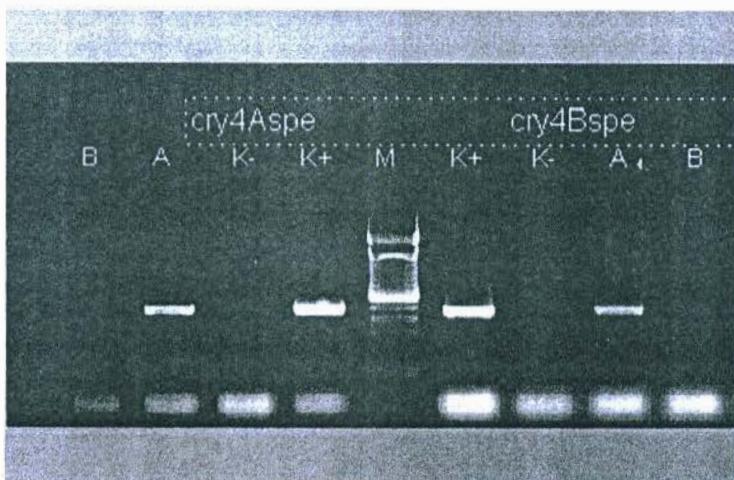
### Definisi Operasional

1. *Bacillus thuringiensis* H-14 Isolat *B. thuringiensis israelensis* (H-14) dengan bentuk protein paraspora tidak beraturan dari hasil isolasi tanah dan jentik sakit/mati.
2. Gen *Cry* adalah gen penyandi produksi kristal endotoksin *B. thuringiensis* H-14 galur lokal
3. Gen *Cyt* adalah gen penyandi produksi faktor lisis *B. thuringiensis* H-14 galur lokal
4. LC 50 adalah konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh 50 persen dari serangga uji
5. LC 90 adalah konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh 90 persen dari serangga uji

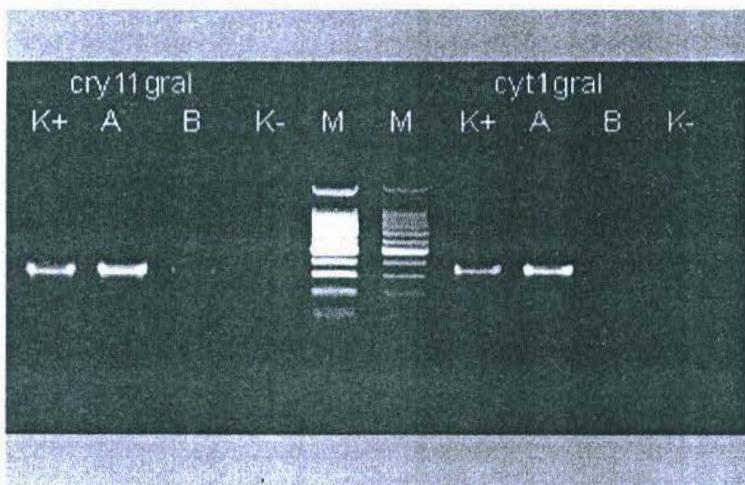
## 6. HASIL

### a. Deteksi Gen *cry* dengan teknik PCR

Hasil amplifikasi DNA menggunakan empat primer : Cyt Igral, cry 4Aspe, cry 4Bspe, cry 11gral menunjukkan pada kedua isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal yang telah diuji secara serologis menunjukkan hasil yang positif pada amplifikasi DNA menggunakan primer cry 4Bspe, cry 4Aspe, cry 11gral. Hasil positif pada amplifikasi DNA menggunakan primer Cyt Igral hanya terdapat pada isolat A.



Gambar 1a. Hasil amplifikasi DNA gen *cry* 4Aspe dan 4BSpe



Gambar 1b. Hasil amplifikasi DNA gen cry cry 11g1 dan cyt1g1

#### b. Penangkapan nyamuk dan pengambilan jentik

##### 1. Fauna nyamuk dan jentik *Anopheles maculatus* di daerah penelitian

Nyamuk *Anopheles* yang berhasil ditangkap di Desa Hargowilis, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo sebanyak 628 ekor, terdiri dari *An. maculatus* sebanyak 224 ekor ( 26,29 %) dan nyamuk *Anopheles* spesies lain sebanyak 404 ekor (71,86 %)(Diagram 1).

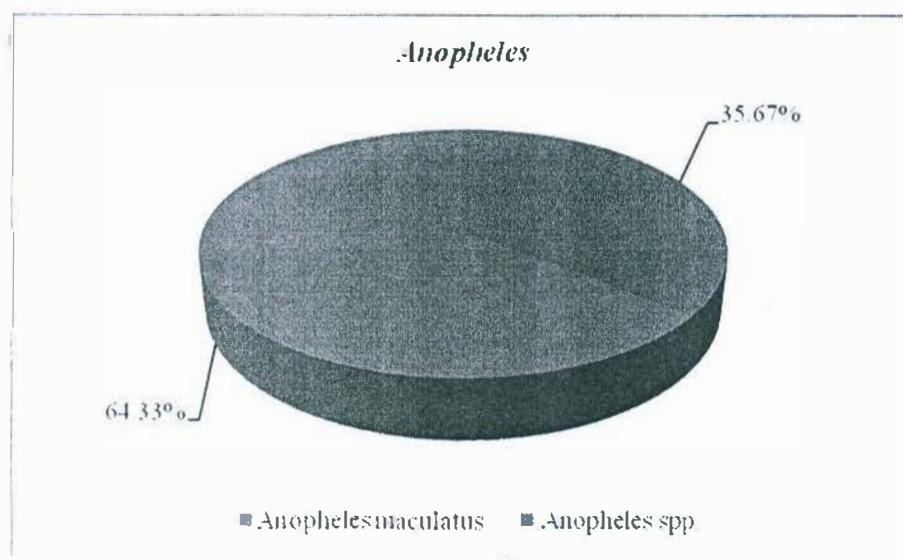
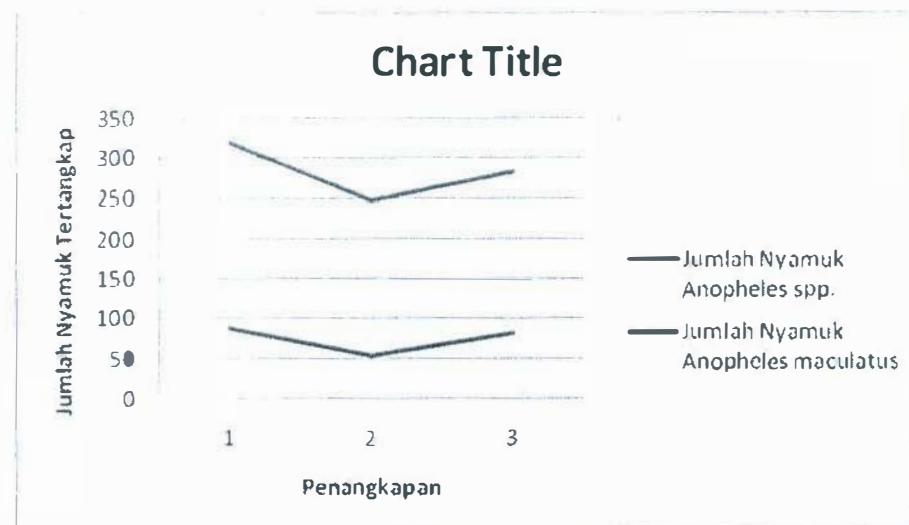


Diagram 1. Nyamuk *An. maculatus* yang tertangkap di Desa Hargowilis, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Juni - Juli 2012

Jumlah jentik yang tertangkap sebanyak 628 ekor selama 3 kali penangkapan dari Bulan Juni – Juli 2012 disajikan pada Grafik 1, .

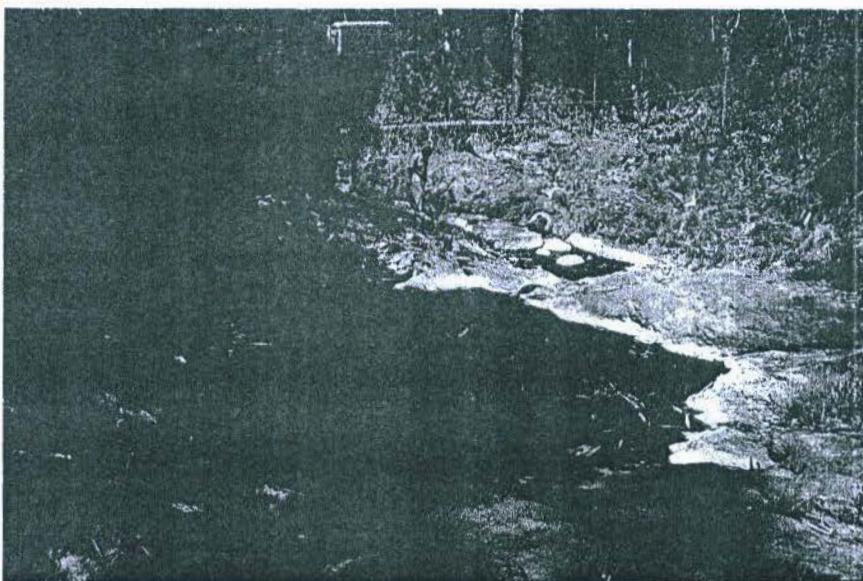


Grafik 1. Jentik *An. maculatus* yang tertangkap di Desa Hargowilis, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Juni – Juli 2012

Tempat perindukan jentik *An. maculatus* di Desa Hargowilis, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo disajikan pada Gambar 1.a dan 1.b.



Gambar 1.c. Kobakan yang berada di antara batu



Gambar 1.d. Kobakan yang berada di sungai

**2. Uji efikasi *B. thuringiensis* H-14 galur lokal (A) formulasi cair terhadap jentik nyamuk dari laboratorium dan lapangan**

Hasil uji efikasi *B. thuringiensis* H-14 galur lokal formulasi cair yang telah ditentukan gen *Cry*nya (isolat A) terhadap jentik *An. maculatus* instar III akhir dari laboratorium dan dari lapangan disajikan pada Tabel 1.

Hasil efikasi *B. thuringiensis* H-14 galur lokal (A) formulasi cair selama 24 jam pengujian, menunjukkan bahwa konsentrasi sebesar 12,50 ppm dan 25,62 ppm mampu mematikan jentik *An. maculatus* berturut-turut sebesar 50 % dan 90 %. Hasil pengukuran kondisi laboratorium seperti pH air = 7, suhu air = 23° C - 25° C, suhu udara = 20° C - 24° C dan kelembaban nisbi udara dalam ruangan = 69 – 89 %

Tabel 1.Uji efikasi *B. thuringiensis* H-14 galur lokal formulasi cair terhadap jentik *An. maculatus* instar III akhir

Jentik Nyamuk <i>An Maculatus</i>	Kematian 50% dan 90% jentik setelah 24 jam pengujian	
	LC 50 (ppm)	LC 90 (ppm)
Laboratorium	12,50	25,62
Lapangan	17,52	28,81

**3. Uji efikasi *B. thuringiensis* H-14 galur lokal di lapangan**

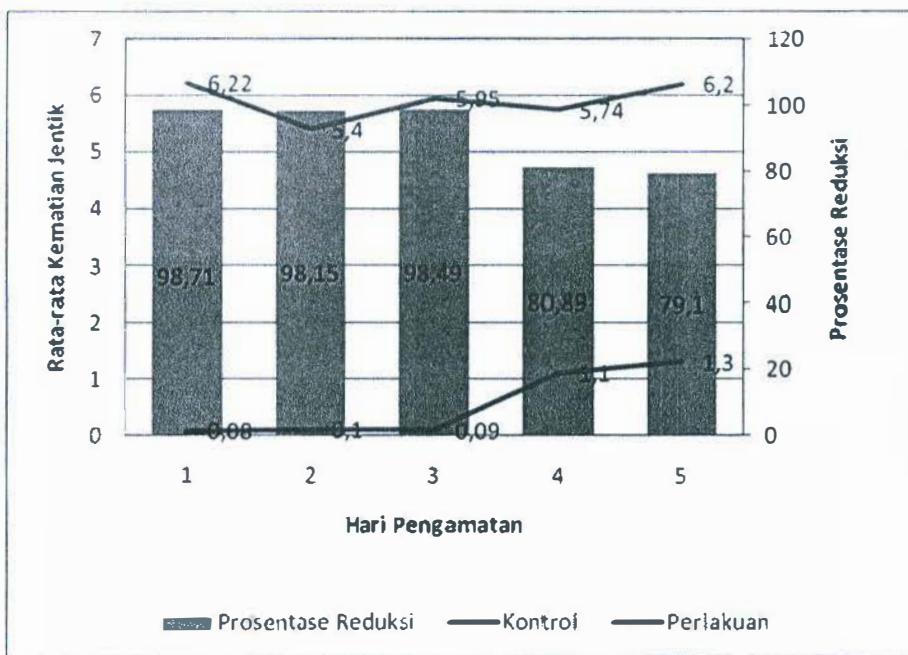
**a. Uji efikasi formulasi cair *B. thuringiensis* H-14 galur lokal konsentrasi 30 ppm**

Pengamatan kepadatan jentik *An. maculatus* yang dilakukan dengan pencidukan secara acak di tempat-tempat yang ditemukan adanya jentik pada sampel kobakan 1-6

sebelum aplikasi dan 5 hari sesudah aplikasi formulasi cair *B. thuringiensis* H-14 galur lokal (isolat A) konsetrasi 30 ppm (LC92) disajikan pada Tabel 2. Pengamatan sebelum aplikasi, menunjukkan bahwa rata-rata kepadatan jentik *An.maculatus* pada kolam kontrol sebesar 6,04 ekor/ciduk dan pada kolam perlakuan 6,06 ekor/ciduk. Luas kobakan kontrol berkisar  $0,26 \text{ m}^2$  dan perlakuan ( $0,35 - 1,78 \text{ m}^2$ )(Tabel 2 dan Grafik 2). Efektivitas *B. thuringiensis* H-14 galur lokal formulasi cair terhadap jentik *An. maculatus*, persen reduksi dihitung menurut rumus Mulla<sup>8</sup>, > 70 % selama 5 hari yaitu pada hari ke 1 (98,71 %), hari ke 2 (98,15 %), hari ke 3 98,49 %, hari ke 4 dan ke 5 berturut-turut 80,89 % dan 79,10 %. Hasil pengukuran kondisi lapangan seperti pH air = 7, suhu air =  $25^\circ \text{ C} - 28^\circ \text{ C}$ , dan kelembaban nisbi udara (RH) berkisar 49 – 81,5 % (Tabel 2)

Tabel 2. Kepadatan jentik *An. maculatus* sebelum dan sesudah aplikasi formulasi cair *Bt* H-14 galur lokal konsentrasi 30 ppm (1 x LC92) di kobakan Desa Hargowilis, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo

Pengamatan (Hari)	Rata-rata kepadatan jentik <i>An maculatus</i> (3-10 dip/ciduk)		Penurunan (%)
	Kontol	Perlakuan	
Sebelum aplikasi <i>Bt</i> H-14	6,04	6,06	
Setelah aplikasi <i>Bt</i> H-14			
1	6,22	0,08	99,71
2	5,40	0,10	98,15
3	5,95	0,09	98,49
4	5,74	1,10	80,89
5	6,20	1,30	79,10



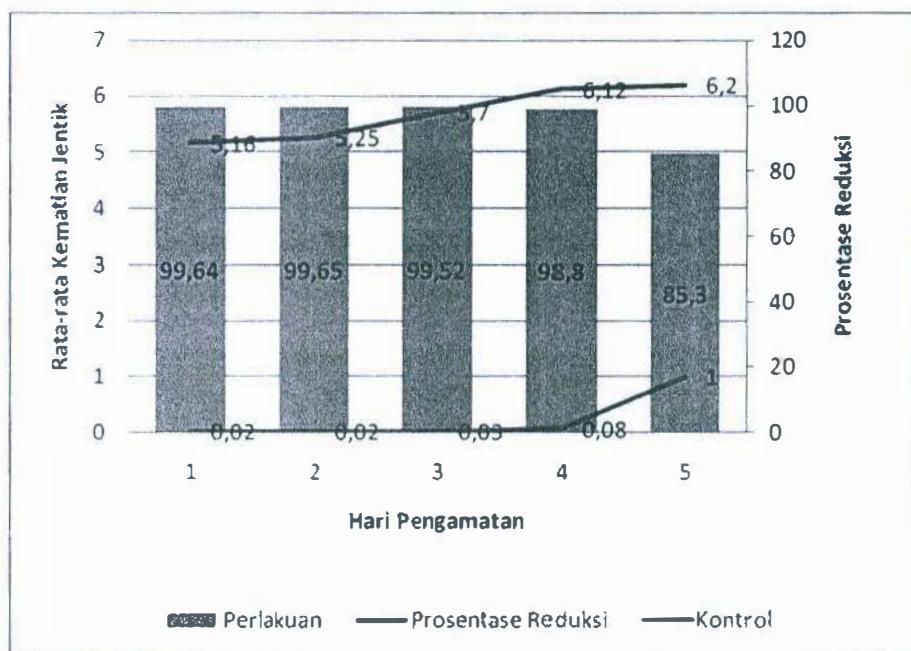
Grafik 2. Persen penurunan kepadatan jentik *An. maculatus* setelah diaplikasi formulasi cair *Bt* H-14 galur lokal konsentrasi 30 ppm dikobakan Desa Hargowilis, Kabupaten Kulon Progo

**b. Uji efikasi formulasi cair *B. thuringiensis* H-14 galur lokal konsentrasi 300 ppm**

Pengamatan kepadatan jentik *An. maculatus* yang dilakukan dengan pencidukan secara acak di tempat-tempat yang ditemukan adanya jentik pada sampel kobakan 1-6 sebelum aplikasi dan 5 hari sesudah aplikasi formulasi cair *B. thuringiensis* H-14 galur lokal (A) dosis 300 ppm (LC99) disajikan pada Tabel 3. Pengamatan sebelum aplikasi, menunjukkan bahwa rata-rata kepadatan jentik *An. maculatus* pada kolam kontrol sebesar 6,30 ekor/ciduk dan pada kolam perlakuan 5,74 ekor/ciduk. Luas kobakan kontrol ( $0,35 \text{ m}^2$ ) dan perlakuan ( $0,42 - 1,08 \text{ m}^2$ ) (Tabel 3 dan Grafik 3). Efektivitas *B. thuringiensis* H-14 galur lokal (A) formulasi cair terhadap jentik *An. maculatus*, persen reduksi dihitung menurut rumus Mulla<sup>8</sup>,  $> 70\%$  selama 5 hari yaitu pada hari ke 1 (99,64 %) dan hari 2 (99,65 %), hari ke 3, hari ke 4 dan ke 5 berturut-turut sebesar 99,52 , 98,80 % dan 85,30 %. Hasil pengukuran kondisi lapangan seperti pH air = 7, suhu air =  $25^\circ\text{C} - 26^\circ\text{C}$ , dan kelembaban nisbi udara (RH) berkisar  $52 - 26\%$  (Tabel 3)

Tabel 3. Kepadatan jentik *An. maculatus* sebelum dan sesudah aplikasi *Bt H-14* galur lokal konsentrasi 300 ppm ( $10 \times$  LC92ppm) di kobakan Desa Hargowilis, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo

Pengamatan (Hari)	Rata-rata kepadatan jentik <i>An. Maculatus</i> (3-10 dip/ciduk)		Penurunan (%)
	Kontol	Perlakuan	
Sebelum aplikasi <i>Bt H-14</i>	5,74	6.30	
Setelah aplikasi <i>Bt H-14</i>			
1	5,16	0,02	99,64
2	5,25	0,02	99,65
3	5,70	0,03	99,52
4	6,12	0,08	98,80
5	6,20	1,00	85,30



Grafik 3. Persen penurunan kepadatan jentik *An. maculatus* setelah diaplikasi *Bt H-14* galur lokal konsentrasi 300 ppm dikobakan Desa Hargowilis, Kabupaten Kulon Progo

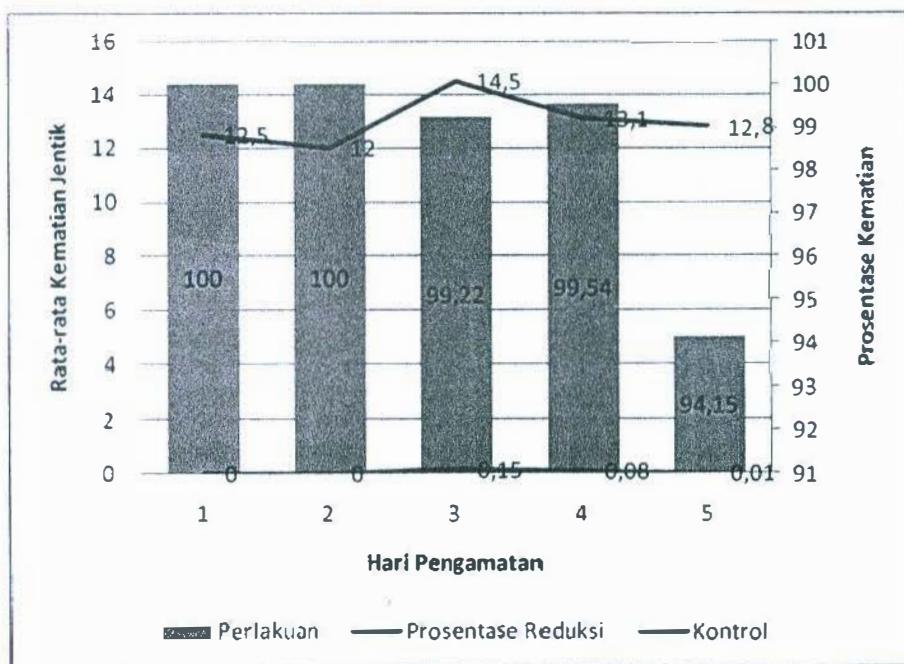
### c. Uji efikasi formulasi cair *B. thuringiensis* H-14 galur lokal konsentrasi 3000 ppm

Pengamatan kepadatan jentik *An. maculatus* yang dilakukan dengan pencidukan secara acak di tempat-tempat yang ditemukan adanya jentik pada sampel kobakan 1-6 sebelum aplikasi dan 5 hari sesudah aplikasi formulasi cair *B. thuringiensis* H-14 galur lokal (A) dosis 3000 ppm ( $1000 \times$ LC92) disajikan pada Tabel 4. Pengamatan sebelum aplikasi, menunjukkan bahwa kepadatan jentik *An. maculatus* pada kolam kontrol sebesar 12,20 ekor/ciduk dan pada kolam perlakuan 16,30 ekor/ciduk. Luas kobakan kontrol

( $1,78 \text{ m}^2$ ) dan perlakuan ( $0,13 - 0,36 \text{ m}^2$ ) (Tabel 4 dan Grafik 4). Efektivitas *B. thuringiensis* H-14 galur lokal (A) formulasi cair terhadap jentik *An. maculatus*, persen reduksi dihitung menurut rumus Mulla<sup>8</sup>, > 70 % selama 5 hari yaitu pada hari ke 1 (100 %) dan hari 2 (100 %), hari ke 3, hari ke 4 dan ke 5 berturut-turut sebesar 99,22 %, 98,80 % dan 85,30 %. Hasil pengukuran kondisi lapangan seperti pH air = 7, suhu air =  $25^\circ\text{C}$  -  $27^\circ\text{C}$ , dan kelembaban nisbi udara (RH) berkisar 53% – 86 % (Tabel 4)

Tabel 4. Kepadatan jentik *An. maculatus* sebelum dan sesudah aplikasi enkapsulasi *Bt* H-14 galur lokal konsentrasi 3000 ppm (100 x LC92) di kobakan Desa Hargowilis, Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo

Pengamatan (Hari)	Rata-rata kepadatan jentik <i>An. maculatus</i> (3-10 dip/ciduk)		Penurunan (%)
	Kontol	Perlakuan	
Sebelum aplikasi <i>Bt</i> H-14	12,20	16,30	
Setelah aplikasi <i>Bt</i> H-14			
1	12,50	0,0	100
2	12,00	0,0	100
3	14,50	0,15	99,22
4	13,10	0,08	99,54
5	12,80	0,01	94,15



Grafik 4. Persen penurunan kepadatan jentik *An. maculatus* setelah diaplikasi *Bt* H-14 galur lokal (A) konsentrasi 3000 ppm dikobakan Desa Hargowilis, Kabupaten Kulon Progo

## 7. PEMBAHASAN

Peneitian ini menggunakan 4 macam primer (*Cyt 1Aa, cry 4Aspe, cry 4Bspe, cry 11gral*) untuk mengidentifikasi apakah isolat yang diuji merupakan *B. thuringiensis* subspecies *israelensis*. WHO menyatakan salah satu cara untuk mengidentifikasi bakteri *B. thuringiensis* H-14 adalah dengan mengidentifikasi kandungan 4 macam kristal protein yang disandi dari gen *Cyt 1Aa, cry 4Aspe, cry 4Bspe* dan *cry 11gral*. Dua isolat (A dan B) yang didetksi gen *Cry*nya, hanya isolat A mengandung gen *Cyt 1Aa, cry 4Aspe, cry 4Bspe* dan *cry 11gral* sedangkan isolat B mengandung gen *Cyt 1Aa, cry 4Aspe* dan *cry 11gral*. Keempat gen yang muncul pada isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal (isolat A) menunjukkan bahwa isolat tersebut mempunyai gen yang sama dengan *B. thuringiensis* subspecies *israelensis* (H-14) produk luar. Isolat A (formulasi cair *B. thuringiensis* H-14 galur lokal) yang telah ditentukan gen *cry* dilakukan uji toksitasnya terhadap jentik *An. maculatus* hasil kolonisasi laboratorium dan lapangan. Bakteri ini mampu membunuh 90 % - 100 % jentik *An. maculatus* di laboratorium maupun uji coba di lapangan. Hal ini dikarenakan Gen *cry 4* merupakan gen penyandi produksi kristal protein yang toksik terhadap serangga dari genus diptera. Hasil amplifikasi pada kedua isolat juga menunjukkan hasil yang bervariasi, pada isolat A band yang dihasilkan tampak tebal akan tetapi pada isolat B band yang dihasilkan tampak tipis. Kemungkinan ada variasi DNA pada masing masing isolat sehingga perlu dilakukan sequencing untuk melihat variasi dari kedua isolat tersebut. Jumlah nyamuk dan jentik *An. maculatus* yang tertangkap di Desa Hargowilis, Kecamatan Kokap sangat bervariasi. Bruce-Chwatt<sup>18</sup> mengatakan bahwa kepadatan populasi nyamuk *Anopheles* sangat dipengaruhi oleh perubahan suhu, kelembaban relatif dan curah hujan. Tampaknya faktor-faktor lingkungan juga berperan mendukung relatif tingginya kepadatan nyamuk dan jentik *An. maculatus*. Suhu udara dan kelembaban di dua daerah tersebut, tampaknya ideal untuk perkembangan jentik dan nyamuk *An. maculatus*. Perbedaan konsentrasi *B. thuringiensis* H-14 galur lokal fonnulasi cair untuk membunuh jentik *An. maculatus* dari laboratorium dengan dari lapangan dapat dilihat pada Tabel 1. Ada beberapa hal yang menyebabkan perbedaan tersebut yaitu faktor pada bakteri dan serangga uji. Faktor pada bakteri adalah struktur kristal yang terdapat pada isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal dapat berpengaruh pada efeksi bakteri tersebut. Struktur kristal dan spora yang berada dalam sel mempunyai ikatan yang lebih mudah dipecah oleh enzim yang dihasilkan serangga dan ukuran molekul protein yang menyusun kristal, serta susunan molekul asam amino dan kandungan karbohidrat dalam

kristal yang dapat mempengaruhi toksitas *B.thuringiensis* tersebut. Faktor yang ada pada serangga adalah perbedaan keadaan pada saluran pencernaan serangga uji seperti pH dalam mesenteron yang mempengaruhi kelarutan kristal protein. Selain itu kemampuan enzim protease yang ada dalam pencernaan serangga uji yang berfungsi untuk mengikat toksin berpengaruh pula terhadap kematian serangga. Reaksi daya bunuh atau patogenisitas di dalam usus tengah jentik tidak sama. Besar kcilnya konsentrasi yang diperoleh sangat bergantung pula pada hubungan antara kristal protein yang dihasilkan dengan jentik serangga sasaran. Hal ini didukung oleh Jaquet dalam Blondine<sup>19</sup> yang melaporkan bahwa tiga faktor yang menentukan potensi deltaendotoksin *B. thuringiensis* adalah **asal** toksin (galur *B. thuringiensis*), kemampuan cairan usus untuk melarutkan kristal protein serta kerentanan serangga sasaran terhadap toksin.

Keberadaan jumlah kristal protein toksin (delta endotoksin) di permukaan dan perilaku makan dari jentik itu sendiri juga berpengaruh dalam menentukan kematian jentik. Kemungkinan bahwa jumlah kristal protein toksin (delta endotoksin) sudah cepat mengendap ke bawah/dasar mangkok yang tidak sepenuhnya mencapai sasaran jentik *Anopheles* yang mempunyai kebiasaan mengambil makanan (termasuk toksin) di daerah permukaan (lebih kurang 1-2 mm). Faktor-faktor seperti instar larva, makanan, periode pempararan, kualitas air, galur bakteri, perbedaan kepekaan jentik nyamuk yang diuji, suhu air dan formulasi, khususnya tingkat sedimentasi/pengendapan, tersedianya toksin di daerah makan jentik dan kebiasaan makan jentik *Anopheles* mungkin dilaporkan sangat mempengaruhi efikasi formulasi *B. thuringiensis* H-14<sup>20</sup>.

Jumlah spora bakteri *B. thuringiensis* H-14 adalah sama banyak di permukaan dan dasar pada hari ke 3 dan ke 7 sesudah aplikasi<sup>21</sup>. Telah diketahui bahwa bakteri *B. thuringiensis* H-14 produk luar yang dikenal dengan nama *B. thuringiensis israelensis* telah diformulasi dalam bentuk cair, bubuk dan granula (Abbott Laboratories). Ketiga formulasi ini dibuat sesuai dengan perilaku makan jentik. Selain tingkat formulasi bakteri, faktor lain adalah tersedianya toksin (delta endotoksin) di daerah makan larva. Apabila tersedia kristal protein toksin cukup akan tetapi larva itu sendiri tidak mau makan maka tidak akan terjadi kematian larva. Kematian larva akan terjadi apabila kristal endotoksin tertelan oleh larva nyamuk yang akan terjadi paralisis usus diikuti kematian larva nyamuk<sup>22</sup>. Kristal protein toksin diproduksi di dalam sel *B. thuringiensis* H-14 bersama-sama spora pada waktu sel mengalami sporulasi<sup>22</sup>.

Kerentanan serangga sasaran terhadap toksin yang dihasilkan maupun kemampuan enzym protease yang berada di usus tengah jentik *Anopheles* dalam melarutkan kristal protein toksin menjadi toksik juga merupakan salah satu faktor dalam menentukan kematian jentik. Uji skala lapangan menggunakan 3 konsentrasi (30 ppm, 300 ppm dan 3000 ppm) *B. thuringiensis* H-14 galur lokal formulasi cair terhadap jentik *An. maculatus* sampai dengan hari ke 5 penebaran, kematian jentik *An. maculatus* masih di atas 70 %. Faktor lingkungan, kondisi alamiah air pembuangan dan penambahan air pada tempat tempat perindukan larva juga merupakan faktor yang dapat berpengaruh pada aktivitas larvasida *B. thuringiensis* H-14<sup>23</sup>. Selain itu beberapa faktor abiotik dapat mempengaruhi efikasi *B. thuringiensis* H-14 seperti temperatur, pH, sinar matahari, garam, polusi bahan organik dan kedalaman air<sup>24</sup>. Temperatur yang terlalu tinggi dapat mengurangi efikasi *B. thuringiensis* H-14. pH tidak ada pengaruh selama masih berada dalam kisaran pH normal. Sinar matahari dapat mempengaruhi aktivitas *B. thuringiensis* H-14. Garam (NaCl) hanya sedikit berpengaruh/pada efikasi *B. thuringiensis* H-14. Memerlukan konsentrasi yang lebih besar bagi lingkungan yang banyak bahan organik.tinggi air yang dalam mengurangi efikasi *B. thuringiensis* H-14.

Hasil pengukuran pH air, suhu air dan kelembaban udara merupakan faktor abiotik yang cukup baik untuk perkembangan jentik *Anopheles*<sup>25</sup>.

Dengan ditemukan gen Cry *B. thuringiensis* H-14 galur lokal yang sama dengan *B. thuringiensis israelensis* (H-14) produk luar maka *B. thuringiensis* H-14 galur lokal dapat dikembangkan penggunaannya sebagai agensia pengendali vektor.

## 8. KESIMPULAN dan SARAN

### Kesimpulan

Ditemukan gen *Cry* 4Aa, 4Ba, 11 dan *Cyt* 1Aa pada isolat *B. thuringiensis* H-14 galur lokal efektif membunuh jentik *An. maculatus* pada uji laboratorium dan dapat menurunkan kepadatan jentik nyamuk > 70 % sampai dengan hari ke 5.

### Saran

Untuk meningkatkan efektivitas *B. thuringiensis* H-14 galur lokal yang telah ditemukan gen *Cry*nya disarankan untuk membuat suatu teknik mikrokapsulasi yang tepat untuk pengendalian jentik nyamuk.

## **9. UCAPAN TERIMA KASIH**

Dengan selesainya penelitian ini kami mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit di Salatiga, Kepala Dina Kesehatan Kabupaten Semarang, Kabupaten Kulon Progo beserta stafnya yang telah memabantu pelakanaan penelitian ini. Ucapan terima kasih kami sampaikan juga kepada semua pihak yang telah aktif membantu pelakanaan penelitian ini.

## **10. DAFTAR KEPUSTAKAAN**

1. Blondine Ch. P, Widyastuti U, Widiarti, Sukarno & Subiantoro. Uji Serologi Isolat *Bacillus thuringiensis* dan Patogenisitasnya Terhadap Jentik Nyamuk Vektor. Buletin Control of Vectors of Disease. Sixth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. 1982. Penelitian Kesehatan. 1998/1999. 26 (2 &3): 91-98.
2. Schepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler & D. H. Dean. *Bacillus thuringiensis* and Its pesticidal Crystal protein. Microbiol. Molecular Biol. 1998. 62: 775-806.
3. Tomlin, C. D. S, Editor. A World Compendium: The Pesticide Manual, 11<sup>th</sup> Ed. British Crop Protection Council. Farnham. Surrey. UK. 1997.
4. WHO. Biological Cotrol of Vectors and Diseases. Sixth Report of the WHO Expert Committee on Vctor Biology and Control. 1982.
5. Jaquet, F., Hunter, R., dan Luthy, P., "Specificity of *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin", *Appl.Environ.Micro.*, 1987.53(3),500-504.
6. Blondine, Ch.P. dan Widyastuti, U., "Pencarian dan Isolasi Patogen serta Pengujian Potensinya Sebagai Pengendali Jentik Nyamuk", *Bull.Pen.Kes.*, 1994. 22(1), 18 –24.
7. Lee, H.L., "Isolation and Evaluation of Two Isolates of *Bacillus thuringiesnsis* for the Control of Mosquitoes of Public Health Importance in Malaysia", *Mosq.Born.Dis.Bull.*, 1988. 5(3-4), 39-47.
- 8.WHO, , "Data Sheet on the Biological Control Agent. *Bacillus thuringiensis* serotype H-14",1979. WHO/VBC/79.750. 1-13.
9. Blondine, Ch.P., Widyastuti, U., Widiarti., Sukarno., dan Subiantoro., "Uji Serologi Isolat *Bacillus thuringiensis* dan Patogenisitasnya Terhadap Jentik Nyamuk Vektor", *Bull. Pen. Kes.*,1999. 26 (2&3), 91-98.

10. Misfit Putrina dan Fardedi. Pemanfaatan Air kelapa dan Air Rendaman Kedelai Sebagai media perbanyak Bakteri *Bacillus thuringiensis* Barliner . Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia . 2007, 9 (1), 64-70.
11. Dit.Jen.PPM-PLP., , Buku 5 Malaria, “ *Tindakan Anti Larva*”, DepKes, Jakarta.1986
12. Mulla, M.S., Darwazeh,H.A., Davidson,E.W., dan Dulmage,H.T., ,”Efficacy and Persistence of the Microbial Agent *B. sphaericus* Against Mosquito Larvae in Organically Enriched Habitats”, *Mosq.News.*1984.,44, 166-173
13. WHO, “Informal Consultation of Bacterial Formulations for Cost-Effective Vector Control in Endemic Area”, WHO/VBC/89.979.1989.
14. Nasir,M. Metode Penelitian”, Ghalia Indonesia, Jakarta, 1983, 282 – 30511.
15. Ali Hanafiah, Kemas. Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi. Rajawali Press, Jakarta.1993.
16. Finney,D.J.,”Probit Analysis”, 3 rd,ed.,Cambridge Univ.Press.London. 1971.
17. Mulla, M.S, Norland R.L, Fanara D M, Darwazeh A.M, & McKean D.W. “”Control of Chironomid Nudges in Recreational Lakes” J. Econ.Entomol. 1971, 71:774-777.
18. Bruce-Chwatt, L.J., ,”*Essential Malariaology*”, William Heinemann, Med. Books Ltd .London. 1985
- 19 Blondine, Ch.P., Damar,T.B., dan Rendro,W., “Pertumbuhan Strain Lokal *Bacillus thuringiensis israelensis* pada Media Alternatif (Air Kelapa dan Rendaman Kedelai) untuk Mengendalikan Larva Nyamuk *Aedes aegypti*”, *Seri Penelitian Fakultas Biologi.*, 1999. 2, 133-138.
20. Becker, N dan Margalit, J. Control of Diptera with *B. thuringiensis israelensis*, Training in Tropical Diseases, Jenewa 4. 1992
21. Nguyen, T.T.H., Su,T., dan Mulla,M.S., , “Mosquito Control and Bacterial Flora in Water Enriched with Organic Matter and Treated with *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* Formulations”, *Journal of Vector Ecology.*, 1999.24(2),138-153.
- 22.Kriangkrai Lerdthusnee, Wichai Kong-ngamsuk, Prokong Phan-Urai, Theeraphap Chareonviriyaphap. Development of Bti Formulated Products and Efficacy Tests against Aedes aegypti Populations. Published in Proceedings First international Symposium on on Biopesticides, October 27-31. Phitsanulok, Thailand. 1996. 140-148

23. Lee, HL, Pe, T.H dan Cheong, W.H. Laboratory Evaluation of the Persistence of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* Against *Aedes aegypti* Larvae., *Mosq.Born.Dis.Bull.* 1986,2(3),61-66.,
24. Abbott Laboratories. *Bt H-14* Life Cycle. The Sequence of Events Associated with Using *B. thuringiensis israelensis* (*Bti*) for Control of Mosquito Larvae. 1993
25. Barodji, Damar TB, Hasan Boesri, Sudini. Bionomik Vektor dan Situasi Malaria di Kecamatan Kokap, Kabupaten Kulon Progo, Yogyakarta. *Jurnal Ekologi Kesehatan*. 2003.2(2).

An. maculatus laboratorium terhadap Bti (1 Agustus 2012)

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* PROBIT ANALYSIS \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
DATA Information

7 unweighted cases accepted.  
0 cases rejected because of missing data.  
1 case is in the control group.  
0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* PROBIT ANALYSIS \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
Parameter estimates converged after 12 iterations.  
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
concentr	4,11332	,86904	4,73319

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-4,51246	,98354	-4,58800

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 2,028 DF = 5 P = ,845

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* PROBIT ANALYSIS \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
Observed and Expected Frequencies

concentr	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
,95	20,0	6,0	5,570	,430	,27848
1,00	20,0	6,3	6,898	-,598	,34489
1,04	20,0	9,3	8,190	1,110	,40948
1,11	20,0	10,0	10,554	-,554	,52772
1,23	20,0	12,0	14,168	-2,168	,70842
1,28	20,0	16,3	15,452	,848	,77261
1,32	20,0	17,3	16,457	,843	,82284

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* P R O B I T A N A L Y S I S \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
 Confidence Limits for Effective concentr

Prob	concentr	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
,01	3,39995	1,27841	5,13871
,02	3,96045	1,65605	5,73361
,03	4,36307	1,95116	6,14765
,04	4,69271	2,20702	6,47965
,05	4,97912	2,43940	6,76366
,06	5,23663	2,65613	7,01585
,07	5,47336	2,86171	7,24529
,08	5,69438	3,05901	7,45766
,09	5,90314	3,25001	7,65673
,10	6,10205	3,43613	7,84519
,15	6,99950	4,32335	8,68363
,20	7,80600	5,18178	9,42691
,25	8,57157	6,04312	10,13141
,30	9,32286	6,92426	10,83027
,35	10,07769	7,83474	11,55069
,40	10,85039	8,77816	12,32193
,45	11,65434	9,75112	13,18138
,50	12,50367	10,74236	14,17951
,55	13,41490	11,73596	15,38110
,60	14,40885	12,72218	16,86079
,65	15,51364	13,70932	18,70136
,70	16,76972	14,72650	21,00922
,75	18,23957	15,82094	23,95290
,80	20,02840	17,06265	27,83725
,85	22,33612	18,56954	33,28117
,90	25,62117	20,59265	41,79622
,91	26,48452	21,10632	44,17544
,92	27,45543	21,67643	46,91914
,93	28,56414	22,31846	50,13904
,94	29,85539	23,05507	54,00391
,95	31,39948	23,92154	58,78504
,96	33,31591	24,97716	64,95632
,97	35,83294	26,33372	73,45255
,98	39,47572	28,24404	86,51519
,99	45,98354	31,52512	112,03128

Abbreviated      Extended  
 Name              Name  
 concentr          concentration

An. maculatus lapangan terhadap Bti (16 Agustus 2012)

\*  
DATA Information

8 unweighted cases accepted.  
0 cases rejected because of missing data.  
1 case is in the control group.  
0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

- - - - - \*  
\*  
Parameter estimates converged after 13 iterations.  
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

Regression Coeff. Standard Error Coeff./S.E.

conc_ppm	5,93268	1,06188	5,58698
----------	---------	---------	---------

Intercept Standard Error Intercept/S.E.

-7,37817	1,39481	-5,28971
----------	---------	----------

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 2,812 DF = 6 P = ,832

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

- - - - - \*  
\*  
Observed and Expected Frequencies

conc_ppm	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
1,11	20,0	6,0	4,416	1,584	,22080
1,23	20,0	6,5	9,376	-2,876	,46879
1,28	20,0	12,0	11,650	,350	,58249
1,32	20,0	14,0	13,589	,411	,67944
1,36	20,0	15,0	15,164	-,164	,75820
1,40	20,0	16,0	16,400	-,400	,82000
1,43	20,0	17,5	17,346	,154	,86729
1,48	20,0	19,0	18,340	,660	,91699

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* PROBIT ANALYSIS \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
Confidence Limits for Effective conc\_ppm

Prob	conc_ppm	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
,01	7,10435	3,98081	9,43108
,02	7,89720	4,68061	10,21000
,03	8,44552	5,18646	10,73855
,04	8,88295	5,60228	11,15499
,05	9,25542	5,96463	11,50630
,06	9,58472	6,29114	11,81459
,07	9,88309	6,59183	12,09220
,08	10,15811	6,87298	12,34675
,09	10,41488	7,13884	12,58333
,10	10,65696	7,39241	12,80550
,15	11,72060	8,53838	13,77328
,20	12,64117	9,56879	14,60317
,25	13,48834	10,54477	15,36445
,30	14,29741	11,49776	16,09310
,35	15,09039	12,44723	16,81304
,40	15,88347	13,40672	17,54409
,45	16,69045	14,38608	18,30615
,50	17,52464	15,39216	19,12263
,55	18,40053	16,42869	20,02405
,60	19,33539	17,49628	21,05209
,65	20,35158	18,59441	22,26347
,70	21,48034	19,72787	23,73347
,75	22,76878	20,91769	25,56386
,80	24,29468	22,21422	27,90995
,85	26,20284	23,71814	31,05995
,90	28,81808	25,64707	35,68404
,91	29,48792	26,12398	36,91747
,92	30,23328	26,64815	38,31152
,93	31,07460	27,23240	39,91141
,94	32,04194	27,89547	41,78423
,95	33,18199	28,66628	44,03561
,96	34,57334	29,59312	46,84569
,97	36,36403	30,76617	50,55964
,98	38,88884	32,38720	55,97485
,99	43,22886	35,09770	65,74797

Abbreviated Name	Extended Name
conc ppm	conc ppm lap



**KEMENTERIAN KESEHATAN**  
**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN**  
Jalan Percetakan Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226  
Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933  
E-mail: sesban@litbang.depkes.go.id, Website: http://www.litbang.depkes.go.id

**PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL )**

Nomor : KE.01.08 /EC/ 577 /2012

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

**"Deteksi Gen Cry Bacillus thuringiensis H-14 Galur Lokal dan Toksisitasnya Terhadap Jentik Nyamuk Vektor Anopheles maculatus"**

yang mengikutsertakan hewan percobaan sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

**Dra. Blondine Ch. P., M.Kes.**

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 6 Agustus 2012

Ketua  
Komisi Etik Penelitian Kesehatan  
Badan Litbang Kesehatan,



Prof. Dr. M. Sudomo

## LEBAR PERSETUJUAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Ketua Panitia Pembina Ilmiah (PPI) B2P2VRP dan Kepala Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga menyatakan bahwa Laporan Akhir Penelitian " **Deteksi Gen Cry Bacillus thuringiensis H-14 Galur Lokal dan Toksisitasnya Terhadap Jentik Nyamuk Vektor Malaria Anopheles maculatus**" telah dapat disetujui sesuai ketentuan yang berlaku.

Menyetujui :

Ketua PPI B2P2VRP

(Dra. Blondine Ch.P M.Kes)  
NIP. 194903251976112001

Ketua Pelaksana

(Drs. Blondine Ch.P. MKes)  
NIP. 194903251976112001

