

TESIS

ISOLASI *Bacillus thuringiensis* DARI TANAH DAN UJI
TOKSISITASNYA TERHADAP LARVA NYAMUK
Aedes aegypti Linn. DAN *Spodoptera litura* Fab.

KK
TKD 04/01
Pag
i

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



JOSEPH PAGAYA

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000

**ISOLASI *Bacillus thuringiensis* DARI TANAH DAN UJI
TOKSISITASNYA TERHADAP LARVA NYAMUK
Aedes aegypti Linn. DAN *Spodoptera litura* Fab.**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh

JOSEPH PAGAYA

NIM 099712506M


**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000**

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 12 APRIL 2000

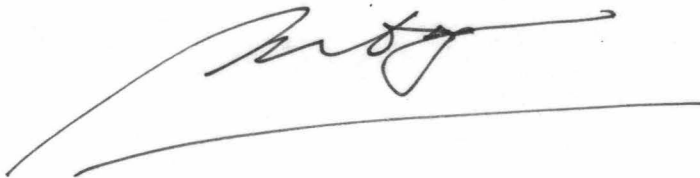
Oleh :

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Atasiati Idajadi, SpMK.
NIP. 130 189 851

Pembimbing



Dr. Subagio Yotopranoto, DAPE
NIP. 130 685 847

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Dr. Soetjipto, MS, PhD.
NIP. 130 687 606

Telah Diuji Pada
Tanggal 24 April 2000

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Neneng K. Djinawi, MSc, SpMK.

Anggota : 1. Prof. Dr. Atasiati Idajadi, SpMK.
2. DR. Eddy Bagus Wasito, dr. SpMK.
3. DR. Kuntoro, dr., MPH., Dr.PH.
4. Dr. Subagio Yotopranoto, DAP&E.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur di panjatkan kehadirat Allah Tuhan kita, atas segala perkenaanNya sehingga penelitian dan penulisan tesis ini dapat saya selesaikan dengan selamat.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Profesor Atasiati Idajadi, pembimbing utama yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran dalam penelitian dan penulisan tesis ini.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan pula kepada Dr. Subagio Yotoprano, DAPE., pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesungguhan mendorong, membimbing dan memberi saran pada penelitian dan penulisan tesis ini.

Terima kasih saya sampaikan kepada DR. Kuntoro, MPH., konsultan metodologi dan statistik yang membantu dan menyediakan waktu untuk konsultasi sejak usulan penelitian hingga analisis data hasil penelitian tesis ini

Dengan rasa hormat saya sampaikan terima kasih kepada Rektor Universitas Airlangga, Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar serta ketua Minat Studi Mikrobiologi Program Pascasarjana Universitas Airlangga atas segala bantuan dan kesempatan yang telah di berikan kepada saya hingga dapat mengikuti dan menyelesaikan pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada ketua dan sekretaris Laboratorium Biologi Dasar Universitas Pattimura beserta staf, yang telah banyak memberikan bantuan dan fasilitas selama penelitian ini di laksanakan.

Terima kasih khusus dan sembah hormat saya ucapkan kepada almarhum **ayah W.Pagaya** dan **ibu Ny. M.Pagaya** tercinta atas dedikasi dan pengorbanan serta dorongan dan bimbingan juga nasehat-nasehat yang berharga dalam membentuk jalan kehidupan saya sampai pada kesempatan mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana.

Terima kasih dan penghargaan saya sampaikan kepada kakak tercinta **Drs.Hendrik Pagaya Kaisiepo** dan **Usi Nel Kaisiepo** atas dukungan doa, moril dan materil selama saya mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Keberhasilan studi dan penelitian serta penulisan tesis ini tak lepas dari peranan dan dukungan moril serta pengorbanan dari istri dan anak-anak tersayang **Ny.B.Pagaya, Weyber, Marchantya, Weynasari Francisela**, tiada kata lain selain cinta dan kasih saya persembahkan.

Kepada saudara **Th.Pentury** dan keluarga yang banyak membantu serta rekan-rekan dan semua pihak yang telah membantu langsung maupun tidak langsung atas penelitian dan penulisan tesis ini saya ucapkan terima kasih

S e m o g a

Surabaya, medio April 2000

Penulis

RINGKASAN

Bacillus thuringiensis adalah salah satu mikroorganisme yang saat ini dikembangkan sebagai agensia pengendali serangga hama pertanian maupun vektor penyakit pada manusia. Sifat toksik bakteri ini ditentukan oleh protein kristal δ -endotoksin, yang toksisitasnya sangat spesifik dan aman terhadap lingkungan, terhadap mamalia dan manusia, serta tidak menimbulkan resistensi bagi serangga.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari toksisitas dari *Bacillus* pembentuk endospora dan penghasil protein kristal *Bacillus thuringiensis* yang diisolasi dari tanah terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* Linn. dan larva ngengat hama *Spodoptera litura* Fab.

Sampel tanah diambil dari 6 sistem ekologi yang terdapat di pulau Morotai masing-masing hutan, sawah, kaki bukit, kolam, rawa mangrove dan perkebunan. Sebanyak 100 gram tanah diambil dari setiap sistem ekologi yang ditentukan dengan senduk plastik steril selanjutnya dimasukkan ke kantung-kantung plastik steril. Di Laboratorium, sebanyak 1 gram dari tiap 100 gram diambil untuk diisolasi bakteri pembentuk endospora.

Identifikasi *Bacillus thuringiensis* dilakukan dengan menggunakan metode Chilcott & Wigley. Isolat yang positif selanjutnya diukur potensi toksik terhadap larva serangga uji dengan satuan pengamatan adalah mortalitas larva.

Teknik analisis untuk mengukur potensi toksik dari masing-masing isolat dipakai personal komputer program SPSS versi 7,5 untuk analisis Probit dan ANOVA satu arah serta uji perbandingan berganda metode BNT pada taraf signifikan $\alpha = 0,05$.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari total 409 koloni isolat bakteri yang ditemukan, 21 isolat positif *B.thuringiensis*. Bioassay terhadap ke 21 isolat tersebut menghasilkan 4 isolat bersifat toksik terhadap larva *Ae.aegypti* masing-masing adalah MRT-B.02, MRT-B.03, MRT-B.04 dan MRT-C.02. Enam isolat bersifat toksik terhadap larva *S.litura*, masing-masing MRT-C.04, MRT-D.01, MRT-D.02, MRT- E.03, MRT-E.04 dan MRT-F.01. Analisis probit menunjukkan isolat MRT-B.04 dan isolat MRT-E.03 memiliki potensi toksik sangat tinggi masing-masing terhadap larva *Ae.aegypti* dan larva *S.litura*, karena nilai LC_{50} dan LC_{90} dari kedua isolat paling rendah dari isolat-isolat lainnya. Analisis varians menunjukkan bahwa ada perbedaan toksisitas yang nyata diantara isolat-isolat hasil isolasi, baik terhadap larva nyamuk *Ae.aegypti* maupun larva *S.litura* sehingga hipotesis nol tidak dapat diterima.

A B S T R A C T

Key words : *Bacillus thuringiensis*, Crystal protein δ -endotoksin, Endospore, Toxicity,

Bacillus thuringiensis is one of the most developed microorganism against both pests and diseases insects vector. Toxicity is due to the presence of certain crystal protein δ -endotoxin, inside the bacterium. The toxicity is more specific for insect and is safe for the environment, humans and mammals and insects do not develop resistency.

The objective of this research is to study the toxicity of the crystal protein and endospores form soil bacillus isolated, against *Spodoptera litura* Fab. larva and the *Aedes aegypti* Linn. mosquito's larva.

Sample of soils were collected from six ecology system which included forest, rice field, foot hill, pond, mangrove swamp and plantation in Morotai island. On the spot, about 100 gram of the soil was collected using sterile plastic spoons, placed in sterile plastic bags. In the laboratory, about 1 gram of soil sample was weighted for the isolation of endospore form bacilli.

Chilcott and Wigley's method was used for the identification of *B.thuringiensis*. The positive isolates of *B.thuringiensis* were measured for potency of toxicity with insect larva mortality as observation unit.

A personal computer programmed with probit analysis was used to analyze data. ANOVA one-way was used to the hypothesis test, continued by multiple comparison test with LSD method at $\alpha = 0,05$ significant level.

A total of 409 bacterial colonies were isolated, 21 positive *B.thuringiensis* isolates were found. From such bioassay, 4 isolates were toxic to the *Ae.aegypti* larva those were MRT-B.02, MRT-B.03, MRT-B.04 and MRT-C.02. Six isolates were toxic to the *S.litura* larva those were MRT-C.04, MRT- D.01, MRT-D.02, MRT-E.03, MRT-E.04 and MRT-F.01.

Data obtained by probit analysis showed that each MRT- B.04 and MRT-E.03 isolates were more toxic to *Ae.aegypti* and *S.litura* larva, because it has a lower LC_{50} and LC_{90} values than the other isolates collected. The ANOVA showed, that the toxicity differed significantly between the isolates collected from soils both to *Ae.aegypti* and *S.litura*, so that null hypothesis was rejected.

DAFTAR ISI

	Halaman
Lembar Persetujuan	iii
Ucapan Terima Kasih	iv
Ringkasan	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	xi
Daftar Gambar	xiii
Daftar Lampiran	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Rumusan Permasalahan	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Jenis-Jenis Bakteri Entomopatogen	7
2.2 Famili Bacillaceae	8
2.3 Genus Bacillus	11
2.4 <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
2.4.1 Habitat dan Sejarah Penemuan <i>B.thuringiensis</i>	12
2.4.2 Identifikasi <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
2.4.3 Jenis, Sifat dan Bentuk Protein Kristal	19

2.4.4 Penelitian-Penelitian <i>Bacillus thuringiensis</i> di Indonesia	22
2.5 Tinjauan Tentang Serangga Uji	24
2.5.1 Nyamuk <i>Aedes aegypti</i> Linn.	24
2.5.2 <i>Spodoptera litura</i> Fab.	36
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	44
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	44
3.2 Hipotesis Penelitian	46
BAB 4 METODE PENELITIAN	47
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	47
4.2 Populasi dan Sampel	47
4.3 Variabel Penelitian	48
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	52
4.5 Bahan dan Alat Penelitian	53
4.6 Prosedur Kerja	53
4.6.1 Pengambilan Sampel Tanah	53
4.6.2 Isolasi dan Identifikasi Bacili Patogen	54
4.6.3 Uji Toksisitas Isolat pada <i>Ae.aegypti</i>	55
4.6.4 Uji Toksisitas Isolat pada <i>S.litura</i>	56
4.7 Analisis Data	57
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN	59
5.1 Hasil Penelitian	59
5.1.1 Jumlah Isolat <i>Bacillus thuringiensis</i>	60
5.1.2 Uji Toksisitas Isolat (bioassay) Terhadap Larva Uji	61

5.2 Analisis Hasil Penelitian	73
5.1.1 Analisis Probit	73
5.2.2 Analisis Varians	81
BAB 6 PEMBAHASAN	82
6.1 Jumlah Isolat <i>Bacillus thuringiensis</i> Hasil Isolasi	82
6.2 Toksisitas Isolat <i>Bacillus thuringiensis</i> Terhadap Larva Uji <i>Aedes aegypti</i>	85
6.3 Toksisitas Isolat <i>Bacillus thuringiensis</i> Terhadap Larva Uji <i>Spodoptera litura</i>	91
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	98
7.1 Kesimpulan	98
7.2 Saran	99
Daftar Kepustakaan	101
Lampiran	109

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Klasifikasi Strain-Strain <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
Tabel 5.1 Hasil Isolasi <i>Bacillus thuringiensis</i> dari Tanah	59
Tabel 5.2 Jumlah Isolat <i>Bacillus thuringiensis</i> dari Tanah	60
Tabel 5.3 Toksisitas Isolat MRT-B.02 Terhadap Larva <i>Ae.aegypti</i> ...	63
Tabel 5.4 Toksisitas Isolat MRT-B.03 Terhadap Larva <i>Ae.aegypti</i> ...	64
Tabel 5.5 Toksisitas Isolat MRT-B.04 Terhadap Larva <i>Ae.aegypti</i> ...	65
Tabel 5.6 Toksisitas Isolat MRT-C.02 Terhadap Larva <i>Ae.aegypti</i> ...	66
Tabel 5.7 Toksisitas Isolat MRT-C.04 Terhadap Larva <i>S.litura</i>	67
Tabel 5.8 Toksisitas Isolat MRT-D.01 Terhadap Larva <i>S.litura</i>	68
Tabel 5.9 Toksisitas Isolat MRT-D.02 Terhadap Larva <i>S.litura</i>	69
Tabel 5.10 Toksisitas Isolat MRT-E.03 Terhadap Larva <i>S.litura</i>	70
Tabel 5.11 Toksisitas Isolat MRT-E.04 Terhadap Larva <i>S.litura</i>	71
Tabel 5.12 Toksisitas Isolat MRT-F.01 Terhadap Larva <i>S.litura</i>	72
Tabel 5.13 Rerata Nilai LC ₅₀ dan LC ₉₀ (95% CL) Isolat-Isolat Yang Toksik Terhadap Larva Uji <i>Ae.aegypti</i>	74
Tabel 5.14 Rerata Nilai LC ₅₀ dan LC ₉₀ (95% CL) Isolat-Isolat Yang Toksik Terhadap Larva Uji <i>S.litura</i>	75
Tabel 5.15 ANOVA Perbedaan Toksisitas (LC ₅₀) Isolat <i>Bacillus thuringiensis</i> MRT-B.02, B.03, B.04 dan C.02 Terhadap Larva Uji <i>Ae.aegypti</i>	77
Tabel 5.16 Hasil Uji BNT Toksisitas Isolat <i>B.thuringiensis</i> Terhadap Larva Uji <i>Ae.aegypti</i>	78

Tabel 5.17 ANOVA Perbedaan Toksisitas (LC_{50}) Isolat <i>Bacillus thuringiensis</i> MRT-C.04, D.01, D.02, E.03, E.04 dan F.01 Terhadap Larva Uji <i>S.litura</i>	79
Tabel 5.18 Hasil Uji BNT Toksisitas Isolat <i>B.thuringiensis</i> Terhadap Larva Uji <i>S.litura</i>	80

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Spora dan Parasporal body dari <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	10
Gambar 2.1 Anatomi Nyamuk Famili Culicinae	28
Gambar 2.3 Perbandingan Tahap Perkembangan Culicinae dan Anophelinae	32
Gambar 2.4 Larva Ulat Grayak <i>Spodoptera litura</i>	40
Gambar 2.5 <i>Spodoptera litura</i> Dewasa	42
Gambar 5.1 & 5.2 Kristal Protein <i>B.thuringiensis</i>	62

BAB 1

PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang Permasalahan.

Dewasa ini penggunaan insektisida kimiawi untuk pengendalian hama pertanian dan serangga vektor penyakit oleh masyarakat di Indonesia sudah sangat populer. Hal ini disebabkan karena penggunaannya mudah dan dapat memberikan hasil yang memuaskan dalam waktu singkat. Akan tetapi, pemakaian yang tidak seimbang dan tidak terkendali serta terus menerus, akan memberikan dampak negatif berupa munculnya serangga-serangga hama dan vektor penyakit yang resisten, pencemaran lingkungan, dan dapat membunuh predator-predator alami dan organisme bukan sasaran lainnya.

Untuk mengatasi dampak negatif yang ditimbulkan dari pemakaian insektisida kimiawi ini, maka perlu dicari, diteliti dan dikembangkan secara terpadu, metode lain dalam pengendalian serangga-serangga hama pertanian dan vektor penyakit yang memiliki daya guna yang setara dengan insektisida kimiawi, aman dan ekonomis.

Salah satu metode pengendalian serangga yang telah dikembangkan dan dikomersilkan di beberapa negara, seperti, Perancis, Kanada, Amerika Serikat, Jepang, India, dan Cina adalah metode pengendalian secara biologis, yaitu suatu cara pengendalian

yang menggunakan jasa mikro-organisme sebagai agensia pengendali. Salah satu mikroorganisme yang telah dikembangkan sebagai agensia pengendali serangga hama pertanian dan serangga vektor penyakit adalah bakteri *Bacillus thuringiensis*. Mikroorganisme lain yang juga dikembangkan sebagai agensia pengendali hama pertanian dan vektor penyakit adalah dari golongan virus, jamur, protozoa dan nematoda. Dibandingkan dengan virus, jamur, protozoa dan nematoda, *Bacillus thuringiensis* lebih diminati karena sifat hidupnya yang kosmopolitan, antara lain, dapat ditemukan pada tanah, *soil aquatic system*, tempat perindukan nyamuk, pada serangga yang sakit, pada lubang-lubang batang pohon, dan lain-lain (WHO, 1979; Lee, 1988; Widyastuti *dkk.*, 1996; Blondine *dkk.*, 1996).

Bacillus thuringiensis merupakan salah satu bakteri pembentuk spora yang bersifat patogen pada serangga (Nester *et al.*, 1983; Tortora *et al.*, 1995). Sifat patogenesisnya disebabkan karena bakteri ini menghasilkan protein toksin (δ -endotoksin) atau lebih dikenal dengan protein kristal (parasporal body) yang memiliki daya insektisidal tinggi dan di manfaatkan sebagai bioinsektisida secara komersial.

Toksisitas protein kristal ini sangat spesifik, yaitu hanya toksik terhadap serangga, tetapi aman terhadap lingkungan biotik dalam air (Mardihusodo, 1992), terhadap mamalia dan manusia (Dubois dan Lewis, 1981), namun spektrum aktifitas insektisidal dari protein

kristal *B.thuringiensis* sempit (Entwistle *et al.*, 1993), demikian pula dengan spektrum inang *B.thuringiensis* juga sempit (Dulmage, 1990; Rusmana & Hadioetomo, 1994), oleh karena itu, pengendalian serangga baik hama pertanian maupun vektor penyakit di Indonesia idealnya menggunakan *B.thuringiensis* yang diisolasi secara domestik (Mardihusodo *dkk.*, 1991; Rusmana & Hadioetomo, 1994).

Uji toksisitas dari *B.thuringiensis* yang diisolasi di Indonesia, baik terhadap larva nyamuk maupun terhadap larva serangga hama pertanian belum banyak dilakukan. Mardihusodo dan kawan-kawan pernah melakukan isolasi *B.thuringiensis* dari tanah dan air tempat perindukan maupun dari larva nyamuk yang sakit disekitar Yogyakarta, Jawa Tengah dan Jawa Timur, dan melakukan uji toksisitasnya terhadap larva nyamuk asal Jawa, mendapatkan bahwa, isolat-isolat yang di peroleh memiliki daya insektisidal yang cukup tinggi, mendekati *B.thuringiensis* standar H-14 (Mardihusodo, 1992).

Blondine dan kawan-kawan juga berhasil mengisolasi *B.thuringiensis* dari tanah pada lubang-lubang batang pohon Klengkeng di Salatiga dimana hasil uji toksisitasnya mampu membunuh larva nyamuk > 50% dalam waktu 24 jam (Blondine *dkk.*, 1996). Uji yang sama dilakukan oleh Widyastuti dan kawan-kawan terhadap 7 isolat *B.thuringiensis* strain lokal hasil isolasi pusat penelitian vektor penyakit Salatiga menunjukkan bahwa salah satu

isolat (31B3) mampu membunuh 90 % larva nyamuk *Anopheles aconitus* (Widyastuti dkk., 1996).

Rusmana dan Hadioetomo (1994), berhasil memperoleh sebanyak 32 isolat *B.thuringiensis* dari hasil isolasi pada tanah-tanah peternakan ulat sutra di Jawa Timur, Jawa Tengah dan Sulawesi Selatan, dan dari uji toksisitasnya menunjukkan bahwa 2 isolat (SPG-A 11.17.01 dan SPG-A 11.10b.01) ke-efektifannya membunuh larva *Spodoptera litura* mencapai 65 % lebih efektif dari Thuricide® (salah satu bioinsektisida komersial buatan USA) dan 4 isolat (SPG-A 11.10b.01, SPG-A 12.01.03, SPG-A 12.03.01 dan SPG-A 11.16.01) efektifitasnya membunuh larva *Crocidolomia binotalis* sama dengan Thuricide (Rusmana & Hadioetomo, 1994).

Melihat daya insektisidal yang ditunjukkan oleh isolat-isolat domestik di atas cukup baik, dan mengingat secara geografi Indonesia terdiri dari pulau-pulau besar dan kecil yang memiliki karakteristik geografis dan keragaman hayati yang tinggi, maka upaya eksplorasi (isolasi) *B.thuringiensis* asli Indonesia perlu di lakukan lebih lanjut dengan tujuan mendapatkan isolat-isolat strain lokal yang potensial dalam mengendalikan populasi serangga hama maupun serangga vektor penyakit di Indonesia.

1.2 Rumusan Permasalahan.

“ Apakah isolat-isolat *B.thuringiensis* yang diisolasi dari tanah bersifat toksik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* Linn.dan larva *Spodoptera litura* Fab. ?”

1.3 Tujuan Penelitian.

1.3.1 Tujuan Umum :

Mengisolasi bakteri dari golongan *bacillus* pembentuk endospora yang mengandung protein kristal toksin (δ -endotoksin) dari tanah.

1.3.2 Tujuan Khusus :

Mengetahui potensi toksisitas dari masing-masing isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi dari tanah terhadap larva nyamuk *Ae.aegypti* Linn. dan larva hama *S.litura* Fab.

1.4 Manfaat Penelitian.

1.4.1 Mendapatkan strain lokal *B.thuringiensis* dan dapat mengembangkannya kemudian sebagai bioinsektisida yang potensial untuk mengendalikan dan menekan populasi nyamuk dan hama pertanian.

1.4.2 Memberikan informasi ilmiah atau *reference strain B.thuringiensis* lokal dari Indonesia.

1.4.3 Sebagai bahan informasi kepada masyarakat, terutama kepada instansi terkait dalam menentukan kebijaksanaan pengendalian hama dan vektor penyakit secara hayati.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jenis-Jenis Bakteri Entomopatogen.

Mengklasifikasikan bakteri berdasarkan pada sifat patogenitasnya sangat sulit. Berdasarkan pada derajat patogenitas tertentu, beberapa bakteri bersifat patogen obligat, akan tetapi sebagian besar bakteri bersifat patogen fakultatif, dan hanya sedikit yang bersifat patogen potensial. Selain itu, beberapa spesies bakteri sangat virulen (misalnya *B.thuringiensis*), merupakan strain yang patogenitasnya rendah atau tidak patogen, sedangkan spesies-spesies lain yang mempunyai virulensi rendah merupakan strain yang patogenitasnya tinggi (Tanada & Kaya, 1993).

Lysenko pada tahun 1983 melakukan pemeriksaan terhadap 300 sampel dari 46 spesies serangga yang sakit, dan ditemukan lebih dari 200 strain bakteri. Selanjutnya dilaporkan bahwa sebagian besar dari bakteri-bakteri tersebut bersifat patogen fakultatif, artinya bahwa sifat patogenitasnya bergantung pada kondisi stres yang dialami oleh serangga inangnya (Tanada & Kaya, 1993). Bakteri-bakteri ini terutama berasal dari genus *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* dan *Proteus*, merupakan bakteri-bakteri yang biasanya mendiami saluran pencernaan, yang secara

(*S.faecalis* dan *Enterococci* lainnya), di bawah kondisi stres, dapat menunjukkan patogenitasnya.

Sebagian besar bakteri yang patogen terhadap serangga terdapat pada famili Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae, Micrococcaceae; pada ordo Rickettsiales dan kelas Mollicutes. Anggota Bacillaceae, teristimewa *B.thuringiensis* dan *B.popilliae*, merupakan agen pengendali serangga secara mikrobiologis yang mendapat perhatian utama.

2.2 Famili Bacillaceae.

Anggota dari famili Bacillaceae merupakan bakteri-bakteri penghasil endospora, gram-positif, motil atau non-motil dan berbentuk batang. Dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* edisi 9, di jelaskan bahwa bakteri-bakteri penghasil endospora dikelompokkan ke dalam group 18 dan terdiri dari sepuluh genus masing-masing, *Amphibacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Oscillospira* *Sporohalobacter*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Sulfidobacillus* dan *Syntrophospora* (Holt, et al., 1994).

Fungsi penting endospora terletak pada ketahanannya terhadap pemanasan, kekeringan, radiasi sinar ultra violet dan disinfektan (Nester et al., 1983; Prescott et al., 1992; Schlegel, 1994; Tortora et al., 1995) serta pemaparan bahan kimia toksik (Tortora et al., 1995).

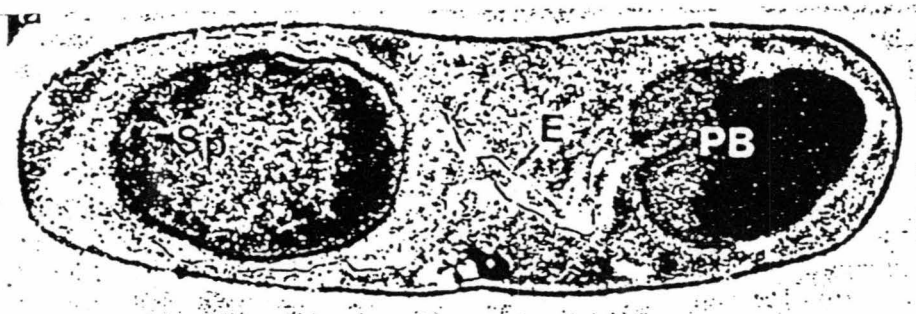
Proses pembentukan endospora dalam sel-sel vegetatif (sel induk) di kenal dengan sporulasi atau sporogenesis (Tortora *et al.*, 1995).

Sporulasi atau sporogenesis terjadi dibagian dalam sel bakteri, dimulai dengan penimbunan bahan yang mengandung protein dan merupakan proses yang kompleks pada difrensiasi sel bakteri. Proses ini dimulai dengan pembelahan sel secara tidak sama besar dengan cara mencekik membran sitoplasma, maka sebagian sitoplasma dipisahkan dari sel induk. Selanjutnya terjadi pembentukan dinding sel seperti terjadi pada pembelahan sel normal (Schlegel, 1994). Meskipun sel-sel vegetatif (sel induk) dari bakteri-bakteri pembentuk endospora dapat dimatikan dengan pemanasan 80°C selama 10 menit, namun endospora termoresisten dapat bertahan pada pemanasan yang jauh lebih tinggi. Sifat termoresisten ini memberikan keuntungan dalam pengembangan teknik pembiakan selektif dari bahan-bahan seperti tanah (Lay, 1994; Schlegel, 1994).

Anggota famili Bacillaceae yang bersifat patogen terhadap serangga adalah genus *Bacillus* dan *Clostridium*. Genus *Bacillus* umumnya merupakan bakteri yang bersifat aerob atau fakultatif anaerob (Atlas & Bartha, 1981; Nester *et al.*, 1983; Claus & Barkeley, 1986) dan menghasilkan enzim katalase (Claus & Barkeley, 1986), sedangkan *Clostridium* adalah bakteri yang bersifat anaerob obligat (Nester *et al.*, 1983) dan tidak dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit (Cato *et al.*, 1986). Kedua genus ini

dibedakan terutama dalam hal kebutuhan akan oksigen, tetapi beberapa dari genus *Bacillus* membutuhkan oksigen dalam jumlah yang sangat terbatas misalnya *B. popilliae*, sehingga oleh beberapa mikrobiologian cenderung menganggapnya sebagai *Clostridium* dari pada *Bacillus* (Tanada & Kaya, 1993).

Selama sporulasi, beberapa dari genus *Bacillus* menghasilkan satu atau lebih inklusi atau badan paraspora didalam sporangium (Gb. 2.1) atau dikenal juga sebagai protein kristal δ -endotoksin (Tanada & Kaya, 1993; Enwistle *et al.*, 1993; Tortora *et al.*, 1995) yang saat ini dikembangkan sebagai bahan aktif bioinsektisida dalam pengendalian serangga hama dan vektor penyakit.

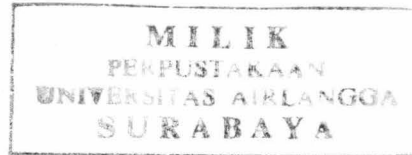


Gambar 2.1 Spora dan Parasporal Body dari *B.thuringiensis israelensis*
(Sp = Spora ; PB = Parasporal Body)
Sumber : Tanada & Kaya, 1993.

2.3 Genus *Bacillus*.

Dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* edisi ke 9 dideskripsikan bahwa genus *Bacillus* merupakan bakteri dengan sel berbentuk batang lurus, berukuran $0,5 - 2,5 \times 1,2 - 10 \mu\text{m}$ dan kadang-kadang terangkai berpasangan atau berantai dengan ujung-ujungnya bulat atau persegi.

Sifat pewarnaannya gram positif, motil dengan flagela peritrikus. Endosporanya berbentuk oval atau kadang-kadang bulat atau silinder dan bersifat sangat resisten terhadap kondisi-kondisi yang merugikan. Setiap selnya mengandung tidak lebih dari satu spora, dan sporulasi tidak mengakibatkan spora terlepas ke udara. Genus bakteri ini bersifat aerob atau fakultatif anaerob dengan kemampuan fisiologis sangat bervariasi terhadap panas, pH, dan salinitas. Genus *Bacillus* tergolong sebagai bakteri kemoorganotrof dengan metabolismenya berlangsung secara fermentatif atau respiratif. Umumnya menunjukkan reaksi katalase positif. Bakteri genus ini hidup pada habitat yang sangat luas, dimana beberapa spesies bersifat patogen pada invertebrata khususnya serangga, misalnya *B.thuringiensis*.



2.4 *Bacillus thuringiensis*.

2.4.1 Habitat dan Sejarah Penemuan *B.thuringiensis*.

B.thuringiensis merupakan bakteri yang hidupnya kosmopolitan dan dapat di isolasi dari tanah, tanah pada lubang batang pohon, serangga, air tempat perindukan nyamuk, dedaunan yang rontok, permukaan daun, bahan-bahan yang di simpan dalam gudang dan lain-lain (WHO, 1979 ; Lee, 1986 ; Chilcott & Wigley, 1994; Blondine *dkk.*, 1996 ; Widyastuti *dkk.*, 1996; Damgaard, *et al.*, 1997), sedangkan menurut Ohba dan Aizawa (1986), bahwa pada tanah tidak hanya di temukan *Bacillus cereus*, tetapi mengandung sekitar 35 % campuran *B.cereus* – *B.thuringiensis*. Marthin and Traver (1989) berhasil memperoleh lebih dari 1000 isolat *B.thuringiensis* yang di isolasi dari tanah 4 benua yaitu Asia, Afrika, Eropa dan Amerika Utara serta Amerika Selatan. Lebih dari 60 % isolat-isolat tersebut di laporkan bersifat toksik terhadap Lepidoptera dan Diptera.

Lee and Seleena (1990), melaporkan bahwa *B.thuringiensis* ditemukan pada habitat tanah dan air dari berbagai sistem ekologi seperti hutan hujan, hutan, sawah, dam, rawa-rawa, rawa-rawa mangrove, danau, selokan dan kaki bukit. Dari 725 sampel tanah yang di periksa, di dapatkan sebanyak 2.394 koloni bakteri yang memiliki

aktivitas larvasidal dan diantaranya terdapat 20 isolat *B.thuringiensis*, dimana salah satunya merupakan strain baru (*B.thuringiensis malaysianensis*), 17 di antaranya adalah serotipe H-14 (*israelensis*), masing-masing satu serotipe H-7 (*aizawai*) dan H-8a8b (*morrisoni*).

Menurut Steinhaus (1960) dalam Tanada & Kaya (1993), bahwa Louis Pasteur antara tahun 1865 dan 1870 menemukan dua spesies *Bacillus* dari peternakan ulat sutera, satu diantaranya diketahui adalah *B.thuringiensis*. Pasteur menemukan bakteri tersebut dalam debu dari tumpukan-tumpukan kotoran ulat sutera. Dilaporkan pula bahwa Ohba *et al.* (1984) juga berhasil mengisolasi sejumlah sub-spesies *B.thuringiensis* dari sampah-sampah peternakan ulat sutera di Jepang.

Pada tahun 1901, Ishiwata seorang mikrobiologian Jepang berhasil mengisolasi *Bacillus* dari larva ulat sutera yang sakit. Ia menemukan bacillus tersebut sangat patogen terhadap ulat sutera, kemudian menamai *Bacillus* tersebut "Sotto Disease Bacillus". Ia menduga bahwa penyebab ini ada hubungannya dengan suatu toksin yang terdapat dalam spora atau yang berdekatan dengan spora. Selanjutnya pada tahun 1908, Iwabuchi menamakan bakteri ini dengan *Bacillus sotto ishiwata*. Akan tetapi nama ini tidak dipakai

karena sistem penamaannya tidak berdasarkan sistem binomial (Tanada & Kaya, 1994).

Pada tahun 1911, Berliner berhasil melakukan isolasi bacillus dari kutu tepung *Anagasta kuehniella*, kemudian pada tahun 1915, ia menamakannya ***Bacillus thuringiensis***. Nama ini diberikan sesuai dengan nama salah satu propinsi di Jerman yaitu Thuringia, tempat dimana isolasi tersebut dilakukan (Enwistle *et al.*, 1993; Tanada & Kaya, 1993). Penemuan ini mempunyai andil besar dalam bidang program pengendalian hama pertanian (Balaraman & Pillai, 1990).

Pada tahun 1927, bakteri ini diisolasi ulang oleh Mattes. Baik Mattes maupun Berliner melaporkan bahwa bacillus hasil isolasi mereka bersifat sangat patogen terhadap larva kutu tepung. Mereka mencatat adanya "*parasporal body*" dalam sporangium, tetapi mereka tidak menjelaskan bahwa *parasporal body* tersebut merupakan sumber toksin.

Seperti yang di kutip oleh Tanada & Kaya (1993) bahwa tak satupun dari peneliti-peneliti terdahulu melakukan uji lapangan tentang daya racun (toksisitas) *B.thuringiensis*. Uji lapangan pertama dilakukan oleh Husz dalam tahun 1926 melalui program internasional pengembangan pengendalian *Ostrina nubilalis* (European corn borer). Data yang diperoleh menunjukkan bahwa kultur *B.thuringiensis* yang diperoleh

dari Mattes memperlihatkan hasil yang sangat memuaskan dalam pemberantasan *O.nubilalis* dan hama pertanian lainnya.

Selanjutnya Hannay pada tahun 1953 mendeskripsikan peranan *parasporal body* *B.thuringiensis* meliputi strukturnya, sifat-sifat pewarnaannya dan kelarutannya dalam pelarut alkali tetapi tidak dalam pelarut organik. Pada tahun 1955, Hannay dan Fitz-James melaporkan pula bahwa secara alamiah protein kristal *B.thuringiensis* paling sedikit memiliki 17 macam asam amino yang menyusun struktur proteinnya. Kemudian pada tahun 1956, Angus berhasil membuktikan bahwa *parasporal body* merupakan sumber toksin penyebab kematian ulat sutera. Hasil penelitian ini kemudian dikonfirmasi dengan pengamatan-pengamatan yang sama yang dilakukan oleh para peneliti Jepang (Tanada & Kaya, 1993).

2.4.2 Identifikasi *B.thuringiensis*.

B.thuringiensis adalah bakteri pembentuk spora, gram positif dan berbentuk batang serta bersifat motil. Sel-sel yang berbentuk batang berukuran diameter antara 1,0 – 1,2 μm dan panjangnya antara 3 – 5 μm jika di tumbuhkan dalam media standar (Stahly *et al.*, 1990, Shieh, 1994). Spora terletak di ujung maupun agak ketengah dan tidak membengkak (Soesanto, 1994).

Salah satu sifat yang di tunjukkan oleh *B.thuringiensis* adanya kristal paraspora yang terbentuk selama pertumbuhan spora di luar exosporium. Adanya kristal paraspora (protein kristal δ -endotoksin) di dalam sel dan aktifitas insektisidal merupakan kriteria utama yang dipakai untuk membedakan spesies *B.thuringiensis* dengan *B.cereus* (Andrews *et al.*, 1987; Baumann *et al.*, 1984; Claus & Berkeley, 1986).

Menurut Shieh (1994), paling sedikit ada 9 metode yang dapat dipakai untuk mengidentifikasi dan mengklasifikasi *B.thuringiensis* yang diisolasi dari alam, yaitu :

1. Identifikasi berdasarkan sifat-sifat morfologi (ukuran sel, spora dan kristal)
2. Antigen flagella
3. Teknik deteksi gen kristal toksin dengan PCR
4. Perbedaan morfologi kristal

5. Aktifitas insektisidal
6. Perbandingan model plasmid
7. Sifat-sifat biokimiawi
8. Sensitifitas terhadap antibiotika
9. Tipe phage.

Identifikasi berdasarkan pada sifat morfologis umumnya menggunakan teknik mikroskopi.

Identifikasi *B.thuringiensis* berdasarkan sifat fisiologi adalah sangat sulit. Disamping adanya protein kristal toksin, perbedaan antara *B.thuringiensis* dan *B.cereus* adalah sedikit sehingga sifat ini tidak dapat dijadikan patokan mengidentifikasi *B.thuringiensis*.

Cara lain untuk mengidentifikasi *B.thuringiensis* adalah cara imunologi yaitu klasifikasi untuk menentukan varietas dengan menggunakan antigen dan yang umum digunakan adalah antigen flagella. Cara ini di anggap merupakan cara yang paling praktis dan handal (reliable) karena sifat yang sangat spesifik (Achmad, 1994). Berdasarkan atas diferensiasi tipe antigen flagella (H-antigen), *B.thuringiensis* terbagi atas 27 group antigenik dan 7 sub-group, sehingga keseluruhannya menjadi 34 serovar (tabel 2.1).

Tabel 2.1 Klasifikasi Strain-Strain *Bacillus thuringiensis*

H-ANTIGEN	SEROVAR	H- ANTIGEN	SEROVAR
1	<i>Thuringiensis</i>	14	<i>Israelensis</i>
2	<i>Finitimus</i>	15	<i>Indiana</i>
3A,3C	<i>Alesti</i>	16	<i>Dakota</i>
3A,3B	<i>Kurstaki</i>	17	<i>Tohukunensis</i>
3A,3D	<i>Sumiyoshiensis</i>	18	<i>Kumamotoensis</i>
3A,3D,3E	<i>Fukuokaensis</i>	19	<i>Tochigiensis</i>
4A,4B	<i>Sotto</i>	20A,20B	<i>Yunanensis</i>
4A,4C	<i>Kenyae</i>	20A,20C	<i>Poncicheriensis</i>
5A,5B	<i>Galleriae</i>	21	<i>Colmeri</i>
5A,5C	<i>Canadensis</i>	22	<i>Shandongiensis</i>
6	<i>Entomocidus</i>	23	<i>Japonensis</i>
7	<i>Aizawai</i>	24	<i>Neoleonensis</i>
8A,8B	<i>Morrisoni</i>	25	<i>Coreanensis</i>
8A,8B	<i>Tenebrionis</i>	26	<i>Silo</i>
8A,8C	<i>Ostrinae</i>	27	<i>Mexicanensis</i>
8B,8D	<i>Nigeriensis</i>	28	<i>Monterey</i>
9	<i>Tolworthi</i>	29	<i>Amagiensis</i>
10	<i>Darmstadtensis</i>	30	<i>Medellin</i>
11A,11B	<i>Tuomanoffii</i>	31	<i>Toguchini</i>
11A,11C	<i>Kyushuensis</i>	32	<i>Cameroun</i>
12	<i>Thompsoni</i>	33	<i>Leesis</i>
13	<i>Pakistani</i>	34	<i>Konkukian</i>

Sumber : Shieh, 1994

Berdasarkan aktifitas protein kristal insektisidal terhadap serangga, Lee *et al.*, 1992, mengklasifikasikan galur *B.thuringiensis* ke dalam 5 patotipe, masing-masing :

- Patotipe I : aktif terhadap Lepidoptera (subsp. *kurstaki*)
- Patotipe II : aktif terhadap Diptera (subsp. *israelensis*)
- Patotipe III : aktif terhadap Coleoptera (subsp. *tenebrionis*)
- Patotipe IV : aktif terhadap Lepidoptera & Diptera (*morrisoni*)
- Patotipe V : aktifitas toksik tidak di ketahui

2.4.3 Jenis Sifat dan Bentuk Protein Kristal *B.thuringiensis*.

Heimpel (1967) dalam Tanada & Kaya (1993) mengusulkan penamaan protein kristal yang diproduksi *B.thuringiensis* dilakukan dengan menggunakan sistem alfabetik Greek. Ia mengatakan sedikitnya terdapat 4 macam protein kristal toksin yang diproduksi oleh *B.thuringiensis*, yaitu, α -exotoxin, β -exotoxin, γ -exotoxin, dan δ -endotoxin. Diantara ke 4 jenis toksin tersebut, hanya γ -exotoxin yang tidak bersifat toksik terhadap serangga.

α -exotoxin adalah suatu exotoxin yang bersifat termolabil dan sangat toksik terhadap insekta tertentu, jika diberikan melalui inokulasi secara *intraheмоcoelic* dan oral, menyebabkan degenerasi dan lisis hemosit. Toksin ini dapat dirusakkan oleh enzim tripsin dan urea dan pada pH diatas 10 dan kurang dari 3,5.

β -exotoxin merupakan toksin yang bersifat tahan panas (*heat-stable*), dikenal juga dengan nama *thuringiensin*. Nama ini diusulkan oleh Kim and Huang (1970), kemudian diadopsi oleh Sebesta *et al.*, (1981). β -exotoxin terbentuk pada fase pertumbuhan vegetatif dan disekresi kedalam medium. Toksin ini tidak diproduksi pada fase sporulasi, namun jika ada hanya sedikit (Holmberg *et al.*, 1980). Menurut Bond *et al.*, (1971) dalam Tanada & Kaya (1993), bahwa

thuringiensis menunjukkan aktifitas insektisidal jauh lebih tinggi dibandingkan dengan DDT, tetapi lebih rendah dibandingkan dengan δ -endotoxin.

δ -endotoxin dikenal juga sebagai badan paraspora atau protein kristal. Penggunaan istilah protein kristal sebagai δ -endotoxin secara entomologi adalah keliru, karena sesungguhnya protein kristal adalah suatu protoksin. Oleh karena itu, δ -endotoxin kemudian didefinisikan sebagai suatu kelas protein toksik yang di hasilkan dari protoksin (protein kristal) yang didegradasi oleh enzim-enzim proteolitik menjadi peptida-peptida kecil toksik. Bentuk dan ukurannya sangat bervariasi tergantung sub-spesiesnya (Mikkola *et al.*, 1982).

Protein kristal ini tidak larut dalam air atau pelarut organik, tetapi larut dalam larutan yang bersifat sangat alkaline, pH diatas 12. Didalam usus tengah insekta dengan pH lebih rendah (antara 10 – 11) kristal ini dapat menjadi larut dengan adanya aktifitas enzim-enzim proteolitik, dan pada saat yang sama dicerna menjadi endotoksin yang memiliki aktifitas insektisidal.

Toksin aktif yang terbentuk dalam usus tengah larva serangga tetap stabil terhadap enzim-enzim proteolitik, sehingga menyebabkan perubahan histopatologis pada epitel usus tengah larva serangga sasaran, sehingga

mengakibatkan gangguan pada permeabilitas membrannya. Gangguan itu terjadi pada transportasi lintas membran karena adanya ikatan antara protein kristal dengan mikrovili usus tengah larva (Davidson, 1984 ; WHO, 1984), mengakibatkan terjadinya pembengkakan sel, perubahan retikulum endoplasma dan mitokondria, gangguan transfer ion-ion, glukosa dan oksigen, kehilangan ATP dan lain-lain (Aronson *et al.*, 1986).

Kerusakan struktur dan fungsi sel tersebut menyebabkan keseimbangan pH dan ion hemolimpha terganggu sehingga serangga yang rentan akan mengalami kelumpuhan dan akhirnya mati. Larva yang mati tubuhnya mengerut, menjadi kering, sedikit melengkung dan menjadi hitam (Rusmana & Hadioetomo, 1994).

Protein toksin (δ -endotoksin) *B.thuringiensis* dilaporkan sangat efektif untuk pengendalian berbagai serangga seperti nyamuk dan hama pertanian (Enwistle *et al.*, 1993 ; Blondine *dkk.*, 1996). Penggunaan insektisida berbahan aktif *B.thuringiensis* dalam kurun waktu lama, yakni sampai dengan 26 generasi ternyata tidak menimbulkan resistensi terhadap serangga (WHO, 1984 dalam Mardihusodo, 1992).

Menurut Dulmage *et al.*, (1990), bahwa isolat-isolat berbeda dari subspecies yang sama dapat berbeda

patogenisitasnya terhadap serangga tertentu, terutama karena strain isolat-isolat tersebut memproduksi toksin-toksin yang berbeda. Disamping itu ditemukan pula bahwa toksisitas *B.thuringiensis* strain tertentu bekerja secara spesifik pada spesies serangga tertentu dan sensitivitas larva dapat berbeda pada lokasi geografi yang berbeda.

2.4.4 Penelitian-Penelitian *B.thuringiensis* di Indonesia.

Di negara-negara maju terutama di Jepang, Amerika dan Eropa, penelitian-penelitian yang mengeksplorasi *B.thuringiensis* sebagai agen pengendali populasi serangga hama pertanian dan kehutanan maupun serangga vektor penyakit sudah lama dilakukan.

Dilaporkan bahwa produk bioinsektisida komersial berbahan aktif *B.thuringiensis* yang pertama di produksi Perancis yang dikemas dengan nama *Sporeine* pada tahun 1938 (Weiser, 1986). Namun penggunaan bioinsektisida berbahan aktif *B.thuringiensis* secara besar-besaran di seluruh dunia sebenarnya baru dimulai pada dekade 80-an (Enwistle *et al.*, 1993).

Di India, China, Malaysia, Jepang dan beberapa negara lain di Asia maupun Afrika, sudah berhasil mengembangkan isolat-isolat strain lokal *B.thuringiensis* sebagai bahan aktif andalan dalam pengendalian hama serangga pertanian

dan nyamuk vektor (demam berdarah dengue, malaria, filariasis), serta mengatasi problem resistensi serangga terhadap insektisida kimiawi.

Di Indonesia, beberapa penelitian telah dilakukan dalam upaya memperoleh isolat-isolat strain lokal yang mampu mengendalikan populasi berbagai nyamuk vektor dan serangga hama pertanian.

Mardihusodo *dkk.*, telah melakukan isolasi *B.thuringiensis* dari habitat tanah, air tempat perindukan nyamuk, dan larva nyamuk yang sakit pada 3 lokasi terpisah di pulau Jawa (Yogya, Jatim, dan Jateng), menemukan 4 isolat. Hasil uji toksisitas dari ke 4 isolat tersebut ternyata mampu membunuh larva nyamuk malaria asal Jawa antara 52 – 72 % (Mardihusodo *dkk.*, 1991).

Di Salatiga, Blondine *dkk.*, melakukan isolasi dari tanah-tanah pada lubang di batang pohon dan percabangan batang pohon Klengkeng dan mereka menemukan 7 isolat *B.thuringiensis*. Selanjutnya dilaporkan bahwa dari uji toksisitasnya, ke 7 isolat tersebut mampu membunuh lebih dari 50 % larva nyamuk *Aedes* maupun *Culex* (Blondine *dkk.*, 1996).

Rusmana dan Hadioetomo, melakukan pemeriksaan terhadap 48 sampel tanah yang diperoleh dari tanah-tanah peternakan ulat sutera di Sulawesi Selatan (31 sampel),

Jawa Tengah (4 sampel), dan Jawa Timur (9 sampel). Mereka menemukan bahwa 43,75 % atau 21 contoh tanah mengandung *B.thuringiensis* (adanya protein kristal). Ditemukan pula tipe protein kristal yaitu yang berbentuk bipiramida, oval, amorf dan bulat, dan terbanyak adalah bentuk kristal bipiramida. Dari uji toksisitas terhadap larva instar I *Crocodolomia binotalis*, 4 isolat menunjukkan aktifitas insektisidal sama dengan *Thuricide HP*, sedangkan terhadap larva *S.litura*, 2 isolat menunjukkan aktifitas insektisidal melebihi *Thuricide HP* (salah satu insektisida komersial berbahan aktif *B.thuringiensis* dari Sandoz Agro Inc. USA).

2.5 Tinjauan Tentang Serangga Uji.

2.5.1 Nyamuk *Aedes aegypti* Linn.

Di berbagai belahan dunia, nyamuk menimbulkan berbagai problem kesehatan manusia. Nyamuk menjadi vektor untuk beberapa penyakit seperti *dengue hemorrhagic fever* atau demam berdarah, *yellow fever*, malaria, filariasis, dan *encephalitis* dan mengancam lebih dari 3 milyar penduduk pada daerah tropik dan sub-tropik atau lebih dari setengah penduduk dunia (Becker & Margalit, 1993). Distribusi nyamuk adalah kosmopolitan, tetapi lebih banyak

dijumpai pada daerah sub-tropis dan tropis, karena pada daerah dingin nyamuk tidak tahan hidup.

Di Indonesia nyamuk *Ae. aegypti* tersebar di seluruh pelosok tanah air, di kota-kota dan pedesaan dan terutama menjadi vektor untuk penyakit demam berdarah dengue, disamping *yellow fever* dan *encephalitis* (Harisunata, 1984), sehingga perlu dicari cara-cara untuk menekan kepadatan populasinya sampai pada tingkat yang tidak mampu berperan sebagai penular penyakit.

Dalam dunia kesehatan, nyamuk pada umumnya berperan dalam hal sebagai :

- Penular penyakit
- *Intermediate host* dari bibit penyakit (patogen)
- Sebagai penyebab penyakit (tidak menonjol), karena gigitannya menyebabkan gatal khusus bagi mereka yang peka.
- Sebagai *annoyance* (pengganggu kesenangan atau kenikmatan orang dan hewan).

Demam berdarah dengue diketahui penyebabnya adalah virus dengue dan ditularkan oleh nyamuk *Ae. aegypti*. Nyamuk *Ae. aegypti*, Linn. di sebut juga dengan *black-white mosquito*, karena tubuhnya di tandai dengan pita-pita atau garis-garis putih keperakan di atas dasar hitam (James and Harwood, 1969 dalam Badrah, 1996).

Barror and de Long (1982), membuat taxonomi atau mengklasifikasikan nyamuk *Ae.aegypti* sebagai berikut :

Phylum : Arthropoda
Class : Insecta
Sub-class : Pterygota
Ordo : Diptera
Sub-ordo : Nematocera
Family : Culicidae
Sub-famili: Culicinae
Genus : *Aedes*
Spesies: *Aedes aegypti*, Linneaus.

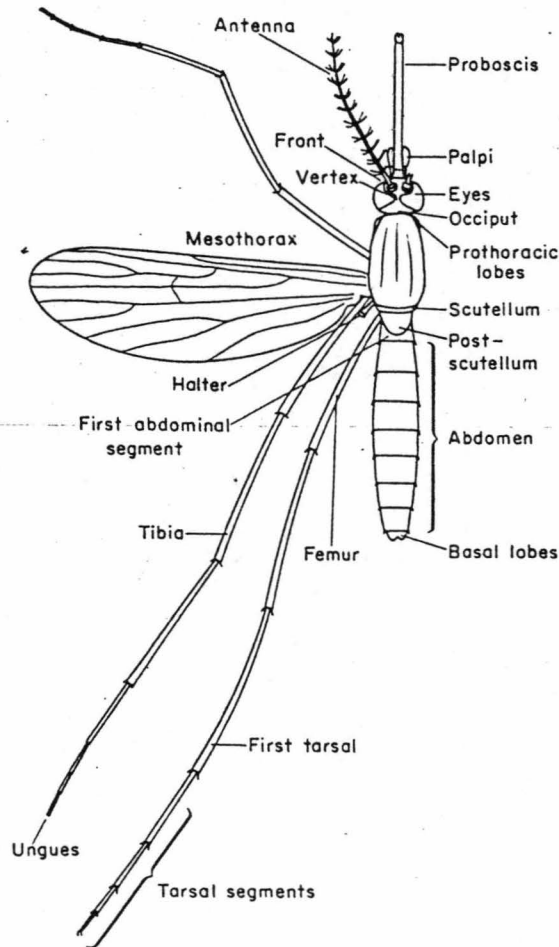
2.5.1.1 Morfologi *Aedes aegypti*, Linn.

Berdasarkan struktur morfologinya, tubuh nyamuk *Ae.aegypti* terdiri dari 3 bagian, masing-masing kepala, dada (*notum* atau *thorax*) dan perut (*abdomen*). Pada bagian kepala terdapat sepasang mata majemuk dan antena yang berbulu. Terdapat pula mulut yang berbentuk panjang dan lansing disebut proboscis yang berbeda antara nyamuk jantan dan nyamuk betina. Pada nyamuk betina mulutnya bertipe *piercing* and *sucking* (penusuk dan pengisap) dan tergolong *anthropofagus*, sedangkan pada nyamuk jantan, bagian mulutnya lebih lemah sehingga tidak mampu menusuk menembusi kulit manusia, oleh karena itu digolongkan sebagai *fitofagus*.

Pada bagian kepala terdapat juga sepasang antena beruas-ruas dan pada tiap pangkal ruas keluar bulu-bulu dimana pada nyamuk jantan bulu-bulu pada antenanya panjang dan lebat, disebut antena bertipe *plumose* (pada nyamuk jantan panjang *palpus maxillaris* sama panjang dengan *proboscisnya*), sedangkan antena pada nyamuk betina bulu-bulunya pendek dan jarang di sebut antena bertipe *pilose*. Selain itu juga terdapat sepasang *palpus maxillaris* yang terlihat diantara *proboscis* dan antena. Pada nyamuk betina panjang *palpus maxillarinya* kurang lebih seperempat dari panjang *proboscisnya*.

Bagian thoraks (*notum*) atau dada terdiri atas 3 ruas, masing-masing disebut protorax atau *pronotum*, mesothorax atau *mesonotum* dan methatorax atau *metanotum*. Pada setiap ruas terdapat sepasang kaki yang beruas-ruas yang disebut femur, tibia dan tarsus. Pada ruas-ruas kaki terdapat gelang-gelang putih. Pada thorax terdapat juga sepasang sayap yang keluar dari bagian dorsal segmen thorax II. Pada punggung (*mesonotum*) terdapat gambaran *lyra* (sepasang garis lengkung dan garis sub-median ditengahnya) berwarna putih, yang dijadikan sebagai petunjuk pembeda spesies (pada *Ae. albopictus* terdapat garis putih yang membelah dua punggung).

Bagian abdomen (perut), terdiri dari 8 ruas dan pada setiap ruas terdapat bintik-bintik putih. Pada saat sedang beristirahat, posisi nyamuk *Ae.aegypti* sejajar dengan bidang permukaan benda yang di hinggapi. (Gordon and Lavoipierre, 1978; Anonim, 1989).



Gambar 2.2. Anatomi Nyamuk Famili Culicinae
(sumber : Manson-Bar & Bell 1987)

2.5.1.2 Telur.

Telur dari nyamuk *Ae.aegypti* berbentuk oval memanjang atau berbentuk elips. Warna telur adalah hitam dengan ukuran panjang antara 0,5 – 0,8 mm.

Tidak memiliki alat pelampung seperti pada telur nyamuk *Anopheles*. Telur diletakkan satu per satu pada benda-benda yang terapung atau pada dinding bagian dalam kontainer yang berbatasan dengan permukaan air. Sebagian besar telur yaitu 85 % dari seluruh jumlah telur yang di lepaskan saat bertelur, melekat pada dinding kontainer, sedangkan 15 % sisanya jatuh ke permukaan air (Mardihusodo dkk., 1979 ; Gordon and Lavoipierre, 1978).

2.5.1.3 Larva.

Bentuk tubuh dari larva nyamuk *Ae.aegypti* memanjang tanpa kaki dan simetris bilateral. Selama masa pertumbuhannya, larva nyamuk ini mengalami 4 kali proses pergantian kulit, yang disebut dengan "ecdysis". Tingkatan perkembangan larva disebut dengan instar dan pada nyamuk terdapat 4 tahap perkembangan instar masing-masing larva instar I (L_1), instar II (L_2), instar III (L_3) dan instar IV (L_4).

Larva instar I (L_1), ukuran tubuhnya sangat kecil, dan transparan. Panjang antara 1 – 2 mm, pada daerah thorax terdapat duri-duri (spinae) yang belum begitu jelas dan siphon (alat pernapasan) belum menghitam.

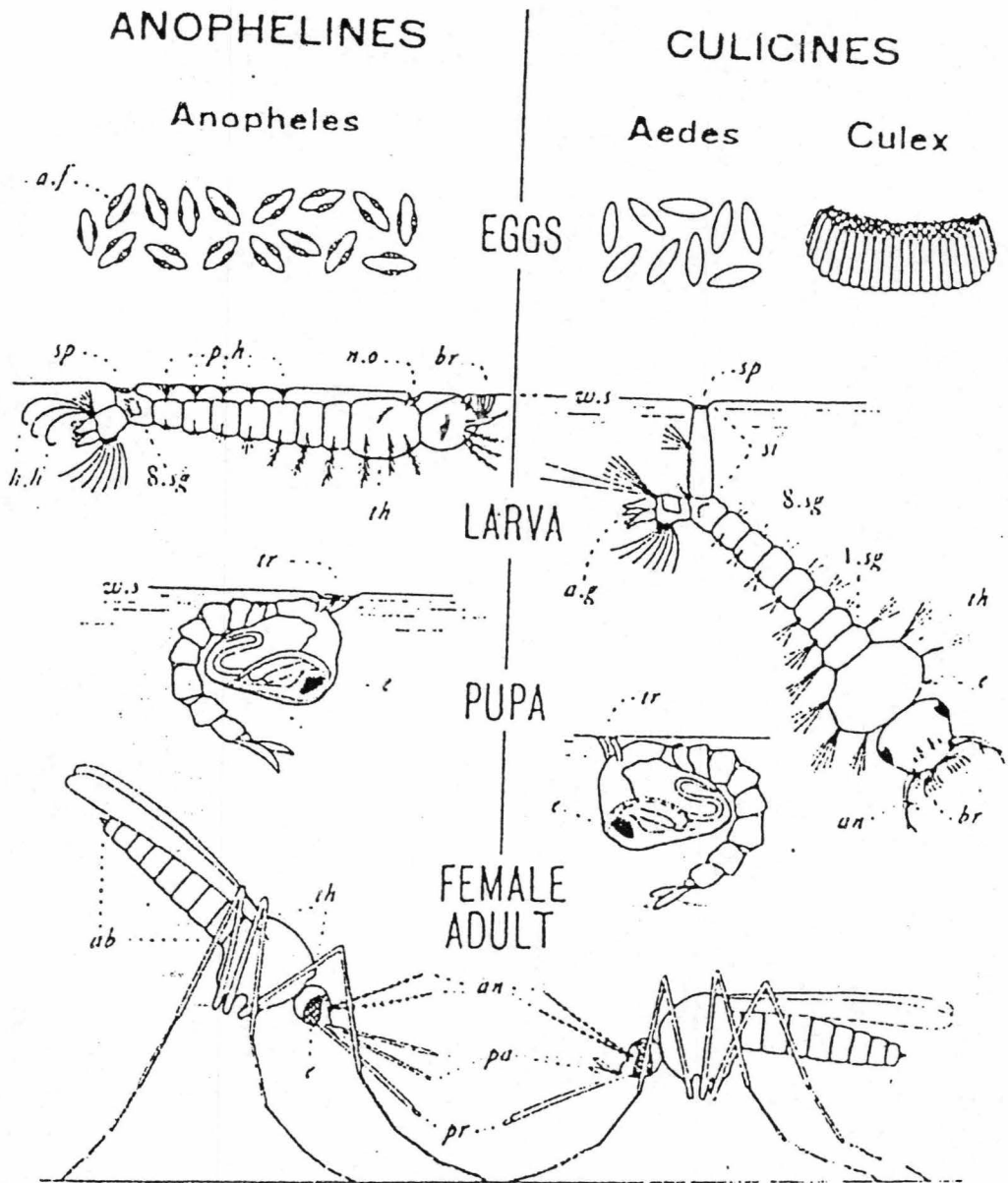
Larva instar II (L_2), ukurannya semakin besar yaitu antara 2,5 – 3,9 mm, dimana spinae pada thorax masih belum jelas, tetapi siphonnya sudah mulai menghitam.

Larva instar III (L_3), ukurannya lebih panjang yaitu antara 3 – 4 mm, spinae sudah tampak jelas dan siphonnya sudah berwarna hitam. Larva instar IV (L_4) ukuran tubuhnya tidak berbeda dengan larva instar III. Pada bagian kepala terdapat sepasang mata majemuk, sepasang antena tanpa duri-duri, dan memiliki mulut yang bertipe *chewing* (pengunyah). Bagian thorax dari larva instar IV tampaknya lebih besar dari bagian-bagian tubuh lainnya, dimana terdapat bulu-bulu yang simetris. Bagian abdomen atau perut terdiri dari ruas-ruas yang berjumlah 8 ruas. Pada ruas abdomen VIII terdapat siphon yang berbentuk corong dan berfungsi sebagai alat pernapasan. Terdapat pula seberkas bulu-bulu yang di sebut *tuft (hair tuft)*, dan pada ruas ini di lengkapi pula dengan bulu-bulu sikat (*hair brush*) di bagian ventral dan gigi-gigi sisir (*comb teeth*) yang berjumlah antara 8 – 16 dan tersusun dalam 1 baris.

Larva *Ae.aegypti* bertubuh langsing dengan gerakan-gerakannya yang licah, bersifat fototaksis negatif. Pada waktu sedang beristirahat, posisi tubuh larva akan membentuk sudut $\pm 45^\circ$ terhadap bidang permukaan air atau hampir tegak lurus dengan kepala dibawah dan siphon diatas (Anonim, 1989).

2.5.1.4 P u p a.

Pada umumnya tubuh dari pupa nyamuk (semua genus) berbentuk batang lengkung atau bengkok dimana bagian kepala dan dada menyatu yang disebut cephalothorax, ukurannya lebih besar dari bagian abdomennya sehingga bentuknya terkesan seperti "koma". Pada bagian dorsal cephalothorax, terdapat alat pernapasan yang berbentuk seperti terompet. Pada ruas abdomen VIII, terdapat sepasang alat pengayuh yang berguna untuk berenang. Pada *Ae.aegypti* alat pengayuhnya berjumbai panjang dan bulu nomor 7 pada ruas abdomen VIII tidak bercabang. Periode pupa adalah periode tidak makan, namun gerakan-gerakannya tampak lebih gesit dibandingkan dengan gerakan larva. Pada saat beristirahat, posisi pupa sejajar dengan bidang permukaan air (Anonim, 1989).



Gambar 2.3. Perbandingan Tahap Perkembangan Culicinae & Anophelinae.
(Sumber : Burges & Cowan, 1993).

2.5.1.5 Bionomik *Ae. aegypti*, Linn.

Yang di maksud dengan bionomik yaitu sifat-sifat biologik dari nyamuk (*Ae.aegypti*) dikaitkan dengan lingkungannya, meliputi tempat perindukan (*breeding place*), kesenangan menggigit dan kesenangan tempat hinggap untuk beristirahat.

2.5.1.5.1 Tempat Perindukan (*Breeding place*).

Telur, larva dan pupa nyamuk *Ae.aegypti* tumbuh dan berkembang di dalam air. Tempat yang disenangi sebagai *breeding place*-nya adalah genangan-genangan air tawar yang jernih dan tenang, umumnya berupa air yang tertampung di suatu tempat, biasanya berupa wadah atau kontainer, bukan genangan air di tanah. Tempat perindukan yang potensial dari nyamuk ini adalah tempat-tempat penampungan air yang digunakan masyarakat sehari-hari seperti drum, tempayan, bak mandi, bak WC, ember, dan lain-lain. Selain tempat-tempat diatas, terdapat beberapa tempat penampungan lain misalnya vas bunga, perangkap semut, tempat minum burung/hewan, barang-barang bekas (kaleng bekas, ban mobil bekas), juga tempat-tempat penampungan air alamiah seperti lubang

pohon, lubang batu, pelepah daun, tempurung kelapa, pangkal pohon pisang, potongan bambu, dan lain-lain (Anonim, 1990 ; Suroso, 1990).

Nyamuk *Ae.aegypti* lebih senang meletakkan telurnya pada wadah-wadah berair yang berwarna gelap, paling suka warna hitam, terbuka lebar, dan terutama yang terletak di tempat-tempat terlindung dari sinar matahari langsung (Anonim, 1990).

Telur nyamuk *Ae.aegypti* di dalam air dengan suhu antara 20 – 40 °C akan menetas menjadi larva dalam waktu 1 – 3 hari. Kecepatan pertumbuhan dan perkembangan larva sangat dipengaruhi oleh faktor temperatur perindukan, kondisi air tempat perindukan, dan kandungan zat makanan pada tempat perindukannya. Pada kondisi optimum, larva berkembang menjadi pupa dalam waktu 4 – 9 hari, kemudian pupa menjadi nyamuk dewasa membutuhkan waktu 2 – 3 hari. Jadi pertumbuhan dan perkembangan dari telur sampai menjadi nyamuk dewasa membutuhkan waktu minimal antara 7 – 14 hari (Anonim, 1990).

2.5.1.5.2 Kesenangan Menggigit dan Tempat Istirahat.

Nyamuk *Ae.aegypti* hidup domestik, lebih senang tinggal di dalam rumah dari pada di luar rumah. Nyamuk betina menggigit dan menghisap darah dengan frekwensinya tinggi pada siang hari terutama pada pagi hari yaitu antara pukul 08.00 – 12.00 atau sore hari, antara pukul 15.00 – 17.00.

Kebiasaan mengisap darah lebih banyak bersifat antropofilik, yaitu menggigit dan mengisap darah beberapa kali, karena pada siang hari orang sedang aktif, nyamuk belum kenyang, orang sudah bergerak, nyamuknya terbang dan menggigit orang lagi sampai memenuhi kebutuhan darah untuk pertumbuhan dan perkembangan telurnya. Kebiasaan istirahatnya umumnya dilakukan di dalam rumah yaitu pada benda-benda yang bergantung, berwarna gelap dan pada tempat-tempat lain yang terlindung (Anonim, 1990).

2.5.2 *Spodoptera litura*, Fab.

S.litura adalah salah satu spesies serangga yang diketahui sebagai hama pada berbagai tanaman pertanian, namun di Indonesia didapatkan sebagai hama yang sering menyerang tanaman kedelai, tembakau, dan ubi jalar (Anonim, 1994 ; Kalshoven, 1991). Spesies serangga ini dapat ditemukan di berbagai tempat di belahan bumi. Diduga serangga ini berasal dari Afrika kemudian menyebar ke Eropa dan belahan bumi sebelah Timur (Kalshoven, 1991).

Serangga hama spesies ini merupakan hama pemakan daun dan populasinya tinggi pada pertanaman, terutama pada daun-daun bagian bawah, sebab telur dan larva kecil yang masih berkelompok, terkonsentrasi pada bagian tanaman tersebut (Anonim, 1994). Untuk pengendalian hama ini, di Indonesia, orang masih mengandalkan penggunaan insektisida kimiawi, namun tidak menyelesaikan persoalan yang timbul, bahkan dikhawatirkan dapat menimbulkan permasalahan baru yaitu menimbulkan resistensi terhadap insektisida dan bahkan dapat membunuh musuh-musuh alaminya serta efek residu yang dapat menurunkan kualitas produk hasil panen.

2.5.2.1 Taxonomi.

Di Indonesia serangga hama ini dikenal dengan nama ulat grayak atau ulat tentara, karena ulat ini dalam jumlah

yang sangat besar sampai ribuan beramai-ramai menyerbu dan memakan tanaman pada malam hari sehingga tanaman akan dimakan habis dalam waktu yang singkat.

Klasifikasi yang dibuat oleh Kalshoven, (1991), terhadap ulat grayak atau ulat tentara ini adalah sebagai berikut :

- O r d o : Lepidoptera
- Famili : Noctuidae
- Genus : *Spodoptera*
- Spesies : *Spodoptera litura*, Fab. (Fabricus)

Dulu nama ilmiahnya adalah *Prodenia litura* Fab., namun untuk negara-negara Afrika dan Eropa disebut atau dikenal juga dengan *Spodoptera littoralis* (Boisd). Nama umum adalah ulat pemotong rumput, namun dikenal pula dengan nama ulat grayak atau ulat tentara. Ordo Lepidoptera lebih dikenal dengan sebutan ngengat atau kupu-kupu, yaitu serangga yang sayap, tubuh dan tungkainya bersisik. Ordo Lepidoptera umumnya mengalami metamorfosis sempurna (*complete methamorphosis*) atau tipe holometabola (Natawigena, 1990).

2.5.2.2 Morfologi.

Tubuh larva ordo Lepidoptera umumnya terdiri atas 13 segmen, dimana 3 segmen terdapat pada bagian thorax dan 10 segmen pada bagian abdomen.

Pada setiap segmen thorax memiliki sepasang tungkai (Thoracic legs). Pada segmen ke tiga, ke enam dan segmen ke 10 dari abdomen larva, umumnya terdapat sepasang tungkai semu (*fore legs*). Larva memiliki alat mulut menggigit dan mengunyah, sedangkan serangga dewasa-nya memiliki alat mulut yang disebut proboscis, berfungsi sebagai pengisap nektar tumbuhan. Panjang tubuh serangga dewasa betina kurang lebih 17 mm, sedangkan serangga jantan berukuran kurang lebih 14 mm.

2.5.2.3 Biologi *S.litura*.

Serangga hama *S.litura* yaitu serangga yang memiliki perkembangan metamorfosis yang sempurna sehingga disebut dengan tipe "Holometabola", yaitu : telur, larva, pupa dan imago (Natawigena, 1990).

2.5.2.3.1 Telur.

Telur *S.litura* berbentuk bulat, dengan diameter 0,3 – 0,51 mm (Kalshoven, 1991, Anonim, 1994).

Pada saat dilepaskan, telur berwarna abu-abu,

selang beberapa waktu kemudian akan berubah menjadi kuning sampai kehijau-hijauan. Telur-telur tersebut ditutupi oleh rambut-rambut halus berwarna coklat keemasan (Anonim, 1994).

Telur-telur *S.litura* umumnya diletakkan permukaan bawah daun secara berkelompok. Setiap kelompok berjumlah 25 – 500 butir. Seekor ngengat betina dapat meletakkan telur sampai 5 kelompok. Umur dari stadium telur berkisar antara dua sampai 6 hari (Kalshoven, 1991, Sudarmo, 1991, Anonim, 1994).

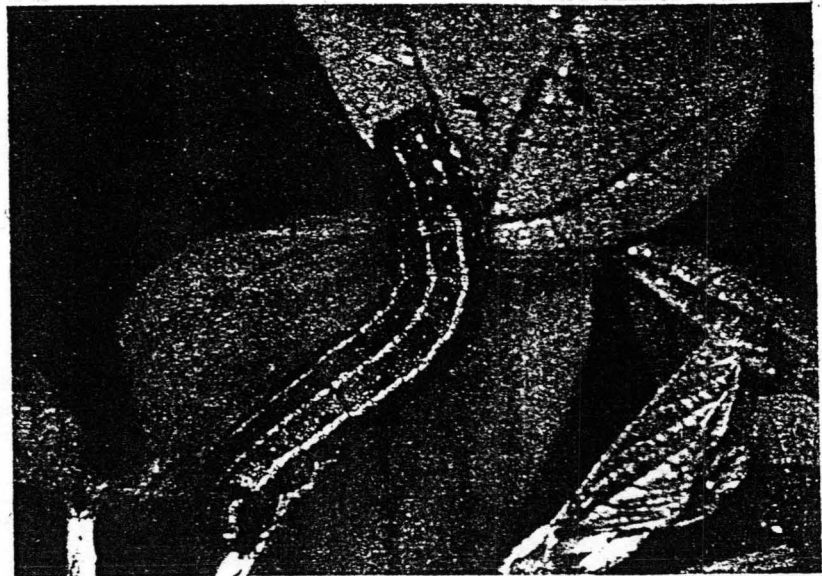
2.5.3.2 L a r v a.

Larva *S.litura* (gambar 2.3). terdiri dari 5 instar, tiap instar mempunyai bentuk tersendiri. Larva instar I mempunyai kepala hitam dan tubuh berwarna hijau kekuningan, lama-kelamaan warna tubuh menjadi hijau. Di sepanjang tubuhnya terdapat terdapat bintik-bintik hitam yang di tumbuhi bulu-bulu halus. Pada instar ini, larva hidup berkelompok di bagian permukaan bawah daun dan memakan bagian epidermis bawah daun sehingga pada daun yang terlihat hanya tulang-tulang daun dan epidermis daun bagian atas.

Larva instar II mempunyai kepala berwarna coklat muda. Warna tubuh mula-mula hijau kekuning-kuningan, kemudian menjadi hijau coklat. Pada tubuhnya terdapat garis-garis putih, dan dekat kepala terlihat garis coklat melintang dengan dua titik hitam pada ke dua sisi.

Larva instar III mempunyai variasi warna lebih jelas. Warna dasar adalah hijau coklat dengan garis-garis putih dan coklat di sepanjang tubuhnya. Pada ruas pertama abdomen terdapat garis coklat melintang dan bagian lateral sepanjang tubuhnya terdapat bintik-bintik hitam.

Larva instar IV mempunyai warna dasar abu-abu dan pada bagian dorsal terdapat 3 garis kuning memanjang (gambar 2.4).



Gambar 2.4. Larva Ulat Grayak *Spodoptera litura*, Fab
Sumber : Nyoman Oka, 1998.

Di atas garis-garis tersebut terlihat bintik-bintik kuning berbentuk setengah lingkaran dan terdapat pada hampir disetiap ruas tubuhnya. Pada bagian lateral terdapat garis kuning dan putih memanjang.

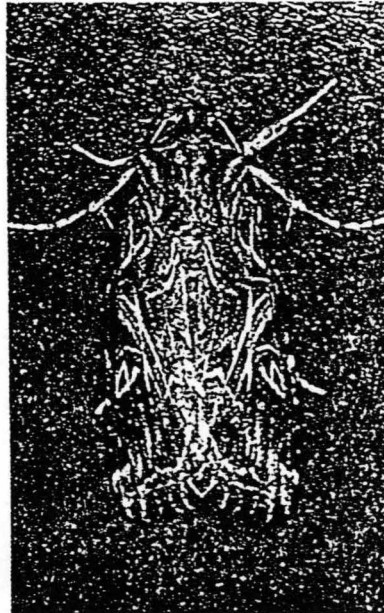
Larva instar V atau instar terakhir berwarna hitam, garis kuning pada bagian dorsal berubah menjadi jingga. Pada ruas ke dua dan ke tiga terdapat bintik-bintik hitam dan kuning, dan pada ruas ke 11 terdapat garis jingga dan putih. Warna pada larva tersebut dipengaruhi oleh lingkungan tempat perkembangbiakannya. Larva yang hidup dalam kelompok yang populasinya padat, warna tubuhnya lebih gelap dan kurus. Lama stadium larva berkisar antara 15 – 30 hari (rata-rata 20 hari) (Sudarmo, 1991).

2.5.3.3 P u p a.

Setelah stadium larva instar V, larva akan berubah menjadi pupa. Stadium pupa ini merupakan stadium istirahat, dimana pupa tidak melakukan aktifitas makan dan gerak. Pupa umumnya berwarna coklat gelap dengan panjang berkisar antara 2,5 – 9,25 mm dan berada di dalam tanah. Stadium pupa berlangsung antara 8 – 11 hari (Sudarmo, 1991).

2.5.3.4 Imago.

Imago adalah stadium individu dewasa (gambar 2.5), ukuran lebar rentang sayapnya antara 32 – 38 mm. Sayap depan dan thorax berwarna kecoklat-coklatan dengan garis-garis coklat yang terang. Imago betina mempunyai garis sempit dan warna tubuhnya lebih gelap jika dibandingkan dengan imago jantan. Sayap belakang bermembran putih dengan di batasi warna coklat pada tepinya.



Gambar 2.5. *Spodoptera litura*, Fab. Dewasa

Sumber : Anonim, 1994.

Pada kepala terdapat sepasang antena dan pada thorax terdapat 3 pasang tungkai. Imago jantan mempunyai ukuran relatif kecil, abdomennya ramping dan ujung abdomen memiliki lebih banyak rambut halus, sedangkan betinanya mempunyai ukuran

relatif besar, abdomen gemuk dan rambut-rambutnya sedikit.

Kopulasi dapat terjadi sejak imago tersebut keluar dari pupa. Lama hidup imago betina dapat mencapai 5 – 10 hari. Total dari perkembangan spesies serangga *S.litura* sejak dari telur sampai imago yaitu antara 30 – 61 hari (Sudarmo, 1991).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual penelitian.

B.thuringiensis adalah anggota Bacillaceae dari genus *Bacillus*, merupakan bakteri pembentuk endospora dengan sel yang berbentuk batang lurus, sifat pewarnaannya Gram-positif. Endosporanya berbentuk oval atau kadang-kadang bulat atau selinder dan bersifat sangat resisten terhadap kondisi-kondisi lingkungan yang merugikan (Holt *et al.*, 1994).

Ukuran tubuhnya meliputi panjang 1.2 – 7 μm dengan diameter berkisar antara 0.3 – 2.2 μm (Laskin & Lechevalier, 1977) dan di bedakan dari genus *Bacillus* lainnya oleh kemampuannya mensintesis protein kristal (WHO, 1979; Nester, *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1994; Shieh, 1994; Soesanto, 1994; Tortora *et al.*, 1995), yang merupakan suatu glikoprotein toksik (Nester *et al.*, 1983). Meskipun sel-sel vegetatif (sel induk) dari bakteri-bakteri pembentuk endospora dapat dimatikan dengan pemanasan 80°C selama 10 menit, namun endospora termoresisten dapat bertahan pada pemanasan yang jauh lebih tinggi. Sifat ini memberikan keuntungan dalam pengembangan teknik isolasi dan pembiakan selektif dari bahan-bahan seperti tanah (Lay, 1994; Schlegel, 1994).

Menurut Dubois & Lewis (1981), bahwa toksisitas dari protein kristal (parasporal body) atau δ -endotoksin sangat spesifik, hanya toksik

terhadap serangga, tetapi aman terhadap lingkungan biotik dalam air, terhadap mamalia dan manusia.

Sifat hidup *B.thuringiensis* adalah kosmopolitan dan dapat di temukan pada habitat yang sangat luas (Chilcott & Wigley, 1994) antara lain meliputi tanah, *soil aquatic system*, tanah pada lubang batang pohon, air tempat perindukan nyamuk, serangga yang terinfeksi, permukaan daun, dan lain-lain (WHO, 1979; Blondine dkk., 1996; Widyastuti dkk., 1996; Damgaard *et al.*, 1997).

Hal yang sama dilaporkan oleh Lee & Seleena (1990), bahwa *B.thuringiensis* dapat ditemukan pada habitat tanah dan air dari berbagai sistem ekologi seperti hutan, hutan hujan, sawah, dam, rawa-rawa, rawa-rawa mangrove, danau, selokan dan kaki bukit.

Menurut Dulmage *et al.*, 1990, bahwa isolat-isolat yang berbeda dari sub-spesies *B.thuringiensis* yang sama dapat berbeda patogenitasnya terhadap serangga tertentu. Hal ini disebabkan terutama karena strain dari isolat-isolat tersebut menghasilkan jenis-jenis toksin yang berbeda.

Menurut Heimpel (1996) dalam Tanada & Kaya (1993), bahwa sedikitnya terdapat empat jenis protein toksin yang dihasilkan oleh *B.thuringiensis* yang diberi nama menurut sistem alfabetik Yunani kuno (Greek), yaitu α -exotoxin, β -exotoxin, γ -exotoxin, dan δ -endotoxin. Dari ke empat jenis toksin yang dihasilkan oleh *B.thuringiensis* tersebut, diketahui hanya γ -exotoxin yang tidak bersifat toksik terhadap serangga, sedangkan δ -endotoksin merupakan toksin dengan sifat larvasidal yang sangat tinggi. Disamping itu, isolat *B.thuringiensis* strain tertentu di

ketahui bekerja sangat spesifik pada spesies serangga tertentu dan sensitifitasnya dapat berbeda pada lokasi geografi yang berbeda (Rusmana & Hadioetomo, 1994).

3.2. Hipotesis Penelitian.

3.2.1 Terdapat perbedaan toksisitas antara isolat-isolat *Bacillus thuringiensis* hasil isolasi terhadap mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti*, Linn..

3.2.2 Terdapat perbedaan toksisitas antara isolat-isolat *Bacillus thuringiensis* hasil isolasi terhadap mortalitas larva hama *Spodoptera litura*, Fab.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimen murni, dimana rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan *Post test only control group design*, dimana ulangan/replikasi dilakukan sebanyak 5 (lima) kali. Penentuan jumlah replikasi ini dilakukan berdasarkan estimasi menggunakan rumus berikut :

$$(t-1)(r-1) \geq 20$$

Ket : t = treatment (perlakuan)

r = replication (ulangan)

4.2 Populasi dan Sampel.

Karena lingkungan teresterial (terrestrial environments) merupakan habitat yang sangat cocok untuk bakteri, maka lingkungan ini ditentukan sebagai populasi, sedangkan sampel adalah tanah-tanah lingkungan teresterial yang diambil dari 6 (enam) lokasi pengambilan (spot) masing-masing sebagai berikut : hutan, sawah, kaki bukit, lumpur mangrove, kolam dan perkebunan.

4.3 Variabel Penelitian.

4.3.1 Variabel Bebas.

Yang menjadi variabel bebas pada penelitian ini adalah toksisitas isolat-isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi dari tanah di Morotai, dengan indikator yang diamati meliputi :

- Jumlah isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi yang mengandung protein kristal δ -endotoksin.
- Jumlah isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi yang bersifat toksik terhadap larva uji nyamuk *Ae.aegypti*, Linn.
- Jumlah isolat *B.thuringiensis*, hasil isolasi yang bersifat toksik terhadap larva uji hama *S.litura*, Fab.

4.3.2 Variabel Tergantung.

Yang menjadi variabel tergantung pada penelitian ini adalah mortalitas larva nyamuk *Ae.aegypti* Linn. dan hama *S.litura* Fab., dengan parameter yang diamati adalah persen (%) mortalitas dari masing-masing larva uji.

4.3.3 Definisi Operasional Variabel.

Definisi operasional variabel pada penelitian ini dapat dijelaskan sebagai berikut :

4.3.3.1 *Bacillus thuringiensis* yang dimaksud dalam penelitian ini adalah bakteri pembentuk endospora dari genus *Bacillus*

yang mengandung protein kristal δ -endotoksin dan yang di peroleh dari hasil isolasi dari tanah di pulau Morotai.

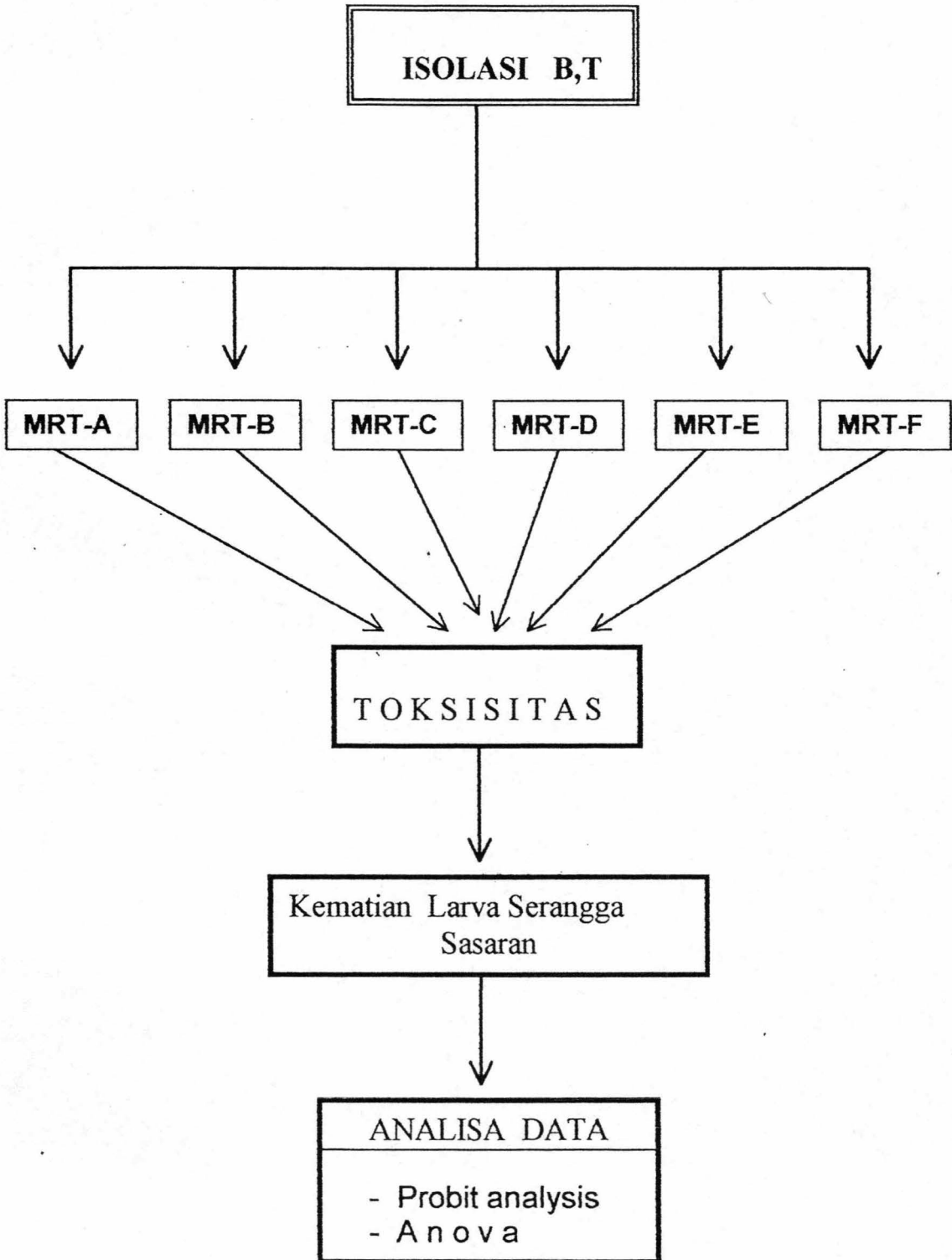
4.3.3.2 Isolat-isolat yang diperoleh diberikan nama sandi masing-masing sesuai dengan lokasi yaitu Morotai, dan jenis sampel tanah dimana tanah tersebut diambil yang dilakukan sebagai berikut :

- MRT-A adalah sandi untuk isolat dari sampel *tanah hutan*.
- MRT-B adalah sandi untuk isolat dari sampel *tanah sawah*.
- MRT-C adalah sandi untuk isolat dari sampel *tanah kaki bukit*
- MRT-D adalah sandi untuk isolat dari sampel *tanah lumpur mangrove*.
- MRT-E adalah sandi untuk isolat dari sampel *tanah kolam*.
- MRT-F adalah sandi untuk isolat dari sampel *tanah perkebunan*.
- Pemberian nomor angka latin diberikan pada setiap isolat sesuai dengan sandi isolatnya, dimaksudkan untuk menunjukkan jumlah isolat.

4.3.3.3 Toksisitas yang dimaksudkan disini adalah keefektifan dari isolat *B.thuringiensis* dalam membunuh larva nyamuk uji

Ae.aegypti dan larva hama uji *S.litura* yang dinyatakan dengan besaran LC_{50} yaitu konsentrasi *B.thuringiensis* (ml/100 ml) yang mampu membunuh 50% larva dari masing-masing serangga uji.

Bagan Alur Penelitian



4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian.

Pengambilan sampel tanah sebagai bahan dasar untuk melakukan isolasi *B.thuringiensis* berlokasi di Morotai, Maluku Utara. Pekerjaan isolasi dan uji toksisitas dari isolat-isolat yang diperoleh terhadap serangga uji dilaksanakan pada Laboratorium Biologi Dasar dan Laboratorium Hama Penyakit Fakultas Pertanian Universitas Pattimura. Penelitian ini dijadwalkan berlangsung dari bulan Juli – November 1999, pelaksanaannya seperti tabel di bawah ini :

Tabel 4.1 Jadwal Penelitian

Tahapan Kegiatan	B U L A N																				
	Juli				Agust.				Septem.				Novem.				Oktober				
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Persiapan Penelitian:																					
- Alat & Media			x	x	x	x	x														
- Laboratorium								x	x												
Pelaksanaan Lit. :																					
- Koleksi sampel										x	x										
- Isolasi & identif.												x	x	x							
- Uji hayati isolat															x	x					
Analisa Data																	x	x	x	x	

4.5 Bahan/Alat.

Bahan yang di pakai untuk penelitian ini adalah : 1). Nutrient broth, 2). Agar-agar, 3). Yeast extract, 4). Tryptose phosphat broth, 5). Latron 77, 6). Napthalene black, 7) Gurr's improve R 66 Giemsa, 8). Alkohol, 9).Aquadestilata steril, 10). Tanah, 11). Kertas saring, 12). Madu, 13). Sari buah, 14). Darah tikus 15). Daun talas, 16). Larva nyamuk *Ae.aegypti*, 17). Larva serangga *S.litura*.

Alat yang dipakai pada penelitian ini meliputi : 18). Autoclave, 19). Inkubator, 20). Jarum ose, 21). Cawan petri, 22). Tabung reaksi, 23). Gelas ukur, 24). Gelas piala, 25). Gelas erlenmeyer, 26). Pipet pasteur, 27). Gelas plastik, 28). Loyang plastik kecil, 29). Penyiduk, 30).sangkar tikus, 31). Sangkar nyamuk, 32). Lampu spritus, 33). Kantung plastik/kontainer, 34). Sendok plastik, 35). Ohaus digital balance, 36). Ohaus portable balance, 37). Pengaduk kaca, 38). Spreader/perata, 39). Hot plate, 40). Water bath, 41). Ent kas, 42). Quebeck colony counter, 43). Fortex/mixer.

4.6 Prosedur Kerja.

4.6.1 Pengambilan Sampel Tanah.

Pada masing-masing spot (hutan, sawah, kaki bukit, lumpur mangrove, kolam dan perkebunan), kurang lebih 100 gram tanah di ambil dengan menggunakan senduk plastik steril, selanjutnya di masukkan ke dalam botol steril bertutup atau kantung plastik bertutup (seal).

Masing-masing tanah tersebut di ambil dari kedalaman antara 2 – 3 cm dibawah permukaan, dimana, pada kedalaman tersebut pengaruh sinar ultra violet sudah tidak ada (Lee & Seleena, 1990). Pengambilan sampel tanah ini dilakukan pada waktu pagi hari dan tidak pada waktu turun hujan.

4.6.2 Isolasi dan Identifikasi Bacilli Patogen.

Dari 100 gram sampel tanah, diambil satu gram, selanjutnya di suspensikan dalam 9 ml air suling (aquades) steril, dikocok, kemudian dipanaskan pada suhu 70 °C selama 15 menit, dimaksudkan untuk mematikan bakteri lain terutama bakteri non-spora. Dari suspensi tersebut, dibuatkan pengenceran berseri 10^{-1} – 10^{-5} . Dari masing-masing pengenceran, di ambil 0,1 ml dan disebarakan pada medium nutrien agar dan diinkubasikan selama 48 jam. Koloni-koloni yang tumbuh terpisah dan menunjukkan ciri bacillus, di ambil dan dibuatkan preparat apusan yang dicat dengan metode Chilcott & Wigley yaitu pengecatan dengan Napthalene black selama 2 menit dan dilanjutkan dengan pengecatan dengan Gurr's improve R 66 Giemsa selama 1 menit (Chilcott & Wigley, 1988). Preparat hasil pengecatan tersebut, selanjutnya diamati pada mikroskop dengan pembesaran 1000 kali, untuk mendeteksi protein kristal toxin. Jika terdapat protein kristal, berarti koloni tersebut adalah positif bacilli patogen. Dari koloni yang positif patogen tadi, dibuatkan biakan murni dengan cara menginokulasikan bakteri

tersebut pada media nutrient agar melalui goresan kuadran (Rusmana & Hadioetomo, 1994). Biakan murni yang diperoleh selanjutnya, disimpan pada agar miring NA pada suhu 4 °C sampai isolat tersebut digunakan.

4.6.3 Uji Toksisitas Isolat Pada Larva Nyamuk *Ae. Aegypti*.

Pengujian toksisitas isolat *B.thuringiensis* pada larva nyamuk di lakukan berdasarkan prosedur Becker (1991), sebagai berikut :

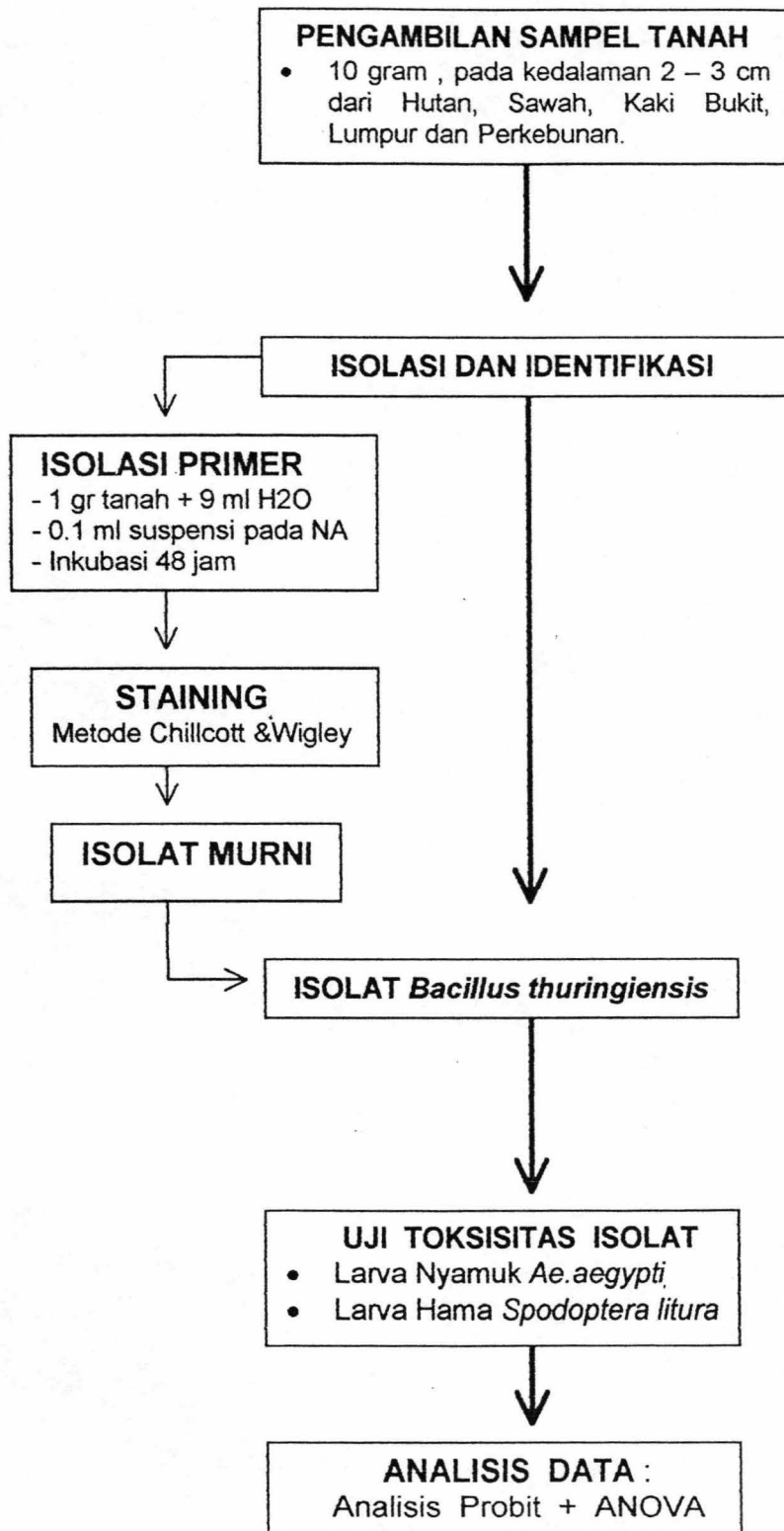
- 2 ose penuh kultur isolat dimasukkan kedalam gelas erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml suspensi nutrien broth dan dikocok dengan shaker selama 48 jam.
- Di buat kan konsentrasi berseri (5, 10, 15) dari larutan tersebut dalam gelas plastik yang diisi dengan 100 ml air.
- Ke dalam gelas-gelas plastik tersebut, dimasukkan 15 larva nyamuk *Ae.aegypti* instar III.
- Sebagai kontrol, 15 larva nyamuk *Ae.aegypti* instar III dimasukkan kedalam gelas palstik berisi 100 ml air (tanpa larutan isolat)
- Ulangan dilakukan sebanyak 5 kali
- Pengamatan terhadap mortalitas larva dilakukan setelah 24 jam dan 48 jam pendedahan.

- 2 loops full (2 ose penuh) kultur isolat hasil isolasi dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml suspensi nutrien broth dan dikocok dengan shaker selama 48 jam.
- Dibuatkan konsentrasi (5, 10, 15) dari larutan tersebut dan dimasukkan ke dalam gelas piala 250 ml yang berisi 100 ml larutan nutrien broth
- Suspensi yang mengandung isolat *B.thuringiensis*, kemudian ditambahkan 4 permil latron 77, bertujuan untuk membantu meratakan dan merekatkan protein kristal toxin pada permukaan daun.
- Potongan daun talas berdimensi 5 x 5 cm, masing-masing dicelupkan ke dalam suspensi, kemudian dikering udarkan.
- Sebagai kontrol digunakan potongan daun yang dicelupkan ke dalam nutrient broth steril.
- Larva yang digunakan dalam uji ini adalah larva instar IV, sebanyak 15 ekor, yang ditempatkan dalam cawan petri yang telah diberi kertas serap dan daun yang telah dicelupkan dalam suspensi bakteri yang mengandung 4 permil latron 77.
- Pengamatan terhadap kematian larva dilakukan setiap 24 jam selama 2 hari (2 x 24 jam).
- Ulangan dilakukan sebanyak 5 kali.

4.7 Analisis Data.

Data penelitian dianalisis dengan menggunakan analisis Probit (Finney, 1971), yaitu untuk menentukan konsentrasi minimal yang dapat membunuh 50 % larva serangga uji (LC_{50}) dan 90 % (LC_{90}). Selanjutnya tingkat keberartian kematian masing-masing larva uji dianalisis dengan Analisis varians satu arah (anova one way) dan dilanjutkan dengan uji BNT.

BAGAN RINGKASAN PROSEDUR PENELITIAN



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian.

Isolasi *Bacillus* penghasil protein kristal δ -endotoksin dari 6 jenis tanah pada 6 lokasi ekologi pulau Morotai, masing-masing tanah hutan, tanah sawah, tanah kaki bukit, tanah rawa mangrove, tanah kolam dan tanah perkebunan, diperoleh hasil bahwa ke 6 jenis tanah yang diisolasi seluruhnya ditemukan *Bacillus* penghasil protein kristal δ -endotoksin yang dikenal dengan *Bacillus thuringiensis* (tabel 5.1).

Table 5.1 Hasil Isolasi *B.thuringiensis* dari Tanah.

No	Lokasi	Jenis Tanah	Σ sampel	Isolat
1.	Sabatai	Hutan	1	+
2.	Pilowo	Sawah	1	+
3.	Daruba	Kaki bukit	1	+
4.	Daruba	Mangrove	1	+
5.	Darame	Kolam	1	+
6.	Darame	Perkebunan	1	+

Keterangan : + = Isolat memiliki protein kristal δ -endotoksin (*B.thuringiensis*)

5.1.1 Jumlah Isolat *B.thuringiensis*.

Pencarian isolat bakteri penghasil "*Insecticidal crystal protein*" (ICP) dilakukan dengan mengisolasi terhadap ke 6 jenis tanah pulau Morotai (tabel 5.1), berhasil di temukan sebanyak 409 isolat bakteri pembentuk endospora, setelah dilakukan pengecatan (staining) mempergunakan metode Chilcott & Wigley (1988), 21 isolat diantaranya (5,13 %) di temukan merupakan bakteri yang mampu mensistesis protein kristal insektisidal atau δ -endotoksin (tabel 5. 2).

Tabel 5.2. Jumlah Isolat *B.thuringiensis* Hasil Isolasi dari Tanah.

Jenis Tanah	Sandi Isolat	Σ Isolat	BT	%
Hutan	MRT – A	46	1	2,17
Sawah	MRT – B	62	4	6,45
Kaki Bukit	MRT – C	84	4	4,76
Rawa Mangrove	MRT – D	51	2	3,92
Kolam	MRT – E	77	4	5,55
Perkebunan	MRT – F	89	6	6,74
T o t a l		409	21	5,13

Keterangan : BT = *Bacillus thuringiensis*.

Berdasarkan tabel di atas, jumlah isolat yang positif sebagai *B.thuringiensis* bervariasi pada masing-masing jenis tanah yaitu antara 1 – 6 isolat atau 2,17 % — 6,74 %. Persentase jumlah isolat

B.thuringiensis terendah ditemukan pada tanah hutan dan tertinggi di temukan pada tanah perkebunan.

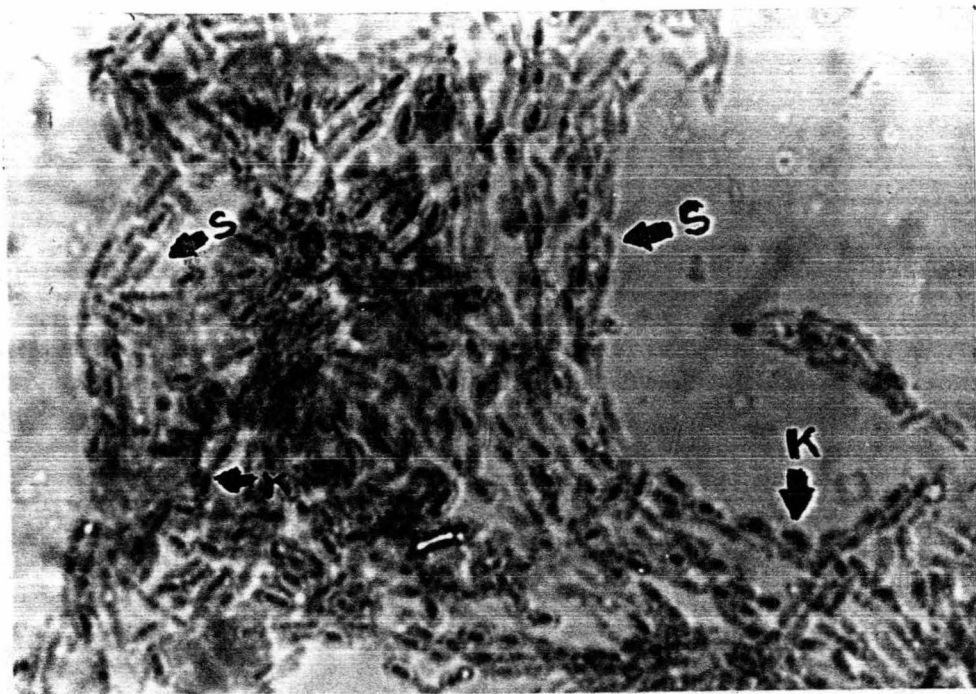
Sementara itu, hasil pengecatan (staining) memperlihatkan bahwa protein kristal insektisidal (δ -endotoksin) *B.thuringiensis* tercat berwarna hitam, sedangkan endosporanya tercat berwarna ungu. (gambar 5.1). Dari hasil pengecatan juga, terlihat paling sedikit ada 4 bentuk kristal protein masing-masing bentuk oval, bentuk bulat, bentuk speris, bentuk persegi dan bentuk tidak beraturan (amorf).

5.1.2 Uji Toksisitas Isolat (Bioassay) Terhadap Larva Uji.

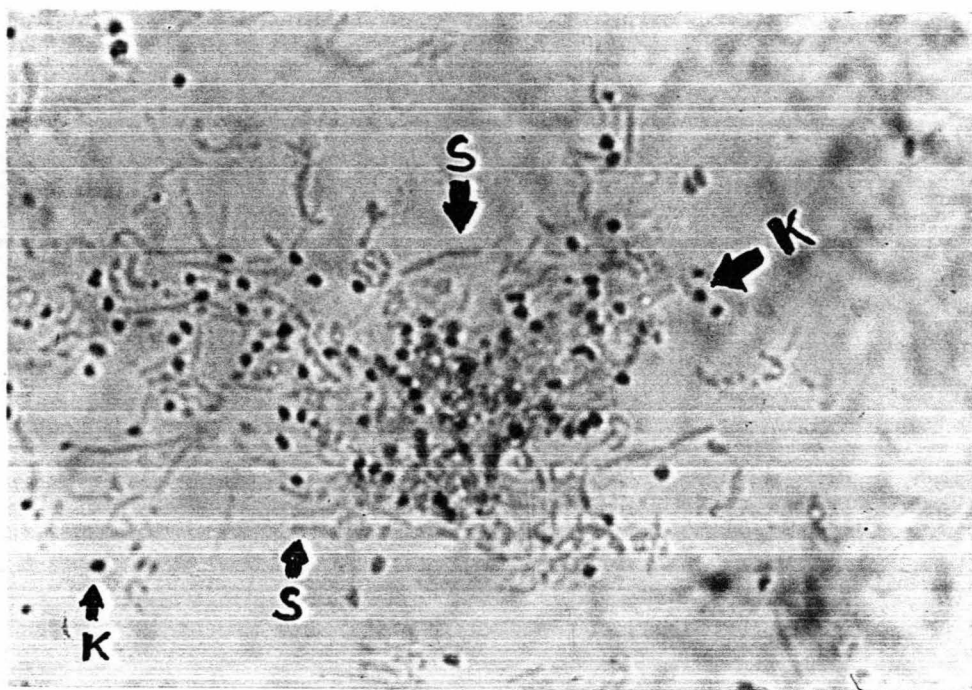
Uji toksisitas (bioassay) bertujuan untuk mengetahui daya bunuh (toksisitas) masing-masing isolat hasil isolasi dari tanah terhadap larva serangga uji (*Ae.aegypti* dan *S.litura*).

Bioassay dilaksanakan masing-masing dengan menggunakan 4 tingkatan konsentrasi isolat yaitu 0.15, 0.10, 0.05 dan 0.00. Konsentrasi isolat di buat dengan cara melakukan pengenceran terhadap larutan induk isolat, setelah diinkubasi sambil digoyang selama 48 jam.

Data bioassay isolat-isolat (21 isolat) terhadap larva serangga uji *Ae.aegypti* tersaji lengkap dalam lampiran 1 , sedangkan terhadap larva serangga uji *S.litura* tersaji lengkap dalam lampiran 2 .



Gambar 5.1 Kristal Protein *Bacillus thuringiensis* hasil isolasi (1000 x)
 Pewarnaan : Naphtalene black + Giemsa
 K = kristal, S = spora



Gambar 5.2 Kristal *Bacillus thuringiensis* hasil isolasi (1000 x)
 Pewarnaan : Naphtalene black + Giemsa
 K = kristal, S = spora)

5.1.2.1 Bioassay Terhadap Larva *Ae.aegypti*.

Berdasarkan data pada lampiran 1 menunjukkan bahwa dari 21 isolat, hanya ada 4 isolat yang mampu membunuh lebih dari 50 % larva *Ae.aegypti* yang diujikan. Ke 4 isolat tersebut adalah isolat MRT-B.02, isolat MRT-B.03, isolat MRT-B.04 dan isolat MRT-C.02. Data toksisitas dari masing-masing isolat tersebut tersaji dalam tabel 5.3, 5.4, 5.5 dan 5.6.

Tabel 5.3. Toksisitas Isolat MRT – B.02 Terhadap Larva *Ae.aegypti*.

W	R	0.15			0.10			0.05			0.00		
		M	T	%	M	T	%	M	T	%	M	T	%
24 J A M	1	0	15	0	3	15	20.0	2	15	13.3	0	15	0
	2	0	15	0	3	15	20.0	2	15	13.3	0	15	0
	3	0	15	0	4	15	26.6	2	15	13.3	0	15	0
	4	0	15	0	2	15	13.3	2	15	13.3	0	15	0
	5	0	15	0	3	15	20.0	2	15	13.3	0	15	0
Rerata		0	-	0	3	-	20.0	2	-	13.3	0	-	0
48 J A M	1	6	15	40.0	8	15	53.3	8	15	53.3	0	15	0
	2	6	15	40.0	8	15	53.3	8	15	53.3	0	15	0
	3	6	15	40.0	9	15	60.0	8	15	53.3	0	15	0
	4	6	15	40.0	7	15	46.6	8	15	53.3	0	15	0
	5	6	15	40.0	8	15	53.3	8	15	53.3	0	15	0
Rerata		6	-	40.0	8	-	53.3	8	-	53.3	0	-	0

Keterangan : M = mortalitas larva, T = total larva yang diujikan
W = waktu pengamatan R = replikasi

Dari tabel di atas menunjukkan bahwa isolat MRT-B.02 bersifat toksik terhadap larva *Ae.aegypti* terutama pada konsentrasi isolat 0.10 dan 0.05 yang mencapai rata-rata 53.3 % dalam waktu pendedahan 48 jam. Sementara pendedahan 24 jam toksin isolat belum bekerja efektif.

Pada kedua konsentrasi di atas terlihat bahwa sudah setengah jumlah larva yang di dedahkan mati (rata-rata 8 dari total 15 larva), sementara pada konsentrasi 0,15 hanya mampu membunuh 30 % larva, sedangkan konsentrasi 0.00 (kontrol) tidak ada larva yang mati. Toksisitas isolat ini tampaknya lebih efektif pada konsentrasi 0,05 walaupun pada replikasi ke 3 dari konsentrasi 0,10 jumlah larva yang mati mencapai 60 % (9 larva dari 15 larva terdedah).

Tabel 5.4. Toksisitas Isolat MRT – B.03 Terhadap Larva *Ae.aegypti*.

W	R	0.15			0.10			0.05			0.00		
		M	T	%	M	T	%	M	T	%	M	T	%
24 J A M	1	14	15	93.3	14	15	93.3	11	15	73.3	0	15	0
	2	13	15	86.6	14	15	93.3	12	15	80.0	0	15	0
	3	13	15	86.6	14	15	93.3	12	15	80.0	0	15	0
	4	12	15	80.0	14	15	93.3	13	15	86.6	0	15	0
	5	13	15	86.6	14	15	93.3	12	15	80.0	0	15	0
Rerata		13	-	86.6	14	-	93.3	12	-	80.0	0	-	0
48 J A M	1	15	15	100	15	15	100	14	15	93.3	0	15	0
	2	14	15	93.3	15	15	100	14	15	93.3	0	15	0
	3	14	15	93.3	15	15	100	14	15	93.3	0	15	0
	4	12	15	80.0	15	15	100	14	15	93.3	0	15	0
	5	15	15	100	15	15	100	14	15	93.3	0	15	0
Rerata		14	-	93.3	15	-	100	14	-	93.3	0	-	0

Keterangan : sda tabel 5.3

Dari tabel di atas menunjukkan bahwa isolat MRT-B.03 bersifat sangat toksik terhadap larva *Ae.aegypti*, pada konsentrasi isolat 0.15, 0.10 dan 0.05 waktu pendedahan 24 jam jumlah larva yang mati rata-rata antara 80 – 93.3 %, dimana jumlah kematian tertinggi dijumpai pada konsentrasi isolat 0.10. Pada konsentrasi ini nampaknya daya kerja

toksin isolat MRT-B.03 terhadap larva lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi lainnya, karena pada pendedahan 48 jam seluruh larva terdedah (15 larva atau 100%) telah mati sementara konsentrasi 0.05 dan 0.15 jumlah larva yang mati adalah 93.3 %, walaupun pada replikasi ke 1 dan ke 5 konsentrasi 0.15 nampak 100 % larva telah mati.

Pada konsentrasi isolat 0.00 (kontrol) tidak ada larva yang mati baik pada waktu pendedahan 24 maupun 48 jam.

Tabel 5.5. Toksisitas Isolat MRT – B.04 Terhadap Larva *Ae.aegypti*.

W	R	0.15			0.10			0.05			0.00		
		M	T	%	M	T	%	M	T	%	M	T	%
24 J A M	1	10	15	66.6	1	15	6.6	7	15	46.6	0	15	0
	2	10	15	66.6	3	15	20.0	7	15	46.6	0	15	0
	3	9	15	60.0	2	15	13.3	7	15	46.6	0	15	0
	4	10	15	66.6	2	15	13.3	7	15	46.6	0	15	0
	5	11	15	73.3	2	15	13.3	7	15	46.6	0	15	0
Rerata		10	-	66.6	2	-	13.3	7	-	46.6	0	-	0
48 J A M	1	15	15	100	14	15	93.3	9	15	60.0	0	15	0
	2	15	15	100	13	15	86.6	9	15	60.0	0	15	0
	3	15	15	100	12	15	80.0	9	15	60.0	0	15	0
	4	15	15	100	13	15	86.6	9	15	60.0	0	15	0
	5	15	15	100	13	15	86.6	9	15	60.0	0	15	0
Rerata		15	-	100	13	-	86.6	9	-	60.0	0	-	0

Keterangan : sda tabel 5.3

Dari tabel di atas menunjukkan bahwa isolat MRT-B.04 bersifat toksik terhadap larva *Ae.aegypti*, terutama terlihat pada konsentrasi isolat 0.15, waktu pendedahan 24 jam jumlah larva yang mati rata-rata 66.6 % (lebih dari separuh larva terdedah telah mati), dimana pada konsentrasi

isolat 0.10 dan 0.05 persentase larva yang mati baru 13.3 % dan 46.6 %.

Pada konsentrasi ini (0.15) waktu pendedahan 48 jam nampak seluruh atau 100 % larva terdedah telah mati. Sementara pada konsentrasi isolat 0.10 dan 0.05 dengan waktu dedah yang sama rata-rata jumlah larva yang mati adalah 86.6 % dan 60.0 %.

Pada konsentrasi isolat 0.00 (kontrol) tidak ada larva yang mati baik pada waktu pendedahan 24 maupun 48 jam.

Tabel 5.6. Toksisitas Isolat MRT – C.02 Terhadap Larva *Ae.aegypti*.

W	R	0.15			0.10			0.05			0.00		
		M	T	%	M	T	%	M	T	%	M	T	%
24 J A M	1	5	15	33.3	5	15	33.3	1	15	6.6	0	15	0
	2	5	15	33.3	5	15	33.3	1	15	6.6	0	15	0
	3	5	15	33.3	5	15	33.3	1	15	6.6	0	15	0
	4	5	15	33.3	5	15	33.3	1	15	6.6	0	15	0
	5	5	15	33.3	5	15	33.3	1	15	6.6	0	15	0
Rerata		5	-	33.3	5	-	33.3	1	-	6.6	0	-	0
48 J A M	1	13	15	86.6	15	15	100	9	15	60.0	0	15	0
	2	13	15	86.6	15	15	100	9	15	60.0	0	15	0
	3	13	15	86.6	15	15	100	9	15	60.0	0	15	0
	4	13	15	86.6	15	15	100	9	15	60.0	0	15	0
	5	13	15	86.6	15	15	100	9	15	60.0	0	15	0
Rerata		13	-	86.6	15	-	100	9	-	60.0	0	-	0

Keterangan : sda tabel 5.3

Dari tabel di atas menunjukkan bahwa isolat MRT-C.02 bersifat toksik terhadap larva *Ae.aegypti*. Pada konsentrasi isolat 0.10, waktu pendedahan 48 jam, 100 % larva yang didedahkan sudah mati, sementara pada konsentrasi 0.05 dan 0.15 larva yang mati mencapai rata-rata 60 % dan 86.6 %.

Nampak toksin isolat ini baru efektif bekerja setelah waktu pendedahan 24 jam, karena jumlah larva yang mati pada waktu pendedahan 24 jam ini rata-rata baru 6.6 % dan 33.3 %. Pada konsentrasi isolat 0.00 (kontrol) tidak ada larva yang mati baik pada pendedahan 24 maupun 48 jam.

5.1.2.2 Bioassay Terhadap Larva *S.litura*.

Berdasarkan data pada lampiran 2 menunjukkan bahwa dari 21 isolat hanya ada 6 isolat yang mampu membunuh lebih dari 50 % larva *S.litura* yang diujikan. Ke 6 isolat tersebut masing-masing adalah isolat MRT-C.04, isolat MRT-D.01, isolat MRT-D.02, isolat MRT-E.03, isolat MRT- E.04 dan isolat MRT-F.01. Data toksisitas dari masing-masing isolat tersebut tersaji dalam tabel 5.7 – 5.12.

Tabel 5.7. Toksisitas Isolat MRT – C.04 Terhadap Larva *S.litura*.

W	R	0.15			0.10			0.05			0.00		
		M	T	%	M	T	%	M	T	%	M	T	%
24 J A M	1	8	15	53.3	7	15	46.6	5	15	33.3	0	15	0
	2	8	15	53.3	7	15	46.6	5	15	33.3	0	15	0
	3	9	15	60.0	7	15	46.6	5	15	33.3	0	15	0
	4	7	15	46.6	7	15	46.6	5	15	33.3	0	15	0
	5	8	15	53.3	7	15	46.6	5	15	33.3	0	15	0
	Rerata	8	-	53.3	7	-	46.6	5	-	33.3	0	-	0
48 J A M	1	8	15	53.3	8	15	53.3	6	15	40.0	0	15	0
	2	10	15	66.6	8	15	53.3	6	15	40.0	0	15	0
	3	10	15	66.6	8	15	53.3	6	15	40.0	0	15	0
	4	8	15	53.3	8	15	53.3	6	15	40.0	0	15	0
	5	9	15	60.0	8	15	53.3	6	15	40.0	0	15	0
	Rerata	9	-	60.0	8	-	53.3	6	-	40.0	0	-	0

Keterangan : sda tabel 5.3

Dari tabel di atas menunjukkan bahwa isolat MRT-C.04 bersifat toksik terhadap larva *S.litura* terutama pada aplikasi dengan konsentrasi isolat 0.10 dan 0.15 yang dapat membunuh rata-rata 53.3 % dan 60 % dari total larva yang didedahkan dalam waktu pendedahan 48 jam. Sementara pada aplikasi dengan konsentrasi isolat 0.05 hanya dapat membunuh maksimum 40 % dari total larva yang didedahkan. Aplikasi dengan konsentrasi 0.15 lebih efektif dibandingkan dengan dua konsentrasi lainnya, pada waktu pendedahan 24 jam saja sudah dapat membunuh 60 % larva (replikasi ke 3) dan pada 48 jam pendedahan mencapai 66.6 % (replikasi ke 2 dan 3), sementara dua konsentrasi lainnya hanya membunuh 33.3 % dan 46.6 % larva (24 jam pendedahan).

Pada konsentrasi 0.00 (kontrol) tidak di temukan larva yang mati, baik 24 jam maupun 48 jam pendedahan.

Tabel 5.8. Toksisitas Isolat MRT – D.01 Terhadap Larva *S.litura*.

W	R	0.15			0.10			0.05			0.00		
		M	T	%	M	T	%	M	T	%	M	T	%
24 J A M	1	10	15	66.6	10	15	66.6	6	15	40.0	0	15	0
	2	13	15	86.6	10	15	66.6	6	15	40.0	0	15	0
	3	11	15	73.3	9	15	60.0	6	15	40.0	0	15	0
	4	11	15	73.3	11	15	73.3	6	15	40.0	0	15	0
	5	10	15	66.6	10	15	66.6	6	15	40.0	0	15	0
	Rerata	11	-	73.3	10	-	66.6	6	-	40.0	0	-	0
48 J A M	1	10	15	66.6	10	15	66.6	6	15	40.0	0	15	0
	2	13	15	86.6	10	15	66.6	6	15	40.0	0	15	0
	3	11	15	73.3	9	15	60.0	6	15	40.0	0	15	0
	4	11	15	73.3	11	15	73.3	6	15	40.0	0	15	0
	5	10	15	66.6	10	15	66.6	6	15	40.0	0	15	0
	Rerata	11	-	73.3	10	-	66.6	6	-	40.0	0	-	0

Dari tabel di atas menunjukkan bahwa isolat MRT-D.01 bersifat toksik terhadap larva *S.litura* terutama pada aplikasi dengan konsentrasi isolat 0.15 yang dapat membunuh 86.6 % larva (replikasi ke 2), tetapi secara rata-rata membunuh 73.3 % dengan waktu pendedahan 24 jam. Sementara pada aplikasi dengan konsentrasi isolat 0.10 dapat membunuh maksimum 73.3 % (replikasi ke 4), rata-rata 66.6 % dari total larva yang di dedahkan. Sedangkan aplikasi dengan konsentrasi 0.05 hanya membunuh 40 % larva. Toksin isolat ini tampaknya hanya bekerja efektif pada 24 jam pendedahan, pada 48 jam pendedahan tidak bertambah larva yang mati.

Pada konsentrasi 0.00 (kontrol) tidak di temukan larva yang mati, baik 24 jam maupun 48 jam pendedahan.

Tabel 5.9. Toksisitas Isolat MRT – D.02 Terhadap Larva *S.litura*.

W	R	0.15			0.10			0.05			0.00		
		M	T	%	M	T	%	M	T	%	M	T	%
24 J A M	1	10	15	66.6	9	15	60.0	10	15	66.6	0	15	0
	2	10	15	66.6	9	15	60.0	9	15	60.0	0	15	0
	3	14	15	93.3	9	15	60.0	10	15	66.6	0	15	0
	4	9	15	60.0	9	15	60.0	7	15	46.6	0	15	0
	5	12	15	80.0	9	15	60.0	9	15	60.0	0	15	0
Rerata		11	-	73.3	9	-	60.0	9	-	60.0	0	-	0
48 J A M	1	11	15	73.3	11	15	73.3	11	15	73.3	0	15	0
	2	11	15	73.3	11	15	73.3	10	15	66.6	0	15	0
	3	15	15	100	11	15	73.3	11	15	73.3	0	15	0
	4	11	15	73.3	11	15	73.3	7	15	46.6	0	15	0
	5	12	15	80.0	11	15	73.3	11	15	73.3	0	15	0
Rerata		12	-	80.0	11	-	73.3	10	-	66.6	0	-	0

Dari tabel di atas menunjukkan bahwa isolat MRT-D.01 bersifat toksik terhadap larva *S.litura* terutama pada aplikasi dengan konsentrasi isolat 0.15 yang dapat membunuh 86.6 % larva (replikasi ke 2), tetapi secara rata-rata membunuh 73.3 % dengan waktu pendedahan 24 jam. Sementara pada aplikasi dengan konsentrasi isolat 0.10 dapat membunuh maksimum 73.3 % (replikasi ke 4), rata-rata 66.6 % dari total larva yang di dedahkan. Sedangkan aplikasi dengan konsentrasi 0.05 hanya membunuh 40 % larva. Toksin isolat ini tampaknya hanya bekerja efektif pada 24 jam pendedahan, pada 48 jam pendedahan tidak bertambah larva yang mati.

Pada konsentrasi 0.00 (kontrol) tidak di temukan larva yang mati, baik 24 jam maupun 48 jam pendedahan.

Tabel 5.9. Toksisitas Isolat MRT – D.02 Terhadap Larva *S.litura*.

W	R	0.15			0.10			0.05			0.00		
		M	T	%	M	T	%	M	T	%	M	T	%
24 J A M	1	10	15	66.6	9	15	60.0	10	15	66.6	0	15	0
	2	10	15	66.6	9	15	60.0	9	15	60.0	0	15	0
	3	14	15	93.3	9	15	60.0	10	15	66.6	0	15	0
	4	9	15	60.0	9	15	60.0	7	15	46.6	0	15	0
	5	12	15	80.0	9	15	60.0	9	15	60.0	0	15	0
Rerata		11	-	73.3	9	-	60.0	9	-	60.0	0	-	0
48 J A M	1	11	15	73.3	11	15	73.3	11	15	73.3	0	15	0
	2	11	15	73.3	11	15	73.3	10	15	66.6	0	15	0
	3	15	15	100	11	15	73.3	11	15	73.3	0	15	0
	4	11	15	73.3	11	15	73.3	7	15	46.6	0	15	0
	5	12	15	80.0	11	15	73.3	11	15	73.3	0	15	0
Rerata		12	-	80.0	11	-	73.3	10	-	66.6	0	-	0

Dari tabel di atas menunjukkan bahwa isolat MRT-D.02 bersifat sangat toksik terhadap larva *S.litura*. Tampaknya ke 3 tingkat konsentrasi yang di aplikasikan memiliki toksisitas cukup tinggi, tetapi konsentrasi 0.15 jauh lebih tinggi yaitu dapat membunuh 100 % larva uji (replikasi ke 3 pendedahan 48 jam) dengan rata-rata 80%, sementara pada aplikasi dengan konsentrasi 0.10 dapat membunuh rata-rata 73.3% larva dan konsentrasi 0.05 dapat membunuh rata-rata 66.6 % (waktu pendedahan 48 jam. Untuk waktu pendedahan 24 jam terlihat bahwa toksin isolat ini sudah bekerja efektif, yakni kematian larva yang telah mencapai rata-rata 60 % dan 73.3 % dari total 15 larva yang didedahkan.

Pada konsentrasi 0.00 (kontrol) tidak di temukan larva yang mati, baik 24 jam maupun 48 jam pendedahan.

Tabel 5.10. Toksisitas Isolat MRT – E.03 Terhadap Larva *S.litura*.

W	R	0.15			0.10			0.05			0.00		
		M	T	%	M	T	%	M	T	%	M	T	%
24 J A M	1	13	15	86.6	10	15	66.6	7	15	46.6	0	15	0
	2	14	15	93.3	11	15	73.3	7	15	46.6	0	15	0
	3	13	15	86.6	11	15	73.3	8	15	53.3	0	15	0
	4	12	15	80.0	12	15	80.0	7	15	46.6	0	15	0
	5	13	15	86.6	11	15	73.3	6	15	40.0	0	15	0
Rerata		13	-	86.6	11	-	73.3	7	-	46.6	0	-	0
48 J A M	1	13	15	86.6	10	15	66.6	7	15	46.6	0	15	0
	2	14	15	93.3	11	15	73.3	7	15	46.6	0	15	0
	3	13	15	86.6	11	15	73.3	8	15	53.3	0	15	0
	4	12	15	80.0	12	15	80.0	7	15	46.6	0	15	0
	5	13	15	86.6	11	15	73.3	6	15	46.6	0	15	0
Rerata		13	-	86.6	11	-	73.3	7	-	46.6	0	-	0

Keterangan : sda tabel 5.3

Dari tabel di atas menunjukkan bahwa isolat MRT-E.03 bersifat toksik terhadap larva *S.litura*. Tampaknya toksisitas dari ke 3 konsentrasi isolat yang di aplikasikan, konsentrasi 0.15 dan 0.10 memiliki toksisitas tinggi, sedangkan konsentrasi 0.05 menunjukkan toksisitas yang rendah (< 50 %). Pada aplikasi dengan konsentrasi 0.15 jumlah larva yang mati rata-rata 86.6 %, tertinggi 93.3 % pada replikasi ke 2. Sementara aplikasi dengan konsentrasi 0.10 jumlah larva yang mati rata-rata 73.3 %, tertinggi 80 % pada replikasi ke 4, sedangkan aplikasi dengan konsentrasi 0.05 , rata-rata larva yang mati hanya 46.6 %, tertinggi 53.3 % pada replikasi ke 3. Semua ini di peroleh dalam waktu pendedahan 24 jam, dimana setelah 48 jam pendedahan, tidak di temukan lagi larva yang mati. Pada konsentrasi 0.00 (kontrol) tidak ditemukan larva yang mati, baik 24 jam maupun 48 jam pendedahan.

Tabel 5.11. Toksisitas Isolat MRT – E.04 Terhadap Larva *S.litura*.

W	R	0.15			0.10			0.05			0.00		
		M	T	%	M	T	%	M	T	%	M	T	%
24 J A M	1	15	15	100	13	15	86.6	10	15	66.6	0	15	0
	2	15	15	100	13	15	86.6	10	15	66.6	0	15	0
	3	15	15	100	12	15	80.0	10	15	66.6	0	15	0
	4	15	15	100	13	15	86.6	10	15	66.6	0	15	0
	5	15	15	100	14	15	93.3	10	15	66.6	0	15	0
Rerata		15	-	100	13	-	86.6	10	-	66.6	0	-	0
48 J A M	1	-	-	-	14	15	93.3	11	15	73.3	0	15	0
	2	-	-	-	14	15	93.3	11	15	73.3	0	15	0
	3	-	-	-	13	15	86.6	11	15	73.3	0	15	0
	4	-	-	-	14	15	93.3	11	15	73.3	0	15	0
	5	-	-	-	15	15	100	11	15	73.3	0	15	0
Rerata		-	-	-	14	-	93.3	11	-	73.3	0	-	0

Keterangan : sda tabel 5.3

Dari tabel di atas menunjukkan bahwa isolat MRT-E.04 sangat toksik terhadap larva *S.litura*. Tampak bahwa aplikasi dengan konsentrasi 0.15 waktu pendedahan 24 jam, 100 % larva yang didedahkan telah mati, sementara konsentrasi 0.10 telah mencapai rata-rata 86.6 %, tertinggi 93.3 % pada replikasi ke 5. Untuk 48 jam pendedahan, jumlah larva yang mati rata-rata 93.3 %, tertinggi 100 %, pada replikasi ke 5, konsentrasi 0.10 dan 73.3 % konsentrasi 0.05.

Pada konsentrasi 0.00 (kontrol) tidak di temukan larva yang mati, baik 24 jam maupun 48 jam pendedahan.

Dibandingkan dengan isolat-isolat lainnya isolat MRT – E.04 ini lebih toksik terhadap larva *S.litura*.

Tabel 5.12 Toksisitas Isolat MRT – F.01 Terhadap Larva *S.litura*.

W	R	0.15			0.10			0.05			0.00		
		M	T	%	M	T	%	M	T	%	M	T	%
24 J A M	1	14	15	93.3	11	15	66.6	8	15	53.3	0	15	0
	2	14	15	93.3	11	15	66.6	8	15	53.3	0	15	0
	3	13	15	86.6	11	15	66.6	9	15	60.0	0	15	0
	4	15	15	100	11	15	66.6	7	15	46.6	0	15	0
	5	14	15	93.3	11	15	66.6	8	15	53.3	0	15	0
Rerata		14	-	93.3	11	-	66.6	8	-	53.3	0	-	0
48 J A M	1	14	15	93.3	13	15	86.6	8	15	53.3	0	15	0
	2	14	15	93.3	13	15	86.6	8	15	53.3	0	15	0
	3	13	15	86.6	13	15	86.6	9	15	60.0	0	15	0
	4	15	15	100	13	15	86.6	7	15	46.6	0	15	0
	5	14	15	93.3	13	15	86.6	8	15	53.3	0	15	0
Rerata		14	-	93.3	13	-	86.6	8	-	53.3	0	-	0

Keterangan : sda tabel 5.3

Dari tabel di atas menunjukkan bahwa isolat MRT-F.01 sangat toksik terhadap larva *S.litura*. Dari ke 3 konsentrasi isolat yang diaplikasikan menunjukkan toksisitasnya sangat tinggi. Aplikasi dengan konsentrasi 0.15 rata-rata membunuh 93.3 % larva, tertinggi 100 % pada replikasi ke 4 waktu pendedahan 24 jam (pendedahan 48 jam tidak berubah), sedangkan aplikasi dengan konsentrasi 0.10, rata-rata membunuh 66.6 %, (pendedahan 24 jam) dan 86.6 % (pendedahan 48 jam), sementara untuk aplikasi dengan konsentrasi 0.05 dapat membunuh rata-rata 53.3 %, tertinggi 60 % pada replikasi ke 3 waktu pendedahan 24 jam (pendedahan 48 jam tidak berubah) .

Pada konsentrasi 0.00 (kontrol) tidak ditemukan larva yang mati, baik 24 jam maupun 48 jam pendedahan. .

5.2 Analisis Hasil Penelitian.

5.2.1 Analisis Probit

Uji toksisitas (bioassay) dengan pendekatan statistik diukur melalui LC_{50} yaitu konsentrasi toksikan yang dapat membunuh 50 % larva serangga uji. Analisis statistik yang digunakan adalah analisis probit. Analisis ini didasarkan pada pengamatan jumlah kematian larva serangga uji untuk konsentrasi 0.15, 0.10 dan 0.05 dengan waktu pengamatan 24 jam dan 48 jam. Data hasil pengamatan terlampir (lamp-1 dan 2). Hasil analisis untuk masing-masing isolat dengan konsentrasi disajikan dalam tabel-tabel berikut :

Tabel 5.13 Rerata Nilai LC_{50} dan LC_{90} (95% CL) Isolat-Isolat Yang Toksik Terhadap Larva Uji *Ae.aegypti* (waktu 48 Jam)

Isolat	LC_{50} (ml/100 ml)	LC_{90} (ml/100 ml)
MRT-B.02	1.46363 0,00000 – 0,00000	2.74840 0,00000 – 0,00000
MRT-B.03	1.46363 0,00000 – 0,00000	2.74840 0,00000 – 0,00000
MRT-B.04	0.80968 0,00000 – 0,00000	1.54080 0,00000 – 0,00000
MRT-C.02	1.46363 0,12890 – 0,34849	2.74840 0,19781 – 0,73094

Berdasarkan analisis probit yang datanya tersaji pada tabel 5.13 diatas, di peroleh rerata nilai LC_{50} dan LC_{90} (95% CL) masing-masing untuk isolat MRT-B.02, adalah 1,46363 ml/100 ml dan 2,74840 ml/100 ml, artinya bahwa pada konsentrasi 1,46363 ml/100 ml isolat MRT-B.02 dapat membunuh 50% larva uji *Ae.aegypti*, dan pada konsentrasi 2,74840 ml/100 ml isolat MRT-B.02, dapat membunuh 90% larva uji *Ae.aegypti* pada kondisi laboratorium.

Untuk isolat MRT-B.03, adalah 0.04606 ml/100 ml dan 0.11489 ml/100 ml, artinya bahwa pada konsentrasi 0.04606 ml/100 ml isolat MRT-B.03, dapat membunuh 50% larva uji *Ae.aegypti*, dan pada konsentrasi 0.11489 ml/100 ml isolat MRT-B.03 dapat membunuh 90% larva uji *Ae.aegypti* pada kondisi laboratorium.

Untuk isolat MRT-B.04 adalah 0.12766 ml/100 ml dan 0.24750 ml/100 ml, artinya bahwa pada konsentrasi 0.12766 ml/100 ml isolat MRT-B.04, dapat membunuh 50% larva uji *Ae.aegypti*, dan pada konsentrasi 0.24750 ml/100

ml isolat MRT-B.04, dapat membunuh 90% larva uji *Ae.aegypti* pada kondisi laboratorium.

Untuk isolat MRT-C.02 adalah 0.16740 ml/100 ml dan 0.27424 ml/100 ml, artinya bahwa pada konsentrasi 0.16740 ml/100 ml isolat MRT-C.02, dapat membunuh 50% larva uji *Ae.aegypti*, dan pada konsentrasi 0.27424 ml/100 ml isolat MRT-C.02, dapat membunuh 90% larva uji *Ae.aegypti* pada kondisi laboratorium.

Tabel 5.14 Rerata Nilai LC_{50} dan LC_{90} (95% CL) Isolat-Isolat yang Toksik Terhadap Larva Uji *S.litura* (waktu 48 Jam)

ISOALAT	LC_{50} (ml/100 ml)	LC_{90} (ml/100 ml)
MRT-C.04	0.12243 0,09057 – 0,19725	0.23842 0,17559 – 0,49345
MRT-D.01	0.08796 0,00000 – 0,00000	0.17260 0,00000 – 0,00000
MRT-D.02	0.08068 0,00000 – 0,00000	0.18083 0,00000 – 0,00000
MRT-E.03	0.07322 0,04995 – 0,9485	0.14158 0,11552 – 0,19615
MRT-E.04	0.05024 0,00000 – 0,00000	0.09246 0,00000 – 0,00000
MRT-F.01	0.06632 0,04434 – 0,08615	0.12750 0,10421 – 0,17443

Berdasarkan analisis probit yang datanya tersaji pada tabel 5.14 diatas, di peroleh rerata nilai LC_{50} dan LC_{90} masing-masing untuk isolat MRT-C.04 adalah 0.12243 ml/100 ml dan 0.23842 ml/100 ml, artinya bahwa pada konsentrasi 0.12243 ml/100 ml isolat MRT-C.04, dapat membunuh 50% larva

uji *S.litura*, dan pada konsentrasi 0.23842 ml/100 ml isolat MRT-C.04, dapat membunuh 90% larva uji *S.litura* pada kondisi laboratorium.

Untuk isolat MRT-D.01 adalah 0.08796 ml/100 ml dan 0.17260 ml/100 ml, artinya bahwa pada konsentrasi 0.08796 ml/100 ml isolat MRT-D.01, dapat membunuh 50% larva uji *S.litura*, dan pada konsentrasi 0.17260 ml/100 ml isolat MRT-D.01, dapat membunuh 90% larva uji *S.litura* pada kondisi laboratorium.

Untuk isolat MRT-D.02 adalah 0.08068 ml/100 ml dan 0.18083 ml/100 ml, artinya bahwa pada konsentrasi 0.08068 ml/100 ml isolat MRT-D.02, dapat membunuh 50% larva uji *S.litura*, dan pada konsentrasi 0.18083 ml/100 ml isolat MRT-D.02, dapat membunuh 90% larva uji *S.litura* pada kondisi laboratorium.

Untuk isolat MRT-E.03 adalah 0.07322 ml/100 ml dan 0.14158 ml/100 ml, artinya bahwa pada konsentrasi 0.07322 ml/100 ml isolat MRT-E.03, dapat membunuh 50% larva uji *S.litura*, dan pada konsentrasi 0.14158 ml/100 ml isolat MRT-E.03, dapat membunuh 90% larva uji *S.litura* pada kondisi laboratorium.

Untuk isolat MRT-E.04 adalah 0.05024 ml/100 ml dan 0.09246 ml/100 ml, artinya bahwa pada konsentrasi 0.05024 ml/100 ml isolat MRT-E.04, dapat membunuh 50% larva uji *S.litura*, dan pada konsentrasi 0.09246 ml/100 ml isolat MRT-E.04, dapat membunuh 90% larva uji *S.litura* pada kondisi laboratorium.

Untuk isolat MRT-F.01 adalah 0.06632 ml/100 ml dan 0.12750 ml/100 ml, artinya bahwa pada konsentrasi 0.06632 ml/100 ml isolat MRT-F.01, dapat membunuh 50% larva uji *S.litura*, dan pada konsentrasi 0.12750 ml/100 ml isolat MRT-F.01, dapat membunuh 90% larva uji *S.litura* pada kondisi laboratorium.

5.2.2 Analisis Varians

5.2.2.1 Analisis Varians Toksisitas *B.thuringiensis* hasil isolasi (MRT-B.02, B.03, B.04 dan C.02) terhadap larva uji *Ae.aegypti*.

Analisis ini bertujuan untuk melihat perbedaan toksisitas (daya bunuh) isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi dari tanah pulau Morotai terhadap larva uji *Ae.aegypti*. Acuan daya bunuh (toksisitas) adalah LC_{50} , hasil analisisnya disajikan dalam tabel 5.15 berikut :

Tabel 5.15. Analisis Varians Perbedaan Toksisitas (LC_{50}) Isolat *B.thuringiensis* MRT – B.02, B.03, B.04, C.04, terhadap larva uji *Ae.aegypti*.

Sumber Var	D b	JK	KT	F-hitung	Sig F ,05
Antar Group	3	4.483	1.494	69.816	0,000
Dalam Group	15	0.3210	0.02140		
Total	18	2530.500			

Dari hasil analisis varians perbedaan toksisitas (LC_{50}) dari Isolat *B.thuringiensis* MRT-B.02, B.03, B.04 dan C.02 terhadap larva uji *Ae.aegypti* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan toksisitas

yang nyata (berbeda nyata) diantara ke empat Isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi yang diaplikasikan dengan $p < 0.05$. (nilai $F = 69.816$ dan probabilitas $p = 0.000$).

Selanjutnya untuk membandingkan kemaknaan toksisitas dari masing-masing isolat terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*, maka analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) yaitu dengan menggunakan uji beda nyata terkecil (BNT), yang hasilnya disajikan dalam tabel 5.16 berikut :

Tabel 5.16 Hasil uji BNT toksisitas isolat *B.thuringiensis* terhadap larva uji *Ae.aegypti*.

Isolat	B.02	B.03	B.04	C.02
B.02		*	*	*
B.03				
B.04				
C.02				

* : berbeda nyata pada $\alpha = 0.05$

Dari hasil uji BNT yang disajikan pada tabel 5.16 terlihat bahwa toksisitas antara isolat –isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi (MRT-B.02; MRT-B.03; MRT-B.04 dan MRT-C.02), yang diaplikasikan terhadap larva nyamuk *Ae.aegypti* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna (berbeda nyata) pada $\alpha = 0.05$, dimana urutan toksisitas yang paling tinggi ke yang paling rendah (dari selisih nilai LC) adalah sebagai berikut : MRT-B.03; MRT-B.04; MRT-C.02; MRT-B.02.

Namun antara isolat MRT – B.03 dengan MRT – B.04; MRT – B.03 dengan MRT – C.02 dan antara isolat MRT – B.04 dengan MRT – C.02 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna, artinya bahwa daya bunuh (toksisitas) dari masing-masing isolat tersebut sama.

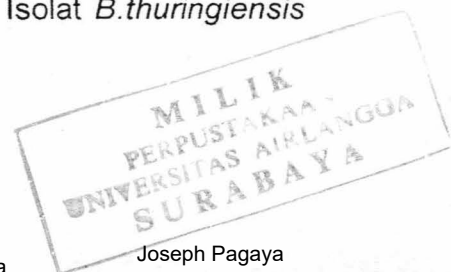
5.2.2.2 Analisis Varians Toksisitas *B.thuringiensis* hasil isolasi (MRT-C.04, D.01, D.02, E.03, E.04 dan F.01) teradap larva uji *S.litura*.

Analisis ini bertujuan untuk melihat perbedaan toksisitas (daya bunuh) isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi dari tanah pulau Morotai terhadap larva uji *S.litura*. Acuan daya bunuh (toksisitas) adalah LC_{50} hasil analisisnya disajikan dalam tabel 5.17 berikut :

Tabel 5.17. Analisis Varians Perbedaan Toksisitas (LC_{50}) Isolat *B.thuringiensis* MRT – C.04, D.01, D.02, E.03, E.04, dan F.01 terhadap larva uji *S.litura*.

Sumber Var	d b	J K	KT	F-hitung	Sig F ,05
Antar Group	5	0.0512	0.003024	77.284	0,000
DalamGroup	24	0.0009390	0.00091		
Total	29	0.0160			

Dari hasil analisis varians perbedaan toksisitas (LC_{50}) dari Isolat *B.thuringiensis* MRT – C.04, D.01, D.02, E.03, E.04 dan F.01 terhadap larva uji *S.litura* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan toksisitas yang nyata (berbeda nyata) diantara ke enam Isolat *B.thuringiensis*



hasil isolasi yang diaplikasikan dengan $p < 0.05$. (nilai $F = 77.284$ dan probabilitas $p = 0.000$).

Selanjutnya untuk membandingkan kemaknaan toksisitas dari masing-masing isolat terhadap larva nyamuk *S.litura*, maka analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) yaitu dengan menggunakan uji beda nyata terkecil (BNT), yang hasilnya disajikan dalam tabel 5.18 berikut :

Tabel 5.18 Hasil uji BNT toksisitas isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi terhadap larva *S.litura*.

Isolat	C.04	D.01	D.02	E.03	E.04	F.01
C.04		*	*	*	*	*
D.01				*	*	*
D.02				*	*	*
E.03					*	
E.04						*
F.01						

* : berbeda pada $\alpha = 0.05$

Dari hasil uji BNT yang disajikan pada tabel 5.18 terlihat bahwa toksisitas antara isolat-isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi (MRT-C.04; MRT-D.01; MRT-D.02; MRT-E.03; MRT-E.04 dan MRT-F.01), yang di aplikasikan terhadap larva hama *S.litura* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna (berbeda nyata) pada $\alpha = 0.05$, dimana urutan toksisitas yang paling tinggi ke yang paling rendah (dari selisih

nilai LC) adalah sebagai berikut : MRT-E.04; MRT-F.01; MRT- E.03; MRT-D.02; MRT-D.01; MRT-C.04.

Namun antara isolat MRT-D.01 dengan MRT-D.02 dan isolat MRT-E.03 dengan MRT-F.01 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna, artinya bahwa daya bunuh (toksisitas) dari masing-masing isolat tersebut sama.

BAB 6

PEMBAHASAN

B.thuringiensis adalah salah satu spesies bakteri yang mampu membentuk struktur dorman endospora. Endospora ini bersifat resisten terhadap bahan-bahan kimia dan perlakuan fisik (panas, sinar UV, dan kering). Perlakuan panas 80 °C selama 10 menit yang diberikan pada saat melakukan isolasi bertujuan untuk mematikan bakteri-bakteri yang berbentuk sel-sel vegetatif serta memutuskan dormansi endospora. Oleh karena itu diharapkan, koloni-koloni yang tumbuh pada medium pertumbuhan seluruhnya berasal dari endospora.

6.1 Jumlah Isolat *B.thuringiensis* Hasil Isolasi.

Pencarian isolat bakteri penghasil kristal protein dari sampel tanah pulau Morotai (tabel 5.1), berhasil ditemukan sebanyak 409 isolat pembentuk endospora, setelah diperiksa dengan mikroskop fase kontras, diperoleh 21 isolat yang mampu mensintesis protein kristal δ -endotoksin (tabel 5.2) atau positif sebagai bakteri *B. thuringiensis* (5,13 %). Menurut Shieh (1994), bahwa untuk mengidentifikasi *B.thuringiensis* yang diperoleh dari alam, salah satu metode yang dapat digunakan adalah metoda mikroskop fase kontras dengan karakter yang diamati adalah ada tidaknya endospora dan kristal protein. Sedangkan menurut Falcon (1971) dalam Achmad, (1994) bahwa diantara bakteri yang patogen terhadap serangga, satu-satunya yang kristaliferus (karena kemampuannya membentuk kristal protein di dalam selnya) adalah *B.thuringiensis*. Stahly *et al.*, (1990), mengemukakan pula bahwa karakter

utama yang menonjol yang dipakai untuk membedakan *B.thuringiensis* dengan bacillus lainnya adalah dengan adanya kristal paraspora diluar *exosporum* yang terbentuk selama berlangsungnya proses sporulasi. Hal yang senada dikemukakan pula oleh Andrew *et al.*, (1987), bahwa adanya kristal paraspora didalam sel merupakan kriteria terbaik yang dapat dipakai untuk membedakan *B.thuringiensis* dari spesies terdekatnya *B.cereus*.

Persentase jumlah isolat *B.thuringiensis* yang di peroleh dari hasil isolasi terhadap sampel tanah di Morotai pada penelitian ini (5,13 %), di nyatakan cukup tinggi jika dibandingkan dengan hasil penelitian serupa di Indonesia yang dilakukan oleh Rusmana & Hadioetomo pada tanah-tanah peternakan ulat sutera di beberapa tempat di Jawa Timur, Jawa Barat dan Sulawesi Selatan, yang hanya memperoleh sekitar 1,14 % isolat *B.thuringiensis* (Rusmana & Hadieotomo, 1994). Hasil penelitian ini masih lebih tinggi pula dari yang di peroleh Ohba dan Aizawa dari penelitian mereka terhadap sampel tanah di Jepang yaitu 2.7 % isolat *B.thuringiensis* (Ohba & Aizawa, 1986) dan Delucca dan kawan-kawannya yang hanya memperoleh 0,5 % isolat *B.thuringiensis* dari penelitian mereka pada tanah di USA (Delucca *et al.*, 1981). Namun hasil ini masih lebih rendah dibandingkan dengan hasil isolasi sampel-sampel tanah yang dilakukan oleh Marthin & Travers (1989) yang memperoleh 3 – 85 % isolat *B.thuringiensis*, Liu *et al.*, (1991), yang memperoleh 16 % isolat *B.thuringiensis* dan Chilcott & Wigley (1993) yang memperoleh 22 – 50 % isolat *B.thuringiensis* (Chilcott & Wigley, 1994). Hal ini karena penelitian yang dilakukan mereka merupakan penelitian

berskala besar yang meliputi areal yang sangat luas, mencakup beberapa benua dan negara.

Persentase kehadiran *B.thuringiensis* yang tinggi (100 %) dari sampel-sampel tanah pulau Morotai (tabel 5.1), diduga merupakan akibat dari terinfeksi larva-larva serangga oleh *B.thuringiensis* secara alamiah yang menyebabkan kematian larva-larva serangga tersebut. Kemudian melalui proses dekomposisi, endospora dorman *B.thuringiensis* terlepas dari jasad larva-larva yang mati dan selanjutnya terdisposisi dalam tanah. Endospora-endospora dorman ini dapat bertahan dalam tanah dalam jangka waktu panjang tanpa mengalami kerusakan. Hal ini dimungkinkan karena fungsi penting endospora terletak pada ketahanannya terhadap pemanasan, kekeringan, radiasi sinar ultra violet dan disinfektan (Nester *et al.*, 1983; Prescott *et al.*, 1992; Schlegel, 1994; Tortora *et al.*, 1995) serta pemaparan bahan kimia toksik (Tortora *et al.*, 1995).

Dari hasil pengecatan dengan menggunakan pewarna Naphtalene black dan Giemsa memperlihatkan bahwa terdapat keragaman dalam morfologi dan ukuran kristal protein. Dari segi morfologi terlihat ada 3 bentuk kristal protein yang menonjol yaitu bentuk bulat, bentuk speris dan bentuk yang tak beraturan (amorf), sedangkan ukuran ada yang besar dan ada yang kecil-kecil. Penelitian yang dilakukan oleh Rusmana dan Hadioetomo (1994) juga memperlihatkan hasil yang serupa dengan penelitian ini yaitu adanya keragaman morfologi kristal protein. Mereka menemukan 4 macam bentuk kristal protein yaitu bentuk bipiramida, bentuk oval, bentuk tidak beraturan dan bentuk bulat.

Menurut Shieh (1994), bahwa bentuk morfologi kristal protein dapat di pakai sebagai patokan dalam menentukan subspecies *B.thuringiensis*, contoh *B.thuringiensis* subspecies *kurstaki*, morfologi kristal proteinnya berbentuk bipiramida, *B.thuringiensis* subspecies *tenebrionis*, morfologi kristal proteinnya berbentuk empat persegi panjang dan datar, sedangkan *B.thuringiensis* subspecies *israelensis*, morfologi kristal proteinnya berbentuk bulat.

Menurut Soesanto (1994), bahwa ada hubungan yang nyata diantara morfologi kristal protein dengan kisaran daya bunuhnya. Varietas yang memiliki daya bunuh terhadap serangga anggota Lepidoptera mempunyai morfologi kristal protein yang berbentuk bipiramida. Yang memiliki daya bunuh terhadap serangga anggota Diptera mempunyai morfologi kristal protein yang berbentuk pleomorfik. Sedangkan yang memiliki daya bunuh terhadap serangga anggota Coleoptera mempunyai morfologi kristal protein yang berbentuk persegi panjang datar atau pipih.

6.2 Toksisitas Isolat *B.thuringiensis* Terhadap Larva Uji *Ae.aegypti*.

Berdasarkan data bioassay dari ke 21 isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi terhadap larva nyamuk uji *Ae.aegypti*, di dapatkan 17 isolat mampu membunuh larva *Ae.aegypti* (lampiran 1), akan tetapi hanya ada 4 isolat yang menunjukkan toksisitas dengan mortalitas larva uji di atas 50%, masing-masing adalah isolat MRT-B.02, MRT-B.03, MRT-B.04 dan MRT-C.02.

Dalam bioassay isolat-isolat hasil isolasi ini terhadap nyamuk uji *Ae.aegypti*, konsentrasi isolat yang di aplikasikan di buat bervariasi yaitu 0.15, 0.10, 0.05 dan 0.00 (tanpa mengandung isolat) sebagai kontrol.

Dari data pengamatan, bahwa pada konsentrasi isolat 0.15, mortalitas rata-rata larva nyamuk uji terhadap isolat MRT-B.02 adalah 40%, terhadap isolat MRT-B.03 adalah 93.3%, terhadap isolat MRT-B.04 adalah 100%, dan terhadap isolat MRT-C.02 adalah 86.6%.

Pada konsentrasi isolat 0.10, mortalitas rata-rata larva nyamuk uji terhadap isolat MRT -B.02 adalah 53.3%, terhadap isolat MRT-B.03 adalah 100%, terhadap isolat MRT-B.04 adalah 86.6% dan terhadap isolat MRT-C.02 adalah 100%.

Pada konsentrasi isolat 0.05, mortalitas rata-rata larva nyamuk uji terhadap isolat MRT-B.02 adalah 53.3%, terhadap isolat MRT-B.03 adalah 93.3%, terhadap isolat MRT-B.04 adalah 60% dan terhadap isolat MRT-C.02 adalah 60%, dengan periode pengamatan 48 jam. Pada konsentrasi isolat 0.00 atau kontrol, mortalitasnya adalah nol, sehingga berdasarkan kontrol ini dapat dikatakan bahwa mortalitas larva uji yang terjadi benar-benar disebabkan semata-mata karena pengaruh toksikan isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi yang diaplikasikan dan bukan karena pengaruh faktor-faktor luar yang tidak dikontrol.

Bioassay (uji toksisitas) dengan pendekatan statistik di ukur melalui LC_{50} dan LC_{90} yaitu konsentrasi toksikan minimal yang dapat membunuh 50% dan 90% larva serangga uji, analisis statistik yang dipakai adalah analisis probit (Finney, 1978).

Hasil analisis probit dari data pengamatan mortalitas larva nyamuk uji terhadap isolat hasil isolasi di peroleh nilai LC_{50} dan LC_{90} masing-masing untuk isolat MRT-B.02 adalah 1.46363 ml/100 ml dan 2.74840 ml/100 ml, untuk

isolat MRT-B.03 adalah 0.04606 ml/100 ml dan 0.11489 ml/100 ml, untuk isolat MRT-B.04 adalah 0.12766 ml/100 ml dan 0.24750 ml/100 ml, serta isolat MRT-C.02 adalah 0.16740 ml/100 ml dan 0.27424 ml/100 ml. Nilai mortalitas pengamatan maupun nilai LC_{50} dan LC_{90} menunjukkan bahwa isolat MRT-B.03 memiliki daya bunuh (toksisitas) tinggi terhadap larva nyamuk uji *Ae.aegypti* di bandingkan dengan 3 isolat lainnya, atau dengan kata lain bahwa sensitivitas larva nyamuk uji *Ae.aegypti* sangat tinggi terhadap isolat MRT-B.03 di bandingkan dengan 3 isolat lainnya.

Hasil uji ANOVA juga menunjukkan ada perbedaan yang sangat bermakna diantara nilai LC_{50} masing-masing isolat dan dilanjutkan dengan uji BNT yang menunjukkan bahwa perbedaan toksisitas antar isolat sangat bermakna pada $\alpha = 0.05$, sehingga mendukung bahwa toksisitas isolat MRT-B.03 lebih baik terhadap larva nyamuk *Ae.aegypti* di bandingkan dengan toksisitas 3 isolat lainnya.

Berdasarkan bioassay ini, ditunjukkan bahwa tingkat konsentrasi isolat yang diaplikasikan bukan merupakan faktor utama yang mempengaruhi mortalitas larva uji, tetapi faktor yang paling menentukan mortalitas larva uji adalah tingkat sensitivitas larva uji bersangkutan terhadap isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi yang diaplikasikan.

Dari penelitian Widyastuti, Blondine dan Subiantoro (1996), yang menguji secara semi kuantitatif 7 isolat hasil isolasi dari sampel-sampel tanah yang di koleksi di sekitar Salatiga, menemukan satu isolat yaitu isolat 31AP3 memiliki toksisitas yang lebih baik terhadap larva *Ae.aegypti*. Nilai LC_{50} yang di peroleh isolat ini adalah 2,48 ml/100 ml dengan priode pengamatan 48 jam.

Apabila isolat 31AP3 hasil penelitian Widyastuti, dkk., diperbandingkan dengan isolat-isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi dalam penelitian ini, maka untuk membunuh 50% larva nyamuk *Ae.aegypti* dibutuhkan konsentrasi isolat 31AP3 lebih kurang 62 kali lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi isolat MRT-B.03 atau lebih kurang 20 kali lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi isolat MRT-B.04 atau lebih kurang 15 kali lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi isolat MRT-C.02, atau bahkan lebih kurang 2 kali lebih besar dari konsentrasi isolat MRT-B.02, yaitu isolat yang paling rendah kemampuan membunuh larva uji nyamuk *Ae.aegypti* dalam penelitian ini.

Dari hasil perbandingan toksisitas isolat 31AP3 yang merupakan salah satu isolat *B.thuringiensis* strain lokal yang toksik terhadap larva nyamuk *Ae.aegypti* dan yang telah dipublikasikan dalam jurnal "Cermin Dunia Kedokteran nomor 107, 1996" (publikasi tentang penemuan isolat *B.thuringiensis* strain lokal sampai saat ini masih sangat kurang) dengan isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi pada penelitian ini, ternyata bahwa salah satu isolat yaitu isolat MRT-B.03 merupakan strain lokal Indonesia yang bersifat sangat toksik terhadap larva *Ae.aegypti* dan potensial untuk dikembangkan dalam mengendalikan larva nyamuk *Ae.aegypti*. Namun untuk pengembangan lebih lanjut perlu dilakukan verifikasi dengan membandingkan toksisitasnya dengan *B.thuringiensis israelensis* standar IPS 82 atau dengan preparat komersial biolarvasida misalnya Technar® atau Bactimos®. Selain itu perlu juga dilakukan uji serologi untuk mengetahui apakah isolat ini

merupakan strain baru atau salah satu dari strain yang sudah terdaftar (*B.thuringiensis* H-14 atau *israelensis*).

Menurut penelitian yang mengisolasi bakteri-bakteri lokal yang bersifat larvasida di Malaysia yang dilaporkan oleh Lee & Seleena (1990), diperoleh 4 isolat yang bersifat larvasida, masing-masing IMR-BT-1, IMRT-BT-8, IMR-BT-16 dan IMR-BT-20. Yang terakhir disebutkan diketahui sebagai strain baru dan dinamakan *B.thuringiensis* subsp. *malaysianensis*, sedangkan tiga isolat lainnya diketahui sebagai *B.thuringiensis* H-14. Dalam bioassay toksisitas dari ke empat isolat tersebut dibandingkan dengan *B.thuringiensis* IPS 82 (standar dari Institut Pasteur Paris) dan Bactimos®.

Nilai LC_{50} yang diperoleh dari masing-masing isolat dan pembanding adalah sebagai berikut : IMR-BT-1 = 0.18 mg/l, IMR-BT-8 = 0.097 mg/l, IMR-BT-16 = 0.041 mg/l, IMR-BT-20 = 0.021 mg/l, IPS 82 = 0.036 mg/l, serta Bactimos = 0.086 mg/l. dari nilai-nilai LC_{50} ini terhadap larva *Ae.aegypti* ternyata bahwa isolat IMR-BT-20 lebih toksik 1,74 kali dari IPS 82 dan lebih toksik 4 kali dari Bactimos. Dilihat dari nilai LC_{50} -nya, toksisitas antara isolat MRT-B.03 yang diperoleh dalam penelitian ini dengan IPS 82 (standar) adalah hampir setara dalam membunuh larva *Ae.aegypti*, tetapi masih lebih toksik 1,8 kali dari Bactimos, namun lebih rendah 2,19 kali dari isolat IMR-BT-20 (*B.thuringiensis* subsp. *malaysianensis*)

Hasil kajian ini dapat kiranya digunakan sebagai landasan rasional untuk memilih isolat hasil isolasi ini khususnya isolat MRT-B.03 untuk dikembangkan sebagai jenis bioinsektisida sebagai sarana pengendalian vektor demam berdarah dengue (DBD) jika suatu saat di perlukan.

B.thuringiensis H-14 merupakan salah satu biolarvasida yang disarankan untuk dikembangkan sebagai pengendali hayati vektor penyakit demam berdarah dengue (DBD) di Indonesia, khususnya terhadap larva *Ae.aegypti* (Salamun dkk., 1994 dalam Badrah, 1996). Menurut hasil penelitian Mardihusodo (1992), menemukan bahwa *B.thuringiensis* H-14 tampak paling aktif terhadap larva nyamuk *Ae.aegypti* dibandingkan dengan *B.sphaericus* H-5a5b. Kejadian ini menurut Mardihusodo, mirip dengan yang ditemui oleh Foo & Yap (1982) di Malaysia. *B.sphaericus* H-5a5b tampak lebih aktif terhadap larva nyamuk *Culex quinquefasciatus*, dari pada larva *Ae.aegypti*. Hal ini juga mempertegas lagi bahwa *B.thuringiensis* H-14 sesungguhnya paling efektif terhadap larva *Ae.aegypti* sebagaimana didokumentasikan sejak lama oleh WHO (1979).

B.thuringiensis israelensis secara luas digunakan sebagai pestisida biologis karena aktifitasnya sangat spesifik dalam membunuh serangga-serangga dari golongan diptera, tanpa menimbulkan efek samping terhadap organisme-organisme lain dan juga tidak mengakibatkan resistensi terhadap larva serangga sasaran (Georghion & Wirth, 1997). Yang menjadi persoalan sekarang adalah *B.thuringiensis* subsp *israelensis* memiliki waktu paruh singkat ('*short half-life*') apabila diaplikasikan untuk mengendalikan larva nyamuk di lapangan. Cara mengatasinya yaitu melakukan kloning gen yang mengkode toksin *B.thuringiensis israelensis* ke dalam organisme yang mendiami tempat-tempat bertelur nyamuk dan kemudian dipakai sebagai sumber makanan bagi larva nyamuk, organisme yang tepat untuk tujuan ini adalah Cyanobacteri (Xiauqiang *et al.*, 1997).

Cara lain untuk mengatasi sifat ketidak stabilan kristal protein toksin *B.thuringiensis israelensis* dilapangan adalah dengan memanfaatkan jasa dari spesies protozoa *Tetrahymena pyriformis* sebagai media perantara dan pembawa spora dan kristal protein toksik dari *B.thuringiensis* subsp. *israelensis*. Spora dan kristal protein toksik dari *B.thuringiensis* subsp. *israelensis*, dapat mengalami bioenkapsulasi di dalam tubuh *T.pyriformis*, dimana toksin akan tetap stabil atau tidak menjadi rusak. Spora dan kristal protein *B.thuringiensis israelensis* akan dikonsentrasikan oleh setiap sel *T.pyriformis* di dalam vakuola makanannya dan jika sel-sel tersebut diberikan kepada larva nyamuk, larva akan segera mati (Manasherob *et al.*, 1998).

6.3 Toksisitas Isolat *B.thuringiensis* Terhadap Larva *S.litura*.

Berdasarkan data bioassay dari ke 21 isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi terhadap larva ngengat *S.litura*, di dapatkan 12 isolat mampu membunuh larva uji tersebut (lampiran 2). Akan tetapi, hanya ada 6 isolat yang menunjukkan toksisitas dengan mortalitas larva uji di atas 50%, masing-masing adalah isolat MRT-C.04, MRT-D.01, MRT-D.02, MRT-E.03, MRT-E.04 dan MRT-F.01.

Dari data pengamatan bioassay isolat-isolat hasil isolasi terhadap larva uji *S.litura*, bahwa pada konsentrasi isolat 0.15 mortalitas rata-rata larva uji terhadap isolat MRT-C.04 adalah 60%, terhadap isolat MRT-D.01 adalah 73.3%, terhadap isolat MRT-D.02 adalah 80%, terhadap isolat MRT-E.03 adalah 86.6%, terhadap isolat MRT-E.04 adalah 100% dan terhadap isolat MRT-F.01 adalah 93.3%.

Pada konsentrasi isolat 0.10 mortalitas rata-rata larva uji terhadap isolat MRT-C.04 adalah 53.3%, terhadap isolat MRT-D.01 adalah 66.6%, terhadap isolat MRT-D.02 adalah 73.3%, terhadap isolat MRT-E.03 adalah 73.3%, terhadap isolat MRT-E.04 adalah 93.3% dan terhadap isolat MRT-F.01 adalah 86.6%.

Pada konsentrasi isolat 0.05 mortalitas rata-rata larva uji terhadap isolat MRT-C.04 adalah 40%, terhadap isolat MRT-D.01 adalah 40%, terhadap isolat MRT-D.02 adalah 66.6%, terhadap isolat MRT-E.03 adalah 46.6%, terhadap isolat MRT-E.04 adalah 73.3% dan terhadap isolat MRT-F.01 adalah 53.3%. Pada konsentrasi isolat 0.00 atau kontrol, mortalitasnya adalah nol, sehingga mortalitas larva uji yang terjadi itu benar-benar karena pengaruh toksikan isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi yang diaplikasikan.

Hasil analisis probit dari data mortalitas larva ngengat uji terhadap isolat-isolat hasil isolasi di peroleh nilai LC_{50} dan LC_{90} masing-masing untuk isolat MRT-C.04 adalah 0.12243 ml/100 ml dan 0.23842 ml/100 ml, untuk isolat MRT-D.01 adalah 0.08796 ml/100 ml dan 0.17260 ml/100 ml, untuk isolat MRT-D.02 adalah 0.08068 ml/100 ml dan 0.18083 ml/100 ml, untuk isolat MRT-E.03 adalah 0.07322 ml/100 ml dan 0.14158 ml/100 ml, untuk isolat MRT-E.04 adalah 0.05024 ml/100 ml dan 0.09246 ml/100 ml, sedangkan untuk isolat MRT-F.01 adalah 0.06632 ml/100 ml dan 0.12750 ml/100 ml.

Dari hasil pengamatan mortalitas larva uji maupun melalui hasil analisis probit dalam penelitian ini, menunjukkan bahwa isolat *B.thuringiensis* MRT-E.04 memiliki daya bunuh atau toksisitas yang sangat tinggi terhadap larva uji *S.litura*. Pada 24 jam pengamatan setelah isolat ini diaplikasikan, mortalitas

larva telah mencapai angka 100%. Berdasarkan analisis probit, bahwa untuk membunuh 50% larva uji *S.litura* hanya diperlukan 0.05024 ml/100 ml isolat MRT-E.04 atau diperlukan 0.09246 ml/100 ml isolat MRT-E.04 untuk membunuh 90% larva uji *S.litura*.

Hasil ANOVA dan uji BNT juga menunjukkan bahwa toksisitas antara isolat MRT-E.04 dengan isolat-isolat hasil isolasi lainnya terhadap larva uji *S.litura* berbeda sangat nyata (sangat signifikan). Hal ini menunjukkan pula bahwa sensitivitas larva *S.litura* sangat tinggi terhadap isolat *B.thuringiensis* MRT-E.04. Melihat dari nilai-nilai LC_{50} dan LC_{90} dari masing-masing isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi, sebenarnya semua isolat hasil isolasi ini bersifat toksik terhadap larva *S.litura*, namun sedikit lebih rendah dari isolat MRT-E.04, kecuali isolat MRT-C.04 toksisitasnya bersifat menengah.

Hasil penelitian Rusmana dan Hadieotomo (1994), menemukan 32 isolat *B.thuringiensis* hasil isolasi dari tanah. Dari ke 32 isolat tersebut, hanya ada 2 isolat yaitu isolat SPG-A 12.16.01 dan SPG-A 11.10b.01 mampu membunuh 65% larva *S.litura* pada hari ke pengamatan. Mereka mengemukakan bahwa isolat SPG-A 12.16.01 dan SPG-A 11.10b.01 lebih toksik dibandingkan dengan *Thuricide*® (salah satu produk komersial bioinsektisida yang preparat aktifnya adalah *B.thuringiensis*.) yang mereka pakai sebagai pembanding. Pada hari ke 3 pengamatan *Thuricide* hanya mampu membunuh 45% larva *S.litura*.

Dari persen mortalitas larva uji *S.litura* yang diperoleh dari uji toksisitas dengan isolat SPG-A 12.16.01 dan SPG-A 11.10b.01 serta pembanding *Thuricide*, ternyata hasil itu masih lebih rendah dibandingkan dengan persen

mortalitas rata-rata dari uji toksisitas dengan isolat hasil isolasi dalam penelitian ini.

Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa isolat-isolat MRT-E.04, MRT-F.01, MRT-E.03 dan MRT-C.04 merupakan isolat-isolat strain lokal yang memiliki toksisitas tinggi terhadap larva *S.litura* dan potensial untuk dikembangkan lebih lanjut untuk membasmi serangga-serangga hama pertanian.

Namun untuk mengukur potensi sesungguhnya dari isolat-isolat ini, masih harus dilakukan verifikasi dengan membandingkan toksisitas isolat-isolat hasil isolasi ini dengan *B.thuringiensis* standar atau *kurstaki* dan dengan beberapa spesies larva serangga uji.

Menurut Santoso dkk., (1994), bahwa *B.thuringiensis* merupakan sejenis bakteri yang terdiri dari banyak varietas atau subspecies. Beberapa varietas mempunyai kisaran inang (serangga sasaran) yang berbeda sehingga *B.thuringiensis* bersifat sangat spesifik terhadap serangga tertentu. Kespesifikan ini mendorong eksplorasi terus menerus dilakukan untuk mencari varietas baru yang lebih efektif atau yang mempunyai kisaran inang yang berbeda dari apa yang selama ini diketahui.

Menurut Hastowo *et al.*, (1992), bahwa terbuka peluang di Indonesia juga dapat dijumpai varietas-varietas *B.thuringiensis* baru yang lebih efektif dan yang mempunyai kisaran inang lebih luas, mengingat beberapa penelitian eksploratif rintisan menunjukkan keragaman distribusi *B.thuringiensis* di Indonesia.

Menurut Bryant (1994), bahwa aplikasi *B.thuringiensis* ditentukan oleh kombinasi antara kristal protein toksin dan spora dan yang penting juga

bergantung pada spesies serangga hama dan subsp. *B.thuringiensis* yang diaplikasikan. Sedangkan sinar UV dapat merusak kristal protein dan menginaktifkan spora. Menurutnya senyawa-senyawa kimia yang dikeluarkan tanaman pada permukaan daun dan pH permukaan daun yang tinggi (alkalin) serta adanya protease dapat merusak aktifitas protein kristal toksin.

Martouret, 1978 dalam Santosa dkk., 1994, mengatakan bahwa untuk sebagian besar hama yang rentan terhadap toksikasi *B.thuringiensis*, kristal saja sebenarnya sudah cukup sebagai bahan aktif, tetapi untuk beberapa hama tertentu seperti *Ostrina nubilalis*, kehadiran spora penting supaya proses toksikasi dapat berlangsung.

Secara kimiawi kristal adalah protein yang labil dibawah pengaruh sinar matahari di lapangan, baik melalui sinar UV atau suhu tinggi yang diakibatkan. Hal ini menjadi sebab mengapa persistensi dan stabilitas *B.thuringiensis* dilapangan tidak lama (Santoso dkk., 1994), untuk itu diperlukan strategi dalam aplikasi *B.thuringiensis* di lapangan. Ada 3 hal penting menurut Bryant (1994), yang menjadi patokan dalam aplikasi dilapangan ; 1).harus memahami sifat fisik dan biologis dari *B.thuringiensis* yang diaplikasi, 2). mengetahui cara makan serangga sasaran dan 3). mengetahui cara kerja toksin dan persistensinya di lapangan.

Apabila *B.thuringiensis* ditujukan untuk mengendalikan hama yang bersifat 'nokturnal', aplikasinya sebaiknya di lakukan pada sore hari sehingga tidak mengalami degradasi oleh sinar UV sebelum sempat termakan oleh hama. Untuk pengendalian hama yang aktif pada siang hari, aplikasi dapat di lakukan pagi hari yang sedapat mungkin di lakukan dari arah bawah sehingga

deposit suspensi bioinsektisida menempel pada permukaan tanaman bagian bawah, dengan demikian mengurangi resiko radiasi langsung oleh matahari (Santoso dkk., 1994).

Kristal protein yang dihasilkan *B.thuringiensis* pada masa sporulasi merupakan protoksin yang belum aktif dan akan bersifat toksik setelah mengalami hidrolisis oleh enzim protease dalam saluran pencernaan serangga yang mempunyai pH alkalin (Rusmana & Hadieotomo, 1994). Kematian larva serangga uji oleh kristal protein δ -endotoksin *B.thuringiensis* disebabkan oleh teraktivasinya kristal protein tersebut oleh lingkungan alkalis dalam usus tengah larva, sehingga toksin aktif menempel pada epitel usus tengah dan mengganggu pengaturan permeabilitas membran, yaitu mengganggu transpor ion, glukosa dan oksigen lintas membran, sebab adanya ikatan antara protein toksin dengan permukaan mikrofilus usus tengah sehingga sel-sel epitelium usus tengah mengalami kekurangan ATP. Selanjutnya sel-sel tersebut mengalami hipertrofi, terpisah satu dengan lainnya dan mengelupas dari membran basalnya sehingga menyebabkan kematian larva (WHO, 1984; Aronson *et al.*, 1986).

Menurut Escriche *et al.*, (1998), bahwa mekanisme kerja kristal protein insektisidal adalah setelah kristal ditelan oleh serangga yang rentan, kristal protein akan menjadi larut dan diaktivasi oleh enzim proteolitik. Kristal protein teraktivasi kemudian diikat oleh reseptor-reseptor spesifik yang terdapat pada permukaan sel-sel membran usus tengah, menyebabkan terbentuk

lubang (*pores*) dan terjadi perubahan tekanan *osmotic koloidal*, sehingga sel-sel membengkak dan terjadi lisis menyebabkan serangga mati.

Untuk dapat mencapai dan menempel pada reseptor-reseptor sel-sel epitel usus tengah larva serangga, kristal protein harus dapat menembus *barrier* permukaan sistem membran usus yang mengandung khitin. Menurut Sahabudin & Kaslow (1993), bahwa patogenesis pada serangga terjadi melalui mekanisme digestif dari enzim khitinase mikroba pada sebagian besar membran-membran *peritropic* insekta, sehingga memungkinkan mikroba dan atau toksinnya dapat menembus membran-membran tersebut.

Sampson & Gooday (1998) melaporkan bahwa *B.thuringiensis* subsp. *israelensis* dan *B.thuringiensis* subsp. *aizawai* keduanya mampu mensekresi chitinase jika ditumbuhkan dalam media yang mengandung chitin. Kitinase endogen *B.thuringiensis* berperan disini untuk membuat membran-membran peritropik melemah, sehingga memungkinkan toksin-toksin bakteri secara cepat mencapai epitelium usus.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan pada uraian hasil penelitian dan pembahasan hasil penelitian, maka dapat di tarik beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Terdapat perbedaan toksisitas yang nyata di antara isolat-isolat *Bacillus thuringiensis* hasil isolasi terhadap mortalitas larva nyamuk uji *Aedes aegypti* Linn. Mortalitas larva uji tertinggi di tunjukkan oleh isolat MRT-B.03 dengan nilai $LC_{50} = 0,04606$ ml/100 ml.
2. Empat isolat *Bacillus thuringiensis* hasil isolasi masing-masing MRT-B.02, MRT-B.03, MRT-B.04 dan isolat MRT-C.02, memiliki kemampuan membunuh (toksisitas) terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*
3. Isolat MRT-B.03 merupakan isolat strain lokal yang memiliki kemampuan membunuh (toksisitas) tinggi terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti* Linn.
4. Terdapat perbedaan toksisitas yang nyata diantara isolat-isolat *Bacillus thuringiensis* hasil isolasi terhadap mortalitas larva ngengat uji *Spodoptera litura* Fab. mortalitas larva ngengat uji tertinggi di tunjukkan oleh isolat MRT-E.04 dengan nilai $LC_{50} = 0,05024$ ml/100 ml.
5. Enam isolat *Bacillus thuringiensis* hasil isolasi masing-masing MRT-C.04, MRT-D.01, MRT-D.02, MRT-E.03, MRT-C.04 dan isolat MRT-F.01 memiliki kemampuan membunuh (toksisitas) terhadap larva ngengat *Spodoptera litura* Fab.

7.2 S a r a n

Berdasarkan hasil penelitian ini yang mendapatkan beberapa isolat yang toksisitas tinggi baik terhadap larva nyamuk *Ae.aegypti* maupun terhadap larva ngengat *S.litura*, maka beberapa saran dapat dikemukakan :

1. Untuk isolat-isolat hasil isolasi ini, perlu dilakukan uji serologi untuk menentukan strain dari masing-masing isolat tersebut.
2. Untuk isolat-isolat hasil penelitian ini, perlu dilakukan *bioassay* terhadap beberapa spesies larva nyamuk vektor penyakit di Indonesia, untuk melihat daya toksisitas masing-masing isolat terhadap spesies-spesies larva nyamuk tersebut. Demikian pula terhadap beberapa spesise larva serangga yang merupakan hama bagi tanaman di Indonesia.
3. Khusus untuk isolat MRT-B.03, disarankan untuk dibandingkan potensi toksiknya dengan potensi toksik dari isolat standar *B.thuringiensis israelensis* (IPS 82 atau IPS 78) dan beberapa insektisida mikroba (bioinsecticide) yang saat ini telah dikomersilkan misalnya *Bactimos*, *Tecknar* dan lain-lain, khusus terhadap larva nyamuk *Ae.aegypti*. Hal yang sama disarankan dilakukan khusus untuk isolat MRT-E.04 dengan isolat standar *B.thuringiensis aizawai* (HD 133) terhadap larva ngengat *S.litura*.
4. Penelitian serupa perlu dilakukan pada pulau-pulau lain di kepulauan Maluku maupun pulau-pulau Indonesia lainnya, sebagai upaya mendapat strain-strain lokal yang mempunyai spektrum inang yang lebih luas.

5. Khusus untuk penelitian ini, disarankan untuk dilanjutkan pencarian isolat *B.thuringiensis* yang pengambilan sampel tanah mencakup seluruh sistem ekologi pada pulau Morotai dan menjangkau seluruh ekosistem pulau.
6. Khusus untuk morfologi (bentuk) kristal protein dari masing-masing isolat hasil penelitian ini, disarankan untuk dilakukan pemeriksaan dengan mikroskop elektron.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- ACHMAD, A.S., 1994. Analisis Strain *Bacillus thuringiensis* Secara Serologi. Makalah, Seminar *Bacillus thuringiensis*. Komisi Pestisida, Dep. Pertanian. (tidak di publikasikan).
- ANDREW, R.E., Jr. R.M.FAUST, H.WABIKO, K.C.RAYMOND and L.A. BULLA Jr., 1987. The Biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. CRC. Crit. Rev. Biotechnol. 6 : 163 – 232.
- ANONIM, 1983. Pedoman Pengamatan Serangga Penular Penyakit Untuk Penataran Petugas Serangga Penular Penyakit Daerah Tk.II Jawa Timur. SPP Din. Kes. Prop. Dati II Jawa Timur, Surabaya.
- ANONIM, 1987. Pemberantasan Vektor dan Cara-Cara Evaluasinya. Dit. Jen. PPM & PLP. Dep. Kes. RI., Jakarta.
- ANONIM, 1989. Kunci Identifikasi Aedes, Jentik dan Dewasa di Jawa. Dit.Jen.PPM & PLP, Depkes. RI, Jakarta.
- ANONIM, 1990. Survey Entomology Demam Berdarah Dengue. Dit. Jen. PPM & PLP. Dep. Kes. RI., Jakarta.
- ANONIM, 1994. Baku Operasional Pengendalian Hama Terpadu *Spodoptera litura* Fab. Pada Tanaman Tembakau Cerutu. Departemen Pertanian, Dir.Jen.Bun.Dir.Bina Perlind.Tanaman,. Jakarta. hal. 1 – 3.
- ARONSON, A.J., W. BECKMAN & P..DUNN, 1989. *Bacillus thuringiensis* and Related Insect Pathogens. Microbiol.Rev. 50 (1) : 1 – 24.
- ATLAS RONALD, M. and RICHARD BARTHA, 1981. Microbial Ecology, Fundamental and Application. Addison-Wesley Publish. Com., Philippine. p. 471
- BADRAH, S., 1996. Toksisitas Residu Dosis Tunggal dan Kombinasi *Bacillus thuringiensis* H-14 dan *Bacillus sphaericus* H-5a5b Terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti* L di Tempat Perindukannya. Tesis Pasca-sarjana Universitas Airlangga, Surabaya. (tidak dipublikasi).
- BALARAMAN, R.E and J.S.PILLAI, 1990. Review of Biological Control Résearch at Vector Control Research Center Pondicherry. Indian Council Research. New-Delhi.

- BAUMANN, L., A. BROADWELL, and P. BAUMANN, 1988. Sequence Analysis of the Mosquitocidal Toxin Genes Encoding 51.4 and 41.9 kilodalton Protein From *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *J. Bacteriol.* 170 : 2045 – 2050.
- BECKER, N & J. MARGALIT, 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* Against Mosquitoes and Blackflies. In “ *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide; Theory and Practice (P.F. ENWISTLE, J.S. CORRY, M.J. BAILEY and S. HIGGS. Eds.) John Willey and Sons, Singapore. p. 147.
- BLONDINE, CH.P., U. WIDYASTUTI, WIDARTI dan SUKARNO, 1996. Isolasi *Bacillus thuringiensis* Pada Media “NYPC” dan Uji Patogenitasnya Terhadap Jentik Nyamuk. *J. Parasitol. Indo.* 9 (1) : 28 – 36.
- BRYANT, J.E., 1994. Application Strategies for *Bacillus thuringiensis*. *Agricul. Ecosyst. Environ.* 49 : 65 – 75.
- BURGESS N.R.H & G.O. COWAN, 1993. A Colour Atlas of Medical Entomology. 1st edition. Chapman & Hall Medical, London. pp. 10 – 30.
- CATO, E.P., W.L. GEORGE and S.M. FINEGOLA, 1986. Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23. In “ *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*”. (P.H.A. Sneath, ed.) Vol. 2. William and Wilkins, Baltimore. pp. 1141 – 1200.
- CLAUS, D. and R.C. BARKELEY, 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174. In “ *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*”. (P.H.A. Sneath, ed.). Vol. 2 Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1105 – 1141.
- CHILCOTT, C.C. and P.J. WIGLEY, 1988. Technical Notes; An Improved Methode for Differential Staining of *Bacillus thuringiensis* Crystal. *Letter in Appl. Microbiol.* 7 : 67 – 70.
- CHILCOTT, C.N. and P.J. WIGLEY, 1994. Opportunities For Finding New *Bacillus thuringiensis* Strains. *Agricul. Ecosys. & Environ.* 49 : 51– 57.
- DAMGAARD P.H., B.M. HANSEN, J.C. PEDERSEN, J. EILENBERG, 1997. Natural Occurance of *Bacillus thuringiensis* on Cabbage Foliage and in Insect Associated with Cabbage Crops. *J. Appl. Microbiol.* 82 (2) : 253 – 258.
- DAVIDSON, E.W., M. URBINA, J. PAYNE, M.S. MULLA, H. DARWAZEH, H.J. DULMAGE and J.A. CORREA, 1984. Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 Spores Use As Larvacides in Aquatic Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 125 – 129.

- De LUCCA, A.J., J.G. SIMONSON, A.D. LARSON, 1981. *Bacillus thuringiensis* Distribution in Soil in the United States. *Can. J. Microbiol.*, 27: 865 – 870.
- DIBYANTORO A.L. and S. SISWOJO, 1980. Approach to Integrated Control of Some Vegetable Insect Pests by Using Microbial Insecticides. *Bull. Penel. Horti.* 16 : 67 – 72.
- DUBOIS N.R. and F.B.LEWIS, 1981. What is *Bacillus thuringiensis*. *J. Arboricul.* 7 (9): 233 – 240.
- DULMAGE, T., A.A. YOUSTEN, S. SINGER and L.A. LACEY, 1990. Guidelines for Production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus spraecus*. UNDP/WORLD BANK/WHO. Special Program for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva.
- ENTWISTLE PHILIP F., JENNY S.CORY, MARK J.BAILEY and STEPHEN HIGGS (Editors), 1993. *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticides; Theory and Practice. John Willey & Sons. Singapore. pp 147 – 208.
- ESCRICHE, B., N.DE DECKER, J. VAN RIE, S. JANSENS and E. VAN KERKHOVE, 1998. Change Permeability of Brush Border Membran Vesicles from *Spodotera littoralis* Midgut Induce by Insecticidal Crystal Protein from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (4) : 1563 – 1565.
- FINNEY D.J., 1971. *Probit Analysis*. 3rd ed. Cambridge Univ.Press. London. pp.141 – 174.
- GEORGHION, G.P., and M.C. WIRTH, 1997. Influence of Exposure to Single versus Multiple Toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on Develepment of Resistance in the Mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 1095 – 1101.
- GORDON R.M and M.M.J. LAVOPIERE, 1987. *Entomogy for Students of Medicine*, 5th Printing, Black Well Sci. Publ. Oxford, London, Edin Borgh, Melbourne. pp. 43 - 56
- HARISUNATA. C., 1984. Mosquito-Born Disease in South East Asia. *Mosq. Born. Dis. Bull.*, 1 (11) : 1 – 11.
- HAROLD, 1979. *Dasar-Dasar Parasitologi Klinik*. Gramedia, Jakarta. hal 17 – 23.
- HASTOWO S., B.W.LAY, M.OHBA, 1992. Naturally Occuring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. *J. Appl. Bacteriol.*, 73 : 108 – 113.

- HOLT J.G., NOEL R. KRIEG, PETER H.A.SNEATH, JAMES T. STALEY, & STANLEY T.WILLIAMS, 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. Williams & Wilkins, Baltimore. Pp. 559 – 564.
- KALSHOVEN, L.G.E, 1981. *Pest of Crop In Indonesia*. Ictiar Baru Van Hove, Jakarta.
- LANSKIN, A.I. and H.A. LECHEVALIER, 1977. *CRC. Hand Book of Microbiology*. 2nd ed. Vol. I. Bacteria. CRC Press. USA. p. 317
- LAY B.W., 1994. *Analisis Mikrobiologi Di Laboratorium*. Radja Grafindo Persada, Jakarta. hal. 129 – 131.
- LEE H.L., 1988. Isolation and Evaluation of Two Isolates of *Bacillus thuringiensis* for the Control of Mosquitoes of Public Health Importance in Malaysia. *Mosq.Born Disease Bull.* 5 (3 – 5): 39 – 47.
- LEE H.L and P.SELENA, 1990. Isolation of Indigenous Larvasidal Microbial Control Agent of Mosquitos: The Malaysian Experience. *South Asian J.Trop. Med. Public Health* 21 (2): 281 – 287.
- LEE, M.K., R.E. MILNE, A.Z. GE, and D.H. DEAN, 1992. Location of A *Bombyx mori* Receptor Binding Region on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Bio. Chem.* 267 (5) : 3115 – 3121.
- LEE HYUNG-HOON, SEUNG-CHULL KANG, and YOUNG-JOU KIM, 1994. Characterization and Serological Identification of *Bacillus thuringiensis* New Isolates. *Japan J. Sanif. Zool.* 46 (4): 86 – 88.
- LERECLUS, D., A. DELECLUSE and M. M. LECADET, 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. In "*Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide; Theory and Practice (P.F. ENWISTLE, J.S. CORRY, M.J. BAILEY AND S. HIGGS. Eds.) John Willey and Sons, Singapore. pp 37 – 59.
- LIU, C.L., A.N. MacMULLAN, R.L. STARNES, D.R. EDWARDS, R. KHAN and T.C. MacRAE, 1991. Abundance, Distribution and Bio-activities of New *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Abstr. 1st Int. on Bacillus thuringiensis*, St. Catherine's College, Oxford, 28 – 31 July.
- MANAHEROB, R., E. BEN-DOV, A. ZARITSKY and Z. BARAK. (1998). Sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in Excreted Food Vacuoles of the Protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 1750 – 1758.

- MANSON-BAHR, P.E.C and D.R. BELL, 1987. Tropical Diseases. Oxford, London. p. 1411.
- MARDIHUSODO S.J., M.A. ROMAS, J. SITUMORANG dan M.K.I. HADJAR, 1991. Isolasi dan Karakterisasi Basili Pembentuk Spora Yang Patogenik Terhadap Larva Nyamuk Di Jawa. J. Ilmu Kedok. XXIII (1) : 25 – 33.
- MARDIHUSODO, S.J. 1987. Mengembangkan dan Meningkatkan Peran Serta Masyarakat Dalam Upaya Pemberantasan Vektor Dengue Haemorrhagic Fever. J. Ilmu Kedok. 19 (1) : 19 – 25.
- MARDIHUSODO, S.J. 1991. Sensitivitas Larva Nyamuk *Aedes aegypti* Terhadap *Bacillus thuringiensis* H-14 dan *Bacillus sphaericus* 1593 . BKM 7 (1) : 44 – 49.
- MARDIHUSODO, S.J. 1992. Aktivitas Larvasidal *Bacillus thuringiensis* H-14 dan *Bacillus sphaericus* 1593 Terhadap Tiga Spesies Nyamuk Vektor Penyakit di Jawa. J. Ilmu Kedok. XXIV (2) : 51 – 57.
- MARTIN, P.A.W. and R.S. TRAVERS, 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 2437 - 2442.
- MIKKOLA, A.R., G.A. CARLBERG, T.VAARA and H.G. GYLLENBERG, 1982. Comparison of Inclusion in Different *Bacillus thuringiensis* Strain. An Electron Microscope Study. FEMS Microbiol. Lett. 13 : 401 – 408.
- MUNANDAR K., 1996. Fusi Protoplasma Antara *Bacillus thuringiensis* Subspesies *Israelensis*, *Kurstaki* dan *Morrisoni*. Tesis Pascasarjana, Universitas Airlangga. hal. 2 – 3 (tidak di publikasikan).
- NATAWIGENA, 1990. Entomologi Pertanian. Armico, Bandung.
- NAVON AMOS, 1989. Development of Potency Bioassay for Selecting *Bacillus thuringiensis* Preparation Againsts Agriculture Pest in Israel. Israel J.Entomol. 23 : 115 – 118.
- NAVON A., M. WYSOKI and S. KEREN, 1983. Potency and Effect of *Bacillus thuringiensis* Preparation Againsts Larvae of *Spodoptera littoralis* and *Boarmia (Ascotis) selendria*, Pytoparasitica. 11 : 3 – 11.
- NAVON A., M. KLEIN and S. BRAUN, 1990. *Bacillus thuringiensis* Potency Bioassay againsts *Heliiothis armigera*, *Earias insulana* and *Spodoptera littoralis* Larvae Based on Standarized Dieta. J.Invert.Phatol. 55 : 387 – 393.

- NESTER E.W., C.E. ROBERT, M.E. LIDSTROM, N.N. PEARSALL and M.T. NESTER, 1983. Microbiology. Saunders College Publ., Japan. Pp.93 – 95, 742 – 743.
- OHBA, M. and K. AIZAWA, 1986. Insect Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Isolated From Soil of Japan. J. Invertebr. Pathol. 47 : 12 – 20.
- OHBA, M., K. AIZAWA and S.SUDO, 1984. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Sericultural Farms of Fukuoka Prefecture Japan. Proc. Assoc. Plant Prot. Kyushu, 30 : 152 – 155.
- OKA, I.N., 1998. Pengendalian Hama Terpadu dan Implementasinya di Indonesia. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. hal. 4
- PRESCOTT L.M., JOHN P.HARLEY & DONALD A. KLEIN, 1992. Microbiology. WCB Publishers, Iowa, USA. pp. 454 – 456.
- RUSMANA I dan R.S. HADIOETOMO, 1994. Isolasi *Bacillus thuringiensis* Berl. Dari Peternakan Ulat Sutera dan Toksisitasnya Terhadap Larva *Crocidolomia binotalis* Zell dan *Spodoptera litura* F. J.Hayati Vol. 1 (1) : 21 – 23.
- SAHABUDIN, M and D.C. KASLOW, 1993. Chitinase : a novel target for blocking parasite transmission. Parasitol. Today. 9 : 252 – 255.
- SAMPSON, M.N and G.W. GOODAY. 1998. Involment of Chitinases of *Bacillus thuringiensis* During Pathogenesis in Insects. Microbiol. 144 : 2189 – 2194.
- SANTOSO, T., B.LAY dan S.HASTOWO, 1994. Kajian Pemanfaatan dan Strategi Aplikasi *Bacillus thuringiensis* Untuk Pengendalian Hama. Makalah Seminar *Bacillus thuringiensis* Komisi Pestisida Dep.Tan., Januari 1994. (tidak dipublikasi).
- SCHLEGEL H.G., 1994. Mikrobiologi Umum (Alih Bahasa : Tedjo Baskoro, Penyunting; Joke R.Wattimena). Gadjah Mada Univ. Press. Yogyakarta. hal. 80 – 85.
- SEBESTA, K., J.FARKAS, K.HORSKA and J.VANKOVA, 1981. Thuringiensin, the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In "Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970 – 1980." (H.D.Burges, ed.) Academic Press. London. pp 249 – 281.
- SHIEH, T.R, 1994. Identification and Classification of *Bacillus thuringiensis*. Makalah. Seminar *Bacillus thuringiensis*, Komisi Pestisida Dep.Tan. (tidak di publikasikan).

- SOEDARTO, 1990. Entomologi Kedokteran. EGC, Jakarta.
- SOESANTO, 1994. Prospek *Bacillus thuringiensis* Dalam Pengendalian Hama. Makalah, Seminar *Bacillus thuringiensis*, Komisi Pestisida Dep. Tan. (tidak di publikasikan).
- STAHLY, D.P., R.E. ANDREWS, and A.A. YOUSTEN, 1990. The Genus *Bacillus*: Insect Pathogen.
- STEINHAUS E.A., 1951. Possible Use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an Aid in the Biological Control of the *Alfalfa carterpillar*. *Hilgardia*. 20 (18) : 359 – 381.
- SUROSO, T., 1990. Pemberantasan Demam Berdarah Dengue, Lokakarya Strategi Penanggulangan Demam Berdarah Dengan Peran Masyarakat (Eds. Gotama, I.B.I & Anorital)
- TAKAKI S., 1985. *Bacillus thuringiensis* Preparation in Japan. *Japan Pest Inform.* 25: 23 – 26.
- TANADA Y & H.K. KAYA, 1993. *Insect Pathology*. Academic Press Inc., London. pp 83 – 122.
- TORTORA G.J., B.R. FUNKE and C.L. CASE, 1995. *Microbiology; An Introduction*. 5th edition, Benjamin Cummings Publ. Co., Singapore. pp 88 – 90.
- YUWONO S., S. NOERHAJATI, S. MOESFIROH, C.A. BAILOWI, S.K. MOESTRANSI, M. FAKIH dan J. SITUMORANG, 1974. Survey *Aedes aegypti*, L (Diptera ; Culicidae) di Yogyakarta, II. Tempat Perkembangbiakan. *B.I.K.* 6 (3) : 103 – 106.
- WHO, 1979. Data Sheet on the Biological Agent *Bacillus thuringiensis* Serotype H-14 . *WHOWBC/79.750*. p 13.
- WHO, 1984. Report of Seven Meeting os Scientific Working Group on Biological Control of Vector. *TDR/BCV/SWG-7/84-3*, Geneva.
- WHO, 1991. Tropical Diseases Progress in Research, 1989 – 1990, Tenth Programme Report. *UNDP/WORLD BANK/WHO*. p. 135
- WIDYASTUTI U., CH.P., BLONDINE dan SUBIANTORO, 1996. Pengujian Patogenitas Isolat *Bacillus thuringiensis* Terhadap Jentik Nyamuk Vektor Secara Semi Kuantitatif. *J.Cermin Kedok.* 107 : 37 – 39.

XIAOQIANG, W., S.J. VENNISON, L. HUIRONG, E. BEN-BOV, A. ZARITSKY and S. BOUSSIBA. 1997. Mosquito Larvacidal Activity of Transgenic *Anabaena* Strain PCC 7120 Expressing Combinations of Genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (12) : 4971 – 4975.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Pengamatan Bioassay Isolat *B.thuringiensis* Hasil Isolasi Terhadap Larva *Aedes aegypti*

KONSENTRASI ISOLAT 0.15															
No.	KODE ISOLAT	WAKTU/REPLIKASI Ke-													
		24 J A M							48 J A M						
		1	2	3	4	5	#	\bar{x}	1	2	3	4	5	#	\bar{x}
1	MRT - A.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	MRT - B.01	1	0	1	2	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0
3	MRT - B.02	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6	6	30	6
4	MRT - B.03	14	13	13	12	13	65	14	1	1	1	0	2	5	1
5	MRT - B.04	10	10	9	10	11	50	10	5	5	6	5	4	25	5
6	MRT - C.01	3	3	3	3	3	15	3	1	1	1	1	1	5	1
7	MRT - C.02	5	5	5	5	5	25	5	8	8	8	8	8	40	8
8	MRT - C.03	0	0	0	0	0	0	0	5	5	6	4	5	25	5
9	MRT - C.04	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	15	3
10	MRT - D.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	MRT - D.02	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0
12	MRT - E.01	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0
13	MRT - E.02	2	2	2	2	2	10	2	0	0	0	0	0	0	0
14	MRT - E.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	MRT - E.04	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0
16	MRT - F.01	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0
17	MRT - F.02	1	3	2	2	2	10	2	0	0	0	0	0	0	0
18	MRT - F.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	MRT - F.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	MRT - F.05	2	2	2	0	4	10	2	1	1	1	1	1	5	1
21	MRT - F.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	KONTROL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KONSENTRASI ISOLAT 0.10															
No	KODE ISOLAT	WAKTU/REPLIKASI Ke-													
		24 J A M							48 J A M						
		1	2	3	4	5	#	\bar{x}	1	2	3	4	5	#	\bar{x}
1	MRT - A.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	MRT - B.01	3	1	2	2	2	10	2	0	0	0	0	0	0	0
3	MRT - B.02	3	3	4	2	3	15	3	5	5	5	5	5	25	5
4	MRT - B.03	14	14	14	14	14	70	14	1	1	1	1	1	5	1
5	MRT - B.04	1	3	2	2	2	10	2	13	10	10	11	11	55	11
6	MRT - C.01	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0
7	MRT - C.02	5	5	5	6	4	25	5	10	10	10	9	11	50	10
8	MRT - C.03	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	25	5
9	MRT - C.04	2	2	1	3	2	10	2	2	2	3	1	2	10	2
10	MRT - D.01	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	10	2
11	MRT - D.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	MRT - E.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	MRT - E.02	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0
14	MRT - E.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	MRT - E.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	MRT - F.01	2	2	2	2	2	10	2	0	0	0	0	0	0	0
17	MRT - F.02	1	3	3	3	5	15	3	4	2	2	2	0	10	2
18	MRT - F.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	MRT - F.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	MRT - F.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	MRT - F.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	KONTROL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lanjutan Lampiran 1.

KONSENTRASI ISOLAT 0,05															
No	KODE ISOLAT	WAKTU/REPLIKASI Ke-													
		24 J A M							48 J A M						
		1	2	3	4	5	#	\bar{x}	1	2	3	4	5	#	\bar{x}
1	MRT - A.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	MRT - B.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	MRT - B.02	2	2	2	2	2	10	2	6	6	6	6	6	30	6
4	MRT - B.03	11	12	12	13	12	60	12	3	2	2	1	2	10	2
5	MRT - B.04	7	7	7	7	7	35	7	2	2	2	2	2	10	2
6	MRT - C.01	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	5	1
7	MRT - C.02	1	1	1	1	1	5	1	8	8	8	8	8	40	8
8	MRT - C.03	1	3	2	2	2	10	2	0	0	0	0	0	0	0
9	MRT - C.04	1	1	1	1	1	5	1	1	1	1	1	1	5	1
10	MRT - D.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	MRT - D.02	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0
12	MRT - E.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	MRT - E.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	MRT - E.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	MRT - E.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	MRT - F.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	MRT - F.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	MRT - F.03	1	0	2	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0
19	MRT - F.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	MRT - F.05	3	5	7	5	5	25	5	0	0	0	0	0	0	0
21	MRT - F.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	KONTROL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran 2. Data Pengamatan Bioassay Isolat *B.thuringiensis* Hasil Isolasi Terhadap Larva *Spodoptera litura*

KONSENTRASI ISOLAT 0,15															
No	KODE ISOLAT	W A K T U / REPLIKASI Ke-													
		24 J A M							48 J A M						
		1	2	3	4	5	#	\bar{x}	1	2	3	4	5	#	\bar{x}
1	MRT - A.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	MRT - B.01	2	2	2	1	3	10	2	1	1	2	0	1	5	1
3	MRT - B.02	2	2	2	2	2	10	2	0	0	0	0	0	0	0
4	MRT - B.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	MRT - B.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	MRT - C.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	MRT - C.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	MRT - C.03	5	3	2	3	2	15	3	1	1	1	1	1	5	1
9	MRT - C.04	8	8	9	7	8	40	8	0	2	1	1	1	5	1
10	MRT - D.01	10	13	11	11	10	55	11	0	0	0	0	0	0	0
11	MRT - D.02	10	10	14	9	12	55	11	1	1	1	2	0	5	1
12	MRT - E.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	MRT - E.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	MRT - E.03	13	14	13	12	13	65	13	0	0	0	0	0	0	0
15	MRT - E.04	15	15	15	15	15	75	15	0	0	0	0	0	0	0
16	MRT - F.01	14	14	13	15	14	70	14	0	0	0	0	0	0	0
17	MRT - F.02	3	3	3	3	3	15	3	0	0	0	0	0	0	0
18	MRT - F.03	3	2	2	1	2	10	2	0	0	0	0	0	0	0
19	MRT - F.04	1	1	1	2	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0
20	MRT - F.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	MRT - F.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	KONTROL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

KONSENTRASI ISOLAT 0,10															
No	KODE ISOLAT	W A K T U / REPLIKASI Ke-													
		24 J A M							48 J A M						
		1	2	3	4	5	#	\bar{x}	1	2	3	4	5	#	\bar{x}
1	MRT - A.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	MRT - B.01	2	2	2	2	2	10	2	1	1	2	0	1	5	1
3	MRT - B.02	2	2	2	2	2	10	2	2	2	2	1	3	10	2
4	MRT - B.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	MRT - B.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	MRT - C.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	MRT - C.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	MRT - C.03	2	3	2	1	2	10	2	1	1	1	1	1	5	1
9	MRT - C.04	7	7	7	7	7	35	7	1	1	1	1	1	5	1
10	MRT - D.01	10	10	9	11	10	50	10	0	0	0	0	0	0	0
11	MRT - D.02	9	9	9	9	9	45	9	2	2	2	2	2	10	2
12	MRT - E.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	MRT - E.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	MRT - E.03	10	11	11	12	11	55	11	0	0	0	0	0	0	0
15	MRT - E.04	13	13	12	13	14	65	13	1	1	1	1	1	1	1
16	MRT - F.01	11	11	11	11	11	55	11	2	2	2	2	2	10	2
17	MRT - F.02	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0
18	MRT - F.03	3	1	0	1	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0
19	MRT - F.04	1	1	1	2	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0
20	MRT - F.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	MRT - F.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	KONTROL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lanjutan Lampiran 2.

KONSENTRASI ISOLAT 0,05

No	KODE ISOLAT	W A K T U / R E P L I K A S I Ke-													
		24 J A M							48 J A M						
		1	2	3	4	5	#	\bar{x}	1	2	3	4	5	#	\bar{x}
1	MRT - A.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	MRT - B.01	1	1	1	1	1	5	1	1	1	2	0	1	5	1
3	MRT - B.02	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	1	3	10	2
4	MRT - B.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	MRT - B.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	MRT - C.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	MRT - C.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	MRT - C.03	2	2	2	2	2	10	2	1	1	1	1	1	5	1
9	MRT - C.04	5	5	5	5	5	25	5	1	1	1	1	1	5	1
10	MRT - D.01	6	6	6	6	6	30	6	0	0	0	0	0	0	0
11	MRT - D.02	10	9	10	7	9	45	9	1	1	1	0	2	5	1
12	MRT - E.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	MRT - E.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	MRT - E.03	7	7	8	7	6	35	7	0	0	0	0	0	0	0
15	MRT - E.04	10	10	10	10	10	50	10	1	1	1	1	1	1	1
16	MRT - F.01	8	8	9	7	8	40	8	0	0	0	0	0	0	0
17	MRT - F.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	MRT - F.03	1	1	1	1	1	5	1	0	0	0	0	0	0	0
19	MRT - F.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	MRT - F.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	MRT - F.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	KONTROL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Probit : Untuk rata-rata Isolat B02

***** PROBIT ANALYSIS *****

DATA Information

4 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 1 case is in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Parameter estimates converged after 15 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONSEN	.99750	4.46643	.22333

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1.45997	.42111	-3.46696

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 5.762 DF = 2 P = .056

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Observed and Expected Frequencies

KONSEN	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.15	15.0	.0	1.426	-1.426	.09504
.10	15.0	3.0	1.303	1.697	.08688
.05	15.0	2.0	1.189	.811	.07926
.00	15.0	.0	1.082	-1.082	.07215

***** PROBIT ANALYSIS *****

Confidence Limits for Effective KONSEN

Prob	KONSEN	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-.86856	.	.
.02	-.59527	.	.
.03	-.42188	.	.
.04	-.29145	.	.
.05	-.18535	.	.
.06	-.09505	.	.
.07	-.01586	.	.
.08	.05503	.	.
.09	.11951	.	.
.10	.17886	.	.
.15	.42460	.	.
.20	.61990	.	.
.25	.78745	.	.
.30	.93791	.	.
.35	1.07734	.	.
.40	1.20965	.	.
.45	1.33765	.	.
.50	1.46363	.	.
.55	1.58961	.	.
.60	1.71761	.	.
.65	1.84992	.	.
.70	1.98935	.	.
.75	2.13981	.	.
.80	2.30736	.	.
.85	2.50267	.	.
.90	2.74840	.	.
.91	2.80775	.	.
.92	2.87223	.	.
.93	2.94313	.	.
.94	3.02231	.	.
.95	3.11261	.	.
.96	3.21871	.	.
.97	3.34915	.	.
.98	3.52254	.	.
.99	3.79582	.	.

bit : Untuk rata-rata Isolat B03

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Information

4 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 1 case is in the control group.

DELTA Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Parameter estimates converged after 18 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONSEN	18.61880	4.08110	4.56220

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-.85765	.32647	-2.62701

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 15.637 DF = 2 P = .000

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Observed and Expected Frequencies

KONSEN	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.15	15.0	13.0	14.603	-1.603	.97352
.10	15.0	14.0	12.636	1.364	.84237
.05	15.0	12.0	7.938	4.062	.52921
.00	15.0	.0	2.933	-2.933	.19554

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Confidence Limits for Effective KONSEN

Prob	KONSEN	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-.07888	.	.
.02	-.06424	.	.
.03	-.05495	.	.
.04	-.04796	.	.
.05	-.04228	.	.
.06	-.03744	.	.
.07	-.03320	.	.
.08	-.02940	.	.
.09	-.02595	.	.
.10	-.02277	.	.
.15	-.00960	.	.
.20	.00086	.	.
.25	.00984	.	.
.30	.01790	.	.
.35	.02537	.	.
.40	.03246	.	.
.45	.03931	.	.
.50	.04606	.	.
.55	.05281	.	.
.60	.05967	.	.
.65	.06676	.	.
.70	.07423	.	.
.75	.08229	.	.
.80	.09127	.	.
.85	.10173	.	.
.90	.11489	.	.
.91	.11807	.	.
.92	.12153	.	.
.93	.12533	.	.
.94	.12957	.	.
.95	.13441	.	.
.96	.14009	.	.
.97	.14708	.	.
.98	.15637	.	.
.99	.17101	.	.

bit : Untuk rata-rata Isolat B04

***** PROBIT ANALYSIS *****

Information

4 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 1 case is in the control group.

DEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Parameter estimates converged after 15 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONSEN	10.69375	3.53081	3.02870

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1.36514	.35860	-3.80686

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 12.149 DF = 2 P = .002

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Observed and Expected Frequencies

KONSEN	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.15	15.0	10.0	8.916	1.084	.59442
.10	15.0	2.0	5.756	-3.756	.38370
.05	15.0	7.0	3.047	3.953	.20314
.00	15.0	.0	1.292	-1.292	.08610

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Confidence Limits for Effective KONSEN

Prob	KONSEN	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-.08989	.	.
.02	-.06439	.	.
.03	-.04822	.	.
.04	-.03605	.	.
.05	-.02616	.	.
.06	-.01773	.	.
.07	-.01035	.	.
.08	-.00373	.	.
.09	.00228	.	.
.10	.00782	.	.
.15	.03074	.	.
.20	.04896	.	.
.25	.06458	.	.
.30	.07862	.	.
.35	.09163	.	.
.40	.10397	.	.
.45	.11591	.	.
.50	.12766	.	.
.55	.13941	.	.
.60	.15135	.	.
.65	.16369	.	.
.70	.17670	.	.
.75	.19073	.	.
.80	.20636	.	.
.85	.22458	.	.
.90	.24750	.	.
.91	.25304	.	.
.92	.25905	.	.
.93	.26566	.	.
.94	.27305	.	.
.95	.28147	.	.
.96	.29137	.	.
.97	.30354	.	.
.98	.31971	.	.
.99	.34520	.	.

obit : Untuk rata-rata Isolasi C02

***** PROBIT ANALYSIS *****

Information

4 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 1 case is in the control group.

DEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

arning # 13527

parameter estimates did not converge in maximum number of iterations.

umber of iterations = 20
 ptimal solution not found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONSEN	11.99409	4.44053	2.70105

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-2.00775	.50292	-3.99216

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 2.203 DF = 2 P = .332

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

KONSEN	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.15	15.0	5.0	6.260	-1.260	.41736
.10	15.0	5.0	3.142	1.858	.20945
.05	15.0	1.0	1.193	-.193	.07956
.00	15.0	.0	.335	-.335	.02233

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Confidence Limits for Effective KONSEN

Prob	KONSEN	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-.02656	-.37595	.03398
.02	-.00383	-.29432	.04837
.03	.01059	-.24282	.05778
.04	.02143	-.20430	.06508
.05	.03026	-.17316	.07122
.06	.03777	-.14685	.07663
.07	.04435	-.12396	.08157
.08	.05025	-.10366	.08618
.09	.05561	-.08540	.09057
.10	.06055	-.06880	.09482
.15	.08098	-.00357	.11592
.20	.09723	.04061	.14035
.25	.11116	.06945	.17038
.30	.12367	.08823	.20446
.35	.13527	.10153	.24014
.40	.14627	.11197	.27618
.45	.15692	.12087	.31226
.50	.16740	.12890	.34849
.55	.17787	.13645	.38519
.60	.18852	.14379	.42283
.65	.19952	.15113	.46197
.70	.21112	.15866	.50342
.75	.22363	.16663	.54832
.80	.23756	.17535	.59846
.85	.25381	.18537	.65706
.90	.27424	.19781	.73094
.91	.27918	.20080	.74881
.92	.28454	.20404	.76822
.93	.29044	.20759	.78958
.94	.29702	.21154	.81345
.95	.30453	.21604	.84067
.96	.31336	.22132	.87267
.97	.32421	.22778	.91203
.98	.33863	.23635	.96438
.99	.36135	.24981	1.04693

bit : Untuk rata-rata Isolat C04

***** PROBIT ANALYSIS *****

Information

4 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 1 case is in the control group.

Model Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Parameter estimates converged after 15 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONSEN	11.04915	3.52735	3.13243

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1.35274	.36178	-3.73917

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 3.511 DF = 2 P = .173

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

KONSEN	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.15	15.0	8.0	9.295	-1.295	.61968
.10	15.0	7.0	6.032	.968	.40214
.05	15.0	5.0	3.177	1.823	.21177
.00	15.0	.0	1.321	-1.321	.08807

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Confidence Limits for Effective KONSEN

Prob	KONSEN	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-.08812	-.38880	-.01541
.02	-.06344	-.32360	.00047
.03	-.04779	-.28235	.01068
.04	-.03602	-.25141	.01844
.05	-.02644	-.22632	.02483
.06	-.01829	-.20502	.03033
.07	-.01114	-.18641	.03522
.08	-.00474	-.16980	.03964
.09	.00108	-.15475	.04372
.10	.00644	-.14095	.04754
.15	.02863	-.08459	.06409
.20	.04626	-.04129	.07875
.25	.06138	-.00617	.09334
.30	.07497	.02260	.10922
.35	.08756	.04575	.12745
.40	.09950	.06401	.14844
.45	.11106	.07854	.17189
.50	.12243	.09057	.19725
.55	.13380	.10108	.22412
.60	.14536	.11074	.25244
.65	.15730	.12002	.28242
.70	.16989	.12929	.31452
.75	.18347	.13890	.34956
.80	.19860	.14927	.38891
.85	.21623	.16106	.43507
.90	.23842	.17559	.49345
.91	.24377	.17907	.50759
.92	.24959	.18283	.52296
.93	.25600	.18695	.53988
.94	.26314	.19154	.55878
.95	.27130	.19676	.58037
.96	.28087	.20286	.60574
.97	.29265	.21034	.63696
.98	.30830	.22025	.67851
.99	.33297	.23579	.74406



bit : Untuk rata-rata Isolat D01

***** PROBIT ANALYSIS *****

A Information

4 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 1 case is in the control group.

DEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

parameter estimates converged after 7 iterations.
 optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONSEN	15.14239	3.67457	4.12086

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-1.33198	.35826	-3.71795

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 3.975 DF = 2 P = .137

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Observed and Expected Frequencies

KONSEN	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.15	15.0	11.0	12.393	-1.393	.82623
.10	15.0	10.0	8.585	1.415	.57231
.05	15.0	6.0	4.240	1.760	.28269
.00	15.0	.0	1.372	-1.372	.09143

***** PROBIT ANALYSIS *****

Confidence Limits for Effective KONSEN

Prob	KONSEN	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-.06567	.	.
.02	-.04767	.	.
.03	-.03624	.	.
.04	-.02765	.	.
.05	-.02066	.	.
.06	-.01471	.	.
.07	-.00950	.	.
.08	-.00483	.	.
.09	-.00058	.	.
.10	.00333	.	.
.15	.01952	.	.
.20	.03238	.	.
.25	.04342	.	.
.30	.05333	.	.
.35	.06252	.	.
.40	.07123	.	.
.45	.07966	.	.
.50	.08796	.	.
.55	.09626	.	.
.60	.10469	.	.
.65	.11341	.	.
.70	.12259	.	.
.75	.13251	.	.
.80	.14354	.	.
.85	.15641	.	.
.90	.17260	.	.
.91	.17651	.	.
.92	.18075	.	.
.93	.18542	.	.
.94	.19064	.	.
.95	.19659	.	.
.96	.20358	.	.
.97	.21217	.	.
.98	.22359	.	.
.99	.24159	.	.

bit : Untuk rata-rata Isolat D02

***** PROBIT ANALYSIS *****

A Information

4 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 1 case is in the control group.

DEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

parameter estimates converged after 7 iterations.
 optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONSEN	12.79591	3.44503	3.71431

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1.03239	.32694	-3.15777

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 7.509 DF = 2 P = .023

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Observed and Expected Frequencies

KONSEN	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.15	15.0	11.0	12.187	-1.187	.81246
.10	15.0	9.0	8.964	.036	.59762
.05	15.0	9.0	5.210	3.790	.34731
.00	15.0	.0	2.264	-2.264	.15094

***** PROBIT ANALYSIS *****

Confidence Limits for Effective KONSEN

Prob	KONSEN	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-.10112	.	.
.02	-.07982	.	.
.03	-.06630	.	.
.04	-.05613	.	.
.05	-.04786	.	.
.06	-.04082	.	.
.07	-.03465	.	.
.08	-.02912	.	.
.09	-.02410	.	.
.10	-.01947	.	.
.15	-.00032	.	.
.20	.01491	.	.
.25	.02797	.	.
.30	.03970	.	.
.35	.05057	.	.
.40	.06088	.	.
.45	.07086	.	.
.50	.08068	.	.
.55	.09050	.	.
.60	.10048	.	.
.65	.11079	.	.
.70	.12166	.	.
.75	.13339	.	.
.80	.14645	.	.
.85	.16168	.	.
.90	.18083	.	.
.91	.18546	.	.
.92	.19049	.	.
.93	.19601	.	.
.94	.20219	.	.
.95	.20923	.	.
.96	.21750	.	.
.97	.22767	.	.
.98	.24118	.	.
.99	.26249	.	.

bit : Untuk rata-rata Isolat E03

***** PROBIT ANALYSIS *****

A Information

4 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 1 case is in the control group.

DEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

parameter estimates converged after 8 iterations.
 optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONSEN	18.74596	4.06473	4.61186

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-1.37257	.36782	-3.73163

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 3.479 DF = 2 P = .176

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

KONSEN	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.15	15.0	13.0	13.875	-.875	.92497
.10	15.0	11.0	10.383	.617	.69217
.05	15.0	7.0	4.975	2.025	.33168
.00	15.0	.0	1.274	-1.274	.08494

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Confidence Limits for Effective KONSEN

Prob	KONSEN	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-.05088	-.14902	-.00909
.02	-.03634	-.12417	.00156
.03	-.02711	-.10846	.00837
.04	-.02017	-.09668	.01353
.05	-.01452	-.08713	.01776
.06	-.00972	-.07902	.02138
.07	-.00551	-.07193	.02458
.08	-.00173	-.06561	.02746
.09	.00170	-.05987	.03009
.10	.00486	-.05460	.03253
.15	.01793	-.03298	.04283
.20	.02832	-.01610	.05131
.25	.03724	-.00191	.05889
.30	.04525	.01050	.06602
.35	.05266	.02165	.07298
.40	.05970	.03182	.08000
.45	.06652	.04121	.08723
.50	.07322	.04995	.09485
.55	.07992	.05816	.10301
.60	.08673	.06595	.11184
.65	.09377	.07347	.12150
.70	.10119	.08088	.13221
.75	.10920	.08837	.14425
.80	.11812	.09626	.15813
.85	.12851	.10500	.17475
.90	.14158	.11552	.19615
.91	.14474	.11801	.20137
.92	.14817	.12068	.20707
.93	.15195	.12360	.21336
.94	.15616	.12684	.22041
.95	.16096	.13050	.22848
.96	.16661	.13476	.23799
.97	.17355	.13997	.24973
.98	.18278	.14683	.26539
.99	.19732	.15753	.29018

bit : Untuk rata-rata Isolat E04

***** PROBIT ANALYSIS *****

A Information

4 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 1 case is in the control group.

DEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

parameter estimates converged after 20 iterations.
 optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONSEN	30.35080	6.85194	4.42952
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1.52476	.44420	-3.43256

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 3.892 DF = 2 P = .143

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Observed and Expected Frequencies

KONSEN	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.15	15.0	15.0	14.982	.018	.99877
.10	15.0	13.0	14.018	-1.018	.93452
.05	15.0	10.0	7.457	2.543	.49712
.00	15.0	.0	.955	-.955	.06366

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Confidence Limits for Effective KONSEN

Prob	KONSEN	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-.02641	.	.
.02	-.01743	.	.
.03	-.01173	.	.
.04	-.00744	.	.
.05	-.00396	.	.
.06	-.00099	.	.
.07	.00161	.	.
.08	.00394	.	.
.09	.00606	.	.
.10	.00801	.	.
.15	.01609	.	.
.20	.02251	.	.
.25	.02801	.	.
.30	.03296	.	.
.35	.03754	.	.
.40	.04189	.	.
.45	.04610	.	.
.50	.05024	.	.
.55	.05438	.	.
.60	.05859	.	.
.65	.06293	.	.
.70	.06752	.	.
.75	.07246	.	.
.80	.07797	.	.
.85	.08439	.	.
.90	.09246	.	.
.91	.09441	.	.
.92	.09653	.	.
.93	.09886	.	.
.94	.10146	.	.
.95	.10443	.	.
.96	.10792	.	.
.97	.11221	.	.
.98	.11790	.	.
.99	.12689	.	.

Probit : Untuk rata-rata Isolat F01

***** PROBIT ANALYSIS *****

A Information

4 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 1 case is in the control group.

DEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Parameter estimates converged after 10 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONSEN	20.94783	4.45981	4.69702
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1.38929	.37694	-3.68568

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 3.492 DF = 2 P = .174

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

KONSEN	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.15	15.0	14.0	14.403	-.403	.96019
.10	15.0	11.0	11.396	-.396	.75975
.05	15.0	8.0	5.493	2.507	.36621
.00	15.0	.0	1.236	-1.236	.08237

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Confidence Limits for Effective KONSEN

Prob	KONSEN	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-.04473	-.13148	-.00697
.02	-.03172	-.10956	.00263
.03	-.02346	-.09571	.00877
.04	-.01725	-.08533	.01343
.05	-.01220	-.07691	.01724
.06	-.00790	-.06976	.02051
.07	-.00413	-.06351	.02339
.08	-.00075	-.05793	.02599
.09	.00232	-.05287	.02836
.10	.00514	-.04823	.03056
.15	.01684	-.02918	.03985
.20	.02614	-.01429	.04748
.25	.03412	-.00177	.05429
.30	.04129	.00920	.06067
.35	.04793	.01907	.06687
.40	.05423	.02811	.07309
.45	.06032	.03649	.07947
.50	.06632	.04434	.08615
.55	.07232	.05176	.09326
.60	.07842	.05885	.10093
.65	.08472	.06571	.10932
.70	.09136	.07250	.11861
.75	.09852	.07938	.12908
.80	.10650	.08661	.14117
.85	.11580	.09461	.15569
.90	.12750	.10421	.17443
.91	.13033	.10647	.17902
.92	.13340	.10890	.18402
.93	.13677	.11156	.18954
.94	.14054	.11450	.19573
.95	.14484	.11782	.20282
.96	.14990	.12170	.21118
.97	.15611	.12641	.22150
.98	.16436	.13262	.23529
.99	.17738	.14231	.25712

Analisis Varians LC50 Untuk Isolat dengan larva uji Aedes

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
LC50	11.534	3	15	.000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
LC50	Between Groups	4.483	3	1.494	69.816	.000
	Within Groups	.321	15	2.140E-02		
	Total	4.804	18			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: LC50

LSD

(I) Jenis Isolat	(J) Jenis Isolat	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
B02	B03	1.2543*	.098	.000	1.0451	1.4635
	B04	1.1720*	.098	.000	.9628	1.3812
	C02	1.1328*	.098	.000	.9236	1.3419
B03	B02	-1.2543*	.098	.000	-1.4635	-1.0451
	B04	-8.23E-02	.093	.388	-.2795	.1150
	C02	-.1215	.093	.209	-.3188	7.568E-02
B04	B02	-1.1720*	.098	.000	-1.3812	-.9628
	B03	8.227E-02	.093	.388	-.1150	.2795
	C02	-3.93E-02	.093	.677	-.2365	.1579
C02	B02	-1.1328*	.098	.000	-1.3419	-.9236
	B03	.1215	.093	.209	-7.57E-02	.3188
	B04	3.928E-02	.093	.677	-.1579	.2365

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Varians LC50 Untuk Isolat dengan larva uji Aedes

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
						Lower Bound	Upper Bound
Jenis Isolat	B02	4	1.3001	.3270	.1635	.7799	1.8204
	B03	5	4.585E-02	1.289E-03	5.764E-04	4.425E-02	4.745E-02
	B04	5	.1281	7.988E-03	3.572E-03	.1182	.1380
	C02	5	.1674	3.924E-03	1.755E-03	.1625	.1723
	Total	19	.3635	.5166	.1185	.1145	.6125

Descriptives

		Minimum	Maximum
Jenis Isolat	B02	.81	1.46
	B03	.04	.05
	B04	.12	.14
	C02	.16	.17
	Total	.04	1.46

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
11.534	3	15	.000

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.483	3	1.494	69.816	.000
Within Groups	.321	15	2.140E-02		
Total	4.804	18			

Loc Tests

Multiple Comparisons

ent Variable: LC50

is	(J) Jenis Isolat	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence interval	
					Lower Bound	Upper Bound
	B03	1.2543*	.098	.000	1.0451	1.4635
	B04	1.1720*	.098	.000	.9628	1.3812
	C02	1.1328*	.098	.000	.9236	1.3419
	B02	-1.2543*	.098	.000	-1.4635	-1.0451
	B04	-8.23E-02	.093	.388	-.2795	.1150
	C02	-.1215	.093	.209	-.3188	7.568E-02
	B02	-1.1720*	.098	.000	-1.3812	-.9628
	B03	8.227E-02	.093	.388	-.1150	.2795
	C02	-3.93E-02	.093	.677	-.2365	.1579
	B02	-1.1328*	.098	.000	-1.3419	-.9236
	B03	.1215	.093	.209	-7.57E-02	.3188
	B04	3.928E-02	.093	.677	-.1579	.2365

the mean difference is significant at the .05 level.

Analisis Varians LC50 Untuk Isolat dengan larva uji *S-litura*

Descriptives

			N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
							Lower Bound	Upper Bound
C50	Jenis Isolat	C04	5	.12276	6.04E-03	2.70E-03	.11526	.13026
		D01	5	8.82E-02	5.84E-03	2.61E-03	8.10E-02	9.55E-02
		D02	5	8.15E-02	1.21E-02	5.42E-03	6.65E-02	9.66E-02
		E03	5	7.32E-02	3.42E-03	1.53E-03	6.89E-02	7.74E-02
		E04	5	5.02E-02	2.31E-03	1.03E-03	4.73E-02	5.31E-02
		F01	5	6.62E-02	2.65E-04	1.19E-04	6.58E-02	6.65E-02
		Total	30	8.03E-02	2.35E-02	4.30E-03	7.16E-02	8.91E-02

Descriptives

			Minimum	Maximum
LC50	Jenis Isolat	C04	.115	.132
		D01	.080	.093
		D02	.066	.099
		E03	.070	.077
		E04	.047	.053
		F01	.066	.066
		Total	.047	.132

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
LC50	Between Groups	1.512E-02	5	3.024E-03	77.284	.000
	Within Groups	9.390E-04	24	3.913E-05		
	Total	1.606E-02	29			

Multiple Comparisons

pendent Variable: LC50

D

I) Jenis Isolat	(J) Jenis Isolat	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
C04	D01	3.45E-02*	.004	.000	2.64E-02	4.27E-02
	D02	4.12E-02*	.004	.000	3.31E-02	4.94E-02
	E03	4.96E-02*	.004	.000	4.14E-02	5.77E-02
	E04	7.26E-02*	.004	.000	6.44E-02	8.07E-02
	F01	5.66E-02*	.004	.000	4.84E-02	6.47E-02
D01	C04	-3.5E-02*	.004	.000	-4.3E-02	-2.6E-02
	D02	6.68E-03	.004	.104	-1.5E-03	1.48E-02
	E03	1.50E-02*	.004	.001	6.85E-03	2.32E-02
	E04	3.80E-02*	.004	.000	2.99E-02	4.62E-02
	F01	2.20E-02*	.004	.000	1.39E-02	3.02E-02
D02	C04	-4.1E-02*	.004	.000	-4.9E-02	-3.3E-02
	D01	-6.7E-03	.004	.104	-1.5E-02	1.48E-03
	E03	8.34E-03*	.004	.046	1.73E-04	1.65E-02
	E04	3.13E-02*	.004	.000	2.32E-02	3.95E-02
	F01	1.54E-02*	.004	.001	7.19E-03	2.35E-02
E03	C04	-5.0E-02*	.004	.000	-5.8E-02	-4.1E-02
	D01	-1.5E-02*	.004	.001	-2.3E-02	-6.9E-03
	D02	-8.3E-03*	.004	.046	-1.7E-02	-1.7E-04
	E04	2.30E-02*	.004	.000	1.48E-02	3.12E-02
	F01	7.02E-03	.004	.089	-1.1E-03	1.52E-02
E04	C04	-7.3E-02*	.004	.000	-8.1E-02	-6.4E-02
	D01	-3.8E-02*	.004	.000	-4.6E-02	-3.0E-02
	D02	-3.1E-02*	.004	.000	-4.0E-02	-2.3E-02
	E03	-2.3E-02*	.004	.000	-3.1E-02	-1.5E-02
	F01	-1.6E-02*	.004	.000	-2.4E-02	-7.8E-03
F01	C04	-5.7E-02*	.004	.000	-6.5E-02	-4.8E-02
	D01	-2.2E-02*	.004	.000	-3.0E-02	-1.4E-02
	D02	-1.5E-02*	.004	.001	-2.4E-02	-7.2E-03
	E03	-7.0E-03	.004	.089	-1.5E-02	1.15E-03
	E04	1.60E-02*	.004	.000	7.83E-03	2.42E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.