



SALINAN

KEPUTUSAN

**REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOMOR 1408/UN3/2019**

TENTANG

**PELAKSANAAN PENELITIAN INTERNAL UNIVERSITAS AIRLANGGA
HIBAH RISET MANDAT, PENELITIAN UNGGULAN FAKULTAS DAN
PENELITIAN DOSEN PEMULA TAHUN 2019**

REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA,

Menimbang : a. bahwa sesuai hasil seleksi proposal penelitian hibah riset mandat, penelitian unggulan fakultas dan penelitian dosen pemula Universitas Airlangga Tahun 2019 sebagai salah satu wujud dari pelaksanaan tridharma perguruan tinggi, maka perlu menetapkan para peneliti dan judul penelitian dimaksud;

b. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a, perlu menetapkan Keputusan Rektor tentang Pelaksanaan Penelitian Internal Universitas Airlangga Hibah Riset Mandat, Penelitian Unggulan Fakultas dan Penelitian Dosen Pemula Tahun 2019;

Mengingat : 1. Undang-Undang Nomor 20 Tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4301);

2. Undang-Undang Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 158, Tambahan Lembaran Negara Tahun 2012 Nomor 5336);

3. Peraturan Pemerintah Nomor 57 Tahun 1954 tentang Pendirian Universitas Airlangga di Surabaya sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Pemerintah Nomor 3 Tahun 1955 tentang Pengubahan Peraturan Pemerintah Nomor 57 Tahun 1954 (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1954 Nomor 99 Tambahan Lembaran Negara Nomor 695 juncto Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1955 Nomor 4 Tambahan Lembaran Negara Nomor 748);

4. Peraturan Pemerintah Nomor 37 Tahun 2009 tentang Dosen (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 76, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5007);
5. Peraturan Pemerintah Nomor 4 Tahun 2014 tentang Penyelenggaraan Pendidikan Tinggi dan Pengelolaan Perguruan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 16, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5500);
6. Peraturan Pemerintah Nomor 30 Tahun 2014 tentang Statuta Universitas Airlangga (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5535);
7. Peraturan Pemerintah Nomor 26 Tahun 2015 tentang Bentuk dan Mekanisme Pendanaan Perguruan Tinggi Negeri Badan Hukum (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2015 Nomor 110, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5699);
8. Keputusan Majelis Wali Amanat Universitas Airlangga Nomor 1032/UN3.MWA/K/2015 tentang Pengangkatan Rektor Universitas Airlangga Periode 2015-2020;
9. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 39 Tahun 2017 tentang Perubahan Atas Peraturan Rektor 42 Tahun 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Airlangga;
10. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 3 Tahun 2019 tentang Perubahan Kedua Atas Peraturan Rektor Nomor 27 Tahun 2018 tentang Pedoman Pendidikan Universitas Airlangga;
11. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 1280/UN3/2015 tentang Pembentukan Lembaga Penelitian dan Inovasi;
12. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 1285/UN3/2015 tentang Pengangkatan Ketua pada Lembaga dan Kepala Perpustakaan di Lingkungan Universitas Airlangga.

Meperhatikan : Surat Ketua lembaga penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga Nomor 398/UN3.14/LT/2019, tanggal 21 Maret 2019, perihal Permohonan SK tentang Pelaksanaan Penelitian Internal Universitas Airlangga Tahun 2019.

MEMUTUSKAN :

- MENETAPKAN :** **KEPUTUSAN REKTOR TENTANG PELAKSANAAN PENELITIAN INTERNAL UNIVERSITAS AIRLANGGA HIBAH RISET MANDAT, PENELITIAN UNGGULAN FAKULTAS DAN PENELITIAN DOSEN PEMULA TAHUN 2019.**
- KESATU :** Menetapkan hasil seleksi proposal penelitian internal Universitas Airlangga hibah riset mandat, penelitian unggulan fakultas dan penelitian dosen pemula tahun 2019.
- KEDUA :** Penerima hibah riset mandat, penelitian unggulan fakultas dan penelitian dosen pemula sebagaimana dimaksud pada diktum KESATU sebanyak 41 (empat puluh satu) judul hibah riset mandat, 176 (seratus tujuh puluh enam) judul penelitian unggulan fakultas, dan 159 (seratus lima puluh sembilan) judul penelitian dosen pemula, dengan susunan nama tim peneliti sebagaimana tercantum dalam lampiran I, lampiran II dan lampiran III yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Keputusan Rektor ini.
- KETIGA :** Biaya untuk pelaksanaan penelitian sebagaimana dimaksud pada diktum KEDUA adalah:
1. Hibah Riset Mandat sebesar Rp. 8.870.160.466 (delapan milyar delapan ratus tujuh puluh juta seratus enam puluh ribu empat ratus enam puluh enam rupiah) dibebankan pada dana RKAT Lembaga Penelitian dan Inovasi;
 2. Penelitian Unggulan Fakultas sebesar Rp. 6.577.632.828 (enam milyar lima ratus tujuh puluh tujuh juta enam ratus tiga puluh dua ribu delapan ratus dua puluh delapan rupiah) dibebankan pada RKAT masing-masing Fakultas;
 3. Penelitian dosen pemula sebesar Rp. 3.514.828.500 (tiga milyar lima ratus empat belas juta delapan ratus dua puluh delapan ribu lima ratus rupiah) dibebankan pada RKAT masing-masing Fakultas.
- KEEMPAT :** Dalam melaksanakan tugasnya, penerima dana penelitian sebagaimana dimaksud pada diktum KEDUA, bekerja secara jujur dan transparan dengan berpedoman pada ketentuan peraturan perundang-undangan yang berlaku, serta bertanggungjawab kepada Rektor melalui Dekan pada Fakultas masing-masing.
- KELIMA :** Jangka waktu pelaksanaan penelitian sebagaimana dimaksud pada diktum KESATU terhitung mulai tanggal 1 Maret 2019 sampai dengan 31 Desember 2019.

KEENAM : Keputusan Rektor ini berlaku surut mulai tanggal 1 Maret 2019.

Salinan disampaikan Yth:
1. Pimpinan Unit Kerja di Lingkungan Unair
2. Yang bersangkutan

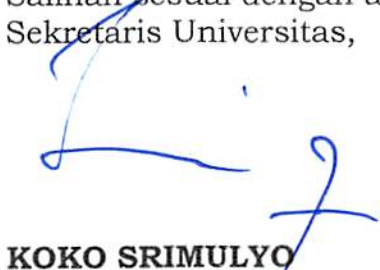
Ditetapkan di Surabaya
pada tanggal 22 Maret 2019

REKTOR,

ttd

MOHAMMAD NASIH
NIP.196508061992031002

Salinan sesuai dengan aslinya
Sekretaris Universitas,



KOKO SRIMULYO
NIP 196602281990021001

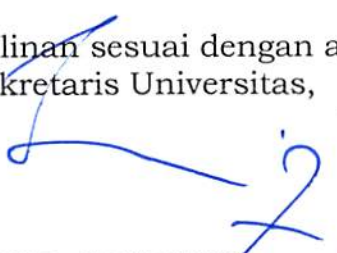
LAMPIRAN II KEPUTUSAN REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA**NOMOR : 1408/UN3/2019, TANGGAL 21 MARET 2019****TENTANG : PELAKSANAAN PENELITIAN INTERNAL UNIVERSITAS AIRLANGGA HIBAH RISET MANDAT,
PENELITIAN UNGGULAN FAKULTAS DAN PENELITIAN DOSEN PEMULA TAHUN 2018****SKEMA PENELITIAN UNGGULAN FAKULTAS**

No	TIM PENELITI	NAMA MAHASISWA	SKEMA	Fakultas / Pusat Studi	JUDUL PENELITIAN	DANA
1	Eka Mishbahatul M.Has, S.Kep.,Ns.,M.Kep. Ferry Efendi, S.Kep.,Ns.,M.Sc., Ph.D Slyvia Dwi W, S.Kep.,Ns.,M.Kep Setho Hadisuyatmana S.Kep.,Ns.,M.Ns (CommHlth & PC)	Ika Zulkafika Mahmudah	PUF	F.Kep	Determinan stunting pada usia 6-24 bulan di Indonesia (Analisis data IFLS-5 tahun 2014/2015)	Rp 20.000.000
2	Dr. Rizki Fitriyari PK, S.Kep.,Ns.,M.Kep Dr. Ah. Yusuf, S.Kp.,M.Kes Rr. Dian Tristiana, S.Kep.,Ns.,M.Kep	Winda Kusumawardani S.Kep.,Ns.	PUF	F.Kep	Pengembangan instrumen clinical pathway pada kasus skizofrenia berdasarkan SDKI di Rumah Sakit Jiwa Menur Surabaya	Rp 25.000.000
3	Dr. Yuni Sufyanti Arief, S.Kp.,M.Kes. Ilya Krisnana, S.Kep.,Ns.,M.Kep Praba Diyan Rahmawati, S.Kep.,Ns.,M.Kep. Iqlima Dwi Kurnia, S.Kep.,Ns.,M.Kep	Hasanuddin, Amd.Kep	PUF	F.Kep	Health coaching dalam meningkatkan self-efficacy keluarga dalam melaksanakan pencegahan gizi buruk pada balita	Rp 35.000.000
4	Endah Mastuti, S.Psi., M.Si., Dr. Seger Handoyo, Psikolog	Fita Fauziah Rahmah (111211132006)	PUF	F.Psi.	Prediktor Demografi Terhadap Test Anxiety Siswa dalam Menghadapi Computer Based Test (CBT)	Rp 40.000.000
5	Dr. Achmad Chusairi, S.Psi., MA, Ilham Nur Alfian, M.Psi., Psikolog	Ardiana Meilinawati (111611133038) Linda Fatmawati (111711133032)	PUF	F.Psi.	Memahami Remaja Dalam Mengembangkan Kemampuan Diri	Rp 40.000.000
6	Atika Dian Ariana, S.Psi., M.Sc., Tri Kurniati Ambarini, M.Psi., Psikolog	Edwin Elmando Purnomo (111311133189) Naufal Al-Farizy (111611133132) Sita Nadia Salsabila Widodo (111611133142) Kavindhi Pradana Firmansyah (111611133178) Edelweiss Stefany Tomahawk (111711133066)	PUF	F.Psi.	Factors Affecting Help- Seeking Behaviors in Community Health Service of People with Common Mental Health Problems	Rp 30.000.000

No	TIM PENELITI	NAMA MAHASISWA	SKEMA	Fakultas / Pusat Studi	JUDUL PENELITIAN	DANA
144	Dr. Sri Sumarsih, Dra., M.Si. Dr. Fatimah, S.Si., M.Kes. Drs. Sofijan Hadi, M.Kes.	Muhammad Iqbal Adiyarso	PUF	FST	Produksi dan Peningkatan Aktivitas Enzim Lipase dari Isolat Lokal Bakteri <i>Micrococcus</i> sp.	Rp 40.000.000
145	Prof. Hery Purnobasuki, Ph.D Dr. Sucipto Hariyanto, DEA	Putu R. Purnama	PUF	FST	Variasi Genetik <i>Thalassia hemprichii</i> (Ehrenb) Aschers. di Perairan Pantai Labuhan Kab. Lamongan melalui Pendekatan RAPD	Rp 40.000.000
146	Salamun, Drs., M.Kes. Dr. Ni'matuzahroh Dr. Fatimah, S.Si., M.Kes.	Nadia Al Batati Izdihar Tsana	PUF	FST	Pengembangan Produk Bioinsektisida: Deteksi Gen <i>Cry</i> dan Karakteristik Genetik Entomopatogen Lokal <i>Bacillus</i> sp. Serta Uji Toksisitasnya sebagai Biolarvasida Vektor Demam Berdarah Dengue	Rp 40.000.000
147	Dr. Alfiah Hayati Drs. Agus Supriyanto, M.Si. Aken Puti Wangyun, S.Si., M.S.c.	Meirizka Amira	PUF	FST	Potensi Bioremediasi terhadap Kemampuan Reproduksi dan Hematologi Ikan Nila (<i>Oreochromis niloticus</i>) yang Tercemar Logam Berat: Upaya Budidaya Perairan	Rp 40.000.000
148	Harsasi Setyawati, S.Si., M.Si. Ahmadi Jaya Permana, S.Si., M.Si. Teguh Hari Sucipto, S.Si., M.Si.	Hardinata Rachmad Sinatriya	PUF	FST	Potensi Senyawa Kompleks Kobalt sebagai <i>Photovoltaic-Thermoelectric</i> untuk Sel Surya Berkinerja Tinggi	Rp 40.000.000
149	Toha Saifudin, S.Si., M.Si. Drs. Sulyanto, M.Si. Ir. Elly anna, M.Si.	Mariet Cetrin Noviani Aso Balita	PUF	FST	Pengembangan Metode Estimasi pada Model <i>Geographically Weighted Regression</i> Menggunakan Estimator Nonparametrik Polinomial Lokal dan Penerapannya pada Bidang Kehayatan	Rp 40.000.000

No	TIM PENELITI	NAMA MAHASISWA	SKEMA	Fakultas / Pusat Studi	JUDUL PENELITIAN	DANA
172	M. Gandul Atik Yuliani, drh., M.Kes Ratna Damayanti, drh., M.Kes Prof. Dr. Anwar Ma'ruf, drh., M.Kes	Alhambra Beac Selvidwisian	PUF	SPS	Desain Vaksin Sub Unit Aeromonas Hydrophila Isolat Lokal Melalui Pendekatan Imunoinformatika	Rp 40.000.000
173	Dr. Epy Muhammad Luqman, drh.,M.Si Dr. Widjiati, drh.,M.Si Dr. Eka Pramytha Hestianah, drh., M.Kes	Alfian aulia Rakhman (061611133203) Athaya kirana Maulidi (061611133130) Nonik Ayu yulitasari (061611133029)	PUF	SPS	Interaksi Antara Autofagi, Apoptosis dan Nekrosis Sel Otak Anak Mencit (<i>Mus musculus</i>) dari Induk yang Dipapar Karbofuran Masa Laktasi	Rp 40.000.000
174	Dr. Herlambang Perdana iratraman, S.H., M.A Amira Paripurna, S.H., LL.M., Ph.D	Wulan Sucianur (091724853006)	PUF	SPS	Pengembangan Disain Politik Hukum Dalam Merespon Menguatnya Otoritarianisme di Indonesia	Rp 40.000.000
175	Dr. Sri Herianingrum, S.E., M.Si Dr. Muhammad Nafik H.R, S.E., M.Si Drs. Moch. Qudsi Fauzy, M.M	Hanif Fahillah, S.A. (091724553007)	PUF	SPS	Analisis Dampak Zakat, Belanja Pendidikan, dan Kesehatan Terhadap Kesejahteraan Di Indonesia	Rp 40.000.000
176	Dr. Ahmad Yudianto, dr.,Sp.F.,SH.,M.Kes Dr. Phil. Toetik Koesbardiati, DFM., PA(K) Puji Harjanto, S.H	Pudji Harjanto, S.H.	PUF	SPS	Analisis Efektivitas DNA <i>Touch</i> Bahan Identifikasi Personal Melalui STR Codis	Rp 40.000.000
	TOTAL DANA					Rp6.577.632.828

Salinan sesuai dengan aslinya
Sekretaris Universitas,


KOKO SRIMALYO
NIP 196602281990021001

Ditetapkan di Surabaya

REKTOR,

ttd

MOHAMMAD NASIH
NIP 196508061992031002

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN UNGGULAN FAKULTAS**



JUDUL PENELITIAN

**PENGEMBANGAN PRODUK BIOINSEKTISIDA :
Deteksi Gen *Cry* dan Karakteristik Genetik Entomopatogen Lokal
Bacillus sp. serta Uji Toksisitasnya sebagai Biolarvasida
Vektor Demam Berdarah Dengue**

TIM PENGUSUL

Salamun, Drs., M.Kes. NIDN. 0010116120 (Ketua)
Dr. Ni'matuzahroh NIDN 0001056806 (Anggota 1)
Dr. Fatimah, S.Si., M.Kes NIDN. 0015107401 (Anggota 2)

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
Oktober 2019**

**HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN UNGGULAN FAKULTAS**

Judul Penelitian : **PENGEMBANGAN PRODUK BIOINSEKTISIDA:
Deteksi Gen *Cry* dan Karakteristik Genetik
Entomopatogen Lokal *Bacillus* sp. serta Uji
Toksitasnya sebagai Biolarvasida
Vektor Demam Berdarah Dengue**

Kode>Nama Rumpun Ilmu : 113/ Biologi (dan Bioteknologi Umum)

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Salamun, Drs., M.Kes.
b. NIDN : 0010116120
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
d. Program Studi : Biologi
e. Nomor HP : 081332198122
f. Alamat surel (*e-mail*) : salamun@fst.unair.ac.id

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Dr. Ni'matuzahroh
b. NIDN : 0001056806
c. Fakultas : Lektor Kepala

Anggota Peneliti (2)

a. Nama Lengkap : Dr. Fatimah, S.Si., M.Kes.
b. NIDN : 0015107401
c. Fakultas : Sains dan Teknologi

Mahasiswa S2 (1)

a. Nama Lengkap : Nadia Al Batati
b. NIM : 081724153008
c. Fakultas : Sains dan Teknologi

Mahasiswa S2 (2)

a. Nama Lengkap : Izdihar Tsana
b. NIM : 081714153010
c. Fakultas : Sains dan Teknologi

Biaya Penelitian : Rp. 40.000.000 (Enam Puluh Juta Rupiah)

Mengetahui
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi



(Prof. Win Darmanto, M.Si., PhD.)
NIP. 1961061661987011001

Surabaya, 30 Oktober 2019

Peneliti

(Salamun, Drs, M.Kes.)
NIP. 196111101987031003

RINGKASAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) adalah penyakit viral yang ditularkan oleh nyamuk vektor penyakit dan sampai saat ini merupakan masalah kesehatan masyarakat yang serius di Indonesia. Usaha untuk mengatasi masalah DBD telah banyak dilakukan, tetapi sampai saat ini hasilnya masih belum memuaskan. Alternatif harapan untuk mengatasi penyakit ini adalah memutus rantai penyebaran penyakit dengan pengendalian populasi vektor sampai di bawah ambang kendali. Penggunaan insektisida kimiawi yang terus menerus terbukti banyak menimbulkan dampak negatif berupa perkembangan kearah resistensi serangga sasaran, membunuh serangga non-sasaran dan mengganggu kualitas lingkungan hidup. Harapan dan kenyataan mengenai masalah DBD membuat para ahli pengendalian hayati menyarankan untuk mengembangkan penggunaan bioinsektisida dan terus dicari agensia pengendali hayati sebagai salah satu alternatif untuk pengendalian terpadu vektor penyakit, karena sasaran yang dituju lebih spesifik, lebih aman dan berwawasan lingkungan. Salah satu agensia hayati yang dikembangkan sebagai bioinsektisida pengendali hayati adalah bakteri entomopatogenik dari marga *Bacillus*.

Penelitian direncanakan secara bertahap untuk mendukung Rencana Induk Penelitian (RIP) fakultas dan universitas, yaitu dalam bidang Produk Mikroorganisme dan diharapkan dapat membantu permasalahan kesehatan masyarakat melalui penelitian bidang Kedokteran Tropis, khususnya pengembangan Bioinsektisida berbahan baku bakteri *Bacillus* sp.. Penelitian pengembangan bioinsektisida lokal ini direncanakan secara bertahap (*multiyears*) meliputi aspek biologis, yaitu isolasi, uji potensi, dan karakterisasi fenotipik entomopatogen lokal *Bacillus* sp. (tahap I), uji toksisitas dan penelitian aspek genomik dan proteomik (tahap II), penelitian kerjasama dengan profesi bioteknologi untuk optimalisasi di laboratorium dan pengembangan formula (tahap III), penelitian kerjasama dengan profesi kesehatan masyarakat untuk uji coba dan penerapan di lapangan (tahap IV), dan penelitian kerjasama dengan industri untuk pengembangan produk dan produksi biomassa bioinsektisida (tahap V).

Pada penelitian sebelumnya melalui dana PUF tahun 2018, peneliti telah berusaha dan berhasil mendapatkan isolat entomopatogen lokal (*indigenous*) dari marga *Bacillus* yang diisolasi dari lingkungan alamiah, domestik dan larva *Ae. aegypti* vektor penyakit DBD. Pada penelitian tahap I tersebut, mikroba entomopatogen lokal jenis *Bacillus* sp. yang potensial membunuh larva *Ae. aegypti* telah berhasil diisolasi dari lingkungan alamiah, domestik dan larva nyamuk *Ae. aegypti* vektor DBD (Salamun *et al.*, 2018). Pada penelitian tahap II, ini dilakukan penelitian karakteristik genetik isolat lokal *Bacillus* sp. terpilih yang terbukti potensial, tujuannya untuk mengetahui nama spesies dan menentukan kekerabatan filogenetik dengan spesies dari *Bacillus* lainnya. Uji hayati dilakukan untuk menentukan kekuatan toksisitas isolat *Bacillus* sp. terpilih terhadap larva *Ae. aegypti*. nyamuk vektor penyakit DBD.

PRAKATA

Puji syukur alhamdulillah kami panjatkan kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan kekuatan dan kesehatan, sehingga kami dapat menyelesaikan laporan akhir dari sebagian tahapan Penelitian Unggulan Fakultas (PUF) periode tahun 2018. Terimakasih dan penghargaan yang setinggi tingginya juga kami sampaikan kepada seluruh pimpinan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk mendapatkan dana PUF 2018, sehingga kami dapat mengawali tahap I dari penelitian yang kami rencanakan sampai dengan tahap V.

Penelitian ini dirancang secara bertahap untuk mendukung RIP fakultas dan universitas dalam bidang **Produk Mikroorganisme dan Enzim**, serta dalam upaya membantu permasalahan kesehatan masyarakat melalui penelitian bidang **Kedokteran Tropis**, khususnya pengembangan **Bioinsektisida** berbahan baku bakteri *Bacillus sp.* lokal. Pada penelitian ini peneliti berusaha mendapatkan entomopatogen lokal (*indigenous*) marga *Bacillus sp.* yang diisolasi dari lingkungan alamiah, tempat perindukan domestik vektor DBD, dan larva vektor DBD. Upaya pengembangan lebih lanjut diarahkan pada optimalisasi dan formulasi entomopatogen lokal sebagai bioinsektisida yang dapat diterapkan di tempat perindukan nyamuk vektor DBD di Indonesia. Penelitian pengembangan bioinsektisida lokal ini direncanakan pada penelitian aspek biologis (tahap I), penelitian toksisitas dan aspek genomik (tahap II), penelitian kerjasama dengan teknolog untuk optimalisasi dan pengembangan formula (tahap III), penelitian kerjasama dengan kesehatan masyarakat untuk uji coba di lapangan (tahap IV), dan penelitian kerjasama dengan industri untuk pengembangan produksi biomasa bioinsektisida (tahap V).

Akhirnya semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi kita semua, khususnya dalam upaya pengembangan bioinsektisida lokal sebagai salah satu pengendali hayati untuk mengatasi masalah DBD di Indonesia. Kami menyadari bahwa laporan akhir ini masih belum sempurna dan masih banyak kekurangannya. Oleh karena itu kritik, saran, masukan dan lainnya sangat kami harapkan guna perbaikan laporan penelitian ini nantinya.

Surabaya, 30 Oktober 2019

Ketua Peneliti,

ttd.

Salamun, Drs., M.Kes.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.4. Kontribusi Penelitian	5
BAB 2. RIP DAN PETA JALAN	7
BAB 3. TINJAUAN PUSTAKA	
3.1. Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	9
3.2. Pengendalian Populasi Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	10
3.3. Entomopatogen <i>Bacillus sp.</i>	12
BAB 4. METODE PENELITIAN	
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	18
4.2. Uji Hayati Isolat Lokal <i>Bacillus sp.</i>	18
4.3. Uji Genetik Isolat Lokal <i>Bacillus sp.</i>	19
4.4. Analisis Data	23
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1. Hasil Uji Hayati Isolat Lokal <i>Bacillus sp.</i>	25
5.2. Hasil Uji Genetik Isolat Lokal <i>Bacillus sp.</i>	31
5.3. Analisis Hasil Sekuensing Gen 16S rRNA dengan Metode BLAST	32
5.4. Analisis Pohon Filogeni	35
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1. Kesimpulan	38
6.2. Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	42

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1. Hubungan OD _{600nm} dengan CFU/mL isolat SB91, G64 dan BK52	30
Tabel 5.2. Hasil uji toksisitas isolat bakteri <i>Bacillus</i> sp. SB91, G64 dan BK52 waktu pendedahan 24 jam dan 48 jam.	30
Tabel 5.3. Hasil evaluasi nilai kemurnian dan konsentrasi DNA isolat <i>Bacillus</i> sp. BK 7.2	31
Tabel 5.4. Hasil analisis BLAST gen 16S rRNA isolat <i>Bacillus</i> sp. BK 7.2	34
Tabel 5.5. Hasil analisis BLAST gen 16S rRNA isolate <i>Bacillus</i> sp. S9.1	34
Tabel 5.6. Hasil analisis BLAST gen 16S rRNA isolate <i>Bacillus</i> sp. BK 5.2	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Skema Rencana Tahapan Penelitian <i>Multiyears</i> Pengembangan Bioinsektisida Lokal terhadap Vektor DBD	8
Gambar 3.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> strain C18, Spora dan <i>Parasporal Crystals</i> tampak Jelas (TEM x 44.000), Sumber : Ibrahim <i>et al.</i> , (2010).	14
Gambar 5.1. Hasil skrining biolarvasida isolat dari lingkungan alamiah Taman Nasional Baluran (BK52, BK71) dan domestik endemik demam berdarah (SB91, G64, SD42) dalam membunuh larva nyamuk <i>Ae. aegypti</i> (%).	25
Gambar 5.2. Hubungan antara variasi volume isolat (mL) dengan OD _{600nm} Isolat SB91, BK52, dan G64.	26
Gambar 5.3. Hasil uji kecepatan isolat bakteri <i>Bacillus</i> sp. SB91, G64 dan BK52 dalam membunuh larva uji dalam pengamatan 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 20; 24 jam	28
Gambar 5.4. Diagram hasil perbandingan nilai LC ₅₀ isolat <i>Bacillus</i> sp. SB91, G64 dan BK52 pada masa pendedahan 24 dan 48 jam	29
Gambar 5.5. Perbandingan hasil nilai LT ₅₀ isolat <i>Bacillus</i> sp. SB91, G64 dan BK52 pada pengamatan 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 20; 24 jam.	30
Gambar 5.6. Hasil elektroforesis DNA genom isolat <i>Bacillus</i> sp. BK 7.2, BK 5.2, dan S 9.1 pada agarose gel 1%. Keterangan: M= Marker DNA 100 bp	32
Gambar 5.7. Hasil sekuensing Gen 16S rRNA isolat <i>Bacillus</i> sp. BK 7.2.	33
Gambar.5.8. Hasil sekuensing gen 16S rRNA isolat <i>Bacillus</i> sp. BK 5.2	33
Gambar 5.9. Hasil sekuensing gen 16S rRNA isolat <i>Bacillus</i> sp. S9.1	34
Gambar 5.10. Analisis pohon filogeni kekerabatan isolat <i>Bacillus</i> sp. BK 7.2.	36
Gambar 5.11. Analisis pohon filogeni kekerabatan isolat <i>Bacillus</i> sp. BK 5.2	36
Gambar 5.12. Analisis pohon filogeni kekerabatan isolat <i>Bacillus</i> sp. S9.1	37

DAFTAR LAMPIRAN

Beaya yang Telah Dikeluarkan	42
Rincian Beaya yang Telah Dikeluarkan	42
Draft Luaran Rencana Publikasi Artikel Ilmiah	44

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Demam Berdarah Dengue (DBD) adalah penyakit viral yang ditularkan oleh nyamuk vektor penyakit dan sampai saat ini merupakan masalah kesehatan masyarakat yang serius di Indonesia (Kemeskes RI, 2016). Penyakit DBD telah ditemukan di Manila tahun 1954 (Halstead, 1990), selanjutnya tahun 1960-an telah menyebar ke Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Kota di Indonesia pertama kali dilaporkan ada wabah DBD adalah di Surabaya, dari 58 orang penderita 24 orang (41%) dilaporkan meninggal dunia (Sumarno, 1987). Semula penyakit DBD menyerang daerah perkotaan padat penduduk seperti Surabaya (Yotopranoto *et al.*, 2010). Pada saat ini dilaporkan telah tersebar luas baik di kota maupun di desa di seluruh provinsi di Indonesia (Kemenkes RI, 2016)

Usaha untuk mengatasi masalah DBD telah banyak dilakukan, tetapi sampai saat ini hasilnya masih belum memuaskan. Alternatif harapan untuk mengatasi penyakit ini adalah memutus rantai penyebaran dengan pengendalian populasi vektor sampai di bawah ambang kendali. Ada tiga jenis nyamuk vektor DBD yang pernah dilaporkan, yaitu *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, dan *Ae. scutellaris*, tetapi sampai saat ini vektor utama DBD adalah *Ae. aegypti* (Sukowati, 2010) Upaya menekan kepadatan populasi *A. egypti* telah dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya adalah dengan pengendalian kimiawi yang sesuai baik untuk larva atau nyamuk dewasa (Kemenkes RI, 2016). Pengabutan (*fogging*) sasaran nyamuk dewasa dan abatisasi untuk pengendalian larva, keduanya dianggap paling cocok dan selama ini banyak digunakan, namun hasilnya masih belum memuaskan (Sukowati, 2010; Kemenkes RI, 2016). Penggunaan insektisida kimiawi tersebut masih menjadi andalan dalam mengurangi kepadatan populasi vektor, namun terbukti banyak menimbulkan dampak negatif berupa perkembangan kearah resistensi serangga sasaran, membunuh serangga non-sasaran dan mengganggu kualitas lingkungan hidup.

Harapan dan kenyataan mengenai masalah DBD membuat para ahli pengendalian hayati menyarankan untuk mengembangkan penggunaan bioinsektisida dan terus dicari pengendali hayati sebagai salah satu alternatif untuk pengendalian hayati vektor penyakit (Thomas, N.B., 2018), karena sasaran yang dituju lebih spesifik, lebih aman dan berwawasan lingkungan. Salah satu agensia pengendali hayati yang dikembangkan sebagai bioinsektisida

adalah bakteri entomopatogenik dari marga *Bacillus*. Berbagai jenis bakteri pembentuk endospora yang mampu hidup berasosiasi dengan serangga antara lain *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus*, *B. papilliae*, *B. larvae*, *B. morotai* telah dimanfaatkan untuk pengendalian berbagai jenis serangga. Entomopatogen yang telah dimanfaatkan secara luas dalam bentuk formula siap pakai, untuk pengendalian larva nyamuk *Ae. aegypti* adalah *B. thuringiensis* serotipe H-14, diisolasi dari tanah di Israel (Boyce, R., 2013) dan *B. sphaericus* H5a5b diisolasi dari tanah di India (Balaraman and Pillai, 1990). Salamun (2004) berhasil mengisolasi entomopatogen lokal yang potensial membunuh larva *Ae. aegypti* dari tanah bekas genangan di kawasan Pantai Bama Taman Nasional Baluran Banyuwangi. Isolat lokal tersebut diberi nama BL5MT dan sampai dengan saat ini belum dilakukan penelitian lebih lanjut, termasuk nama spesies, karakter fenotipik dan genomik dari bakteri isolat lokal BL5MT.

El-kersh *et al.* (2016), telah mengisolasi dan melakukan karakterisasi strain lokal *Bacillus thuringiensis* yang berasal dari Saudi Arabia dan sejumlah 68 isolat mempunyai toksisitas larvisidal terhadap nyamuk *Anopheles gambiae* vektor penyakit malaria, isolat *Bacillus thuringiensis* strain 63 toksisitas larvisidalnya paling tinggi dan potensial dikembangkan sebagai pengendali hayati nyamuk vektor penyakit di masa mendatang. Suryadi *et al.* (2016) telah mengisolasi dan karakterisasi *Bacillus shpaericus* yang dapat dikembangkan sebagai bioinsektisida pengendali hayati terhadap nyamuk vektor penyakit Malaria *Anopheles aconitus* dari pulau Lombok. Ammouneh *et al.* (2011) juga telah berhasil mengisolasi dan melakukan karakterisasi strain lokal *Bacillus thuringiensis* yang berasal dari tanah di Syria yang berpotensi dapat dikembangkan sebagai bioinsektisida terhadap serangga hama.

Ben-Dov, E. (2014) dalam telaahnya tentang toksin *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) melaporkan bahwa *Bti* yang pertama kali ditemukan dan digunakan sebagai agen pengendali hayati terhadap larva nyamuk dan lalat hitam di seluruh dunia mempunyai kelebihan. Aktivitas larvisidal ditentukan oleh empat toksin utama, yaitu di bobot molekul polipeptida 134, 128, 72 dan 27 kDa, dan setidaknya juga ada dua toksin tambahan, yaitu 78 kDa dan 29 kDa, yang disandikan masing-masing oleh *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa*, *cyt1Aa*, *cry10Aa* dan *cyt2Ba*, semua dipetakan pada plasmid 128 kb yang dikenal sebagai *pBtoxin*. Keenam δ -endotoksin ini membentuk kompleks kristal parasporal dengan toksisitas yang sangat tinggi, spesifik dan khas untuk larva *Aedes*, *Culex* dan *Anopheles*. Toksin *Cry* terdiri

dari tiga domain, yaitu domain I dan reseptor pengikat II dan III. Meskipun toksisitas *Cyt1Aa* dan *Cyt2Ba* rendah terhadap larva, tetapi bekerja sinergis dengan toksin *Cry* dan kombinasi di antara mereka mencegah munculnya resistensi di larva target. Kondisi tersebut dapat mengurangi tingkat resistensi yang signifikan terhadap populasi larva nyamuk selama beberapa dekade penggunaan bioinsektisida *Bti*. Dengan demikian menunjukkan bahwa *Bti* akan tetap menjadi agen pengendali hayati yang efektif untuk tahun-tahun mendatang. Thomas, M.B. (2018) telah melakukan telaah dari berbagai tulisan ilmiah tentang peran pengendali hayati dalam pengendalian vektor penyakit dan berharap komunitas pengendali vektor memperhatikan perspektif dan peluang peran agensia hayati dalam pengendalian terpadu penyakit yang ditularkan oleh vektor.

Pada penelitian *multiyears* ini direncanakan dengan urutan sebagai berikut.

1. Isolasi bakteri entomopatogen lokal *Bacillus sp.* yang berpotensi sebagai biolarvasida terhadap larva *Ae. aegypti* dari lingkungan alamiah, tempat perindukan nyamuk, dan larva.
 - a. Isolasi dari tanah alamiah (tempat perindukan *Ae. aegypti* yang disediakan oleh alam) di Taman Nasional Baluran.
 - b. Isolasi dari endapan TPA domestik (tempat perindukan *Ae. aegypti* yang dibuat oleh manusia) di daerah endemik DBD.
 - c. Isolasi dari larva nyamuk *Ae. aegypti* di tempat perindukan domestik, di daerah endemik DBD.
2. Uji potensi entomopatogen lokal *Bacillus sp.* hasil isolasi dari tanah alamiah dan tempat perindukan domestik, dalam kemampuannya membunuh larva *Ae. aegypti* vektor DBD.
3. Karakterisasi fenotipik entomopatogen lokal *Bacillus sp.* :
 - a. karakteristik makroskopis,
 - b. karakteristik mikroskopis, dan
 - c. karakteristik fisiologis/biokimia.
4. Uji hayati untuk menentukan LC_{50} dan LT_{50} entomopatogen lokal *Bacillus sp.* yang potensial terhadap larva *Ae. aegypti*.
5. Karakterisasi genetik dan protein *Cry* entomopatogen lokal *Bacillus sp.* :
 - a. karakteristik genetik (nama jenis dan posisi kekerabatan genetik),

- b. deteksi protein *Cry*, dan
 - c. gen penyandi toksin *Cry*.
6. Optimalisasi berbagai variabel untuk pengembangan entomopatogen *Bacillus* sp. yang potensial untuk produk bioinsektisida terhadap vektor DBD.
 7. Pengembangan formula bioinsektisida *Bacillus* sp. yang paling potensial sebagai bioinsektisida terhadap vektor DBD.
 8. Uji coba penerapan di lapangan berbagai formula bioinsektisida *Bacillus* sp. yang paling potensial sebagai bioinsektisida terhadap vektor DBD.
 9. Produksi biomassa bioinsektisida *Bacillus* sp. yang paling potensial sebagai produk paten bioinsektisida terhadap vektor DBD.

Penelitian Tahap I melalui penelitian sub-tahap 1, 2, dan 3 telah dilakukan, yaitu isolasi *Bacillus* sp., uji potensi terhadap larva *Ae. aegypti*, dan karakterisasi fenotipik entomopatogen lokal *Bacillus* sp. dari sampel tanah alamiah di Taman Nasional Baluran, dari endapan TPA domestik perindukan nyamuk *Ae. aegypti*, dan dari larva *Ae. aegypti* (Salamun, *et al.*, 2018). Hasil isolasi dari 30 sampel tanah alamiah di Taman Nasional Baluran diperoleh 108 isolat dan sebanyak 9,26 % isolat berpotensi tinggi. Isolasi dari 30 sampel tanah endapan TPA domestik diperoleh 130 isolat dan sebanyak 12,12 % isolat berpotensi tinggi. Isolasi dari 30 sampel larva *A. aegypti* diperoleh 131 isolat dan sebanyak 11,48% isolat berpotensi tinggi. Beberapa isolat lokal *Bacillus* sp. yang berhasil diisolasi tersebut, ada yang mampu membunuh 100% larva uji dalam pengamatan 24 jam, sehingga perlu dilakukan penelitian pengembangan lebih lanjut terhadap beberapa aspek genomik, yaitu menentukan nama spesies dan posisi kekerabatan genetik, serta toksisitas bakteri entomopatogen *Bacillus* sp. isolat lokal yang potensial untuk dikembangkan sebagai bioinsektisida terhadap nyamuk *Ae. aegypti* vektor DBD.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut di atas, maka penelitian pada tahap II ini diajukan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Bagaimanakah kekuatan toksisitas entomopatogen lokal *Bacillus* sp. yang potensial terhadap larva *Ae. aegypti* yang diisolasi dari tanah alamiah, endapan TPA domestik, dan larva *Ae. aegypti* yang ditentukan melalui uji hayati ?

2. Apakah nama spesies entomopatogen lokal *Bacillus* sp. yang potensial yang diisolasi dari tanah alamiah, endapan TPA domestik, dan larva *Ae. aegypti* yang berpotensi membunuh larva *Ae. aegypti* ?.
3. Bagaimanakah posisi kekerabatan genetik entomopatogen lokal *Bacillus* sp. yang diisolasi dari tanah alamiah, endapan TPA, dan larva *Ae. aegypti* yang berpotensi membunuh larva *Ae. aegypti* dan posisinya terhadap *Bacillus* spesies lainnya?.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian tahap II ini adalah sebagai berikut.

1. Menetapkan kekuatan toksisitas entomopatogen lokal *Bacillus* sp. yang potensial terhadap larva *Ae. aegypti* yang diisolasi dari tanah alamiah, endapan TPA domestik, dan larva *Ae. aegypti* yang ditentukan melalui uji hayati ?
2. Menentukan nama spesies entomopatogen lokal *Bacillus* sp. yang potensial yang diisolasi dari tanah alamiah, endapan TPA domestik, dan larva *Ae. aegypti* yang berpotensi membunuh larva *Ae. aegypti* ?.
3. Menetapkan posisi kekerabatan genetik entomopatogen lokal *Bacillus* sp. yang diisolasi dari tanah alamiah, endapan TPA, dan larva *Ae. aegypti* yang berpotensi membunuh larva *Ae. aegypti*, yaitu posisi kekerabatannya terhadap *Bacillus* spesies lainnya ?.

1.4. Kontribusi Penelitian

1. Hasil penelitian ini, diharapkan dapat meluaskan wawasan peneliti, khususnya mendalami salah satu bidang ilmu mikrobiologi yang diminati, serta diharapkan dapat merupakan sumbangan berharga untuk :
 - a. Memperkaya khasanah ilmu pengetahuan, khususnya di bidang usaha pengendalian hayati vektor penyakit DBD yang menggunakan bioinsektisida lokal di Indonesia
 - b. Meningkatkan pembangunan nasional, dengan mengembangkan potensi lokal agensia hayati dalam upaya pengendalian kepadatan populasi nyamuk vektor penyakit DBD di Indonesia
2. Hasil penelitian ini, diharapkan dapat menambah "khasanah pemanfaatan unggulan lokal dan penerapannya untuk kemaslahatan nasional/internasional", dalam upaya

pengembangan bioinsektisida lokal sebagai salah satu pengendali hayati untuk mengatasi masalah DBD, khususnya di Indonesia

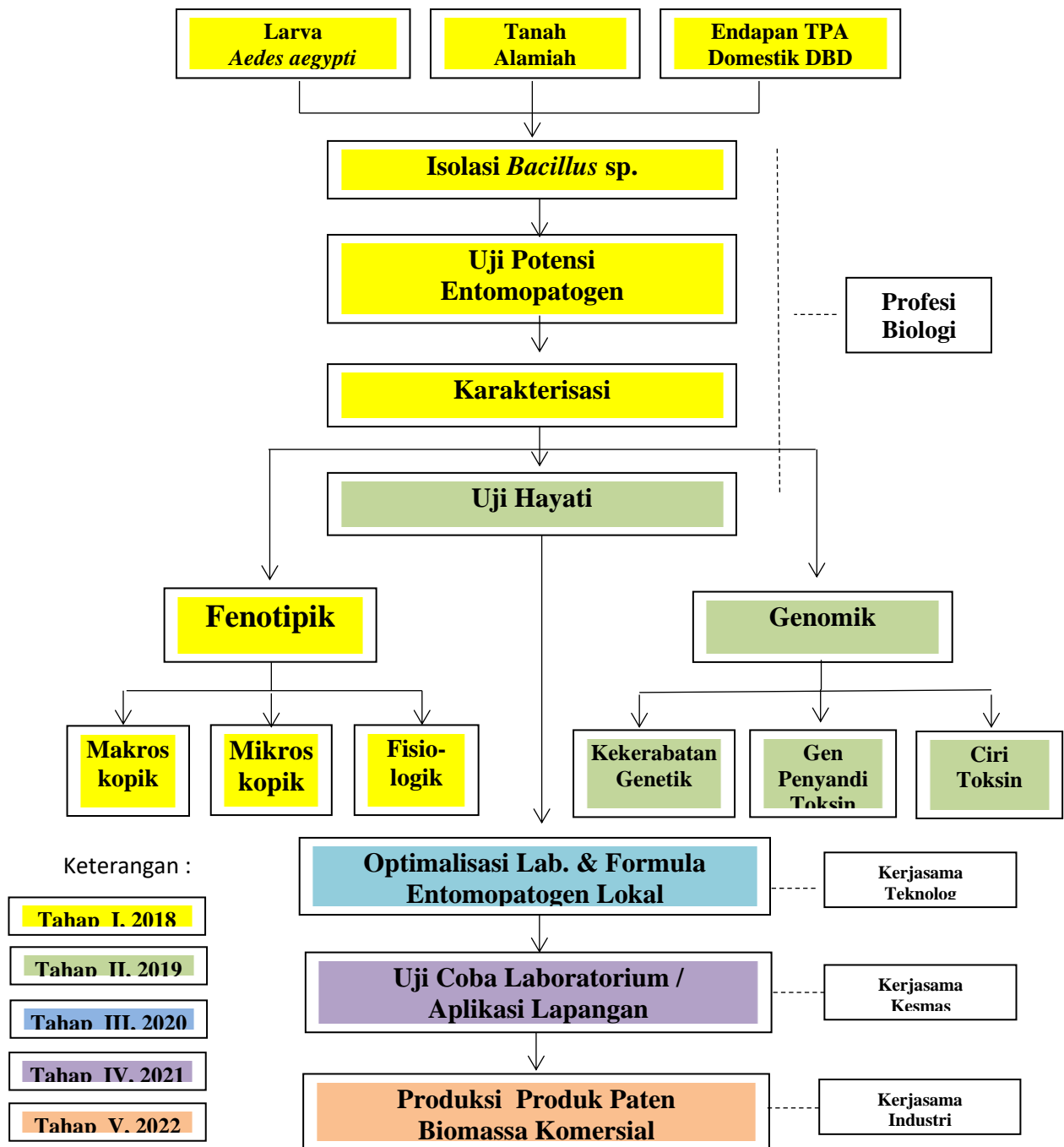
BAB 2

RIP DAN PETA JALAN

PENELITIAN UNGGULAN FAKULTAS

Penelitian ini dirancang secara bertahap untuk mendukung RIP fakultas dan universitas dalam bidang **Produk Mikroorganisme dan Enzim**, serta membantu permasalahan kesehatan masyarakat melalui penelitian bidang **Kedokteran Tropis**, khususnya pengembangan Bioinsektisida berbahan baku bakteri *Bacillus* sp.. Pada penelitian ini peneliti berusaha mendapatkan entomopatogen lokal (*indigenous/native*) marga *Bacillus* sp. yang diisolasi dari lingkungan alamiah, tempat perindukan domestik vektor DBD, dan larva vektor DBD. Upaya pengembangan lebih lanjut diarahkan pada optimalisasi dan formulasi entomopatogen lokal sebagai bioinsektisida yang dapat diterapkan di tempat perindukan nyamuk *Ae. aegypti* vektor DBD di Indonesia.

Penelitian pengembangan bioinsektisida lokal ini direncanakan beberapa tahap (*multiyears*), yaitu pada penelitian aspek isolasi, uji potensi, dan karakterisasi fenotipik (**tahap I, tahun 2018**), penelitian aspek genomik dan toksisitas melalui uji hayati (**tahap II, tahun 2019**), penelitian kerjasama dengan profesi teknologi untuk optimalisasi di laboratorium dan pengembangan formula (**tahap III, tahun 2020**), penelitian kerjasama dengan profesi kesehatan masyarakat untuk uji coba dan penerapannya di lapangan (**tahap IV, tahun 2021**), dan penelitian kerjasama dengan industri untuk pengembangan produk hasil produksi biomasa bioinsektisida (**tahap V, tahun 2022**). Skema tahapan (peta jalan) penelitian pada Gambar 2.1 .



Gambar 2.1. Skema Rencana Tahapan Penelitian *Multiyears* Pengembangan Bioinsektisida Lokal terhadap Vektor DBD

BAB 3

TINJAUAN PUSTAKA

3.1. Nyamuk *Ae. aegypti*

Nyamuk *Ae. aegypti* melakukan metamorfosis sempurna (*holometabola*), dengan pertumbuhan dan perkembangan dibagi menjadi 4 tahap, yaitu nyamuk dewasa, telur, larva dan pupa (Rahayu dan Ustiawan, 2013). Nyamuk *Ae. aegypti* sering disebut *black-white mosquito*, karena tubuhnya ditandai dengan garis-garis putih keperakan di atas dasar hitam, di Indonesia juga disebut sebagai salah satu dari nyamuk rumah. Tahap telur, larva, dan pupa tumbuh dan berkembang di air. Genangan air yang disukai sebagai tempat perindukan adalah genangan air di suatu wadah (kontainer) tempat penampung air (TPA), bukan genangan air di tanah. Survei yang telah dilakukan di beberapa kota di Indonesia menunjukkan bahwa TPA yang digunakan sebagai tempat perindukan sehari-hari adalah tempayan, bak mandi, bak WC, dan sejenisnya yang berisi air jernih (Yotopranoto *et al.*, 1998; Candra, 2010). Tempat perindukan tambahan non-TPA, seperti tempat minuman burung, barang bekas, vas bunga, dan lainnya, sedangkan TPA alamiah berupa lubang pohon, pelepah daun, tempurung kelapa, potongan bambu, dan lainnya (Yotopranoto *et al.*, 1998; Candra, 2010).

Nyamuk dewasa meletakkan telur satu-persatu pada benda-benda yang terapanung atau pada dinding bagian dalam dekat permukaan air dari TPA, yang disukai adalah berair jernih dan berwarna gelap, paling menyukai TPA dengan warna dinding hitam, terbuka lebar dan terutama terletak di tempat-tempat terlindung dari sinar matahari langsung (Nurjana dan Kurniawan, 2017). Dilaporkan bahwa dari telur yang dilepas, sebanyak 85% melekat di dinding TPA dan 15% telur lainnya jatuh ke permukaan air (Mardihusodo *et al.*, 1978). Telur *Ae. aegypti* akan menetas menjadi larva dalam waktu 1-2 hari dengan suhu air antara 20-40 °C. Kecepatan telur menetas menjadi larva dipengaruhi beberapa faktor, diantaranya adalah suhu, tempat, dan keadaan air serta kandungan zat makanan yang ada di tempat perindukannya. Setelah telur menetas menjadi larva, larva bertubuh langsing, bergerak sangat lincah, aktif mencari makan, berperilaku menghindari sinar, dan waktu istirahat tubuhnya membentuk sudut hampir tegak lurus dengan bidang permukaan air (Mardihusodo *et al.*, 1978). Pada kondisi optimum, larva berkembang menjadi pupa dalam waktu 4-9 hari. Setelah larva menjadi pupa, gerakan pupa lebih lincah larva, namun pupa pada bentuk tidak makan. Waktu istirahat, posisi tubuh pupa sejajar dengan bidang permukaan air. Pupa

berubah menjadi nyamuk dewasa dalam waktu 2-3 hari. Jadi pertumbuhan dan perkembangan *Ae. aegypti* dari telur sampai dengan menjadi nyamuk dewasa memerlukan waktu kurang lebih 7-14 hari (Kemenkes RI, 2016).

Ae. aegypti hidup domestik tersebar secara kosmopolitan, lebih menyukai tinggal di dalam rumah, nyamuk betina menusuk dan mengisap darah di siang hari dan lebih menyukai darah manusia (antropofilik) daripada darah hewan (zoofilik). Waktu mencari makan, lebih tertarik oleh bau yang dipancarkan inang, kemudian faktor suhu, kelembaban, kadar CO₂, dan warna TPA. Kebiasaan istirahat lebih banyak di dalam rumah pada benda yang bergelantungan, berwarna gelap dan di tempat lain yang terlindung (Yotopranoto, *et al.*, 1998). Pada waktu menusuk dan mengisap darah dapat menularkan berbagai penyakit, seperti DBD, *Yellow fever*, *Virus encephalitis*, Filariasis, dan *Zika* (Blasberg *et al.*, 2016).

3.2. Pengendalian Populasi Nyamuk *Ae. aegypti*

Nyamuk *Ae. aegypti* berperan sebagai vektor penyakit DBD, untuk itu perlu dicari cara yang paling tepat untuk menekan kepadatan populasi sampai pada tingkat di bawah ambang kendali dalam perannya sebagai vektor penyakit. Usaha menekan kepadatan populasi nyamuk *Ae. aegypti* dapat dilakukan dengan berbagai cara. Secara garis besar ada 4 cara yang dapat dilakukan dalam pengendalian vektor penyakit, yaitu dengan cara pengendalian kimiawi, lingkungan, hayati, dan genetik (Sukowati, 2010; Kemenkes RI, 2016).

Pengendalian kimiawi dilakukan dengan menggunakan insektisida kimia baik untuk larva maupun nyamuk dewasa. Pengendalian nyamuk dewasa *Ae. aegypti* selama ini yang dianggap paling sesuai adalah dengan cara pengabutan (*fogging*). Cara ini biasanya dilakukan berulang-ulang dan harus diikuti dengan pengendalian larva dengan cara abatisasi (Sukowati, 2010). Larva *Ae. aegypti* hidup di air bersih seperti bak mandi, bak WC, atau genangan air bersih lainnya, maka harus dicari larvisida yang sesuai dan dinyatakan aman untuk manusia. Satu satunya larvisida kimia yang telah dinyatakan aman untuk digunakan di tempat perindukan nyamuk *Ae. aegypti* adalah temephos (Kemenkes RI, 2016). Pengendalian cara ini sudah dilakukan sejak tahun 1950-an sampai dengan sekarang dan hasilnya memuaskan, tetapi pengendalian kimiawi ini telah terbukti banyak menimbulkan dampak negatif seperti perkembangan ke arah resistensi serangga sasaran, membunuh

serangga non-sasaran yang berguna, dan mengganggu kualitas lingkungan hidup (Sukowati, 2010).

Pengelolaan lingkungan dilakukan untuk menghilangkan tempat-tempat perindukan yang disukai oleh nyamuk *Ae. aegypti* atau menghalangi kontak vektor dengan manusia (Sukowati, 2010). Contoh pengelolaan lingkungan yang biasa dilakukan untuk menghilangkan tempat perindukan *Ae. aegypti*, dikenal dengan pemusnahan sarang nyamuk, misalnya menguras bak mandi secara berkala, menanam barang bekas yang dapat menampung air hujan, menutup rapat penampung air yang bersifat permanen. Contoh menghalangi kontak vektor dengan manusia dilakukan dengan memasang kelambu, mengatur suhu ruang, dan memberi sekat angin pada pintu masuk ruangan. Cara-cara ini memang dianggap lebih aman dan terciptanya lingkungan yang sehat dan hidup bersih, tetapi membutuhkan partisipasi dan kesadaran masyarakat berkesinambungan dan terus menerus (Kemenkes RI, 2016).

Pengendalian hayati dengan memanfaatkan interaksi antara vektor dengan makhluk hidup lainnya yang secara alamiah biasa terjadi di alam semesta, baik interaksi vektor dengan golongan mikroorganisme, hewan invertebrata, atau hewan vertebrata (Thomas, 2018). Interaksi antara golongan makhluk hidup tersebut terjadi melalui mekanisme patogenitas, parasitisme, atau mangsa-pemangsa. Contoh hubungan mangsa-pemangsa, antara larva *Ae. aegypti* dengan ikan kepala timah (*Panchax panchax*) dan hubungan parasitisme antara Nematoda *Romanomermis iyengari* dengan larva *Ae. aegypti*. Beberapa golongan virus, bakteri, fungi, atau protozoa juga dapat dikembangkan sebagai patogen terhadap larva *Ae. aegypti* (WHO, 2011). Sebagai kompetitor virus DBD, telah digunakan bakteri *Wolbachia* yang dimasukkan ke dalam nyamuk *Ae. aegypti* dan dilepas ke lapangan (Soares, 2016).

Pengendalian genetik telah banyak dilakukan percobaan dan diterapkan di lapangan, misalnya dengan teknik jantan mandul, yaitu dengan melepas sejumlah besar nyamuk jantan yang sudah disterilkan melalui rekayasa genetika (Blasberg *et al.*, 2016). Nyamuk betina hanya kawin satu kali seumur hidupnya, sehingga jika dikawini oleh nyamuk jantan steril, maka tidak akan menghasilkan keturunan yang fertil.

Berbagai cara pengendalian vektor tersebut di atas, ternyata tidak ada satupun cara yang memuaskan jika dilakukan masing-masing secara terpisah. Dalam usaha penurunan populasi vektor pada tingkat di bawah ambang kendali dapat dilakukan dengan konsep pengendalian terpadu, yaitu dengan menerapkan semua cara sesuai dengan situasi dan

kondisi biologis, bionomik, ekologis vektornya, serta harus mempertimbangkan keuntungan dan kerugian baik dalam hal biaya dan pengaruhnya terhadap kualitas lingkungan hidup (WHO, 2011; Kemenkes RI, 2016).

3.3. Entomopatogen *Bacillus* sp.

Jenis jenis bakteri *Bacillus* sp. merupakan salah satu bakteri tanah yang jumlahnya melimpah, berkisar antara 10^6 hingga 10^7 sel tiap gram tanah (Paul, 2007). Selain dapat ditemukan di tanah, jenis bakteri *Bacillus* sp. juga banyak diisolasi dari air dan tubuh hospes yang terinfeksi. Isolasi jenis bakteri anggota *Bacillus* sp. dari tanah dilakukan dengan teknik khusus, yaitu dengan memanaskan sampel tanah antara 65 hingga 80 °C selama 30 menit dengan maksud untuk memacu pembentukan endospora, sedangkan sel-sel bakteri yang tidak tahan panas dan tidak membentuk endospora akan mati, medium untuk pertumbuhan yang digunakan untuk isolasi adalah media NYSP (Suryadi *et al.*, 2016).

B. thuringiensis yang mempunyai aktivitas bioinsektisidal, pertama kali ditemukan oleh ilmuwan Jepang Ishiwata tahun 1901, kemudian berikutnya ilmuwan Jerman Berliner tahun 1915, dan hasil temuan tersebut mempunyai andil besar di bidang pertanian dalam program pengendalian hama tanaman (Balaraman and Pillai, 1990). Pada periode berikutnya Kellen dan kawan-kawan di tahun 1965, melaporkan bahwa *B. sphaericus* yang mempunyai aktivitas bioinsektisidal pertama kali diisolasi dari larva instar IV *Culiceta insidens*, di California USA (Balaraman dan Pillai, 1990). Sejak ditemukan *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotipe H-14 oleh Golberg dan Margalit (1977) di Israel dan terbukti mempunyai aktivitas bioinsektisidal terhadap larva nyamuk, akhir-akhir ini usaha terhadap pencarian bakteri *B. thuringiensis* lokal masih banyak dilakukan di Asia termasuk Indonesia.

Pusat Penelitian Pengendalian Vektor (VCRC) di India, telah menemukan beberapa isolat lokal yang mempunyai aktivitas insektisidal terhadap larva nyamuk *Culex quinquefasciatus*. Dua di antara isolat yang telah berhasil dikembangkan adalah *B. thuringiensis* H-14 (VCRC B17) yang kemudian dikemas dengan nama dagang *Deltafix*TM dan *B. sphaericus* H-5a5b (VCRC B42) yang dikemas dengan nama dagang *Spherefix*TM (Balaraman dan Pillai, 1990). Di Malaysia Lee dan Seleena (1990), mengambil sampel 725 yang dikoleksi dari habitat bakteri, telah berhasil menemukan beberapa jenis bakteri yang mempunyai aktifitas larvisidal, seperti *B. thuringiensis* H-14, *B. sphaericus* H-5a5b, dan *B. sphaericus* H-25, serta spesies lokal, yaitu *B. thuringiensis* susp. *malaysianensis*. Bakteri

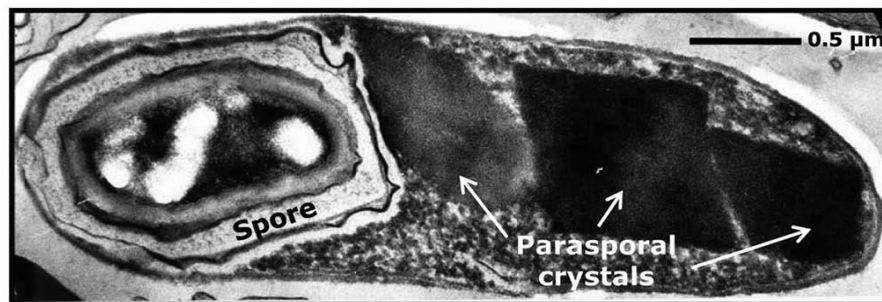
lokal tersebut dilaporkan mempunyai potensi sebesar 1,71, 1,4, dan 1,62 kali berturut turut terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, dan *Anopheles maculatus*, jika dibandingkan dengan *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Lee and Seleena, 1990).

El-kersh, *et al.* (2016), telah mengisolasi dan melakukan karakterisasi strain lokal *B. thuringiensis* yang berasal dari Saudi Arabia dan sejumlah 68 isolat mempunyai toksisitas larvisidal terhadap nyamuk *Anopheles gambiens* vektor penyakit malaria, isolat *B. thuringiensis* starin 63 toksisitas larvisidalnya paling tinggi dan potensial dikembangkan sebagai pengendali hayati nyamuk vektor penyakit di masa mendatang. Ammouneh *et al.* (2011) juga telah berhasil mengisolasi dan melakukan karakterisasi strain lokal *B. thuringiensis* yang berasal dari tanah di Syria yang berpotensi dapat dikembangkan sebagai bioinsektisida terhadap serangga hama.

Mardihusodo *et al.* (1991) mengawali penelitian di Indonesia, meneliti 203 sampel yang dikoleksi dari 25 ekor larva nyamuk, 92 tanah, 86 air di satu lokasi daerah Jawa Timur, 3 lokasi daerah Istimewa Yogyakarta, dan 6 lokasi daerah Jawa Tengah, telah berhasil menemukan 4 isolat genus *Bacillus* yang mempunyai aktivitas insektisidal. Keempat isolat tersebut adalah *Bacillus cereus* (142), *Bacillus pumilus* (25C), dan *B. sphaericus* (23A dan 51C), aktivitas larvisidal masing masing basili masih jauh lebih rendah bila dibandingkan dengan aktivitas *B. thuringiensis* H-14 pembanding (*Teknar*^R). Dilaporkan juga bahwa dalam waktu 24 jam, *B. thuringiensis* H-14 telah membunuh 100% larva uji *Culex quinquefasciatus*, sedangkan ke-4 isolat lokal tersebut dalam waktu 48 jam mematikan larva uji hanya sebesar 52,5 sampai dengan 70% saja.

B. thuringiensis dan *B. sphaericus* lokal di Indonesia juga telah banyak diisolasi dan berpotensi sebagai pengendali hayati vektor penyakit dari golongan serangga Diptera. Muharsini, *et al.* (2003) telah mengisolasi dan karakterisasi *B. thuringiensis* lokal yang berpotensi sebagai bioinsektisida pengendali hayati terhadap *Chrysomya bezziana* lalat penyebab myasis, dari daerah di Jawa dan Sulawesi Selatan. Pratiwi, *et al.* (2013) melakukan isolasi dan uji toksisitas *B. thuringiensis* asal kota Nganjuk yang berpotensi sebagai larvisidal terhadap *Ae. aegypti*. Blondine (2013) juga telah melakukan uji efikasi galur lokal *B. thuringiensis* H-10 terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti* dan *A. aconitus*. Suryadi *et al.* (2016) telah mengisolasi dan karakterisasi *B. shpaericus* yang berpotensi sebagai bioinsektisida pengendali hayati terhadap nyamuk vektor penyakit Malaria *A. aconitus* dari pulau Lombok.

B. thuringiensis adalah bakteri bentuk-batang, gram-positif, dapat bergerak, lebar 1,0-1,5 mikro meter, sporangium tidak membengkak dengan spora bentuk silindris, badan parasporal atau kristal protein berbentuk sferis, dapat menggunakan gula-gula untuk meningkatkan pertumbuhannya di samping harus ada sumber makanan lain berupa protein dan asam amino sebagai sumber utama karbon dan nitrogen (WHO, 1979) . *B. sphaericus* adalah bakteri bentuk batang, gram-variabel, dapat bergerak, panjang 1,5 mikro meter dan 0,6 mikro meter. Sporangium membengkak di posisi ujung dengan spora bulat (sferis), bersifat aerobik, membentuk badan parasporal kecil, tidak mereduksi nitrat, tidak meragi glukosa atau gula-gula lain, tetapi menggunakan asam-asam amino sebagai sumber karbon dan nitrogen (WHO, 1980). Struktur *B. thuringiensis* pada Gambar 3.1. berikut.



Gambar 3.1. *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* strain C18, Spora dan *Parasporal Crystals* tampak Jelas (TEM x 44.000), Sumber : Ibrahim *et al.*, 2010.

B. thuringiensis H-14 bukan penyakit infeksi pada larva nyamuk, tetapi mengandung toksin yang jika ditelan oleh larva nyamuk, toksin dapat menyebabkan kematian (Ibrahim *et al.*, 2010). Toksin *B. thuringiensis* diproduksi selama proses sporulasi, dan berupa endotoksin karena selama proses sporulasi toksin disimpan di dalam spora atau inklusi parasporal. Bahan aktif yang mempunyai aktifitas larvisidal tersebut adalah delta-endotoksin, suatu protein yang ada di inklusi parasporal pada *B. thuringiensis* H-14 (Bahagiawati, 2002). Dalam tubuh serangga, protein delta-endotoksin yang mempunyai aktivitas larvisidal bersifat sebagai protoksin dan menjadi toksin aktif setelah dipengaruhi oleh cairan proteolitik yang ada di tengah usus larva sasaran (Bahagiawati, 2002). Pada *B. thuringiensis* H-14, protoksin tersebut berupa protein sub-unit tunggal dengan berat molekul 134 kD, dan pada pH alkalis serta kondisi enzim yang sesuai di usus tengah larva sasaran, dengan cepat diubah menjadi sub-unit yang lebih kecil dan lebih toksik, menjadi toksin aktif dengan berat molekul 25 kD

dan enzim aktivatornya adalah alkaline protease (Ibrahim *et al.*, 2010). Protoksin *parasporal crystal (Cry)* menempel pada reseptor *cadherin like-protein* dari membran sel usus tengah larva serangga dan bersifat spesifik terhadap serangga golongan Diptera, Lepidoptera, dan Coleoptera (Ibrahim *et al.*, 2010). Laporan lebih lanjut menunjukkan bahwa paling sedikit ada 4 fraksi protein pada inklusi parasporal atau spora yang sudah diketahui baik pada *B. thuringiensis* H-14 maupun *B. sphaericus*. Empat fraksi protein tersebut adalah komponen polipeptida dengan berat molekul 28, 68, 125, dan 135 kD pada *B. thuringiensis* H-14 dan 42, 51, 110, dan 125 kD pada *B. sphaericus* (Ibrahim *et al.*, 2010).

Kerja toksin *B. thuringiensis* H-14 dan *B. sphaericus* terhadap larva Diptera telah diketahui dengan jelas, setelah toksin aktif terbentuk dan menempel pada epitel usus tengah larva, maka epitel usus terganggu pengaturan permeabilitas membrannya. Gangguan terjadi pada transpor ion lintas membran karena adanya ikatan antara protein dengan permukaan mikrofilus usus tengah larva (Ibrahim, *et al.*, 2010). Toksin aktif dengan bobot molekul yang lebih kecil yang terbentuk di usus tengah larva tetap stabil terhadap cairan proteolitik berikutnya, dan menyebabkan histopatologis pada epitel usus tengah larva yang sama baik dari toksin *B. thuringiensis* H-14 maupun *B. sphaericus*, hanya kecepatan kerjanya yang berbeda.

Toksin *B. thuringiensis* H-14 bekerja sangat cepat, hanya beberapa menit larva mati setelah pendedahan, sedangkan toksin *B. sphaericus* bekerja lebih lambat, larva mati beberapa jam setelah pendedahan (Ibrahim, *et al.*, 2010). Larva instar II (L2) selama 2 jam terpapar toksin dengan dosis lethal 50% (5 mikro gram per-ml), sel sel epitel usus tengah mengalami hipertropi, terpisah satu dengan lainnya, sel lisis, dan mengelupas dari membrana basalisnya, sehingga larutan alkalis dari usus tengah masuk ke rongga darah dan menyebabkan kematian larva (Bahagiawati, 2002).

Perbedaan aktifitas antara *B. thuringiensis* H-14 dengan *B. sphaericus* terhadap larva sasaran juga telah dilaporkan. *B. thuringiensis* H-14 lebih aktif terhadap larva *Aedes*, sedangkan *B. sphaericus* 1593 lebih aktif terhadap larva *Culex* (Mardihusodo, 1991). Perbedaan sensitivitas larva terhadap kedua bioinsektisida tersebut terjadi karena adanya perbedaan reseptor pada usus tengah larva, dilaporkan juga bahwa pengurangan sensitivitas larva terhadap toksin berhubungan dengan jumlah reseptor yang ada di sel sel usus tengah larva. Sehingga ada gagasan dilakukan fusi sel antara *B. thuringiensis* dengan *B. sphaericus*

atau dengan rekayasa genetika toksin *Cry* yang hasilnya diharapkan berupa galur baru atau gabungan sifat-sifat toksin yang diinginkan dari basili tersebut (Ibrahim *et al.*, 2010).

Beberapa bentuk formulasi *B. thuringiensis* H-14 telah berhasil diproduksi, seperti bentuk tepung (*pouder*), tepung lembab (*wettable pouders*), cairan (*liquits*), granula (*granuls*), briket (*briquettes*), dan pelet (*pellets*). Bentuk bentuk formulasi tersebut mempunyai spesifikasi daya tahan terhadap faktor lingkungan yang berbeda beda, sehingga dapat dipilih formulasi yang dianggap paling sesuai untuk kondisi lingkungan tertentu (Bahagiawati, 2002). *B. sphaericus* H-5a5b (VCRC B-42) bentuk bubuk yang diproduksi oleh *Vector Controle Research Centre* (VCRC) India terbukti patogen terhadap larva *Culex quinquefasciatus* yang ada di Indonesia (Salamun, 1996). Larva *Ae. aegypti* L. yang dikolonisasikan di Surabaya, juga terbukti sensitif terhadap *B. thuringiensis* H-14 hasil isolasi di Israel dan *B. sphaericus* H-5a5b hasil isolasi di India (Salamun, 1998). Uji coba kemampuan bertahan (residu) toksisitas bakteri *B. thuringiensis* H-14 dan *B. sphaericus* H-5a5b formula bubuk dari VCRC India, baik tunggal maupun komparasi terhadap larva *Ae. aegypti* di macam macam tipe TPA buatan juga pernah dilakukan (Salamun, *et al.* 1994; Salamun, 1995; Salamun, 2000). *B. thuringiensis* H-14 bentuk bubuk (tepung) digunakan di bawah kondisi lapangan, aktivitas larvisidalnya menjadi lebih pendek bila dibandingkan dengan hasil ujinya di laboratorium. Tampaknya hal ini terjadi karena adanya : (1) degradasi kimiawi dan fisik di bawah kondisi lapangan ; (2) konsumsi dan destruksi toksin oleh larva nyamuk dan invertebrata lainnya; (3) pengendapan toksin menjadi sedimen sehingga menghilang dari zona makan (*feeding zone*) larva nyamuk (Bahagiawati, 2002). Laporan lain menunjukkan bahwa efek residual bioinsektisida dipengaruhi oleh (1) kualitas air di tempat perindukan nyamuk termasuk kadar garam kandungan zat organik zat makanan dan laju penelanan oleh larva dan kadar oksigen; (2) larva sasaran, termasuk jenis dan densitas larva; (3) larvisida termasuk jenis atau varietas patogen, bentuk formulasi, dan dosis yang digunakan; (4) tempat penampungan air (TPA) termasuk bahan dan macam endapan; dan (5) faktor lingkungan lain, termasuk iklim dan kondisi sinar matahari.

Boys *et al.* (2013), telah mengumpulkan hasil penelitian yang menggunakan berbagai formula bioinsektisida berbahan baku *B. thuringiensis* untuk pengendalian vektor DBD di berbagai negara. Berbagai formula yang telah digunakan di berbagai negara, telah terbukti dapat menurunkan angka kejadian penyakit DBD setelah bioinsektisida tersebut diterapkan di lapangan.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika Molekuler, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya, pada bulan Maret sampai dengan Oktober 2019. Dua fokus pekerjaan penelitian, yaitu (1) Uji Hayati isolat lokal *Bacillus* sp. dan (2) karakterisasi genetik isolat lokal *Bacillus* sp.

4.2. Uji Hayati Isolat Lokal *Bacillus* sp.

Uji hayati isolat lokal *Bacillus* sp. diperlukan untuk mengetahui kekuatan toksisitasnya dari nilai LC₅₀ dan LT₅₀.

4.2.1. Persiapan larva uji

Telur *Ae. aegypti* berasal dari nyamuk yang dipelihara secara intensif di fasilitas pemeliharaan di Laboratorium Entomologi ITD (*Institute Tropical Diseases*) Universitas Airlangga Surabaya. Telur *Ae. aegypti* direndam dalam air sumur untuk penetasan dan kolonisasi larva uji. Larva yang dihasilkan dari penetasan telur dipelihara selama sekitar 6 hari untuk mencapai tahap larva instar III. Larva instar III inilah yang digunakan sebagai larva uji dari uji hayati entomopatogen lokal *Bacillus* sp. terhadap larva *Ae. aegypti*.

4.2.2. Cara kerja uji hayati

Dalam rangka untuk mendapatkan nilai LC (*Lethal Concentration*)/konsentrasi mematikan dan nilai LT (*Lethal Time*)/waktu mematikan, uji hayati dilakukan pada isolat terpilih yang menunjukkan toksisitas lebih dari 50% pada saat uji potensi lanjutan. Lima konsentrasi, dalam perbedaan konsentrasi, 3 ulangan, dan 20 larva untuk setiap wadah pengujian. Media 10% kultur v/v (tanpa bakteri) sebagai kontrol negatif.

Tingkat kematian larva *Ae. aegypti* dihitung menggunakan rumus ini:

$$\text{Mortality rate} = \frac{\text{number of dead larvae}}{\text{number of total larvae}} \times 100 \%$$

Jika di kelompok kontrol negatif 5-20% ditemukan larva mati, rumus koreksi Abbott yang digunakan untuk memperoleh angka kematian yang terkoreksi:

$$\text{Corrected mortality rate} = \frac{\text{Mortality rate of test group} - \text{mortality rate of control group}}{100\% - \text{Mortality rate of control group}} \times 100\%.$$

Nilai-nilai LC₅₀ dan LT₅₀ dihitung menggunakan Analisis Probit yang menggunakan program *Windows* pada *software Minitab V16*.

4.3. Uji Genetik Isolat Lokal *Bacillus* sp.

4.3.1. Bahan dan alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini antara lain *autoclave*, timbangan analitik, *incubator*, lemari pendingin, *Laminar Air Flow* (LAF), *freezer*, *sentrifuge*, oven, *shaker*, *beaker glass*, DNA *electrophoresis apparatus*, tabung reaksi, tabung Erlemeyer 250 mL, gelas ukur 25 mL, cawan petri, *microwave*, *stirrer*, *microtube*, jarum ose, korek api, spidol permanen, bunsen, *spektrofotometer*, vortex, mikro pipet, tip (*white* dan *yellow tip*), *waterbath*, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan UV-*transluminator*

Penelitian ini menggunakan bahan berupa kultur isolat lokal *Bacillus* sp. yang telah diisolasi dari tanah alamiah, endapan TPA, dan larva *Ae. aegypti* yang potensial membunuh larva *Ae. aegypti*. Isolasi DNA menggunakan bahan media *Luria Bertani* (LB) cair, *Nuclei Lysis Solution*, larutan RNase, *Protein Presipitation Solution*, isopropanol, ethanol 70%, DNA *Rehydration Solution*. Untuk bahan elektroforesis dan spektrofotometer berupa agarose, *Tris-Borate-EDTA* (TBE), *Ethidium Bromide* (EtBr), *loading dye*, DNA *Rehydration Solution*. Sedangkan bahan untuk proses PCR berupa primer forward, primer reverse, *Gotaq® Green Master Mix*, ddH₂O.

4.3.2. Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif yang dianalisis secara deskriptif. Penelitian deskriptif ini dilakukan untuk mengetahui urutan basa nukleotida (sekuen DNA) dari bakteri entomopatogen yang telah diisolasi dari larva *Aedes aegypti*. Selanjutnya, hasil

sekuen DNA digunakan untuk menentukan nama spesies *Bacillus* sp. dengan cara mencari kesamaan antara sekuen DNA yang ingin diketahui dengan *database* sekuen yang terdapat pada GenBank melalui program *Basic Local 22 Alignment Search Tool* (BLAST) untuk diperoleh data identitas isolat *Bacillus* sp. yang dijelaskan secara deskriptif.

4.3.4. Persiapan alat

Peralatan yang digunakan dalam bentuk gelas (kaca) dibungkus dengan kertas atau aluminium foil, selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit dengan tekanan 1 atm. Semua alat yang telah disterilkan dimasukkan ke dalam oven.

4.3.5. Pembuatan media *Luria Bertani Broth* (LB)

Media *Luria Bertani Broth* dibuat dengan mencampurkan serbuk *Luria Bertani Broth* sebanyak 20 gram ke dalam 1 liter akuades. Semua bahan dihomogenkan tanpa dilakukan pemanasan, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 20 menit.

4.3.6. Peremajaan isolat

Peremajaan isolat bakteri *Bacillus* sp. dimulai dengan mengambil isolat bakteri tersebut dari stok sebelumnya. Koloni bakteri dari stok diambil menggunakan jarum ose, selanjutnya digoreskan pada media *Luria Bertani agar* padat yang baru. Setelah itu, biakan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37 °C selama 1 hari.

4.3.7. Pembuatan kultur mikroba

Isolat *Bacillus* sp. ditanam di media *Luria Bertani* (LB) agar diambil 1 ose dan dimasukkan ke dalam tabung berisi 50 mL media cair *Luria Bertani* (LB) kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Selanjutnya, isolat diinkubasi selama 16 jam pada suhu 30 °C berupaya untuk mendapatkan DNA *Bacillus* sp. (Senfi *et al.*, 2012).

4.3.8. Isolasi DNA

Isolasi DNA kromosom dilakukan untuk mendapatkan *whole genome sequencing* dari *Bacillus* sp. sebagai *template* untuk mengangkat jenis isolat dengan menggunakan 16S rRNA. Langkah pertama yang dilakukan adalah isolat *Bacillus* sp. hasil peremajaan terlebih dahulu diinokulasikan pada media cair LB dengan mengambil koloni bakteri tersebut menggunakan jarum ose. Selanjutnya biakan tersebut diinkubasi pada inkubator shaker selama ±20 jam. Proses isolasi DNA genom dari bakteri *Bacillus* sp. menggunakan *DNA purification kit* (Promega), dan prosedur yang dilakukan sesuai dengan arahan dari produsen kit tersebut (Promega protocol, 2018).

Biakan *Bacillus* sp. pada media cair LB di ambil sebanyak 1 mL dan dituangkan pada tabung eppendorf 1,5 mL. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 g selama 2 menit, supernatan dibuang sehingga didapatkan pelet sel. Pelet sel yang didapat ditambahkan 600 μ L *Nuclei Lysis Solution* dan diresuspensi secara hati-hati. Suspensi diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 80^oC selama 5 menit, dan didinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya, ditambahkan larutan RNAse sebanyak 3 μ L, kemudian diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 37^oC selama 60 menit, dan didinginkan pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan 200 μ L *Protein Presipitation Solution* dan divortex dengan kecepatan tinggi selama 20 detik. Setelah tercampur, sampel diinkubasi diatas es selama 5 menit. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 g selama 3 menit, supernatan diambil dan dituangkan pada tabung Eppendorf 1,5 mL yang baru, yang telah diisi dengan 600 μ L isopropanol suhu ruang. Sampel dicampur secara perlahan dengan membolak-balikkan tabung hingga terbentuk benang. Selanjutnya, isolat disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 g selama 2 menit, dan supernatan dibuang. Pelet yang dihasilkan ditambahkan dengan ethanol 70% sebanyak 600 μ L dan dicampur dengan membolak-balikkan tabung. Suspensi disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 g selama 2 menit, supernatan dibuang dan pelet dikeringkan selama 10 menit. Pelet ditambahkan 100 μ L *DNA Rehydration Solution*, kemudian diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 65^oC selama 1 jam. Penyimpanan hasil isolasi DNA dilakukan dalam lemari pendingin dengan suhu -20^oC.

4.3.9. Verifikasi DNA

a. Pengecekan dengan elektroforesis

Pengecekan dengan elektroforesis ini bertujuan untuk konfirmasi keberadaan DNA *Bacillus* sp. Elektroforesis DNA ini menggunakan gel *agarose* konsentrasi 1%. Sebelum membuat gel, beberapa peralatan untuk membuat gel (*chamber*, cetakan dan sisir). Peralatan tersebut kemudian dirangkai dan diatur horizontalitasnya dengan *waterpass*. Kemudian 0,5 gram agarose dimasukan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan dengan 50 mL *buffer* Tris-Borate-EDTA (TBE). Selanjutnya, Erlenmeyer ditutup dengan *plastic wrap* dan dilubangi kecil-kecil. Larutan tersebut selanjutnya dipanaskan dengan *microwave*.

Setelah larutan tersebut larut kemudian ditunggu hingga suhu 40-50^oC dan sebanyak 0,2 μ L Ethidium Bromide (EtBr) ditambahkan kedalamnya lalu dihomogenkan. Larutan yang telah ditambahkan EtBr dituang ke dalam cetakan dan ditunggu hingga mengeras.

Selanjutnya sisir diambil kemudian gel diletakkan ke dalam *chamber* Elektroforesis lalu digenangi dengan larutan *buffer* TBE. Sampel DNA dicampur dengan loading *dye* dengan perbandingan (2:1) menggunakan *micropipet*. Loading *dye* dan DNA yang tercampur di masukkan ke dalam sumuran gel yang berisi TBE, serta *Marker* DNA dimasukkan ke dalam sumuran gel tersebut. Selanjutnya, gel dielektroforesis pada 100 volt selama 30 menit dengan Elektroforesis Bio-Rad. Setelah gel dielektroforesis kemudian divisualisasi menggunakan *UV-transiluminator*.

b. Pengecekan dengan spektrofotometer

Pengecekan dengan spektrofotometer bertujuan untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA isolat *Bacillus* sp. Langkah pertama yang perlu dilakukan yaitu DNA hasil isolasi dituangkan ke dalam *Microdroplet* sebanyak 3 μ L dengan menggunakan blanko DNA *Rehydration Solution* sebagai pelarut lalu mengukur nilai absorban hasil isolasi DNA dengan panjang gelombang 260 dan 280 nm. Untuk menghitung besarnya kemurnian pada isolat *Bacillus* sp. bisa dilihat melalui Persamaan 4.1.

$$\text{Kemurnian DNA} = A_{260}/A_{280} \quad (4.1)$$

Keterangan:

A = Absorbansi

Jika hasil dari perhitungan konsentrasi diperoleh nilai 1,8 hingga 2,0 maka kemurnian DNA tersebut dikatakan baik. Akan tetapi, apabila diperoleh nilai lebih dari 2,0 maka kemungkinan DNA masih mengandung hasil presipitasi etanol. Sehingga, perhitungan konsentrasi DNA bakteri didapatkan menggunakan Persamaan 4.2.

$$\text{Konsentrasi DNA } (\mu\text{gmL}) = A_{260} \times \text{faktor pengenceran} \times 50 \text{ } (\mu\text{gmL}) \quad (4.2)$$

4.3.10. Amplifikasi gen 16S rRNA

DNA hasil isolasi digunakan untuk amplifikasi gen 16 S rRNA sepanjang 1550 pb dengan menggunakan *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Amplifikasi gen 16s RNA untuk menentukan nama spesies dari isolat bakteri yang ditemukan dengan teknik PCR (*ANALYTIK JENA Biometra Tadvanced*) tersebut. Campuran PCR menggunakan bahan dari PCR *mix* KAPA Robust, akuabides steril, sampel DNA isolat bakteri *Bacillus* dan primer.

Campuran tersebut dibuat dengan volume akhir 25 μL . Primer yang digunakan untuk mengangkat gen adalah primer universal yaitu P0 posisi 27f (5'-GAG AGT TTG ATG CTG GCT CAG-3') dan P6 posisi 1495r (5' -CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3').

Komponen untuk reaksi PCR dengan volume 25 μL adalah 12,5 μL *Gotaq® Green Master Mix*, 1,5 μL primer *forward* (10 pmol), 1,5 μL primer *reverse* (10 pmol), 1,5 μL DNA genomik *Bacillus* sp. (DNA hasil isolasi) sebagai DNA *template*, dan 8 μL ddH₂O steril. Proses amplifikasi gen dilakukan dengan kondisi predenaturasi pada suhu 95⁰C selama 2 menit, denaturasi pada suhu 95⁰C selama 30 detik, *annaeling* pada suhu 55⁰C selama 45 detik, *extention* pada suhu 72⁰C selama 1 menit dan *final extention* pada suhu 72⁰C selama 1 menit. Proses tersebut dilakukan sebanyak 35 siklus.

DNA hasil amplifikasi tersebut dimurnikan lalu disekuen secara komersial untuk mengetahui urutan basa DNA-nya. Data sekuen tersebut dibandingkan dengan data di *GenBank* dari database *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang dilakukan di laboratorium *Ist Base* Malaysia.

4.3.11. Analisis hubungan kekerabatan

Analisis hubungan kekerabatan bertujuan untuk mengetahui seberapa besar kemiripan isolat lokal *Bacillus* sp. dengan isolat *Bacillus* lainnya. Hubungan kekerabatan dari isolat *Bacillus* akan dianalisis menggunakan pembuatan pohon filogenetik dengan *software* Mega 6.06. Sebelum melakukan penyusunan, terlebih dahulu dilakukan pemasukan seluruh data sekuens pada kolom analisis data.

4.4. Analisis Data

Keseluruhan data yang didapatkan dianalisis secara statistik deskriptif dan analitik. Data yang didapatkan yaitu sekuen dari gen 16S rRNA bakteri entomopatogen *Bacillus* sp. terpilih dari isolasi tahap I. Hasil dari sekuen DNA digunakan untuk menentukan nama spesies tersebut dengan cara mencari kesamaan (*similarity*) antara sekuen DNA yang ingin diketahui dengan *database* sekuen lain yang terdapat pada *GenBank* melalui program BLAST. Menurut Pangastuti (2006), kesamaan minimal untuk menyatakan bahwa sekuen DNA dari sampel adalah spesies yang sama dengan yang ada di database adalah sebesar 97% dianalisis secara deskriptif. Data dari hasil uji hayati juga dianalisis dengan menggunakan statistik deskriptif dan analitik.

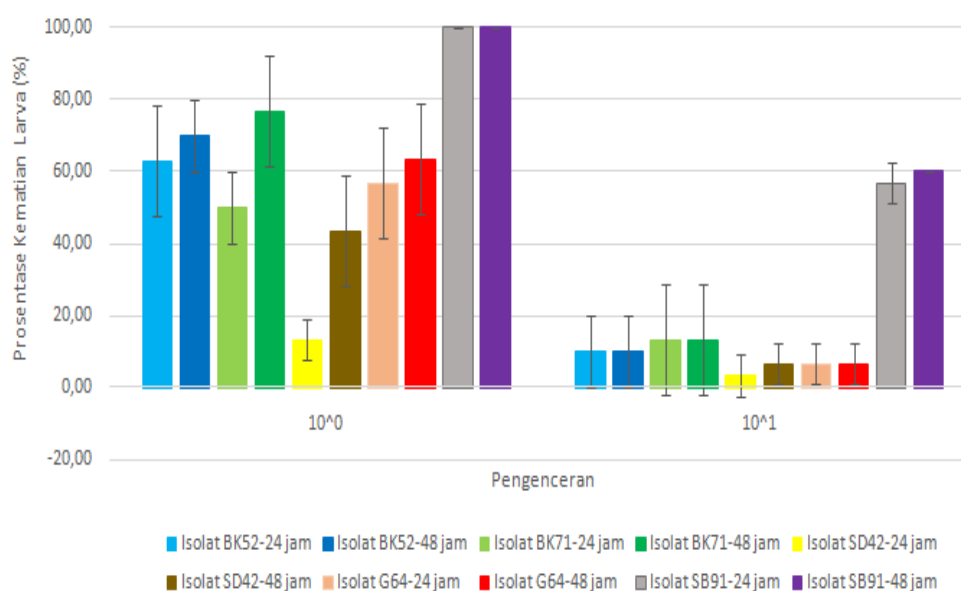
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Uji Hayati

5.1.1. Skrining dan uji pendahuluan

Isolat terpilih yang diujikan pada skrining ini merupakan isolat yang telah diuji potensinya pada penelitian tahap I (Salamun *et al.*, 2018) yang memiliki daya bunuh tinggi terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*. Komposisi pengambilan isolat tersebut yaitu 2 isolat tertinggi dari lingkungan alamiah Taman Nasional Baluran yaitu *Bacillus* sp. BK7.1 (Savana Bekol) dan *Bacillus* sp. BK5.2 (Savana Bekol) serta 3 isolat tertinggi dari lingkungan domestik yaitu *Bacillus* sp. SD4.2 (Sidoarjo), *Bacillus* sp. G6.4 (Gresik) serta *Bacillus* sp. S9.1 (Surabaya).

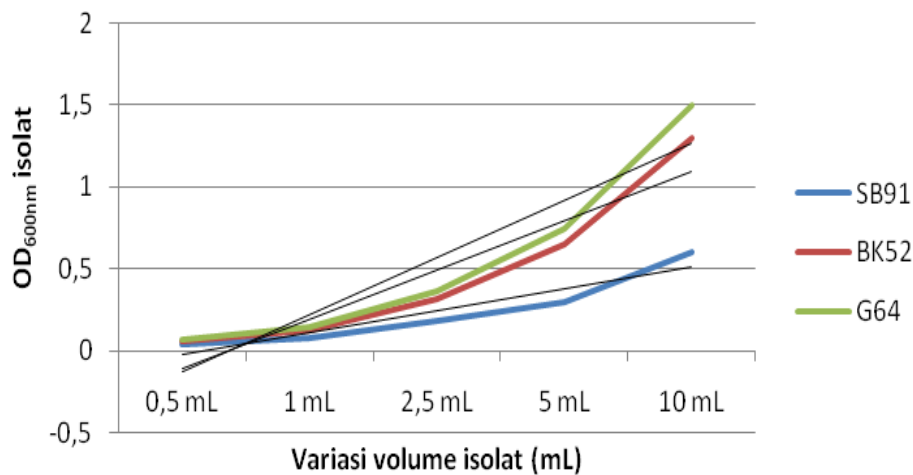
Uji pendahuluan difungsikan untuk mengetahui rentang nilai biolarvasida yang dapat mematikan larva nyamuk *Ae. aegypti*. Uji pendahuluan dilakukan untuk mencari nilai LC₅ dan LC₉₀. Hasil skrining aktivitas biolarvasida dan uji pendahuluan isolat lingkungan alamiah Taman Nasional Baluran dan domestik disajikan dalam gambar 5.1.



Gambar 5.1. Hasil skrining biolarvasida isolat dari lingkungan alamiah Taman Nasional Baluran (BK5.2, BK7.1) dan domestik endemik demam berdarah (S9.1, G6.4, SD4.2) dalam membunuh larva nyamuk *Ae. aegypti* (%).

5.1.2. Penentuan konsentrasi isolat

Berdasarkan hasil skrining aktivitas larvasida yang didapatkan, dapat diambil 3 (tiga) isolat terbaik yang akan diujikan pada tahap selanjutnya. Isolat yang diuji pada tahap selanjutnya adalah S9.1, BK5.2 dan G6.4. Sebelum diuji toksisitasnya, ketiga isolat tersebut diukur konsentrasi biolarvasidanya. Penentuan konsentrasi biolarvasida dilakukan 2 (dua) tahap yaitu penentuan hubungan antara mL isolat dan OD_{600nm} serta melakukan penghitungan TPC untuk mengetahui grafik hubungan antara OD_{600nm} dengan CFU/mL. Data mengenai hubungan antara mL isolat dan OD_{600nm} disajikan dalam gambar 2.



Gambar 5.2. Hubungan antara variasi volume isolat (mL) dengan OD_{600nm} Isolat S9.1, BK5.2, dan G6.4.

Selanjutnya data hasil OD_{600nm} masing-masing isolat tersebut dimasukkan ke dalam grafik hubungan antara OD_{600nm} dengan CFU/mL yang diperoleh melalui penghitungan *Total Plate Count* (TPC). Data mengenai hubungan antara OD_{600nm} dengan CFU/mL masing-masing isolat disajikan dalam tabel 5.1.

5.1.3. Uji Hayati

Uji hayati (uji toksisitas) dilakukan di laboratorium entomologi, *Institut Tropical Disease Center* (TDC), Universitas Airlangga. Hasil uji tersebut digunakan untuk mengetahui nilai LC₅₀ serta LT₅₀ dari isolat S9.1, G6.4 dan BK5.2. Hasil uji toksisitas pendedahan 24 jam dan 48 jam, disajikan dalam tabel 5.2.

Tabel 5.1. Hubungan OD_{600nm} dengan CFU/mL isolat S9.1, G6.4 dan BK5.2

Isolat S9.1				
Kode Perlakuan	mL isolat	OD_{600nm}	Rumus $y=ax+b$ (10^6)	Jumlah sel
J ₁ K ₁	0,5 mL	0,04	$165x + 17,16$	$2,37 \times 10^7$
J ₁ K ₂	1 mL	0,08	$165x + 17,16$	$3,03 \times 10^7$
J ₁ K ₃	2,5 mL	0,18	$165x + 17,16$	$4,65 \times 10^7$
J ₁ K ₄	5 mL	0,3	$165x + 17,16$	$6,66 \times 10^7$
J ₁ K ₅	10 mL	0,6	$165x + 17,16$	$1,16 \times 10^8$
Isolat G6.4				
Kode Perlakuan	mL isolat	OD_{600nm}	Rumus $y=ax+b$ (10^6)	Jumlah sel
J ₂ K ₁	0,5 mL	0,07	$164,1x - 1,7$	$9,78 \times 10^6$
J ₂ K ₂	1 mL	0,15	$164,1x - 1,7$	$2,29 \times 10^7$
J ₂ K ₃	2,5 mL	0,37	$164,1x - 1,7$	$5,9 \times 10^7$
J ₂ K ₄	5 mL	0,75	$164,1x - 1,7$	$1,21 \times 10^8$
J ₂ K ₅	10 mL	1,5	$164,1x - 1,7$	$2,44 \times 10^8$
Isolat BK5.2				
Kode Perlakuan	mL isolat	OD_{600nm}	Rumus $y=ax+b$ (10^6)	Jumlah sel
J ₃ K ₁	0,5 mL	0,06	$200x + 8$	2×10^7
J ₃ K ₂	1 mL	0,13	$200x + 8$	$3,4 \times 10^7$
J ₃ K ₃	2,5 mL	0,32	$200x + 8$	$7,2 \times 10^7$
J ₃ K ₄	5 mL	0,65	$200x + 8$	$1,38 \times 10^8$
J ₃ K ₅	10 mL	1,3	$200x + 8$	$2,68 \times 10^8$

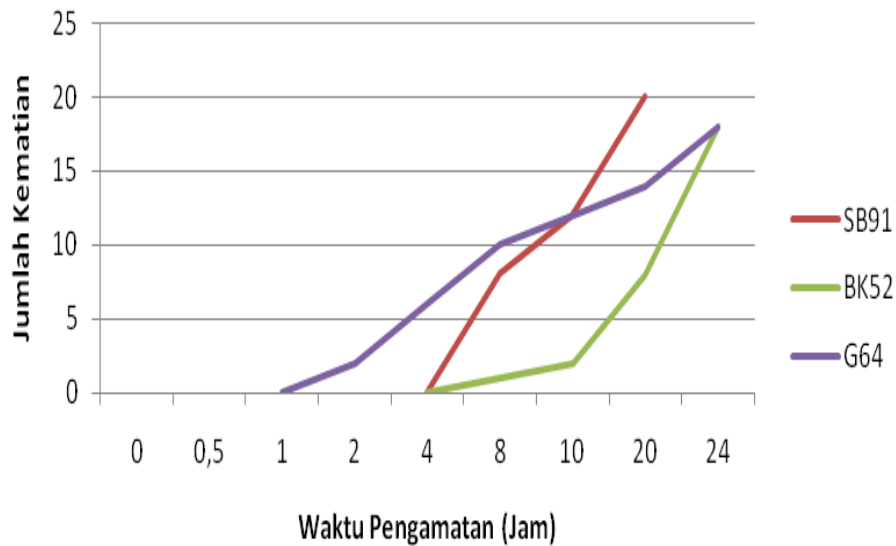
Keterangan: y = nilai CFU/mL ; $ax+b$ = OD_{600nm}

Tabel 5.2. Hasil uji toksisitas isolat bakteri *Bacillus* sp. S9.1, G6.4 dan BK5.2 waktu pendedahan 24 jam dan 48 jam.

Isolat	Konsentrasi	CFU/mL	Pendedahan 24 jam (%)	Pendedahan 48 jam (%)
S9.1	K _{0,5mL}	$2,37 \times 10^7$	$13,3 \pm 5,8$	$23,3 \pm 5,8$
	K _{1mL}	$3,03 \times 10^7$	40 ± 10	$73,3 \pm 11,5$
	K _{2,5mL}	$4,65 \times 10^7$	$73,3 \pm 5,8$	$86,7 \pm 5,8$
	K _{5mL}	$6,66 \times 10^7$	100 ± 0	100 ± 0
	K _{10mL}	$1,16 \times 10^8$	100 ± 0	100 ± 0
G6.4	K _{0,5mL}	$9,78 \times 10^6$	$6,7 \pm 5,8$	$6,7 \pm 5,8$
	K _{1mL}	$2,29 \times 10^7$	20 ± 10	$26,6 \pm 5,8$
	K _{2,5mL}	$5,9 \times 10^7$	$43,3 \pm 15,3$	$43,3 \pm 15,3$
	K _{5mL}	$1,21 \times 10^8$	$73,3 \pm 5,8$	$76,7 \pm 5,8$
	K _{10mL}	$2,44 \times 10^8$	$93,3 \pm 5,8$	$93,3 \pm 5,8$
BK5.2	K _{0,5mL}	2×10^7	$3,3 \pm 5,8$	$3,3 \pm 5,8$
	K _{1mL}	$3,4 \times 10^7$	20 ± 10	$26,6 \pm 5,8$
	K _{2,5mL}	$7,2 \times 10^7$	40 ± 10	50 ± 0
	K _{5mL}	$1,38 \times 10^8$	$63,3 \pm 5,8$	80 ± 10
	K _{10mL}	$2,68 \times 10^8$	$93,3 \pm 5,8$	100 ± 0

Selain untuk mengetahui nilai LC₅₀ dan LC₉₀ isolat *Bacillus* sp. dari lingkungan alamiah dan domestik, uji toksisitas ini juga difungsikan untuk mencari nilai *Lethal Time*

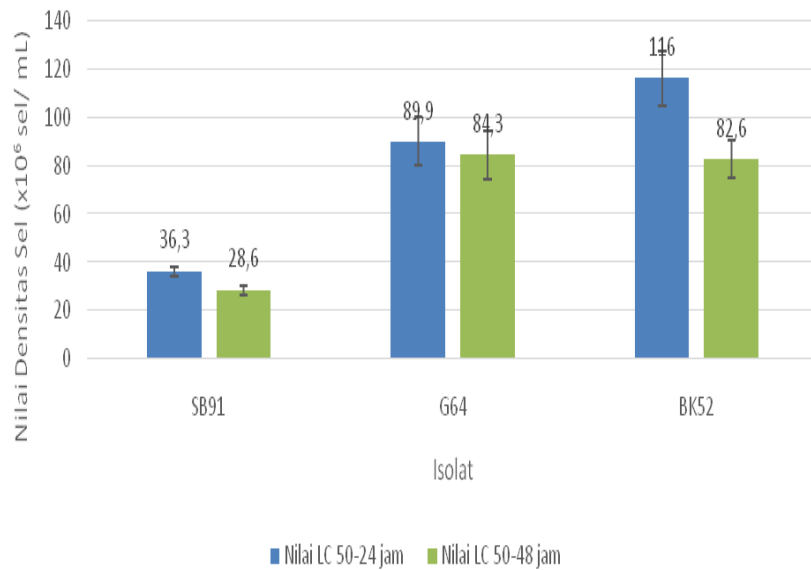
(LT) bakteri dalam membunuh larva nyamuk *Ae. aegypti*. Hasil uji kecepatan isolat bakteri *Bacillus* sp. dalam mematikan larva uji disajikan dalam gambar 5.3.



Gambar 5.3. Hasil uji kecepatan isolat bakteri *Bacillus* sp. S9.1, G6.4 dan BK5.2 dalam membunuh larva uji dalam pengamatan 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 20; 24 jam

5.1.4. Menentukan nilai LC_{50}

Data hasil uji toksisitas isolat lokal alamiah Taman Nasional Baluran dan domestik endemik DBD dalam membunuh larva nyamuk *Ae. aegypti* di analisis menggunakan bantuan aplikasi statistik yaitu MINITAB 17. Diagram hasil perbandingan nilai LC_{50} isolat *Bacillus* sp. S9.1, G6.4 dan BK5.2 pada masa pendedahan 24 dan 48 jam disajikan dalam gambar 5.4.



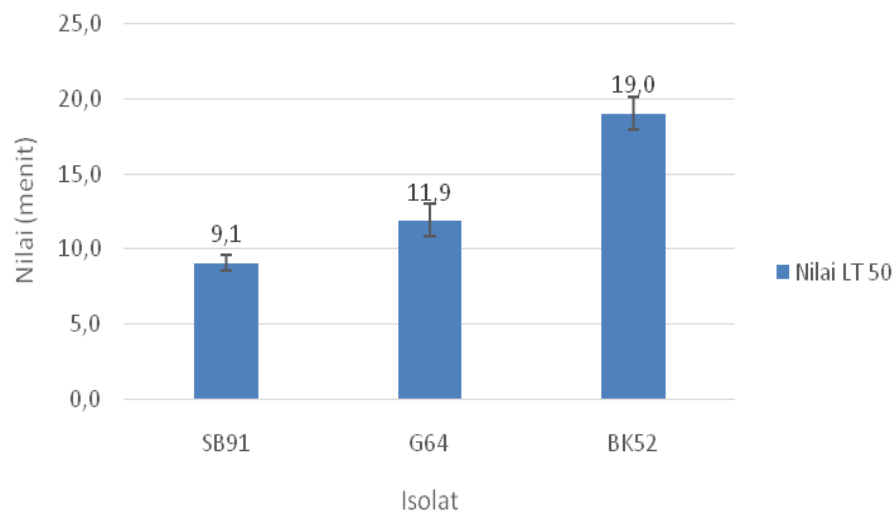
Gambar 5.4. Diagram hasil perbandingan nilai LC₅₀ isolat *Bacillus sp.* S9.1, G6.4 dan BK5.2 pada masa pendedahan 24 dan 48 jam

Kematian larva nyamuk *Ae. aegypti* yang disebabkan oleh bakteri *Bacillus sp.* S9.1, G6.4 maupun BK5.2, menunjukkan bahwa isolat tersebut berpotensi membunuh larva nyamuk *Ae. aegypti*. Dari data nilai LC isolat tersebut dalam mematikan 50% populasi total larva uji, dapat ditarik kesimpulan bahwa isolat S9.1 merupakan isolat yang memiliki aktivitas toksisitas yang paling baik dapat membunuh larva nyamuk *Ae. aegypti*.

Nilai *Lethal Concentration* (LC) pada dasarnya adalah konsentrasi suatu agen/organisme yang mampu membunuh organisme target dalam populasi tertentu. Nilai LC₅₀ suatu organisme/mikroorganisme adalah konsentrasi organisme/mikroorganisme tersebut yang dapat membunuh 50% populasi organisme target. Semakin rendah nilai LC, baik dalam LC₅₀ maupun LC₉₀ suatu isolat mikroorganisme, semakin tinggi sifat toksisitas suatu agen/mikroorganisme. Hal ini menunjukkan agen/mikroorganisme tersebut hanya membutuhkan konsentrasi yang rendah untuk membunuh organisme. Toksisitas bakteri *Bacillus sp.* dapat dipengaruhi oleh beberapa hal, seperti jenis toksin yang dimilikinya, jenis larva dan umur larva target yang diuji serta jenis media pertumbuhan yang digunakan (Suryadi *et al.*, 2016).

5.1.5. Menentukan nilai LT_{50}

Analisis untuk menentukan nilai LT_{50} dari isolat lokal alamiah dan domestik menggunakan bantuan aplikasi statistik yaitu MINITAB 17. Penghitingan LT akan dilihat pada tingkat kecepatan isolat dalam membunuh larva uji pada 50% kematian larva. Diagram perbandingan hasil nilai LT_{50} isolat *Bacillus sp.* S9.1, G6.4 dan BK5.2 pada pengamatan 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 20; 24 jam disajikan dalam gambar 5.5.



Gambar 5.5. Perbandingan hasil nilai LT_{50} isolat *Bacillus sp.* S9.1, G6.4 dan BK5.2 pada pengamatan 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 20; 24 jam.

Dari data nilai LT isolat tersebut dalam mematikan 50% populasi total larva uji, dapat ditarik kesimpulan bahwa isolat S9.1 merupakan isolat yang memiliki aktivitas kecepatan mematikan yang paling baik dapat membunuh larva nyamuk *Ae. aegypti*. *Lethal Time* (LT) adalah waktu yang diperlukan suatu agen/organisme mampu membunuh organisme target dalam populasi tertentu. Nilai LT_{50} suatu organisme/mikroorganisme adalah waktu yang dibutuhkan organisme/mikroorganisme tersebut yang dapat membunuh 50% populasi organisme target. Semakin sedikit waktu yang diperlukan organisme dalam membunuh populasi target, maka semakin baik pula efektivitas organisme/mikroorganisme tersebut dalam membunuh populasi target.

5.2. Hasil Uji Genetik Isolat Lokal *Bacillus* sp.

Hasil dari sekuen DNA digunakan untuk menentukan nama spesies tersebut dengan cara mencari kesamaan (*similarity*) antara sekuen DNA yang ingin diketahui dengan *database* sekuen lain yang terdapat pada GenBank melalui program BLAST. Menurut Pangastuti (2006), kesamaan minimal untuk menyatakan bahwa sekuen DNA dari sampel adalah spesies yang sama dengan yang ada di database adalah sebesar 97%. Hasil adalah sebagai berikut.

5.2.1. Identifikasi nama jenis isolat *Bacillus* sp. BK 7.2, BK 5.2 dan SB.91

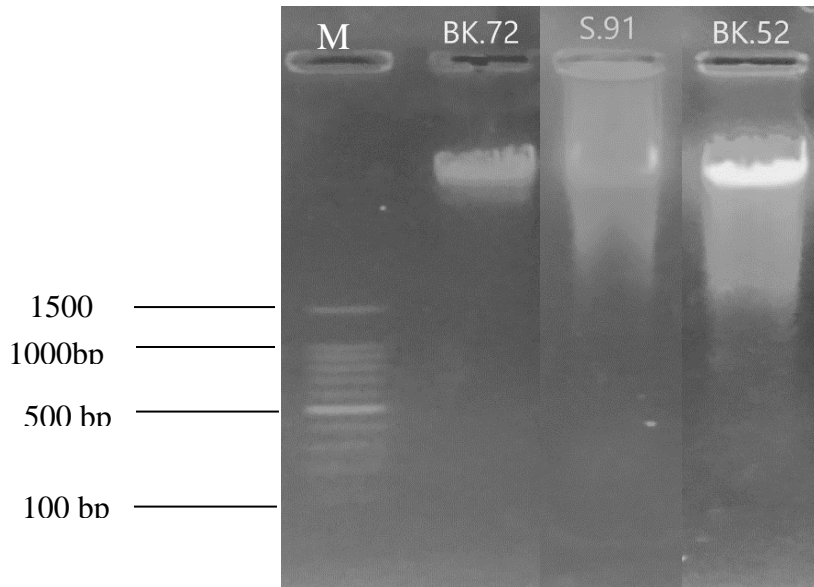
5.2.1.1. Analisis hasil isolasi DNA dan amplifikasi gen 16S rRNA isolat *Bacillus* sp. BK 7.2, BK 5.2 dan S9.1 dengan metode PCR

Isolat *Bacillus* sp. BK 7.2, BK5.2 dan S9.1 diisolasi DNA genomnya menggunakan DNA *Purification Kit* (Promega). Hasil isolasi DNA dikonfirmasi dengan elektroforesis dan kemudian di evaluasi tingkat kemurnian dan konsentrasinya. Nilai kemurnian dan konsentrasi DNA genom dari *Bacillus* sp. BK 7.2, BK 5.2 dan S9.1 dapat dilihat pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3. Hasil evaluasi nilai kemurnian dan konsentrasi DNA isolate *Bacillus* sp. BK 7.2

Kode Isolat	A260	A280	Kemurnian DNA (A260/A280)	Konsentrasi DNA (ng/μl)
BK 7.2	1,133	0,638	1,78	54
BK 5.2	1,310	0,708	1,85	62,9
S 9.1	1,174	0,633	1,86	56,1

Hasil elektroforesis DNA genom isolat *Bacillus* sp. BK 7.2, BK 5.2 dan S 9.1 divisualisasi di bawah sinar UV dan dapat dilihat pada gambar 5.6.



Gambar 5.6. Hasil elektroforesis DNA genom isolat *Bacillus* sp. BK 7.2, BK 5.2, dan S 9.1 pada agarose gel 1%. Keterangan: M= Marker DNA 100 bp;

5.3. Analisis Hasil Sekuensing Gen 16S rRNA dengan Metode BLAST

Gen 16S rRNA isolat *Bacillus* sp. BK 7.2, BK 5.2 dan S 9.1 yang telah berhasil diamplifikasi dan dikonfirmasi melalui elektroforesis kemudian dilanjutkan untuk dilakukan purifikasi dan sekuensing. Tahapan purifikasi dan sekuensing gen 16S rRNA dilakukan dengan mengirim sampel hasil PCR DNA genom ke *1st Base Sequencing Service* di Singapura. Data yang telah berhasil disekuensing kemudian dianalisis dengan menggunakan *software BioEdit Sequence Alignment Editor* versi 7.2.5. Hasil urutan nukleotida gen 16S rRNA isolate *Bacillus* sp. BK 7.2, BK5.2 dan S 9.1 dapat dilihat pada Gambar 5.7, Gambar 5.8. dan Gambar 5.9.

```

ATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTA
AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAA
ACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG
GAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGAGGAGC
GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCT
AAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG

```

GTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGAT
AGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTCTGAG
ATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCA
CTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGT
TAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCT
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
GCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCGGTGAGGTA

Gambar 5.7. Hasil sekuensing Gen 16S rRNA isolat *Bacillus* sp. BK 7.2.

CTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAG
TAACACGTGGGTAACCTGCCATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAA
CATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGT
CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG
CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCT
GTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC
ATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGA
AAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG
TTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCCTAGAGATAGGGCTTCTCCT
TCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGT
TCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAA
CACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGG

Gambar.5.8. Hasil sekuensing gen 16S rRNA isolat *Bacillus* sp. BK 5.2

GTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGC
ATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG
TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAAG
AACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCG
CAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGG
GAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGCTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC
GAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCC
GCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGATAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGAGT
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG

CAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG
 AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
 GACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGAT
 CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
 AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGG
 TGAGGTAA

Gambar 5.9. Hasil sekuensing gen 16S rRNA isolat *Bacillus* sp. S9.1

Sekuens gen 16S rRNA dari isolat *Bacillus* sp. BK 7.2 yang didapatkan memiliki ukuran 1381 pasang basa, pada isolat *Bacillus* sp. BK 5.2 memiliki ukuran 1432 pasang basa, dan pada isolat *Bacillus* sp. S 9.1 memiliki ukuran 1394 pasang basa. Kemudian hasil tersebut disejajarkan dengan sekuens gen 16S rRNA dari mikroorganisme lain yang telah dipublikasikan pada GenBank. Homologi gen 16S rRNA dilihat dengan menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) yang diakses melalui *National Center for Biotechnology Information at The National Library of Medicine in Washington DC* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Berdasarkan analisis BLAST yang telah dilakukan, didapatkan hasil urutan DNA gen 16S rRNA dari isolat *Bacillus* sp. BK 7.2 dan S9.1 memiliki kesamaan dengan *Bacillus subtilis* dengan tingkat homologi yang sangat tinggi sedangkan isolat BK 5.2 memiliki kesamaan dengan *Bacillus thuringiensis* dengan tingkat homologi tinggi juga. Hasil analisis BLAST gen 16S rRNA isolat ini dapat dilihat pada Tabel 5.4, Tabel 5.5, dan Tabel 5.6.

Tabel 5.4. Hasil analisis BLAST gen 16S rRNA isolat *Bacillus* sp. BK 7.2

No	Nama Spesies	Accession	E value	%ID	Query Cover
1	<i>Bacillus subtilis</i> subs. inaquosorum strain BGSC 3A28	NR 104873.1	0.0	100%	100%
2	<i>Bacillus subtilis</i> strain JCM 1465	NR 113265.1	0.0	99.93%	100%
3	<i>Bacillus subtilis</i> strain NBRC 13719	NR 112629.1	0.0	99.93%	100%

Tabel 5.5. Hasil analisis BLAST gen 16S rRNA isolate *Bacillus* sp. S9.1

No	Nama Spesies	Accession	E value	%ID	Query Cover
1	<i>Bacillus subtilis</i> subs. inaquosorum strain BGSC 3A28	NR 104873.1	0.0	99.93%	100%
2	<i>Bacillus subtilis</i> strain JCM 1465	NR 113265.1	0.0	99.86%	100%

3	<i>Bacillus subtilis</i> strain NBRC 13719	NR 112629.1	0.0	99.86%	100%
---	--	-------------	-----	--------	------

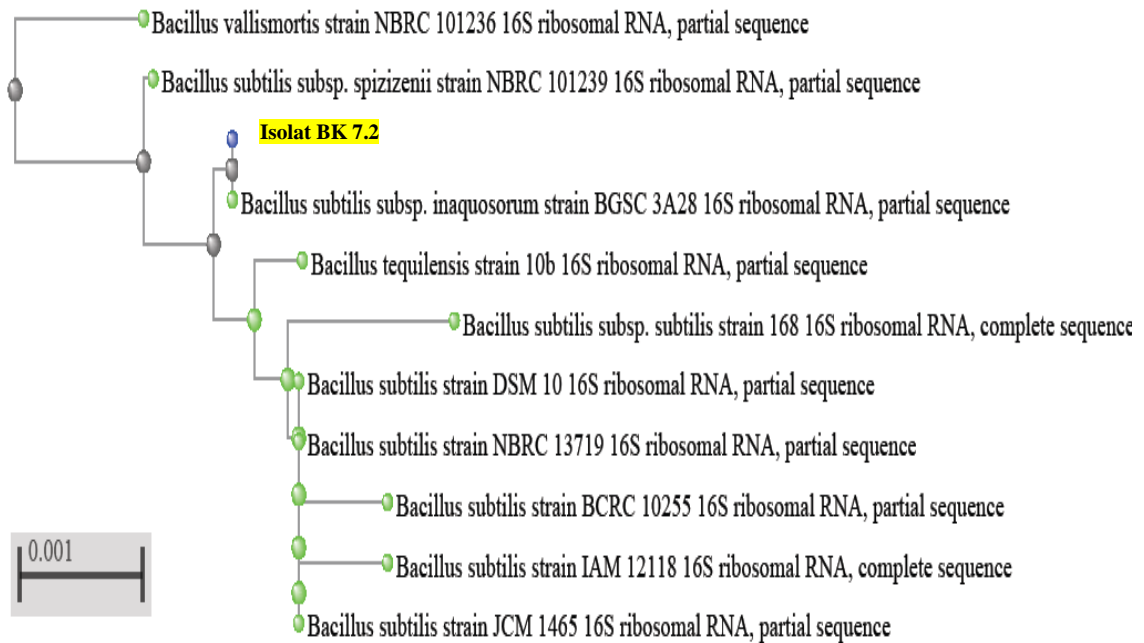
Tabel 5.6. Hasil analisis BLAST gen 16S rRNA isolate *Bacillus* sp. BK 5.2

No	Nama Spesies	Accession	E value	%ID	Query Cover
1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain B16	KX977387.1	0.0	100%	99%
2	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IARI-UPS 6	KT441072.1	0.0	100%	99%
3	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain 2110	JF947357.1	0.0	100%	99%

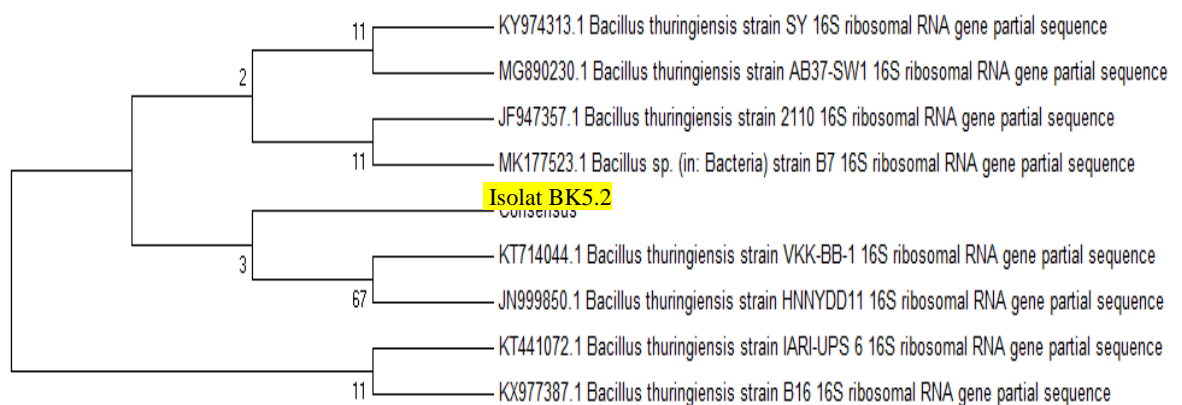
Berdasarkan hasil BLAST gen 16S rRNA dapat disimpulkan bahwa isolat *Bacillus* sp. BK 7.2 yang telah diisolasi dari Taman Nasional Baluran ini merupakan spesies Bakteri *Bacillus subtilis* serta isolat *Bacillus* sp. BK 5.2 yang juga diisolasi dari Taman Nasional Baluran merupakan spesies bakteri *Bacillus thuringiensis*. Sedangkan pada isolat S 9.1 yang telah diisolasi dari larva nyamuk *Aedes aegypti* merupakan spesies bakteri *Bacillus subtilis*.

5.4. Analisis Pohon Filogeni

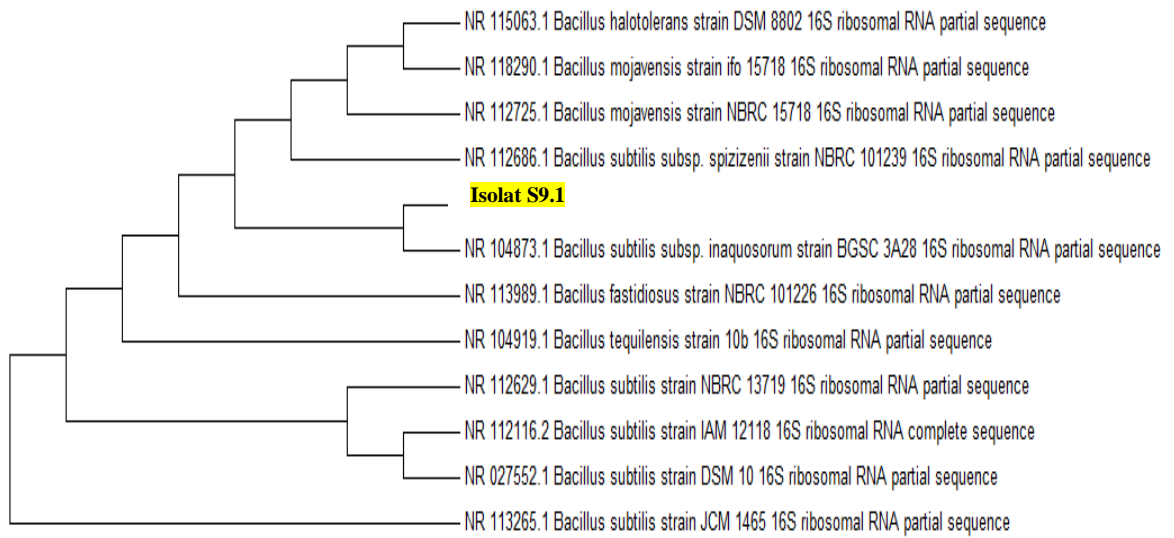
Hasil sekuensing DNA genom isolat *Bacillus* sp. BK 7.2 yang telah disetarakan dengan mikroorganisme lain melalui BLAST kemudian disusun untuk menentukan hubungan kekerabatan dengan membuat pohon filogenetik menggunakan software Mega 7 versi 7.0.21. Hasil pohon filogeni hubungan kekerabatan isolat *Bacillus* sp. BK 7.2, BK 5.2 dan S 9.1 dapat dilihat pada gambar 5.10, Gambar 5.11 dan Gambar 5.12.



Gambar 5.10. Analisis pohon filogeni kekerabatan isolat *Bacillus* sp. BK 7.2.



Gambar 5.11. Analisis pohon filogeni kekerabatan isolat *Bacillus* sp. BK 5.2



Gambar 5.12. Analisis pohon filogeni kekerabatan isolat *Bacillus* sp. S9.1

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Nilai LC₅₀ isolat terpilih *Bacillus* sp. pada masa pendedahan 24 dan 48 jam berturut-turut dengan toksisitas tinggi ke rendah, masing-masing adalah :
 - a. isolat S9.1 memiliki nilai LC_{50-24jam} adalah $3,63 \times 10^7 \pm 1,87 \times 10^6$ sel/mL dan LC_{50-48jam} adalah $2,86 \times 10^7 \pm 2,02 \times 10^6$ sel/mL.
 - b. isolat G6.4 memiliki nilai LC_{50-24jam} adalah $8,99 \times 10^7 \pm 1,01 \times 10^7$ sel/mL dan LC_{50-48jam} adalah $8,43 \times 10^7 \pm 1,01 \times 10^7$ sel/mL, dan
 - c. isolat BK5.2 memiliki nilai LC_{50-24jam} adalah $1,16 \times 10^8 \pm 1,11 \times 10^7$ sel/mL dan LC_{50-48jam} adalah $8,26 \times 10^7 \pm 7,62 \times 10^6$ sel/mL
2. Nilai LT₅₀ isolat terpilih *Bacillus* sp. pada masa pengamatan per-waktu yang ditentukan selama 24 jam adalah :
 - a. isolat S9.1 memiliki nilai LT₅₀ = $9,1 \pm 0,5$ jam,
 - b. isolat G6.4 memiliki nilai LT₅₀ = $11,9 \pm 1,1$ jam, dan
 - c. isolat BK5.2 memiliki nilai LT₅₀ = $19 \pm 1,1$ jam.
3. Hasil analisis menggunakan 16S rRNA, isolat terpilih *Bacillus* sp. S9.1 menunjukkan kesamaan dan kekerabatannya dengan *Bacillus subtilis*, isolat *Bacillus* sp. BK7.2 menunjukkan kesamaan dan kekerabatannya dengan *Bacillus subtilis*, sedangkan isolat *Bacillus* sp. BK5.2 menunjukkan kesamaan dan kekerabatannya dengan *Bacillus thuringiensis*.

6.2. Saran

Berdasarkan nilai LC₅₀, LT₅₀, dan analisis 16S rRNA, isolat *Bacillus* sp. BK5.2 adalah *Bacillus thuringiensis* yang berpotensi tinggi sebagai agen pengendali hayati larva nyamuk *Ae. aegypti*, sehingga perlu diteliti lebih lanjut mengenai :

1. Optimalisasi dan pengembangan formula.
2. Tingkat keamanan terhadap berbagai jenis organisme air non-target.
3. Toksisitas residual di tempat perindukan nyamuk *Ae. aegypti* vektor DBD.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberghini, Sara. Filippini, Rachele. Marchetti, Elisa. Dindo, Maria Luisa. Shelvelev, Alexi B. Battisti, Andrea. Squartini, Andrea. 2005. *Construction of a Pseudomonas sp. derivate carrying the cry9Aa gene from Bacillus thuringiensis and a proposal for new standard criteria to assess entomocidal properties of bacteria*. *Research in Microbiology*. 156 (2005) 690–699
- Ammounh, H., M. Harba, E. Idris, H. Makee, 2011. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests. *Turk. J. Agric. For.* 35 (2011) 421-431
- Bahagiawati, 2002. Penggunaan *Bacillus thuringiensis* sebagai Bioinsektisida. *Buletin AgroBio*. 5(1) : 21-28
- Balaraman ,R.E., J.S. Pillai, 1990. *Review of Biological Control Research at Vector Control Research Centre, Pondicherry*. Indian Council of Medical Research, New Delhi.
- Blasberg, M., H. Goos, and V. Hackenbroch, 2016. *Aedes aegypti* Mosquito, *Fighting the Most Dangerous Animal in the World*. WHO Spiegel Online.
- Blondine, Ch.P., 2013. Efikasi *Bacillus Thuringiensis* 2 Isolat Serotipe H-10 Galur Lokal terhadap Jentik Nyamuk *Ae. aegypti* dan *Anopheles Aconitus*. *Jurnal Vektora* 5(1): 28-33
- Boyce, R., A. Lenhart, A. Kroeger, R. Velayudhan, B. Roberts and O. Horstick, 2013. *B. thuringiensis israelensis* for the Control of Dengue Vectors: Systematic Literature Review, *Trop. Med. and Int. Health* 18(5) : 564–577
- Candra, Aryu, 2010. Demam Berdarah Dengue: Epidemiologi, Patogenesis, dan Faktor Risiko Penularan. *Aspirator* 2(2) : 110 –119
- El-kersh, T.A., Ashraf M. Ahmed, Yazeed A. Al-sheikh, Frédéric Tripet, Mohamed A. Ibrahim and Ali A. M. Metwalli, 2016. Isolation and Characterization of Native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced Larvicidal Toxicity against the Mosquito Vector *Anopheles gambiae*. *Parasites & Vectors* 9: 1-14
- Goldberg, L.J. and J.Margalit, 1977. A Bacterial spore Demonstrating Rapid Larvicidal Activity Against *Anophels sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Ae. aegypti*, and *Culex pipiens*. *Mosq. News* 37 (3): 355-358
- Halstead, S.B., 1990. Global Epidemiology of Dengue Haemorrhagic Fever. *Shouteast Asian J. Trop. Med. Public Health* 21(4): 636-641
- Ibrahim, M.A., N. Griko, M. Junker and L.A. Bulla, 2010. *Bacillus thuringiensis*, A Genomics and Proteomics Perspective, *Bioengineered Bug* 1(1) :31-50
- Kemenkes RI, 2016. Situasi DBD di Indonesia. *Pusat Data dan Informasi Kesehatan RI*, Ditjen Pencegahan dan Penularan Penyakit, Kementerian Kesehatan RI, Jakarta, Indonesia.

- Lee, H.L and P. Seleena, 1990. Preliminary Field Evaluation of a Malaysian Isolate of *Bacillus thuringiensis* Serotype H-14 against *Culex pseudovishnui*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub Heal.* 21(1): 143-144
- Mardihusodo, S.J., 1991. Sensitivitas Larva Nyamuk *Aedes aegypti* terhadap *Bacillus thuringiensis* H-14 dan *Bacillus sphaericus* 1593. *B. Kesehat. Masy.* 7(1): 44-49
- Mardihusodo, S.J., Mardhiyah, C.A. Baidlowi, 1979. Kemampuan Menetas Telur *Aedes aegypti*. Lembaga Penelitian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Mardihusodo, S.J., M.A. Romas, J. Situmorang, dan M.M.I. Hajar, 1991. Isolasi dan Karakterisasi Basili Pembentuk Spora yang Patogenik terhadap Larva Nyamuk di Jawa. *B.I. Ked.* 23(2): 41-50
- Muharsini, S., April H. Wardhana, H. Rijzaani² dan B. Amirhusein. 2003. Karakterisasi Isolat *Bacillus thuringiensis* dari Beberapa Daerah di Jawa dan Sulawesi Selatan untuk Kontrol Biologi Lalat Myasis *Chrysomya bezziana*. *JITV* 8(4) :256-263
- Nurjana, M.A. dan A. Kurniawan, 2017. Preferensi *Aedes aegypti* Meletakkan Telur pada berbagai Warna Ovitrap di Laboratorium. *BALABA* 13(1) : 37-42
- Paul, A, 2007. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Academic Press, Elsevier Inc. Burlington, USA
- Pratiwi, E.K., S. Samino, Z. Penata Gama, N. Nakagoshi, 2013. Uji Toksisitas *Bacillus thuringiensis* Asal Kota Nganjuk Terhadap Larva *Ae. aegypti*. *Jurnal Biotropika* 1(4) : 171-176
- Promega protocol. 2018. *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*. Technical Manual.
- Rahayu, D.F. dan A. Ustiawan, 2013. Identifikasi *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. *BALABA* 9(1) : 7-10
- Salamun, S.J. Mardihusodo, M.A. Romas, 1994. Recidual toxicity of *Bacillus thuringiensis* H-14 (VCRC B-17) in Some Types of Breeding Places of *Aedes aegypti*. *Bulletin of Health Studies* 22(2): 63-66
- Salamun, 1995. Studi Komparatif Efek Residu *Bacillus thuringiensis* H-14 dan *Bacillus sphaericus* terhadap Larva *Ae. aegypti* L. pada beberapa Tipe Tempat Penampung Air. *Buletin Penelitian Kesehatan* 23(4): 19-22
- Salamun, 1996. Toksisitas *B. sphaericus* H-5a5b (VCRC B-42) terhadap Larva *Culex quinquefasciatus*. *Berkala Penelitian Hayati*, 2(2)
- Salamun, 1998. Sensitivitas Larva *Aedes aegypti* L. terhadap *Bacillus thuringiensis* H-14 dan *Bacillus sphaericus* H-5a5b. *Majalah Kedok. Tropis Indonesia* 9(1-2): 19-24
- Salamun, 2000. Masa Residu Efektif *Bacillus thuringiensis* H-14 dan *Bacillus sphaericus* H-5a5b serta Kombinasinya di Tempat Perindukan *Culex quinquefasciatus*, *Jurnal MIPA* 5(3)
- Salamun, 2000. Persistensi Toksisitas Bioinsektisida *Spherefix TM* pada beberapa Tipe Tempat Perindukan Nyamuk *Aedes aegypti* L., *Berkala Penelitian Hayati* 6(1).
- Salamun, 2004. Eksplorasi Bakteri Lokal yang Berpotensi sebagai Agensia Hayati terhadap Larva Nyamuk Vektor, *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia* 15(2)

- Salamun, Fatimah, T. Nurhariyati, A. Supriyanto, 2018. PENGEMBANGAN PRODUK BIOINSEKTISIDA : Isolasi dan Karakterisasi Fenetik Entomopatogen Lokal *Bacillus* sp. serta Uji Potensinya sebagai Biolarvasida Vektor Demam Berdarah Dengue. *Laporan Akhir Penelitian Unggulan Fakultas*. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Senfi F, Safaralizadeh MH, Safavi SA, dan Aramideh S, 2012. Isolation and Characterization of Native *Bacillus thuringiensis* Strains from Apple Prchads at Urma, Iran and their Toxicity to Lepidoptera Pests, *Ephestia kuehniella* Zeller and *Pieris brassicae* L. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 22(1): 33-37
- Shiddiqi, M. Hero. 2011. Eksplorasi Protein Toksin *Bacillus thuringiensis* dari Tanah di Kabupaten Tangerang. Skripsi. Jakarta: Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah
- Soares, A.A., 2016. Promising New Tools to Fight Aedes Mosquitoes. *WHO Buletin*, Vol. 94/8/16.
- Sukowati, S., 2010. Masalah Vektor Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Pengendaliannya di Indonesia. *Buletin Jendela Epidemiologi* 2 : 26-30
- Sumarmo, 1987. Dengue Haemorrhagic Fever in Indonesia. *Shouteast Asian J. Trop. Med. Public Health* 18(3): 269-274
- Suryadi, B.F., B. Yanuwidi, T. Ardyati, Suharjono, 2016. Evaluation of Entomopathogenic *B. sphaericus* Isolated from Lombok Beach Area against Mosquito Larvae. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6(2): 148–154
- Thomas, M.B., 2018. Biological Control of Human Disease Vectors : a Perspective on Challenges and Opportunities. *BioControl*. 63:61-69
- WHO, 1979. *Data Sheet on the Biological Control Agent, Bacillus thuringiensis* sertype H-14 (de Barjag 1978). World Health Organization, Jeneva.
- WHO, 1980. *Data Sheet on the Biological Control Agent, Bacillus sphaericus* strain 1593. World Health Organization, Jeneva.
- Yotopranoto, S., S. Subekti, Rosmanida, Salamun, 1998. Analisis Dinamika Populasi Vector pada Lokasi dengan Kasus Demam Berdarah Dengue yang Tinggi di Kotamadya Surabaya, *Maj. Kedok. Tropis Indonesia* 9(1-2): 25-31
- Yotopranoto, S., Kusmartisnawati, K.C. Mulyatno, and H. Arwati, 2010. The Fluctuation of *Aedes aegypti* in Endemic Area of Dengue Hemorrhagic Fever in Surabaya City, Indonesia. *Ind. Jurnal Trop. Infec. Dis.* 1(2) : 60-64