



DISERTASI

**PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN TOKSIN BAKTERI SIMBION
PHOTORHABDUS LUMINESCENS ISOLAT INDONESIA YANG
BERSIFAT ENTOMOPATOGENIK TERHADAP
LARVA NYAMUK *AEDES AEGYPTI*
(SUATU ALTERNATIF BIOINSEKTISIDA BARU)
PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**



DWI WAHYUNI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

**PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN TOKSIN BAKTERI SIMBION
PHOTORHABDUS LUMINESCENS ISOLAT INDONESIA YANG
BERSIFAT ENTOMOPATOGENIK TERHADAP
LARVA NYAMUK *Aedes aegypti*
(SUATU ALTERNATIF BIOINSEKTISIDA BARU)
PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Selasa
Tanggal : 4 Maret 2003
Pukul 10.00 WIB**

Oleh :

**DWI WAHYUNI
NIM. 099813121 D**

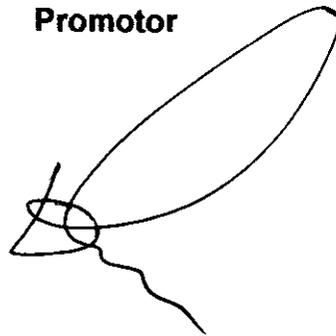
Lembar Persetujuan

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI

TANGGAL : Agustus, 2003

Oleh

Promotor



Prof. H. Soedarto, DTMH, Ph.D., Dokter

Nip : 130 350 713

Ko- Promotor I



Prof. I.G.B. Amitaba, drh

Ko- Promotor II



Dr. Eddy Bagus Wasito, dr,MS,DSMK



Telah diuji pada ujian tahap 1

Tanggal 4 Maret 2003

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. H. Sarmanu, drh. M.S

Anggota : 1. Prof. H. Soedarto, dr., DTM&H. PhD
2. Prof. IGB.Amitaba, drh.
3. Dr. Eddy Bagus Wasito, dr. M.S
4. Prof. Soebaktiningsih, DTM&H. M.Sc. dr
5. Dr. Didik Sulistyanto, Ir.Agr.

Ditetapkan dengan surat keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 853/JO3/PP/2003
Tanggal : 04 Februari 2003

UCAPAN TERIMA KASIH

Rasa syukur dan harapan ridho semata- mata hanya penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena sesungguhnya hanya dengan limpahan rahmat dan karunia Allah Yang Maha Pengasih, maka serangkaian penelitian dan penulisan disertasi ini dapat penulis selesaikan.

Tapak demi tapak yang penulis lalui dalam beberapa warsa menjalani pendidikan dan penelitian menuju proses pematangan dan pendewasaan diri dalam menuangkan kreasi, inovasi dan daya sintesis yang solid untuk sebuah karya ilmiah, akhirnya memasuki gerbang keberhasilan. Kelelahan yang panjang kini berganti dengan siraman kebahagiaan yang mengiringi tuntasnya sebuah karya mulia untuk mengawali kehidupan selanjutnya.

Sesederhana ataupun sesempurna apapun sebuah karya, tidak akan membuahkan hasil yang optimal tanpa tuntunan dan peran para pembimbing secara terpadu dan sumbangsih dari berbagai pihak, oleh karena itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak atas bantuan yang telah diberikannya.

Penulis tidak sanggup menyebutkan nama- nama pribadi satu demi satu, namun demikian penulis perlu menyebutkan beberapa nama secara khusus atas perannya yang khusus pula dalam penyusunan disertasi ini. Ucapan terima kasih yang tak terhingga dihaturkan kepada :

Prof. H. Soedarto, dr, DTM&H, PhD. Sebagai promotor telah menghantarkan penulis melewati jenjang pendidikan tertinggi, dalam kesibukan beliau yang sangat padat, berkenan meluangkan waktu untuk membimbing, memberi petunjuk dan dorongan moral, menumbuhkan rasa percaya diri dan semangat yang tidak henti- hentinya atas ilmu pengetahuan yang penulis tekuni. Dari beliau juga penulis memperoleh berbagai literatur yang berkaitan dengan penelitian.

Prof. I.G.B Amitaba, drh. Selaku ko- promotor I, tanpa pernah bosan mengingatkan, memotivasi dan memberi asupan keilmuan sejak penulis menapakkan diri studi S-2 di Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga sampai saat ini. Beliau juga yang menjadi pembimbing utama dalam penyusunan Tesis dan sekaligus memberi rekomendasi penulis untuk melanjutkan studi kejenjang S-3. Jasa beliau sangat besar dalam keberhasilan penulis menjalani pendidikan ini.

Dr. Eddy Bagus Wasito, dr. MS. SpMK. Selaku ko- promotor II, memberikan wacana dan wawasan berpikir secara runtut dan rasional dalam mengerjakan penelitian. Ditengah kesibukannya yang padat, beliau masih sempat membimbing, mengarahkan, mendampingi dan memberi petunjuk pelaksanaan penelitian sejak penulis masih di jenjang S-2 sampai selesainya disertasi ini. Penulis tidak sanggup melupakan jasa besar beliau yang berkenan secara langsung ikut mengamati hasil- hasil penelitian ini, terutama pada saat identifikasi dan karakterisasi bakteri, walaupun sampai larut malam. Beliau juga memberi wawasan keilmuan bagaimana seharusnya seorang ilmuwan bersikap dan mengamalkan ilmunya sesuai dengan tanggung jawabnya kepada Allah SWT.

Rangkaian proses keberhasilan dan kesempatan menimba ilmu secara berkelanjutan tidak lepas dari peran berbagai pihak yang terkait. Dengan rasa tulus dan penuh keikhlasan disampaikan rasa hormat dan terima kasih yang setinggi- tingginya kepada :

Pemerintah Republik Indonesia melalui **Departemen Pendidikan Nasional** yang memberi kesempatan dan bantuan dana beasiswa TMPD untuk kelangsungan pendidikan program Doktor pada Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. Med. H. Puruhito, dr. Sp.B, selaku rektor Universitas Airlangga dan **Prof. H. Soedarto, dr. DTM&H. Ph.D.,** mantan Rektor

Universitas Airlangga yang telah mengizinkan penulis mengikuti pendidikan program Doktor di Universitas Airlangga.

Prof. Dr. H. Muhammad Amien, dr. Sp.P. Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan **Prof. Dr. H. Soedijono Tirtowidardjo, dr. SpTHT.** mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga beserta seluruh pimpinan Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang memberikan kesempatan menimba ilmu dan bersosialisasi di Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Selain itu kelancaran proses pengurusan administrasi selama mengikuti pendidikan program doktor tidak lepas dari peran seluruh staf administrasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Juliati Hood Alsagaff, dr. MS. SpPA, FIAC. Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Atas segala perhatian dan dukungannya dalam membantu memperlancar proses akademik selama mengikuti pendidikan program Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Soebaktiningsih, dr, DTM&H. M.Sc. Selaku konsultan di bidang Parasitologi Kedokteran, tanpa pernah bosan mengingatkan, memotivasi dan dengan kesabarannya beliau senantiasa memberikan masukan- masukan yang sangat berarti dalam substansi keilmuan, sehingga memberikan nilai tambah dalam serangkaian proses penyusunan disertasi ini. Sungguh suatu kewajaran apabila penulis menyampaikan terima kasih yang tulus kepada beliau.

Dr. Didik Sulistyanto, Ir. Agr. Selaku konsultan di bidang Biologi kontrol. Dengan kearifannya memberikan asupan keilmuan, terutama yang berkaitan dengan pengetahuan tentang nematoda entomopatogen. Dari beliau pulalah bakteri *Photorhabdus* yang digunakan dalam penelitian ini penulis dapatkan. Dengan segala kerendahan dan ketulusan hati penulis

menyampaikan terima kasih yang tak terhingga atas bantuan moril dan materiil yang relatif tidak sedikit jumlahnya.

Prof. Dr. H. Sarmanu, drh. MS. Selaku konsultan di bidang Statistik, di sela-sela kesibukannya, menyempatkan diri untuk memberikan masukan-masukan, arahan dan wacana berpikir secara runtut. Dengan segala kesabarannya membantu memperlancar penyelesaian pendidikan sejak penulis menempuh jenjang S-2 sampai penulis melanjutkan pendidikan di Program Doktor ini.

Prof. Dr. Hj. Sri Subekti, drh. DEA. Beliau bersama dengan Prof. I.G.B.Amitaba, drh, adalah pembimbing dalam penyusunan Tesis S2 dan sekaligus pemberi rekomendasi untuk melanjutkan studi kejenjang S3 ini. Beliau juga adalah orang pertama yang memberi wawasan dan membangkitkan semangat disaat penulis terbentur dengan masalah – masalah yang berkaitan dengan hasil penelitian pendahuluan. Peran beliau sebagai pembimbing, sahabat dan motivator menjadikan penulis berada di jenjang keberhasilan yang diraih saat ini.

Selanjutnya, ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada :

Prof. Dr. Kabul Santoso, MS. Rektor Universitas Jember beserta seluruh pembantu Rektor Universitas Jember sebagai instansi induk yang memberikan dukungan moril dan materiil serta kesempatan untuk meninggalkan tugas selama masa pendidikan program Doktor di Universitas Airlangga.

Prof. Ida Bagus Alit Ana, SH. Guru besar di Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember. Banyak memberi masukan seputar kemajuan pendidikan dalam kaitannya dengan aplikasi hasil penelitian penulis terutama untuk kemajuan anak didik. Dengan kearifannya selalu memotivasi dan menumbuhkan semangat dikala penulis mengalami benturan-benturan psikologis dan penurunan semangat belajar.

Drs. Dwi Suparno, M.Hum. Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember beserta seluruh pembantu dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember, atas segala dukungan, perhatian dan bantuan baik moril maupun materiil serta membebaskan penulis dari segala tugas rutin di Fakultas Keguruan dan ilmu pendidikan Universitas Jember.

Teman-teman sejawat di jurusan pendidikan MIPA Fakultas keguruan dan Ilmu Pendidikan tanpa terkecuali, terutama para sejawat di **program Pendidikan Biologi** Universitas Jember yang senantiasa memotivasi penulis untuk segera menyelesaikan pendidikan program Doktor ini serta selalu memberikan informasi- informasi baru seputar perkembangan yang terjadi di Jurusan Pendidikan MIPA Universitas Jember. Tanpa dukungan dan keakraban serta masukan – masukan yang menjadi nilai tambah dalam rangkaian penelitian, pastilah penulis tidak berada pada jenjang keberhasilan yang pada saat ini sudah diraih.

Ucapan terima kasih yang setinggi-tingginya disampaikan kepada pimpinan- pimpinan lembaga yang turut mendukung kelancaran pelaksanaan penelitian ini dan pihak- pihak yang terkait, antara lain kepada :

Prof. Dr. Yoes Priyatna Dachlan, dr. M.Sc. Ketua Pusat Penelitian Penyakit Tropis (TDC) Universitas Airlangga, yang telah memberikan ijin dan kemudahan dalam menggunakan alat- alat dan fasilitas di Laboratorium TDC Universitas Airlangga serta bantuan moril maupun materiil yang jumlahnya relatif tidak sedikit.

Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Sc. Kepala pusat penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember, yang telah mengijinkan dilakukannya purifikasi dan karakterisasi protein bakteri *Photorhabdus* yang digunakan dalam penelitian ini. Bantuan moril dan materiil serta penggunaan alat- alat dan fasilitas yang digunakan dalam penelitian ini merupakan dukungan yang tidak ternilai.

Subagyo Yotopranoto, dr. DAPE, Rusmanida, Dra. M.Kes, dan Kris cahyo Mulyatno, yang telah banyak membantu penulis dalam melakukan kolonisasi larva nyamuk *Aedes aegypti* mulai penangkapan larva di Kecamatan Sawahan sampai pelaksanaan uji toksisitas, termasuk pustaka – pustaka yang berhubungan dengan penelitian penulis .

Miswar, Ir. M.Si. sekretaris lembaga pusat penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember. Peranannya sangat besar dalam melakukan purifikasi, dan karakterisasi protein bakteri *Photorhabdus*, walaupun harus mengamati sampai larut malam, bahkan sampai pagi, terkadang harus mengulang berkali-kali. Tidak cukup dengan kata untuk menyampaikan rasa terima kasih. Semoga Allah SWT membalasnya dengan pahala yang berlipat ganda.

Suharto, Drs. M. Kes. secara khusus berperan dalam analisis data, **Supriyanto, Drs. M.Si**, yang berkenan mencarikan berbagai literatur dan pustaka- pustaka lain guna melengkapi wawasan penulis tentang uji toksisitas terhadap hewan Vertebrata, juga kepada **Imam Mudakir, Ir, M.Si** yang telah meminjamkan berbagai alat yang digunakan dalam pengujian toksisitas untuk hewan Vertebrata, yang kesemuanya sangat membantu mempercepat penyelesaian penyusunan disertasi ini.

Dr. Indrayana, dr, Sp PK (K), Dr. Kuntaman dan Rahmi, dr, M.Si. Beliau bertiga yang telah memberi reagensia yang penulis butuhkan secara suka rela serta rela meminjamkan berbagai alat dan ruangan pada saat penulis melakukan uji pendahuluan

Tamzis dan yanto, yang telah membantu mempersiapkan alat- alat dan bahan – bahan yang penulis butuhkan serta membersihkan dan mengatur kembali semua alat yang dipakai. Bantuan yang mereka berikan sangat meringankan pekerjaan penulis. Tamzis juga membantu dalam hal pengambilan sebagian gambar- gambar hasil penelitian.

Mohammad Nur Rais, SP. MM. Sangat berjasa dalam penulisan disertasi ini, mengatasi semua masalah yang berkaitan dengan Komputer,

DAFTAR ISI**Halaman**

SAMPUL DEPAN.....	I
SAMPUL DALAM.....	ii
PERSYARATAN GELAR.....	iii
PERSETUJUAN.....	iv
PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
RINGKASAN.....	xii
ABSTRAK.....	xvi
DAFTAR ISI.....	xvii
DAFTAR TABEL.....	xxii
DAFTAR GAMBAR.....	xxv
DAFTAR LAMPIRAN	
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan	8
1.3.1 Tujuan Umum.....	8
1.3.2 Tujuan khusus.....	8
1.4. Manfaat.....	9

1.4.1 Manfaat akademik.....	9
1.4.2. Manfaat teoritik/terapan.....	10
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1 Biologi Dasar NEP-Bakteri Simbion	11
2.2 Eksotoksin NEP	13
2.3 Bakteri <i>Photorhabdus</i>	13
2.3.1 Biologi dasar bakteri <i>Photorhabdus</i>	13
2.3.2 Taksonomi bakteri <i>Photorhabdus</i>	14
2.3.3 Karakterisasi bentuk primer dan sekunder	16
2.3.4 Toksin bakteri <i>Photorhabdus</i>	17
2.3.5 Skema kerja toksin Biolarvasida.....	18
2.3.6 Toksin bakteri <i>Photorhabdus</i> alternatif pengganti B. t	19
2.4 Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	21
2.4.1 Klasifikasi nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	21
2.4.2 Cara hidup nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	21
2.4.3 Sifat nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	22
2.4.4 Pertumbuhan dan perkembangan.....	22
2.5 Pengendalian serangga sebagai vektor penyakit.....	27
2.5.1 Pengendalian kimiawi	27
2.5.2 Pengendalian Genetik	28
2.5.3 Pengendalian Lingkungan	28
2.5.4 Pengendalian Hayati (Biologi)	28

2.6 Uji laboratorium.....	29
2.6.1 Identifikasi bakteri simbion	29
2.6.2 Elektroforesis	31
2.6.3 Metoda Bradford.....	32
2.6.4 Purifikasi Protein Toksin	33
2.6.5 Pengujian toksisitas.....	34
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	35
3.1 Kerangka konseptual	37
3.2 Hipotesis penelitian.....	39
BAB IV METODE PENELITIAN	41
4.1 Rancangan penelitian.....	41
4.2 Populasi , sampel dan besar sampel.....	42
4.3 Definisi operasional variabel.....	43
4.4 Waktu dan Tempat penelitian.....	45
4.5 Cara penelitian.....	46
4.5.1 Kolonisasi larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	46
4.5.2 Karakterisasi biakan murni.....	47
4.5.3 Karakterisasi morfologi dan biokimia	48
4.5.4 Pembiakan bakteri	54
4.5.5 Pembuatan supernatan.....	54
4.5.6 Karakterisasi supernatan.....	55

4.5.7 Purifikasi.....	60
4.5.8 Pengujian toksisitas Protein toksin.....	68
4.6 Analisis data.....	70
4.6.1 Variabel bebas.....	70
4.6.2 Variabel tergantung.....	70
4.6.3 Variabel kendali.....	71
4.6.4 Uji statistik.....	71
4.7 Kerangka operasional.....	72
BAB V HASIL PENELITIAN	73
5.1 Karakterisasi bakteri <i>Photorhabdus luminescens</i> Ist. Ind ..	73
5.1.1 Karakterisasi biakan murni.....	73
5.1.2 Karakterisasi morfologi.....	74
5.1.3 Karakterisasi Biokimia.....	75
5.2 Kolonisasi larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	78
5.2.1 Kondisi lingkungan laboratorium.....	79
5.2.2 Koleksi telur	80
5.2.3 Pemeliharaan larva	81
5.2.4 Pemeliharaan pupa	82
5.4 Pembuatan Supernatan	83
5.5 Karakterisasi supernatan	83
5.6 Pengujian toksisitas supernatan.....	85

5.6.1 Pengujian pendahuluan	86
5.6.2 Pengujian akhir	87
5.7 Purifikasi.....	92
5.8 Pengujian toksisitas protein toksin.....	93
5.8.1 Pengujian pendahuluan	97
5.8.2 Pengujian akhir	98
5.9 Karakterisasi protein toksin.....	103
5.9.1 SDS- PAGE	103
5.9.2 Pengukuran konsentrasi protein toksin	104
BAB VI PEMBAHASAN.....	105
6.1 Karakterisasi biakan murni	105
6.2 Karakterisasi morfologi dan biokimia	106
6.2.1 Karakter Morfologi	107
6.2.2 Karakter Biokimia	108
6.3 Kolonisasi larva nyamuk... <i>Aedes aegypti</i>	111
6.3.1 Hasil kolonisasi	112
6.3.2 Kondisi lingkungan laboratorium.....	114
6.4 Pembuatan supernatan.....	116
6.5 Pengujian toksisitas supernatan.....	117
6.6 Karakterisasi supernatan.....	120
6.6.1 Sifat Labilitas Terhadap Panas	120

6.6.2 Pengukuran Konsentrasi Protein Supernatan	120
6.6.3 Analisis secara NATIVE-PAGE Supernatn.....	121
6.6.4 Analisis Aktivitas Enzim Proteolitik Supernatan	122
6.7 Purifikasi protein toksin	124
6.8 Pengujian toksisitas protein toksin.....	126
6.9 Perbedaan toksisitas supernatan dengan toksisitas protein toksin.....	129
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	132
7.1 Kesimpulan.....	132
7.2 Saran.....	134
AFTAR PUSTAKA.....	135
LAMPIRAN.....	144

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1	Spesies bakteri simbion yang bersimbiosis dengan NEP 15
2.2	Perbedaan morfologi pada tiga bagian tubuh nyamuk <i>Aedes aegypti</i> dewasa jantan dan betina..... 25
4.1	Standar protein BSA dengan konsentrasi yang bervariasi..... 57
4.2	Bahan/komposisi gel akrilamide untuk Native-PAGE..... 58
4.3	Bahan/komposisi gel yang mengandung substart enzim proteolitik(1% gelatin) untuk analisis zimogram..... 58
5.1	Hasil pengamatan karakterisasi morfologi..... 75
5.2	Hasil pengamatan karakterisasi biokimia..... 75
5.3	Kondisi suhu ruang dan kelembaban nisbi ruang..... 79
5.4	Hasil pengukuran konsentrasi supernatan dengan standar BSA..... 84
5.5	Hasil pengujian pendahuluan Toksisitas supernatan bakteri <i>Photorhabdus</i> isolat lokal terhadap larva instar IV nyamuk <i>Ae.</i> <i>Aegypti</i> , jumlah larva 10 ekor, lama pendedahan 24 & 48 jam, Temperatur 27 ^o C dan kelembabap 80 %..... 86
5.6	Replika 1. Hasil pengujian akhir jumlah (%) kematian larv nyamuk aji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dari supernatan bakteri <i>Photorhabdus</i> 87
5.7	Replika 2. Hasil pengujian akhir, jumlah (%) kematian larva nyamuk uji dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dari supernatan bakteri <i>Photorhabdus</i> dalam kondisi kamar, temperatur 27 ^o C dan kelembaban 80%..... 88

5.8	Replika 3. Hasil pengujian akhir, jumlah kematian (%) larva uji dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa dedah 24 jam & 48 jam dari supernatan bakteri <i>Photorhabdus</i> dalam kondiskamarempertatur 27°C dan kelembaban 80%.....	89
5.9	Rata-rata jumlah (%) kematian larva uji pada R1, R2, R3 hasil pengujian akhir toksisitas supernatan dari berbagai seri pengenceran dengan jumlah larva uji tiap-tiap replika 10 ekor dengan masa dedah 24 jam. Dilakukan dalam kondisi kamar, temperatur 27° C dan kelembabap 80 %.....	90
5.10	Rata-rata jumlah (%) dari R1, R2, R3 hasil pengujian akhir toksisitas supernatan dari berbagai serial pengenceran dengan jumlah larva uji tiap-tiap replika 10 ekor, dengan masa dedah 48 jam. Dilakukan pada suhu kamar, temperatur 27 C dan kelembaban 80%.....	91
5.11	Hasil fraksinasi dan pengukuran konsentrasi protein suoernatan bakteri <i>Photorhabdus</i>	92
5.12	Hasil pengujian toksisitas fraksi-fraksi protein bakteri <i>Photorhabdus</i> isolat lokal terhadap larva instar IV nyamuk <i>Aedes aegypti</i> . Jumlah larva uji 10 ekor, masa pendedahan 24 dan 48 jam.	94
5.13	Hasil pengujian pendahuluan toksisitas protein toksin (fraksi No : 33) terhadap larva nyamuk <i>Aedes aegypti</i> . Jumlah kematian larva uji (%) dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam & 48 jam dalam kondisi kamar, temperatur 27 C dan kelembaban 80 %.....	97
5.14	Replika 1. Hasil pengujian akhir Toksisitas protein toksin (fraksi No :33). Jumlah (%) kematian larva nyamuk uji dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dalam kondisi kamar, temperatur 27 C dan kelembaban 80 %.....	98
5.15	Replika 2. Hasil pengujian akhir toksisitas protein toksin (fraksi No : 33). Jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dalam kondisi kamar, temperatur 27 C dan kelembaban 80%.....	99

5.16	Replika 3. Hasil pengujian akhir toksisitas protein toksin (fraksi No :33). Jumlah (%) kematian larva uji dengan jumlah larva uji 10 ekor, masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dalam kondisi kamar, temperatur 27 C dan kelembaban 80 %.....	100
5.17	Rata-rata jumlah (%) kematian larva uji pada R1,R2,R3 hasil pengujian akhir toksisitas protein toksin(fraksi No :33) dari berbagai seri pengenceran dengan jumlah larva uji tiap-tiap replika 10 ekor dengan masa dedah 24 jam Dilakukan dalam kondisi kamae, temperatur 27 C dan kelembaban 80 %.....	101
5.18	Rata-rata jumlah (%) kematian larva uji pada R1,R2,R3 hasil pengujian akhir toksisitas protein toksin (Frase No:33) dari berbagai seri pengenceran dengan jumlah larva uji tiap-tiap replika10 ekor dengan masa dedah 48 Jam. Dilakukan pada kondisi ruangan, temperatur 27 C dan kelembaban 80%.....	102
5.19	Hasil pengukuran konsentrasi protein toksin dengan standart BSA.	104

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Daur hidup nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	26
4.1 Metode blotting untuk analisis aktivitas enzim proteolitik supernatan menggunakan gelatin sebagai substrat.....	59
5.1 Biakan murni bakteri <i>Photobacterium</i> dalam nutrient Broth cultur	73
5.2 Adsorpsi Bromothymol biru dalam NBTA, coloni bakteri <i>Photobacterium</i> berwarna hijau / <i>Greenish</i>	74
5.3 Hasil uji bioluminescen bakteri <i>Photobacterium</i> pada serangga <i>Galleria mellonella</i>	76
5.4 Hasil uji motilitas bakteri <i>Photobacterium luminescens</i> isolat Indonesia.....	77
5.5 Hasil pengujian Indol bakteri <i>Photobacterium luminescens</i> Isolat indonesia.....	77
5.6 Hasil uji Katalase bakteri <i>Photobacterium luminescens</i> isolat Indonesia.....	78
5.7 Hasil pewarnaan Gram bakteri <i>Photobacterium luminescens</i> Isolat Indonesia.....	78
5.8 Hasil pengamatan telur nyamuk <i>Aedes aegypti</i> secara makroskopik warna hitam	80

5.9 Hasil pengamatan telur nyamuk <i>Aedes aegypti</i> secara	
Mikroskopik.....	80
5.10 Hasil pemotretan larva instar IV nyamuk <i>Aedes aegypti</i> dibawah	
Mikroskop fase kontras dengan pembesaran 40X.....	81
5.11 Hasil pemotretan pupa nyamuk <i>Aedes aegypti</i> dibawah mikroskop	
Fase kontras dengan pembesaran 40X.....	82
5.12 Hasil pembuatan supernatan bakteri <i>Photorhabdus luminescens</i>	
isolat Indonesia yang dipisahkan dari peletnya	83
5.13 Hasil elektroforesis secara Native-PAGE.....	84
5.14 Hasil uji enzim Proteolitik supernatan dengan Zymo Gram.....	85
5.15 Hasil pengukuran konsentrasi protein hasil fraksinasi supernatan	
bakteri <i>Photorhabdus luminescens</i>	93
5.16 Pita-pita protein hasil elektroforesis yang telah diwarnai dengan	
pewarna silver.....	103

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Probit Analysis	144
Lampiran 2. Probit Transformed Responses (supernatan)	147
Lampiran 3 . Probit Transformed Responses (protein toksin)	148
Lampiran 4. Tahap – Tahap Penelitian	149
4.1. Tahap Karakterisasi bakteri	149
4.2. Pembuatan Biakan cair	150
4.3. Pembuatan Supernatan	150
4.4. Tahap kolonisasi larva uji	151
4.5. Pengujian Toksisitas Supernatan	152
4.6. Uji Zymo Gram	153
4.7. Purifikasi	153
4.8. Proses SDS- PAGE	154
4.9. Pengujian toksin protein	154
Lampiran 5. Hasil perhitungan besarnya konsentrasi Protein	155

xxx

BAB I

BAB I

PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Penggunaan insektisida kimia dalam pengendalian serangga baik di bidang pertanian maupun di bidang kesehatan dapat dikatakan lebih mudah dan memberikan hasil yang memuaskan dalam waktu yang singkat, sehingga bahan toksik ini digunakan secara luas oleh masyarakat dan sering tanpa perhitungan serta koordinasi yang baik (Grewal, dkk, 1994). Tanpa disadari penggunaan insektisida kimia dewasa ini telah menimbulkan dampak negatif yang sangat merugikan bagi masyarakat (Sumarmo, dkk, 1994).

Dampak negatif pemakaian insektisida kimia antara lain adalah terjadinya perubahan perilaku serangga vektor dan peningkatan toleransi serta terjadi kekebalan serangga terhadap insektisida terpakai (*resistensi*), ledakan serangga hama sekunder (*resurgensi*), masalah pencemaran lingkungan, terbunuhnya flora dan fauna predator yang berguna dalam mempertahankan keseimbangan ekologis bahkan sampai mencapai tingkat yang membahayakan keselamatan jiwa manusia (Narro dan Gomez, 1995). Penggunaan insektisida kimia pada umumnya berhasil baik hanya dalam waktu yang pendek, yang kemudian diikuti dengan kenaikan populasi serangga, oleh karena terjadi resistensi serangga terhadap insektisida kimia tersebut (Soedarto, 1991).

Dampak negatif yang lain adalah menyangkut masalah sosial maupun masalah ekonomi masyarakat. Masalah sosial misalnya berhubungan dengan penolakan penduduk terhadap penyemprotan insektisida kimia, misalnya DDT di dalam rumah, karena menimbulkan pencemaran lingkungan. Selain itu berbagai spesies nyamuk sudah mulai kebal terhadap DDT, sehingga diperlukan insektisida dengan dosis yang lebih tinggi (Hoedoyo, 1993). Masalah ekonomi timbul dengan semakin tingginya harga insektisida, akibatnya semakin mahal biaya operasional, sedangkan dana yang tersedia terbatas (Sumarmo, dkk, 1994).

Kenyataan diatas membuat para ahli pengendalian hayati mengembangkan penggunaan bioinsektisida dan mencari agen pengendali hayati sebagai alternatif pengendalian hama dan vektor penyakit, agar sasaran yang dituju lebih spesifik, lebih aman dan berwawasan lingkungan (WHO, 1991). Para ahli pengendalian hayati berpaling kepada pengendalian vektor secara biologis, yaitu penggunaan organisme hidup musuh alami nyamuk, yang terbukti berperan penting sebagai salah satu faktor lingkungan biotik yang mempengaruhi penyebaran dan kepadatan nyamuk (WHO, 1996). Dewasa ini adanya perubahan sikap dan pendapat kearah pendayagunaan agen-agen biologis dalam pengendalian vektor penyakit itu ditandai antara lain dengan semakin besarnya minat untuk menggunakan mikroba dalam mengendalikan serangga hama dan vektor penyakit. (Guhl, dkk, 1996).

Pada saat ini agen-agen pengendalian hayati yang telah dikembangkan sebagai pembasmi serangga adalah berbagai jenis bakteri dari genus *Bacillus*, seperti *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus spaericus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus larvae* dan *Bacillus morotai* (Lehmann, dkk, 1997). Diantara berbagai jenis *Bacillus* tersebut yang dimanfaatkan secara luas adalah *Bacillus thuringiensis*, karena terbukti efektif melawan serangga (Forst dan Nealsor, 1996, Mardihusodo, 1991).

Bowen dan Ffrench (1999) telah melaporkan terjadinya resistensi serangga terhadap *Bacillus thuringiensis* pada tanaman *transgenik*, oleh karena itu perlu dipikirkan dan diupayakan untuk menemukan toksin alternatif dalam mengatasi masalah tersebut. Hal ini menimbulkan perhatian yang besar dari para ahli pengendalian hayati. Perhatian yang besar ini mengakibatkan timbulnya pencarian toksin baru.

Pada akhir-akhir ini mulai diteliti peran bakteri *Photobacterium luminescens* yang menghasilkan toksin untuk pengendalian hayati terhadap serangga. Toksin bakteri *Photobacterium luminescens* memberi harapan besar untuk dikembangkan sebagai alternatif bioinsektisida baru. Insektisidal toksin baru bakteri *Photobacterium luminescens* ditengarai dapat menandingi tingginya tingkat toksisitas *Bacillus thuringiensis* (Adams, 1999).

Toksin bakteri *Photobacterium luminescens* bersifat mematikan apabila diinjeksikan atau diberikan secara oral sebagai makanan terhadap serangga yang termasuk dalam empat ordo pada kelas Insekta, yaitu: *Coleoptera*,

Diptera, *Lepidoptera* dan *Hymenoptera* (Bowen dkk., 1998). Bakteri *Photorhabdus luminescens* hidup berasosiasi dengan nematoda entomopatogen *Heterorhabditis*. Bakteri ini hidup di bagian atas saluran usus dari nematoda tersebut (Boemare, dkk, 1996). Bakteri simbiosis *Photorhabdus luminescens* yang berada dalam saluran usus nematoda entomopatogen ini dapat diisolasi dengan cara menginokulasi larva *Galleria melonella* atau *Tenebrio molitor* dengan nematoda entomopatogen dan diinkubasi selama 24-48 jam (Akhurst, 1980). Pada pembiakan *in vitro* dengan perlakuan suhu dan waktu inkubasi di luar tubuh nematoda entomopatogen, bakteri *Photorhabdus luminescens* dapat menghasilkan toksin yang mempunyai berat molekul tinggi (Szallas, dkk, 1997).

Feller (1995) berhasil melakukan purifikasi toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* yang berupa protein kompleks dan sangat efektif apabila diberikan secara oral maupun secara injeksi pada beragam larva serangga. Bowen dan French (1999) telah menguji toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* terhadap larva *Manduca sexta*, yang menyebabkan gangguan pada epitelium larva *Manduca sexta* dan menyebabkan terjadinya kematian larva tersebut.

Penemuan toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* ini dikembangkan di USA untuk perlindungan tanaman dan merupakan strategi untuk mengendalikan serangga hama tanaman (Bowen, dkk, 1998).

Pencarian organisme patogen lokal yang tidak menimbulkan dampak negatif pada lingkungan perlu terus-menerus diupayakan. Penelitian-penelitian dengan upaya mencari organisme patogen lokal di Indonesia mempunyai arti penting, yaitu: pertama, ekologis bahan patogen akan lebih mampu beradaptasi dengan lingkungan serangga sasaran, kedua, efektifitasnya akan lebih baik karena lingkungan yang sama, dan yang ketiga, daya gunanya tentu lebih besar (Mardihusodo, 1991).

WHO (1991) juga mendukung diproduksinya bahan entomopatogen lokal, dengan sarana dan prasarana yang tersedia di tempat masing-masing, karena hal ini akan mengurangi ketergantungan dari luar negeri dan tentu akan sangat menghemat devisa negara, karena biaya pemakaian bioinsektisida lokal dapat ditekan serendah-rendahnya, bahkan mungkin dapat di ekspor ke negara lain.

Nematoda entomopatogen *Heterorhabditis spp* dengan mudah dapat ditemukan di Indonesia, karena dapat hidup di segala lapisan tanah dan dapat diisolasi dengan metode *Baiting* menggunakan larva *Galeria mellonella* atau *Tenebrio molitor* (Akhurst, 1986). Di laboratorium hama dan penyakit tanaman Fakultas Pertanian Universitas Jember telah dilakukan isolasi dan perkembangbiakan nematoda entomopatogen dan bakteri simbiosis Isolat Indonesia (Sulistyanto, 1997).

Penelitian tentang nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* sebagai pengendali hayati telah dilakukan pada serangga hama *Otiorynchus*

sulcatus di Eropa dan Amerika Serikat (Ehlers, 1996). *Heterorhabditis megidis* dan *Heterorhabditis bacteriophora* dapat mengendalikan larva *Phyllopertha horticola* yang merusak padang rumput lapangan Golf Jerman sampai 89% (Sulistiyanto, 1997).

Pemanfaatan Nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* isolat Indonesia dengan bakteri simbion *Photorhabdus luminescens* yang hidup di dalamnya perlu ditindak lanjuti dengan mengembangkan penelitian-penelitian yang kemungkinan mempunyai prospek positif dalam pemberantasan dan pengendalian hayati serangga vektor penyakit, termasuk bakteri simbion *Photorhabdus luminescens* yang hidup di dalam ususnya. Bakteri simbion *Photorhabdus luminescens* di Indonesia belum banyak diteliti, terutama tentang protein toksin yang dihasilkan terkait dengan peranannya di bidang Kedokteran sebagai pengendalian hayati serangga vektor penyakit, seperti nyamuk *Aedes aegypti*.

Nyamuk *Aedes aegypti* merupakan serangga vektor penyakit, antara lain penyakit Demam berdarah dengue. Di Indonesia penyakit ini merupakan masalah kesehatan masyarakat yang sangat serius untuk segera diatasi, karena jumlah penderita sangat tinggi dengan korban yang selalu meningkat dari tahun ke tahun (Hoedoyo, 1993). Usaha untuk mengatasi penyakit Demam berdarah dengue yang dilakukan dalam upaya menetapkan diagnosis yang tepat dan cepat, maupun upaya menemukan vaksin untuk pencegahan sudah banyak dilakukan, namun sampai saat ini hasilnya belum

memuaskan. Upaya pencegahan atau pemberantasan penyakit Demam berdarah dengue yang paling efektif dilakukan saat ini adalah melalui pemutusan rantai penularannya, yaitu dengan membasmi nyamuk vektor (Vaughan, dkk,1994). Penggunaan bioinsektisida dan musuh-musuh alami yang ekologiannya cocok dengan vektor sasaran akan mengoptimalkan hasil akhirnya, oleh sebab itu hendaknya diupayakan untuk mencari patogen dan musuh-musuh alami lokal (asli) terlebih pada daerah-daerah endemik Demam berdarah, Malaria maupun Filariasis seperti di Indonesia (WHO, 1991).

Hal inilah yang mendorong dilaksanakannya penelitian dengan judul; Purifikasi dan karakterisasi protein toksin bakteri simbiosis *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia yang bersifat entomopatogenik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* (alternatif Bioinsektisida baru).

1.2 Rumusan Masalah

Masalah dalam penelitian ini adalah bahwa sampai saat ini bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia belum pernah diteliti secara mendalam terutama terkait dengan protein toksin yang dihasilkannya serta toksisitasnya terhadap serangga vektor penyakit. Berdasarkan hal ini maka dapat disusun rumusan masalah sebagai berikut :

1. Bagaimanakah karakter bakteri *Photorhabdus luminescens* Isolat Indonesia jika dibandingkan dengan karakter bakteri *Photorhabdus*

luminescens isolat negara lain (Netherland dan Victerville), baik karakter biakan murni, karakter morfologi maupun karakter biokimia ?

2. Bagaimanakah karakter supernatan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia yang patogenik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* ?
3. Bagaimanakah hasil purifikasi dan karakterisasi protein toksin bakteri simbion *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia yang bersifat entomopatogenik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* ?
4. Apakah terdapat perbedaan hasil pengujian toksisitas supernatan dengan toksisitas protein toksin bakteri simbion *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* ?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan umum

Mempurifikasi dan mengkarakterisasi protein toksin bakteri simbion *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia yang bersifat entomopatogenik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* sebagai alternatif bioinsektisida baru.

1.3.2 Tujuan khusus:

1. Membandingkan karakter bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia dengan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat negara lain (Netherland dan Victerville) baik karakter biakan murni, karakter morfologi maupun karakter biokimia.

2. Menganalisis karakter dari supernatan baktri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia yang patogenik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*.
3. Mempurifikasi dan mengkarakterisasi protein toksin bakteri simbiosis *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia yang bersifat entomopatogen terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*.
4. Mendapatkan perbedaan toksisitas supernatan dengan toksisitas protein toksin bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Dengan penemuan baru protein toksin bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia yang patogenik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*, maka dapat dipakai sebagai bioinsektisida baru pengendali hayati serangga vektor penyakit di Indonesia, sehingga ilmu pengetahuan dibidang biologi kedokteran semakin berkembang.
2. Dengan terungkapnya protein toksin bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia yang baru pertama kali dipurifikasi di Indonesia, maka akan menambah wawasan peneliti maupun peneliti lain untuk melakukan tindak lanjut dari hasil penelitian ini.

3. Dengan diisolasinya bakteri *Phothorhabdus luminescens* di Indonesia, maka akan menambah keaneka ragaman mikroba Indonesia.

1.4.2 Manfaat Teoritik / Terapan

1. Dapat dipakai sebagai salah satu upaya pengembangan lebih lanjut pengganti insektisida kimia dengan suatu alternatif bioinsektisida baru isolat Indonesia.
2. Dapat dipakai sebagai agen pengendalian hayati khususnya nyamuk *Aedes aegypti* yang merupakan vektor penyakit Demam Berdarah Dengue ataupun sebagai bagian penting dari pengendalian vektor secara terpadu.
3. Dapat diproduksi dalam skala industri, sehingga menambah sumber devisa negara dalam menunjang pembangunan nasional.

BAB II

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA



2.1 Biologi Dasar Nematoda Entomopatogen–Bakteri Simbion

Steinernema spp dan *Heterorhabditis spp* berasosiasi dengan bakteri simbion *Xenorhabdus* dan *Photorhabdus*, yang saat ini masih dalam familia *Enterobacteriaceae* (Boemare, dkk, 1996). Masing-masing spesies nematoda entomopatogen memiliki asosiasi simbiose yang khas, yaitu dengan satu jenis bakteri, walaupun *Xenorhabdus spp* atau *Photorhabdus spp* bisa berasosiasi dengan lebih dari satu jenis nematoda entomopatogen (Akhurst dan Boemare, 1990). Seperti jenis nematoda dari ordo *Rhabditidae* lainnya, *Steinernema spp* dan *Heterorhabditis spp* fase yang efektif untuk mengendalikan serangga hama adalah dari fase infeksi juvenil, yang mana secara morfologi dan fisiologinya telah lama beradaptasi dengan lingkungan dalam tanah. Invektif juvenil ini dapat diisolasi dari semua jenis tanah di lingkungan dimana larva serangga ditemukan dan dapat diisolasi dengan metode *Baiting* dari larva instar akhir *Galeria melonella* (Hominick, dkk, 1996). Nematoda entomopatogen ini menyimpan kurang lebih 250 sel bakteri simbion di bagian atas intestinum (Spiridonov dan Akhmedov, 1994).

Perilaku nematoda entomopatogen untuk menemukan inang ini bermacam- macam, seperti perilaku hunter atau penyerang yang memiliki

kemampuan bergerak yang tinggi atau perilaku ambusher atau diam dan menunggu inang di dekatnya kemudian baru menyerang (Gaugler, 1993).

Penetrasi nematoda entomopatogen kedalam tubuh inang atau serangga melalui lubang alami, seperti : mulut, anus, trachea, stigma dan atau menembus langsung ke dalam kutikula (Bedding dan Molyneux, 1996). Indikasi ini memperlihatkan bahwa proses penetrasi nematoda entomopatogen didukung oleh aktifitas dari protease yang diproduksinya (Simoes dan Rosa, 1996). Setelah masuk ke dalam tubuh inang, nematoda entomopatogen melepaskan bakteri simbiotiknya ke dalam *Haemolymph*, setelah 24-48 jam serangga inang mati. Di dalam tubuh inang yang mati nematoda entomopatogen berkembang dengan cepat dan memakan sel bakteri dan jaringan tubuh inang. Tanpa adanya sel bakteri simbiotik di dalam kadaver inang maka nematoda entomopatogen tidak dapat berkembang biak dengan baik (Poinar, 1995). *Steinernema spp* dapat diproduksi di media in vitro tanpa bakteri simbiotik *Xenorhabdus spp*, tetapi hal ini tidak berhasil pada *Heterorhabditis spp*. Nematoda entomopatogen *Heterorhabditis spp* tidak dapat berkembang tanpa adanya aktifitas metabolisme dari bakteri simbiotik *Photorhabdus spp* (Lunau, dkk, 1995). Dua sampai tiga minggu setelah berkembang dalam tubuh inang, infektif juvenil meninggalkan kadaver inang dan mencari inang baru.

Distribusi secara geografis ini dapat diartikan sangat global, yaitu antar benua, negara, pulau atau lapang. Nematoda entomopatogen memiliki

distribusi yang sangat luas dan keberadaannya telah banyak dilaporkan ada di semua benua kecuali di Antartik.

2.2 Eksotoksin Nematoda Entomopatogen

Aktifitas eksotoksin bereaksi setelah nematoda entomopatogen berada di dalam inang / serangga. Adanya korelasi antara kematian serangga dengan aktifitas eksotoksin diketahui dengan memisahkan eksotoksin yang menggunakan metode pertukaran kation Chromatografi, tetapi *mode of action* dari eksotoksin ini belum diketahui (Lewis, dkk 1995). Selain eksotoksin ada beberapa enzim yang dihasilkan oleh nematoda entomopatogen, antara lain : protease, lipase lecithinase, DNA ase dan phosphatase(Kaya, 1995).

2.3 Bakteri *Photorhabdus*

2.3.1 Biologi Dasar Bakteri *Photorhabdus*

Bakteri simbion *Photorhabdus* adalah bakteri entomopatogen yang mempunyai daya bunuh yang besar terhadap serangga. Satu sel bakteri sudah dapat membunuh serangga dalam waktu 24-28 jam, karena adanya toksin di dalam tubuhnya. *Photorhabdus spp* adalah bakteri gram negatif, bersifat entomopatogenik, dan menunjukkan adanya bioluminescens (Bowen dan Ensign, 1996). Bakteri *Photorhabdus spp* ditemukan hidup berasosiasi dengan nematoda entomopatogen *Heterorhabditis spp* fase infeksiif juvennil di dalam saluran ususnya (Boemare dkk., 1996). Infeksiif juvennil secara aktif mencari mangsa insekta dalam tanah. Pada waktu infeksiif juvennil

menemukan mangsa, ia akan masuk ke dalam insekta menuju haemolimfe, kemudian melepaskan bakteri *Photorhabdus* dari usus infeksi juvenil. Bakteri *Photorhabdus* kemudian berkembang biak dengan cepat, membunuh insekta dalam waktu 1-2 hari (Clarke dan Dowd, 1995). *Photorhabdus spp* merupakan patogen pada insekta yang sangat efektif, dapat melawan mekanisme pertahanan anti bakteri dari insekta (Forst dan Nealsor, 1996).

Heterorhabditis spp fase yang efektif untuk mengendalikan serangga adalah pada fase infeksi juvenil III (IJ-III) dari siklus hidupnya, yang secara morfologi dan fisiologinya telah lama beradaptasi dengan lingkungan dalam tanah. *Heterorhabditis* pada fase Infeksi juvenil dapat diisolasi dari semua jenis tanah di lingkungan dimana larva serangga ditemukan dan dapat diisolasi dengan metode *Baiting* dari larva *Galleria mellonella/Tenebrio molitor* (Hominick, dkk, 1996). Setiap ekor infeksi juvenil *Heterorhabditis* ini menyimpan kurang lebih 250 sel bakteri *Photorhabdus* di bagian atas saluran usus (Spirodonov dan Akhmedov, 1994).

2.3.2 Taksonomi Bakteri *Photorhabdus*

Studi taksonomi telah membedakan antara beberapa spesies bakteri yang merupakan simbiosis dari nematoda entomopatogen sebagai berikut :

Tabel 2.1 Spesies bakteri simbion yang bersimbiosis dengan nematoda entomopatogen (Mracek, 1997).

Nematoda entomopatogen	Bakteri simbion
<i>Steinemema carpocapcae</i>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>
<i>Steinemema feltiae</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinemema glaseri</i>	<i>Xenorhabdus poinarii</i>
<i>Steinemema affinis</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinemema kraussei</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinemema intermedia</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinemema kushidai</i>	<i>Xenorhabdus japonica</i>
<i>Steinemema scaptirisci</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinemema cubana</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	<i>Photorhabdus luminencens</i>
<i>Heterorhabditis megidis</i>	<i>Photorhabdus luminencens</i>
<i>Heterorhabditis indicus</i>	<i>Photorhabdus luminencens</i>

Steinemema spp membawa bakteri dari genus *Xenorhabdus* dalam perutnya (Poinar, 1995). *Heterorhabditis spp* membawa bakteri simbion yang mula-mula diklasifikasikan sebagai *Xenorhabdus luminencens*, tetapi hasil test DNA menunjukkan bahwa bakteri ini berbeda dengan genus *Xenorhabdus*, sehingga mengubah diskripsi menjadi genus baru yaitu *Photorhabdus* (Boemare dkk, 1996). Perbedaan ini juga nampak pada interaksi mereka dengan nematoda (Akhurst, 1996). *Photorhabdus* tidak terdapat pada spesies *Steinemema*, tetapi hanya ditemukan pada spesies

Heterorhabditis dan juga sebaliknya *Xenorhabdus spp* tidak ditemukan pada *Heterorhabditis* (Akhurst dan Boemare, 1990).

Photorhabdus termasuk keluarga *Enterobacteriaceae* dan hanya dikenal sebagai bioluminescens, bersifat entomopatogenik, tergolong bakteri gram negatif dan dengan uji katalase menunjukkan *katalase positif*. Sedangkan semua bakteri *Xenorhabdus* tidak memiliki dua sifat penting yaitu: tidak bioluminescent dan katalase negatif (Boemare, dkk, 1996).

2.3.3 Karakterisasi bentuk primer dan sekunder

Bakteri *Photorhabdus* mempunyai dua bentuk, primer dan sekunder. Karakteristik yang umum untuk membedakan antara bentuk primer dan bentuk sekunder adalah dengan dicelupkannya pada agar Mc Conkey, primer : merah, sekunder : kuning (Akhurst, dkk, 1996). Beberapa bentuk bakteri *Photorhabdus luminescens* sekunder bercahaya, walaupun tidak seterang bentuk primernya. Karakteristik varian bentuk sekunder dari tiap-tiap penelitian menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Bentuk primer yang sering disebut sebagai fase satu berbeda dari fase dua atau bentuk sekunder dalam hal adsorpsi warna, pigmentasi dan produksi anti mikroba. Pada beberapa spesies tertentu juga terjadi perbedaan dalam ukuran sel, morfologi internal dan fimbriae. Tiap-tiap bakteri yang dipisahkan dari nematoda entomopatogen yang sama oleh peneliti yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan dalam morfologi koloni dan pigmentasi walaupun dibiakkan dalam

medium yang sama, bahkan perbedaan pH air dalam pembuatan medium dapat menimbulkan perbedaan morfologi maupun pigmentasi (Bintrim dan Eensign, 1998).

2.3.4 Toksin Bakteri *Photorhabdus*

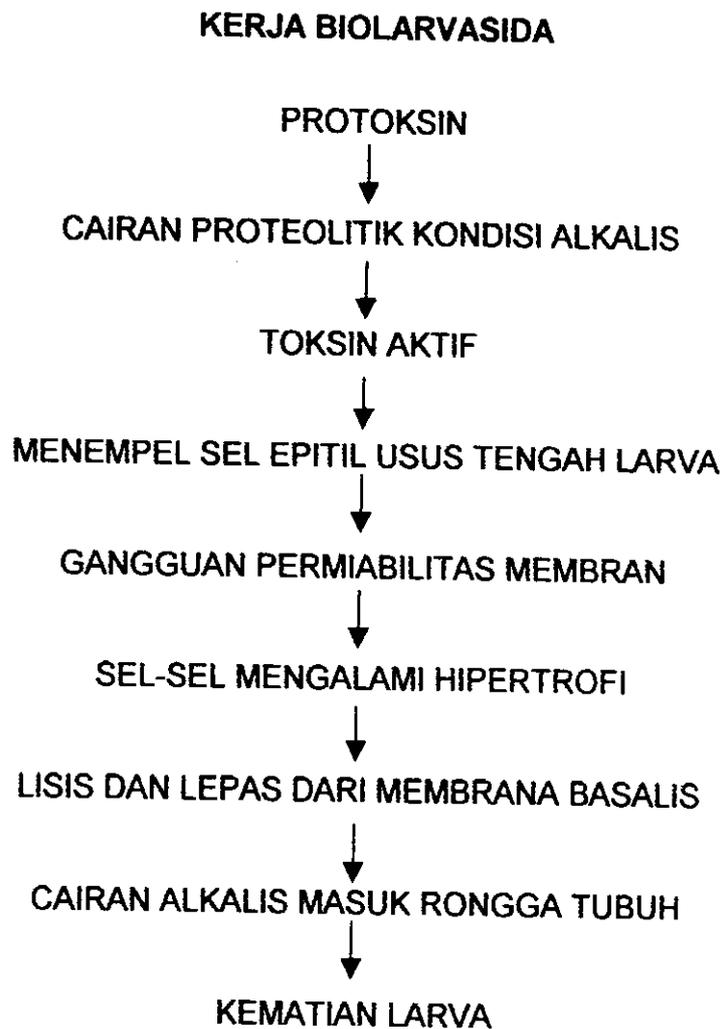
Tim ilmuwan dari University of Wisconsin–Madison yang dipimpin oleh Richard Ffrench-Constant dan David Bowen telah menemukan toksin baru dari bakteri *Photorhabdus*. (Bowen dan Ffrench, 1999). Bakteri *Photorhabdus* hidup berasosiasi dengan nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* (Boemare, dkk, 1996). Apabila bakteri *Photorhabdus* ditumbuhkan dalam peptone broth, di luar tubuh nematoda, bakteri ini menghasilkan toksin protein kompleks yang bersifat letal apabila termakan oleh atau dimasukkan ke dalam hemolimfe dari larva insekta. Toksin ini mempunyai aktifitas patogenik terhadap insekta baik diinjeksikan maupun diberikan secara oral (minum), terutama insekta dari ordo, *Coleoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera* dan *Hymenoptera* (Bowen, dkk, 1998).

Perkembangan ke depan menunjukkan bahwa toksin bakteri *Photorhabdus* mempunyai berat molekul tinggi dan bersifat mematikan terhadap serangga (Szallas, dkk, 1997). Penemuan toksin ini akan memberi peluang besar untuk dikembangkan menjadi bioinsektisida baru.

Penemuan protein toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia memungkinkan penggunaan langsung protein toksin bakteri

Photobacterium luminescens sebagai bioinsektisida baru di Indonesia untuk strategi pengendalian serangga hama dan vektor penyakit.

2.3.5 Skema kerja toksin Biolarvasida (WHO,1991)



Stahly dan Andrews (1990), membedakan cara kerja protein toksin berdasarkan serangga sasarannya, yaitu :

1. Lisis terjadi di saluran pencernaan di bagian tengah larva serangga dalam waktu 5-20 menit setelah dimakan, yang diikuti lisis dibagian dalam tubuh dengan waktu 1-7 jam. Lisis ini disertai kenaikan pH haemolimpa 1-1,5 unit. Hal ini menandakan terjadinya kebocoran pada dinding saluran pencernaan, sehingga cairan alkali usus masuk ke dalam Haemolimpa.
2. Lisis terjadi di bagian tengah saluran pencernaan larva serangga. Lisis ini tidak disertai kenaikan pH Haemolimpa. Kematian terjadi dalam waktu 2-4 hari. Mekanisme kerja toksin protein macam ini merupakan mekanisme yang paling umum terjadi pada berbagai jenis serangga.
3. Kematian larva serangga terjadi dalam waktu 2-4 hari yang disebabkan oleh adanya spora yang berkecambah dan tumbuh di saluran pencernaan serangga yang memakannya.

2.3.6 Toksin Bakteri *Photorhabdus* alternatif Pengganti Toksin *Bacillus Thuringiensis*

Keberhasilan yang paling menonjol dari bioteknologi Agrikultural adalah pengembangan hasil panen yang tahan terhadap hama serangga. Pengembangan hasil panen ini merupakan peningkatan produktivitas dan penghematan biaya, karena penurunan pemakaian insektisida kimia (Oka, Ida Nyoman, 1993).

Pengembangan hasil panen karena kemampuannya dalam menghadapi hama serangga didukung oleh sejumlah gen insektisida yang diisolasi dari *Bacillus thuringiensis*. Ketergantungan hanya pada gen *Bacillus thuringiensis* menyebabkan timbulnya resistensi serangga pada *Bacillus thuringiensis* (Bowen dan French, 1999).

Perhatian para ilmuwan pada resistensi serangga terhadap *Bacillus thuringiensis* yang telah nampak pada hasil-hasil tanaman *transgenik* mengakibatkan timbulnya pencarian toksin alternatif. Toksin bakteri *Photobacterium* merupakan alternatif penting yang harus dikembangkan, karena toksin ini dapat membunuh serangga dalam waktu 24-48 jam. Hal ini diharapkan dapat menandingi dan menggantikan toksin bakteri *Thuringiensis* (Adams, 1999).

2.4 Nyamuk *Aedes aegypti*

2.4.1 Klasifikasi Nyamuk *Aedes aegypti*

Kedudukan taksonomi nyamuk *Aedes aegypti* adalah sebagai berikut :

Phylum : Arthropoda

Clasis : Insecta

Ordo : Diptera

Sub Ordo : Nematocera

Super Familia : Culicoidea

Familia : Culicidae

Sub Familia : Culicinae

Genus : *Aedes*

Spesies : *Aedes aegypti*

(Soedarto, 1990).

2.4.2 Cara Hidup Nyamuk *Aedes aegypti*

Nyamuk *Aedes aegypti* dalam perkembangbiakannya menyukai lingkungan kondisi air yang jernih, tenang dan relatif bersih. Ciri lainnya dari *Aedes aegypti* adalah mempunyai perilaku terbang, istirahat, berkembang biak dan mencari makan pada pagi dan sore hari (Soedarto, 1990). Nyamuk *Aedes aegypti* banyak ditemukan di dalam rumah atau di sekitar rumah atau daerah pemukiman yang padat penduduknya. *Aedes aegypti* mempunyai kebiasaan menghisap darah pada waktu pagi dan sore hari, sehingga kontak yang terjadi antara manusia dengan nyamuk *Aedes aegypti* pada umumnya pagi dan sore hari (Hoedoyo, 1993).

2.4.3 Sifat Nyamuk *Aedes aegypti*.

Nyamuk *Aedes aegypti* berwarna hitam dengan gelang-gelang (loreng) putih pada sayap dan kakinya, berkembangbiak di tempat penampungan air yang tidak beralaskan tanah seperti bak mandi, WC, tempayan, drum dan barang-barang yang menampung air seperti kaleng, ban bekas, pot, tanaman air, tempat minum burung dan lain-lain. Nyamuk betina membutuhkan darah manusia untuk mematangkan telurnya agar dapat meneruskan keturunannya (Davidson, 1984). Nyamuk *Aedes aegypti* lebih tertarik untuk meletakkan telurnya pada wadah berair yang berwarna gelap, paling menyukai warna hitam, terbuka lebar, dan terutama yang terletak di tempat-tempat terlindung sinar matahari langsung (Briseno dkk, 1996). Sifat lain nyamuk *Aedes aegypti* adalah menyukai dinding vertikal dari kontainer/bejana yang berisi air tepat diatas permukaan air untuk tempatnya bertelur (Yadava dan Narasimham, 1992).

2.4.4 Pertumbuhan dan Perkembangan

Masa pertumbuhan dan perkembangan nyamuk *Aedes aegypti* dapat dibagi menjadi 4 tahap yaitu: telur, larva, pupa dan nyamuk dewasa. Waktu yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mulai dari telur sampai nyamuk dewasa dalam kondisi laboratorium, suhu 27°C dan kelembaban 80 % antara 7-14 hari (Duane dan Gary, 1995).

Telur nyamuk *Aedes aegypti* berukuran kecil (50 mikron), berwarna hitam sepintas lalu nampak bulat panjang dan bentuknya jorong (oval) menyerupai terpedo. Di bawah mikroskop, pada dinding luar (exochorion) telur nyamuk ini nampak adanya garis-garis yang membentuk gambaran menyerupai sarang lebah. Di alam bebas telur ini diletakkan satu persatu menempel pada dinding tempat perindukan, sedikit diatas permukaan air. Di dalam Laboratorium terlihat jelas telur-telur ini diletakkan menempel pada kertas saring yang tidak terendam air sampai batas ketinggian 2-4 cm di atas permukaan air. Di dalam laboratorium telur menetas 1-2 hari. Dalam keadaan kering telur *Aedes aegypti* dapat disimpan kurang lebih satu bulan, bila lebih lama maka daya tetasnya akan berkurang (Lee, 1990).

Larva nyamuk *Aedes aegypti* dapat dibedakan dengan jenis nyamuk lain (*Anopheles, culex, Mansonia*) berdasarkan ciri-ciri morfologi yang khas, antara lain :

- a. Sifon (alat pernafasan) berbentuk kerucut, pendek dan gemuk.
- b. *Hair tuft* (bulu-bulu pada siphon) hanya terdapat sepasang.
- c. *Combteeth* (gigi sisir yang terdapat pada abdomen segmen ke-8) dilengkapi dengan duri.
- d. Segmen *thorax* kedua dan ketiga pada sisi lateral terdapat pangkal bulu yang berduri panjang (Soedarto, 1990).

Larva nyamuk *Aedes aegypti* berukuran 7 x 4 mm, mempunyai pelana yang terbuka, bulu sifon satu pasang dan gigi sisir berduri lateral. Di dalam perkembangannya larva ini mengalami 4 kali pergantian kulit dan larva yang terbentuk berturut-turut disebut larva instar I, II, III, IV. Pertumbuhan dan perkembangan larva instar II dan instar III terjadi lebih cepat bila dibandingkan dengan larva instar I. Tahap larva instar IV lebih lama apabila dibandingkan dengan tahap L I, L II, L III. Larva instar I sangat kecil, transparan, panjang tubuhnya 1-2 mm, duri pada dada belum jelas, corong pernapasan belum menghitam. Larva instar II bertambah besar ukurannya 2-4 mm, duri-duri di dada belum jelas, corong pernapasan mulai menghitam. Larva instar III lebih panjang, ukurannya 4-5 mm, duri-duri didada sudah jelas, corong pernapasan sudah berwarna hitam. Larva instar IV telah lengkap mempunyai bagian-bagian kepala, dada dan perut (Duane dan Gary, 1994).

Pupa nyamuk *Aedes aegypti* tubuhnya bengkok, dengan bagian kepala-dada (*cephalothorax*) lebih besar bila dibandingkan bagian perutnya, sehingga memberi kesan seperti tanda koma. Pada bagian dorsal dada terdapat alat pernapasan yang bentuknya seperti terompet. Pada ruas perut VIII terdapat sepasang alat pengayuh yang berguna untuk berenang. Pupa adalah bentuk tidak makan, namun nampak gerakannya lebih lincah apabila dibandingkan dengan larva (Mardihusodo, 1989).

Nyamuk *Aedes aegypti* dewasa tubuhnya tersusun dari 3 bagian yaitu: kepala, dada, dan perut. Pada bagian kepala terdapat sepasang mata majemuk dan antena yang berbulu. Alat mulut nyamuk betina mempunyai tipe penusuk-pengisap, sedangkan nyamuk jantan bagian mulutnya lebih lemah, sehingga tidak mampu menembus kulit manusia. Pada bagian dada tersusun dari 3 ruas yaitu: *prothorax*, *mesothorax*, dan *metathorax*. Pada setiap ruas dada terdapat sepasang kaki yang terdiri dari: femur, tibia, dan tarsus. Pada bagian dada juga terdapat sepasang sayap tanpa noda-noda hitam. Bagian perut terdiri dari 8 ruas dan tiap-tiap ruas terdapat bintik-bintik putih. Pada waktu istirahat posisi nyamuk *Aedes aegypti* sejajar dengan bidang permukaan yang diinggapi (Thomas, 1994).

Tabel 2.2 Perbedaan morfologi pada tiga bagian tubuh nyamuk *Aedes aegypti* dewasa jantan dan betina (Edward dan Duane, 1992).

	Jantan	Betina
Antena	Bentuk plumose (berambut panjang dan lebat)	bentuk pilose (Rambut jarang dan pendek)
Maxillary palp	lebih panjang dari proboscis	lebih pendek dari proboscis
Ujung abdomen	Hypopigium	cerci

Suatu hal yang menarik perhatian adalah bahwa *Aedes aegypti* merupakan salah satu nyamuk yang berperan sebagai vektor penyakit yaitu

penyakit Demam berdarah, penyakit Kuning (*yellow fever*) dan penyakit *Filariasis*. Cara efektif untuk mengatasinya adalah dengan menekan kepadatan populasi nyamuk *Aedes aegypti* sampai pada tingkat yang tidak mampu berperan sebagai penular penyakit (Brown, 1979).

2.5 Pengendalian Serangga Sebagai Vektor Penyakit

Upaya penekanan kepadatan populasi nyamuk *Aedes aegypti* dapat dilakukan dengan beberapa cara. Secara garis besar ada 4 cara pengendalian vektor (Feller, 1995).

1. Pengendalian kimiawi.
2. Pengendalian genetik.
3. Pengendalian lingkungan.
4. Pengendalian hayati.

2.5.1 Pengendalian Kimiawi

Pengendalian kimiawi dilakukan dengan menggunakan insektisida-insektisida kimia yang sesuai untuk telur, larva, pupa dan nyamuk dewasa (Soedarto,1990). Insektisida kimia banyak dipakai karena memberi hasil yang memuaskan dan efeknya terlihat dengan jelas dalam waktu yang relatif singkat, biayanya ringan dan lebih mudah menggunakannya (Donald dan Scott, 1993). Dewasa ini telah disadari adanya dampak negatif yang serius dari penggunaan insektisida kimia, yaitu meningkatnya resistensi, pencemaran lingkungan, keracunan, kematian organisme bukan sasaran dan adanya residu yang ditinggalkannya (Sumarmo,dkk, 1994). Dampak-dampak negatif penggunaan insektisida kimia menghambat usaha-usaha penanggulangan penyakit, sehingga perlu dicari insektisida yang sesuai dan aman untuk manusia (WHO,1996)

2.5.2 Pengendalian Genetik

Cara pengendalian Genetik yang sering dilakukan adalah teknik jantan mandul dengan manipulasi genetik yang menggunakan sinar radio aktif. Hasil manipulasi genetik berupa sejumlah besar nyamuk jantan yang sudah steril dan dengan melepas sejumlah besar nyamuk jantan steril ke alam, diharapkan nyamuk-nyamuk jantan steril dapat mengawini nyamuk-nyamuk betina, sehingga tidak akan menghasilkan keturunan. Pengendalian secara genetik ini pada akhirnya diharapkan akan menurunkan jumlah populasi nyamuk (Stephen dan Schluederberg, 1990).

2.5.3 Pengendalian Lingkungan

Pengendalian lingkungan dilakukan dengan cara menghilangkan tempat-tempat perindukan yang disukai nyamuk *Aedes aegypti*, misalnya menguras tempat penampungan air seminggu sekali, menanam barang bekas yang dapat menampung air hujan, meniadakan gantungan-gantungan pakaian di dalam rumah dan menutup rapat-rapat tempat penampungan air yang bersifat permanen (Mardihusodo, 1988).

2.5.4 Pengendalian Hayati (Biologi)

Pengendalian Hayati atau pengendalian Biologis dilakukan dengan menggunakan kelompok makhluk hidup, baik dari golongan Mikroorganisme, hewan vertebrata atau hewan invertebrata. Kelompok makhluk hidup dapat

berperan sebagai patogen, parasit atau pemangsa. Jenis- jenis ikan seperti: *Panchax-panchax*, *Lebistus letucularis* dan *Gambusia affinis* adalah pemangsa yang cocok untuk larva nyamuk, tetapi kurang cocok untuk perindukan *Aedes aegypti*. Jenis- jenis cacing nematoda seperti: *Romamomermis iyengati* dan *Romamomermis culciferax* merupakan parasit pada larva nyamuk, tetapi juga kurang sesuai untuk tempat perindukan nyamuk *Aedes aegypti*. *Bacillus thuringiensis* dan *Bacillus sphaericus* dianggap paling sesuai untuk dapat dikembangkan sebagai pengendali larva nyamuk *Aedes aegypti* ditempat perindukannya (WHO, 1991).

2. 6 Uji Laboratorium

2.6.1 Identifikasi Bakteri Simbion

Langkah pertama dalam identifikasi bakteri adalah pengamatan terhadap morfologinya. Morfologi sel secara individu meliputi: ukuran, bentuk, ada tidaknya spora, flagel maupun kapsul. Morfologi koloni meliputi: bentuk, ukuran dan warna koloni pada berbagai medium (Akhurst dan Bedding, 1993).

Langkah berikutnya perlu dilakukan pengujian terhadap sifat-sifat biokimia, pengecatan maupun patogenitasnya. Langkah ini meliputi :

a. Pembentukan Indol

Indol merupakan zat yang berbau busuk yang dihasilkan oleh beberapa bakteri yang ditumbuhkan dalam medium yang mengandung asam

amino triptopan. Adanya Indol dapat ditentukan dengan bermacam-macam cara, misalnya dengan pengujian Ehrlich, Kovacs, Gnezda (Arnheim dan Erlich, 1992).

b. Pembentukan Amonia (NH₃)

Amonia terjadi karena deaminasi asam-asam amino oleh bakteri-bakteri heterotrof. Adanya amonia dapat ditunjukkan dengan pengujian Nester, dimana jika terdapat amonia warna reagensia akan berubah menjadi kuning sampai coklat kemerahan (Bloch, 1991).

c. Pengecatan Gram

Pengecatan Gram merupakan pengecatan deferensial dengan memakai bermacam-macam cat. Perbedaan susunan sel bakteri Gram positif (+) dan sel bakteri Gram negatif (-) mengakibatkan perbedaan dalam sifat-sifat pewarnaannya. Dinding sel dan membran sitoplasma bakteri Gram positif (+) mempunyai afinitas yang besar terhadap kompleks cat kristal violet dan Iodium. Dinding sel dan membran sitoplasma bakteri Gram negatif (-) afinitasnya sangat kecil. Perbedaan yang menyolok adalah dinding sel bakteri Gram positif (+) terdiri dari 90% lapisan peptidoglikan, sedangkan pada bakteri gram negatif(-) lapisan peptidoglikan hanya 5-20% saja, sehingga dengan cat kristal violet bakteri gram positif (+) akan mengikat kuat cat tersebut dan tidak luntur dengan cat peluntur, akibatnya warna sel adalah biru. Bakteri Gram negatif (-) tidak dapat mengikat kuat cat kristal violet dan luntur dengan cat peluntur, akibatnya

sel bakteri terwarnai dengan cat terakhir yaitu safranin, sehingga sel berwarna merah (Amheim dan Erlich, 1992).

d. Reduksi H_2O_2

H_2O_2 direduksi menjadi H_2O dan O_2 oleh bakteri-bakteri yang mempunyai katalase. Enzim ini dimiliki oleh bakteri yang bersifat aerob obligat. Beberapa bakteri dapat hidup tanpa O_2 dari udara, karena bakteri-bakteri tersebut dapat mereduksi garam-garam nitrat atau senyawa-senyawa lain. Nitrat direduksi menjadi nitrit atau amonia. *Methylene blue* dan indikator lain direduksi sehingga menjadi tidak berwarna (Stoscheck, 1990).

2.6.2 Elektroforesis

Proses elektroforesis adalah suatu proses pemisahan partikel-partikel berdasarkan muatan listriknya. Partikel-partikel atau senyawa yang terpisah ini dapat berupa protein atau asam-asam polinukleat yang berasal dari darah, cairan-cairan biologis ataupun berasal dari jaringan lunak (Crowther, 1995). Perangkat elektroforesis terdiri dari serangkaian sirkuit listrik dengan bahan-bahan berupa air dan garam-garam yang mudah diuraikan. Garam-garam yang mudah diuraikan, misalnya: sodium klorida. Garam ini di dalam air dapat terurai membentuk ion sodium yang bermuatan positif tunggal dan ion klorida yang bermuatan negatif tunggal. Elektroda-elektroda ditempatkan di dalam larutan yang dihubungkan dengan sumber energi seperti baterai. Sumber energi seperti baterai salah satu kutubnya

akan menarik ion yang bermuatan negatif yang dinamakan anion dan ujung yang lainnya akan menarik ion-ion positif yang dinamakan kation (Schoeff dan Williams, 1993).

Fenomena elektroforesis merupakan perpindahan muatan-muatan positif maupun negatif dari suatu senyawa ke muatan yang berlawanan dalam area listrik (Artama dkk, 1991).

Elektroforesis merupakan suatu proses pemisahan yang paling baik untuk mengidentifikasi dan mengumpulkan protein dengan cara memurnikan dan memperkirakan homogenitas kemurnian fraksi-fraksi protein (Lapolla, dkk, 1991) Elektroforesis secara rutin digunakan untuk memperkirakan berat molekul protein dan mempersiapkan untuk pemrosesan protein lebih lanjut. Elektroforesis dapat memfraksinasi protein berdasarkan ukuran, bentuk dan muatan-muatan protein makromolekul (Scopes, 1987).

2.6.3 Metode Bradford

Metode *Bradford*, (1976) merupakan metode yang tepat untuk pengukuran konsentrasi protein. Metode ini banyak digunakan diberbagai laboratorium (Chial dkk, 1993). Teknik atau cara kerja metode *Bradford* dalam pengukuran konsentrasi protein lebih sederhana dan lebih cepat diketahui hasilnya dibandingkan dengan metode lainnya, misalnya metode *Lowry* (Kaya, dkk, 1993). Pengujian protein dengan metode *Bradford*

menggunakan bahan celupan *Coomassie blue* G250. Konsentrasi protein dapat dihitung dengan membuat grafik standart yang menggunakan *Bovine Serum Albumine* (BSA) (Congdon, dkk ,1993).

2.6.4 Purifikasi Protein Toksin Bakteri *Photorhabdus*

Bakteri *Photorhabdus* apabila ditumbuhkan dalam medium *Pepton Broth*, tanpa Nematoda entomopatogen akan memproduksi protein toksin kompleks yang sangat ampuh apabila diberikan secara oral atau diinjeksikan kepada larva insekta (Strauch dan Ehlers, 1998). Toksin sebagai protein kompleks ini dianalisis dengan *Sodium Dodecyl Sulfate-elektroforesis gel polyacrylamide* menunjukkan bahwa toksin protein ini tersusun dari beberapa sub unit protein dari ukuran 30-200 kDa.

Purifikasi toksin protein yang dikerjakan oleh Bowen dan Ensigr (1998) tampak bahwa terjadinya pemisahan fraksi besar dengan bobot molekul tinggi menunjukkan bahwa toksin protein ini sangat ampuh apabila diberikan kepada larva serangga. Fraksi yang berbobot molekul tinggi dipisahkan dengan *High performance Liquid Chromatografi* (HPLC) menjadi tiga kompleks protein toksin dengan larva sasaran yang berbeda.

2.6.5 Pengujian Toksisitas

Pengujian toksisitas insektisida terhadap serangga uji, stimulus diaplikasikan kepada subyek dalam serial unit konsentrasi atau dosis dan atau dalam serial waktu. Respon dalam pengujian toksisitas berupa angka kematian (Mortalita). Hasil yang diperoleh dalam pengujian toksisitas adalah berupa LC_{50} (konsentrasi yang diperlukan agar populasi serangga uji mengalami kematian sebesar 50% pada waktu tertentu), dan atau LT_{50} (lama pengujian yang diperlukan agar populasi serangga uji mengalami kematian sebesar 50 % pada dosis atau konsentrasi tertentu (Siti Rahmah, 1990).

Selama ini pengendalian serangga hama maupun serangga vektor penyakit dengan insektisida kimia dari bahan kimia sintetis merupakan senjata utama yang digunakan secara luas oleh banyak pihak dan sering tanpa perhitungan dan koordinasi yang baik. Hal ini akan mengakibatkan timbulnya dampak negatif seperti ekologi terganggu, bahkan serangga hama maupun serangga vektor penyakit yang mula-mula rentan terhadap insektisida berubah menjadi tahan terhadap insektisida kimia terpakai atau yang sejenis (Sunthorn Sirivakam, 1972).

Pengujian toksisitas insektisida baru terhadap serangga uji maupun mengetahui kerentanan serangga terhadap insektisida yang telah lama digunakan dapat dianalisis dengan menggunakan Probit analisis (Yule dan Kendal, 1990).

BAB III



BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

Kerangka konseptual ini dipakai sebagai acuan dalam melakukan penelitian dengan mengacu dari teori-teori terkait yang sudah ada sebelumnya.

Photorhabdus adalah bakteri entomopatogen yang hidup bersimbiosis dengan Nematoda entomopatogen *Heterorhabditis*. di dalam saluran intestinalnya (Boemare dan Givaudan, 1996). Bakteri *Photorhabdus* yang berada dalam intestinum Nematoda entomopatogen diisolasi dengan cara menginokulasi larva *Galleria mellonella* atau *Tenebrio molitor* dengan Nematoda entomopatogen dan diinkubasi selama 24-48 jam (Akhurst, 1980).

Bakteri *Photorhabdus* yang ditumbuhkan dalam medium *Peptone Broth*, tanpa Nematoda, akan memproduksi protein toksin kompleks yang bersifat patogen jika diberikan secara oral atau disuntikkan pada hemolimfe dari larva serangga yang termasuk ke dalam ordo *Diptera*, *Hymenoptera*, *Coleoptera* dan *Lepidoptera* (Bowen, dkk, 1998).

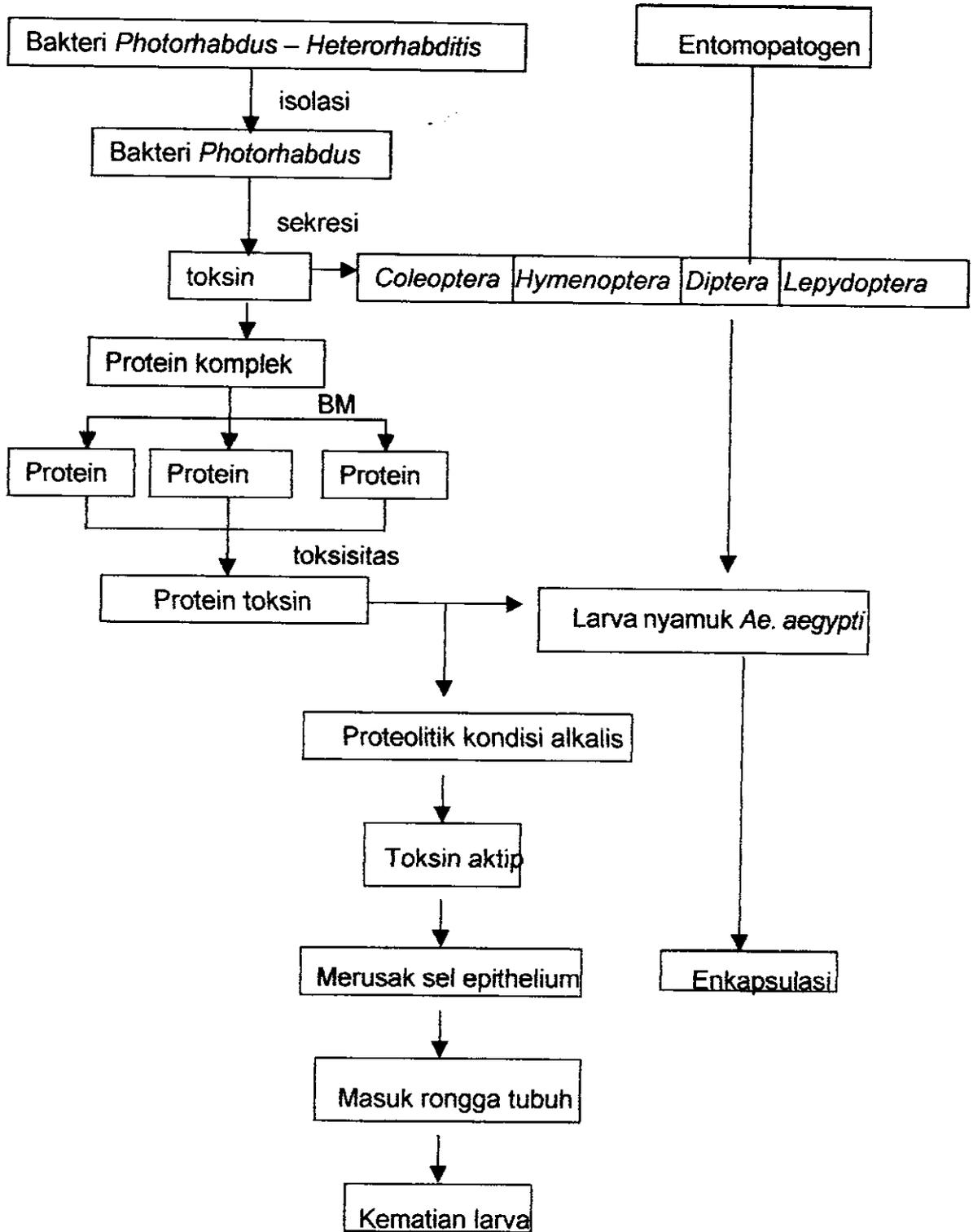
Toksin sebagai protein kompleks yang diproduksi oleh bakteri *Photorhabdus* mempunyai berat molekul tinggi. Hasil analisis dengan *SDS-PAGE* menunjukkan bahwa protein toksin kompleks ini tersusun dari beberapa sub unit protein dari ukuran 30 – 200 kDa. Protein toksin kompleks ini selanjutnya memisahkan elektroforesis gel menjadi tiga komponen yang

mempunyai aktifitas insektisidal terhadap larva sasaran yang berbeda (Szallas, dkk, 1997).

Toksin bakteri *Photorhabdus* ditengarahi dapat menandingi tingginya tingkat toksisitas *Bacillus thuringiensis* yang telah terjadi resistensi serangga, terutama pada tanaman *transgenik* (Adam, 1999)

Toksin bakteri *Photorhabdus* memberi harapan besar untuk dikembangkan sebagai alternatif Bioinsektisida baru, khususnya serangga vektor penyakit seperti nyamuk *Aedes aegypti*.

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan kerangka konseptual :

1. Interaksi bakteri simbiosis sangat spesifik, bakteri *Xenorhabdus* bersimbiosis dengan *Steinemema* dan bakteri *Photorhabdus* dengan *Heterorhabditis* (Boemare, dkk, 1996).
2. Pengujian patogenitas nematoda entomopatogen –bakteri *Photorhabdus* terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* mengakibatkan terjadinya enkapsulasi (Simoes dan Rosa, 1996)
3. *Photorhabdus* adalah bakteri gram negatif yang merupakan bakteri enterik yang ditemukan dalam saluran usus Nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* (Bowen, dkk, 1998). Isolasi bakteri *Photorhabdus* yang berada di dalam saluran usus Nematoda entomopatogen dapat dilakukan dengan cara menginokulasi larva *Tenebrio molitor* atau *Galleria melonella* dengan Nematoda entomopatogen dan diinkubasi selama 24-48 jam (Akhurst, 1980).
4. Bakteri *Photorhabdus* yang ditumbuhkan dalam *Pepton Broth* tanpa Nematoda akan mengsekresi toksin ke dalam medium *Broth* yang bersifat letal apabila diinjeksikan atau termakan atau dimasukkan ke dalam haemolim dari larva serangga yang mewakili empat ordo, yaitu : *Coleoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera* dan *Hymenoptera* (Bowen, dkk, 1998).
5. Toksin bakteri *Photorhabdus* berupa protein kompleks yang tersusun dari kumpulan-kumpulan protein dari berbagai ukuran yang kemudian

dipisahkan dengan *SDS-PAGE* menjadi tiga komponen yang mempunyai daya toksik terhadap larva serangga yang berbeda (Bowen, dkk, 1998). Szallas, dkk, 1997)

6. Nyamuk *Aedes aegypti* merupakan serangga vektor penyakit, antara lain penyakit Demam Berdarah Dengue. Dalam klasifikasi kedudukan taksonomi nyamuk *Aedes aegypti* termasuk ke dalam ordo *Diptera*, familia *Culcidae* (Soedarto, 1990).
7. Protein toksin bakteri *Photorhabdus* yang diberikan secara oral kepada serangga akan menyebabkan gangguan pada epitelium usus larva sehingga cairan alkali usus masuk kedalam rongga tubuh dan akhirnya terjadi kematian pada larva (Bowen and Ffrench, 1999).

3.2 Hipotesis Penelitian

Dalam penelitian ini dapat disusun hipotesis penelitian sebagai berikut:

1. Karakter bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia sama dengan karakter bakteri *Photorhabdus* isolat negara lain (Netherland dan Victerville), kecuali motilitas dan ukuran selnya.
2. Supernatan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia terdiri dari beberapa kumpulan protein yang bersifat patogen maupun yang tidak patogen terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*.

3. Protein yang bersifat patogenik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* dapat dipurifikasi dan dikarakterisasi dari supernatan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia.
4. Besarnya toksisitas protein hasil purifikasi berbeda dengan besarnya toksisitas supernatan bakteri simbion *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*

BAB IV

BAB IV

METODE PENELITIAN



4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik yang terdiri dari tiga tahap. Tahap pertama adalah tahap kolonisasi larva uji dan karakterisasi bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia yang terdiri dari: karakter biakan murni, karakter morfologi dan karakter biokimia. Tahap kedua adalah tahap pembuatan supernatan dan karakterisasi supernatan yang meliputi : uji toksisitas supernatan, pengukuran konsentrasi supernatan dengan uji *Bradford*, uji *Zymo Gram* untuk melihat ada / tidaknya enzim proteolitik dan analisis protein secara *native-PAGE*. Tahap ketiga adalah tahap purifikasi dan karakterisasi protein toksin yang terdiri dari : fraksinasi supernatan, pengukuran konsentrasi fraksi-fraksi protein, uji toksisitas fraksi-fraksi protein terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*, analisis *SDS-PAGE*, uji *Bradford* serta pengujian toksisitas protein toksin terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*

Pengujian toksisitas terdiri dari dua tahap. Tahap pengujian pendahuluan, bertujuan untuk menentukan variasi dan interval dosis yang akan digunakan dalam pengujian akhir. Pengujian pendahuluan cukup dilakukan satu kali ulangan dalam satu serial dosis atau konsentrasi dari dosis/konsentrasi minimal yang dapat menyebabkan kematian 100%

serangga uji sampai dengan kontrol. Tahap kedua adalah tahap pengujian akhir yang dilakukan dalam satu serial dosis dan waktu yang menyebabkan kematian serangga uji mulai dari 100% sampai dengan kontrol berdasarkan hasil pengujian pendahuluan. Variasi dosis/konsentrasi ada sembilan macam variasi dengan ditambah satu kelompok kontrol. Pengujian dilakukan tiga kali ulangan.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*). Hewan percobaan yang dipakai dalam penelitian ini adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* instar IV dalam kelompok-kelompok kecil sebagai satuan percobaan. Perlakuan dalam percobaan ini adalah: protein toksin bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia dalam serial konsentrasi dan waktu, sedangkan responnya adalah jumlah kematian (mortalitas) dari larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*.

Hasil akhir dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh protein toksin bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia yang bersifat entomopatogenik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* sehingga dapat menjadi alternatif bioinsektisida baru.

4.2 Populasi, Sampel, Besar sampel

Pada penelitian ini digunakan larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* dengan jumlah n ekor. Hewan percobaan ini dibagi dalam 2 kelompok, yaitu :

1. Kelompok kontrol: larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* isolat Surabaya yang telah dikolonisasi di laboratorium Entomologi kedokteran TDC Univ. Airlangga sampai pada keturunan (F) ke 20 tanpa diberi protein toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat lokal.
2. Kelompok perlakuan: larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* isolat Surabaya yang telah dikolonisasi di laboratorium Entomologi kedokteran TDC Univ. Airlangga sampai pada keturunan (F) ke 20 yang diberi protein toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia dalam berbagai serial konsentrasi dan waktu.

4.3 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini dapat dijelaskan sebagai berikut :

1. Bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia adalah bakteri *Photorhabdus luminescens* yang diisolasi dari dalam usus *Heterorhabditis indicus* Isolat Ngadas-Jawa Timur-Indonesia yang sudah dikembangbiakan di laboratorium hama dan penyakit tanaman fakultas pertanian Universitas Jember.
2. Nyamuk *Aedes aegypti* yang digunakan dalam penelitian ini adalah nyamuk *Aedes aegypti* isolat Surabaya yang ditangkap dari kecamatan Sawahan Surabaya dan dikolonisasi di laboratorium Entomologi Kedokteran TDC Univ. Airlangga sampai pada F20.

3. Entomopatogenik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* dalam penelitian ini adalah toksik / bersifat mematikan terhadap larva nyamuk *aedes aegypti*.
4. Protein toksin adalah protein yang dipurifikasi dari supernatan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia yang bersifat toksik terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*.
5. Purifikasi protein toksin adalah pemisahan atau pemurnian protein dari supernatan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia yang paling toksik terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*.
6. Karakterisasi meliputi karakter biakan murni, yaitu adanya Rods dan warna koloni pada adsorpsi Bromotimol Biru, karakter morfologi yang terdiri dari: bentuk sel, panjang sel, lebar sel, diameter koloni, karakter biokimia yang meliputi pembentukan indol, motilitas, katalase, pewarnaan gram dan uji Bioluminescens. Karakter supernatan meliputi, labilitas terhadap panas, uji *Zymo gram*, pengukuran konsentrasi protein, *native PAGE* dan pengujian toksisitas supernatan. Karakterisasi protein toksin meliputi: labilitas terhadap panas, uji *Bradford*, pengukuran konsentrasi protein, *SDS-PAGE* dan pengujian toksisitas protein toksin
7. Toksisitas adalah kemampuan protein toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia untuk dapat mematikan larva uji (larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*). Dalam pengujian toksisitas protein toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia terhadap larva uji,

stimulus diaplikasikan pada subyek dalam serial unit konsentrasi , sedangkan respon berupa angka kematian (mortalitas).

8. Pengujian toksisitas terdiri dari pengujian pendahuluan dan pengujian akhir baik untuk supernatan maupun protein toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* isolat Surabaya yang telah dikolonisasi sampai dengan keturunan (F) ke 20.
9. LC_{50} (*Lethal concentration 50%*) adalah konsentrasi yang diperlukan agar populasi serangga uji mengalami kematian sebesar 50% pada waktu tertentu.

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

4.4.1 Waktu penelitian : Penelitian ini dimulai sejak Oktober 2000 sampai dengan November 2002.

4.4.2 Tempat penelitian :

1. Laboratorium Mikrobiologi Kedokteran TDC Universitas Airlangga Surabaya: karakterisasi bakteri simbion *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia.
2. Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember: pembuatan supernatan, karakterisasi supernatan, purifikasi protein toksin yang dihasilkan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia.
3. Laboratorium Entomologi Kedokteran TDC Universitas Airlangga Surabaya: kolonisasi larva nyamuk *Aedes aegypti* dan pengujian

toksisitas protein toksin bakteri *Photobacterium luminescens* terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*.

4.5 Cara Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan cara sebagai berikut :

4.5.1 Kolonisasi larva nyamuk *Aedes aegypti*

1. Alat yang digunakan

Untuk kolonisasi larva uji adalah sebagai berikut :

sangkar nyamuk ukuran 30 x 30 x 30 cm, aspirator untuk menangkap nyamuk, loyang plastik ukuran 30 x 40 x 10 cm, tabung reaksi besar ukuran: panjang 15 cm dan garis tengah 5 cm, pipet mulut besar ukuran 10 ml untuk pengambilan larva, kertas saring diameter 10 cm, kain handuk basah untuk menjaga kelembaban, gelas dicat hitam diameter 10 cm, rak besi.

2. Bahan yang digunakan

Untuk kolonisasi larva uji adalah sebagai berikut madu / royal jelly, larutan gula, marmut / tikus putih, pelet, air PDAM yang telah diinkubasi.

3. Cara kerja kolonisasi larva uji

Cara kerja kolonisasi nyamuk *Aedes aegypti* dilakukan menurut petunjuk Lim suwan dkk., (1987). Urutan kerja kolonisasi nyamuk *Aedes aegypti* dikelompokkan menjadi empat tahap, yaitu ; tahap koleksi telur, tahap pemeliharaan larva, tahap pemeliharaan pupa, tahap pemeliharaan nyamuk.

a. Tahap koleksi telur

Cangkir plastik hitam (gelas yang dicat hitam) dengan diameter 10 cm diisi air sampai permukaan air kurang lebih 3cm dari bibir atas dan di atasnya diberi kertas saring melingkar selebar 2cm. Cangkir / gelas diletakkan di dalam sangkar nyamuk yang sebelumnya nyamuk-nyamuk tersebut sudah diberi makanan darah marmut/ tikus putih 3-4 hari sebelumnya. Dan cangkir dibiarkan 4-6 hari. Kertas saring yang sudah berisi telur nyamuk diambil dari dalam sangkar, dikeringkan untuk disimpan dan dipakai pada tahap berikutnya.

b. Tahap pemeliharaan larva

Menyiapkan loyang-loyang plastik berukuran 30 x 40 x 10 cm yang sudah diisi dengan 2 liter air PDAM. Telur yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam loyang plastik yang sudah diisi 2 liter air PDAM, yang sudah diinkubasikan selama 2 hari, dan penetasan dilakukan selama 24-48 jam. Memindahkan larva yang baru menetas dari hasil penetasan telur ke dalam loyang-loyang plastik dengan pipet mulut lebar. Meletakkan pelet sebagai makanan larva pada bagian pojok loyang, dan diulangi setiap 2 hari sekali sampai menjadi pupa. Menghilangkan lapisan yang terbentuk di bagian permukaan air dalam loyang dengan lembar kertas saring setiap dua hari sekali sebelum pemberian makanan larva.

c. Tahap pemeliharaan pupa

Pupa yang terbentuk dari hasil pemeliharaan larva diambil satu persatu dengan pipet dan dipindahkan ke dalam cangkir plastik yang berisi air PDAM. Cangkir-cangkir plastik yang berisi pupa diletakkan di dalam sangkar nyamuk dan dibiarkan 2 sampai 3 hari. Cangkir-cangkir plastik tersebut diambil dari dalam sangkar, jika semua pupa sudah menjadi nyamuk.

d. Tahap pemeliharaan nyamuk

Nyamuk *Aedes aegypti* dari hasil pemeliharaan pupa diberi makan dengan 10% larutan gula dan madu pada kapas yang diletakkan di cangkir-cangkir plastik dan makanan tersebut diganti setiap 3 hari. Setelah 6-7 hari nyamuk diberi makanan dengan jalan memasukkan marmut yang sudah difiksasi ke dalam sangkar nyamuk dan dibiarkan 3-4 jam. Tiga sampai empat hari berikutnya dilakukan koleksi telur nyamuk. Pekerjaan kolonisasi nyamuk dilakukan sampai F ke 20 secara rutin dan tetap dikolonisasi sampai penelitian berakhir.

4.5.2 Karakterisasi biakan murni Bakteri simbion *Photorhabdus luminescens* Isolat Indonesia.

Bakteri *Photorhabdus luminescens* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman fakultas Pertanian Universitas Jember.

1. Alat dan bahan yang digunakan :

- a. Inkubator
- b. Freezer (- 20 °C)
- c. Glycerol 15%
- d. Tabung berukuran 2 ml
- e. Medium Ys, yang terdiri dari :

1. $\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$: 0,5 gram

2. KHPO_4 : 0,5 gram

3. MgSO_4 : 0,2 gram

4. Na CL : 5 gram

5. H_2O : 1000 ml

6. yeast ekstrak : 5 gram

f. Medium Agar (*Nutrient Broth Agar*), terdiri dari :

5 Standart-1- Nutrient Broth (Merck 7881) : 37 gram

6 Bromthymol Blue / Sigma : 25 gram

7 H_2O : 1000 ml

8 2,3,5 Larutan TTC (1%) : 4 ml

2. Prosedur kerja (Akhurst, 1980)

Kultur bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia diinkubasi dalam ruang gelap dengan suhu 25°C selama 48 jam. Koloni tunggal yang diperoleh dikarakterisasi untuk melihat adanya Rods dan warna koloni

pana adsorpsi Bromotymol Biru, kemudian disubkultur dalam media YS cair. Setelah 30 jam, bakteri tersebut disimpan dalam *freezer*, suhu – 80°C, dan siap untuk diidentifikasi (Akhurst, 1980).

4.5.3 Karakteristik morfologi dan biokimia bakteri *Photobacterium luminescens* Isolat Indonesia

Karakteristik morfologi bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia ditentukan dengan memperhatikan bentuk sel, panjang sel, lebar sel, diameter koloni dan pewarnaan Gram (Grewal, dkk, 1994).

Karakteristik biokimia bakteri *Photobacterium luminescens* dilakukan dengan uji pewarnaan Gram, motilitas, pembentukan Indol, reduksi Hidrogen Peroksida (katalase) dan pengujian bioluminescens pada serangga uji (Akhurst, 1980).

1. Alat dan Bahan yang digunakan :
 - a. Biakan murni bakteri *Photobacterium luminescens* Indonesia dalam medium nutrien-agar padat, berumur 24 jam.
 - b. Biakan murni bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia dalam medium nutrien- agar cair, berumur 24 jam.
 - c. *Petridish* steril.
 - d. Larutan H₂O₂ 30%.
 - e. Larutan H₂ O₂ 3%.
 - f. Larutan reagensia Kovacs.

- g. Larutan reagensia Ehrlich.
- h. Larutan reagensia Salkowski.
- i. Cat Gram A (cat Hucker s crystal violet).
- j. Cat Gram B (Lugol s Iodine).
- k. Cat Gram C (Alkohol).
- l. Cat Gram D (cat Safranin).
- m. Gelas obyek.
- n. Minyak imersi.
- o. Medium (Agar) Nutrient Broth yang terdiri dari :
 - 1. Standart-1- Nutrient Broth (Merck 7881) : 37 gram.
 - 2. Bromthymol Blue / Sigma : 25 gram.
 - 3. H₂ O : 1000 ml.
 - 4. 2,3,5 Larutan TTC (1%) : 4 ml.

2. Prosedur kerja

a. Cara Inokulasi

Medium nutrien agar tegak diinokulasi secara aseptik dengan biakan murni bakteri *Photorhabdus luminescens* memakai jarum inokulasi secara tusukan sampai kedasar tabung.

Medium nutrien agar miring diinokulasi secara aseptik dengan biakan murni bakteri *Photorhabdus luminescens* memakai jarum inokulasi secara goresan yang lurus.

b. Cara Inkubasi

Medium nutrisi agar yang telah diinokulasi diinkubasi pada temperatur kamar selama 48 jam.

c. Reduksi Hidrogen Peroksida

Tabung medium nutrisi agar yang diinokulasi dengan biakan murni bakteri *Photobacterium luminescens*, diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 2 hari. Kedalam tabung ditambahkan 2-3 ml larutan H₂O₂ 3% pada permukaan medium, jika terlihat adanya gelembung-gelembung O₂ disekeliling pertumbuhan bakteri, maka terjadi reduksi H₂O₂.

d. Pembentukan Indol

Tabung medium agar (*Nutrient Broth*) diinokulasi dengan biakan murni bakteri *Photobacterium* dan diinkubasi selama 4 hari pada temperatur 37 °C. Pembentukan indol dengan pengujian Kovacs, ke dalam tabung ditambahkan 5 ml larutan reagensia Kovacs, jika terbentuk warna merah pada lapisan larutan reagensia, hal ini menunjukkan terbentuknya indol.

Pembentukan indol dengan pengujian Ehrlich : ke dalam tabung ditambahkan eter, kemudian dikocok dan kemudian dibiarkan sampai terbentuk lapisan. Secara hati-hati ditambah larutan reagensia Ehrlich. Terbentuknya warna merah ungu dibawah lapisan ether menunjukkan terbentuknya Indol.

e. Pewarnaan Gram

Gelas obyek dibersihkan dengan alkohol agar bebas lemak, kemudian dipanaskan diatas nyala lampu. Secara aseptik mengambil suspensi bakteri *Photorhabdus luminescens* diambil dengan oser, lalu diratakan di permukaan gelas obyek, kemudian dikering anginkan dan difiksasi diatas nyala api lampu spiritus. Tetesi dengan larutan Gram A sebanyak 2-3 tetes selama 1 menit, kemudian dikering anginkan. Tetesi dengan cat Gram B sebanyak 2-3 tetes selama 1 menit, kemudian cuci dengan air mengalir dan kering anginkan. Tetesi dengan cat Gram C (peluntur cat) selama 30 detik lalu cuci dengan air mengalir, kemudian dikering anginkan. Larutan D (cat penutup/pembanding) kemudian ditetaskan, tunggu selama 2 menit, lalu cuci dengan air mengalir dan kering anginkan. Diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 X dan ditetesi dengan minyak imersi. Bakteri Gram (+) akan berwarna ungu / violet, sedangkan bakteri Gram (-) akan berwarna merah.

f. Bioluminescens pada serangga uji

Bioluminescens dilihat dari gejala serangan pada serangga *Galleria mellonella* (ulat bambu) yang mati terinfeksi oleh bakteri *Photorhabdus luminescens*. Isolat bakteri *Photorhabdus* diinfeksi pada *G. mellonella*, kemudian diinkubasi pada temperatur ruang selama 24 jam. Pengamatan dilakukan pada kadaver serangga ulat bambu untuk melihat perubahan warna yang terjadi pada kutikula. Bioluminescent dikatakan positif apabila kadaver serangga memancarkan sinar terang di ruangan yang gelap (*dark*

room), dan negatif apabila tidak memancarkan sinar terang ditempat yang gelap.

4.5.4 Pemiakan Bakteri *Photorhabdus luminescens*

1. Bahan untuk pembuatan medium padat, terdiri dari :

- a. Protease Pepton 2% : 1,2 gram
- b. Agar 1,5 % : 0,9 gram

2. Bahan untuk pembuatan medium cair, terdiri dari :

- a. Protease Pepton 2% : 1 gram
- b. Tween 80 0,5 % : 0,25 ml

3. Prosedur pemiakan bakteri *Photorhabdus*

Bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia yang telah dikarakterisasi kemudian ditanam dalam medium padat yang terdiri dari 2% PP3 dan 1% agar dengan suhu 28⁰ C, waktu inkubasi 48 jam. Koloni tunggal bakteri *Photorhabdus luminescens* yang tumbuh dalam medium padat ditumbuhkan pada medium cair yang terdiri dari 2%PP3 ditambah dengan 0,5 % Tween 80 dengan suhu 30⁰ C dan waktu inkubasi 48 jam. Bakteri yang tumbuh dalam medium cair ini kemudian dilakukan pemusingan dengan kecepatan 250 rpm dan disimpan dalam suhu kamar (Bowen dkk, 1998).

4.5.5 Pembuatan supernatan (Bowen and Ensigr, 1998).

1. Alat dan bahan

- a. Bakteri *Photorhabdus luminescens*

- b. Peptone Protease 2% : 1 gram
- c. Tween 80 0,5 % : 0,25 ml
- d. Tabung plastik
- e. Timbangan
- f. Sentrifuge
- g. 100 mM Tris Hcl (pH 7,5)
- h. Kertas filter diameter pori 0,2 um.

2. Prosedur pembuatan supernatan

Bakteri *Photobacterium luminescens* ditumbuhkan dalam medium yang terdiri dari *protease peptone* no: 3 (PP3) 2% ditambah dengan + 0,5 % Tween 80 dan diinkubasi pada suhu 30°C. Setelah 48 jam biakan bakteri diputar dengan menggunakan *sentrifuge* pada 10.000 g selama 20 menit. Cairan supernatan disaring dengan kertas saring yang berukuran 0,2 um, kemudian di *sentrifuge* lagi pada 500 x g selama 4 jam. Kemudian ditambah dengan larutan 100 mM Tris- HCL steril, pH 7,0 dan *disentrifuge* lagi dengan kecepatan yang sama selama 1 jam, kemudian disaring lagi. Cairan bening yang selanjutnya disebut sebagai supernatan dipindah ke dalam tabung reaksi.

4.5.6 Karakterisasi Supernatan

1. Penentuan konsentrasi supernatan

A. Bahan dan alat

- a. Coomassie brilliant blue G250 (CBB G250) : 100 mg
- b. 95 % Etanol : 50 ml
- c. 85 % Asam Phosphorit (85 % Phosphorit acid) : 100 ml
- d. Air distilasi : 1 Liter
- e. Protein Bovine Serum Albumin (BSA)
- f. Kertas saring Whatman No :1
- g. Vortek
- h. Spektrofotometer

B. Prosedur

Konsentrasi supernatan ditentukan berdasarkan metode *Bradford* (1976) dan sebagai standar protein digunakan protein *bovine serum albumine* (BSA). Larutan *Bradford* dibuat dengan melarutkan 100 mg *coomassie brilliant blue* G250 (CBB G250) dengan 50 ml 95% etanol. Pada larutan tersebut tambahkan 100 ml 85% asam phosphorit dan kemudian ditambah dengan air distilasi sampai volume menjadi 1 liter, kemudian diaduk terus sampai homogen. Larutan *Bradford* tersebut kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman no. 1 dan dimasukkan kedalam botol berwarna gelap untuk menghindari pengaruh sinar.

Untuk menghitung konsentrasi supernatan dibuat kurva standar menggunakan protein BSA dengan konsentrasi yang bervariasi.

Tabel 4.1 standar protein BSA dengan konsentrasi yang bervariasi

Nomor Tabung	Stok lar. BSA (μL)	Jumlah Protein (μg)	Akuades (μL)	Lar. Bradford (ml)
1	0	0	100	1
2	2,5	2.5	97.5	1
3	5,0	5.0	95	1
4	10	10	90	1
5	15	15	85	1
6	20	20	80	1
7	25	25	75	1
8	30	30	70	1

Seluruh tabung divortek dan lalu didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit. Setelah 15 menit lalu optical density (OD) diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Grafik kurva standar dibuat dengan linier regresi. Untuk pengukuran konsentrasi protein supernatan, 50 μL supernatan ditambah 50 μL akuades dan 1 ml larutan *Bradford*.

2. Uji *zimogram* aktivitas proteolitik supernatan

Uji *zimogram* dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim proteolitik dari supernatan. Langkah-langkah yang dilakukan dalam uji *zimogram* adalah sebagai berikut :

a. Elektroforesis supernatan secara *native*-PAGE.

- b. *Blotting* pada gel akrilamide yang mengandung substrat gelatin.
- c. Inkubasi dan pengecatan gel.

a. Elektroforesis supernatan secara *Native-PAGE*

Supernatan dielektroforesis secara *Native-PAGE* pada konsentrasi akrilamide 12% dengan arus listrik sebesar 50 volt selama 5-6 jam.

Tabel 4.2 Bahan / komposisi gel akrilamide untuk *Native-PAGE*

Bahan kimia	<i>Separating gel</i> (12%)	<i>Stacking gel</i> (4.5%)
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	5 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	1.875 ml
Akrilamide (30%)	8 ml	1.125 ml
Aquadest	7 ml	4.5 ml
Temed	10 μ l	5 μ l
10% Amonium persulfat (APS)	100 μ l	50 μ l
Total	20 ml	7.5 ml

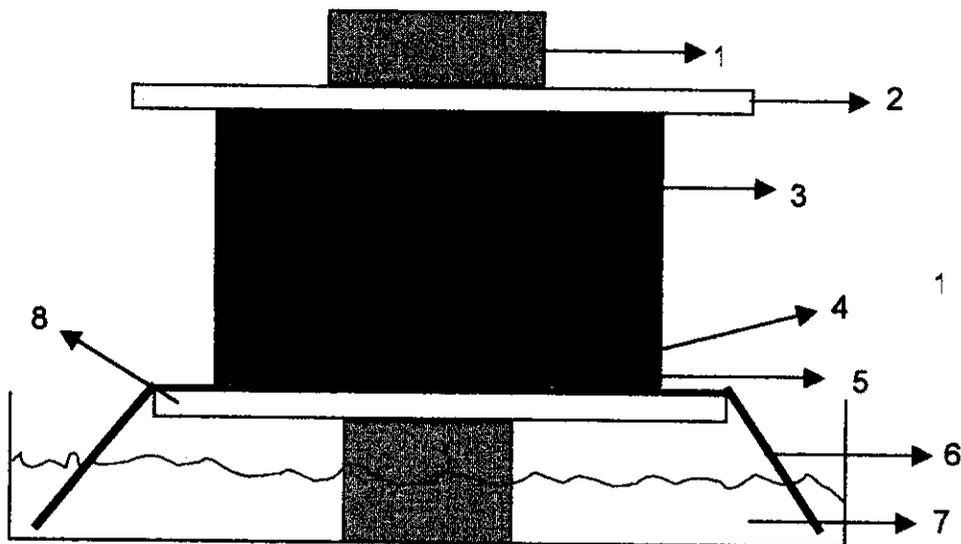
Tabel 4.3 Bahan / komposisi gel yang mengandung substrat enzim proteolitik (1% gelatin) untuk analisis *zimogram*

Bahan kimia	<i>Separating gel</i> (12%)
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	5 ml
Akrilamide (30%)	8 ml
Aquadest yang mengandung gelatin 0.2 g	7 ml
Temed	10 μ l
10% Amonium persulfat (APS)	100 μ l
Total	20 ml

b. Proses *blotting*

Protein-protein dalam supernatan yang telah dipisahkan dengan elektroforesis secara *native*-PAGE dipindahkan ke gel akrilamide yang mengandung substrat 1% gelatin dengan cara *blotting*.

Cara kerja / proses *blotting*(dilakukan pada suhu 4°C selama satu malam).



Gambar 4.1 Metode *blotting* untuk analisis aktivitas enzim proteolitik supernatan menggunakan gelatin sebagai substrat

Keterangan :

1. Beban pemberat
2. Kaca pemberat
3. Lapisan kertas isap
4. Gel akrilamide yang mengandung substrat gelatin
5. Gel akrilamide hasil elektroforeisi secara *native*

6. Kertas saring whatman
7. Bufer elusi
8. Kaca penyangga

c. Inkubasi dan pengecatan gel

Gel akrilamide hasil *blotting* diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam untuk menghidrolisis gelatin. Setelah proses hidrolisis, gel diwarnai dengan pewarna 0.5% *amido black* dalam 7% asam asetat. Gel yang telah diwarnai, kemudian dilakukan *destaining* (peluruhan warna) dengan 7% asam asetat sampai muncul *band* warna putih.

4.5.7 Purifikasi

Supernatan yang masih berupa protein kompleks mempunyai toksisitas terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*. Untuk mendapatkan protein tunggal maka dilakukan fraksinasi dengan alat *fraction collector*, kemudian dianalisis secara SDS-PAGE. Sebelum dilakukan fraksinasi supernatan dipadatkan terlebih dahulu dengan cara *Freeze Dry*.

1. Bahan untuk proses SDS-PAGE
 - a. PBS (Phospat Buffer Saline) = Larutan garam faali

- b. Larutan dapar Elektroforesis pH = 8,3
 - c. Tris HCL pH = 8,8 dan 6,8
 - d. Bis Acrylamid
 - e. SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)
 - f. Aquadest
 - g. Temed
 - h. APS (Amonium Per Sulfate) 10%
 - i. Butanol 50 %
 - j. Larutan dapar lamlli
2. Bahan untuk pencucian gel
- a. Metanol 50% dan metanol 5%
 - b. Asam asetat 7,5 %
 - c. Glutaraldehyd 5 %
3. Bahan untuk pengecatan
- a. 70% NaOH 0,36%
 - b. NH₃ 25 %
 - c. AgNO₃
 - d. Asam asetat 10 %
 - e. Formaldehyd
 - f. Larutan Gliserin 5 – 10%
 - g. Alkohol 70 %
 - h. Kertas Whatman

4. Alat-alat untuk proses SDS-PAGE

- a. Sonicator 30 get / det
- b. Water bath
- c. Pemusing : *Fisher* model 59, dengan out put 10.000 rpm
- d. Gelas ukur 50 ml dan gelas ukur 250 ml
- e. Pipet eppendorf dengan tip ukuran 100 ul dan 500 ul
- f. Eppendorf tube ukuran 1,5 ml
- g. Erlenmeyer
- h. Becker glass
- i. Cawan petri besar dengan diameter 25 cm
- j. *Strirer Thermolyne* dengan magnetic stir bar
- k. Shaker HS 500
- l. Pipet ukuran 1 ml, 5 ml dan 10 ml
- m. Jarum suntik / *disposable syringe*
- n. Timbangan analitik *Sartorius Portble*
- o. Seperangkat alt Minigel Twin G-24 (Model Biometra) yang terdiri:
Sepasang gelas plat, 3 pasang klip, sebuah *comb*, *silicon rubber seal*,
dan main *camber*.

5. Formula *separating gel* (12,5 %)

- | | |
|----------------------|--------|
| a. Tris HCL ph = 8,8 | 1,2 ml |
| b. Bis Acrylamid | 2,4 ml |

c. SDS 10%	1,2 ml
d. Aquadest	1,1 ml
e. TEMED	5 ul
f. APS 10 %	30 ul

Volume yang dibutuhkan 6 ml / gel

6. Formula *stacking* (sammel) gel

a. Tris HCL ph = 6,8	1,2 ml
b. Bis Acrylamid	2,5 ml
c. SDS 10 %	0,6 ml
d. Aquadest	1,1 ml
e. TEMED	5 ul
f. APS 10%	30 ul

Volume yang dibutuhkan 2 ml / gel.

7. Prosedur SDS-PAGE

- Sepasang gelas plat dari Minigel Twin G-42 dibersihkan dengan alkohol 70% untuk menghilangkan sisa-sisa lemak / detergent.
- Diantara kedua gelas plat tersebut dipasangkan *silicon rubber seal* kemudian klip dipasangkan pada sisi kanan, kiri dan bawah untuk berdiri.
- Campuran formula dari *Separating gel* dimasukkan diantara (sela-sela) gelas plat dengan menggunakan pipet 10 ml.

- d. Kemudian ditambahkan larutan butanol 10% untuk meratakan permukaan gel dan dibiarkan selama 15 menit untuk menunggu proses polimerisasi.
- e. Setelah gel mengeras larutan butanol diatas gel tersebut dibuang sisanya dibersihkan dengan kertas Whatman.
- f. Campuran formula dari *Stacking gel* dimasukkan diatas *Separating gel* hingga penuh, dan *comb* diselipkan pada *Stacking gel* untuk membuat cetakan.
- g. Proses polimerisasi ditunggu selama 5-10 menit.
- h. Setelah gel mengeras *comb* diambil dan gel dicuci dengan larutan dapar elektroforesis kemudian seal dilepas.
- i. Plat yang berisikan gel dipindahkan dalam main *chamber* dan untuk medium perpindahan elektron dipergunakan larutan dapar elektroforesis (*running buffer*).
- j. Sepasang gelas plat dari Minigel Twin G-42 dibersihkan dengan alkohol 70% untuk menghilangkan sisa-sisa lemak/detergent.
- k. Diantara kedua gelas plat tersebut dipasangkan *silicon rubber seal* kemudian klip dipasangkan pada sisi kanan, kiri dan bawah untuk berdiri.
- l. Campuran formula dari *Separating gel* dimasukkan diantara (sela-sela) gelas plat dengan menggunakan pipet 10 ml.
- m. Kemudian ditambahkan larutan butanol 10% untuk meratakan permukaan gel dan dibiarkan selama 15 menit untuk menunggu proses polimerisasi.

- n. Setelah gel mengeras larutan butanol diatas gel tersebut dibuang sisanya dibersihkan dengan kertas *Whatman*.
- o. campuran formula dari *Stacking gel* dimasukkan diatas *Separating gel* hingga penuh, dan *comb* diselipkan pada *Stacking gel* untuk membuat cetakan.
- p. Proses polimerisasi ditunggu selama 5-10 menit.
- q. Setelah del mengeras *comb* diambil dan gel dicuci dengan larutan dapar elektroforesis kemudian seal dilepas.
- r. Plat yang berisikan gel dipindahkan dalam main *chamber* dan untuk medium perpindahan elektron dipergunakan larutan dapar elektroforesis (*running buffer*).
- s. Gelembung- gelembung udara yang terdapat di dasar gel dihisap dengan *disposabl syringe*.
- t. Protein toksin hasil purifikasi dimasukkan dalam cetakan dari *comb* dengan volume 15 ul.
- u. Pada cetakan gigi paling kanan dimasukkan marker.
- v. *Chamber* ditutup dan arus listrik dinyalakan (proses *running*) dengan kuat arus 10 Ampere dan Voltage 30 Volt (pada *Stacking gel*).
- w. Setelah proses *running* berjalan hingga mencapai *Separating gel* kuat arus ditambah hingga mencapai 25 Ampere dan 90 Volt.
- x. Proses *running* selesai dengan ditandai keluarnya protein dan larutan dan larutan dapar lamlli dari gel menuju ke medium.

- y. Kemudian dilakukan pencucian gel.
8. Proses pencucian gel dan fiksasi
- Gelas plat yang berisi gel tersebut dibuka dan gel dipotong hingga batas antara *Separating gel* dan *Stacking gel* dibuang.
 - Potongan dari *Separating gel* yang tersisa direndam dalam cairan step I yang berisi 100 ml metanol 50 % dan 100 ml asam asetat 7,5 % dan dimasukkan dalam petri besar.
 - Kemudian dilakukan proses *Shaking* selama 30 menit.
 - Setelah itu cairan Step I dibuang dan diganti dengan cairan Step II yang berisi 100 ml metanol 5 % dan 100 ml asam asetat 7,5 % dan dilakukan *Shaking* seperti Step I.
 - Kemudian cairan Step II dibuang dan diganti dengan cairan cairan Step III yang berisi 40 ml glutaraldehid 5 % dan 200 ml aquadest, lalu dilakukan *shaking* seperti tahap diatas dengan waktu yang sama.
 - Caran step III dibuang diganti dengan aquadest dan dilakukan proses yang sama dengan waktu 2 jam baru dilakukan pengecatan.
9. Pengecatan silver
- Formula cat untuk Silver
 - NaOH 0,36 % 42 ml
 - NH₃ 25 % 2,8 ml
 - Aquadest 147 ml
 - 1,6 gram Ag NO₃ dalam 8 ml aquadest.

2. Cara pembuatan :

- a. Ketiga larutan tersebut (NaOH 0,36 %; NH₃ 25 % dan aquadest) dicampur dalam erlenmeyer dan dimasukkan magnetic stir bar.
- b. Erlenmeyer di tempatkan diatas stir yang telah dinyalakan , kemudian dimasukkan larutan AgNO₃ melalui kertas filter dan ditunggu hingga homogen.
- c. Setelah homogen stir dimatikan dan larutan dapat digunakan untuk bahan cat.

3. Tahap-tahap pengecatan

1. Bahan cat tersebut dituang dalam cawan petri besar yang telah berisi gel dan dilakukan *Shaking* selama 15 menit.
2. Setelah selesai bahan cat dibuang dan diganti dengan aquadest lalu dilakukan *shaking* dengan waktu 2X2 menit.
3. Aquadest dibuang dan diganti dengan larutan yang terdiri dari campuran asam sitrun 200 ul. Formaldehid 100 ul dan aquadest 200 ml.
4. Dilakukan proses *shaking* yang sama seperti diatas hingga terlihat gambaran dari pita protein.
5. Setelah warna cukup tajam, cairan dibuang dan diganti dengan cairan asam asetat 10 % untuk menghentikan pross pengecatan (yang sebelumnya dibilas dahulu dengan aquadest (Griffin, dkk, 1994).

4.5.8 Pengujian toksisitas toksin protein Bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*

Dalam pengujian toksisitas protein terhadap serangga uji, stimulus diaplikasikan pada subyek dalam serial unit konsentrasi (dosis) dan atau waktu, sedang respon berupa angka kematian (mortalitas) dari larva uji.

Pengujian ini dilakukan dalam 2 tahap, yaitu tahap uji pendahuluan dan tahap pengujian akhir.

1. Pengujian pendahuluan

Pengujian pendahuluan dilakukan dengan tujuan untuk menentukan variasi dan interval konsentrasi / dosis yang akan digunakan didalam pengujian akhir. Pengujian pendahuluan cukup dilakukan 1 kali ulangan dalam satu serial konsentrasi / dosis dari dosis minimal yang dapat menyebabkan kematian 100 % serangga uji sampai dengan konsentrasi atau dosis yang tidak mampu mematikan serangga uji.

2. Pengujian akhir

Pengujian akhir dilakukan dalam satu serial konsentrasi / dosis dari dosis / konsentrasi yang menyebabkan kematian 100% sampai dengan dosis/konsentrasi yang menyebabkan kematian serangga uji 5 % berdasarkan hasil pengujian pendahuluan, ditambah 1 kelompok kontrol. Pengujian ini dilakukan 3 kali ulangan. Penghitungan jumlah kematian

dilakukan pada masa dedah 24 jam dan masa dedah 48 jam. Data yang diperoleh dianalisis dengan metode Probit Analisis.

3. Tes kepekaan larva nyamuk terhadap insektisida (WHO,1976)

- a. Setiap percobaan yang lengkap, dikumpulkan sejumlah kira-kira 300 larva nyamuk. Larva berada dalam stadium ketiga akhir atau keempat awal bersama air tempat asal larva, sampai waktu percobaan dapat diselenggarakan. Larva-larva yang menunjukkan bentuk tidak normal disingkirkan dan tidak diikutsertakan dalam percobaan. Sejumlah 20-25 larva dimasukkan kedalam sebuah beker gelas kecil berisi 25 ml air suling. Pemindahan larva dikerjakan dengan pipet. Disediakan 12 beker gelas kecil berisi larva untuk percobaan.
- b. Kedalam 12 beker gelas besar berukuran 500 ml dimasukkan 225 ml air suling. Temperatur air dengan menggunakan termometer diperiksa dan selama berlangsungnya percobaan berkisar antara 24-30 derajat Celcius.
- c. Kedalam masing-masing beker gelas, dimasukkan 1 ml insektisida yang sudah dibuat dengan konsentrasi tertentu yang telah dibuat sebelumnya. Dengan menggunakan semperit 3 ml dengan cara mengisap, disemprotkan berulang-ulang agar larutan insektisida menjadi homogen. Dalam membuat berbagai konsentrasi larutan insektisida, terlebih dahulu dibuat larutan yang paling pekat. Pada setiap konsentrasi larutan insektisida, dilakukan 2 kali percobaan ulang, demikian juga terhadap

- larutan kontrol. Larutan kontrol dibuat dengan menambahkan 1ml etanol pada 225 ml air suling.
- d. 20 menit sesudah dibuat larutan insektisida, larva nyamuk dituangkan bersama 25 ml air sulingnya dari beker gelas 25 ml ke dalam beker gelas 500 ml.
 - e. Perhitungan angka kematian larva nyamuk dikerjakan sesudah terjadi kontak dengan insektisida selama 24 Jam. Larva yang mati dihitung jumlah keseluruhannya.
 - f. Percobaan harus diulang apabila lebih dari 10% larva kontrol berubah menjadi pupa atau bila lebih dari 20% larva kontrol mati.
 - g. Diantara angka kematian 10% dan angka kematian 90% paling sedikit harus dilakukan 3 kali percobaan penghitungan angka kematian.

4.6 Analisis Data

4.6.1 Variabel bebas

Variabel bebas di dalam penelitian ini adalah protein toksin yang dihasilkan oleh bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia dalam serial konsentrasi dan serial waktu.

4.6.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung yang diamati dalam penelitian ini adalah angka kematian (mortalitas) larva nyamuk *Aedes aegypti*, untuk menetapkan LC_{50}

(konsentrasi yang diperlukan agar populasi serangga uji mengalami kematian sebesar 50 %).

4.6.3 Variabel kendali

Variabel yang disamakan dalam penelitian ini adalah:

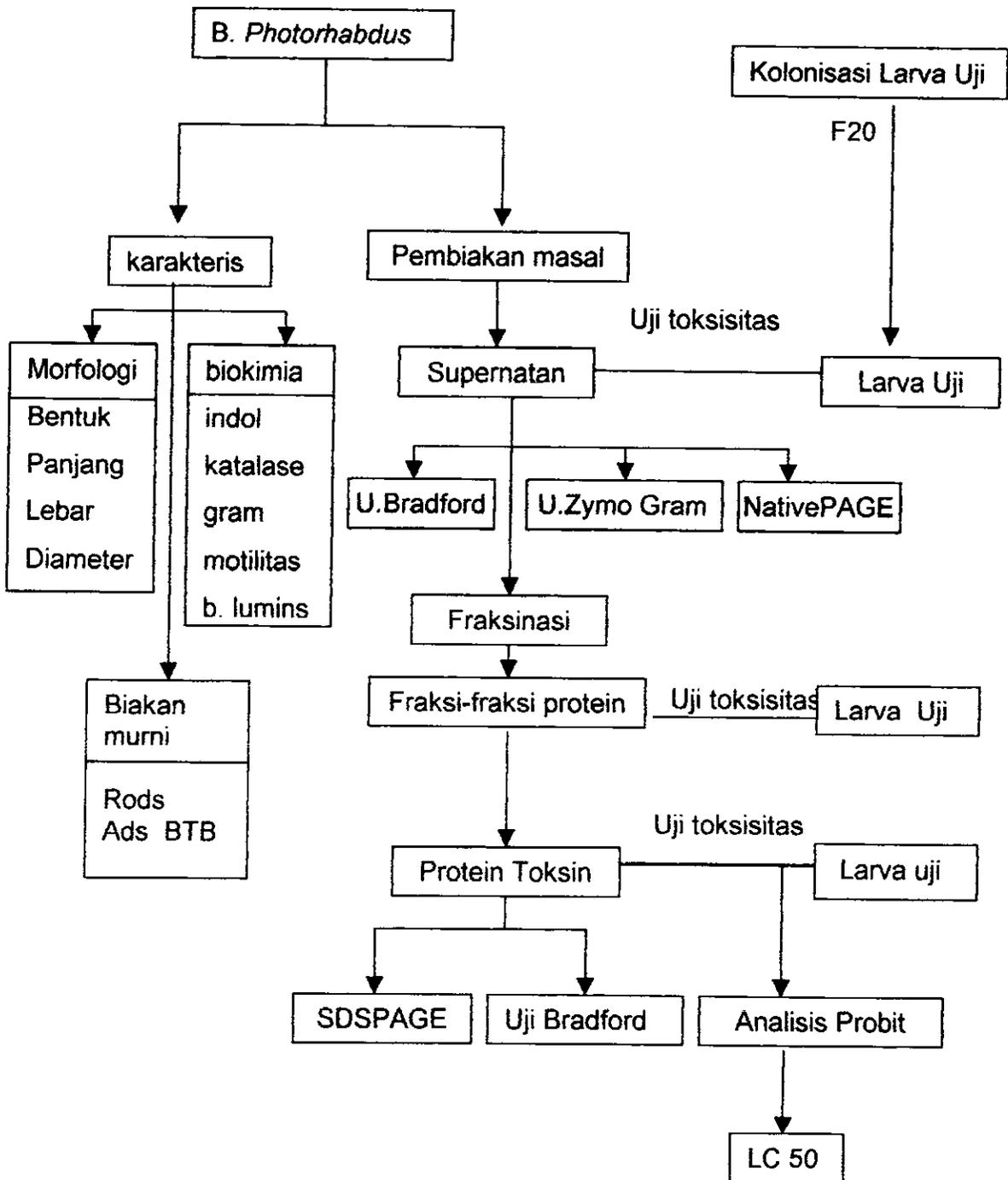
- | | |
|-------------------------|----------------------------|
| a. Larva uji | d. Lingkungan laboratorium |
| b. lama pengujian | e. <i>Deionized water</i> |
| c. Besarnya konsentrasi | |

4.6.4 Uji statistik

Analisis probit dipakai untuk pengujian toksisitas insektisida terhadap serangga. Besarnya toksisitas ditetapkan berdasarkan nilai LC_{50} (Yule dan Kendal, 1990). Data sudah dikoreksi dengan *formula Abbots*, jika angka kematian (AK) dari kelompok kontrol antara 5-10%, maka AK larva nyamuk yang diberi isolat bakteri simbion dikoreksi dengan rumus :

$$AK = \frac{AK(\%) \text{ uji} - AK(\%) \text{ kontrol}}{100 - AK(\%) \text{ kontrol}} \times 100$$

4.7 Kerangka Operasional



BAB V

BAB V

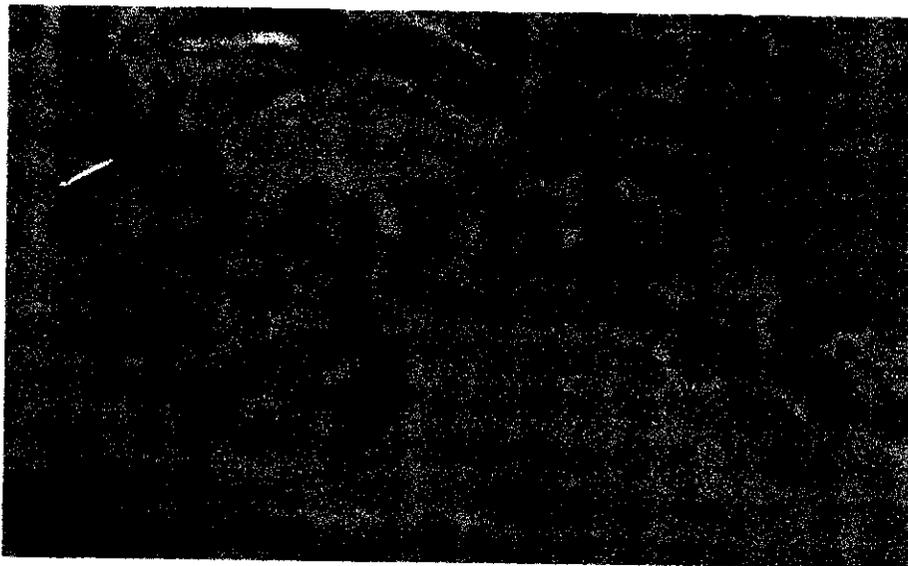
HASIL PENELITIAN



5.1 Karakterisasi Bakteri *Photorhabdus luminescens* Isolat Indonesia

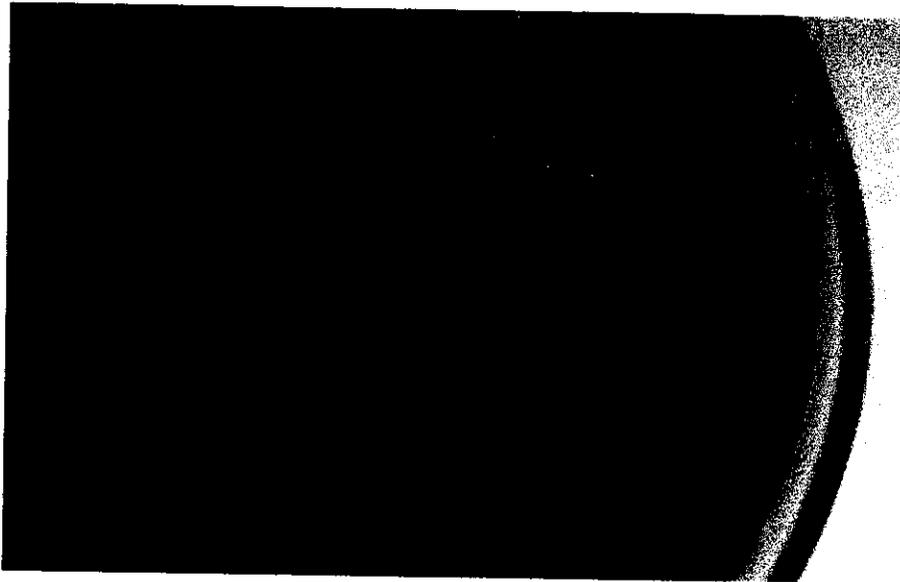
Bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman Universitas Jember.

5.1.1 Karakterisasi biakan murni bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia.



Gambar 5.1 Biakan murni bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia dalam nutrient Broth kultur (masa inkubasi 48 jam). tanda panah (lihat gambar) menunjukkan *rods* .

Biakan murni bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia dalam NBTA (masa inkubasi 48 jam) untuk melihat absorsi bromotimol biru.



Gambar 5.2 Adsorpsi Bromothymol biru dalam NBTA, koloni bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia berwarna hijau *Igreenish* (lihat tanda panah).

5.1. 2 Karakterisasi morfologi bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia

Karakter morfologi bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia dilakukan dengan menumbuhkan pada medium agar (masa inkubasi 48 jam) meliputi: bentuk sel, panjang sel, lebar sel, diameter koloni, warna sebelum pewarnaan dan pewarnaan Gram.

Tabel 5.1. Hasil pengamatan karakterisasi morfologi

Bentuk sel	Batang
Warna	putih(tanpa pewarnaan)
Panjang sel	1,99 μm
Lebar sel	1,80 μm
Diameter koloni	1,55 mm
Pewarnaan Gram	Merah (-)

5.1.3. Karakterisasi Biokimia bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia

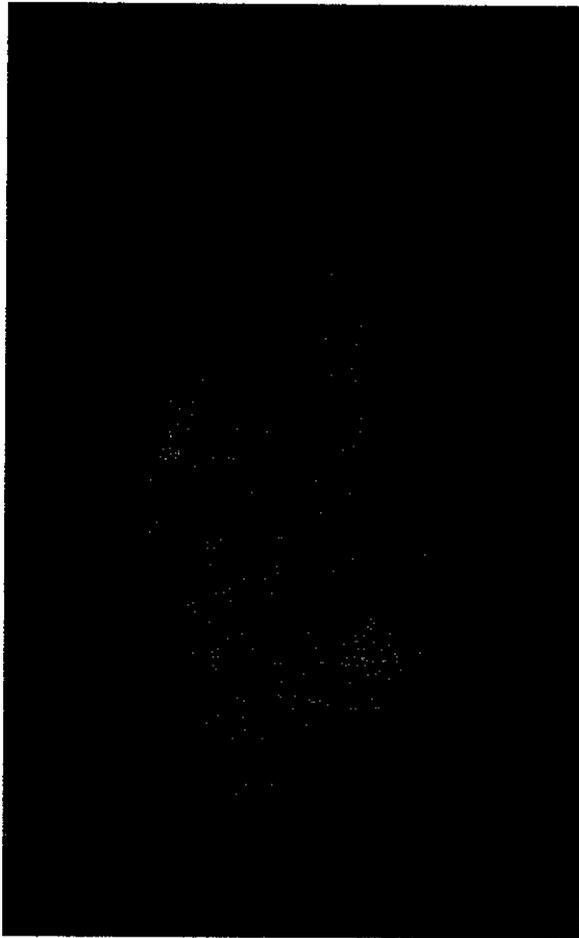
Karakter biokimia dilakukan dengan menumbuhkan pada medium agar (masa inkubasi 48 jam), meliputi: pembentukan indol, motilitas, uji katalase dan uji Bioluminescens.

Tabel 5. 2. Hasil pengamatan karakterisasi biokimia

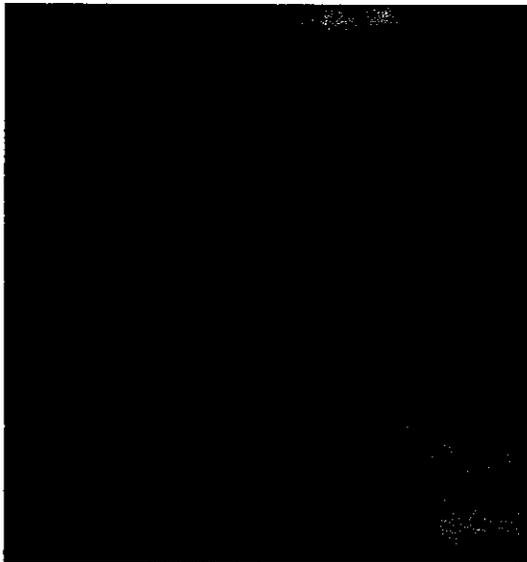
Pembentukan Indol	(+)
Reduksi H_2O_2 / Katalase	(+)
Motilitas	(-)
Bioluminescens pada serangga uji	bersinar putih kekuningan (+)

Uji bioluminescens bakteri *Photorhabdus luminescens* isoat Indonesia dilakukan pada larva *Galleria mellonella*.

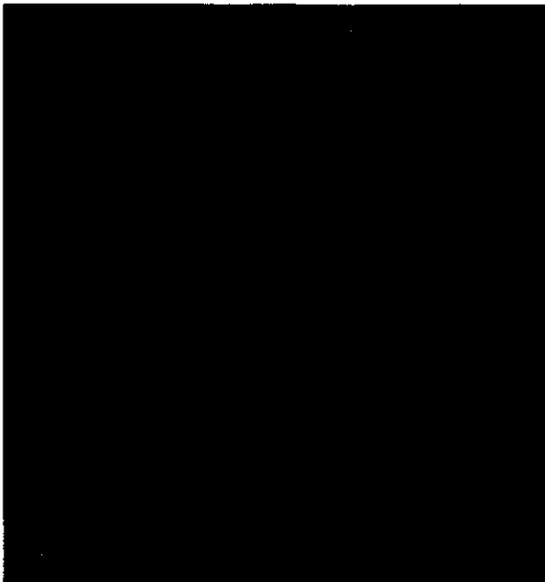
UJI bioluminescens bakteri *Photorhabdus luminescens* isoat Indonesia dilakukan pada larva *Galleria mellonella*.



Gambar 5.3 Hasil uji bioluminescens bakteri *Photorhabdus* pada serangga *Galleria mellonella*. Nampak pada ruang gelap (*dark room*) memancarkan sinar terang berwarna putih kekuningan

**Motilitas (-)**

Gambar 5.4 Hasil uji motilitas bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia, nampak pada gambar bahwa motilitasnya negatif.

**Indol (+)**

Gambar 5.5 Hasil pengujian Indol bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia. Terbentuknya lapisan cincin menunjukkan indol nya positif.



Katalase (+)

Gambar 5.6 Hasil uji Katalase bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia. Adanya gelembung *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia. Adanya gelembung- gelembung putih nenunjukkan Katalase (+)



Gram (-)

Gram 5.7 bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia berwarna merah (bakteri Gram negatif)

5.2 Kolonisasi larva uji

Larva nyamuk *Aedes aegypti* yang digunakan dalam penelitian ini ditangkap dari kecamatan Sawahan Surabaya dan telah dikolonisasi di laboratorium Entomologi Kedokteran TDC Universitas Airlangga sampai pada F 20.

laboratorium Entomologi Kedokteran TDC Universitas Airlangga sampai pada F 20.

5.2.1. Kondisi Lingkungan Laboratorium

Hasil pengukuran kondisi lingkungan Laboratorium Entomologi Kedokteran TDC Univ. Airlangga, tempat dimana penelitian ini dilakukan dan faktor-faktor luar secara ringkas disajikan sebagai berikut :

Tabel 5. 3 Kondisi suhu ruang dan kelembaban nisbi ruang

Bulan (Th2001-2002)	Temperatur (°C)			Kelembaban
	Min	Max.	rata-rata	
Februari	26,5	26,7	26,6	80
Maret	26,8	27	26,9	80
April	27	27,4	27,2	79
Mei	27,1	27,3	27,2	79
Juni	27	27,4	27,1	79
Juli	27	27,3	27,1	79
Agustus	26,9	27,2	27	80
September	27,5	27,8	27,6	80
Oktober	27	27,6	27,4	80
November	26,9	27,2	27	80
Desember	26,8	27,1	26,9	81
Januari	26,8	27,2	27	80

Kondisi suhu air PDAM : 27 °C Kondisi suhu *Deionized Water* : 27 °C

PH *Deionized Water* : 7,5 % PH *Deionized Water* : 7,5 %

pH air PDAM : 7,7 %

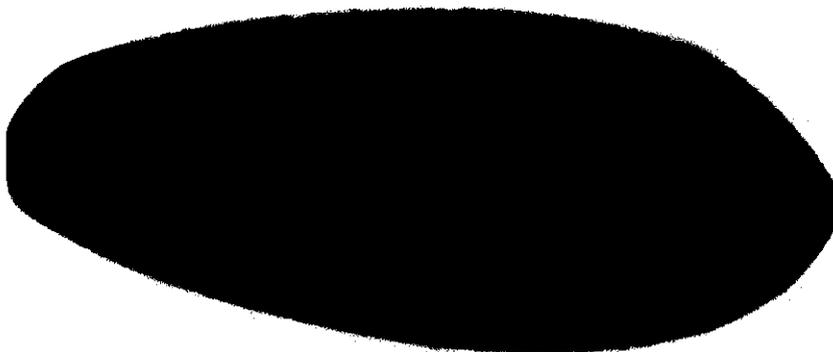
5.2.2 Koleksi Telur.

Telur nyamuk *Aedes aegypti* mulai dikoleksi setelah mencapai keturunan (F) yang ke 20 sejak dilakukan kolonisasi di dalam laboratorium Entomologi Fakultas kedokteran TDC Univ. Airlangga.



Gambar 5.8 Hasil pengamatan telur nyamuk *Aedes aegypti* secara makroskopik warna hitam, bentuk oval, keadaan ditempat penelitian menempel pada kertas saring pada batas permukaan air, letaknya sendiri-sendiri, menetas dalam waktu 2 hari.

Exochorion (dinding luar) dari telur nyamuk *Aedes aegypti* membentuk gambar garis-garis yang menyerupai sarang labah-labah.



Gambar 5.9 Hasil pengamatan telur nyamuk *Aedes aegypti* secara mikroskopis. Dilakukan dengan mikroskop fase kontras pembesaran 40X : bentuknya bulat lonjong, warna coklat tua, kelihatan adanya garis-garis yang mirip sarang labah-labah.

5.2.3 Pemeliharaan larva

Larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* yang ditetaskan dari telur hasil kolonisasi yang sudah mencapai keturunan yang ke 20 (F 20) diidentifikasi dibawah mikroskop untuk melihat ciri-cirinya. Sebelum dilakukan pengamatan larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* hasil kolonisasi ini dibuat preparat awetan terlebih dahulu untuk memudahkan pengamatan. Larva instar IV ini lah yang nantinya sebagai larv uji di dalam penelitian ini.



Gambar 5.10 Hasil pemotretan larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* dibawah mikroskop fase kontras dengan pembesaran 40X. Nampak tubuhnya terdiri dari bagian kepala, dada dan perut. Corong pernafasan bentuknya gemuk (lihat tanda panah).

5.2.4 Pemeliharaan pupa.

Pupa hasil kolonisasi dilakukan pengamatan di bawah mikroskop Fase kontras.



Gambar 5.11 Hasil pemotretan pupa nyamuk *Aedes aegypti* dibawah mikroskop fasekontras dengan pembesaran 40X. nampak bahwa bagian kepala bersatu dengan bagian dada, bentuknya seperti koma, posisinya menggantung.

dan uji enzim proteolitik dengan zymogram.

5.6.1 Pengujian pendahuluan

Pengujian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui konsentrasi supernatan yang dapat mematikan larva uji sebesar 100 % sampai dengan kontrol

Tabel 5.5 Hasil pengujian pendahuluan jumlah (%) kematian larva nyamuk uji dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dari supernatan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia dalam kondisi kamar, temperatur 27°C dan kelembaban 80 %.

Serial pengenceran	jumlah (%) kematian larva uji	
	Lama pendedahan 24 jam	Lama pendedahan 48 jam
0,1	100	100
0,01	40	50
0,001	10	10
Kontrol (air)	0	0
Kontrol (PP3)	0	0
Kontrol (Tween 80)	0	0

5.6.2 Tahap pengujian akhir

Dalam tahap pengujian akhir dibuat serial konsentrasi berdasarkan hasil pengujian pendahuluan. Pengujian akhir dilakukan tiga (3) kali ulangan.

Tabel 5.6 Replika 1 Hasil pengujian akhir jumlah (%) kematian larva nyamuk uji dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dari supernatan bakteri *Photobacterium luminescens* dalam kondisi kamar, temperatur 27°C dan kelembaban 80 %.

Serial pengenceran	jumlah (%) kematian larva uji	
	Lama pendedahan 24 jam	Lama pendedahan 48 jam
0,100	100	100
0,050	90	100
0,025	80	80
0,013	40	50
0,010	40	40
0,005	30	40
0,0025	20	20
0,00125	10	10
0,00100	10	10
Kontrol (air)	0	0
Kontrol (PP3)	0	0
Kontrol (Tween 80)	0	0

Tabel 5.7 Replika 2. Hasil pengujian akhir jumlah (%) kematian larva nyamuk uji dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dari supernatan bakteri *Photobacterium luminescens* dalam kondisi kamar, temperatur 27°C dan kelembaban 80 %.

Serial pengenceran	jumlah (%) kematian larva uji	
	Lama pendedahan 24 jam	Lama pendedahan 48 jam
0,10	100	100
0,05	80	100
0,025	80	90
0,0125	50	50
0,010	40	40
0,005	40	40
0,0025	20	20
0,00125	10	10
0,001	0	10
Kontrol (air)	0	0
Kontrol (PP3)	0	0
Kontrol (Tween 80)	0	0

Tabel 5.8 Replika 3. Hasil pengujian akhir jumlah (%) kematian larva nyamuk uji dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dari supernatan bakteri *Photobacterium luminescens* dalam kondisi kamar, temperatur 27°C dan kelembaban 80 %.

Serial pengenceran	jumlah (%) kematian larva uji	
	Lama pendedahan	Lama pendedahan
	24 jam	48 jam
0,1	100	100
0,05	100	100
0,025	90	90
0,0125	50	60
0,010	40	50
0,005	30	40
0,0025	20	40
0,00125	10	10
0,001	10	10
Kontrol (air)	0	0
Kontrol (PP3)	0	0
Kontrol (Tween 80)	0	0

Tabel.5.9 Rata-rata Jumlah (%) kematian larva uji pada R1, R2, R3 hasil Pengujian akhir Toksisitas Supernatan dari berbagai seri pengenceran dengan jumlah larva uji Tiap-tiap replikan 10 ekor, dengan masa dedah 24Jam. Dilakukan pada suhu kamar, temperatur 27°C dan kelembaban nisbi 80%.

Seri Pengenceran	Jumlah (%) Kematian larva Uji			Rata-rata
	Replika 1	Replika 2	Replika 3	
0,1	100	100	100	100,00
0,05	90	80	100	90,00
0,025	80	80	90	80,33
0,0125	40	50	50	46,60
0,010	40	40	40	40,00
0,005	30	40	30	33,33
0,0025	20	20	20	20,00
0,00125	10	10	10	10,00
0,001	10	0	10	6,60
Kontrol (air)	0	0	0	0,00
Kontrol (PP3)	0	0	0	0,00
Kontrol (Tween 80)	0	0	0	0,00

Berdasarkan Analisis Probit diperoleh $LC_{50} = 0,0129$, dengan kisaran batas bawah (lower) = 0,00091 dan kisaran batas atas (upper) = 0,06.

(Grafik pada lampiran 2, halaman 145)

Tabel 5.10 Rata-rata Jumlah (%) kematian larva uji pada R1, R2, R3 hasil Pengujian akhir Toksisitas Supernatan dari berbagai seri pengenceran dengan jumlah larva uji Tiap-tiap replikan 10 ekor, dengan masa dedah 48 Jam. Dilakukan pada suhu kamar, temperatue 27°C dan kelembaban nisbi 80%.

Seri Pengenceran	Jumlah (%) Kematian larva Uji			Rata – rata
	Replika 1	Replika 2	Replika 3	
0,1	100	100	100	100,00
0,05	100	100	100	100,00
0,025	80	90	90	86,60
0,0125	50	50	60	53,33
0,010	40	40	50	43,33
0,005	40	40	40	40,00
0,0025	20	20	40	26,60
0,00125	10	10	10	10,00
0,001	10	10	10	10
Kontrol (air)	0	0	0	0,00
Kontrol (PP3)	0	0	0	0,00
Kontrol (Tween 80)	0	0	0	0,00

Berdasarkan analisis probit diperoleh $LC_{50} = 0,0119$, dengan kisaran batas bawah (lower) = 0,0005 dan kisaran batas atas (upper) = 0,06.

(Grafik pada lampiran 2, halaman 145)

5.7 Purifikasi

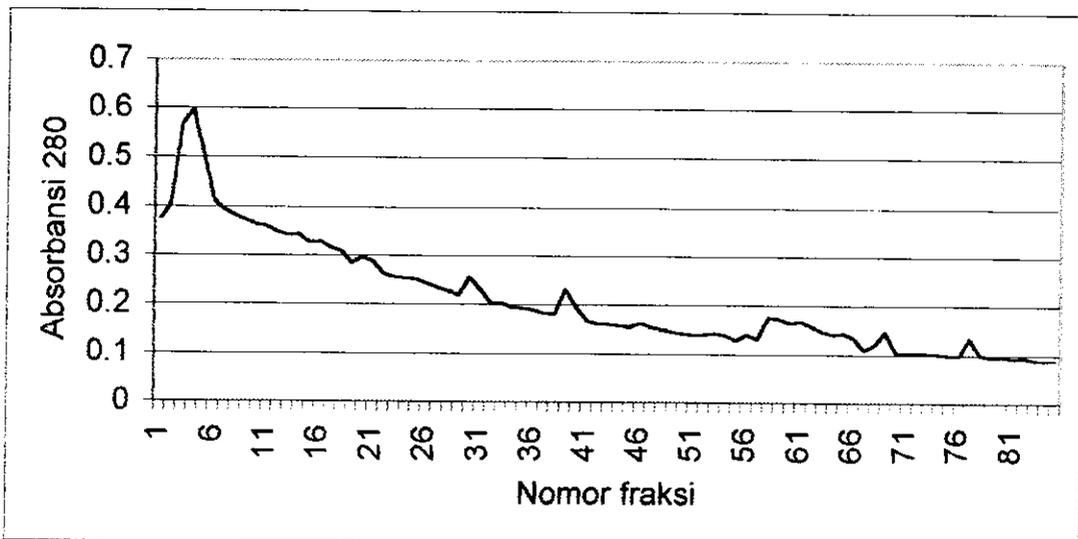
Supernatan yang masih berupa protein kompleks mempunyai toksisitas terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*. Untuk mendapatkan protein tunggal maka dilakukan purifikasi dengan *SDS-PAGE*, yang sebelumnya terlebih dahulu dilakukan fraksinasi.

Hasil dari fraksinasi terdapat 85 fraksi Protein, yang kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi protein.

Tabel 5.11 Hasil fraksinasi dan pengukuran konsentrasi protein supernatan akteri *Photorhabdus spp.*

Nomor Fraksi	Abs 280	Nomor Fraksi	Abs 280	Nomor Fraksi	Abs 280
1	0,374	31	0,257	61	0,168
2	0,406	32	0,232	62	0,158
3	0,567	33	0,205	63	0,147
4	0,598	34	0,204	64	0,140
5	0,511	35	0,196	65	0,144
6	0,411	36	0,193	66	0,134
7	0,393	37	0,190	67	0,109
8	0,382	38	0,184	68	0,120
9	0,372	39	0,181	69	0,146
10	0,363	40	0,198	70	0,104
12	0,359	41	0,168	71	0,104
13	0,348	42	0,162	72	0,104
14	0,342	43	0,161	73	0,103
15	0,344	45	0,155	74	0,102
16	0,327	46	0,164	75	0,098
17	0,330	47	0,155	76	0,098
18	0,316	48	0,150	77	0,134
19	0,309	49	0,145	78	0,099
20	0,284	50	0,141	79	0,095
21	0,298	51	0,139	80	0,097
22	0,287	52	0,139	81	0,093

Nomor Fraksi	Abs 280	Nomor Fraksi	Abs 280	Nomor Fraksi	Abs 280
23	0,263	53	0,143	82	0,095
24	0,257	54	0,138	83	0,090
25	0,254	55	0,128	84	0,890
26	0,252	56	0,140	85	0,088
27	0,244	57	0,130		
28	0,235	58	0,176		
29	0,228	59	0,172		
30	0,219	60	0,165		



Gambar 5.15 Hasil pengukuran konsentrasi protein hasil fraksinasi supernatan bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia

5.8 Pengujian Toksisitas Protein Toksin

Dari 85 fraksi protein hasil fraksinasi supernatan dilakukan pengujian toksisitas untuk menentukan fraksi protein mana yang mempunyai toksisitas paling besar terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*. Berdasarkan hasil pengujian pendahuluan dengan masa dedah 24 jam dan 48 jam

terdapat satu fraksi yang paling toksik, terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*. yaitu fraksi no : 33.

Secara lengkap hasil pengujian toksisitas protein toksin terhadap Larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* dapat dilaporkan sebagai berikut :

Tabel 5.12 Hasil pengujian toksisitas fraksi-fraksi protein bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*. Jumlah (%) kematian larva nyamuk uji dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam, dalam kondisi kamar, temperatur 27°C dan kelembaban 80 %.

No Fraksi	Masa Dedah 24 jam				Masa dedah 48 jam			
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	--	-	--	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
19	100%	50%	20%	-	100%	50%	30%	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-

No Fraksi	Masa Dedah 24 jam				Masa dedah 48 jam			
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
22	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-
28	100%	30%	20%	-	100%	30%	20%	-
29	100%	30%	20%	-	100%	40%	20%	-
30	100%	10%	10%	-	100%	10%	10%	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-
32	100%	10%	-	-	100%	10%	-	-
33	100%	100%	30%	10%	100%	100%	50%	10%
34	100%	20%	-	-	100%	20%	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-
39	100 %	40%	10%	-	100%	50%	20%	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-	-

No	Masa Dedah 24 jam				Masa dedah 48 jam				
	Fraksi	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
58		100%	30%	20%	-	100%	30%	20%	
59		100%	40%	-	-	100%	40%	-	-
60		100%	30%	-	-	100%	30%	10%	-
61		-	-	-	-	-	-	-	-
62		70%	-	-	-	100%	30%	-	-
63		-	-	-	-	-	-	-	-
64		-	-	-	-	-	-	-	-
65		-	-	-	-	-	-	-	-
66		-	-	-	-	-	-	-	-
67		-	-	-	-	-	-	-	-
68		-	-	-	-	-	-	-	-
69		80%	-	-	-	100%	-	-	-
70		-	-	-	-	-	-	-	-
71		-	-	-	-	-	-	-	-
72		-	-	-	-	-	-	-	-
73		-	-	-	-	-	-	-	-
74		60%	-	-	-	100%	20%	-	-
75		-	-	-	-	-	-	-	-
76		-	-	-	-	-	-	-	-
77		-	-	-	-	-	-	-	-
78		-	-	-	-	-	-	-	-
79		-	-	-	-	-	-	-	-
80		-	-	-	-	-	-	-	-
81		-	-	-	-	-	-	-	-
82		-	-	-	-	-	-	-	-
83		-	-	-	-	-	-	-	-
84		-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol (air)		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Kontrol (PP3)		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Kontrol (Tween 80)		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Berdasarkan hasil pengujian diatas terdapat satu fraksi protein yang paling toksik terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* yaitu fraksi nomor 33. Fraksi ini kemudian dilakukan pengujian toksisitas terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*. Pengujian ini terdiri dari 2 tahap, yaitu :

5.8.1 Pengujian pendahuluan protein toksin (fraksi No :33)

Tabel 5.13 Hasil pengujian pendahuluantoksitas protein toksin (Fraksi No: 33) terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*. Jumlah (%) kematian larva nyamuk uji dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dalam kondisi kamar, temperatur 27 °C dan kelembaban 80 %.

Serial pengenceran	jumlah (%) kematian larva uji	
	Lama pendedahan 24 jam	Lama pendedahan 48 jam
0,01	100	100
0,001	30	40
0,0001	10	10
Kontrol (air)	0	0
Kontrol (PP3)	0	0
Kontrol (Tween 80)	0	

5.8.2 Pengujian Akhir

Tabel 5.14 Replika 1. Hasil pengujian akhir toksisitas protein toksin (Fraksi No:33), jumlah (%) kematian larva nyamuk uji dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dalam kondisi kamar, temperatur 27°C dan kelembaban 80 %.

Serial pengenceran	Jumlah (%) kematian larva uji	
	Lama pendedahan 24 jam	Lama pendedahan 48 jam
0,01	100	100
0,005	80	80
0.0025	50	60
0,00125	40	50
0.0010	40	50
0,0005	30	40
0,00025	20	30
0,000125	10	10
0,00010	10	10
Kontrol (air)	0	0
Kontrol (PP3)	0	0
Kontrol (Tween 80)	0	0

Tabel 5.15 Replika 2. Hasil pengujian akhir toksisitas protein toksin (Fraksi No:33) , jumlah (%) kematian larva nyamuk uji dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dalam kondisi kamar, temperatur 27°C dan kelembaban 80 %.

Serial pengenceran	Jumlah (%) kematian larva uji	
	Lama pendedahan 24 jam	Lama pendedahan 48 jam
0,01	100	100
0,005	80	80
0.0025	70	70
0,00125	50	50
0.0010	30	40
0,0005	20	40
0,00025	20	30
0,000125	10	20
0,00010	0	10
Kontrol (air)	0	0
Kontrol (PP3)	0	0
Kontrol (Tween 80)	0	0

Tabel 5.16 Replika 3. Hasil pengujian akhir toksisitas protein toksin (fraksi No:33) , jumlah (%) kematian larva nyamuk uji dengan jumlah larva uji 10 ekor dan masa pendedahan 24 jam dan 48 jam dalam kondisi kamar, temperatur 27°C dan kelembaban 80 %.

Serial pengenceran	Jumlah (%) kematian Larva uji	
	Lama pendedahan 24 jam	Lama pendedahan 48 jam
0,01	100	100
0,005	90	90
0,0025	70	80
0,00125	50	60
0,0010	30	40
0,0005	20	30
0,00025	10	20
0,000125	10	10
0,00010	0	0
Kontrol (air)	0	0
Kontrol (PP3)	0	0
Kontrol (Tween 80)	0	0

Tabel 5.17 Rata-rata Jumlah (%) kematian larva uji pada Replika 1, Replika 2, Replika 3 Hasil Pengujian akhir toksisitas protein toksin (fraksi No:33) dari berbagai seri pengenceran dengan jumlah larva uji tiap-tiap replikan 10 ekor, dengan masa dedah 24 Jam. Dilakukan pada suhu kamar, temperatur 27°C dan kelembapan nisbi 80%.

Seri Pengenceran	Jumlah (%) kematian larva Uji			Rata-rata
	Replika 1	Replika 2	Replika 3	
0,01	100	100	100	100
0,005	80	80	90	83,33
0.0025	50	70	70	63,33
0,00125	40	50	50	46,66
0.0010	40	30	30	30,33
0,0005	30	20	20	23,33
0,00025	20	20	10	16,66
0,000125	10	10	10	10
0,00010	10	0	0	3,33
Kontrol (air)	0	0	0	0,00
Kontrol (PP3)	0	0	0	0,00
Kontrol (Tween 80)	0	0	0	0,00

Berdasarkan analisis probit diperoleh $LC_{50} = 0,00131$, dengan batas bawah

(lower) = 0,000625 dan kisaran batas atas (upper) = 0,006

(Grafik pada lampiran 3, halaman 146).

Tabel 5.18 Rata-rata Jumlah (%) kematian larva uji pada Replika 1, Replika 2, Replika 3. Hasil pengujian akhir toksisitas protein toksin (fraksi No : 33) dari berbagai seri pengenceran dengan jumlah larva uji tiap-tiap replikan 10 ekor, dengan masa dedah 48 Jam. Dilakukan pada suhu kamar, temperatur 27°C dan kelembapan nisbi 80%.

Seri Pengenceran	Jumlah (%) kematian larva Uji			Rata-rata
	Replika 1	Replika 2	Replika 3	
0,01	100	100	100	100,00
0,005	80	80	90	83,33
0.0025	60	70	80	70,00
0,00125	50	50	60	53,33
0.0010	50	50	40	46,66
0,0005	40	40	30	36,66
0,00025	30	30	20	26,66
0,000125	10	20	10	13,33
0,00010	10	10	0	6,66
Kontrol (air)	0	0	0	0,00
Kontrol (PP3)	0	0	0	0,00
Kontrol (Tween 80)	0	0	0	0,00

Berdasarkan analisis probit diperoleh $LC_{50} = 0,00112$, dengan kisaran batas bawah (lower) = 0,000082 dan kisaran batas atas (upper) = 0,006.

(Grafik pada lampiran 3, halaman 146).

5.9.2 Pengukuran konsentrasi protein

Pengukuran konsentrasi protein toksin hasil fraksinsi dengan metode *Bradford*

Tabel 5.19 Hasil pengukuran konsentrasi protein toksin dengan standart BSA.

Jumlah Protein BSA (μg) Y	Absorsi 595 nm	Abs Terkoreksi X
0	0,34	0
2,5	0,39	0,05
5,0	0,41	0,07
7,5	0,43	0,09
10	0,45	0,11
15	0,46	0,12
30	0,50	0,16

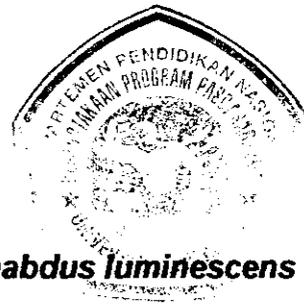
Konsentrasi protein toksin. sebesar 0,615 ug

(Hasil perhitungan dilampiran halaman 153)

BAB VI

BAB VI

PEMBAHASAN



6.1 Karakterisasi Biakan Murni Bakteri *Photorhabdus luminescens*

Isolat Indonesia

Bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia yang dipakai dalam penelitian ini diperoleh dari laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Hasil karakterisasi dari biakan murni bakteri *Photorhabdus luminescens* Isolat Indonesia nampak adanya *Rods* (gambar 5.1). Peneliti terdahulu, Boemare, dkk (1996) menemukan adanya *Rods* pada bakteri *Photorhabdus luminescens* . Lebih lanjut Grewal, dkk (1995) mengatakan bahwa *Rods* merupakan ciri bakteri enterik yang hidup bersimbiosis di dalam usus organisme lain. Hal ini diperkuat oleh Boemare dan Givaudan (1996) bahwa hampir 80 % sampai 90% bakteri *Photorhabdus* mengandung *Rods*.

Berdasarkan pendapat diatas adanya *Rods* pada bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia menggambarkan bakteri enterik. Dalam penelitian ini bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia diisolasi dari dalam usus Nematoda entomopatogen *Heterorhabditis spp* Isolat Indonesia. Seperti halnya bakteri *Photorhabdus* isolat yang lain, hampir semua bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia dalam penelitian ini mengandung *Rods*.

Hasil pengamatan tentang adsorpsi Bromothymol Biru pada NBTA, koloni bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia berwarna *Greenish* / hijau (gambar 5.2) Menurut Strauch dan Ehlers (1998) bakteri *Photorhabdus luminescens* mempunyai karakteristik warna koloni dalam adsorpsi BTB adalah *Greenish*. Hal ini diperkuat dengan pendapat Bedding dan Molyneux, (1996), adanya perbedaan adsorpsi Bromothymol Biru untuk warna koloni bakteri *Photorhabdus* dengan bakteri *Xenorhabdus*. Lebih lanjut Bintrim dan Ensign, 1998 mengatakan bahwa koloni bakteri *Photorhabdus* dalam adsorpsi warna Bromothymol Biru berwarna *Greenish*, sedangkan koloni bakteri *Xenorhabdus* berwarna *Blue* atau tidak dapat mengabsorpsi.

Berdasarkan pendapat diatas koloni bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia dalam adsorpsi Bromothymol Biru mempunyai karakteristik warna yang sama dengan bakteri *Photorhabdus* isolat yang lain. Warna *Greenish* koloni bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia menjadi karakteristik yang khas, karena sangat berbeda dengan warna koloni bakteri *Xenorhabdus* isolat Indonesia yang tidak dapat mengabsorpsi Bromothymol Biru.

6.2 Karakterisasi Morfologi dan Biokimia bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia

Langkah pertama didalam karakterisasi bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia pada penelitian ini adalah melakukan

pengamatan terhadap morfologi baru kemudian sifat- sifat biokimianya dan sifat patogenitasnya.

6.2.1 Karakter Morfologi

Hasil karakterisasi morfologi menunjukkan bahwa bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia yang ditumbuhkan dalam NBT agar dengan masa inkubasi 48 Jam, berbentuk batang, dengan panjang sel rata-rata: 1,99 μm lebar sel rata-rata: 1,8 μm . Diameter koloni rata- rata: 1,55 mm dan berwarna putih (tabel 5.1).

Karakter morfologi bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia mempunyai ukuran yang lebih kecil apabila dibandingkan dengan ukuran bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat yang lain, misalnya dengan bakteri *Photorhabdus* isolat Netherland yang mempunyai ukuran rata-rata 2,0 – 2,5 μm (Fost dan Nealsor, 1996), atau bakteri *Photorhabdus* isolat Victerville yang mempunyai ukuran rata- rata 3,0 – 3,5 μm (Platt dkk, 1997).

Adanya perbedaan morfologi ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan faktor geografis. Menurut Campbell, dkk, 1996, faktor lingkungan geografi baik itu iklim, temperatur, kelembaban maupun keadaan tanah dimana mikroba itu ditemukan akan mempengaruhi keragaman morfologi mikroba yang hidup didalamnya. Faktor lain yang menyebabkan perbedaan karakter morfologi adalah perbedaan isolat, metode yang dipakai maupun kondisi waktu melakukan karakterisasi (boemare and Akhurst, 1994)

6.2.2 Karakter Biokimia

Hasil karakterisasi biokimia bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia untuk pembentukan indol adalah positif. Indol adalah zat yang berbau busuk yang dapat dihasilkan oleh bakteri yang tumbuh dalam medium yang mengandung triptopan (Alexander, dkk, 1994). Pengujian yang dipakai untuk mengetahui pembentukan indol dalam penelitian ini dengan pengujian Kovacs. Hasil pengujian menunjukkan terbentuknya warna merah pada lapisan larutan reagensia. Hal ini dapat sebagai salah satu indikator bakteri Enterik. Bakteri spesifik yang hidup didalam usus Nematoda entomopatogen termasuk keluarga *Enterobacteriaceae* (Bedding, dkk, 1995). Signifikansi dari hasil pengujian ini adalah bahwa bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia termasuk dalam kelompok *Enterobacteriaceae*.

Hasil pewarnaan gram bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia dalam penelitian ini menunjukkan sel bakteri gram negatif. Pewarnaan gram atau pengecatan gram merupakan pengecatan deferensial untuk melihat perbedaan susunan sel bakteri gram positif (+) dan bakteri gram negatif (-). Sel bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia setelah terwarnai dengan safranin berwarna merah. Dinding sel dan membran sitoplasma bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia mempunyai afinitas yang kecil terhadap kompleks cat kristal violet dan Iodium, akibatnya tidak dapat mengikat kuat cat kristal violet sehingga luntur dengan cat peluntur, dan sel bakteri terwarnai dengan cat safranin sehingga sel

berwarna merah yang menunjukkan sel bakteri gram negatif (-). Bakteri *Photorhabdus* adalah bakteri gram negatif yang merupakan bakteri enterik yang ditemukan dalam kaitannya dengan nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* (Duane dan Gary, 1996).

Hasil pewarnaan Gram ini membedakan antara bakteri *Photorhabdus* dengan *B. thuringiensis* yang selama ini sangat diandalkan sebagai Bioinsektisida. *B. thuringiensis* merupakan bakteri Gram positif, sedangkan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia adalah bakteri Gram negatif. Kedua bakteri tersebut sama- sama dapat diisolasi dari tanah, tetapi *B. thuringiensis* diisolasi secara langsung dari tanah sedangkan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia melalui *baiting* larva *Tenebrio molitor*.

Hasil uji katalase/reduksi H_2O_2 bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia adalah positif / terjadi reduksi H_2O_2 , terlihat adanya gelembung-gelembung O_2 pada permukaan medium. Uji Bioluminensens pada serangga uji menunjukkan hasil yang positif. Serangga uji yang digunakan untuk uji bioluminensens bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat lokal adalah serangga *Galleria mellonella* (ulat hongkong). Bioluminensens dilihat dari gejala serangan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia pada serangga uji yang mati terinfeksi oleh Bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia di tempat gelap (dark room) akan terlihat terang bersinar putih kekuningan. Hal ini sesuai dengan pendapat Bowen and

Ffrench, (1999) yang menyatakan bahwa karakteristik yang utama dari bakteri *Photorhabdus* adalah bahwa bakteri *Photorhabdus* hanya dikenal sebagai bioluminescens bakterium dan bakteri katalase positif.

Dengan demikian karakter utama bakteri *Photorhabdus* juga dimiliki oleh bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia. Satu hal yang membedakan dari karakter biokimia ini adalah motilitas. Bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia mempunyai karakter yang negatif untuk motilitas, sedangkan bakteri *Photorhabdus* isolat lain (Netherland dan Victerville) motilitasnya positif dengan alat gerak berupa flagel (Poinar, 1995). Menurut Akhurst, (1996) kebanyakan bakteri *Photorhabdus* adalah motil.

Perbedaan motilitas pada bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia dengan bakteri *Photorhabdus* isolat Netherland maupun Victerville kemungkinan besar memang berbeda spesiesnya. Dalam penelitian ini belum bisa diungkap, karena memang penelitian ini tidak mengarah ke hal itu.

Karakteristik dari bakteri *Photorhabdus* belum banyak diungkap, hanya ada beberapa karakter dari bakteri *Photorabdsus* yang telah ditemukan sebelumnya seperti yang diisolasi dari nematoda entomopatogen yang ditemukan di tanah kebun Florida selatan (Bowen, dkk, 1998). Bakteri *Photorhabdus* adalah Entomopatogenik, bioluminensens, terkait dengan bakteri gram negatif, termasuk *Enterobakteriaceae* dan ditemukan dalam saluran intestinal nematoda entomopatogen dari familia *Heterorhabditidae*.

(Boemare dkk, 1996): taxonomi spesifik bakteri *Photorhabdus* hanya dikenal sebagai bioluminensens bakterium dan merupakan bakteri katalase positif. Bird dan Akhur (1983), mengemukakan bahwa sel-sel bakteri *Photorhabdus* pertama kali berlokasi pada bagian anterior dari *Heterorhabditis* dan selanjutnya berlokasi disepanjang usus. Boemare dan Akhurst (1994) menggambarkan bakteri *Photorhabdus* dapat diberi pigmen, dapat bioluminensens dan dapat menghasilkan enzim protease. Boemare dan Givaudan(1996), menyebutkan 80%-90% bakteri *Photorhabdus* mengandung Rods, sebagian spesiesnya ada yang motil tapi ada yang hanya berkerumun di agar. Hasil tes di Neterland dan Victorville koloni isolat *Photorhabdus* pada medium agar NBT bentuknya cembung bulat pipih dengan batas tepi yang tidak beraturan, warna koloni hijau agak kemerahan (Szallas dkk., 1997).

Berdasarkan petunjuk-petunjuk karakteristik bakteri *Photorhabdus* yang telah ditemukan para ilmuwan dari berbagai tanah di dunia, bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia mempunyai ciri-ciri yang sama yang juga dimiliki oleh bakteri *Photorhabdus* yang ditemukan di negara lain. Perbedaan karakteristik mengenai motilitas dan ukuran bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia, bukan merupakan perbedaan yang mendasar.

6.3 Kolonisasi Larva Nyamuk *Aedes aegypti*

Dalam Penelitian ini digunakan larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* yang ditangkap dari Kalurahan Patemon Kecamatan Sawahan – Surabaya.

Sawahan adalah perkampungan di Surabaya yang tergolong endemik untuk penyakit Demam Berdarah. Hampir setiap tahun kasus penyakit demam berdarah melanda kampung ini, sehingga mudah sekali menemukan jentik-jentik / larva nyamuk *Aedes aegypti* di sekitar rumah-rumah penduduk yang bermukim dikampung ini. Larva ini dikolonisasi di dalam laboratorium Entomologi Kedokteran (TDC) Universitas Airlangga sampai pada F20.

6.3.1 Hasil Kolonisasi

Hasil dari kolonisasi diperoleh populasi larva yang homogen, larva yang mempunyai sifat-sifat yang sama. Menurut Nuttall (1997) populasi yang ditangkap di alam bebas apabila dikolonisasi sampai se kurang-kurangnya 14 generasi maka sifat-sifatnya akan kembali ke parental. Lebih lanjut Narro dan Gomes (1995), menyatakan bahwa nyamuk *Aedes aegypti* yang sifatnya sudah kembali ke parental mempunyai kesamaan dari sifat-sifat yang dimilikinya, sehingga akan mempengaruhi perolehan data yang lebih akurat. Menurut Mardihusodo (1989) dalam pengambilan data pada suatu penelitian, populasi yang homogen akan sangat membantu dalam perolehan data yang akurat. Pendapat-pendapat para ahli di atas menjadi dasar untuk dilakukannya kolonisasi larva nyamuk *Aedes aegypti* dalam penelitian ini hingga mencapai keturunan (F) yang ke 20.

Untuk melihat *Exochorion* telur nyamuk *Aedes aegypti* diamati secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop fasekontras dengan

pembesaran 40X (gambar 5.5). Hasil pengamatan menunjukkan adanya garis-garis seperti anyaman yang tidak teratur di lapisan paling luar. Hal ini sama dengan yang disampaikan oleh Chadee(1994) dimana anyaman yang tidak teratur ini digambarkan mirip dengan sarang labah-labah. *Exochorion* inilah yang membedakan antara telur nyamuk *Aedes aegypti* dengan yang lain.

Pada larva instar IV dilakukan identifikasi dengan menggunakan mikroskop biasa untuk melihat ciri-cirinya. Larva instar IV inilah yang nantinya digunakan dalam penelitian ini, Dipilihnya larva instar IV, karena mengikuti petunjuk WHO (1976). Sangat penting untuk menggunakan suatu populasi yang homogen dari larva instar IV awal, larva ini diperoleh pada larva yang berumur 7 hari dengan panjang 5-6 mm.

Hasil pengamatan ciri-ciri larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* hasil kolonisasi dengan menggunakan mikroskop biasa pembesaran 40 X (gambar 5.6) menunjukkan adanya sepasang duri yang menonjol dipangkal bulu di bagian dada, di bagian perut nampak adanya corong pernafasan yang bentuknya pendek dan besar, tubuh larva terdiri dari bagian kepala, dada dan perut. Hasil pengamatan ini sesuai dengan ciri khas larva nyamuk *Aedes aegypti* yang dikemukakan oleh Lim suwan (1987), yaitu adanya sepasang kait yang menonjol di pangkal bulu roma di bagian dada, corong pernafasannya gemuk pendek dan terdapat sederet sirip bergigi kasar seperti mahkota di bagian abdomen. Dalam penelitian ini tidak nampak adanya

sederet sirip bergigi kasar seperti mahkota dimungkinkan karena kurang sempurnanya dalam pembuatan preparat, namun ciri-ciri yang nampak sudah mewakili kebenaran dari larva nyamuk *Aedes aegypti*.

Dalam penelitian ini perubahan larva instar IV menjadi pupa memerlukan waktu 2 hari. Berdasarkan hasil pengamatan ini kemudian dipakai sebagai dasar penentu lamanya waktu pendedahan dalam pengujian toksisitas.

6.3.2 Kondisi Lingkungan Laboratorium

Hasil pengukuran kondisi lingkungan laboratorium tempat dimana penelitian ini dilakukan dan faktor-faktor luar yang berkaitan dengan kolonisasi larva uji menggambarkan suatu kondisi yang baik untuk berlangsungnya kolonisasi larva uji.

Suhu/temperatur ruangan di dalam laboratorium selama penelitian berlangsung berkisar antara 26,9⁰C sampai dengan 27,7⁰C. Kondisi ini menggambarkan kisaran temperatur ruangan yang cukup baik. Pertumbuhan dan perkembangan nyamuk *Aedes aegypti* mulai dari telur sampai dewasa suhu optimum dalam kondisi laboratorium adalah 27⁰C (James, dkk, 1991). Nyamuk *Aedes aegypti* tidak dapat berkembang dengan baik pada suhu udara kurang dari 17⁰C. Berdasarkan pendapat-pendapat diatas kisaran suhu ruangan laboratorium tempat berlangsungnya kolonisasi larva uji dalam

penelitian ini sangat baik untuk pertumbuhan dan perkembangan nyamuk *Aedes aegypti*.

Kelembaban nisbi ruangan selama penelitian ini berlangsung berkisar antara 79% sampai dengan 81%. Kisaran kelembapan ini menggambarkan bahwa ruangan tempat penelitian ini berlangsung cukup lembab untuk berlangsungnya kolonisasi larva nyamuk *Aedes aegypti* sehingga pertumbuhan dan perkembangannya dapat berlangsung dengan baik. Kelembaban nisbi ruangan yang paling baik untuk berlangsungnya pertumbuhan dan perkembangan nyamuk *Aedes aegypti* dalam kondisi laboratorium adalah 80% (Baltasar, dkk, 1996). Nyamuk *Aedes aegypti* akan hidup dengan baik pada kondisi kelembaban yang cukup (Golberg dan Margalit, 1977).

Kondisi suhu deionized water yang digunakan untuk kolonisasi nyamuk *Aedes aegypti* 27⁰C dan pH deionized water 7,5 %. Suhu air 27⁰C adalah suhu yang optimum untuk pertumbuhan dan perkembangan nyamuk *Aedes aegypti*. Menurut Lee (1990) suhu optimum pertumbuhan dan perkembangan larva nyamuk di dalam air berkisar 25⁰C sampai 35⁰C. pH air optimum 7,5 .

Secara keseluruhan kondisi lingkungan laboratorium tempat berlangsungnya kolonisasi nyamuk *Aedes aegypti* baik suhu ruangan, kelembapan nisbi, suhu deionized water maupun pH deionized water

merupakan kondisi yang baik untuk pertumbuhan dan perkembangan nyamuk *Aedes aegypti* dan tidak berpengaruh pada kematian larva .

6.4 Pembuatan supernatan.

Supernatan bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia hasil penelitian ini berupa cairan bening berwarna putih kekuningan (gambar 5.8). Cairan ini dipisahkan dari peletnya dan sudah tidak mengandung bakteri, hal ini dapat diamati diamati dibawah mikroskop tidak terdapat fase-fase cerah. Menurut Dekker dkk (1998) dalam masa inkubasi 48 jam dengan pemeriksaan dibawah mikroskop dengan mudah dapat dikenali sel-sel bakteri *Photobacterium* yang menunjukkan fase cerah.

Supernatan bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia mengandung toksin. Menurut Boewen dkk (1998) bakteri *Photobacterium* menghasilkan eksotoksin yang bersifat mematikan apabila diberikan secara oral atau injeksi ke dalam larva serangga. Lebih lanjut Gaugler (1996) mengatakan bahwa bakteri *Photobacterium* apabila ditumbuhkan dalam medium agar maka akan mensekresi toksin ke dalam kultur agar. Toksin bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia akan diuji toksisitasnya terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*. Hal ini akan dibahas tersendiri di bagian lain.

Sifat lain dari supernatan bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia adalah labil terhadap panas, berupa protein kompleks dan

mempunyai konsentrasi protein sebesar 0,155 ug/ml. Sifat-sifat ini juga dimiliki oleh supernatan bakteri *Photobacterium* yang dipurifikasi oleh Bowen dkk (1998). Secara terinci hal ini akan dibahas satu persatu di bagian lain.

6.5 Pengujian toksisitas supernatan.

Supernatan bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia diuji toksisitasnya terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* hasil kolonisasi. Larva instar IV awal dipilih dari larva yang berumur 7 hari dan panjangnya rata-rata 4-6 mm. Hal ini sesuai dengan petunjuk Mardihusodo (1988) agar menggunakan L4 awal untuk larva nyamuk *Aedes aegypti* dan L3 awal untuk larva nyamuk *Anopheles*. Berdasarkan pertimbangan sensitivitas dan cepat lambatnya tanggapan terhadap aktivitas larvasidal yang diperkuat oleh petunjuk WHO (1976). Pengujian toksisitas dilakukan dalam kondisi kamar dengan suhu 27°C dan kelembapan 80%. Angka kematian larva ditentukan sesuai dengan waktu dedah 24 jam dan 48 jam dengan menghitung jumlah larva yang mati. Jika terdapat pupasi maka pupa diambil dan jumlahnya tidak diperhitungkan dari data dasar. Penentuan larva yang mati adalah apabila larva sudah tidak bergerak-gerak walaupun dirangsang dengan apapun, posisinya menggeletak didasar gelas beker dan apabila ditetesi dengan larutan eosin warnanya tidak berubah, karena sel yang mati sudah tidak

dan Tween 80. Konsentrasi larva uji sebanyak 10 ekor/30 ml deionized water. Hal ini untuk menjaga kepadatan dan kualitas larva uji, sehingga kematian larva benar-benar hanya oleh perlakuan semata-mata. Menurut Golberg dan Margalit (1977) untuk menjaga kualitas dan kepadatan populasi larva dalam loyang ditentukan sebesar 1ekor / 3 ml air. Jika terjadi kematian lebih dari 10% dari kelompok pembanding, maka penelitian harus diulang. Tingkat sensitivitas relativitas dari larva nyamuk uji dipertimbangkan atas dasar besarnya LC50, perbedaan nyata dalam kisaran antara masing-masing batas kepercayaan 95 % atau 95 % confidence limits (CL).

Hasil pengujian toksisitas supernatan yang dianalisis dengan probit analisis dengan confidence limits 95 %, waktu dedah 24 jam diperoleh besarnya LC50 = 0,0129; kisaran batas bawah = 0,00091; kisaran batas atas = 0,06. Sedangkan untuk masa dedah 48 jam, diperoleh besarnya LC 50 = 0,0119, kisaran batas bawah = 0,0005, dan kisaran batas atas = 0,06. Dalam hal ini ada beberapa hal yang perlu dipertimbangkan bahwa besarnya toksisitas dipengaruhi oleh cepat lambatnya kerja toksin (Campbell dan Kaya,1999). Seperti halnya hasil pengujian toksisitas supernatan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat lokal terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*, lama / waktu dedah tidak begitu besar pengaruhnya terhadap jumlah kematian larva uji. Jumlah kematian larva uji dengan waktu dedah 24 jam tidak jauh berbeda dengan jumlah kematian larva uji dengan waktu dedah 48 jam. Hal ini menunjukkan bahwa besarnya toksisitas supernatan

Bakteri *Photobacterium luminescens* isolat lokal terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* mengikuti teori Campbell dan Kaya (1999). Aktivitas kerja toksin dipengaruhi oleh besarnya protein toksin yang dihasilkan (Blackburn dkk, 1998) Protein yang diproduksi oleh bakteri dipengaruhi oleh medium yang digunakan dan waktu fermentasi (Klowden, dkk, 1996). Pada supernatan bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia medium yang digunakan adalah medium yang terdiri dari PP3, Tween 80 dan agar dengan waktu fermentasi 48 jam. Dilihat dari masih banyaknya PP3 yang belum terabsorpsi dengan fermentasi 48 jam berarti pertumbuhan bakteri masih belum mencapai titik optimum, sehingga protein toksin yang dihasilkan juga belum optimum. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui komposisi medium yang paling tepat dan waktu Fermentasi yang optimum untuk pertumbuhan bakteri *Photobacterium*, sehingga diperoleh toksisitas yang lebih tinggi. Hal lain yang perlu diingat bahwa supernatan ini masih terdiri dari berbagai protein baik protein toksin maupun protein yang tidak toksin terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*. Purifikasi / pemisahan protein untuk mendapatkan protein tunggal perlu dilakukan sehingga diperoleh protein yang mempunyai toksisitas tinggi terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*.

6.6 Karakterisasi Supernatan.

6.6.1 Sifat Labilitas Terhadap panas

Hasil pengujian supernatan tentang sifat labilitas terhadap panas menunjukkan bahwa aktivitas insektisidal terlihat lebih bersifat seperti protein, karena rentan terhadap panas. Dengan pemanasan 70 °C supernatan ini mengalami penurunan tingkat toksisitas. Sifat labilitas terhadap panas juga diungkapkan oleh peneliti terdahulu Bintrim dan Ensign(1998), dari supernatan bakteri *Photobacterium luminescent*. Sifat labilitas terhadap panas ini mirip dengan sifat toksin *B. thuringiensis* dimana ekstrak sel *B. thuringiensis* yang terpapar pada berbagai temperatur selama 12 menit, menunjukkan bahwa toksin tetap stabil pada suhu 80°C, walaupun ada sedikit penurunan aktivitas larvasidanya. Pada suhu diatas 80°C aktivitas larvasida menurun secara mendadak (Novak dan Rowley, 1994).

Labilitas terhadap panas dan kerentanan protease dari kompleks toksin yang dihasilkan oleh bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia mengindikasikan bahwa kemampuan untuk mematikan larva nyamuk *Aedes aegypti* didukung oleh adanya protein kompleks.

6.6.2 Pengukuran Konsentrasi Protein Supernatan.

Hasil pengukuran konsentrasi protein supernatan dengan jumlah sampel 100ul dan absorbansi 595 sebesar 0,155 ug/ul. Hal yang sama pernah dilakukan oleh Bowen(1998) dengan jumlah sampel 500 ul hasil

pengukuran konsentrasinya sebesar 0,5 ug/ul. Untuk mendapatkan konsentrasi protein lebih besar perlu dikembangkan langkah pemurnian protein. Langkah pemurnian protein dengan penambahan DEAE-Sepharose akan sangat meningkatkan aktivitas insektisida protein toksin sementara akan terjadi pengurangan terhadap senyawa lain (Campbell dan Gaugler, 1997). Dalam penelitian ini belum mampu dilakukan penambahan DEAE-Sepharose, karena disamping sulit didapatkan juga diperlukan waktu yang lama.

6.6.3 Analisis Secara *Native-PAGE* Supernatan Bakteri *Photorhabdus* Isolat Indonesia

Teknik elektroforesis merupakan cara yang sangat layak untuk memisahkan kumpulan protein yang dihasilkan oleh bakteri. Dalam penelitian ini supernatan dielektroforesis secara *Native-PAGE*.

Hasil dari supernatan yang dianalisis secara *Native-PAGE* menunjukkan adanya beberapa macam protein. Hal ini terlihat dari banyaknya band yang terwarnai (Gambar 5.9). Peneliti terdahulu Bowen dan French (1999) telah menemukan bahwa bakteri *Photorhabdus* memproduksi protein toksin kompleks yang tersusun dari beberapa subunit protein dari ukuran 30 kDa – 200 kDa. Protein toksin kompleks ini mempunyai aktivitas insektisidal jika diberikan baik secara oral atau injeksi terhadap serangga dari ordo *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera* dan *Lepidoptera*. Protein toksin

komplek ini juga terdapat pada banyak toksin bakterial yang lain, misalnya insektisida *B. thuringiensis* yang diketahui juga tersusun dari banyak sub unit protein (Campbell dan Gaugler, 1995). Toksin insektisidal *B. thuringiensis* membutuhkan pengolahan enzim atau aktivasi sel lebih lanjut untuk dapat menjadi bioinsektisida yang ampuh dalam membasmi serangga. Protein toksin kompleks bakteri *Photobacterium luminescens* yang ditemukan dalam penelitian ini merupakan temuan awal yang perlu penanganan lebih lanjut dari para pakar / ahli Biologi sehingga menjadi Bioinsektisida baru alternatif pengganti toksin *B. thuringiensis* dengan daya toksik yang tidak kalah kuatnya. Protein toksin kompleks dalam supernatan yang terdeteksi dalam penelitian ini belum dapat diketahui ukurannya, karena sulitnya mendapatkan marker untuk *Native - PAGE*.

6.6.4 Analisis Aktivitas Enzim Proteolitik Supernatan

Dalam penelitian ini yang dapat dilakukan adalah analisis aktivitas enzim proteolitik. Dengan uji Zymogram untuk analisis aktivitas enzim, tempat dimana terjadi hidrolisis gelatin berarti terjadi aktivitas enzim proteolitik, sehingga dapat dipakai untuk memperkirakan band yang mana yang bersifat toksik.

Hasil uji zimogram dari supernatan dalam penelitian ini tampak bahwa supernatan bakteri *Photobacterium luminescens* isolat lokal menghasilkan dua bentuk enzim proteolitik (gambar 5.10). Temuan ini sangat membantu

menentukan tempat band yang mengandung protein toksik. Peneliti terdahulu, menemukan bahwa protein toksin kompleks yang diproduksi oleh bakteri *Photorhabdus* mengandung tiga fraksi yang mengandung aktivitas protease yang berbeda (Bowen dan Ffrench, 1999). Hasil penelitian ini hanya ada 2 fraksi yang terhidrolisis gelatin. Berarti hanya ada 2 fraksi yang mempunyai aktivitas protease, dimana satu nampak jelas sedang di fraksi yang lainnya tidak begitu jelas. Adanya perbedaan dalam hasil penelitian ini dengan apa yang ditemukan oleh Bowen dan Ffrench (1999) dimungkinkan karena perbedaan isolat yang digunakan atau mungkin juga perbedaan spesies maupun cara pengujian untuk analisis enzim yang digunakan berbeda. Dua fraksi yang mempunyai aktifitas protease hasil penelitian ini ada hubungannya dengan aktivitas toksinnya. Hal ini akan lebih jelas lagi pada pemisahan fraksi-fraksi protein selanjutnya dan uji aktifitas fraksi-fraksi khususnya terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*. Aktivitas enzim proteolitik berhubungan dengan kedasyatan kerja toksin yang dihasilkan oleh bakteri *Photorhabdus* (Clarke dan Dowd, 1995). Enzim protease merupakan faktor yang menyebabkan kedasyatan kerja toksin dalam membunuh serangga. Labilitas terhadap panas dan adanya aktivitas enzim protease dalam supernatan bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat lokal mengindikasikan bahwa kemampuan toksin dalam mematikan larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* didukung oleh protein kompleks yang terkandung didalam supernatan. Enzim-enzim lain yang juga merupakan faktor yang

dapat mempengaruhi kerja toksin adalah lipase, phospholipase dan nuclease (Rique, 1994). Banyak toksin yang dihasilkan oleh bakteri tersusun atas banyak sub unit protein dan banyak dari toksin yang dihasilkan oleh bakteri membutuhkan pengolahan enzim atau aktivasi dengan menghasilkan sel atau mengaktifkan sel – sel organisme yang menjadi sasarannya.

6.7 Purifikasi Protein Toksin.

Supernatan yang terdiri dari beberapa komponen protein dilakukan fraksinasi. Hasil fraksinasi diperoleh 85 fraksi protein. Berdasarkan hasil pengukuran konsentrasi protein dengan spektrofotometer, absorbansi 280 nm diketahui besarnya konsentrasi protein fraksi-fraksi berkisar antara 0,088 – 0,598 $\mu\text{g/ml}$. Hasil pengujian fraksi-fraksi terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* diperoleh satu fraksi yang paling toksik. Menurut Bowen dkk (1998) bahwa protein kompleks yang dihasilkan bakteri *Photorhabdus* bersifat mematikan terhadap serangga dari ordo *Diptera*, *Hymenoptera*, *Coleoptera* dan *Lepidoptera*. Menurut Bowen dan French (1999) bahwa kompleks molekul protein yang diproduksi oleh bakteri *Photorhabdus* mempunyai daya toksik terhadap larva sasaran yang berbeda. Dalam penelitian ini terdapat satu fraksi protein yang bersifat mematikan terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*. Fraksi ini kemudian disebut protein toksin yang selanjutnya dianalisis dengan SDS-PAGE.

Hasil SDS-PAGE protein toksin menunjukkan satu band yang terlihat jelas, yaitu band dengan berat molekul 67 k Da, sedang dua band lainnya yang kurang jelas menunjukkan berat molekul 29 kDa dan 97 kDa. (Gambar 5.11).

Hal yang sama juga dilakukan oleh peneliti terdahulu Bowen dan Ffrench (1999) yang diujikan toksisitasnya terhadap larva *Manduca sexta* hasilnya menunjukkan bahwa kompleks molekul bermasa tinggi terdiri dari tiga protein utama yang berukuran 55-65 k Da. Tiga protein utama ini mempunyai daya toksik terhadap larva sasaran yang berbeda.

Griffin dkk (1994) menuliskan bahwa berat molekul protein yang terukur pada gel, pita protein tunggal atau yang paling dominan dapat digunakan sebagai standar pemurnian.

Signifikansi dari penemuan ini adalah bahwa protein toksin yang dipurifikasi dari bakteri simbiosis *Photobacterium luminescens* Isolat Indonesia dengan BM 67 kDa adalah protein murni yang bersifat entomopatogenik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*.

Pada penelitian ini untuk menguji kemurnian protein dikerjakan dengan cara freeze dry (beku kering). Menurut Baxter dan Blake (1996) untuk menghasilkan protein murni dapat dikerjakan dengan alat yang mahal yaitu freeze dry (beku kering) dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan SDS-PAGE.

Hasil pengukuran konsentrasi protein toksin hasil purifikasi dengan volume 30 ml pada absorbansi 595 diperoleh hasil : 0,615 ug / ml. Besarnya

konsentrasi protein toksin ini 6 kali lebih besar dari pada besarnya konsentrasi supernatan (0,155 ug / ml). Kemungkinan ini ada hubungannya dengan kemurnian protein. Pada supernatan masih belum mengalami purifikasi / fraksinasi sehingga hasil *Native-PAGE* elektroforesis nampak beberapa band / pita-pita protein yang sama tebalnya. Protein toksin merupakan supernatan yang dilakukan purifikasi dengan cara fraksinasi *SDS-PAGE* elektroforesis yang tinggal satu band / pita protein yang terlihat jelas. Besarnya konsentrasi protein ada hubungannya dengan hasil pengujian toksisitas dalam penelitian ini. Menurut Blackburn dkk (1998) aktivitas kerja toksin dipengaruhi oleh banyaknya protein.

6.8 Pengujian Toksisitas protein Toksin

. Dalam pengujian toksisitas ini protein toksin diaplikasikan pada larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* dalam serial unit konsentrasi dari 0,001 sampai dengan 0,00001 dengan waktu dedah 24 jam dan 48 jam. Respon berupa angka kematian atau mortalitas. Dengan analisis probit untuk waktu dedah 24 jam, diperoleh besarnya $LC_{50} = 0,00131$, dengan kisaran batas bawah = 0,000625 dan kisaran batas atas = 0,006 untuk confidence limits 95%. Sedangkan untuk masa dedah 48 jam, besarnya $LC_{50} = 0,00112$, dengan kisaran batas bawah = 0,000082 dan kisaran batas atas = 0,006.

Hasil pengujian toksisitas protein toksin menunjukkan bahwa protein toksin yang diproduksi oleh bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat

Indonesia sangat toksik dalam membunuh larva nyamuk *Aedes aegypti*, dimana pada pengenceran 10^4 masih mampu membunuh 46,66 % larva uji dengan waktu dedah 48 Jam (Tabal 5.18). Temuan ini sangat diharapkan menjadi awal dari penelitian selanjutnya oleh para ilmuwan untuk mengungkap lebih banyak tentang toksin bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia ini menjadi Bioinsektisida baru yang aman terhadap lingkungan dan hanya spesifik membunuh hewan yang menjadi sasarannya.

Tingkat toksisitas dari protein toksin bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia berbagai serial konsentrasi protein terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*. menunjukkan mortalitas beragam. Tingkat toksisitas dipengaruhi oleh tingkat konsentrasi . Semakin tinggi konsentrasi protein toksin semakin tinggi % mortalitas yang terjadi. Aktivitas kerja toksin dipengaruhi oleh banyaknya protein (Blackburn dkk, 1998). Protein toksin yang dipurifikasi dalam penelitian ini hasil dari fermentasi bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia dalam medium PP3, Tween 80 dan agar, dengan waktu inkubasi 48 Jam. Dilihat dari hasil fermentasi bakteri selama 48 jam masih terdapat banyak PP3 yang belum terabsorpsi oleh bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri belum mencapai tingkat pertumbuhan optimum, sehingga protein yang diproduksi juga belum optimum. Dalam penelitian selanjutnya perlu dicari pertumbuhan optimum dari bakteri *Photobacterium* isolat Indonesia untuk mendapatkan toksisitas protein toksin yang lebih tinggi. Cara lain untuk meningkatkan jumlah toksin

yang lebih besar perlu dikembangkan langkah pemurnian Chromatographi DEAE-Sephacel (Bowen dkk, 1998). Cara ini dapat meningkatkan produksi protein toksin, sementara terjadi pengurangan produksi protein yang lain.

Kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* dalam penelitian ini diduga disebabkan oleh gangguan ephithelium akibat kerja protein toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia. Menurut WHO (1991) menduga kerja toksin biolarvasida mula-mula bersifat protoksin, setelah menempel pada cairan proteolitik akan menjadi toksin yang aktif. Toksin aktif menempel pada sel epitel usus larva tengah akan menyebabkan gangguan permeabilitas membran, akibatnya sel-sel epitel mengalami hipertrofi sehingga lisis dan lepas dari membrana basalis masuk rongga darah yang menyebabkan kematian larva. Burnell dan Dowds (1996), membedakan mekanisme kerja kristal protein menjadi tiga berdasarkan serangga sasarannya, yaitu paralisis yang terjadi pada saluran pencernaan tengah larva serangga kemudian sebagian dalam tubuh serangga yang disertai kenaikan pH haemolimpe yang menandakan terjadinya kebocoran pada dinding saluran pencernaan sehingga cairan alkalis masuk kedalam rongga darah, paralisis yang terjadi tidak disertai kenaikan pH yang berarti tidak terjadi kebocoran pada dinding saluran pencernaan, tidak terjadi paralisis dimana kematian serangga disebabkan adanya spora yang berkecambah dalam saluran pencernaan serangga. Dalam hal ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk

mengungkap cara kerja protein toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia dalam mematikan larva nyamuk *Aedes aegypti*.

6.9 Perbedaan hasil pengujian toksisitas supernatan dengan toksisitas protein toksin.

Hasil pengujian toksisitas protein toksin nampak lebih patogenik dari pada hasil uji toksisitas supernatan, Perbedaan ini juga nampak pada perbedaan kandungan/konsentrasi protein toksin dengan supernatan. Konsentrasi protein toksin sebesar 0,615 ug/ml, sedangkan konsentrasi supernatan sebesar 0,155 ug / ml. Adanya perbedaan konsentrasi protein inilah kemungkinan besar yang menyebabkan perbedaan toksisitas. Menurut Blackburn dkk (1998) banyak faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas kerja toksin antara lain; bahwa aktivitas kerja toksin dipengaruhi oleh banyaknya protein. Sedang faktor yang lain seperti adanya aktivitas enzim protease (Ehlers and Peters, 1995). Kemungkinan yang lain yang membedakan besar-kecilnya toksisitas adalah cara kerja toksin (Georgis, 1996).

Temuan-temuan dalam penelitian ini barulah awal dari proses panjang yang harus dikembangkan untuk mengungkap kemampuan protein toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia sebagai entomopatogenik dibandingkan dengan toksin *B. thuringiensis*, sehingga protein toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia dapat menjadi alternatif bioinsektisida baru pengganti toksin *B. thuringiensis* yang

berdasarkan laporan terakhir tentang terjadi resistensi serangga terhadap *B. thuringiensis*, khususnya pada hasil-hasil transgenik. Hasil pengamatan di lapangan diketahui bahwa resistensi serangga terhadap pestisida kimia lebih cepat terjadi dibandingkan resistensi serangga terhadap bioinsektisida *B. thuringiensis* (Campbell dan Kaya, 1999).

Mengingat bakteri *Photobacterium luminescens* yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat Indonesia yang terbukti mempunyai toksisitas terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* isolat Indonesia, maka akan mempunyai peluang yang besar untuk dapat dikembangkan menjadi bioinsektisida baru. Hal ini didukung dengan pendapat Loyola (1993) penggunaan bioinsektisida dan musuh- musuh alami yang ekologisnya cocok dengan vektor sasaran akan mengoptimalkan hasil akhirnya. WHO (1996) tetap menyarankan agar dicari bahan patogen dan musuh-musuh alami (lokal) terlebih nyamuk *Aedes aegypti* pada daerah endemik demam berdarah Dengue seperti di Indonesia.

Data dasar yang diperoleh dalam penelitian ini sangat penting untuk dikembangkan penerapannya dalam skala yang lebih besar atau pengujian dilapangan dengan penelitian kearah produksi masal.

WHO (1991) sangat mendukung diproduksinya bioinsektisida lokal, di tempat di mana penyakit yang ditularkan nyamuk bersifat endemik, dengan bahan-bahan lokal termasuk mikroba entomopatogen lokal dengan alat-alat yang tersedia di tempat masing-masing. Hal ini akan sangat mengurangi

ketergantungan dari luar dan lagi tentu akan sangat menghemat devisa negara, sehingga *cost-benefit* pemakaian bioinsektisida lokal dapat ditekan serendah-rendahnya, bahkan apabila memungkinkan hasil produksi mempunyai nilai ekonomi tinggi untuk diproduksi dan diekspor ke negara lain.

BAB VII

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN



7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik beberapa kesimpulan:

1. Karakter biakan murni Bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia mempunyai persamaan dengan bakteri *Photobacterium* isolat negara lain (Netherland maupun Victerville). Karakter morfologi bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia memiliki ukuran lebih kecil dari pada bakteri *Photobacterium* isolat Netherland maupun *Photobacterium* isolat Victerville. Karakter biokimia bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia berbeda dengan bakteri *Photobacterium* isolat Netherland dan Victerville pada motilitas, dimana isolat Indonesia negatif, sedang isolat Netherland maupun Victerville positif.
2. Supernatan bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia berupa protein kompleks yang terdiri dari beberapa komponen protein, besarnya konsentrasi protein adalah 0,155 $\mu\text{g/ml}$, mempunyai aktifitas enzim proteolitik dan mempunyai toksisitas terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*, dengan waktu dedah 24 jam, diperoleh besarnya toksisitas (LC_{50}) adalah 0,0129, sedangkan untuk masa dedah 48 jam besarnya

LC₅₀ adalah 0,0119. Beberapa komponen protein dalam supernatan ada yang bersifat patogenik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*.

3. Protein yang bersifat patogenik terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* dapat dipurifikasi dan dikarakterisasi dari supernatan bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia. Hasil purifikasi dan karakterisasi protein bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia yang bersifat entomopatogen terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* menunjukkan adanya protein murni dengan berat molekul 67 kDa, sedangkan dua band yang kurang jelas menunjukkan berat molekul 29 kDa dan 97 kDa. Protein ini mempunyai toksisitas terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti*, untuk masa dedah 24 jam, besarnya LC₅₀ = 0,00131 dan untuk masa dedah 48 jam, besarnya LC₅₀ = 0,00112. Protein toksin ini dapat digunakan dalam pemberantasan larva nyamuk *Aedes aegypti* secara biologi dalam upaya pencegahan penularan penyakit DBD di Indonesia.
4. Terdapat perbedaan hasil pengujian toksisitas supernatan dengan toksisitas protein hasil purifikasi bakteri *Photobacterium luminescens* isolat Indonesia terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*. Hasil pengujian toksisitas protein hasil purifikasi lebih patogenik dari pada hasil uji toksisitas supernatan, baik pada masa pendedahan 24 jam maupun masa dedah 48 jam.

7.2 Saran

Temuan dalam penelitian ini merupakan langkah awal dari penelitian selanjutnya untuk mengungkap lebih luas tentang peran toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia sebagai bioinsektisida baru yang aman terhadap lingkungan dan bersifat spesifik dalam memberantas serangga sasaran. Beberapa hal yang perlu disarankan adalah :

1. Dalam upaya memperoleh toksisitas yang lebih besar perlu adanya penelitian untuk mengetahui komposisi medium yang tepat dan waktu fermentasi yang optimum bagi pertumbuhan bakteri *Photorhabdus luminescens* Isolat Indonesia.
2. Dalam penelitian selanjutnya perlu dikembangkan langkah pemurnian *Chromatographi DEAE-Sephacel*. Cara ini dapat meningkatkan produksi protein toksin, sementara terjadi pengurangan produksi protein yang lain.
3. Pengembangan penelitian untuk mendapatkan protein toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* isolat Indonesia yang murni, spesifik dan dapat diproduksi dalam jumlah yang secara ekonomi menguntungkan, perlu mendapat dukungan dari semua pihak baik pemerintah maupun swasta, karena toksin bakteri *Photorhabdus luminescens* Isolat Indonesia dapat menjadi alternatif pengganti *B. thuringiensis* yang telah diketahui terjadi resistensi pada tanaman transgenik.

DAFTAR PUSTAKA



DAFTAR PUSTAKA

- Adams TS, 1999. Hematophagy and Hormone Release. *Annals of the Entomological Society of America* 92: 1-13.
- Akhurst dan Bedding, 1993. *Nematoda and their biological control of insect pest*, CSIRO Publications, Melbourne, Australia, pp 1-178.
- Akhurst R J, 1986. *Xenorhabdus nematophilus subsp. Poinarii*, its interaction with insect pathogenic nematodes. *Syst Appl Microbiol* 134: 1835-1845.
- Akhurst RJ, 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp. Bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of Genetal Microbiology* 121: 303-309.
- Akhurst RJ & Boemare NE, 1990 *Biology and taxonomy of Xenorhabdus*, in *Entomopathogenic Nematodes in Biological control*. CRC Press, Boca Raton, Fl, pp 75-90.
- Akhurst RJ, 1996. Controlling insects in soil with entomopatogenic nematodes. In: RA Samson, Vlax JM and Peters D, *Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology*, pp 265-267. *Proc. 4th Int. Colloq.*
- Alexander R, Griffith JM and Wilkinson M, 1994. *Basic biochemical methods*. New york : John Willey and Sons, pp 120-125.
- Arnheim A and Erlich H ,1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annual review of Biochemistry* 61: 131-156.
- Artama WT, Margino S, Hartiko H, Asmara W, Mubarika S, Sembiring, 1991. *Isolasi, purifikasi, digesti dan amplikasi DNA, petunjuk lab. Kursus singkat rekayasa genetika, PAU Bioteknologi, UGM, Yogyakarta.*
- Baltasar Briseno-Garcia, 1996. Potential Risk for Dengue Hemorrhagic Fever: The Isolation of Serotype Dengue-3 in Mexico, *Emerging Infectious Diseases* 2(2).

- Baxter RI and Blake CD, 1996. Oxygen and the hatch of eggs and the migration of larvae of *Meloidogyne Javanica*. *Ann Appl Biol* 63:191-550.
- Bedding R A, Akhurst R J & Kaya HK, 1995. Future Prospects of entomogenous and entomopathogenic nematodes, in *Nematodes and the Biological control of insect pest*. Est Melbourne, Australia, pp 157-170.
- Bedding RA, and Molynuex AS, 1996. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis spp*. *Nematologica* 28: 354-359.
- Bird AF and Akhurst RJ, 1983. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family *Steinernematidae*. *International journal of Parasitology* 13: 599-606.
- Blackburn M, Golubeva E, Bowen D and Ffrench-Costa RH, 1998. A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminiscens*; toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol* 64: 3036-3041.
- Bloch W, 1991. A biochemical perspective of polymerase chain reaction. *Biochemistry* 30(11) : 2736-2747.
- Boemare NE and Akhurst, 1994. DNA homology between *Xenorhabdus* and *Photorhabdus spp* : Convergent evolution of two different genera. East Melbourne, Australia, pp 157-170.
- Boemare NE, Lanmond and Mauleon H, 1996. The entomopathogenic nematodes and their associated bacteria : Phenotypic targets, genetic limitations and an assesment of possible hazards. *Biocontrol Science and Technology* 6: 435-447.
- Bomare N E and Alain Givaudan, 1996. Pathogenicity of the symbionts. *J. Gen. Microbiol* 134: 751-761.
- Bowen D and Ffrench-Constant R, 1999. *Photorhabdus* toxin complex. *J. Biotechnology* 235- 277.
- Bowen D T, Rocheleau M, Blackburn O, Andreev E, Golubeva R, Bhartia And Ffrench-Constant R, 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science* 280: 2129 -2132.

- Bowen DJ And Ensigr JC, 1996. Crystalline inclusion protein and an insecticidal toxin of *Xenorhabdus spp.* J. Gen. Microbiol 134: 751-761.
- Bowen DJ And Ensigr J C, 1998. Purification and Characterization of a High-Molecular-Weight Insecticidal Protein Complex Produced By The Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens*. Applied and Environmental Microbiology, pp 3029-3035.
- Bradford MM,1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. Anal. Biochem 72 :248-254.
- Briseno-Garcia, 1996. Potential risk for Dengue hemorrhagic Fever. The isolation of serotype Dengue-3 in Mexico, Emerging infectious diseases 2 (2).
- Brown HW, 1979. Dasar-dasar Parasitologi klinis. Terjemahan Bintari Rukmono, Edisi ketiga, PT Gramedia, Jakarta, pp 535.
- Burnell AM, and Dowds, 1996. The genetic improvement of entomopathogenic nematodes and their associated bacteria: Phenotypic targets, genetic limitations and an assesment of possible hazards. Biocontrol Science and Technology 6: 435-447.
- Campbell JF and Gaugler R, 1995. Nivation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopatogenic nematodes (*Heterorhabditis* and *Steinernema*). Behaviour 126: 155-169.
- Campbell JF, Lewis EE, Yoder and Gaugler R, 1996. Entomopathogenic nematode *Heterorhabditidae* and *Steinernema* spatial distribution in turfgrass. Parasitology 113: 473-483.
- Campbell JF and Kaya HK,1999. How and why aparasitic nematode jumps. Nature 397: 485-486.
- Campbell JF and Gaugler R, 1997. Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: dichotomy or variation along acontinuum. Fundamental and Applied Nematology 20: 393-398.
- Chadee, 1994. Seasonal Abundance, Biting Cycle, and Parity of the Mosquito *Anopheles homonculus* in Trinidad, West Indies. Journal of the American Mosquito Control Association, 10(4): 522-526.

- Chial HJ, Thompson HB and Splittgerber AG, 1993. A spectral study of the charge form of coomassie blue G. *Anal. Biochem* 209: 258-266.
- Clarke DJ and Dowd BCA, 1995. Virulence mechanism *Photorhabdus spp* strain K122 toward wax moth larvae. *J. Invertebr. Patho* : 149-165
- Congdon RW, Muth GW, and Splittgerber AG, 1993. The binding interaction of coomassie blue with protein. *Anal. Biochem* 178:407-413.
- Crowther JR, 1995. ELISA theory and practise in methods in molecular Biology, vol. 42. Humana Press, New Jersey.
- Davidson EW, 1984. Microbiology, Pathology and Genetic of *Bacillus*: Biological Aspects which are important to field Use. *Mosq. News*, 44 (2): 178-184.
- Dekker T, Takken W, Knols BGJ, Bouman E, Van De Laak S, De Bever A, huisman P W T, 1998. Selection of Biting Sites on a Human Host by *Anopheles gambiae ss*, *arabiensis* and *An. Quadriannualatus*.
- Donald S and Scott B, 1993. Dengue in diseases control priorities in developing countries, pp 304-305
- Duane J and Gary G, 1996. Community Involvement in the Control of *Aedes aegypti* *Acta Tropica* 61: 170.
- Duane J and Gary G, 1994. Community based integrated control of *Aedes aegypti* : A brief overview of current programs. *American journal of tropical medicine and hygiene* 50(6): 50.
- Duane J and Gary, 1995. Dengue hemorrhagic Fever : The emergence of a global health problem, *Emerging infection diseases* 1(2): 55-57.
- Edward B and Duane J, 1992. Dengue and dengue hemorrhagic fever, *pediatric infectious diseases journal* 11(4): 315.
- Ehlers RU, 1996. Insect biocontrol with non- endemic entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis spp*) : Conclusions and recommendations of a combined OECD and COST workshop on scientific and regulatory policy issues. *Biocontrol Science and technology* 6: 295-302.

- Ehlers RU and Peters A, 1995. Entomopathogenic nematodes in biological control : Feasibility, perspectives and possible risks, in *Biological control : Benefits and Risks*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 119-136.
- Feller W, 1995. An introduction to probability theory and its application. Vol.1.3rd ed. John Wiley and Sons, NY.
- Ffrench R, 1999. *Photorhabdus* toxin : novel biological insecticides. *Science* 280 : 2129-2142.
- Forst S and Nealsor K, 1996. Molecular biology of the symbiotic- pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. And *Photorhabdus* spp. *Microbial Rev* : 24-46.
- Gaugler R, 1993. Ecological genetics of entomopathogenic nematodes, in *Nematodes and the Biological control of insect Pests*. CSIRO, East Melbourne, pp 89-95.
- Gaugler R, 1996. Ecologicqal considerations in the biological control of soil inhabiting insect with entomopatogenic nematodes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 24: 35- 360.
- Georgis R, 1996. Present and future prospekt for entomopathogenic nematodes products. *Biocontrol and Science and Technology* 2: 83-99.
- Golberg LJ and Margalit J, 1977. Bacterial spore demostrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *uranotaenia ungulata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. *Mosq. News* 37(3): 355-358.
- Grewal PS, Gaugler R and Selvan S, 1995. Host recognition by entomopathogenic nematodes : behavioral response to contact with host faeces, *J Chem Ecol* 19: 1219-1231.
- Grewal PS, Tomalak M, Kell CBO and Gaugler R, 1994. Evaluation of agenetically selected strain of *Steinernema feltiae* against the mushroom sciarid *Lycoriellaa mali*. *Annals of Applied biology* 123: 695-702.
- Griffin CT, Joyce SA, and Burnell AM, 1994. The use of isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins in the taxonomy of the genus *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae), *Nematologica* 40: 601-612.

- Guhl F, Schofield CJ, Collin FH, 1996. The polyubiquitin gene of the mosquito *Aedes aegypti* structure and expression. *Insect Mol Biol* 109-117.
- Harold, 1979. *Dasar Parasitologi Klinis*, Gramedia, Jakarta.
- Hoedoyo, 1993. Vektor Demam berdarah Dengue dan upaya penanggulangannya. *Jurnal Parasitologi Indonesia* 6 (1).
- Hominick WM, Reid AP, Bohan DA and Briscoe BR, 1996. Entomopathogenic nematodes : Biodiversity, geographical, distribution and the convention on biological diversity. *Bio. And technology* 6: 317-333.
- James AA, Blackmer K, Marinotti O, Ghosn CR, Racioppi JV, 1991. Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito *Aedes aegypti*. *Mol Biochem Parasitol* 44:245-54.
- Kaya H, Klein M and Burlando M, 1993. Impact of *Baccillus* spp, and nematodes entomopathogenic on a population of the scarabaeid, *cyclocephala hirta*. *Biocontrol science and technology* 3 :443-453.
- Klowden M J, Fernandez NM, 1996. Effects of Age and Mating and the Host Seeking Behavior of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Journal of Vector Ecology* 21 (2): 156-158.
- Lapolla RI, Harar JA, Kelly CG, Taylor WR, Bohart C, Hendricks M, 1991, Sequence and structural analysa of surface protein antigen I/II (Spa A) of *Streptococcus sobrinus*, *infect. Immun* 59 (8): 2677-2685.
- Lee HL, 1990. Isolation of indigenous larvicidal microbial control agents of mosquitoess. *The Malaysian experiencesis South East Asian. J. Trop. Med. Pub. Hlth* 21 (2) : 281-287.
- Lehmann T, Besanky NY, Hawley WA, Fahey TG, Kamau L, Collins FH, 1997. Microgeographicstructure of *Aedes aegypti* in western Kenya based on mt DNA and microsatellite loci. *Mol Ecol* 243-253.
- Lewis EE, Selvan S, Campbell JF and R Gaugler, 1995. Changes in foraging behavior during the infective stage of entomopathogenic nematodes. *Parasitology* 110 :583-590.

- Lim Suwan, 1987. Rearing techniques for mosquitoes, practical entomology malaria and filariasis. MRC trop. Med. Mahidol University, Thailand 47-62.
- Loyola EG, 1993. Anopheles albimanus Host Selection Patterns in Three Ecological Areas of the Costal Plains of Chiapas, Southern Mexico. Journal of Medical Entomology 30: 518-523.
- Lunau S, Stoessel S, Schmidt AJ and Ehlers RU, 1995. Establishment of monoxenic inocula for scaling up in vitro cultures of the entomopathogenic nematodes *Stenemema spp.* And *Heterorhabditis spp.* Nematologica 39: 385-399.
- Mardihusodo SJ, 1991. Basili pembentuk spora yang patogen. Berkala ilmu kedokteran, Jakarta, XXIII (1) : 25-36.
- Mardihusodo SJ, 1988. Percobaan isolasi bakteri yang patogenik terhadap larva nyamuk di Yogyakarta. M. Parasitologi. Indonesia I (3&4) : 47-54.
- Mardihusodo SJ, 1989. Pengaruh perubahan lingkungan fisik terhadap penetasan telur nyamuk *Aedes aegypti*. B.K.M, 4 (6) 185-189.
- Mracek Z, 1997. The distribution of *Steinernematid* nematodes in Czecholovakia. Proc. Int. Colloq. Invertebr. Pathil. Prague, 145-146.
- Narro and Gomez D, 1995. El dengue en Mexico un problema prioritario de salud publica, salud publica Mexico, 37(2).
- Novak M G, Rowley WA, 1994. Serotonin Sepletion Affects Blood Feeding but Not Host Seeking Ability in *Aedes triseriatus*. Journal of Medical Entomology 31: 600-606.
- Nuttall I, 1997. Web Pages, Division of Control of Tropical Diseases. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Oka, Ida Nyoman, 1993. Pertanian berkelanjutan : pengalaman penerapan konsep PHT dan prospek pengembangannya dalam pendidikan tinggi pertanian. Lokakarya Nasional Pendidikan Tinggi Pertanian Masa Depan. Fakultas Pertanian Institut Pertanian, Bogor, 15 hlm.
- Platt K B, Linthicum K J, Myint KSA, Innis BL, 1997. Impact of Dengue Virus Infection on Feeding Behavior of *Aedes aegypti*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 57(2):119-125.

- Poinar JJ, 1995. Taxonomy and Biology of *Steinernema* and *Heterorhabditis*. In : Gaugler, R. and Kaya, H.K. (Eds), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, pp 23-61. CRC Press, Boca Raton.
- Roque P, 1994. Chemical factor released by *Steinernema carpocapsae* correlated with the penetratin in the insect host, in Sixth international colloquium on invertebrate pathology and microbial control- second international conference on *Bacillus Thuringiensis*, society for invertebrate pathology, Montpellier, pp 277.
- Schoeff LE, Williams RH, 1993. Principle of laboratory instruments, Mosby-year book, Inc, pp 165-169.
- Scopes RK, 1987. Protein purification principle and practice, springer-verlag, New York Inc.
- Simoes N and Rosa JS, 1996. Pathogenecity and Host Specificity of Entomopathogenic Nematodes . Bio. Sci. Technology 6: 403-413.
- Siti Rahmah, 1990. Analisis probit secara arismetik untuk pengujian toksisitas insektisida terhadap serangga. Lab. Parasitologi UGM, Yogyakarta.
- Soedarto, 1990. Entomologi Kedokteran. EGC. Jakarta, pp 21-26
- Soedarto, 1991. Pola kekebalan nyamuk *Culex fatigans* di Surabaya terhadap Insektisida. Lembaga penelitian Universitas Airlangga, Surabaya, pp 45-49.
- Spiridonov SE, Akhmedov EN, 1994. Proliferation of symbiotic bacteria in the intestinal vesicles of invasive larvae of *Neoplectana spp.* Helminthologia 28: 141-142.
- Stahly DP and Andrews RE, 1990. The genus *Bacillus* Insect Pathogen. Iowa: State University of Iowa, pp 42-83.
- Stephen and Schluederberg, 1990. Emerging viruses, the evolution of viruses and viral diseases, Journal of infektious diseases 2(2).
- Stoscheck CM, 1990. Increased uniformity in the response of the Coomassie blue protein assay to different protein. Anal. Biochem 178 : 111-116
- Strauch O and Ehlers R, 1998. Food signal production of *Photorhadus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis spp.* in liquid culture. Appl. Microbiol and Biotechnol, in

- press(Sulistiyanto dan Ehler, 1996. Efficacy of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis megidis* and *H. bacteriophora* for the control of Grubs in Golf Course Turf. *Biocontrol science and Technology* 6: 247-250.
- Sulistiyanto D, 1997. Untersuchungen zum Wirkungspotential Enthomopathogener Nematoden (*Heterorhabditis spp*) zur Biologischen Bekämpfung von Engerlingen des Gartenlaubkafer (*Phyllopertha horticola*). PhD Dissertation, University of Kiel, Germany pp 47-53.
- Sumarmo T, Suroso A, Abdulkadir, Lubis L, 1994. The epidemiology, control and prevention of Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) in Indonesia. *Cermin dunia kedokteran* 92 : 5-10.
- Sunthorn Sirivakarn, 1972. Contribution of the American Entomological Intitute, Washington, D.C. 20.
- Szallas E, Koch C, Fodor A, Burghardt J, Buss O, Szentirmai A, Nealsen K H and Stackebrandt E, 1997. : Phylogenetic evidence for the taxonomic heterogeneity of *Photorhabdus luminescens*. *Int. J. Syst. Bacteriol* 47: 402-407.
- Thomas P, 1994. Dengue, The risk to developed and developing countries, *Proceeding of the national academy of sciences* 91: 2397.
- Vaughan J A, Noden BH, Beier JC, 1994. Prior Blood Feeding Effects on Susceptibility of *Anopheles gambiae* to Infection with Cultured plasmodium falciparum. *Journal of Medical Entomology* 31: 445-449.
- WHO Exp.Com.on Insecticides, 1976. Twenty-second Report. *Wld. Hlth. Org. Tech.Rep.Ser. No: 585*.
- WHO, 1991. Biological Control of Vector. *UNDP/World Bank/ WHO Spec. Prog. Res. Train. Trop. Dis, Geneva* pp 97-101.
- WHO, 1996. The world health report : Fighting diseases fostering development, Geneva, pp 24.
- Yadava and Narasimham, 1992. Dengue Haemorrhagic Fever and its Control in India *Dengue Newsletter*.
- Yule GU and Kendal MG, 1990. An introduction to the theory of statistik. 14th ed. Ch. Griffin and Co, Ltd, London.

LAMPIRAN

lampiran 1. PROBIT ANALYSIS

DATA Tahap Pengujian akhir Tabel 5.14; 5.15; 5.16 atau Data Probit 3.
 18 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of out-of-range group values.
 0 cases rejected because of missing data.
 6 cases are in the control group.
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

Group Information

F	Level	N of Cases	Label
	1	9	Masa dedah 24 Ja
	2	9	Masa Dedah 48 Ja

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.
 Natural Response rate to be estimated
 The number of subjects in the CONTROL group 180,0
 The number of responses in the CONTROL group ,0



PROBIT ANALYSIS

Parameter estimates converged after 17 iterations.
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):
 Regression Coeff. Standard Error Coeff./S.E.

X	1,69097	,23737	7,12375
---	---------	--------	---------

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.	F
-----------	----------------	----------------	---

-3,61044	,60504	-5,96723	Masa dedah 24 Ja
-3,38188	,57220	-5,91030	Masa Dedah 48 J.

Estimate of Natural Response Rate = ,032408 with S.E. = ,04931

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 9,795 DF = 14 P = ,777
 Parallelism Test Chi Square = 1,237 DF = 1 P = ,266

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

Covariance(below) and Correlation(above) Matrices of Parameter Estimates

	X	NAT RESP
X	,05634	,80902
NAT RESP	,00947	,00243

Observed and Expected Frequencies

F	X	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
1	3,00	30,0	30,0	27,916	2,084	,93052
1	2,70	30,0	25,0	25,060	-,060	,83533
1	2,40	30,0	19,0	20,468	-1,468	,68227
1	2,10	30,0	14,0	14,738	-,738	,49127
1	2,00	30,0	12,0	12,863	-,863	,42876
1	1,70	30,0	7,0	7,660	-,660	,25534
1	1,40	30,0	5,0	4,057	,943	,13524
1	1,10	30,0	3,0	2,121	,879	,07070
1	1,00	30,0	1,0	1,769	-,769	,05898
2	3,00	30,0	30,0	28,682	1,318	,95606
2	2,70	30,0	25,0	26,557	-1,557	,88524
2	2,40	30,0	21,0	22,729	-1,729	,75763
2	2,10	30,0	16,0	17,376	-1,376	,57920
2	2,00	30,0	15,0	15,487	-,487	,51623
2	1,70	30,0	12,0	9,837	2,163	,32790
2	1,40	30,0	8,0	5,452	2,548	,18174
2	1,10	30,0	3,0	2,812	,188	,09373
2	1,00	30,0	1,0	2,291	-1,291	,07636

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

Confidence Limits for Effective X

F	1 Masa dedah 24 Ja	95% Confidence Limits	
Prob	X	Lower	Upper
,01	5,74621	1,20086	14,27379
,02	8,32895	1,99493	19,18355
,03	10,54076	2,75155	23,15237
,04	12,58388	3,50350	26,67835
,05	14,53454	4,26339	29,94548
,06	16,43132	5,03782	33,04546
,07	18,29704	5,83091	36,03181
,08	20,14664	6,64555	38,93906
,09	21,99064	7,48399	41,79111
,10	23,83688	8,34809	44,60546
,15	33,28178	13,10700	58,49646
,20	43,39241	18,72413	72,69706
,25	54,48179	25,38155	87,75361
,30	66,83602	33,29393	104,10584
,35	80,77169	42,72655	122,21146
,40	96,67298	54,01390	142,61982
,45	115,03114	67,58365	166,04773
,50	136,49871	83,98953	193,48535
,55	161,97264	103,95877	226,36581
,60	192,73119	128,46445	266,85675
,65	230,67360	158,84618	318,39047
,70	278,77032	197,03632	386,68744
,75	341,98396	246,04102	481,89892
,80	429,38149	311,08749	623,65673
,85	559,82282	402,72968	855,26349
,90	781,64158	547,26242	1295,91326
,91	847,26483	587,96739	1436,07205

,92	924,81410	635,10388	1606,88715
,93	1018,30120	690,69873	1819,84957
,94	1133,92588	757,83597	2093,22811
,95	1281,90504	841,50892	2458,10944
,96	1480,61671	950,51657	2972,52487
,97	1767,60470	1102,39475	3760,41854
,98	2237,00421	1339,74340	5150,72851
,99	3242,46535	1815,35594	8486,94578

PROBIT ANALYSIS

Confidence Limits for Effective X

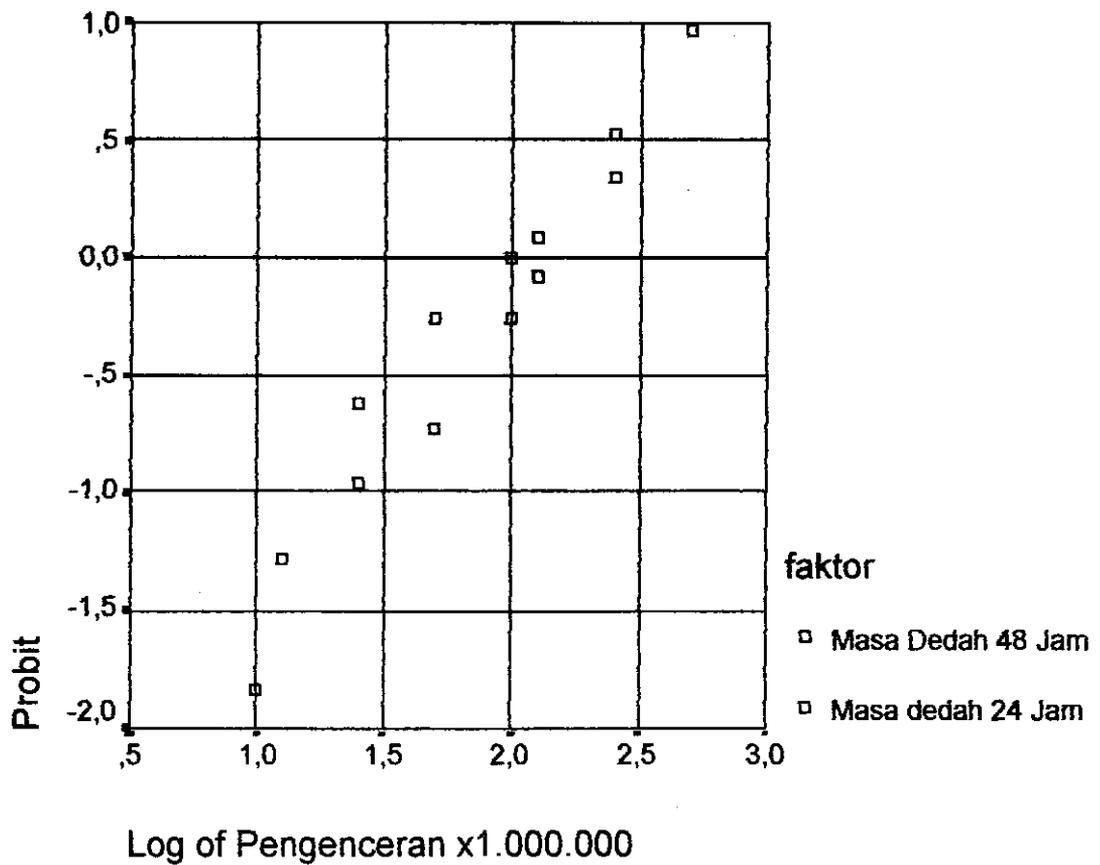
F	2 Masa Dedah 48 Ja	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
Prob	X		
,01	4,20938	,88425	10,40605
,02	6,10136	1,46954	13,97975
,03	7,72161	2,02751	16,86695
,04	9,21829	2,58223	19,43088
,05	10,64725	3,14299	21,80567
,06	12,03673	3,71465	24,05819
,07	13,40346	4,30023	26,22745
,08	14,75838	4,90189	28,33860
,09	16,10920	5,52128	30,40906
,10	17,46166	6,15978	32,45157
,15	24,38050	9,67869	42,52479
,20	31,78702	13,83679	52,80910
,25	39,91052	18,77042	63,69932
,30	48,96059	24,64070	75,51143
,35	59,16914	31,64709	88,57305
,40	70,81760	40,04132	103,27676
,45	84,26583	50,14536	120,13496
,50	99,99186	62,37570	139,85675
,55	118,65274	77,27785	163,47169
,60	141,18485	95,57792	192,54365
,65	168,97949	118,26734	229,56074
,70	204,21264	146,76242	278,68726
,75	250,51967	183,25057	347,33117
,80	314,54256	231,53321	449,82179
,85	410,09709	299,32311	617,73037
,90	572,58999	405,92515	937,88854
,91	620,66217	435,91120	1039,81737
,92	677,47073	470,62340	1164,07846
,93	745,95452	511,55226	1319,04548
,94	830,65515	560,96562	1518,03280
,95	939,05699	622,53505	1783,69975
,96	1084,62283	702,72996	2158,35235
,97	1294,85531	814,44236	2732,36426
,98	1638,71299	988,98788	3745,63061
,99	2375,26155	1338,67160	6178,24026

Estimates of Relative Median Potency

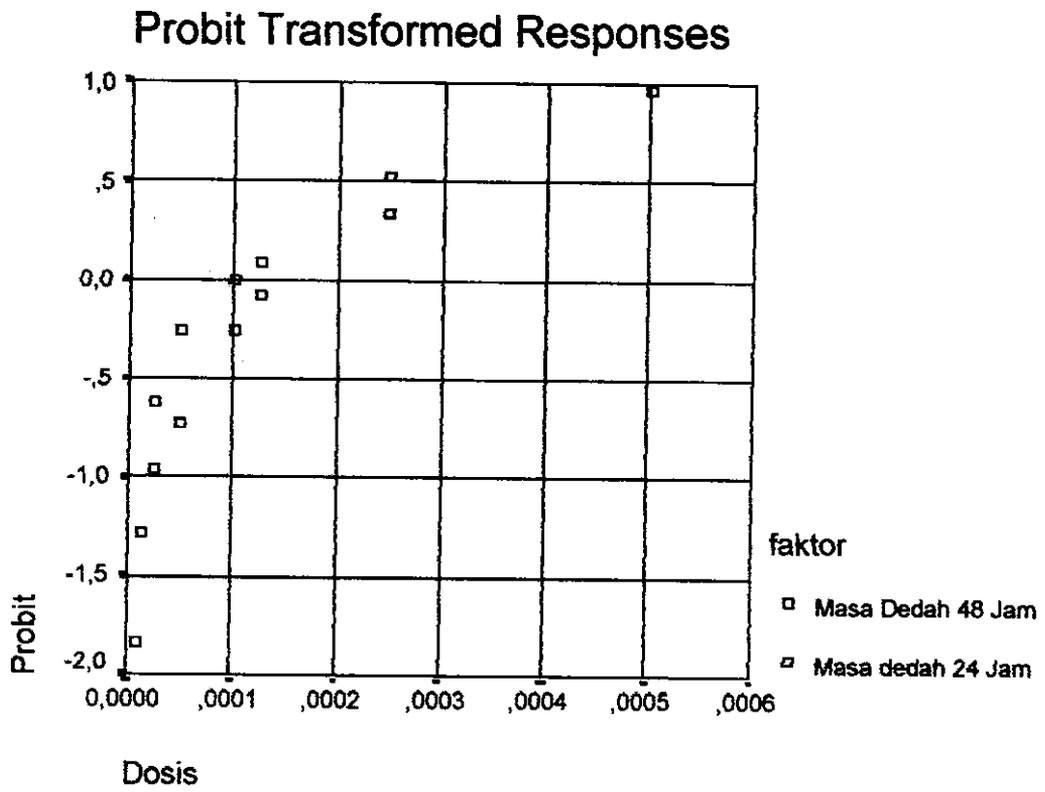
F	Estimate	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
1 VS. 2	1,3651	,93318	2,21205

LAMPIRAN 2

Probit Transformed Responses

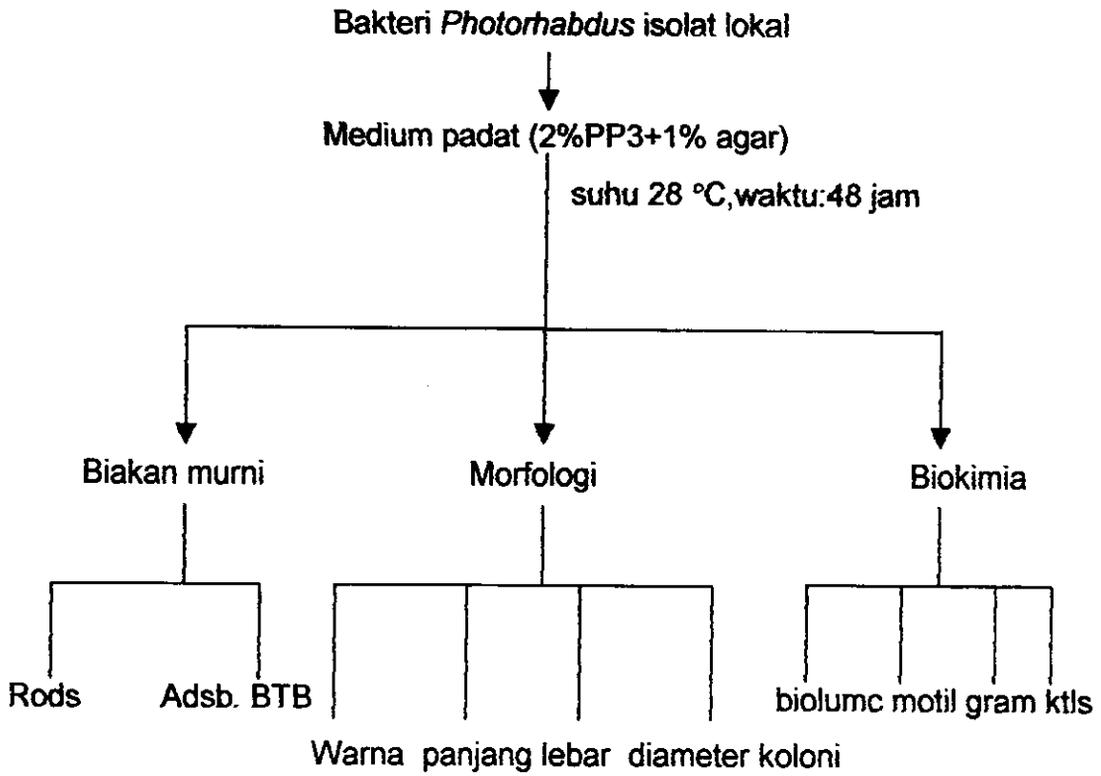


Lampiran 3 : Probit Transformed Responses

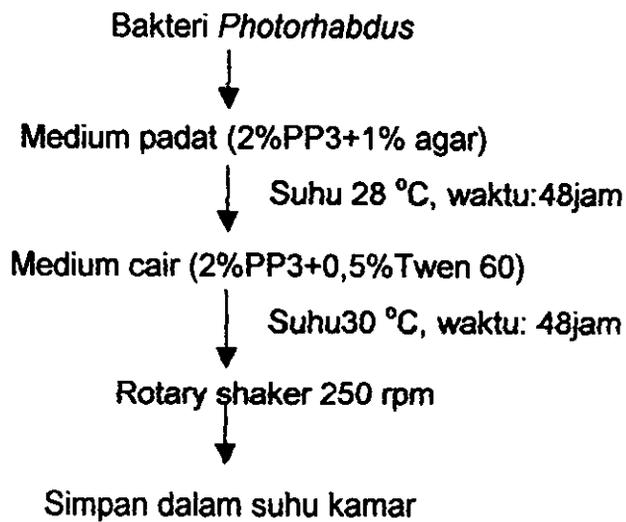


Lampiran 4 : Tahap-Tahap Penelitian

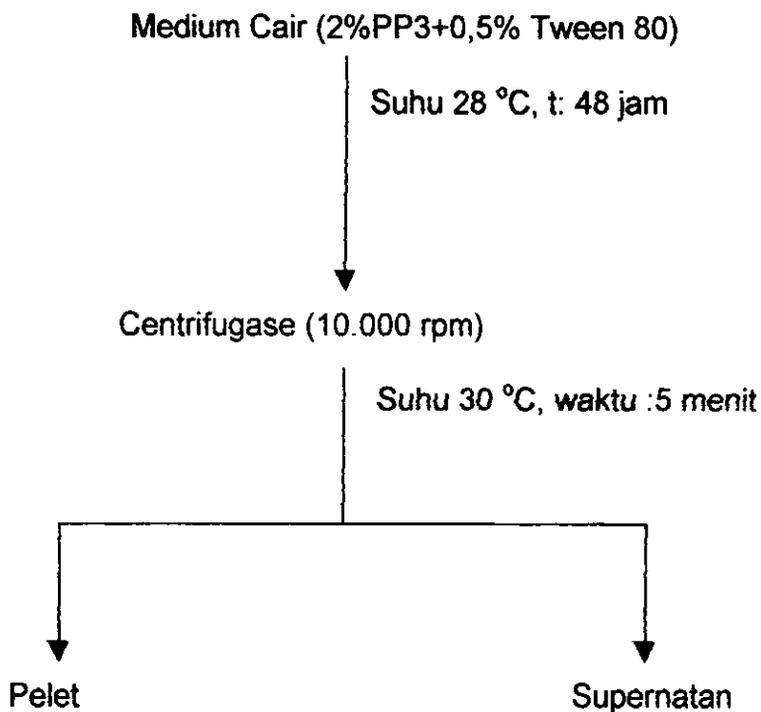
4.1. Tahap karakterisasi bakteri *Photorhabdus* isolat lokal



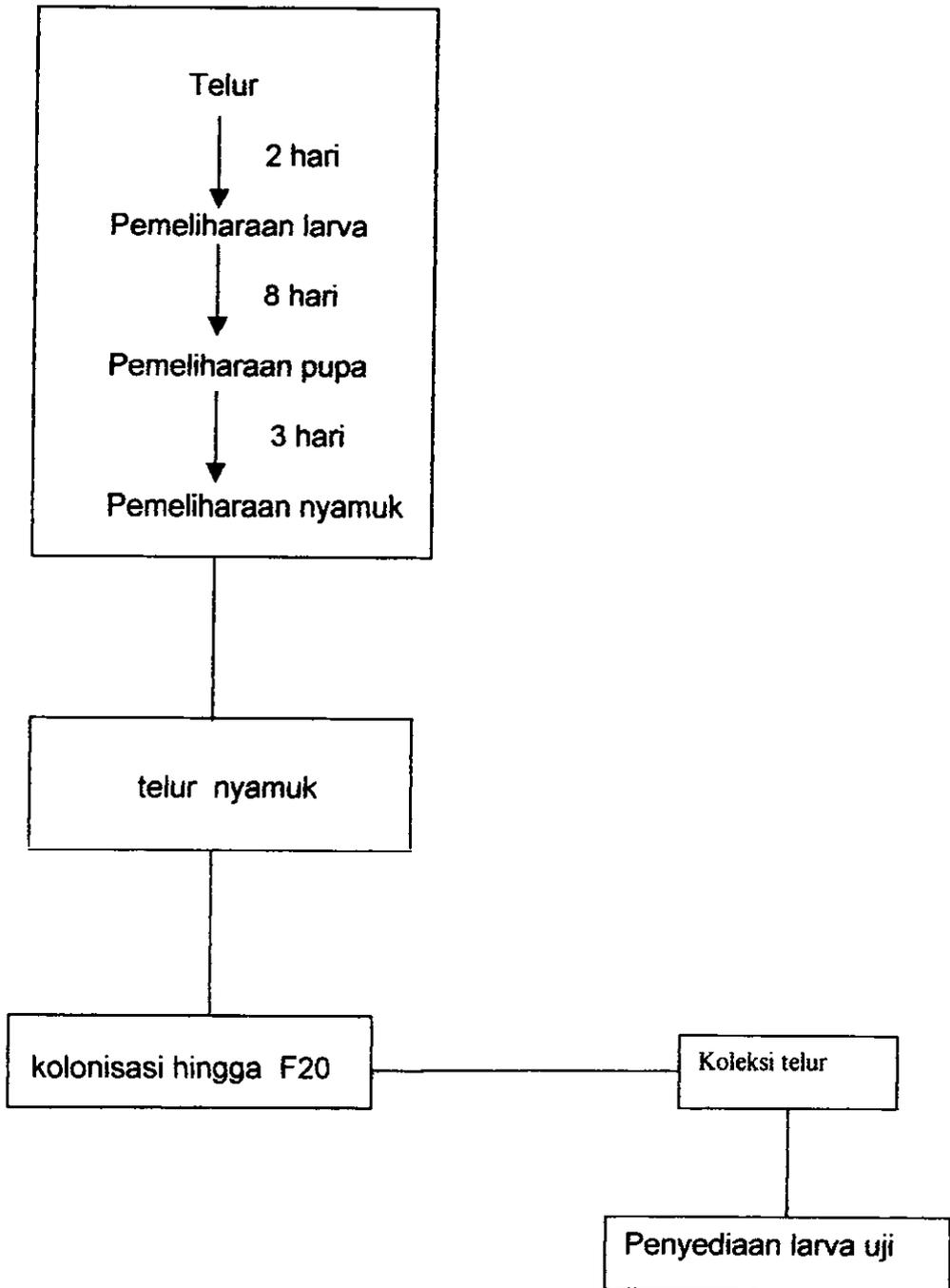
4.2. Pembuatan Biakan Cair Bakteri *Photorhabdus* isolat lokal



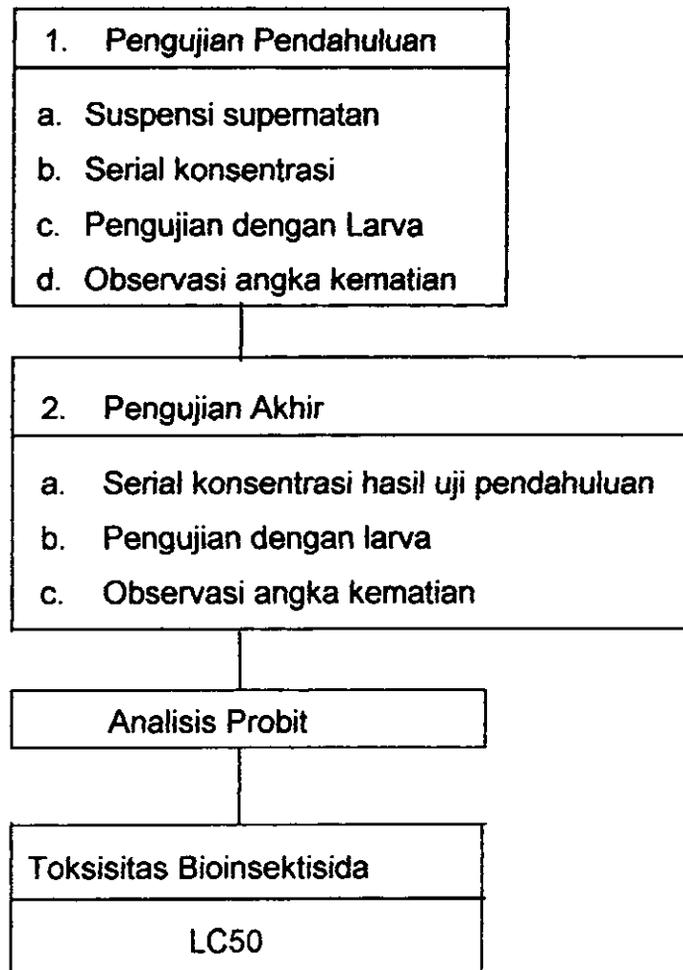
4.3. Pembuatan Supernatan



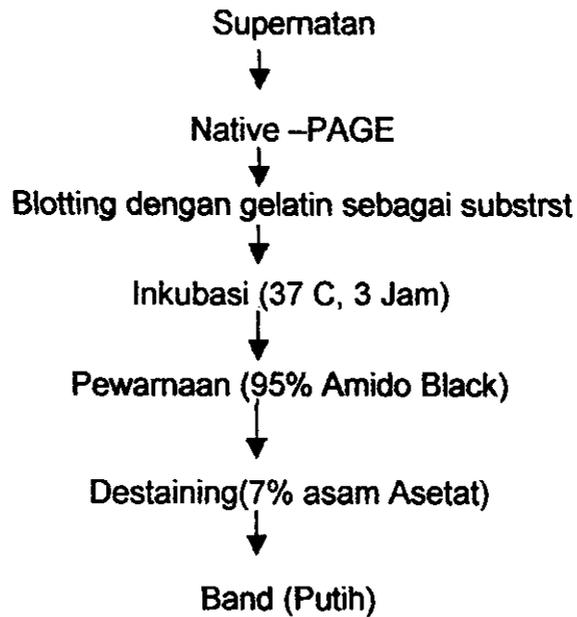
4.4. Tahap Kolonisasi Larva Uji



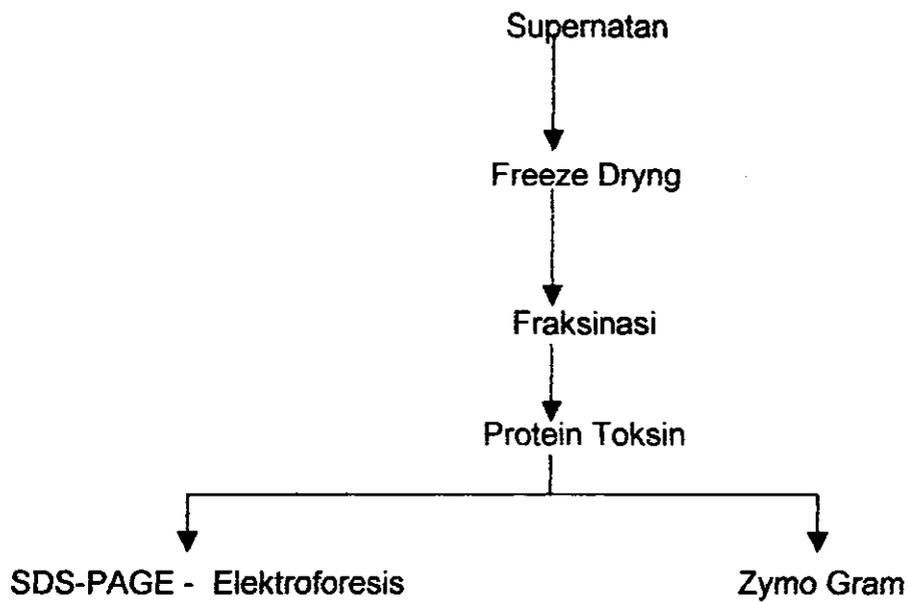
4.5. Pengujian Toksin Supernatan



4.6. Uji Zymo Gram



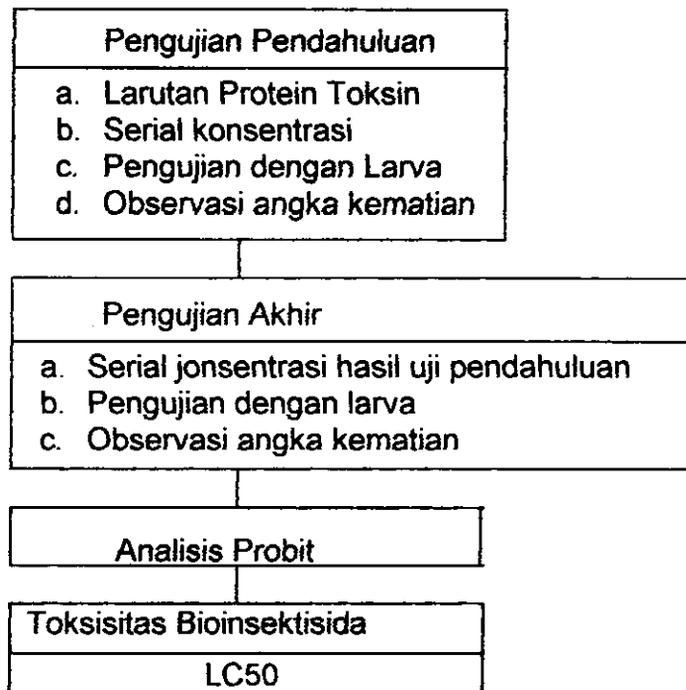
4.7. Purifikasi



4.8. Proses SDS – PAGE



4.9. Pengujian Toksin Protein



Lampiran 5. Hasil perhitungan konsentrasi Protein.

1. Supernatan

Persamaan Regresi $Y = a + b X$

$$Y = -5.027 + 173,866 X$$

Absorban 595 $0,458 - 0,34 = 0,118 X$

$$y = -5.027 + 173,866 X$$

$$= 15,489 \mu\text{g} / 100 \text{ ml}$$

$$= 0,155 \mu\text{g} / \text{ml}$$



2. Protein Toksin

Persamaan Regresi $Y = a + b X$

$$Y = -5.027 + 173,866 X$$

Absorban 595 $0,47 - 0,34 = 0,34$

$$Y = -5,027 + 173,866 X$$

$$X = 18,445 \mu\text{g} / 30 \text{ ml}$$

$$X = 0,615 \mu\text{g} / \text{ml}$$