

Uji Toksisitas *Bacillus thuringiensis* Asal Kota Nganjuk Terhadap Larva *Aedes aegypti*

Erma Kusuma Pratiwi¹⁾, Setijono Samino¹⁾, Zulfaidah Penata Gama^{1,2)}, Nobukazu Nakagoshi¹⁾

¹⁾Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

²⁾Graduate School for International Development and Cooperation (IDEC), Hiroshima University, Japan

Alamat Korespondensi: Erma Kusuma Pratiwi (ermakusumapратиwi@yahoo.com)

ABSTRAK

Demam Berdarah *Dengue* (DBD) merupakan salah satu penyakit endemik di Indonesia dan menyebabkan banyak kematian penduduk, khususnya di Provinsi Jawa Timur. Kota Nganjuk memiliki tingkat kelimpahan larva *Aedes aegypti* tertinggi di Provinsi Jawa Timur pada tahun 2008-2010. Kota Nganjuk merupakan daerah fokus utama untuk penanganan penyakit endemik DBD di Indonesia. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan isolat *Bacillus thuringiensis* asal Kota Nganjuk yang paling efektif dalam membunuh larva *Aedes aegypti*. Sampel sedimen dan air diambil dari 10 lokasi di Kecamatan Nganjuk. Bakteri diisolasi menggunakan media selektif *B. thuringiensis* kemudian dilakukan karakterisasi fenotip (*Profil Matching Method*), seleksi isolat yang patogen dan uji toksisitas (LC_{50}) pada larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III. Persentase mortalitas larva dianalisis probit (LC_{50}) dan ragam (*ANOVA*). Hasil isolasi mendapatkan dua isolat *B. thuringiensis* yaitu K.K1.S.K2 dan W.Swh.S.K2 dari 26 isolat bakteri yang mampu membunuh larva *Aedes aegypti* instar III lebih dari 50 %. Isolat K.K1.S.K2 serta W.Swh.S.K2 dengan umur biakan 48 jam pada waktu pendedahan 72 jam efektif membunuh larva *Aedes aegypti* instar III secara berurutan yaitu 83,3 % dan 76,67 %. Isolat W.Swh.S.K2 hasil isolasi dari sampel sedimen memiliki toksisitas tertinggi dengan nilai LC_{50} 48 jam sebesar $3,53 \times 10^7$ sel/ml.

Kata Kunci : *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis*, Demam Berdarah *Dengue*, Uji Toksisitas

ABSTRACT

Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) is one of endemic disease in Indonesia and increase mortality of people, especially in East Java. Nganjuk has the highest density of *Aedes aegypti* larvae from all city in East Java at 2008-2010 caused of it. Nganjuk was the one of major DHF epidemic foci in Indonesia. The objective of this research was to get *Bacillus thuringiensis* isolates from Nganjuk City that has highest toxicity to *Aedes aegypti* larvae. The sediment and water samples were taken from 10 sites in Nganjuk. Bacterial isolation was performed using *B. thuringiensis* selective media. Phenotypic characteristics of the isolates were obtained with the simple matching method, and the toxicity tests were also performed on the third instar larval stage of *Aedes aegypti*. Larvae mortality was analyzed by using regression probit and value of LC_{50} was analyzed using ANOVA. Two indigenous *B. thuringiensis* isolates among the 26 bacterial isolates, K.K1.S.K2 and W.Swh.S.K2 were toxic to the third instar larvae of *A. Aegypti* more than 50 % mortality. The K.K1.S.K2 and W.Swh.S.K2 isolates at the age of 48-hour culture at 72 hours of exposure time kill the third instar larvae of *Aedes aegypti* at 83,3% and 76,67%, respectively. W.Swh.S.K2 that isolated from sediment sample has highest toxicity for killing the third instar larvae of *Aedes aegypti* at LC_{50} 48 h = $3,53 \times 10^7$ cells / mL.

Key words: *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis*, Dengue Hemorrhagic Fever, Toxicity Test

PENDAHULUAN

Demam Berdarah *Dengue* (DBD) merupakan penyakit endemis di Indonesia yang menyebabkan banyak kematian penduduk. Penyakit DBD disebabkan oleh virus *dengue* dan ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* L.[18]. Pada tahun 2010 jumlah kematian akibat kasus DBD di Indonesia sekitar 1.317 orang, hal ini menyebabkan Indonesia menduduki urutan tertinggi untuk kasus DBD di ASEAN [1].

Nganjuk merupakan salah satu Kota di Provinsi Jawa Timur yang dinyatakan sebagai daerah

endemis DBD dan dinilai paling rawan, sehingga kota tersebut merupakan daerah fokus utama untuk penanganan penyakit tersebut. Berdasarkan data dari Dinas Kesehatan Jawa Timur tahun 2010 [7], Kota Nganjuk memiliki nilai kelimpahan larva *A. aegypti* tertinggi dari seluruh kota di Provinsi Jawa Timur dari tahun 2008-2010 yaitu dengan rata-rata 70,58 %. Selain itu berdasarkan analisis kasus DBD Dinas Kesehatan Jawa Timur periode Tri Bulan I (Januari-Maret 2012) Kota Nganjuk mengalami peningkatan jumlah penderita dan peningkatan angka kematian (CFR).

Penularan penyakit DBD akan terus meningkat apabila tidak adanya upaya pemberantasan serta akibat tingginya kontak dengan nyamuk vektor DBD [5]. Pengendalian yang umum dilakukan adalah dengan menggunakan bahan kimia, namun penggunaan secara berlebihan akan menyebabkan resistensi vektor virus *dengue*, pencemaran lingkungan, serta terbunuhnya musuh alami (organisme bukan sasaran). Oleh karena itu diperlukan metode pengendalian yang lebih mengutamakan keamanan lingkungan dengan pengendalian secara biologi yaitu dengan memanfaatkan toksin dari *B. thuringiensis* [3]. Penggunaan bakteri *B. thuringiensis* lebih ramah lingkungan karena mempunyai target yang spesifik (tidak mematikan serangga bukan sasaran) dan mudah terlarut sehingga tidak terakumulasi dan mencemari lingkungan [4, 13].

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel. Penentuan lokasi pengambilan sampel didasarkan pada data kelimpahan larva *A. aegypti* tertinggi dari seluruh kota di Provinsi Jawa Timur tahun 2008-2010 (Dinas Kesehatan Jawa Timur, 2010). Lokasi pengambilan sampel tersebut adalah di Kelurahan Kauman dan Kelurahan Werungotok, Kecamatan Nganjuk, Kabupaten Nganjuk, Jawa Timur.

Isolasi *Bacillus thuringiensis*. Bakteri diisolasi dengan metode yang merujuk pada Atlas (2004); Gama & Marwati (2005); Chatterjee dkk. (2007) [2, 6, 11]. Media yang digunakan untuk isolasi bakteri adalah media selektif *B. thuringiensis* yaitu glukosa 3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, *yeast extract* 2 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,08 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, Agar 15 g dalam 1000 ml akuades. Biakan diinkubasikan selama \pm 48-72 jam dalam inkubator dengan suhu 30° C. Karakter koloni bakteri yang diisolasi yaitu berbentuk bulat, dengan tepian berkerut, memiliki diameter 5 – 10 mm, berwarna putih, elevasi timbul (*raised*) dan permukaan koloni kasar [16], serta merupakan bakteri Gram positif, memiliki sel vegetatif berbentuk batang dengan ukuran panjang 3-5 μm dan lebar 1-1,2 μm , memiliki endospora dengan letak subterminal [19].

Isolat yang memiliki karakter mirip dengan *B. thuringiensis* dimurnikan dengan metode *streak plate* secara kuadran, dan diinkubasikan selama \pm 48-72 jam dalam suhu 30° C. Isolat yang telah dimurnikan disimpan pada media NA (*Nutrient Agar*) dengan suhu 4° C.

Klasifikasi bakteri berdasarkan nilai similaritas sifat-sifat fenotip. Uji biokimia yang dilakukan meliputi uji katalase, hidrolisi pati, *voges proskauer*, dan diuji menggunakan API 50 CHB (*bioMerieux, Marcyle Etoile, France*). Similaritas isolat bakteri diketahui dengan menggabungkan seluruh data karakter fenotip kemudian diolah menggunakan program CLAD97 [15]. Data tersebut diolah menggunakan program CLAD97 untuk mengkonstruksikan dendogram yang mencerminkan indeks similaritas antarstrain menggunakan algoritma pengklasteran *average linkage* (UPGMA: *Unweight Pair Group Method with Arithmetic Average*) [15].

Uji Toksisitas *B. thuringiensis* terhadap larva *A. aegypti*. Larva nyamuk *A. aegypti* diperoleh dari Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, Surabaya. Larva yang digunakan untuk uji toksisitas adalah larva instar III. Isolat bakteri berumur 24 jam diinokulasikan pada 50 ml medium NB (*Nutrient Broth*) yang diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam. Pada setiap waktu inkubasi 24 jam sekali, suspensi bakteri diambil sebanyak 5 ml dan diinokulasikan pada mangkuk plastik yang sebelumnya telah diisi dengan 45 ml air sumur steril. Pada setiap mangkuk diisi dengan 20 ekor larva instar III [23] dan juga ditambah pakan larva berupa *dogfeed*. Perlakuan kontrol berupa 50 ml air sumur yang telah ditambah 20 ekor larva dan *dogfeed* tanpa suspensi bakteri. Mortalitas larva dihitung pada setiap pendedahan 24, 48 dan 72 jam [10].

Isolat bakteri yang dapat membunuh larva *A. aegypti* lebih dari 50% maka dilakukan uji toksisitas kembali dengan seri pengenceran antara perbandingan suspensi bakteri dan air sumur yaitu 50:0, 45:5, 40:10; 35:15, 30:20, dan 25:25 ml. Isolat bakteri pada umur biakan 24-48 jam diinokulasikan dalam 50 ml NB dan diinkubasi pada suhu 30°C sebagai kultur murni. Setiap konsentrasi suspensi kultur dimasukkan dalam mangkuk plastik dan ditambahkan 20 ekor larva instar III beserta *dogfeed*. Perlakuan kontrol berupa 50 ml air sumur yang telah ditambah 20 ekor larva dan *dogfeed* tanpa suspensi bakteri. Mortalitas larva dihitung pada setiap pendedahan 24, 48 dan 72 jam [10].

Nilai LC_{50} dihitung berdasarkan analisis Probit SPSS for Windows *release 16.0*. Nilai LC_{50} setiap waktu pengamatan dan konsentrasi *B. thuringiensis* dilakukan menggunakan uji *Independent Sample T Test* ($\alpha = 0,05$).

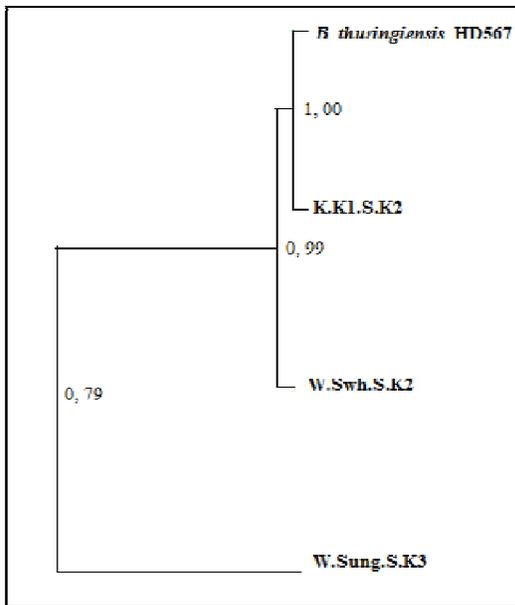
Analisis Data. Uji toksisitas *B. thuringiensis* terhadap larva nyamuk *A. aegypti* diuji menurut Rancangan Acak Kelompok (RAK). Perlakuan pada

percobaan ini yaitu isolat bakteri dan waktu pendedahan. Percobaan tersebut dilakukan sebanyak tiga ulangan dengan parameter uji persentase kematian larva nyamuk *A. aegypti*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Fenotip Isolat Nganjuk yang Memiliki Kemiripan dengan *B. thuringiensis* Pengendali Larva *A. aegypti*

Hasil isolasi bakteri dari Nganjuk didapatkan 59 isolat *Bacillus* spp. dan hanya 26 isolat yang memiliki kemiripan dengan *B. thuringiensis* baik dari hasil pengamatan morfologi koloni, sel dan endospora. Berdasarkan hasil seleksi dari 26 isolat yang dapat membunuh larva *A. aegypti* lebih dari 50 % diperoleh tiga isolat yaitu W.Sung.S.K3, K.K1.S.K2 dan W.Swh.S.K2.



Gambar 1. Dendrogram tingkat similaritas keempat isolat bakteri berdasarkan karakter fenotip

Similaritas antara W.Sung.S.K3, K.K1.S.K2, W.Swh.S.K2 dengan *B. thuringiensis* HD-567 disajikan pada Gambar 1. Suatu isolat dapat dikatakan dalam satu genus dengan indeks similaritas fenotip antara 89-98 %, dalam satu spesies dengan indeks similaritas fenotip 99 %, dan dalam satu *strain* apabila memiliki indeks similaritas fenotip 100 % [14]. Sehingga dapat dikatakan isolat K.K1.S.K2 merupakan satu *strain* dengan *B. thuringiensis* HD-567 karena memiliki indeks similaritas 100 %, sedangkan W.Swh.S.K2 merupakan satu spesies dengan *B. thuringiensis* HD567 karena memiliki indeks similaritas 99 %. Isolat W.Sung.S.K3 memiliki nilai indeks similaritas 79 % dan dianggap tidak dalam satu genus dengan *B. thuringiensis* HD-567, sehingga

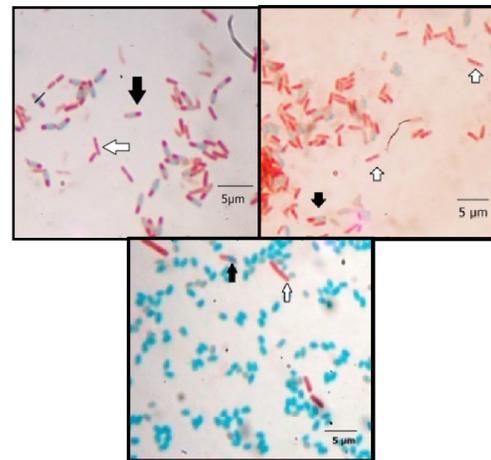
tidak dilakukan uji penentuan LC₅₀ pada isolat tersebut. Isolat W.Swh.S.K2 memiliki similaritas dengan *B. thuringiensis* HD-567 sebesar 99 % karena memiliki perbedaan pada salah satu hasil uji API 50-CHB. Isolat W.Sung.S.K3 memiliki similaritas dengan *B. thuringiensis* HD-567 sebesar 79 % karena memiliki perbedaan warna koloni, dan juga beberapa hasil uji biokimia pada API 50 CHB.

Tabel 1. Karakter fenotip *B. thuringiensis* asal Nganjuk yang memiliki patogenitas terhadap larva *A. aegypti* instar III lebih dari 50 %

Karakter Fenotip	Isolat Bakteri		
	<i>B. thuringiensis</i> HD567	K.K1.S.K2	W.Swh.S.K2
Pengamatan Koloni			
Bentuk <i>Circular</i>	+	+	+
Tepian <i>Round</i>	+	+	+
Elevasi			
<i>Effuse</i>	+	+	+
<i>Flat</i>	-	-	-
Struktur Dalam	+	+	+
Warna			
Putih	+	+	+
Krem	-	-	-
Pengamatan sel			
Gram positif	+	+	+
Ukuran Sel			
1x3,8 µm	+	-	-
1x3,5 µm	-	-	+
1x3,4 µm	-	+	-
Endospora	+	+	+
<i>Subterminal</i>			

Keterangan:

- (+) = memiliki karakter fenotip yang bersangkutan
- (-) = tidak memiliki karakter fenotip yang bersangkutan



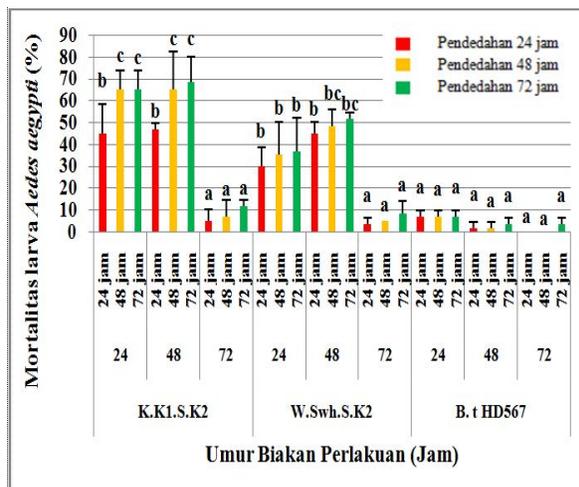
Gambar 2. Morfologi endospora dengan pewarnaan *malachite green* pada perbesaran 1000x. Tanda (⇨) Sel vegetatif; (⇩) Endospora dengan letak subterminal

Hasil Uji Toksisitas (LC₅₀) Isolat Nganjuk Terhadap Larva *A. aegypti*

Hasil seleksi dari 26 isolat yang dapat membunuh larva *A. aegypti* instar III diperoleh dua isolat *B. thuringiensis* yaitu isolat K.K1.S.K2 dan W.Swh.S.K2. Isolat K.K1.S.K2 serta W.Swh.S.K2 dengan umur biakan 48 jam pada waktu pendedahan 72 jam membunuh larva *Aedes aegypti* instar III lebih dari 50 % berturut-turut yaitu 68,3 % dan 51,67 % (Gambar 3). Kedua isolat tersebut memiliki daya bunuh paling efektif dibandingkan isolat-isolat yang lainnya karena memiliki nilai mortalitas yang tinggi. Perbedaan tingkat toksisitas dari 26 isolat tersebut diduga karena adanya perbedaan jenis kristal [17].

Isolat K.K1.S.K2 dan W.Swh.S.K2 membunuh larva pada umur biakan 24 jam, dan menunjukkan nilai toksisitas tertinggi pada umur biakan 48 jam, kemudian nilai toksisitas menurun secara signifikan pada inkubasi biakan 72 jam. Perbedaan nilai toksisitas pada waktu inkubasi yang berbeda tersebut berhubungan dengan waktu produksi toksin.

Isolat K.K1.S.K2, W.Swh.S.K2 dan *B.thuringiensis* HD-567 telah dapat membunuh larva pada inkubasi 24 jam diduga karena adanya senyawa eksotoksin yang keluar sebelum fase sporulasi. Eksotoksin diproduksi selama fase aktif pertumbuhan vegetatif yaitu fase logaritmik. Eksotoksin merupakan senyawa yang tersusun oleh adenine, ribose, glukosa dan asam alarat. Senyawa tersebut bersifat toksik teradap serangga ordo diptera, vertebrata dan mikroorganisme lain [8, 9, 17].

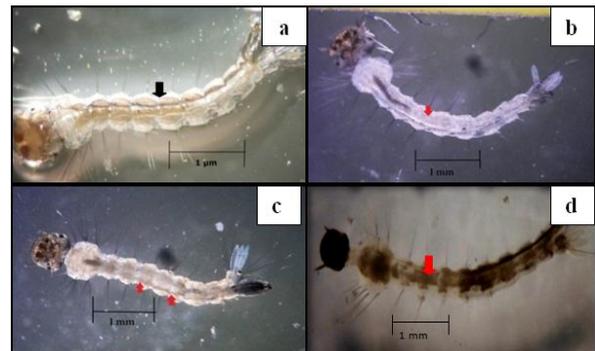


Gambar 3. Persentase mortalitas larva *A. aegypti* instar III oleh perlakuan isolat K.K1.S.K2, W.Swh.S.K2 dan *B. thuringiensis* HD-567. Keterangan : huruf kecil yang sama di atas balok dalam umur biakan yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan.

Isolat K.K1.S.K2, W.Swh.S.K2 membunuh larva secara maksimal pada umur biakan 48 jam dimana telah terjadi fase sporulasi secara maksimal. Kedua isolat tersebut kemungkinan besar dapat menyebabkan kematian larva karena adanya δ -endotoksin yang keluar saat fase sporulasi. Senyawa δ -endotoksin merupakan jenis toksin yang berbentuk protoksin selama tahap sporulasi dan bersifat insektisidal ketika masuk ke dalam saluran pencernaan larva *A. aegypti* [8, 9, 17].

Apabila dibandingkan dengan kedua isolat Nganjuk, isolat *B. thuringiensis* HD-567 memiliki nilai toksisitas terhadap larva *A.aegypti* pada umur biakan 24 jam yang jauh lebih rendah yaitu 6,67 %. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Gama [10], bakteri *B. thuringiensis* isolat lokal mempunyai daya bunuh yang lebih besar dibandingkan dengan *B. thuringiensis* varietas *israelensis* serotype H-14.

Larva hasil uji dengan menggunakan isolat K.K1.S.K2 dan W.Swh.S.K2 terlihat mengalami kerusakan pada bagian saluran pencernaannya. Pada Gambar 4 (a) merupakan larva normal, dimana terlihat saluran pencernaan yang masih utuh. Sedangkan pada gambar b, c dan d merupakan larva hasil uji yang mengalami kerusakan.



Gambar 4. Kerusakan membran saluran pencernaan larva *A. aegypti* (a). larva normal; (b). hasil uji toksisitas oleh isolat K.K1.S.K2; (c). hasil uji toksisitas oleh isolat W.Swh.S.K2; (d). hasil uji toksisitas oleh isolat *B. thuringiensis* HD567; (➔) saluran pencernaan yang rusak, (➡) saluran pencernaan normal.

Tabel 2. Nilai LC₅₀ terhadap larva *A. aegypti* instar III

Isolat	Densitas Sel (x10 ⁷ sel/ml)		
	LC ₅₀ 24	LC ₅₀ 48	LC ₅₀ 72
<i>B. thuringiensis</i> HD-567	47,08 (b)	46,66 (ab)	19,49 (ab)
K.K1.S.K2	3,92 (a)	3,83 (a)	3,66 (a)
W.Swh.S.K2	3,96 (a)	3,53 (a)	3,50 (a)

Mortalitas larva dengan perlakuan berbagai konsentrasi bakteri digunakan untuk penentuan LC₅₀. Nilai LC₅₀ adalah satuan yang menyatakan konsentrasi suatu produk yang mampu membunuh

50 % dari organisme uji [21]. Isolat yang memiliki toksisitas paling baik adalah yang membutuhkan konsentrasi bakteri paling sedikit dalam membunuh 50% larva dengan waktu pendedahan paling cepat. Nilai LC₅₀ dari perlakuan K.K1.S.K2, W.Swh.S.K2 dan *B.thuringiensis* HD-567 pada pendedahan 24 jam secara berurutan yaitu $3,92 \times 10^7$ sel/ml, $3,96 \times 10^7$ sel/ml, dan $47,08 \times 10^7$ sel/ml; pada pendedahan 48 jam yaitu $3,83 \times 10^7$ sel/ml, $3,53 \times 10^7$ sel/ml dan $46,66 \times 10^7$ sel/ml, serta pada pendedahan 72 jam yaitu $3,66 \times 10^7$ sel/ml, $3,50 \times 10^7$ dan $19,49 \times 10^7$ sel/ml (Tabel 2). Sehingga diantara isolat *B. thuringiensis* yang memiliki efektivitas terbaik adalah W.Swh.S.K2 dengan nilai LC₅₀ 48 jam sebesar $3,53 \times 10^7$ sel/ml. Densitas sel yang dibutuhkan W.Swh.S.K2 untuk membunuh larva 50% pada pendedahan 48 jam dan 72 tidak berbeda signifikan yaitu $0,03 \times 10^7$ sel/ml, sehingga isolat tersebut dapat dikatakan memiliki efektivitas yang lebih baik dengan waktu pendedahan paling cepat yaitu 48 jam.

Bedasarkan hasil dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Gama dkk [12], isolat *B. thuringiensis* yang memiliki potensi terbaik dalam membunuh larva adalah isolat indigenus Kota Malang. Isolat tersebut adalah PWR4 32 dengan nilai LC₅₀ 72 jam sebesar $22,79 \times 10^7$ sel/ml. Sedangkan isolat dari penelitian ini yang memiliki potensi terbaik adalah W.Swh.S.K2 dengan nilai LC₅₀ 48 jam sebesar $3,53 \times 10^7$ sel/ml. Dari hasil uji toksisitas tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat *B. thuringiensis* indigenus dari Kota Nganjuk memiliki potensi yang lebih baik dibandingkan dengan isolat dari Malang. Hal ini dapat dilihat dengan densitas sel dari isolat Nganjuk yang lebih sedikit dapat membunuh larva lebih banyak.

KESIMPULAN

Dua isolat *B. thuringiensis* yaitu K.K1.S.K2 dan W.Swh.S.K2 asal Nganjuk dapat membunuh larva *A. aegypti* instar III lebih dari 50%. Isolat W.Swh.S.K2 memiliki toksisitas tertinggi dalam membunuh larva *A. aegypti* instar III dengan nilai LC₅₀ 48 jam sebesar $3,53 \times 10^7$ sel/ml.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Bapak Drs. Setijono Samino, MS., D.Sc. selaku pembimbing yang telah mendampingi dan memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna dan Ibu Zulfaidah Penata Gama S.Si, M.Si selaku ketua proyek penelitian *Bacillus thuringiensis* di Provinsi Jawa Timur yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Anna, L. K. 2011. *Kompas Health*. <http://health.kompas.com/read/2011/02/1907163187/Kasus.DBD.di.Indonesia.tertinggi.di.ASEA.N>. Diakses tanggal 29 Agustus 2012
- [2] Atlas, R. M. 2004. *Microbiology: Fundamentals and Applications*. 2nd Edition. McMillan Publ. Co. New York.
- [3] Bellows, T. S, T. W. Fisher. 1999. *Handbook of Biological Control. Principles and Applications of Biological Control*. Academic Press. New York.
- [4] Blondine, Ch. P & U. Widyastuti. 2001. Patogenisitas Isolat *Bacillus thuringiensis* setelah dikeringkan pada Suhu Dingin (Lyophilisasi) terhadap Jentik *Aedes aegypti* di Laboratorium. http://.kalbe.co.id/....pdf/07_PtogenisitasIsolat.html. Diakses tanggal 4 April 2012
- [5] Budiyanto, A. 2005. Study Indeks Larva Nyamuk *Aedes aegypti* dan Hubungannya dengan PSP Masyarakat tentang Penyakit DBD di Kota Palembang Sumatra Selatan. <http://www.google.com/search?H=en&q=studi+indeks+larva+nyamuk+aedes+aegypti+....> Diakses tanggal 27 Mei 2013
- [6] Chatterjee, S. N., T. Bhattacharya, T. K. Dangar & G. Chandra. 2007. Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil Environment. *African J. Biotechnol.* 6 (13): 1587-1591.
- [7] Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur. 2010. Profil Kesehatan Provinsi Jawa Timur. www.dinkes.jatimprov.go.id. Surabaya.
- [8] Dulmage HT. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In: Burges HD, ed. *Microbial Control of Pest and Plant Diseases*. London: Academic Press.
- [9] Faust, P. & L. Bulla. 1982. Bacteria and their toxins as insecticides, pp. 75-208. In E. Kurstak [ed.], *Microbial and viral pesticides*. Merceel Dekker, New York.
- [10] Gama, Z. P., Suharjo, & G. Ekowati. 1998. Potensi Patogenitas *Bacillus thuringiensis* var. israelensis serotype H-14 dan *Bacillus thuringiensis* isolat Madura terhadap Larva Nyamuk. Laporan Penelitian Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Brawijaya. Malang.
- [11] Gama, Z. P. dan U. Marwati. 2005. Seleksi Strain *Bacillus thuringiensis* Isolat Sumenep yang paling Potensial sebagai Agen Pengendali Larva Nyamuk *A. aegypti*. *Natural* 9 (1): 1-5.
- [12] Gama, Z.P., N. Nakagoshi, Suharjo, & F. Setyowati. 2013. Toxicity studies for indigenus

- Bacillus thuringiensis* isolates from Malang city, East Java on *Aedes aegypti* larvae. *Asian Pacific J.Tropic. Biomed.* 13: 60034-9.
- [13] Nurwijayanti, R. 2005. Daya Bunuh *Bacillus thuringiensis* Isolat Bangkalan Madura terhadap Berbagai Instar Larva Nyamuk. Jurusan Biologi. Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya. Malang. Skripsi
- [14] Priest, F & B. Austin. 1993. Modern Bacterial Taxonomy Second Edition. Chapman dan Hall. London.
- [15] Rahardi, B. 2002. Pemrograman Aplikasi Konstruksi Kekerabatan Taksonomi Dengan Visual C++6.0. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Skripsi
- [16] Rampersad, J., A. Khan and D. Ammons. 2002. Usefulness of Staining Parasporal Bodies when Screening for *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 79:203-4
- [17] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 775-806.
- [18] Some, H. 2007. Nyamuk Demam Berdarah dan Warna Bak Mandi. <http://strenkali.org>. Diakses 12 April 2012.
- [19] Trizelia. 2001. Pemanfaatan *Bacillus thuringiensis* untuk pengendalian hama *crocidotoma binotalis*. IPB. Bandung.
- [20] Walther, C. J., G. A. Couche, M. A. Pfannenstiel, S. E. Egan, L. A. Bivin & K. W. Nickerson. 1986. Analysis of mosquito larvicidal potential exhibited by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:650-653.
- [21] Yamamoto, T., T. Lizuka & J.N. Aronson. 1983. Mosquitocidal Protein of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* : Identification and Partial Isolation of the Protein. *Current. Microbiol.* 9: 279-284.