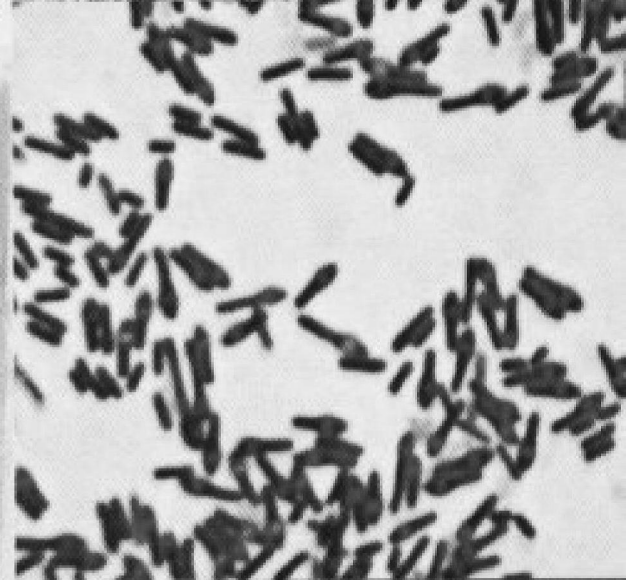
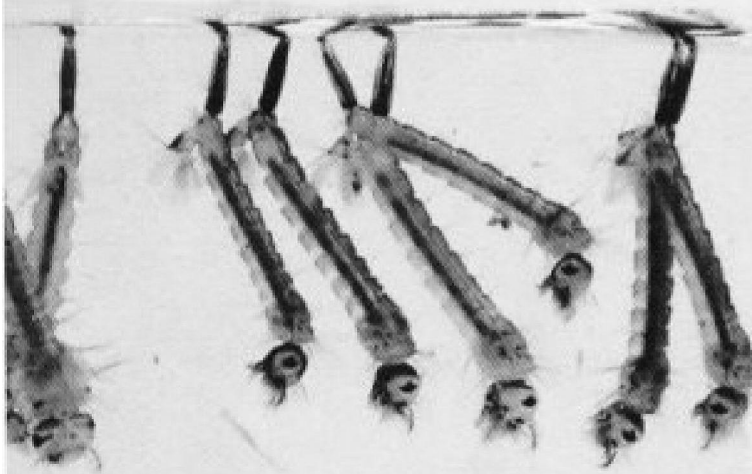
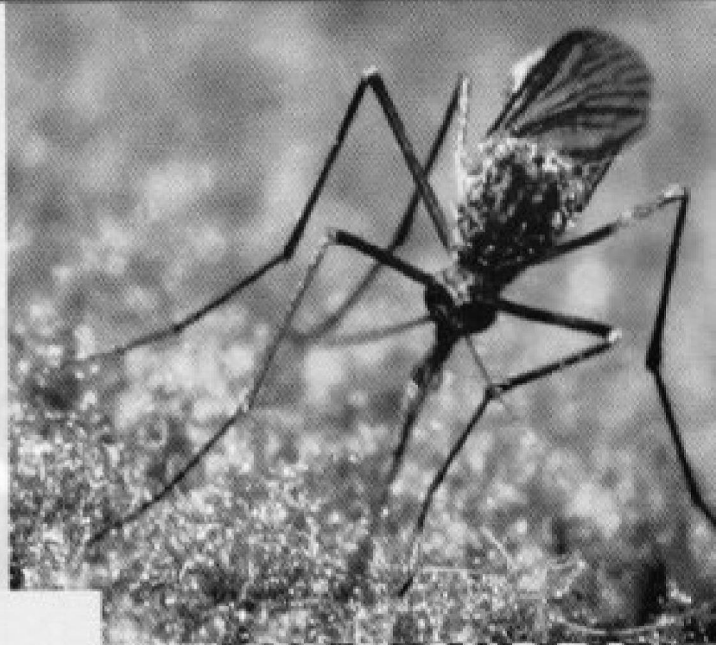
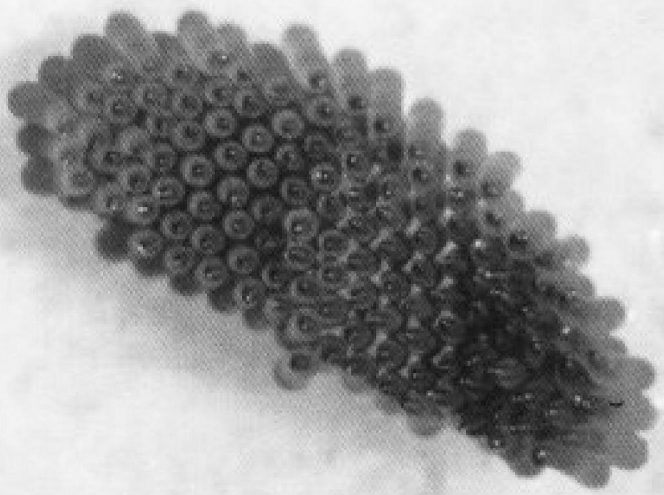


MONOGRAF



BACILLUS SPHAERICUS AGEN PENGENDALI HAYATI LARVA NYAMUK



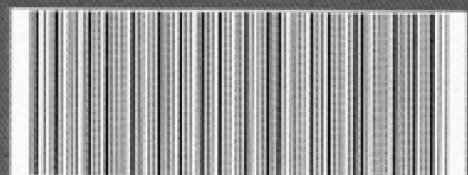
BAMBANG FAJAR SURYADI



Bambang Fajar Suryadi, dilahirkan di Surabaya (Jawa Timur) pada 11 Oktober 1972. Penulis menyelesaikan pendidikan S1 Biologi di FMIPA Universitas Brawijaya pada tahun 1996. Pendidikan S2 di bidang bioteknologi diselesaikan pada tahun 2000 di IPB, Bogor dan pada tahun 2016 penulis menyelesaikan pendidikan S3 di bidang mikrobiologi di Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Di bidang riset, penulis mendalami bidang mikrobiologi khususnya pengendalian hayati berbasis mikroba. Sejak tahun 2003, penulis aktif menjadi staf pengajar di PS Biologi, FMIPA Universitas Mataram, Mataram NTB.



PENERBIT UPT. MATARAM UNIVERSITY PRESS
Jl. Pemuda Nomor 33 Telp. (0370) 633007, Mataram 83125
Email : upt.mataramuniversitypress@gmail.com
Website : <http://uptpress.unram.ac.id/>



ISBN 978-623-7608-7-1

MONOGRAF

.....
BACILLUS SPHAERICUS
AGEN PENGENDALI
HAYATI LARVA NYAMUK
.....



Mataram University Press

MONOGRAF

.....
BACILLUS SPHAERICUS
AGEN PENGENDALI
HAYATI LARVA NYAMUK
.....

BAMBANG FAJAR SURYADI



Mataram University Press

Bacillus sphaericus: Agen Pengendali Hayati Larva Nyamuk

Judul:

Monograf
Bacillus sphaericus
Agen Pengendali Hayati Larva Nyamuk

Penulis:

Bambang Fajar Suryadi

Layout:

Fatia Hijriyanti

Design Sampul:

Tim Mataram University Press

Design Isi:

Fatia Hijriyanti

Penerbit:

Mataram University Press
Jln. Majapahit No. 62 Mataram-NTB
Telp. (0370) 633035, Fax. (0370) 640189, Mobile Phone +6281917431789
e-mail: upt.mataramuniversitypress@gmail.com
website: www.uptpress.unram.ac.id.

Cetakan Pertama, November 2020

ISBN: 978-623-7608-72-1

Hak cipta dilindungi oleh undang-undang. Dilarang memperbanyak, sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk dan dengan cara apapun, tanpa izin penulis dan penerbit.

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, akhirnya monograf dengan judul ***Bacillus sphaericus* Agen Pengendali Hayati Nyamuk** dapat diselesaikan.

Penulisan monograf ini didasari oleh masih adanya masalah penyakit infeksi yang agensia penyebabnya disebarkan oleh nyamuk (disebut juga penyakit tular nyamuk), seperti malaria, demam berdarah Dengue, Chikunya, dan beberapa penyakit lain. Hingga kini, kasus-kasus penyakit tular nyamuk tidak pernah berkurang, walaupun banyak upaya pengendalian nyamuk telah dilakukan. Karenanya, sudah saatnya kita melirik penggunaan bakteri *Bacillus sphaericus* sebagai salah satu agensia untuk pengendalian nyamuk di Indonesia. Di beberapa negara *B. sphaericus* banyak digunakan mendampingi prosedur lain dalam pengendalian nyamuk. Bakteri ini selain efektif, juga aman bagi lingkungan. Tidak seperti bahan kimia pestisida yang kemungkinan meninggalkan residunya di alam dan berpotensi menyebabkan masalah baru.

Beberapa bagian dari monograf ini diambil dari studi pustaka dari berbagai sumber ilmiah, sedangkan bagian isolasi, deteksi serta pengembangbiakan bakteri berasal dari hasil penelitian dari tahun 2014 sampai dengan sekarang yang dilakukan di Pulau Lombok dan Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Molekuler, FMIPA Universitas Brawijaya.

Ucapan terima kasih yang tak terhingga penulis sampaikan pada Bapak Dr. Suharjono, Ibu Dr. Tri Ardiyati dan Bapak Dr. Bagyo Yanuwiadi dari Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Ekologi FMIPA Universitas Brawijaya yang telah banyak membimbing penulis dalam melakukan penelitian mengenai *B. sphaericus* ini. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan untuk rekan-rekan peneliti di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Molekuler, FMIPA Universitas Brawijaya.

Akhir kata, walaupun monograf ini masih jauh dari sempurna, semoga monograf ini bermanfaat terutama untuk mahasiswa, dosen dan peneliti yang berminat untuk meneliti *B. sphaericus* pada khususnya dan bidang mikrobiologi lingkungan pada umumnya.

Mataram, November 2020

Penulis

Bambang Fajar Suryadi

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II MIKROBIOLOGI BACILLUS SPHAERICUS.....	7
2.1 Sejarah Penemuan <i>B. sphaericus</i>	7
2.2 Mikrobiologi <i>B. sphaericus</i>	8
2.3 Genom <i>B. sphaericus</i>	10
2.4 Taksonomi <i>B. sphaericus</i>	11
BAB III TOKSISITAS DAN MEKANISME TOKSIN B. SPHAERICUS.....	15
3.1 Toksisitas <i>B. sphaericus</i>	15
3.2 Mekanisme Kerja Toksin <i>B. sphaericus</i>	20
BAB IV APLIKASI B. SPHAERICUS DALAM PENGENDALIAN HAYATI NYAMUK	23
4.1 Pengendalian Nyamuk Terpadu	23
4.2 Produksi <i>B. sphaericus</i> Komersial.....	27
A. Fermentasi Semi-Padat	27
B. Fermentasi Cair.....	28
4.3 Formulasi <i>B. sphaericus</i>	29
4.4 Pengendalian Nyamuk di Lapangan.....	30

BAB V	ISOLASI B. SPHAERICUS DARI LINGKUNGAN DAN DETEKSI GEN PENYANDI TOKSINNYA	35
5.1	Isolasi <i>B. sphaericus</i> dari Lingkungan	35
A.	Persiapan Alat dan Bahan	35
B.	Pemilihan Lokasi Pengambilan Sampel Tanah	36
C.	Pengambilan dan Perlakuan Sampel Tanah	36
D.	Pembiakan <i>B. sphaericus</i>	37
E.	Pengujian Toksisitas Selektif	38
F.	Pengujian Toksisitas Kuantitatif/Uji Hayati	39
5.2	Deteksi Gen Penyandi Toksin <i>B. sphaericus</i>	40
A.	Isolasi DNA <i>B. sphaericus</i>	40
B.	Teknik PCR Untuk Deteksi DNA Penyandi Toksin <i>B. sphaericus</i>	41
BAB VI	PENUTUP	45
	DAFTAR PUSTAKA	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Stadium parasit Plasmodium (A) <i>Schizont</i> dan (B) <i>Ring form</i> dari <i>Plasmodium vivax</i> (Sumber: Kute et al., 2012)	2
Gambar 1.2	Gambaran mikroskopi elektron virus Dengue dan Chikungunya (A) Virus Dengue penyebab penyakit demam berdarah Dengue dan (B) Virus Chikungunya penyebab penyakit Chikungunya (Sumber: A. Branswell, 2017; B. Weinbaum, 2020)	4
Gambar 1.3	Morfologi nyamuk Aedes (A) Nyamuk <i>Ae. aegypti</i> dan (B) Nyamuk <i>Ae. Albopictus</i>	4
Gambar 2.1	Morfologi koloni (A) dan sel <i>B. sphaericus</i> (B) yang diisolasi dari tanah di Mataram.	9
Gambar. 3.1	Kristal toksin <i>B. sphaericus</i> difoto menggunakan Keterangan: Kristal (Kristal Toksin); Endospora (E) Mikroskop elektron (Baumann et al., 1991).....	16
Gambar 3.2	Susunan gen penyandi toksin pada <i>B. sphaericus</i>	19
Gambar 4.1	Habitat perindukan nyamuk potensial	25
Gambar 4.2	Ikan <i>Gambusia affinis</i>	26

Gambar 4.3	Formulasi komersial <i>B. sphaericus</i> . Vectolex® (A) dan aplikasinya di lingkungan (B dan C) Sumber (A: United States Air Force, 2017; B & C: Valent Biosciences, 2017).....	29
Gambar 4.4	(A) Telur dan (B) larva nyamuk <i>Culex</i> spp.....	31
Gambar 5.1	Morfologi sel <i>B. sphaericus</i> (A) Morfologi sel vegetatif (24-48 jam) dan (B) sel dengan endospora dan endospora yang mengalami lisis (72-96 jam). (Sumber: Dokumentasi pribadi).....	38

DAFTAR TABEL

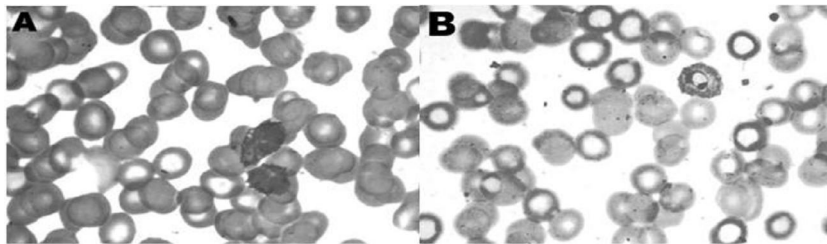
Tabel 5.1 Urutan primer untuk deteksi gen penyandi toksin <i>B. sphaericus</i> dan produk hasil PCR-nya. (Sumber: Prabhu et al., 2013)	42
--	----

BAB I

PENDAHULUAN

Penyakit infeksius masih menjadi masalah kesehatan besar di Indonesia, dan beberapa penyakit tersebut agensia penyebabnya disebarkan oleh serangga (penyakit tular serangga/vektor). Serangga yang paling banyak menjadi vektor penyakit di Indonesia adalah nyamuk. Beberapa penyakit yang agensia penyebabnya disebarkan oleh nyamuk adalah malaria, demam berdarah Dengue, Chikungunya dan filaria. Menurut data yang dikeluarkan oleh Kementerian Kesehatan RI tahun 2019, didapatkan Annual Parasite Incident (API) sebanyak 0,93 per 1.000 orang penduduk untuk kasus malaria di Indonesia. Penderita malaria paling banyak didapatkan di daerah Papua dan Nusa Tenggara Timur, sementara hampir semua daerah di Indonesia telah dinyatakan bebas malaria. Sementara itu, Incident Rate untuk kasus infeksi Dengue di Indonesia termasuk tinggi yaitu sebesar 51,48 per 1.000 orang penduduk pada tahun 2018. Kasus Chikungunya pada tahun 2019 paling banyak dilaporkan di Jawa Barat (1.044 orang), disusul Lampung (829 orang) dan Gorontalo (534 orang). Kasus filariasis pada tahun 2019 terbesar didapatkan di Papua (3.615 orang), disusul oleh Nusa Tenggara Timur sebesar 1.540 orang dan Papua Barat (1.089 orang) (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020).

Penyakit malaria di Indonesia keberadaannya sudah dilaporkan sejak penjajahan Belanda di abad ke-18 (Muhsin, 2012). Penyakit ini disebabkan oleh protozoa parasit *Plasmodium*. Hingga kini, di Indonesia diketahui terdapat setidaknya ada 4 jenis plasmodium penyebab penyakit malaria di Indonesia, yaitu: *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* dan yang baru diketahui adalah *P. knowlesi* yang ditularkan dari monyet ekor panjang (Mueller *et al.*, 2007; Collins, 2012).



Gambar 1.1
Stadium parasit Plasmodium (A) *Schizont* dan (B) *Ring form* dari *Plasmodium vivax* (Sumber: Kute *et al.*, 2012)

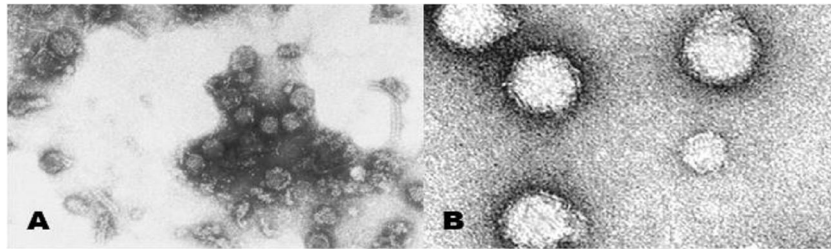
Gejala yang ditunjukkan oleh penderita malaria adalah demam, menggigil, rasa lelah, muntah dan sakit kepala. Pada infeksi yang parah/tidak segera mendapat pertolongan medis, dapat menyebabkan koma dan kematian. Gejala malaria biasa terlihat 10-15 hari setelah tergigit nyamuk pembawa agensia malaria ini (Beare *et al.*, 2006).

Dalam penyebarannya, Plasmodium penyebab malaria disebarkan oleh nyamuk *Anopheles*. Di Indonesia diketahui terdapat 20 anggota spesies *Anopheles* yang secara alami dapat menyebarkan parasit *Plasmodium*. Penyebaran nyamuk ini merata di seluruh Indonesia, mulai di pinggiran pantai (dataran rendah) hingga di pegunungan (dataran tinggi) (Elyazar *et al.*, 2013).

Setelah malaria, penyakit demam berdarah Dengue adalah penyakit tular nyamuk yang masih banyak

diderita oleh masyarakat Indonesia. Penyakit ini diketahui menyerang di Indonesia pada tahun 1960an (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2010). Penyakit demam berdarah Dengue ini disebabkan oleh virus Dengue (DEN virus), yaitu virus bergenom RNA rantai tunggal yang termasuk dalam anggota kelompok Flavivirus (family Flaviviridae). Virus Dengue juga termasuk dalam golongan Arbovirus atau *Arthropoda-Borne Virus*, karena disebarkan oleh serangga (terutama nyamuk) (Simmons *et al.*, 2012). Gejala yang ditimbulkan oleh infeksi virus ini adalah adanya demam tinggi, ruam pada kulit, sakit kepala, muntah, dan sakit persendian serta otot. Gejala ini bisa berlangsung selama 2 hingga 7 hari. Kondisi ini bisa diperparah dengan kemungkinan terjadi DHF (Dengue haemorrhagic fever) dan DHS (*Dengue haemorrhagic shock*) yang dapat menyebabkan kematian bila tidak segera mendapat pertolongan (Ranjit & Kissoon, 2011).

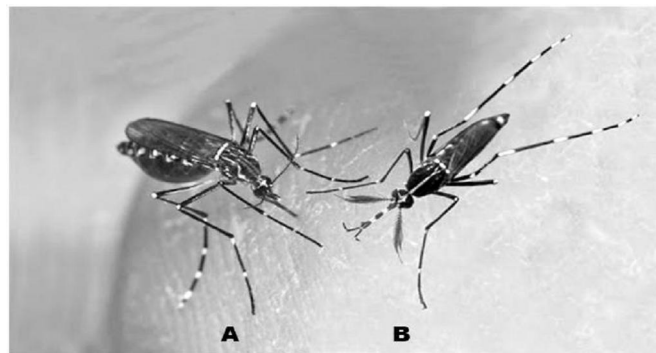
Penyakit lain yang disebarkan nyamuk adalah Chikungunya. Penyakit ini disebabkan oleh Chikungunya Virus (CHIKV) yang termasuk dalam genus Alphavirus, family Togaviridae. Virus ini merupakan virus RNA dengan utas RNA positif (Powers *et al.*, 2001). Penyakit ini diketahui keberadaannya di Indonesia sejak tahun 1980an (Wibowo, 2010). Gejala yang ditimbulkan oleh infeksi virus ini adalah demam, sakit kepala, sakit otot, pegal, mual dan ruam kulit. Gejala ini bisa berlangsung hanya dalam 2 hari atau hingga berminggu-minggu (Center for Disease Control, 2016).



Gambar 1.2

Gambaran mikroskopi elektron virus Dengue dan Chikungunya (A) Virus Dengue penyebab penyakit demam berdarah Dengue dan (B) Virus Chikungunya penyebab penyakit Chikungunya (Sumber: A. Branswell, 2017; B. Weinbaum, 2020)

Agensia demam berdarah Dengue dan Chikungunya ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk *Aedes*. Terdapat 2 jenis *Aedes* yang diketahui membawa virus ini di Indonesia, yaitu *Ae. aegypti* dan *A. albopictus* (Gould & Solomon, 2008; Enserink, 2007). Selain malaria, demam berdarah Dengue dan Chikungunya terdapat penyakit lain yaitu filariasis dan encephalitis yang agensia juga disebarkan oleh nyamuk *Culex* (Hoedjo, 1989).



Gambar 1.3

Morfologi nyamuk *Aedes* (A) Nyamuk *Ae. aegypti* dan (B) Nyamuk *Ae. Albopictus* (Sumber: Center for Disease Control, 2007)

Upaya pengendalian nyamuk dapat dilakukan dengan berbagai pendekatan, yaitu dengan pendekatan sporadis dan non-sporadis. Pendekatan sporadis

dilakukan dengan menggunakan bahan kimia pestisida, baik pada skala kecil (digunakan rutin di rumah) hingga skala besar (digunakan pada saat terjadi wabah/kejadian luar biasa di suatu daerah). Pendekatan non-sporadis dilakukan dengan melakukan pengendalian nyamuk terpadu, yang terdiri dari modifikasi/menghilangkan habitat potensial nyamuk, pengendalian larva nyamuk dan pengendalian nyamuk dewasa. Pengendalian larva nyamuk dapat dilakukan penggunaan bahan kimia (pestisida) dan agensia biologis. Begitu pula dengan pengendalian nyamuk dewasa (Center for Disease Control, 2020). Penggunaan bahan kimia, walaupun efektif seringkali memberikan dampak yang negatif, contohnya adalah matinya organisme serangga non-target yang tidak berbahaya. Selain itu, bahan kimia pestisida bila digunakan berlebihan dalam jangka waktu lama akan berdampak negatif untuk manusia sebagai penggunaannya (Neve *et al.*, 2007). Karena itu, agensia biologis dipilih menjadi alternatif dalam pengendalian nyamuk, khususnya untuk membunuh larva nyamuk.

Salah satu agensia biologis yang dapat digunakan dalam pengendalian nyamuk adalah bakteri, dalam hal ini yang banyak digunakan adalah *Bacillus sphaericus*. Bakteri ini adalah bakteri Gram positif berbentuk batang yang mampu membentuk endospora bila menjumpai kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan bagi kehidupannya. Beberapa strain/isolat dari bakteri ini dapat mensintesis beberapa jenis protein toksin yang bila tertelan oleh larva nyamuk, akan membunuh larva nyamuk tersebut. *B. sphaericus* telah dilaporkan oleh Meyer dan Neide pada tahun 1905, tapi baru pada tahun 1965 Kellen *et al.* berhasil mengisolasi *B. sphaericus* dengan sifat toksik yang tinggi terhadap larva nyamuk (Kellen *et al.*, 1965). Sejak saat itu, banyak peneliti

mengeksplorasi beberapa strain *B. sphaericus* dan serangga targetnya yang banyak ditemukan di seluruh belahan dunia (Vanlalhrauaia, 2010). Pada tahun 1991, US EPA (institusi lingkungan hidup pemerintah Amerika Serikat) mengeluarkan izin penggunaan bakteri ini untuk mengendalikan nyamuk (United States Environment Protection Agency, 2014), yang diikuti dengan implementasi pada pengendalian nyamuk terpadu di hampir semua negara bagian di AS. *B. sphaericus* adalah jenis kedua yang digunakan dalam pengendalian nyamuk setelah *Bacillus thuringiensis*, yang juga secara luas digunakan dalam pengendalian larva nyamuk di beberapa tempat di dunia (Poopathi & Tyagi, 2006).

BAB II

MIKROBIOLOGI BACILLUS SPHAERICUS

2.1 Sejarah Penemuan *B. sphaericus*

Sejarah penemuan *B. sphaericus* entomopatogenik (mampu membunuh serangga) diawali dengan penemuan ini oleh Meyer dan Neide pada tahun 1904. Penemuan *B. sphaericus* entomopathogenik pertama tersebut tidak terlalu mengundang perhatian para peneliti, hingga pada tahun 1965 Kellen *et al.* mengisolasi ini dari larva nyamuk *Culiseta* yang sekarat/hampir mati di California, Amerika Serikat (Kellen *et al.*, 1965). Sejak penemuan tersebut, banyak dilaporkan hasil isolasi *B. sphaericus* dari berbagai lokasi dengan beberapa jenis target nyamuk yang berbeda-beda (Vanlalhraia *et al.*, 2010). Hingga kini terdapat 5 isolat *B. sphaericus* dengan entomopatogenik yang digunakan dalam pengendalian hayati nyamuk yaitu:

1. *B. sphaericus* strain K berasal dari Amerika Serikat. Strain K memiliki sifat patogenik yang lemah terhadap nyamuk.
2. *B. sphaericus* strain SSII-1 berasal dari India. Strain SSII-1 memiliki sifat patogenik yang tinggi, tapi penelitian dan produksinya tidak dikembangkan lebih lanjut karena instabilitas dalam fermentasi dan aplikasinya.
3. *B. sphaericus* strain 1593 berasal dari Jakarta, Indonesia. Strain ini adalah strain dengan sifat

patogenik yang bagus dan stabil dalam fermentasi dan aplikasinya. Strain 1593 adalah salah satu strain yang dijual/tersedia secara komersial.

4. *B. sphaericus* strain 2362 berasal dari Nigeria. Strain ini adalah strain dengan sifat patogenik yang tinggi dan stabil dalam fermentasi dan aplikasinya. Strain ini adalah strain yang dijual/tersedia secara komersial.
5. *B. sphaericus* strain C3-41 yang berasal dari China. Strain ini adalah strain yang dijual/tersedia secara komersial di China.

Selain 4 strain *B. sphaericus* tersebut, masih banyak strain *B. sphaericus* yang pernah dilaporkan, tapi dengan toksisitas yang bervariasi (de Barjac, 1990; Singer, 1990).

Pada tahun 1991 US EPA memberikan ijin penggunaan *B. sphaericus* untuk digunakan dalam pengendalian hayati nyamuk di Amerika Serikat. Penggunaan *B. sphaericus* digunakan untuk melengkapi prosedur pengendalian nyamuk terpadu yang dilakukan di seluruh Negara bagian di Amerika Serikat (United State Environmental Protection Agency, 1999).

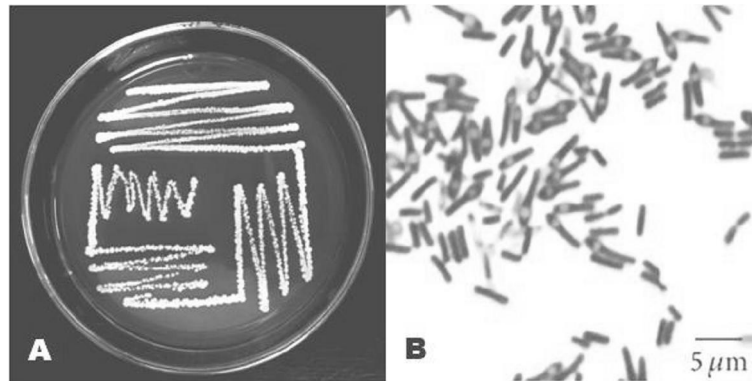
2.2 Mikrobiologi *B. sphaericus*

B. sphaericus adalah bakteri aerob yang berbentuk batang yang dapat membentuk endospora (struktur pelindung sel) pada saat ini berada pada lingkungan yang tidak mendukung kehidupannya. Endospora berbentuk bulat (*sphere*) dan terbentuk di ujung sel (disebut juga endospora terminal). Pada saat terjadi sporulasi, sporangium bakteri ini akan membesar di bagian ujung sel (Suryadi, 2016).

B. sphaericus dapat diisolasi dari tanah dari berbagai tempat. Mulai dari tempat yang kering (dari tanah pekarangan, tanah kebun hingga hutan), maupun tempat yang basah (dari badan air, sedimen kolam, sawah, sungau hingga saluran pembuangan). Dari penelitian yang dilakukan oleh Suryadi pada tahun

2016, *B. sphaericus* tidak bisa diisolasi dari air maupun tanah di lingkungan laut.

Morfologi sel dan koloni *B. sphaericus* disajikan pada Gambar 2.1 sebagai berikut.



Gambar 2.1

Morfologi koloni (A) dan sel *B. sphaericus* (B) yang diisolasi dari tanah di Mataram. (Sumber: Dokumentasi pribadi)

Karakteristik koloni *B. sphaericus* adalah sebagai berikut. Koloni tunggal berbentuk bundar dengan tepian serta permukaan rata dan halus. Koloni berwarna putih agak kecoklatan (krem) dan tidak tembus cahaya.

Karakteristik sel *B. sphaericus* adalah sebagai berikut. Sel berbentuk batang dan bersifat Gram positif. Sel memiliki ukuran (P) 1,5 - 3,0 x (L) 0,5 - 0,75 μm . Dalam kondisi yang kurang menguntungkan bagi pertumbuhan, sel mampu membentuk endospore yang berbentuk bulat, membesar dan terkonsentrasi di ujung sel (endospore terminal). Endospore berukuran (Diameter) 1,0 - 1,5 μm (Suryadi, 2016).

Karakter biokimia dan fisiologis *B. sphaericus* adalah sebagai berikut. *B. sphaericus* menunjukkan reaksi negatif pada pengujian fermentasi gula, hidrolisis pati, reduksi nitrat, indol, dan MR/VP. Reaksi positif ditunjukkan pada pengujian katalase, urease, oksidase, pemanfaatan kasein, motilitas, dan pertumbuhan pada media Simmon Sitrat. *B. sphaericus* mampu tumbuh dalam media yang mengandung NaCl sebesar 5 dan 10%, serta pertumbuhannya bersifat aerobik (Suryadi, 2016).

Bakteri ini menunjukkan resistensi pada antibiotik Streptomisin, tapi sensitif terhadap antibiotik Kloramfenikol, Penisilin, Amoksisilin, Tetrasiklin, Eritromisin, Vankomisin, Gentamisin dan Ciproflokasasin (Suryadi, 2016).

B. sphaericus dapat diisolasi dan ditumbuhkan dengan beberapa jenis medium, yaitu:

1. Medium NYSM, mengandung Nutrient Broth 8,0 g/L; Yeast extract 0,5 g/L; MgCl₂.6H₂O 0,2 g/L; MnCl₂.4H₂O 0,01 g/L; CaCl₂.4H₂O 0,1 g/L (Yousten dan Davidson, 1982).
2. Medium NY Agar, mengandung Yeast Extract 0,05 %; Nutrien Broth 0,08 %; dan Agar 1,5 % (Yousten *et al.*, 1985).
3. Medium NYST, terdiri dari NY Agar/NY Broth dengan menambahkan MnCl₂ 5.10⁻⁵ M; CaCl₂ 7.10⁻⁴ M; MgCl₂ 1.10⁻³ M; Streptomisin 100 µg/mL (Yousten *et al.*, 1985).
4. Medium MBS mengandung Triptone 10,2 g/L; Yeast extract 2,0 g/L; MgSO₄ 0,3 g/L; CaCl₂ 0,2 g/L; Fe(SO₄)₂ 0,02 g/L; MnSO₄; 0,02 g/L; ZnSO₄ 0,02 g/L. (Kalfon *et al.*, 1983).

Beberapa penelitian mengeksplorasi bahan-bahan alami yang dapat digunakan untuk menumbuhkan *B. sphaericus* yang sekaligus mampu menginduksi produksi toksinnya (El-Bandary, 2006).

2.3 Genom *B. sphaericus*

Genom lengkap *B. sphaericus* berhasil diisolasi dan dianalisis sekuens DNA genomnya pada tahun 2008 oleh Hu *et al.* Penelitian ini dilakukan pada *B. sphaericus strain* C3-41 yang digunakan sebagai agen pengendali nyamuk di China. Genom *B. sphaericus* C3-41 berbentuk sirkular yang tersusun atas 4.639.821 pasang basa DNA yang mengandung 4.786 urutan yang mengkode protein. Selain DNA kromosom, juga berhasil diisolasi plasmid berukuran besar yang membawa 177.642 pasang basa DNA yang mengandung 186 urutan yang mengkode

protein. Kromosom *B. sphaericus* C3-41 memiliki kandungan rata-rata GC sebesar 37,29 %, sedangkan plasmid *B. sphaericus* C3-41 memiliki kandungan rata-rata GC sebesar 33,10 % (Hu *et al.*, 2008).

B. sphaericus C3-41 memiliki kromosom yang membawa 85 jenis tRNA dan memiliki 10 rDNA operon. Titik awal replikasi (*origin of replication*) berhasil diidentifikasi dengan membandingkan genom *B. sphaericus* dengan bagian serupa pada *Bacillus subtilis*. Empat buah gen (*rpmH*, *dnaA*, *dnaN* dan *recF*) yang produknya berkaitan dengan replikasi DNA pada ini terdeteksi dan terletak di dekat titik awal replikasi. Adanya kotak *dnaA* dan daerah kaya urutan AT di bagian hulu gen *dnaA* membantu dalam mengidentifikasi titik awal replikasi (Hu *et al.*, 2008).

Pada *B. sphaericus* C3-41 gen penyandi toksin tersebar di sepanjang kromosom dan tidak mengelompok di satu lokasi dalam DNA genom. Gen penyandi toksin biner (*binA* dan *binB*) *B. sphaericus* C3-41 yang menyandikan toksin utama terdapat di kromosom dan plasmid. Tersebarnya *binA* dan *binB* pada plasmid merupakan suatu yang tidak biasa yang terjadi pada *B. sphaericus*. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh aktivitas infeksi *phage* pada *B. sphaericus* yang diteliti. Selain didapatkan gen *binA* dan *binB*, juga didapatkan gen penyandi toksin Mtx yaitu *mtx2* dan *mtx3* (Hu *et al.*, 2008).

Pada kromosom *B. sphaericus* C3-41 juga didapati gen yang terlibat dalam patogenisitas beberapa bakteri Gram positif, termasuk *Bacillus cereus* dan *Listeria monocytogenes*. Gen-gen ini kemungkinan memiliki produk yang berperan dalam mekanisme infeksi yang umum pada bakteri Gram positif (Hu *et al.*, 2008).

2.4 Taksonomi *B. sphaericus*

Penggolongan *B. sphaericus* menggunakan prosedur *flagellar serotyping* dilakukan oleh de Barjac *et al.* (de Barjac *et al.*, 1985). Dari prosedur ini *B. sphaericus* dibedakan menjadi 6 *serogroup* H. Studi

mengenai *serotyping* juga menunjukkan sebanyak 47 *serotype B. sphaericus* telah diidentifikasi. Dari sejumlah *serotype* yang pernah diidentifikasi, terdapat 4 *serotype* yang memiliki toksisitas terhadap larva nyamuk, yaitu:

1. *Serotype* H-1 terbagi atas H-1a (toksik terhadap larva nyamuk) dan H-1A1b (non-toksik terhadap nyamuk);
2. *Serotype* H-26 terbagi atas H-26a26b, H-26a26c dan H-26a26b26d (toksik terhadap larva nyamuk).
3. *Serotype* H-5 terbagi menjadi H-5a5b (toksik terhadap larva nyamuk) dan H-5a5c (bersifat *saprophyt*).
4. *Serotype* H-6 terbagi menjadi H-6a6b (bersifat *saprophyt*) dan H-6a6c (toksik terhadap larva nyamuk).

Hambatan dalam penggunaan teknik *flagellar serotyping* ini adalah adanya karakter toksik dan non-toksik dalam *strain* yang sama. Fenomena ini didapati pada *serotype* H-6 (de Barjac *et al.*, 1988) dan H9 (Cokmus & Yousten, 1991). Masalah lainnya adalah adanya *strain* yang non-motil (tidak memiliki *flagella*).

Kepekaan *strain B. sphaericus* terhadap *lytic bacteriophage* juga digunakan untuk mengelompokkan *strain* dalam beberapa kelompok *lysotypes* (Yousten, 1984). Pengelompokan *B. sphaericus* dengan *lysotyping* dapat mengelompokkan *strain B. sphaericus* yang toksik dan non-toksik. Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan protein permukaan pada tiap *strain B. sphaericus*. *Strain B. sphaericus* yang toksik memiliki protein permukaan yang tersusun secara linear, yang memungkinkan perlekatan *bacteriophage* pada permukaan sel. Permukaan sel *B. sphaericus* yang non-toksik tidak dapat ditemplei oleh *bacteriophage* karena memiliki protein permukaan yang berbentuk tetragonal (Lewis & Yousten, 1988).

Pengelompokan berdasarkan homologi DNA dilakukan oleh Krych *et al.* (1980). Dari pengelompokan ini didapatkan bahwa anggota *strain B. sphaericus* yang toksik terhadap nyamuk digolongkan menjadi 1 kelompok. Keberadaan plasmid pada *strain* dari *B.*

sphaericus yang toksik terhadap larva nyamuk juga diteliti oleh Abe *et al.* (1983). Empat dari 6 *strain B. sphaericus* yang toksik terhadap larva nyamuk didapati adanya plasmid, tetapi plasmid tersebut tidak berkaitan dengan karakter toksisitas yang dimilikinya. Grigarova *et al.* (1988) kembali meneliti plasmid yang dimiliki oleh 43 *strain B. sphaericus* dan membandingkannya dengan *strain B. sphaericus* referensi. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa berdasarkan plasmid yang dimilikinya tidak terdapat kaitan antara *strain B. sphaericus* yang diteliti dengan *strain B. sphaericus* yang dijadikan referensi.

Alexander dan Priest (1990) mengkarakterisasi 91 *strain B. sphaericus* dengan 155 karakter. Dengan analisis numerik menggunakan *Jaccard's Coefficient Linkage Clustering* didapatkan 14 *cluster* (dengan tingkat similaritas mencapai 79%), yang mengandung lebih dari 1 *strain* dan terdapat 17 *cluster* tunggal. Semua *strain B. sphaericus* yang toksik terhadap larva nyamuk terkelompok menjadi 1 *cluster* dengan klasifikasi yang dilakukan berdasarkan urutan basa DNA.

Salah satu komponen yang biasa dijumpai pada peptidoglikan anggota Genus *Bacillus*, yaitu asam meso-diaminopimelat ternyata tidak didapati pada *B. sphaericus*. Peptidoglikan *B. sphaericus* mengandung komponen lisin dan asparagin. Tidak adanya asam diaminopimelat menjadikan *B. sphaericus* dan beberapa spesies lain seperti *B. fusiformis*, dan *B. macroides* dikelompokkan dalam Genus baru, yaitu *Lysinibacillus* (Ahmed *et al.*, 2007).

Dari berbagai penelitian tersebut, pengelompokan *B. sphaericus* berdasarkan karakter sel dapat dilakukan menggunakan beberapa teknik. Namun, beberapa pendekatan yang telah dilakukan masih belum dapat memprediksi karakter toksisitas *B. sphaericus* terhadap larva nyamuk. Karakter ini hanya dapat diketahui dengan menguji isolat *B. sphaericus* terhadap larva nyamuk target secara langsung.

BAB III

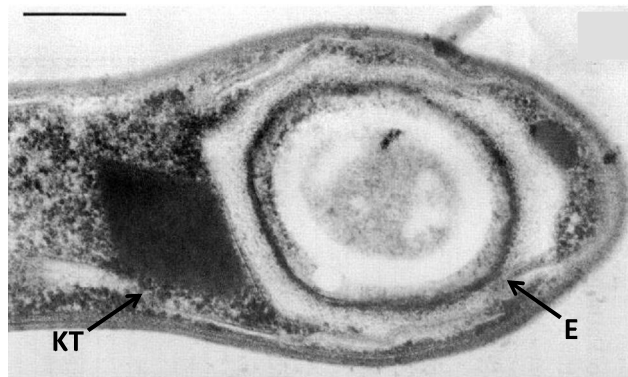
TOKSISITAS DAN MEKANISME TOKSIN *B. SPHAERICUS*

3.1 Toksisitas *B. sphaericus*

B. sphaericus secara umum mampu membunuh larva nyamuk dari Genus *Culex* dan *Anopheles*, tetapi kurang mampu dalam membunuh larva Genus *Aedes* (Berry *et al.*, 1993). Kemampuannya dalam membunuh larva berbagai jenis nyamuk sangat bervariasi, bergantung pada spesies nyamuk dan *serotype B. sphaericus*. Dilaporkan juga, *serotype B. sphaericus* yang sama memiliki kemampuan yang berbeda dalam membunuh larva nyamuk spesies yang sama (Thiery & de Barjac, 1989). Berbagai teknik analisis tidak dapat memprediksi kemampuan daya bunuh *B. sphaericus* terhadap larva spesies nyamuk tertentu. Metode deteksi yang paling efektif adalah dengan menguji *B. sphaericus* secara langsung pada larva nyamuk (Charles *et al.*, 1996).

Adanya inklusi kristal pada *B. sphaericus* dilaporkan pertama kali oleh Davidson (1981). Kristal ini dicurigai berperan dalam aktivitas *B. sphaericus* yang menyebabkan kematian larva nyamuk. Semua *strain B. sphaericus* yang bersifat toksik terhadap nyamuk dapat menghasilkan kristal parasporal. Penelitian lebih lanjut

pada *B. sphaericus* serotype H5a5b, H25 dan H26 menegaskan keberadaan kristal parasporal ini pada tahap sporulasi (Broadwell & Baumann, 1986; de Barjac *et al.*, 1988). Pemberian kristal yang dimurnikan secara parsial pada larva nyamuk menunjukkan sifat toksisitas kristal ini (Payne & Davidson, 1984). Penelitian lain pada *B. sphaericus* mutan yang dihambat kemampuan sporulasinya menunjukkan kegagalannya dalam membentuk kristal dan menjadikannya non-toksik terhadap larva nyamuk (Charles *et al.*, 1996). Hal ini menegaskan bahwa kristal parasporal sangat penting perannya dalam membunuh larva nyamuk dan disintesis oleh *B. sphaericus* hanya pada saat sporulasi.



Gambar. 3.1

Kristal toksin *B. sphaericus* difoto menggunakan Keterangan: Kristal (Kristal Toksin); Endospora (E) Mikroskop elektron (Baumann *et al.*, 1991)

Protein toksin *B. sphaericus* tersusun atas 2 komponen (karenanya disebut protein biner yang disingkat Bin), yaitu BinA (berat molekul 41,9 kDa) dan BinB (berat molekul 51,4 kDa) (Arapinis *et al.*, 1988; Baumann *et al.*, 1988). Protein ini disintesis dalam jumlah yang sama (*equimolar*) dan tersusun dalam bentuk kristal yang terlihat jelas pada tahap III sporulasi *B. sphaericus* (Baumann *et al.*, 1985). Dari percobaan kloning gen penyandi BinA dan BinB dari berbagai strain

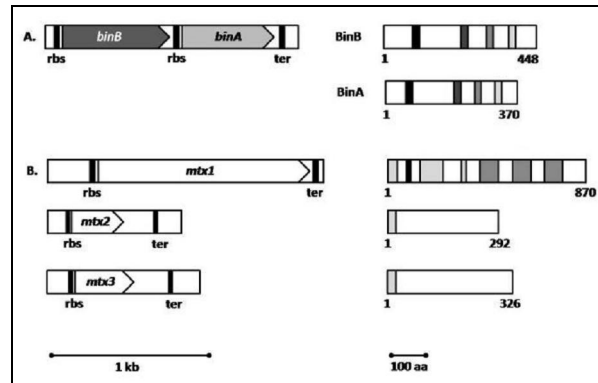
B. sphaericus yang berifat sangat toksik terhadap larva nyamuk didapatkan informasi bahwa gen penyandi protein Bin ini terdapat dalam 1 operon yang memiliki 174 hingga 176 pasang basa pada daerah *intergenic region*. Pada masing-masing bagian hulu penyandi BinA dan BinB didapatkan situs *ribosom binding site* dan pada daerah penyandi BinA didapatkan struktur *stem-loop* yang menunjukkan daerah terminasi transkripsi (Hindley & Berry, 1987; Baumann *et al.*, 1988). Ini mengindikasikan bahwa 2 protein toksin tersebut disintesis pada saat yang bersamaan.

Percobaan kloning pada promotor gen penyandi toksin Bin *B. sphaericus* yang difusikan dengan *lacZ* (penyandi protein β -galaktosidase) menunjukkan tidak terbentuknya protein β -galaktosidase yang sintesisnya hanya terjadi pada fase eksponensial. Hal ini mengindikasikan bahwa protein BinA dan BinB disintesis pada akhir fase eksponensial hingga fase stasioner (Charles *et al.*, 1996).

Gen penyandi protein toksin BinA dan BinB diketahui terdapat di kromosom *B. sphaericus* (de Muro & Priest, 1994). Dari berbagai penelitian yang mengaplikasikan teknik hibridisasi DNA, kedua gen ini didapati pada semua *strain B. sphaericus* yang bersifat sangat toksik terhadap larva nyamuk. Perbandingan gen penyandi toksin pada *B. sphaericus strain* 1593, 2362 dan 2317-3 (semua adalah *strain B. sphaericus* dengan sifat toksisitas kuat) menunjukkan adanya kesamaan hingga 3479 nukleotida. Bila dibandingkan dengan *B. sphaericus strain* IAB59 dan 2297 (*strain* dengan toksisitas sedang), didapatkan perbedaan 7 nukleotida dan 15 nukleotida. Perbandingan pada tingkat asam amino menunjukkan BinA memiliki 1 dan 5 asam amino yang berbeda, sedangkan BinB menunjukkan 3 dan 5 asam amino yang berbeda. Hal ini mengindikasikan sifat

toksisitas sangat ditentukan oleh perbedaan asam amino yang menyusun protein toksin BinA dan BinB (de Muro & Priest, 1994). Urutan asam amino BinA dan BinB tidak menunjukkan similaritas dengan semua toksin yang pernah diteliti (bahkan toksin terhadap larva nyamuk yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis*), karenanya toksin biner *B. sphaericus* digolongkan menjadi toksin yang tersendiri (Baumann *et al.*, 1988).

Selain kristal parasporal yang berifat toksik kuat terhadap larva nyamuk, *B. sphaericus* memiliki toksin lain yang bersifat toksik lemah terhadap larva nyamuk. Toksin ini diisolasi pertama kali dari *B. sphaericus strain* SSII-I. Berbeda dengan kristal parasporal, toksin yang bersifat lemah ini disintesis oleh *B. sphaericus* pada fase pertumbuhan vegetatif (Thanabalu *et al.*, 1991). Protein ini diberi nama *Mosquitocidal Toxin* disingkat Mtx. Protein toksin Mtx terdiri atas 3 jenis protein, yaitu berukuran 100 kDa (Mtx1), 31,8 kDa (Mtx2) dan 35,8 kDa (Mtx3). Rendahnya sifat toksisitas protein Mtx ini disebabkan protein Mtx tidak membentuk struktur kristal seperti protein toksin biner/Bin, sehingga mudah terdegradasi oleh protease yang dimiliki oleh *B. sphaericus*. Hal ini didukung oleh penelitian yang mengaplikasikan protein Mtx yang dihasilkan *B. sphaericus* mutan (protease non-aktif) menunjukkan bahwa protein Mtx memiliki toksisitas yang cukup tinggi terhadap larva nyamuk *Culex* dan *Anopheles* (Delecluse *et al.*, 1995). Susunan gen penyandi toxin Bin (*binA* dan *binB*) dan Mtx (*mtx1*, *mtx2* dan *mtx3*) disajikan pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2
Susunan gen penyandi toksin pada *B. sphaericus*

(Sumber: Baumann *et al.*, 1991)

Susunan gen penyandi toksin Mtx adalah sebagai berikut: pada daerah hulu didapatkan promotor yang urutan DNA-nya menyerupai promotor yang dimiliki oleh *Bacillus subtilis* (Thanabalu *et al.*, 1991). Kloning yang menggabungkan promotor gen *mtx* dengan gen *lacZ* menghasilkan ekspresi protein β -galaktosidase, yang mengindikasikan bahwa protein Mtx diekspresikan pada fase vegetatif dan eksponensial. Hal ini yang membedakan waktu ekspresi toksin Mtx dengan toksin biner (Bin/Btx) yang terjadi pada akhir fase eksponensial hingga mendekati sporulasi (Ahmed *et al.*, 1995).

Bila tertelan oleh larva, toksin Mtx1 akan dihidrolisis oleh protease yang ada dalam saluran pencernaan larva menjadi fragmen 27 dan 70 kDa. Fragmen 27 kDa mengandung urutan pendek yang berhubungan dengan daerah protein transmembran, sedangkan fragmen 70 kDa memiliki tiga urutan berulang yang masing-masing tersusun atas kurang lebih 90 asam amino yang fungsinya masih belum diketahui. Fragmen 27 kDa juga memiliki kesamaan pada bagian katalitik beberapa toksin ADP-Ribosilasi (Thanabalu *et al.*, 1991; Thanabalu, 1992).

Penelitian yang mengaplikasikan teknik hibridisasi DNA terhadap toksin Mtx1, Mtx2 dan Mtx3 tidak menunjukkan adanya kesamaan di antara keduanya, kesamaan dengan toksin kristal (toksin biner/Bin) maupun dengan toksin insektisida lain. Gen penyandi dua toksin ini dideteksi terdapat pada semua strain *B. sphaericus*, baik yang memiliki sifat toksisitas tinggi maupun toksisitas rendah (Liu *et al.*, 1996).

Toksin Mtx2 dilaporkan memiliki kesamaan dengan toksin bakteri yang aktif terhadap sel mamalia (toksin ϵ) yang dimiliki oleh *Clostridium perfringens* (hingga 30%) dan sitotoksin yang dimiliki oleh *Pseudomonas aeruginosa* (hingga 27%). Protein toksin Mtx2 memiliki kesamaan hingga 38% dengan Mtx3 (Liu *et al.*, 1996).

Penelitian yang mengaplikasikan teknik kloning melaporkan bahwa toksin Mtx3 yang berukuran 35,8 kDa memiliki bagian terminal/ujung N yang merupakan peptida sinyal khas dari bakteri Gram positif. Di dalam sinyal peptida ini didapatkan 26 asam amino yang merupakan struktur heliks transmembran. Selain peptida sinyal, terdapat 326 asam amino yang menunjukkan aktivitas larvasida yang tinggi terhadap larva *Anopheles* ketika diekspresikan dalam *E. coli* (Liu *et al.*, 1996).

3.2 Mekanisme Kerja Toksin *B. sphaericus*

Kristal toksin ketika ditelan oleh larva nyamuk, protein 42 kDa dan 51 kDa akan diubah menjadi bentuk aktif protein 39 kDa dan 43 kDa oleh kombinasi pH tinggi dan aktivitas enzim protease yang terdapat pada saluran pencernaannya. Protein 43 kDa akan berfungsi sebagai pengikat reseptor khas pada sel penyusun saluran pencernaan dan pembawa protein 39 kDa yang akan memasuki sel tersebut. Masuknya toksin ke sel

penyusun saluran pencernaan menyebabkan lisis yang selanjutnya akan membunuh serangga target (Klein *et al.*, 2002).

Mekanisme perusakan oleh toksin biner/Bin *B. sphaericus* yang diamati pada larva *Culex* sp. dibagi menjadi beberapa tahap. (I) Penelanan kompleks sel-endospora *B. sphaericus* oleh larva nyamuk; (II) solubilisasi dalam saluran pencernaan bagian tengah (*midgut*) akibat pH basa yang dihasilkan dalam saluran pencernaan larva nyamuk; (III) pemrosesan protein 51 kDa dan 42 kDa menjadi 43 kDa dan 39 kDa; (IV) pengikatan protein pada bagian *caecum* lambung dan saluran pencernaan bagian posterior; dan (V) internalisasi toksin dan terbentuknya efek kerusakan pada bagian lambung dan saluran pencernaan yang ditemplei oleh protein toksin (Bauman *et al.*, 1991).

Kerusakan terjadi terutama pada membran sel penyusun saluran pencernaan. Kerusakan ini terjadi kurang lebih 15 menit setelah kristal toksin ditelan oleh larva nyamuk *Culex* dan *Anopheles*. Ikatan antara toksin biner dengan sel epitelium saluran pencernaan menyebabkan terbentuknya lubang pada membran lipida yang mengakibatkan pembesaran mitokondria, retikulum endoplasma dan vakuola, yang akan diikuti dengan lisis sel dan kematian larva. Kerusakan paling parah didapati pada bagian *caecum* lambung dan saluran pencernaan bagian posterior. Kerusakan juga dijumpai pada jaringan syaraf dan otot rangka (Klein *et al.*, 2002).

Ketidakmampuan toksin biner *B. sphaericus* dalam membunuh larva *Aedes* sp. dapat diamati dalam percobaan pengikatan protein BinA dan BinB (dilakukan secara terpisah) dengan fraksi membran batas sikat (*brush border membran fraction*/BBMF) saluran pencernaan larva *Aedes*. Protein BinB tidak berikatan dengan BBMF saluran pencernaan larva *Aedes*,

sedangkan BinA hanya berikatan secara non-spesifik dengan BBMF saluran pencernaan larva *Aedes*. Hasil yang berbeda ditunjukkan dengan percobaan menggunakan BBMF saluran pencernaan larva *Culex*, bahwa BinB mampu berikatan dengan *caecum* lambung dan saluran pencernaan bagian tengah, sedangkan BinA hanya berikatan dengan *caecum* lambung dan saluran pencernaan secara non-spesifik (Davidson, 1988; Davidson, 1989). Bila BinB dan BinA direaksikan secara bersamaan, BinA akan mengikat daerah yang diikat oleh BinB. Pengamatan pada tingkat *in-vivo* menunjukkan bagian ujung/terminal N pada BinB berikatan dengan bagian saluran pencernaan larva. Bagian ujung/terminal C pada BinB berikatan dengan bagian ujung/terminal N pada BinA yang bertanggung jawab pada kerusakan saluran pencernaan larva. Internalisasi toksin akan terjadi apabila komponen BinB dan BinA ada secara bersamaan (Oey *et al.*, 1992).

Penelitian yang menggunakan kristal toksin berlabel radioisotop ^{125}I dan membran batas sikat yang diisolasi dari nyamuk *Culex pipiens* maupun *Culex quinquefasciatus* menunjukkan bahwa toksin biner *B. sphaericus* berikatan dengan reseptor jenis tunggal. Reseptor tersebut merupakan protein membran pada saluran pencernaan yang ditambatkan ke dalam membran melalui glikosil fosfatidil inositol (GPI) dan sebagian dikeluarkan oleh fosfolipase C spesifik terhadap fosfatidil inositol (PI-PLC). Urutan peptida yang dimilikinya memiliki kemiripan dengan keluarga enzim α -amilase (Silva-Filha *et al.*, 1999).

Toksin Mtx (yang terdiri dari Mtx1, Mtx2 dan Mtx3) memiliki efek toksik yang lemah untuk larva nyamuk *Culex* dan *Anopheles*. Kematian larva akibat toksin Mtx terjadi karena lisis pada sel penyusun saluran pencernaan (Monnerat *et al.*, 2007).

BAB IV

APLIKASI *B. SPHAERICUS* DALAM PENGENDALIAN HAYATI NYAMUK

4.1 Pengendalian Nyamuk Terpadu

Nyamuk adalah salah satu gangguan yang bisa dijumpai di hampir semua tempat di dunia dan menjadi salah satu serangga penyebab masalah kesehatan yang penting di dunia. Penanganan masalah penyebaran nyamuk dilakukan dengan berbagai cara dan melibatkan banyak produk pestisida. Dalam beberapa tahun terakhir, penanganan nyamuk dilakukan secara terintegrasi dan komprehensif. Manajemen nyamuk yang terpadu (*Integrated Mosquito Management/IMM*) dilakukan berbasis manajemen hama terpadu (*Integrated Pest Management/IPM*) di bidang pertanian, yang telah terbukti berhasil secara efektif mengatasi hama pertanian secara ekonomis dan tetap mendukung lingkungan sekitar. Manajemen hama terpadu menggabungkan semua teknik dan produk pestisida yang tersedia untuk melakukan tindakan yang komprehensif dalam mengatasi populasi hama untuk menekan dampak ekonomi, dampak kesehatan masyarakat, dan memberikan pengaruh minimal untuk organisme non-target. Di beberapa tempat, manajemen hama terpadu juga menggunakan bahan-bahan lokal

yang tersedia untuk membuat media pemeliharaan maupun sediaan pestisida (Gray, 2019).

Komponen dari manajemen nyamuk terpadu adalah:

1. Pendidikan dan Komunikasi

Pendidikan dan komunikasi bertujuan untuk memberikan pengetahuan pada masyarakat tentang pentingnya mereduksi populasi nyamuk di lingkungan mereka (rumah, taman, kebun dan lingkungan sekitar). Dengan adanya pemahaman yang baik, reduksi habitat perindukan nyamuk dapat dilakukan secara mandiri oleh masyarakat dan diharapkan dapat membantu pemerintah dalam mengatasi masalah kesehatan yang disebabkan oleh nyamuk.

2. *Surveillance*/Pengamatan

Surveillance/pengamatan penting dilakukan untuk melihat keberadaan spesies nyamuk yang berpotensi menjadi vektor penyakit tertentu. Misalnya, keberadaan larva dan dewasa spesies *Aedes* (*Ae. aegypti* maupun *Ae. albopictus*) yang berpotensi menjadikan vektor demam berdarah dengue dan chikungunya. Untuk mendukung keberhasilan *surveillance*, tenaga ahli perlu dibekali cara dalam menangkap dan mengidentifikasi larva nyamuk dan nyamuk dewasa. Keberhasilan dalam *surveillance* dapat menentukan teknik penanganan yang tepat dan tidak berlebihan.

3. Reduksi Habitat Perindukan Nyamuk

Semua nyamuk membutuhkan air yang menggenang dalam perkembangannya (meletakkan telur dan stadium larva serta pupa). Nyamuk betina meletakkan telurnya di permukaan air, ataupun di

tempat yang nantinya/berpotensi untuk digenangi air. Setelah telur menetas, perkembangan biakan nyamuk akan terjadi dalam 4 tahap yang disebut instar. Dalam kondisi yang ideal (suhu yang hangat dan ketersediaan makanan yang cukup), larva nyamuk akan menjadi pupa dalam waktu 6 hari. Transisi dari pupa menjadi nyamuk dewasa memerlukan waktu hingga 2-3 hari. Dengan kondisi seperti ini, reduksi lingkungan yang berpotensi bisa menjadi tempat perkembangbiakan nyamuk (air yang menggenang dalam bentuk apapun) harus dilakukan (Center for Disease Control, 2020).



Gambar 4.1

Habitat perindukan nyamuk potensial (Sumber: Gray, 2019)

1. Penggunaan Larvasida

Larva dapat ditangani dengan beberapa cara (dan disebar di badan air), seperti:

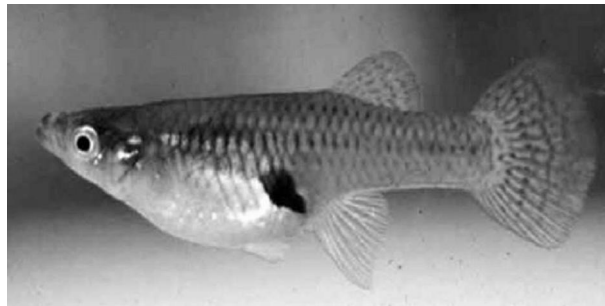
- a. Bahan kimia larvasida, seperti Metophrene dan Temephos. Metophrene adalah senyawa regulator pertumbuhan serangga, yang mampu menghambat pertumbuhan larva menjadi pupa (karena dapat menghambat sintesis biosintesis chitin). Temephos adalah senyawa organofosfat, yang targetnya adalah sistem syaraf serangga, yang akan membunuh larva dengan cara melumpuhkan pergerakan larva, yang membuat larva akan mati tenggelam (Braga *et al.*, 2005).
- b. Ikan (seperti *Gambusia affinis*) yang makanannya adalah larva nyamuk. Selain *G. affinis* ada banyak

spesies yang mengkonsumsi larva nyamuk sebagai salah satu makanannya. Ikan bisa dipelihara di kolam yang menampung air yang tidak mengalir (United States Geological Survey, 2020).

- c. Mikroorganisme, seperti *B. thuringiensis* dan *B. sphaericus*. *B. thuringiensis* efektif digunakan untuk membunuh larva *Aedes*, sedangkan *B. sphaericus* efektif untuk membunuh larva *Culex* dan *Anopheles* (Suryadi *et al.*, 2015).

2. Penggunaan Pestisida Untuk Nyamuk Dewasa (*Adulticide*)

Ada banyak pilihan yang dapat digunakan untuk membunuh nyamuk dewasa, seperti: Organofosfat, Pyrethoid, dan Pyrethrins. Walaupun terbukti efektif, penggunaan bahan-bahan tersebut harus dilakukan dalam batasan tertentu (sesuai aturan dan tidak berlebihan) untuk mencegah dampak negatif paa lingkungan (United States Environment Protection Agency, 2019).



Gambar 4.2

Ikan *Gambusia affinis* (Sumber: Garden Lake, 2017)

4.2 Produksi *B. sphaericus* Komersial

A. Fermentasi Semi-Padat

Fermentasi semi-padat telah digunakan selama bertahun-tahun pada produksi skala komersial beberapa jenis produk berbasis mikroba, seperti amilase fungal, protease bakterial maupun formulasi *B. thuringiensis*. Dengan menggunakan teknik fermentasi semi-padat, matriks kering dibasahi dengan medium yang telah diinokulasi dengan mikroba yang akan ditumbuhkan. Inkubasi akan dilakukan dalam suhu yang tepat selama beberapa hari (sesuai kebutuhan). Pada akhirnya, bakteri akan dipisahkan dari media semi-padat untuk dilakukan perlakuan dan purifikasi lebih lanjut. Kelebihan dari teknik fermentasi ini adalah dapat menekan biaya, jauh di bawah biaya fermentasi cair yang konvensional karena tidak menggunakan fasilitas fermentasi seperti halnya fermentasi cair (*submerged fermentation*) (Dai *et al.*, 1989).

Bahan yang dipakai dalam fermentasi semi padat misalnya tepung ikan, tepung kacang, tepung kedelai maupun bahan hasil pertanian lain yang memiliki kandungan protein yang tinggi, karena *B. sphaericus* tidak mampu memanfaatkan karbohidrat dalam pertumbuhannya. *B. sphaericus* yang diproduksi dengan teknik fermentasi padat, mampu memerikan toksisitas yang sama tingginya dengan yang diproduksi pada teknik fermentasi konvensional. Oleh karena itu, teknik fermentasi semi-padat dapat dilakukan di negara berkembang, dengan skala industri kecil dan menengah, untuk menekan biaya produksi yang besar (Dai *et al.*, 1994).

B. Fermentasi Cair

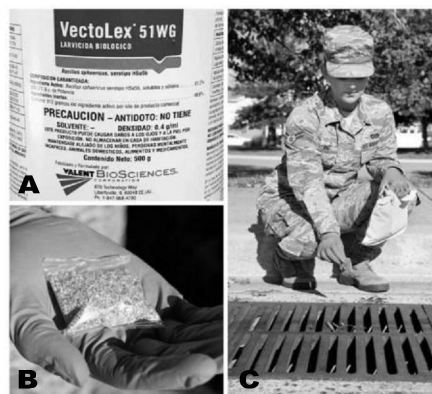
Tenik fermentasi cair untuk menumbuhkan *B. sphaericus* adalah teknik fermentasi yang paling awal diimplentasikan. *B. sphaericus* adalah bakteri aerob dan suplai oksigen yang cukup tinggi sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan, inisiasi dalam sporulasi dan sintesis toksin. Dibandingkan dengan teknik fermentasi padat, teknik fermentasi cair membutuhkan inventasi yang lebih tinggi dan alat yang lebih kompleks. Namun hasilnya bisa jauh melebihi teknik fermentasi padat dengan waktu yang lebih singkat. Teknik fermentasi cair hanya cocok digunakan oleh fasilitas produksi/pabrik yang besar dan tidak terlalu cocok digunakan dalam produksi skala rumah tangga/kecil maupun menengah (Russel *et al.*, 1989).

B. sphaericus tidak membutuhkan glukosa atau karbohidrat yang lain untuk pertumbuhannya, karena banyak enzim yang berkaitan dengan metabolisme karbohidrat yang tidak dimiliki oleh bakteri ini. *B. sphaericus* dapat tumbuh dengan baik menggunakan medium yang mengandung asam-asam organik, seperti asetat, suksinat, arginin dan glutamat sebagai sumber karbon energinya. Bakteri ini juga mampu memanfaatkan glukonat dan gliserol sebagai satu-satunya sumber karbon. Dengan karakter fisiologi seperti ini, pemanfaatan bahan alami sebagai medium untuk fermentasi masih memungkinkan, selama bahan-bahan tersebut kaya akan asam amino/protein (Russel *et al.*, 1989). Toksin yang dimiliki *B. sphaericus* akan disintesis ketika bakteri ini mengalami sporulasi, sehingga dalam fermentasi perlu menambahkan bahan-bahan yang dapat mempercepat sporulasi dan meningkatkan sintesis toksin, misal Mn^{2+} dan Ca^{2+} . Berbagai bahan alami pernah dilaporkan pernah digunakan dalam fermentasi *B. sphaericus*, seperti limbah peternakan, kacang-

kacangan, darah kering, dan tepung ikan dengan produksi sel dan toksin yang sangat baik (El-Bendary, 2006).

4.3 Formulasi *B. sphaericus*

Sejak tahun 1980an, beberapa percobaan pembuatan sediaan *B. sphaericus* dalam formulasi berupa *powder* (butiran halus) dan *granule* (butiran berukuran lebih besar) telah dilakukan di Amerika Serikat, Thailand, Brazil, India, Filipina dan Rusia. Efektivitasnya kemudian dievaluasi, baik dalam laboratorium maupun di lapangan (dengan berbagai macam habitat nyamuk). Evaluasi menunjukkan hasil yang sangat menggembirakan dan kemudian diikuti dengan produksi sediaan *B. sphaericus* komersial. Hingga kini, sekitar 150 ton/tahun) sediaan *B. sphaericus* telah diproduksi dan tersedia secara komersial, seperti: Vectolex[®], Spherimos[®], Sphericide[®], Spherimos[®] dan Jianbao[®] (Liu *et al.*, 1989). Beberapa jenis formulasi komersial disajikan pada gambar 4.3 sebagai berikut.



Gambar 4.3

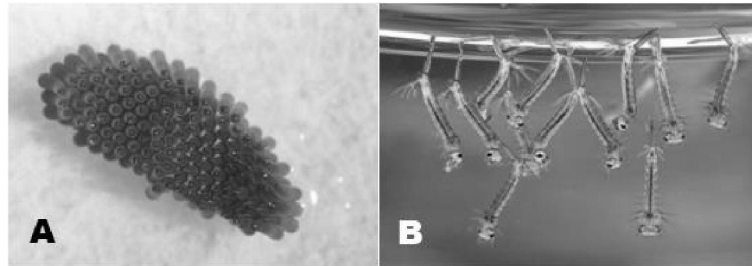
Formulasi komersial *B. sphaericus*. Vectolex[®] (A) dan aplikasinya di lingkungan (B dan C) Sumber (A: United States Air Force, 2017; B & C: Valent Biosciences, 2017)

4.4 Pengendalian Nyamuk di Lapangan

Pada awal tahun 1980an, toksisitas *B. sphaericus* dievaluasi di laboratorium maupun di lapangan di beberapa negara (*project* ini didukung oleh WHO). Dari berbagai pengamatan, didapatkan data efikasi *B. sphaericus* terhadap beberapa jenis nyamuk sangat bagus. Dapat disimpulkan dari berbagai pengamatan bahwa, *B. sphaericus* memiliki toksisitas tertinggi terhadap nyamuk *Culex* spp, disusul oleh nyamuk *Anopheles* spp. Toksisitas paling rendah (bahkan non-toksik) ditunjukkan oleh *Aedes* spp. Walau demikian, *B. sphaericus* tetap dijadikan agensia pengendali biologis nyamuk yang potensial, karena selain efektifitasnya, bakteri ini tidak memberikan efek samping negatif bagi organisme non-target (ikan dan serangga lain) dan *B. sphaericus* mampu *recycle*/membentuk endospora beserta toksinnya (karena toksin melekat pada endospora) pada sisa nyamuk yang sudah mati, sehingga aplikasi *B. sphaericus* di lapangan tidak perlu dilakukan terlalu sering (Priest, 1992). Hal ini akan berdampak pada efek penekanan populasi nyamuk bisa lebih lama dan secara ekonomis bisa lebih hemat.

Data penggunaan *B. sphaericus* untuk pengendalian hayati nyamuk terbesar dilakukan di China. Kurang lebih senayak 150 ton formulasi *B. sphaericus* digunakan setiap tahun dalam 20 tahun terakhir. Paling tidak, terdapat 70 kota di China yang menggunakan sediaan *B. sphaericus*. Larvisida berbasis *B. sphaericus* diaplikasikan pada saluran pembuangan limbah, danau, rawa, kolam dan tanki penampungan air. Aplikasi *B. sphaericus* bertujuan untuk menekan perkembangbiakan nyamuk *Culex* spp di bagian utara China. Hingga kini, kurang lebih 8.000 hektar habitat yang berpotensi sebagai tempat perkembangbiakan nyamuk telah diberikan *treatment* dengan *B. sphaericus*.

Di China, *B. sphaericus* strain C3-41 (strain lokal China) diproduksi dengan nama pasar Jian Bao® dan telah digunakan selama 9 tahun dalam upaya pengendalian nyamuk di seluruh kota di China (Chen *et al.*, 1994).



Gambar 4.4

(A) Telur dan (B) larva nyamuk *Culex* spp.

(Sumber: Center for Disease Control, 2020)

Data di China menunjukkan, setelah *B. sphaericus* diaplikasikan di area yang banyak mengandung larva *Culex* spp, populasi larva berkurang sebanyak 95% pada 3 hari pasca pemberian. Dengan demikian, populasi nyamuk dapat ditoleransi dan dianggap tidak terlalu berbahaya bagi penduduk sekitar (Zhang *et al.*, 1989; Yuan *et al.*, 2000). Efek kontrol/larvasida *B. sphaericus* yang diaplikasikan diamati dapat bertahan selama 2-3 minggu. Bila dosis ditingkatkan, efek larvasida dan durasi efek juga meningkat. Yang menarik, di perairan yang mengandung polutan yang tinggi, formulasi *B. sphaericus* C3-41 menunjukkan efek larvasida selama 5 bulan dalam 1 kali aplikasi (Zhang *et al.*, 1989).

Aplikasi larvasida berbasis *B. sphaericus* untuk mengendalikan nyamuk *Anopheles* spp pernah dilaporkan dilakukan di China, India, Guatemala dan beberapa negara Afrika. Di China, *An. dirus*, *An. sinensis*, *An antropophagus*, dan beberapa spesies *Anopheles* lain diketahui menjadi vektor parasit malaria. Formulasi *B. sphaericus* C3-41 digunakan untuk pengendalian *Anopheles* spp dan menunjukkan strain ini bersifat

toksik terhadap nyamuk-nyamuk tersebut. Densitas larva dilaporkan mengalami penurunan hingga 100% dalam 1 minggu pasca aplikasi dan efek kontrolnya bisa bertahan dalam beberapa minggu. Peningkatan efektifitas kontrol dan durasi kontrol juga meningkat, ketika dilakukan peningkatan dosis aplikasi. Karena tingkat efektifitas dan durasi efek yang sangat tinggi, formulasi larvasida berbasis *B. sphaericus* C3-41 diusulkan untuk menjadi alternatif larvasida/pestisida kimia sintetik (Zhang *et al.*, 1994).

Pada aplikasi larvisida berbasis *B. sphaericus* di Guatemala, 20 ton formulasi *B. sphaericus* digunakan di seluruh bagian negara tersebut dalam suatu program. Dari aplikasi tersebut didapatkan reduksi sebesar 94,57% pada *An. albimanus* yang merupakan spesies vektor di Guatemala (Castro *et al.*, 2000). Laporan aplikasi larvisida berbasis *B. sphaericus* pada habitat *Anopheles* di Amerika Serikat (Kumar *et al.*, 1994), India (Mariappan *et al.*, 1998), Brazil (Rodrigues *et al.*, 1998), Mexico (Arredondo-limnez *et al.*, 1990), Kamerun (Barbazan *et al.*, 1998), dan beberapa negara Afrika Barat menunjukkan keberhasilan yang signifikan secara statistik (Skovmand & Sanogo, 1999), dengan efek reduksi larva yang berlangsung selama selama 1 minggu dalam sekali aplikasi. Dari laporan tersebut didapatkan bahwa, larvisida *B. sphaericus* memiliki aktivitas yang tinggi terhadap *An. juvitalitis*, *An. culicifacies*, *An. darlingi*, *A. braziliensis*, *A. gambiae*, *A. muneztowari*, dan *A. quandrimaculatus* yang dikenal memiliki kemampuan sebagai vektor parasit penyebab malaria.

Formulasi larvisida berbasis *B. sphaericus* dilaporkan memiliki efek kontrol yang rendah (bahkan sama sekali tidak berpengaruh) pada *Aedes* spp (misal *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*). Efek baru terlihat ketika dosis ditingkatkan beberapa kali lipat dosis awal. Karena

itu, untuk keberhasilan pengendalian biologis larva *Aedes* spp disarankan menggunakan agensia biologis yang lain, seperti *B. thuringiensis* yang dilaporkan memiliki eketifitas yang jauh tinggi dibandingkan dengan *B. sphaericus*.

BAB V

ISOLASI *B. SPHAERICUS* DARI LINGKUNGAN DAN DETEKSI GEN PENYANDI TOKSINNYA

5.1 Isolasi *B. sphaericus* dari Lingkungan

B. sphaericus bukan bakteri yang sulit untuk diisolasi dari lingkungan. Bakteri ini bisa didapatkan dari tanah di sekitar kita (kecuali di lingkungan laut). Walau tidak sulit untuk diisolasi, masalah yang sering dihadapi adalah:

1. Memisahkan/mengisolasi *B. sphaericus* dari bakteri tanah yang lain.
2. Mendapatkan isolat *B. sphaericus* yang bersifat toksik terhadap larva nyamuk.

Dari 2 kesulitan di atas, pada bab ini akan dipaparkan metode untuk bisa mendapatkan isolat *B. sphaericus* entomopatogenik (bersifat pathogen/toksik untuk serangga).

A. Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang harus disiapkan untuk kegiatan isolasi *B. sphaericus* adalah sebagai berikut.

1. Kontainer/wadah tertutup untuk menampung tanah.

2. Sekop atau serok untuk mengambil tanah.
3. Media Nutrien Agar bubuk (digunakan dengan konsentrasi 20 g/L).
4. Yeast extract (digunakan dengan konsentrasi 5 g/L).
5. Mineral: MgCl₂ (digunakan dengan konsentrasi 203 mg/L), MnCl₂ (digunakan dengan konsentrasi 10 mg/L) dan CaCl₂ (digunakan dengan konsentrasi 103 mg/L).
6. Antibiotik Streptomisin (digunakan dengan konsentrasi 100 ug/mL)
7. Aquadest steril (1 liter).
8. Perangkat kerja laboratorium mikrobiologi.

B. Pemilihan Lokasi Pengambilan Sampel Tanah

Tempat yang potensial untuk dapat mengisolasi *B. sphaericus* adalah tempat yang berhubungan langsung dengan telur dan larva nyamuk. Misalnya tanah (lebih disukai yang terdapat rumput) yang ada di bawah naungan pohon, sedimen kolam, sedimen di saluran pembuangan/got, dan pinggir sungai yang tidak mengalir. Dari beberapa lokasi tersebut, lebih baik lagi apabila bisa didapati larva di dalamnya.

Dari tanah selain dari tempat yang telah disebutkan, kita masih bisa mengisolasi *B. sphaericus*, tapi kita kecil kemungkinannya bisa mendapatkan isolat *B. sphaericus* yang toksik terhadap larva nyamuk.

C. Pengambilan dan Perlakuan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil dengan kedalaman 10-20 cm dan langsung dimasukkan ke dalam wadah/kontainer yang bisa ditutup dengan baik. Tanah yang lebih dalam dari 20 cm, tidak akan didapati *B. sphaericus*. Hal ini kemungkinan karena di kedalaman

lebih dari 20 cm, kondisi sudah mulai anaerob. Bila tanah yang diambil berasal dari sungai/got/kolam, air yang berlebihan dibuang, baru tanah dimasukkan ke dalam wadah/kontainer.

Tanah yang sudah dikoleksi bisa langsung dibiakkan. Bila pembiakan tidak langsung dilakukan, tanah dalam container bisa disimpan di suhu ruang.

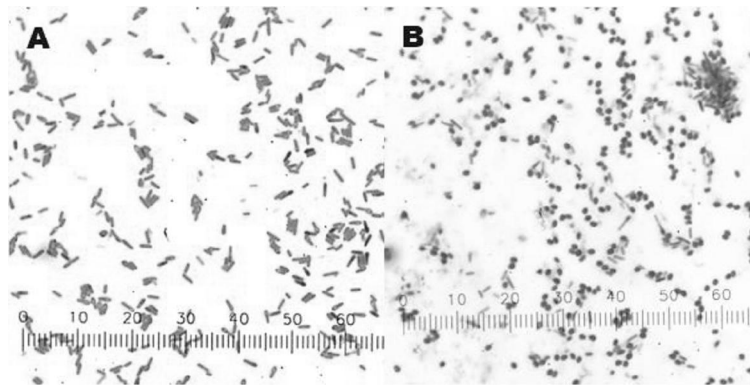
D. Pembiakan *B. sphaericus*

B. sphaericus diisolasi berdasar prosedur yang dilakukan oleh Radhika *et al.* (2011) dengan sedikit modifikasi. Dua puluh lima gram sampel tanah ditambahkan dengan 225 mL larutan garam fisiologis dalam tabung reaksi kaca steril dan kemudian dikocok kuat (*vortex mixing*) selama 2-3 menit. Setelah homogen, tabung dipanaskan dalam penangas air bersuhu 80° C selama 30 menit. Dari suspensi sampel tersebut diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL larutan garam fisiologis, kemudian dilakukan pengenceran berseri hingga 10⁻⁵. Hasil pengenceran kemudian disebar pada medium NYSM dalam cawan Petri. Pada medium NYSM tersebut ditambah dengan antibiotik Streptomisin dengan konsentrasi 100 µg/mL (untuk mencegah pertumbuhan bakteri lain selain *B. sphaericus*). Biakan dalam cawan Petri diinkubasi pada suhu 30-33° C selama 24-72 jam.

Koloni yang tumbuh diamati morfologinya dan dicuplik untuk dilakukan pewarnaan Gram dan endospora. Koloni dengan morfologi bentuk bundar (*circular*), pinggiran rata (*entire*), elevasi rata (*flat*), berwarna putih dan berdiameter 5-10 mm, serta morfologi sel berbentuk batang yang bersifat Gram positif.

Pada inkubasi ke-72 jam (paling cepat) akan terlihat adanya struktur endospora terminal dengan sporangium

yang membesar (*bulging/swollen*) diduga merupakan *B. sphaericus*. Pada inkubasi ke-72 jam ini, biasanya 25-30% sel akan membentuk endospora, sisanya adalah sel batang (belum mengalami sporulasi). Pada jam inkubasi ke-96 (hari keempat), jumlah endospora bisa mencapai 50-60% dari total sel dan akan terlihat endospore yang lisis (tampak sebagai bulatan-bulatan kecil). Morfologi sel vegetatif dan endospora disajikan pada Gambar 5.1 di bawah ini.



Gambar 5.1

Morfologi sel *B. sphaericus* (A) Morfologi sel vegetatif (24-48 jam) dan (B) sel dengan endospora dan endospora yang mengalami lisis (72-96 jam). (Sumber: Dokumentasi pribadi)

E. Pengujian Toksisitas Selektif

Uji toksisitas awal *B. sphaericus* terhadap larva nyamuk dilakukan berdasarkan prosedur Dulmage *et al.* (1990), dengan cara menyiapkan beberapa wadah (sesuai dengan jumlah isolat *B. sphaericus* yang ditemukan) yang masing-masing berisi 200 mL campuran akuades steril dengan biakan cair *B. sphaericus* hasil isolasi dan 20 larva nyamuk instar III. Selain itu, juga disiapkan 2 wadah yang digunakan sebagai kontrol negatif dan kontrol positif. Kontrol negatif pertama berisi 200 mL akuades dan kontrol negatif kedua berisi 180 mL akuades dan 20 mL medium (tanpa bakteri). Kontrol

positif menggunakan wadah berisi 200 mL campuran akuades steril yang mengandung 10 % v/v biakan cair *B. sphaericus* strain 2362 (strain referensi) dan 20 larva nyamuk instar III. Pengujian dilakukan pada suhu ruang dengan waktu pendedahan (*exposing time*) 24, 48 dan 72 jam. Jumlah larva yang mati pada tiap wadah kemudian diamati dan dicatat. Prosedur ini diulangi sebanyak 3 kali. Bila terjadi kematian lebih dari 20% dari jumlah larva pada kontrol negatif pertama dan kedua, maka pengujian harus diulangi.

Persentase kematian larva nyamuk didapatkan dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Kematian larva} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah total larva}} \times 100 \%$$

Koreksi *Abbott* (Finney, 1971) digunakan apabila pada kelompok kontrol terdapat kematian 5 - 20 % menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{AKK (\%)} = \frac{\text{AK (\%)} \text{ Uji} - \text{AK (\%)} \text{ Kontrol}}{100 \% - \text{AK (100)} \text{ Kontrol}} \times 100 \%$$

Keterangan:

AKK : Angka Kematian Koreksi

AK : Angka Kematian Larva

F. Pengujian Toksisitas Kuantitatif/Uji Hayati

Isolat *B. sphaericus* hasil isolasi yang mampu membunuh lebih dari 50% larva nyamuk pada uji toksisitas awal kemudian diuji lebih lanjut. Pengujian ini dilakukan pada 7 jenis konsentrasi bakteri yang berbeda 10 kali lipat (pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-7}). Sembilan wadah disiapkan, masing-masing berisi 180 mL akuades steril dengan 20 ekor larva nyamuk instar

III. Wadah pertama diperlakukan sebagai kontrol negatif pertama/air (ditambah dengan 20 mL akuades steril), wadah kedua diperlakukan sebagai kontrol negatif kedua/medium (berisi 180 mL air dan 20 mL medium, tanpa biakan) dan 7 wadah berikutnya adalah untuk pengujian. Ketujuh wadah berisi 180 mL akuades dan 20 mL biakan cair yang telah diencerkan secara serial. Pengujian dilakukan pada suhu ruang dengan waktu pendedahan (*exposing time*) 24, 48 dan 72 jam. Kontrol positif menggunakan wadah berisi 200 mL campuran akuades steril yang mengandung 10% v/v biakan cair *B. sphaericus* strain 2362 (strain referensi) dan 20 larva nyamuk instar III. Pengujian dilakukan menggunakan biakan *B. sphaericus* toksik berumur 72 jam. Jumlah larva yang mati pada tiap wadah kemudian (Dulmage *et al.*, 1991).

Melalui uji hayati ini nantinya dapat didapatkan nilai LC (*Lethal concentration*) selama 24, 48 dan 72 jam. Semakin kecil nilai LC yang didapat, maka semakin toksik suatu isolat. Hal ini disebabkan oleh rendahnya konsentrasi bakteri yang dimiliki yang bisa membunuh populasi larva uji yang sama.

5.2 Deteksi Gen Penyandi Toksin *B. sphaericus*

A. Isolasi DNA *B. sphaericus*

Isolat *B. sphaericus* yang memiliki aktivitas larvasida potensial dibiakkan dalam medium NYSM padat dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Untuk menghasilkan DNA yang banyak, sebaiknya tidak melakukan ekstraksi DNA pada biakan *B. sphaericus* yang berusia lebih dari 24 jam. Usia lebih dari 24 jam biasanya lebih banyak didapatkan endospore, yang akan mengurangi hasil DNA ketika akan diekstraksi.

Metode ekstraksi DNA ini dilakukan menurut Ausubel *et al.* (2003) dengan sedikit modifikasi. Satu hingga dua oose biakan padat *B. sphaericus* dimasukkan ke dalam tabung mikro yang berisi 560 μ L buffer TE pH 7,6. Sepuluh mikroliter lisozim (konsentrasi 30 mg/mL) ditambahkan ke dalam campuran tersebut dan tabung diinkubasi pada 37 °C selama 1 jam. Tiga puluh mikroliter SDS dan 10 μ L proteinase K (konsentrasi 20 mg/mL) kemudian ditambahkan pada campuran dan tabung diinkubasi kembali pada suhu 40 °C selama 1 jam. Seratus mikroliter 5% NaCl dan 80 μ L CTAB (konsentrasi 10 % dalam NaCl) kemudian ditambahkan dan campuran diinkubasi pada 65 °C selama 1 jam. Ekstraksi dilakukan dengan campuran fenol:kloroform:isoamil alkohol (perbandingan volume 25:24:1), kemudian disentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit. Fase atas (yang berisi DNA dan RNA) dipisahkan dan dilanjutkan dengan presipitasi menggunakan etanol absolut sebanyak 2 kali volume, kemudian diinkubasi semalam pada suhu -20 °C. Untuk mengendapkan DNA, dilakukan sentrifugasi 12.000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit. Endapan DNA dicuci dengan 500 μ L etanol 70 % dan disentrifugasi 12.000 rpm pada 4 °C selama 30 menit. Endapan DNA dilarutkan dengan 50-100 μ L buffer TE pH 7,6.

Dari pengalaman penulis ada beberapa metode ekstraksi DNA yang bisa digunakan. Tapi metode ini yang memberikan hasil DNA yang paling banyak dan stabil.

B. Teknik PCR Untuk Deteksi DNA Penyandi Toksin *B. sphaericus*

Teknik amplifikasi DNA untuk mendeteksi keberadaan gen penyandi toksin *B. sphaericus* adalah *multiplex* PCR yang berdasar pada prosedur dari Prabhu *et al.* (2013) menggunakan 5 pasang primer untuk

deteksi gen toksin (detail primer disajikan pada Tabel 5.1). Parameter PCR-nya adalah sebagai berikut. Reaksi amplifikasi diawali dengan predenaturasi pada 94 °C selama 5 menit, denaturasi pada 94 °C selama 30 detik, penempelan primer pada 46 °C selama 30 detik dan pemanjangan pada 72 °C selama 60 detik sebanyak 35 siklus. Pemanjangan akhir dilakukan pada 72 °C selama 5 menit. Amplikon dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,5%. Pengamatan hasil dilakukan dengan pewarnaan menggunakan EtBr (Ethidium bromida) di bawah sinar UV. Urutan primer yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan DNA gen penyandi toksin *B. sphaericus* (gen *bin* dan *mtx*) disajikan pada Tabel 5.1 sebagai berikut.

Tabel 5.1

Urutan primer untuk deteksi gen penyandi toksin *B. sphaericus* dan produk hasil PCR-nya. (Sumber: Prabhu *et al.*, 2013)

Primer	Urutan DNA Primer	Ukuran Produk (bp)
binA	F: 5'-TTG CCA ATA TTG AGT GTG C-3' R: 5'-TGC CTT CAC TTC CAG AAA AC-3'	200
binB	F: 5'-TAG TGT GAA TTC TCT AGC C-3' R: 5'-CAC TCA GTT AGG AGA AAG A-3'	100
mtx1	F: 5'-TGT GTC TTC TAC TGG AGA T-3' R: 5'-ACT GTT TAT GCT TCA CCT A-3'	300
mtx2	F: 5'-CTC CCT ATT GCT CGT ACT CT-3' R: 5'-TTT CGG TTT CCC AGT TAT C-3'	854
mtx3	F: 5'-TAC GAA ATG ATA CCG ATA G-3' R: 5'-GAT ACC CAC TTA AGT CCT C-3'	400

Hasil PCR dari deteksi gen ini berkaitan langsung dengan toksisitas suatu isolat atau strain *B. sphaericus*. Suatu isolat/strain *B. sphaericus* memiliki toksisitas yang kuat bila memiliki gen *binA* dan *binB* pada DNA-nya (ditandai dengan hasil PCR *binA* dan *binB* yang positif). Keberadaan gen *mtx* yang lengkap (*mtx1*, *mtx2*

dan *mtx3*), maupun yang tidak lengkap (kurang salah satunya), tidak memberikan banyak pengaruh pada toksisitas suatu isolat/strain *B. sphaericus*. Ini disebabkan toksin biner yang disandikan oleh binA dan binB lebih stabil dibandingkan dengan toksin Mtx (Priest, 1992; Charles *et al.*, 1996).

Deteksi gen penyandi toksin *B. sphaericus* bisa dilakukan lebih dulu, sebelum dilakukan uji toksisitas terhadap larva nyamuk target. Dengan diketahuinya keberadaan gen penyandi toksin tersebut, sifat toksisitas dapat diperkirakan lebih awal. Namun, bila di satu laboratorium, fasilitas biologi molekuler tidak memadai/tidak ada, tidak ada pilihan lain selain menguji toksisitas isolat *B. sphaericus* langsung pada larva target.

BAB VI

PENUTUP

Dari tulisan ini, kita bisa lihat bahwa *B. sphaericus* telah digunakan sebagai agen pengendali hayati larva nyamuk di berbagai negara dengan tingkat keberhasilan yang baik. Larvisida berbasis dapat *B. sphaericus* digunakan bersama/bergiliran dengan teknik pengendalian yang lain (penggunaan Abate, *fogging*, maupun teknik lain) untuk meningkatkan keberhasilan pengendalian larva nyamuk. Selain itu, penggunaan *B. sphaericus* dapat menekan resistensi nyamuk akibat teknik pengendalian lain. Namun demikian, agensia bakteri ini tidak pernah digunakan di Indonesia, padahal dari catatan berbagai sumber isolat, *B. sphaericus* strain 1539 berasal dari Jakarta.

Penggunaan larvisida berbasis *B. sphaericus* di negara lain sudah dilakukan sejak lama, dengan hasil yang baik. Hal ini bisa dicontoh untuk diterapkan di Indonesia. Tentunya, pengendalian menggunakan larvisida berbasis bakteri ini perlu diteliti tingkat keberhasilannya di Indonesia dalam skala kecil dan menengah, untuk kemudian ditingkatkan dalam skala yang lebih besar. Mengingat setiap lokasi memiliki karakteristik lingkungan yang berbeda-beda.

Selain potensi dalam pengendalian larva nyamuk, industri larvisida berbasis *B. sphaericus* memiliki potensi

untuk dikembangkan di Indonesia. Mengingat bahwa *B. sphaericus* adalah bakteri yang mudah didapatkan di lingkungan/tanah di sekitar kita. Dengan meembangkan industri larvisida di Indonesia, kita bisa mengurangi ketergantungan terhadap produk larvisida yang impor dari negara lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18 (2): 265-267. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Abe, K., Paust, R. M., Bulla Jr., L. A. 1983. Plasmid DNA in strains of *Bacillus sphaericus* and in *Bacillus moritai*. *J. Invertebr. Pathol.* 43:328-335.
- Ahmed, H. K., Mitchell, W. J., Priest F. G. 1995. Regulation of mosquitocidal toxin synthesis in *Bacillus sphaericus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:310-314.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A & Fujiwara, T. 2007. Proposal of *Lysinibacillus borotolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1117-1125.
- Alexander, B. & Priest, F. G. 1990. Numerical classification and identification of *Bacillus sphaericus* including some strains pathogenic for mosquito larvae. *J. Gen. Microbiol.* 136: 367-376.
- Arapinis, C., de la Torre, F., Szulmajster, J. 1988. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Bacillus sphaericus* 1593M gene encoding a 51.4

kD polypeptide which act synergistically with the 42 kD protein for the expression of the larvicidal toxin. *Nucleic Acid Res.* 16: 7731-7739.

Arredondo-Jimnez, J.I., Lopez, T., Rodriguez, M.H., and Bown, D.N. 1990. Small scale field trials of *Bacillus sphaericus* (strain 2362) against Anopheline and Culicine mosquito larvae in Southern Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6: 300-305.

Ausubel F. M., Brent R, Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (eds.). 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc. USA.

Barbazan, P., Baldet, T., Darriet, T., Escaffre, H., Djoda, D. H., Hougard, J. M. 1998. Impact of treatments with *Bacillus sphaericus* on Anopheles populations and the transmission of malaria in Maroua, a large city in a savannah region of Cameroon. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14: 33-39.

Baumann P., Clark, M. A., Baumann, L., Broadwell A. H. 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito patogen: properties of the organism and its toxin. *Microbiol Rev.* 55: 425-436.

Baumann, L., Broadwell A. H. Baumann, P. 1988. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9 kilodalton protein of *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *J. Bacteriol.* 170: 2045-2050.

Baumann, P., Unterman, B. M., Baumann, L., Broadwell, A. H., Abbene, S. J. 1985. Purification of larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *J. Bacteriol.* 163: 738-747.

- Beare, N. A., Taylor, T. E., Harding, S. P., Lewallen, S., Molyneux M. E. 2006. Malarial retinopathy: A newly established diagnostic sign in severe malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 75 (5): 790–7.
- Berry, C., Hindley, J., Ehrhardt, A. F., Grounds, T., de Souza, E. 1993. Genetic determinants of host ranges of *Bacillus sphaericus* larvacidal toxins. *J. Bacteriol.* 175: 510-518.
- Braga, I. A., Mello, C. A., Montella, I. A., Lima, J. B. P., Ademir de Martins, J. J., Medeiros, P. F. V. D. 2005. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. *J. Med. Entomol.* 42(5):830-7. doi: 10.1093/jmedent/42.5.830.
- Branswell, H. 2017. Scientists solve a Dengue mystery: Why second infection is worse than first? Dalam: <https://www.statnews.com/2017/11/02/Dengue-second-infection/> Diakses pada: 07-09-2020.
- Broadwell, A. H. & Baumann, P. 1986. Sporulation associated activation of *Bacillus sphaericus* larvicide. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 758-764.
- Castro, S. D. B., Arias, A. M., Velasquez, D. R. C., Granados, R. T., Mendoza, I. 2000. Introduction of *Bacillus sphaericus* strain 2362 (GRISELESF) for biological control of malaria vectors in Guatemala. *Re. Cubana. Med. Trop.* 52:37-43.
- Center for Disease Control. 2016. Chikungunya Virus Symptom, Diagnosis and Treatment. Dalam: <https://www.cdc.gov/Chikungunya/symptoms/index.html>. Diakses

pada: 26-09-2016.

Center for Disease Control (CDC). 2007. *Aedes aegypti*.

Dalam:

<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=9534>.

Diakses pada: 07-09-2020.

Center for Disease Control (CDC). 2020. Integrated Mosquito Management. Website:

<https://www.cdc.gov/mosquitoes/mosquito-control/professionals/i>

Center for Disease Control (CDC). 2020. Integrated Mosquito Management. Dalam:

<https://www.cdc.gov/mosquitoes/mosquito-control/professionals/integrated-mosquito-management.html>. Diakses pada: 03-09-2020.

Centers for Disease Control (CDC). 2020. Life Cycle of *Culex* Species Mosquitoes. Dalam:

<https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/culex.html>. Diakses pada: 21-09-2020.

Charles, J. F., Nielson-LeRoux, C., Delécluse, A. 1996.

Bacillus sphaericus toxins: molecular biology and mode of action. *Ann. Rev. Entomol.* 41 (51): 451-472.

Charles, J. F., Nielson-LeRoux, C., Delecluse, A. 1996.

Bacillus sphaericus toxins: molecular biology and mode of action, *Ann. Rev. Entomol.* 41:389-410.

Chen, Z. S., Zhang, Y. M., Cai, C. J., Yuan, Z. M. 1994.

Efficacy of *Bacillus sphaericus* C3-41 against *Anopheles sinensis* in laboratory and in fields. *Disinsectional Microorganism.* 4: 82-84.

Cokmus, T. & Yousten, A. A. 1991. Two new mosquito

pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* from Turkey. *J. Invertebr. Pathol.* 57:439-440.

- Collins, W. E. 2012. Plasmodium knowlesi: A malaria parasite of monkeys and humans. Annual Review of Entomology. 57: 107-121. DOI: 10.1146/annurev-ento-121510-133540.
- Dai, J. Y., Zhang, J. B., Yu, Z. N. 1989. Studies on semi-solid fermentation of mosquito-larvicidal Bacillus sphaericus, Disinsectional Microorganism. 2: 47-48.
- Dai, J. Y., Zhang, J. B., Yu, Z. N. 1994. The acute toxicity test of semi-solid fermentation products of Bacillus sphaericus CS-8 against mosquito. Disinsectional Microorganism. 3:94-97
- Davidson, E. W. 1981. A review of a pathology of bacilli infecting mosquitoes, including of ultrastructural study of larvae-fed Bacillus sphaericus 1593 spores. Dev. Ind. Microbiology. 22:69-81.
- Davidson, E. W. 1988. Binding of the Bacillus sphaericus (Eubacteriales: Bacillaceae) toxin to midgut cells of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae: relationship to host range. J. Medical. Entomol. 21: 151-157.
- Davidson, E. W. 1989. Variation in Binding of Bacillus sphaericus toxin and wheat germ agglutinin to larval midgut cells of six species of mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 53:251-259.
- de Barjac, H. 1990. Classification of B. sphaericus strains and comparative toxicity to mosquito larvae. In: H. de Barjac H, D. J. Sutherland (Eds.). 1990. Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies. Rutgers University Press. London.
- de Barjac, H., Larget, T. I., Cosmao-Dumanoir, V, Ripoteau, H. 1985. Serological Classification of Bacillus sphaericus strain on the basis of toxicity

- to mosquito larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 85-90.
- de Barjac, H., Thiery, I., Cosmao-Dumanoir, V. Ripouteau, H. 1988. Another *Bacillus sphaericus* serotype harbouring strains very toxic to mosquito larvae: Serotype H6. *Ann. Ins. Pasteur/Microbiol.* 139: 363-377.
- de Muro, M. A. & Priest, F. G. 1994. A colony hybridisation procedure for the identification of mosquitocidal strains of *Bacillus sphaericus* on isolation plates. *J. Invertebr. Pathol.* 63: 310-313.
- Delecluse, A., Rosso, M. L., & Ragni, A. 1995. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* susp. Jegathesan encoding a highly mosquitocidal protein. *Appl Environ Microbiol.* 61: 4230-4235.
- Dulmage, T, Yousten, A. A., Singer, S. & Lacey, L. A. 1990. Guidelines of Production of *Bacillus thuringiensis* and H-14 and *Bacillus sphaericus*. WHO Special Program for Research and Training in Tropical Disease. Geneve.
- El-Bendary, M. A. 2006. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. *J. Basic Microbiol.* 46 (2):, 158-170. DOI: 10.1002/jobm.200510585.
- Elyazar, I. R. F., Sinka, M. E., , Gething, P. W., Tarmidzi, S. N., , Surya A., Kusriastuti R., Winarno, Baird J. K., Hay S. I., , Bangs M. J. 2013. The Distribution and Bionomics of Anopheles Malaria Vector Mosquitoes in Indonesia. *Adv. Parasitol.* 83: 173-255.
- Enserink, M. 2007. Epidemiology. Tropical disease follows mosquitoes to Europe. *Science.* 3127

- (5844): 1485. DOI: 10.1126/science.317.5844.1485a.
- Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. 3rd. Edition, S. Chand & Company Ltd. New Delhi.
- Garden Lakes. 2017. Western Mosquitofish (*Gambusia Affinis*). Dalam: [https:// Gardenlakes.Net/ Mosquitofish-gambusia-affinis/](https://Gardenlakes.Net/Mosquitofish-gambusia-affinis/) /Diakses pada: 21-09-2020.
- Gould, E. A. & Solomon, T. 2008. Pathogenic flaviviruses. *Lancet*. 371 (9611): 500–9. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60238-X.
- Gray, E. W. 2019. Best Management Practices of Integrated Mosquito Management. Dalam: [http://www.gamosquito.org/ resources/papers/BMP_IMM.pdf](http://www.gamosquito.org/resources/papers/BMP_IMM.pdf). Diakses pada 21-09-2020.
- Grigarova, R., Hristova, T., Miteva, V. & Peneva, N. 1988. Characterization of local strains of *Bacillus sphaericus* toxic to mosquitoes. *Acta. Microbiol. Bulgaria*. 22: 87-93.
- Hindley, J. & Berry, C. 1987. Identification, cloning and sequence analysis of the *Bacillus sphaericus* 1593 41.9 kD larvicidal toxin gene. *Mol. Microbiol*. 1:187-194
- Hoedjo. 1989. Vectors of Malaria and Filariasis in Indonesia. *Bulletin Penelitian Kesehatan*. 17 (2): 181-190.
- Hu, X., Fan, W., Han, B., Liu, D., Zheng, D., Li, Q., Dong, W.. 2008. Complete Genome Sequence of the Mosquitocidal Bacterium *Bacillus sphaericus* C3-41 and Comparison with Those of Closely Related *Bacillus* Species. *Journal of Bacteriology*. 190 (8): 2892–2902.

- Kalfon, A., Thiery I. L., Charles, J. F., de Barjac, H.. 1983. Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18:168-173.
- Kellen, W. R., Clark, T. B., Lindegren , J. E., Ho, B. C. 1965. *Bacillus sphaericus* Neide as a Pathogen of Mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology. 7: 442-448.
- Kellen, W. R., Clark, T. B., Lindegren, J. E., Ho, B. C., Rogoff, M. H., Singer, S. 1965. *Bacillus sphaericus* Neide as a patogen of mosquitoes. J Invertebr Pathol. 7 (4): 442–8.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2020. Profil Kesehatan Indonesia 2019. Kementerian Kesehatan Indonesia. Jakarta.
- Kementerian Kesehatan RI. Demam Berdarah Dengue. 2010. Buletin Jendela Epidemiologi. 2: 1-41.
- Klein, D., Uspensky, I., Braun, S. 2002. Tightly bound binary toxin in the cell wall of *Bacillus sphaericus*. Appl Environ Microbiol. 68: 3300-3307.
- Krych, V. K., Johnson, J. L., Yousten, A. A. 1980. Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 30(2): 476-484.
- Kumar, A., Sharma, V. P., Sumodan, P. K., Thavaselvam, D., Kamal, R. H. 1994. Malaria control utilizing *Bacillus sphaericus* against *Anopheles stephensi* in Panaji, Goa. J. Am. Mosq. Control Assoc. 10:534-539.
- Kute, V. B. , Trivedi, H. L., Vanikar, A. V., Shah, P. R., Gumber, M. R., Pate, I H. V, Goswami, J. G., and Kanodia, K. V. 2012. *Plasmodium vivax* Malaria-associated Acute Kidney Injury. Emerging

Infectious Disease. 18 (5): 842–845

- Lewis, L. O. & Yousten, A. A. 1988. Bacteriophage attachment to the S-layer proteins of mosquito pathogenic strains *Bacillus sphaericus*. *Curr. Microbiol.* 17: 55-60.
- Liu, E. Y., Zhang, Y. M., Cai, C. J., Yan, J. P., Chen, Z. S. 1989. Pilot-scale study of *Bacillus sphaericus* C3-41 mosquito-larvicidal formulation. *Chinese J Epidemiol.* 10: 7-9.
- Liu, J. W., Porter, A. G., Wee, B., Thanabalu, T. 1996. New gene from *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8 kilodalton mosquitoicidal toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2174-2176.
- Mariappan, T., Amalraj, D. D., Doss, P. S., Sahu, S. S., Jambulingam, P., Somachary, N., Reddy, C. M., Kalyanasundaram, M., Das, P.K. 1999. Field evaluation of *Spicbiomoss*, a biolarvicidal formulation of *Bacillus sphaericus* against immatures of *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles* species. *Indian J. Med. Res.* 110:128-132.
- Monnerat, R. G., Batista, A. C., Telles de Medeiros, P., Martins, S. E., Melatti, V. M. Praça, L. B. 2007. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biol Control.* 41: 291-295.
- Mueller, I., Zimmerman, P. A., Reeder, J. C. 2007. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* - the "bashful" malaria parasites *Trends in Parasitology.* 23 (6): 278–283. DOI: 10.1016/j.pt.2007.04.009.
- Muhsin, M. 2012. *Bibliografi Sejarah Kesehatan Pada*

- Masa Pemerintahan Hindia Belanda. *Paramita*. 22 (2): 186-197.
- Oey, C., Hindley, J., Berry, C. 1992. Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivative to *Culex quinquefasciatus* gut: elucidation of functional binding domains. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1515-1526.
- Payne, J. M. & Davidson, E. W. 1984. Insecticidal activity of crystalline parasporal inclusion and other component of the *Bacillus sphaericus* 1593 spore complex. *J. Invert. Pathol.* 43: 383-388.
- Poopathi, S. & Tyagi, B. K. 2006. The Challenge of Mosquito Control Strategies: from Primordial to Molecular Approaches. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 1 (2): 51-65.
- Powers, A. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Strauss, E. G., Kang, W., Strauss, J. H., Weaver, S. C. 2001. Evolutionary relationships and systematic of the Aphavirus. *Journal of Virology*. 75 (21): 10118-10131. DOI: 10.1128/JVI.75.21.10118-10131.2001)
- Prabhu, D. I. G., Sankar, S. G., Vasan, P. T., Piriya, P. S., Selvan, B. K., Vennison, S. J. 2013. Molecular characterization of mosquitocidal *Bacillus sphaericus* isolated from Tamil Nadu, India (Short Communication). *Acta Tropica*. 127: 158-164.
- Priest, F. G. 1992. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 357-369.
- Priest, F. G. 1992. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 357-

369.

- Radhika, D., Ramathilaga, A., Prabu, C. S., Murugesan, & A. G., 2011. Evaluation of larvicidal activity of soil microbial isolates (*Bacillus* and *Acinetobacter* Sp.) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) - the vector of Chikungunya and Dengue. Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences 1:169-178.
- Ranjit, S. & Kissoon, N. 2011. Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. Pediatric Critical Care Medicine. 12 (1): 90-100. DOI: 10.1097/PCC.0b013e3181e911a7.
- Rodrigues, I. B., Tadei, W. P., Dias, J. M. 1998. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amazonia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 93 :441-444.
- Russell, B. L., Jelley, S. A., Yousten, A. A. 1989. Carbohydrate metabolism in the mosquito pathogen *Bacillus sphaericus* 2362. Appl. Environ. Microbiol. 55: 294-297.
- Silva-Filha, M. H., Nielson Leroux, C. Charles, J. F. 1999. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of mosquito *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae). Insect. Biochem. Molec. Biol. 29: 711-721.
- Simmons, C. P., Farrar, J. J., Nguyen, vV., Wills, B. 2012. Dengue. The New England Journal of Medicine. 366 (15): 1423-1432. DOI: 10.1056/NEJMra1110265.
- Singer, S. 1990. Introduction to The Study of *Bacillus sphaericus* As A Mosquito Control Agent. In: H. de Barjac & D. J. Suntherland (Eds.). 1990. Bacterial

- Control of Mosquitoes and Blackflies. Rutgers University Press. London.
- Skovmand, O. dan Sanogo, E. 1999. Experimental formulation of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in Burkina Faso. *J. Med. Entomo.* 36: 62-77.
- Suryadi, B. F. 2016. Eksplorasi *Bacillus sphaericus* dari Pantai Pulau Lombok Sebagai Agen Pengendali Larva Nyamuk *Anopheles aconitus*. Disertasi Doktoral. Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya. Malang.
- Suryadi, B. F., Yanuwadi, B, Ardiyati, T., Suharjono. 2016. Evaluation of entomopathogenic *Bacillus sphaericus* isolated from Lombok beach area against mosquito larvae. *Asian Pac J Trop Biomed.* 6 (2): 148–154.
- Suryadi, B. F., Yanuwadi, B., Ardyati, T., Suharjono. 2015. Isolation of *Bacillus sphaericus* from Lombok Island, Indonesia, and Their Toxicity against *Anopheles aconitus*. *Int. J. Microbiol.* 2015: 854709. doi: 10.1155/2015/854709.
- Thanabalu, T., Hindley, J., Berry, C. 1992. Proteolytic processing of mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSI-I. *J. Bacteriol.* 174:5051-5056.
- Thanabalu, T., Hindley, J., Jackson-Yao, J., Berry, C. 1991. Cloning, sequencing and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-I. *J. Bacteriol.* 173:2776-2785.
- Thiery, I., & de Barjac, H. 1989. Selection of the most potent *Bacillus sphaericus* strains, based on activity ratios determined on three mosquito

- species. *App. Microbiol. Biotechnol.* 31: 577-581.
- United States Air Force. 2019. When in doubt, dump it out. Diakses dari: <https://www.clover.af.mil/News/Article/965586/when-in-doubt-dump-it-out/> Diakses pada: 10-09-2020.
- United States Environmental Protection Agency (US-EPA). 1999. *Bacillus sphaericus* serotype H5a5b strain 2362 (128128) Fact Sheet. In Website: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-119801_01-Nov-99.pdf. Diakses pada: 10-09-2020.
- United States Environmental Protection Agency (US-EPA). 2019. Pyrethrins and Pyrethroids. Dalam: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/pyrethrins-and-pyrethroids.pdf>. Diakses pada 21-09-2020.
- United States Geological Survey (USGS). 2017. *Gambusia affinis* (Western Mosquitofish). Dalam: <https://nas.er.usgs.gov/queries/factsheet.aspx?SpeciesID=846>. Diakses pada: 21-09-2020.
- US Environmental Protection Agency (US EPA). 2014. Fact Sheet *Bacillus sphaericus* 2362, serotype H5a5b, strain ABTS 1743 (PC Code 119803). Dalam: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/073049-00065-20140211.pdf. Diakses pada: 01-09-2020.
- Valent Biosciences. 2017. Vectolex WDG. Dalam: <https://valentbiosciences.com/publichealth/wp-content/uploads/sites/4/2017/02/vectolex-sup-sup-fg-specimen-label-1.pdf>. Diakses pada: 30-10-

2020.

- Vanlalhrauaia, N., Kumar, S., Gurusubramanian, G. 2010. *Bacillus sphaericus* in the biological control of mosquito vector complex. *Sci Vis.* 11 (2): 61-71.
- Weinbaum, D. 2020. New Epidemic Rapidly Spreads Across Haiti. Dalam: <https://www.hearttoheart.org/new-epidemic-rapidly-spreads-across-haiti/> Diakses pada: 07-09-2020.
- Wibowo. 2010. Sejarah Chikungunya di Indonesia, Suatu Penyakit Reemerging? *Suplemen Media Penelitian dan Pengembangan Penelitian.* 20: 55-58.
- Yousten, A. A. 1984. Bacteriophage typing of mosquito strains of *Bacillus sphaericus*. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 124.
- Yousten, A. A., & Davidson, E. W. 1982. Ultrastructural analysis of spores and parasporal crystals formed in *Bacillus sphaericus* 2297. *Appl. Env. Microbiol.* 44:1449-1455.
- Yousten, A. A., Benfield E. F., Genthner, F. J.. 1995. *Bacillus sphaericus* Mosquito Patogen in the Aquatic Environment. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 90 (1): 125-29.
- Yuan, Z. M., Zhang, Y. M., Liu, E. Y., Cai Q. X., Pang, Y. 2000, High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China, *Biocontrol Sci. Techno.* 40: 43-51.
- Zhang, Y. M., Cai, C. J., Liu, E. Y., Chen, Z. S., Yan, J. P. 1989, Affecting factors and evaluation of *Bacillus sphaericus* formulation on controlling mosquito larvae in fields. *Chinese J. Epidemiol.* 10: 20-25.

- Zhang, Y. M., Cai, C.J., Liu, E. Y., Chen, Z. S. 1989. Effects of *Bacillus sphaericus* C3-41 Mosquito-Larvicidal Formulation in field. *Disinsectional Microorganism*. 2:43-46.
- Zhang, Y. M., Chen, Z. S., Cai, C. J., Yuan, Z. M., 1994. Larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* C3-41 flowable concentrates against larvae of *Anopheles* and *An. dirus*. *Chinese J. Vector Biological Control*. 5: 168-170.

