



UNIVERSITAS INDONESIA

**Penentuan Konsentrasi Letal *Bacillus thuringiensis israelensis*
terhadap *Culex quinquefasciatus* di Laboratorium Parasitologi FKUI**

SKRIPSI

LUKMANUL HAFIZ

0806451435

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI KEDOKTERAN UMUM
JAKARTA
18 APRIL 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**Penentuan Konsentrasi Letal *Bacillus thuringiensis israelensis*
terhadap *Culex quinquefasciatus* di Laboratorium Parasitologi FKUI**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana kedokteran

LUKMANUL HAFIZ

0806451435

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI KEDOKTERAN UMUM**

JAKARTA

18 APRIL 2011

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Lukmanul Hafiz

NPM : 0806451435

Tanda tangan : 

Tanggal : 18 April 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Lukmanul Hafiz
NPM : 0806451435
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Judul Skripsi : Penentuan Konsentrasi Letal *Bacillus thuringiensis israelensis* terhadap *Culex quinquefasciatus* di Laboratorium Parasitologi FKUI

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar sarjana pada Program Pendidikan Dokter Umum Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. dr. Saleha Sungkar, DAP&E, MS (Saleha)

Penguji : Prof. dr. Saleha Sungkar, DAP&E, MS (Saleha)

Penguji : Dra. Beti Ernawati Dewi, PhD (Beti)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 18 April 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penyusunan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana kedokteran pada Program Pendidikan Dokter Umum Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penulis juga mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada pihak yang telah membantu dan membimbing saya selama penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada Prof. dr. Saleha Sungkar, DAP&E, MS, yang telah membimbing saya dalam melakukan penelitian ini.. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr. dr. Saptawati Bardosono, MSc, sebagai Ketua Modul Riset FKUI yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian ini. Akhirnya, penulis mengucapkan penghargaan yang tak terhingga kepada orang tua dan keluarga yang tanpa lelah memberikan dukungan material dan moral. Tanpa mereka, penelitian ini sangatlah sulit dilakukan.

Penulis berharap semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu kedokteran dan memberi manfaat kepada masyarakat.

Jakarta, 18 April 2011



Lukmanul Hafiz

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA
ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lukmanul Hafiz
NPM : 0806451435
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Skripsi


Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif (*Non-Exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul: " Penentuan Konsentrasi Letal *Bacillus thuringiensis israelensis* terhadap *Culex quinquefasciatus* di Laboratorium Parasitologi FKUI" beserta perangkat yang ada (bila diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 18 April 2011

Yang menyatakan,



Lukmanul Hafiz

ABSTRAK

Nama : Lukmanul Hafiz
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Judul : Penentuan Konsentrasi Letal *Bacillus thuringiensis israelensis* terhadap *Culex quinquefasciatus* di Laboratorium Parasitologi FKUI

Penyakit tular nyamuk merupakan masalah kesehatan masyarakat antara lain filariasis yang ditularkan oleh *Cx. quinquefasciatus*. Pemberantasan filariasis dilakukan dengan pengobatan masal yang didukung pemberantasan vektor. Saat ini pemberantasan vektor ditekankan pada pemberantasan biologis, salah satunya menggunakan *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Bti telah digunakan di berbagai Negara namun di Indonesia efikasi Bti terhadap *Cx. quinquefasciatus* belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi letal Bti bentuk cair dalam membunuh *Cx. quinquefasciatus*. Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental menggunakan koloni larva *Cx. quinquefasciatus* dari Laboratorium Parasitologi FKUI. Sebanyak 100 larva instar III dimasukkan ke dalam bak keramik yang berisi 125 L air. Selanjutnya bak tersebut diberikan Bti bentuk cair dengan berbagai konsentrasi lalu diobservasi, dan setelah 24 jam dihitung jumlah larva yang mati. Sebagai kontrol 100 larva dimasukkan ke dalam bak dengan jenis dan ukuran yang sama namun tidak diberikan Bti. Hasil penelitian menunjukkan LC_{50} dan LC_{95} untuk *Cx. quinquefasciatus* adalah 0,575 (0.288- 0.801) ml/m² dan 2,839 (2.431-3.482) ml/m². Koefisien determinasi (R^2) selama pengamatan 24 jam sebesar 0,968. Disimpulkan LC_{50} Bti terhadap larva *Cx. quinquefasciatus* adalah 0,575 ml/m² dan LC_{95} adalah sebesar 2,839 ml/m². Untuk penggunaan di lapangan, digunakan estimasi konsentrasi tertinggi LC_{95} dan sesuai dengan sediaan yang dijual oleh pabrik yaitu 4 ml/m².

Kata kunci: *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Cx. quinquefasciatus*, LC_{50} , LC_{95}

ABSTRACT

Name : Lukmanul Hafiz
Study Program : General Medicine
Title : Lethal Concentration Test of *Bacillus thuringiensis israelensis* against *Cx.quinquefasciatus* in Laboratory of Parasitology, FKUI

Mosquito borne disease is still a public health problem, one of them is filariasis which is transmitted by *Cx.quinquefasciatus*. Eradication of filariasis by mass treatment supported the eradication of the vector. Currently focused on eradicating eradication of vector biology, one of them using *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI). BTI has been used in various countries but in Indonesia BTI efficacy against *Cx.quinquefasciatus* is unknown. This study aims to determine the lethal concentration BTI liquid form against *Cx.quinquefasciatus*. This research was conducted with experimental methods using a colony of *Cx.quinquefasciatus* larvae in the Laboratory of Parasitology FKUI. A total of 100 third instar larvae inserted into the ceramic container containing 125 L of water. Furthermore, these container are given BTI liquid form with various concentrations. After 24 hours counted the number of dead larvae. The results showed LC_{50} and LC_{95} for *Cx.quinquefasciatus* is 0,575 (0,288-0,801) ml/m² and 2,839 (2,431-3,482) ml/m². The coefficient of determination (R^2) during 24-hour observation is 0.968. BTI concluded LC_{50} of *Cx.quinquefasciatus* larvae LC_{95} is 0.575 ml/m² and amounted to 2.839 ml/m². For use in the field, is used to estimate the highest concentration of LC_{95} and in accordance with the stocks being sold by the factory which is 4 ml/m².

Keywords: *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Cx.quinquefasciatus*, LC_{50} , LC_{95}

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	v
ABSTRAK.....	vi
<i>ABSTRACT</i>	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	x
1.PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah.....	2
1.3. Tujuan Penelitian	2
1.4. Manfaat Penelitian	2
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Filariasis.....	4
2.1.1. Definisi.....	4
2.1.2. Patologi dan Gejala Klinis Filariasis Bancrofti.....	4
2.1.3. Patologi dan gejala Klinis Filariasis Brugian.....	6
2.1.4. Diagnosis.....	6
2.1.5. Pengobatan dan Prognosis	7
2.2. Culex sebagai Vektor Filariasis	7
2.2.1. Morfologi Culex sp.	7
2.2.2. Daur Hidup.....	8
2.2.3. Perilaku	8
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	9

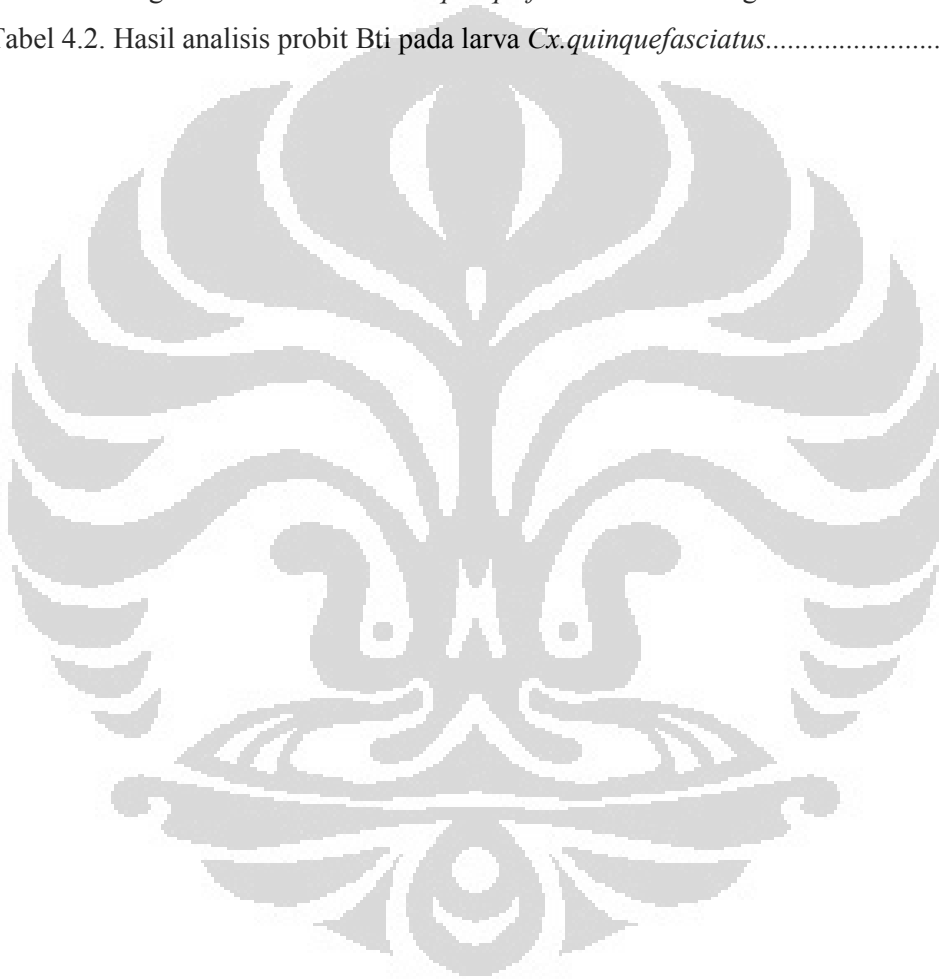
2.3.1. Karakteristik Biologis	9
2.3.2. Cara Kerja Terhadap Serangga Target.....	10
2.3.3. Produk Komersial, Produksi, dan Aplikasi.....	11
2.3.4. Pengaruh Paparan Bt Terhadap Manusia	11
2.4. Kerangka Konsep.....	11
3. METODE PENELITIAN	12
3.1. Desain Penelitian	12
3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian	12
3.3. Populasi dan Sampel Penelitian	12
3.4. Cara Kerja	12
3.5. Identifikasi Variabel.....	13
3.6. Pengumpulan Data dan Manajemen Penelitian.....	13
3.7. Analisis Data	13
3.8. Batasan Operasional.....	14
4. HASIL PENELITIAN.....	15
5. DISKUSI	17
6. KESIMPULAN DAN SARAN	18
DAFTAR PUSTAKA.....	19

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Morfologi nyamuk <i>Cx. quinquefasciatus</i>	8
Gambar 4.1 Grafik transformasi probiotik Bti	17

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Angka Kematian Larva <i>Cx. quinquefasciatus</i> di Berbagai Konsentrasi Bti	15
Tabel 4.2. Hasil analisis probiotik Bti pada larva <i>Cx. quinquefasciatus</i>	16



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Salah satu penyakit endemis yang masih sulit ditanggulangi adalah filariasis. Filariasis dilaporkan menghabiskan dana 5 juta US dolar atau sekitar 550 milyar rupiah setiap tahun, untuk penanggulangannya di dunia. Di Indonesia, filariasis tersebar luas hampir di seluruh propinsi. Pada tahun 2008, jumlah kasus kronis filariasis mencapai 11 699 penderita di 378 kabupaten/kota. Berdasarkan hasil pemetaan, prevalensi mikrofilaria di Indonesia adalah 19% dari seluruh populasi Indonesia, berarti terdapat 40 juta orang mengandung mikrofilaria. Oleh karena itu, Kementerian Kesehatan RI bersama-sama dengan kementerian kesehatan negara endemis lainnya telah melakukan kesepakatan untuk mengeliminasi filariasis pada tahun 2020.

Dalam program tersebut, digunakan metode yang sama di semua negara endemis untuk memberantas filariasis limfatik, yaitu menggunakan *diethyl carbamazine citrate* (DEC) dan albendazol setahun sekali selama 5 tahun yang diberikan secara gratis kepada penduduk di daerah endemis. Program tersebut diharapkan dapat mengeliminasi filariasis, namun kenyataannya, hingga Oktober 2009, baru 6 juta (19%) orang yang minum obat filariasis dari target 32 juta penduduk sasaran yang akan mendapat pengobatan masal filariasis.

Berdasarkan data di stas pemberantasan filariasis perlu didukung dengan pemberantasan vektor. Filariasis ditularkan oleh *Cx.quinquefasciatus* di daerah perkotaan dan *Anopheles sp.*, *Aedes sp.* dan *Mansonia sp.* di daerah pedesaan. Di daerah perkotaan, *Cx.quinquefasciatus* berkembangbiak di berbagai tempat perindukan seperti tempat penampungan air di rumah-rumah, got, kali, kolam, dan lain-lain.

Strategi pemberantasan vektor saat ini diupayakan lebih memperhatikan lingkungan yang disebut *integrated vektor management (IVM)*. Hal tersebut dapat dilakukan dengan manajemen lingkungan dan pemberantasan biologis.

Pemberantasan biologis dapat dilakukan menggunakan ikan, cyclops, jamur, dan *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Bti merupakan bakteri gram positif pembentuk spora yang bersifat insektisida selama fase sporulasi sebagai kristal parasporal yang disebut delta-endotoksin. Bti telah lama digunakan untuk memberantas vektor malaria yaitu *Anopheles* di Indonesia namun untuk *Cx.quinquefasciatus* efektivitasnya belum diketahui.

Saat ini telah diproduksi Bti yang diformulasikan untuk pemberantasan *Cx.quinquefasciatus*, tetapi berapa konsentrasi yang tepat untuk digunakan di Indonesia, belum diketahui. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui konsentrasi letal Bti terhadap *Cx.quinquefasciatus*.

1.2 Rumusan Masalah

Berapa konsentrasi letal Bti terhadap *Cx.quinquefasciatus* ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Diketuinya konsentrasi letal Bti terhadap *Culex quinquefasciatus* di Laboratorium Parasitologi FKUI.

1.3.2 Tujuan Khusus

Diketuinya LC_{50} dan LC_{95} Bti terhadap *Culex quinquefasciatus* di Laboratorium Parasitologi FKUI.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti

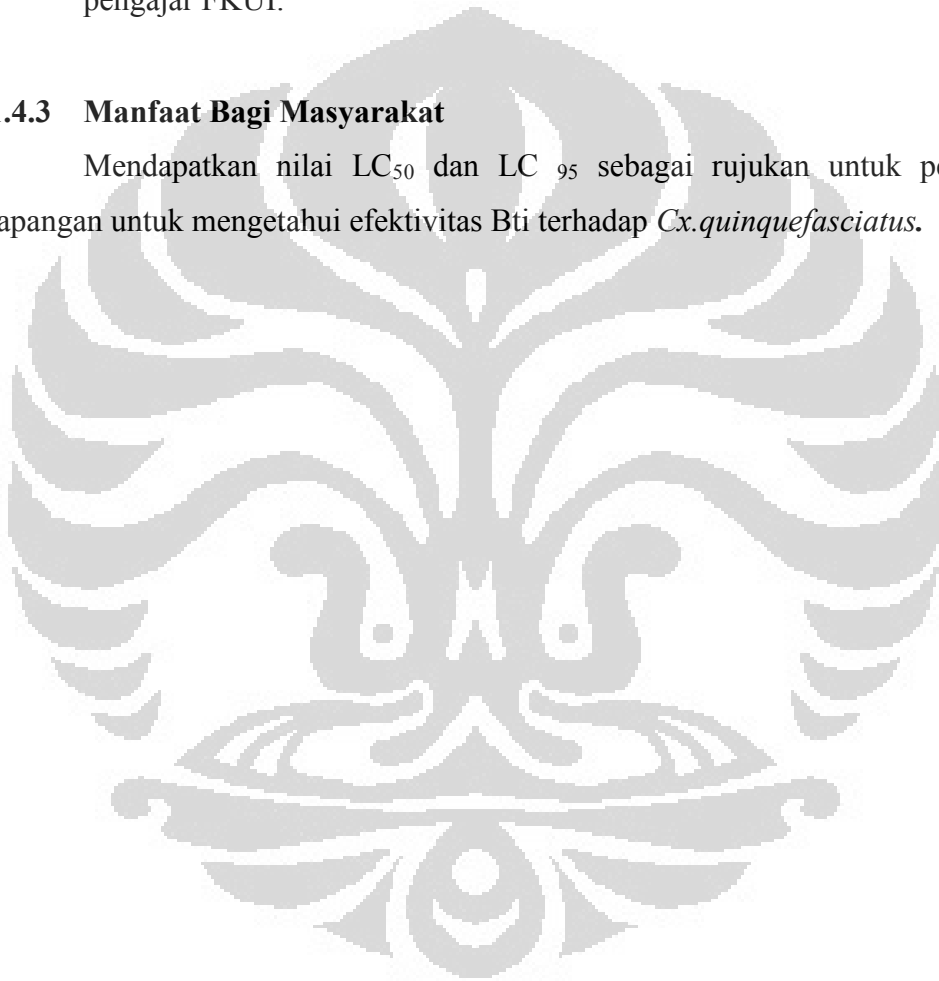
1. Sebagai sarana pelatihan dan pembelajaran melakukan penelitian di bidang biomedik.
2. Mengembangkan kemampuan berpikir kritis, analitis, dan sistematis dalam mengidentifikasi permasalahan kesehatan masyarakat.
3. Melatih kerja sama tim dalam mewujudkan penelitian ini.

1.4.2 Manfaat Bagi Perguruan Tinggi

1. Mengamalkan Tri Darma Perguruan Tinggi dalam melaksanakan fungsi perguruan tinggi sebagai lembaga penyelenggara pendidikan, penelitian, dan pengabdian masyarakat.
2. Turut berperan serta dalam rangka mewujudkan visi FKUI 2014 sebagai universitas riset.
3. Meningkatkan kerjasama serta komunikasi antara mahasiswa dan staf pengajar FKUI.

1.4.3 Manfaat Bagi Masyarakat

Mendapatkan nilai LC_{50} dan LC_{95} sebagai rujukan untuk penelitian lapangan untuk mengetahui efektivitas Bti terhadap *Cx. quinquefasciatus*.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Filariasis

Filariasis bankrofti adalah infeksi oleh cacing filaria *Wuchereria bancrofti*, yang bentuk dewasanya berdiam dalam sistem limfatik, menimbulkan limfangitis rekuren dengan fibrosis dan obstruksi. Pada obstruksi luas, terjadi edema kronis yang berkembang menjadi elefantiasis. Mikrofilarianya bersirkulasi dalam darah; kemudian ditularkan pada nyamuk yang mengisap darah, sebagai vektor dan pejamu intermiten.¹

Filariasis brugian adalah infeksi oleh cacing filaria spesies *Brugia malayi* dan *B. timori*, cacing dewasanya berdiam dalam saluran limfatik, kelenjar getah bening, dan jaringan penyambung; gejalanya berkisar dari adenitis asimtomatik, hingga serangan demam berkala, limfangitis, dan elefantiasis, terutama pada tungkai bawah dan kaki. Mikrofilarianya bersirkulasi seperti filariasis bancrofti.¹

2.1.1 Patologi dan Gejala Klinis Filariasis Bankrofti

Gejala klinis filariasis limfatik disebabkan oleh microfilaria dan cacing dewasa baik yang hidup dan mati.¹ Mikrofilaria biasanya tidak menimbulkan kelainan tetapi dalam keadaan tertentu dapat menyebabkan *occult filariasis*. Cacing dewasa menimbulkan limfadenitis dan limfangitis retrograd dalam stadium akut, disusul dengan obstruktif menahun 10 sampai 15 tahun kemudian.

Perjalanan penyakit filariasis limfatik dapat dibagi dalam beberapa stadium yaitu stadium mikrofilaremia tanpa gejala klinis, stadium akut dan stadium menahun. Pada penderita mikrofilaremia tanpa gejala klinis, pemeriksaan dengan limfosintigrafi menunjukkan adanya kerusakan saluran limfe. Adanya cacing dewasa hidup dapat menyumbat saluran limfe dan terjadi dilatasi pada saluran limfe, disebut lymphangiectasia.² Setelah infiltrasi limfositik yang intensif, lumen tertutup dan cacing mengalami kalsifikasi. Sumbatan sirkulasi limfatik terus berlanjut pada individu yang terinfeksi berat sampai semua saluran limfatik yang ada tertutup menyebabkan limfedema di daerah yang terkena. Selain itu juga terjadi hipertrofi otot polos di sekitar daerah terkena.^{2,3}

2.1.1.1 Patologi dan Gejala Klinis Filariasis Brugian

Gejala klinis filariasis malayi sama dengan gejala klinis filariasis timori. Gejala klinis ke dua penyakit tersebut berbeda dengan gejala klinis filariasis bankrofti. Stadium akut ditandai dengan serangan demam dan gejala peradangan saluran dan kelenjar limfe, yang hilang timbul berulang kali. Limfadenitis biasanya berlangsung 2 - 5 hari dan dapat sembuh tanpa pengobatan. Peradangan pada saluran limfe ini dapat terlihat sebagai garis merah yang menjalar ke bawah dan peradangan ini dapat pula menjalar ke jaringan sekitarnya, menimbulkan infiltrasi pada seluruh paha atas.

Limfedema biasanya hilang lagi setelah gejala peradangan menyembuh, tetapi dengan serangan berulang kali, lambat laun pembengkakan tungkai tidak menghilang setelah gejala peradangan sembuh, sehingga timbullah elefantiasis. Selain kelenjar limfe inguinal, kelenjar limfe lain di bagian medial tungkai, di ketiak dan di bagian medial lengan juga sering terkena. Pada filariasis brugia, elefantiasis hanya mengenai tungkai bawah, di bawah lutut, atau kadang-kadang lengan bawah di bawah siku. Alat kelamin dan payudara tidak pernah terkena, kecuali di daerah filariasis brugia yang bersamaan dengan filariasis bankrofti. Kiluria bukan merupakan gejala klinis filariasis brugia.

2.1.1.2 Diagnosis

Ada beberapa hal yang penting dalam menentukan diagnosis filariasis, yaitu:

1. Tempat tinggal pasien pada daerah endemis (umumnya pada daerah iklim tropis dan subtropis).⁴
2. Adanya serangan episodik berupa limfangitis, limfadenitis, dan demam.
3. Hidrokel; kiluria; limfedema akut atau kronik; atau elefantiasis pada lengan, kaki, organ genitalia, atau di payudara.
4. Ditemukannya mikrofilaria di darah, kiluria, atau di cairan hidrokel; hasil serologi positif; dan antigen sirkulasi. Pengambilan darah harus dilakukan pada malam hari (setelah pukul 20.00) mengingat periodisitas microfilaria umumnya nokturna. Pada pemeriksaan histopatologi, kadang-kadang potongan cacing dewasa dapat dijumpai di saluran dan kelenjar limfe dari jaringan yang dicurigai sebagai tumor. Deteksi antigen dengan

immunochromatographic test (ICT) menggunakan antibodi monoklonal telah dikembangkan untuk mendeteksi antigen *W. bancrofti* dalam sirkulasi darah. Hasil tes positif menunjukkan adanya infeksi aktif walaupun microfilaria tidak ditemukan dalam darah.^{5,6}

Selain itu, diagnosis dapat dipastikan dengan pemeriksaan laboratorium, yakni:

1. Teknik biologi molekuler dapat digunakan untuk mendeteksi parasit melalui DNA parasit dengan menggunakan reaksi rantai polimerase (Polymerase Chain Reaction/PCR). Teknik ini mampu memperbanyak DNA sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi parasit pada *cryptic infection*.⁷
2. Deteksi antibodi dengan menggunakan rekombinan antigen telah dikembangkan untuk mendeteksi antibodi subklas IgG4 yang meningkat pada filariasis *Brugia*. Deteksi antibodi tidak dapat membedakan antara infeksi lampau dan infeksi aktif.⁸ Pada stadium obstruktif, microfilaria sering tidak ditemukan lagi di dalam darah tetapi ada di dalam cairan hidrokel atau cairan kiluria.

2.1.1.3 Pengobatan dan Prognosis

Selama lebih dari 40 tahun DEC merupakan obat pilihan baik untuk pengobatan perorangan maupun masal. DEC bersifat membunuh microfilaria dan juga cacing dewasa pada pengobatan jangka panjang. Dosis yang dianjurkan adalah 6 mg/kg berat badan/hari selama 12 hari. Umumnya dengan dosis ini akan menghilangkan microfilaria tapi untuk benar-benar bebas dari parasitnya diperlukan beberapa kali pengobatan. Program eliminasi filariasis melalui pengobatan masal di daerah endemis (prevalensi $\geq 1\%$) telah dicanangkan oleh organisasi kesehatan dunia. Obat yang dianjurkan adalah kombinasi DEC 6 mg/kg BB dan albendazol 400 mg yang diberikan setiap tahun selama 5 – 10 tahun pada penduduk di atas usia 2 tahun.⁹

Obat lain yang juga dipakai dan saat ini masih terus diuji coba adalah ivermektin. Ivermektin adalah antibiotik semisintetik dari golongan makrolid yang mempunyai aktivitas luas terhadap nematoda dan ektoparasit. Obat ini hanya membunuh microfilaria. Efek samping yang ditimbulkannya lebih ringan dibanding DEC. Diberikan sebagai dosis tunggal 400 ug/kg berat badan; dapat

sebagai obat tunggal (setiap 6 bulan sekali) atau dikombinasikan dengan dietil-karbamasin (diberikan setahun sekali).

Bila ditemukan luka harus segera diobati dengan antibiotik dan antimikotik.⁹ Kelangsungan hidup filaria di dalam containeruh hospes dipengaruhi oleh adanya *Wolbachia* yang merupakan endobakteri dari famili rickettsiaceae. Endobakteri ini berperan pada perkembangan, reproduksi dan kelangsungan hidup parasit filaria dalam containeruh hospes sehingga dapat dijadikan target pada pengobatan filariasis. Pengobatan DEC pada filariasis akan membunuh parasit sehingga keluarnya wolbachia atau molekul lipopolisakrida menyebabkan efek samping pengobatan. Antibiotik golongan makrolid (tetrasiklin, doksisisiklin) diketahui efektif membunuh *wolbachia* dalam parasit filarial dan mengurangi efek samping pengobatan DEC.¹⁰

2.1.2 *Culex sp*

Di Indonesia ditemukan 3 jenis parasit nematoda penyebab filariasis limfatik pada manusia, yaitu *W. bancrofti*, *B. malayi* dan *B. timori*.³ Parasit itu tersebar di seluruh kepulauan di Indonesia oleh berbagai spesies nyamuk yang termasuk dalam genus *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia*, *Coquilettidia* dan *Armigeres*. Vektor utama filariasis di daerah perkotaan adalah *Cx.quinquefasciatus*, sedangkan di pedesaan filariasis bancrofti dapat ditularkan oleh berbagai spesies *Anopheles* atau dapat pula ditularkan oleh nyamuk *Aedes kochi*, *Cx.bitaeiorrhynchus*, *Cx.annulirostris* dan *Armigeres obsturbans*.

2.1.2.1 Morfologi *Culex sp*

Telur diletakkan satu per satu atau berkelompok membentuk semacam rakit.³ Stadium pupa mempunyai tabung pernapasan yang bentuknya kelihatan sempit dan panjang, digunakan untuk pengambilan oksigen. Pada stadium dewasa nyamuk betina, palpinya lebih pendek daripada probosisnya, sedangkan pada nyamuk jantan, palpinya melebihi panjang probosisnya. Sisik sayapnya sempit dan panjang.



Gambar 2.1. Morfologi nyamuk *Cx. quinquefasciatus*

2.1.2.2 Daur Hidup

Culex sp. metamorfosis sempurna, tetapi waktu yang diperlukan untuk pertumbuhan dari telur sampai menjadi dewasa lebih pendek (1-2 minggu). Tempat perindukannya di air jernih maupun air keruh (*polluted*). Tempat perindukan *Cx. quinquefasciatus* adalah pada got dengan air keruh dan kotor dekat rumah.¹¹

2.1.2.3 Perilaku

Culex mempunyai kebiasaan mengisap darah hospes pada malam hari saja. Jarak terbangnya biasanya pendek mencapai jarak rata-rata beberapa puluh meter saja. Umur nyamuk dewasa baik di alam maupun di laboratorium biasanya kira-kira 2 minggu.¹²

2.1.3 *Bacillus thuringiensis*

2.1.3.1 Karakteristik Biologis

Bacillus thuringiensis (Bt) adalah bakteri gram positif bersifat anaerob fakultatif. Bakteri ini membentuk protein inklusi yang memiliki karakteristik yang dekat dengan endospora.¹² Subspesies dari Bt dapat mensintesis lebih dari satu inklusi paraspora. Secara genetik, Bt tidak dapat dibedakan dengan *Bacillus cereus* (Bc), kecuali kemampuan Bt untuk memproduksi inklusi kristal paraspora, yang bersifat toksik bagi invertebrata tertentu, terutama spesies larva serangga yang tergabung dalam ordo *Coleoptera*, *Diptera*, dan *Lepidoptera*. Inklusi paraspora

dibentuk oleh *insecticidal crystal protein* (ICP) yang berbeda-beda. Kristal tersebut memiliki berbagai macam bentuk (bipiramida, kuboid, rhomboid, sferik, atau gabungan dari dua tipe kristal), tergantung komposisi dari ICPnya.¹²

Tingkat taksonomi paling dasar yang membedakan fenotipnya adalah subspecies, yang dapat diidentifikasi dari *serotype* flagellanya. Sampai tahun 1998, 67 subspecies berhasil ditemukan. Gen yang mengkode ICP umumnya berada pada plasmid. Sebagian besar plasmid yang mengandung gen ICP dapat dipindahkan lewat konjugasi antar strain Bt dan dapat pula ditransfer kepada spesies bakteri lain yang berkaitan/berdekatan. Domain berbeda dari ICP memiliki keterkaitan dengan kerentanan hospes (pengenalan oleh reseptor) dan toksisitasnya (pembentukan pori-pori).¹³

Beberapa subspecies Bt memproduksi beta-eksotoksin, yaitu nukleotida yang stabil terhadap panas selama fase pertumbuhan vegetatif dan dapat mengontaminasi produk kristal dari Bt. Beta-eksotoksi bersifat toksik terhadap hampir seluruh bentuk kehidupan termasuk manusia dan serangga target. Selama fase pertumbuhan vegetatif, berbagai strain Bt memproduksi berbagai golongan antibiotik, enzim, metabolit, dan toksin, termasuk toksin Bc, yang memiliki efek merugikan bagi organisme target dan organisme nontarget. Jumlah spora tidak secara akurat merefleksikan aktivitas insektisida strain Bt. Potensi tiap produk Bt diuji menggunakan standar internasional menggunakan serangga uji spesifik.¹⁴

2.1.3.2 Cara Kerja Terhadap Serangga Target

Bt yang telah tersporulasi dan memiliki ICP atau kompleks spora-ICP harus dimakan oleh larva serangga. Efikasi dari ICP bergantung pada pelarutannya di usus, konversi dari protoksin menjadi toksin yang aktif secara biologis oleh enzim proteolitik, pengikatan dengan reseptor membran spesifik oleh domain C-terminal pada toksin aktif, dan pembentukan pori oleh domain N-terminal yang dilanjutkan dengan lisis dari sel epitel, sehingga mengakibatkan perforasi dari dinding usus larva. Perkembangan spora dan proliferasi dari sel vegetatif menjadi hemosol dapat mengakibatkan septisemia, yang berkontribusi sebagai penyebab kematian. Pengikatan reseptor oleh ICP adalah penentu utama spesifisitas hospes terhadap ICP yang berbeda-beda dari Bt.¹⁴

Sejumlah serangga dari beberapa spesies dengan tingkatan resistensi yang berbeda terhadap Bt berhasil didapatkan melalui eksperimen seleksi di laboratorium. Spesies-spesies tersebut antara lain *Ploida interpunctella*, *Cadra cautella*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Chrysomela scripta*, *Trichoplusia*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis*, dan *Cx. quinquefasciatus*, dan resistensinya ditunjukkan terhadap Bti, Btk, Btte, dan subspecies Bt lainnya.¹⁴

Bti membunuh larva nyamuk secara umum 1 jam setelah larva tersebut makan. Aktivitas larva berkurang dalam 2 jam, dan melemah pada 4 jam secara ekstrim, kemudian paralisis dalam waktu 6 jam.¹⁴

2.1.3.3 Produk Komersial, Produksi, dan Aplikasi

Produk Bt konvensional, yang menggunakan strain Bt yang alami mencakup kurang lebih 90% dari pasar MPCA dunia. Sebagian besar produk Bt mengandung ICP dan spora aktif yang dapat bertahan hidup, tetapi pada produk-produk Bt lainnya, sporanya telah terinaktivasi. Setiap tahun, 13.000 ton produk Bt diproduksi menggunakan teknologi fermentasi aerob. Produk konvensional Bt menargetkan kepada hama dari ordo lepidoptera yang merusak agrikultur dan tanaman-tanaman hutan; akan tetapi, beberapa tahun ini, strain Bt yang aktif terhadap hama coleoptera juga telah dipasarkan. Strain dari Bt yang aktif terhadap vektor parasit penyakit akibat virus dari ordo diptera juga digunakan pada program kesehatan masyarakat.¹⁴ Formulasi dari Bt komersial dapat digunakan sebagai insektisida pada dedaunan, tanah, lingkungan air, atau tempat penyimpanan makanan. ICP sendiri dapat menjadi inaktif secara biologis dalam beberapa jam atau hari.¹⁴

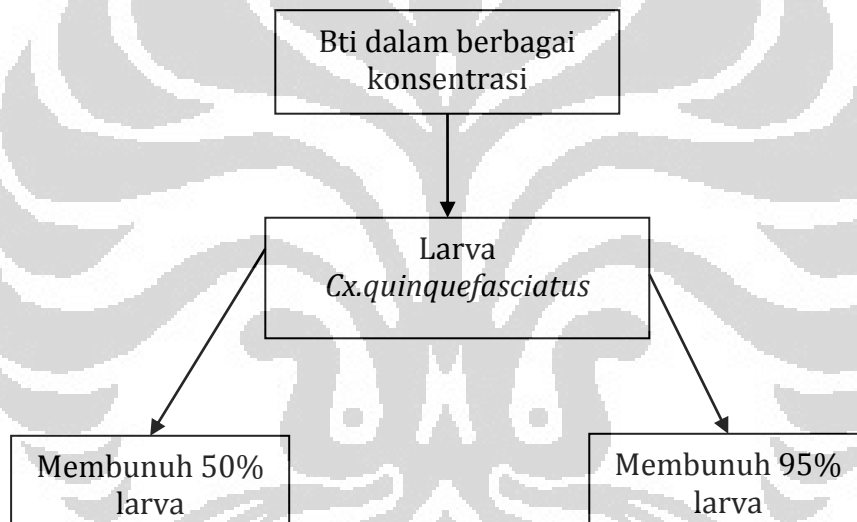
2.1.3.4 Pengaruh pajanan Bt Terhadap Manusia

Penggunaan Bt pada sektor agrikultur dapat mengakibatkan kontaminasi pada makanan dan air. Dengan pengecualian terhadap iritasi kulit dan mata, tidak ada pengaruh yang merugikan yang dilaporkan setelah terpajan oleh produk Bt saat bekerja. Sukarelawan yang bersedia memakan dan menghirup produk Bt dalam jumlah besar tetapi tidak merasakan efek negatif terhadap kesehatannya.

Titer antibodi terhadap sel-sel vegetatif, spora, dan kompleks spora-kristal ditemukan pada pekerja yang menyemprotkan produk Bt, tetapi tidak ada laporan mengenai efeknya terhadap kesehatan.

Terdapat beberapa laporan kasus kemunculan Bt pada pasien dengan penyakit infeksi yang berbeda-beda. Akan tetapi, dari berbagai studi yang dilakukan, tidak ada yang mendemonstrasikan risiko aktual terhadap kesehatan manusia akibat penggunaan Bt. Bt belum pernah dilaporkan mengakibatkan efek merugikan terhadap kesehatan manusia bila berada pada air minum atau makanan. ICP terlarut alkali dari Bti bersifat sitolitik terhadap eritrosit manusia, fibroblas tikus, dan limfosit primer babi *in vitro*.¹⁴

2.5. Kerangka Konsep



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental.

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Eksperimen ini dilakukan pada bulan Desember 2009 sampai dengan bulan Maret 2010 di Laboratorium Parasitologi FKUI.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Target

Populasi target penelitian ini adalah larva *Cx. quinquefasciatus*.

3.3.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah larva *Cx. quinquefasciatus* yang berasal dari koloni laboratorium Parasitologi FKUI.

3.3.3 Objek Penelitian

Objek penelitian ini ialah semua larva *Cx. quinquefasciatus* Instar III yang dipelihara di Laboratorium Parasitologi FKUI.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pemeliharaan *Cx. quinquefasciatus*

Larva *Cx. quinquefasciatus* dipelihara di dalam baskom berukuran 24 x 35 x 6 cm³ yang berisi air PAM dan diberi makan *rabbit chow*. Bila pupa telah terbentuk, maka pupa dikumpulkan dalam mangkuk berisi air lalu mangkuk tersebut diletakkan di dalam kurungan nyamuk yang berukuran 25 x 25 x 25 cm³. Bila nyamuk dewasa telah keluar dari pupa, maka nyamuk tersebut diberi makan air gula 10% yang dicampur dengan vitamin B kompleks 1%. Setelah berumur 5 hari, nyamuk betina diberi makan darah mencit. Ke dalam kurungan nyamuk juga dimasukkan mangkuk berisi air dan kertas saring sebagai tempat peletakan telur. Telur yang terkumpul pada kertas saring dikering-anginkan selama 1 minggu.

Selanjutnya, telur ditetaskan dan larva yang baru menetas dipindahkan ke dalam baskom berisi air. Bila larva telah mencapai instar III, maka larva tersebut siap untuk diuji.

3.4.2 Penentuan Lc_{50} dan Lc_{95}

Pada penelitian ini digunakan *container* berupa bak yang terbuat dari beton yang bagian dalamnya dilapisi keramik berwarna putih. Ukuran bak adalah $60 \times 60 \times 60 \text{ cm}^3$ yang diisi air sumur dengan volume 125 liter. Sebelum dipakai, bak diisi air sampai penuh lalu diganti setiap 3 hari selama 1 bulan untuk menghilangkan bau semen. Setelah siap pakai, *container* diisi air sumur sebanyak 125 liter lalu dibubuhi Bti dengan 6 jenis konsentrasi untuk mendapatkan Lc_{50} dan Lc_{95} . Konsentrasi Bti yang digunakan menggunakan satuan ml/m^2 , sehingga toksin Bti dihitung berdasarkan jumlah penyebarannya di permukaan air. Setelah itu dimasukkan 4 x 25 ekor larva *Cx. quinquefasciatus* instar III dan dibiarkan selama 24 jam lalu dihitung angka kematiannya. Analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah *probability unit (probit analysis)*.

3.5 Identifikasi Variabel

Variabel bebas adalah konsentrasi Bti dan variabel tergantung adalah angka kematian larva.

3.6 Pengumpulan Data dan Manajemen Penelitian

Pada penelitian ini, jumlah larva yang mati dihitung secara manual setelah dibiarkan selama 24 jam. Kemudian, hasil pengamatan dimasukkan ke dalam master table yang dibagi berdasarkan variabel-variabel yang akan dianalisis. Data-data yang didapatkan tadi kemudian dianalisis menggunakan *probability unit (probit analysis)* dalam program statistik SPSS 17,0. Hasil probit tadi akan menunjukkan estimasi konsentrasi letal Bti yang digunakan. Selanjutnya, peneliti menarik kesimpulan dari hasil analisis mengenai efektifitas formula yang diuji.

3.7 Analisis Data

Secara umum analisis yang dilakukan terhadap data yang diperoleh

dilakukan secara deskriptif naratif kecuali pada penentuan LC₅₀. Penentuan LC₅₀ dilakukan dengan analisis probit yaitu metode perhitungan untuk mendapatkan nilai toksisitas suatu jenis racun terhadap hewan uji. Analisis probit dilakukan dengan program regresi linear pada SPSS 17,0. Analisis dengan program ini dilakukan karena menunjukkan hubungan variabel bebas (X) dan variabel terikat (Y).

$$Y = A + BX$$

Keterangan: Y = jumlah hewan uji yang mati; X = Variasi konsentrasi hewan uji; A = Bilangan konstan; B = Koefisien prediktor.

3.8 Batasan Operasional

1. Bti adalah spora *Bacillus thuringiensis israelensis* yang digunakan sebagai larvasida.
2. LC₅₀ adalah konsentrasi toksin yang dibutuhkan untuk membunuh 50% dari seluruh hama target pada wilayah tertentu.
3. LC₉₅ adalah konsentrasi toksin yang dibutuhkan untuk membunuh 95% dari seluruh hama target pada wilayah tertentu.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Pada uji laboratorium yang telah dilakukan, Bti dengan berbagai konsentrasi yang diujikan pada 100 ekor larva nyamuk *Cx.quinquefasciatus* menghasilkan data seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.1. Semakin tinggi konsentrasi Bti yang diujikan maka persentase larva nyamuk yang mati juga semakin besar.

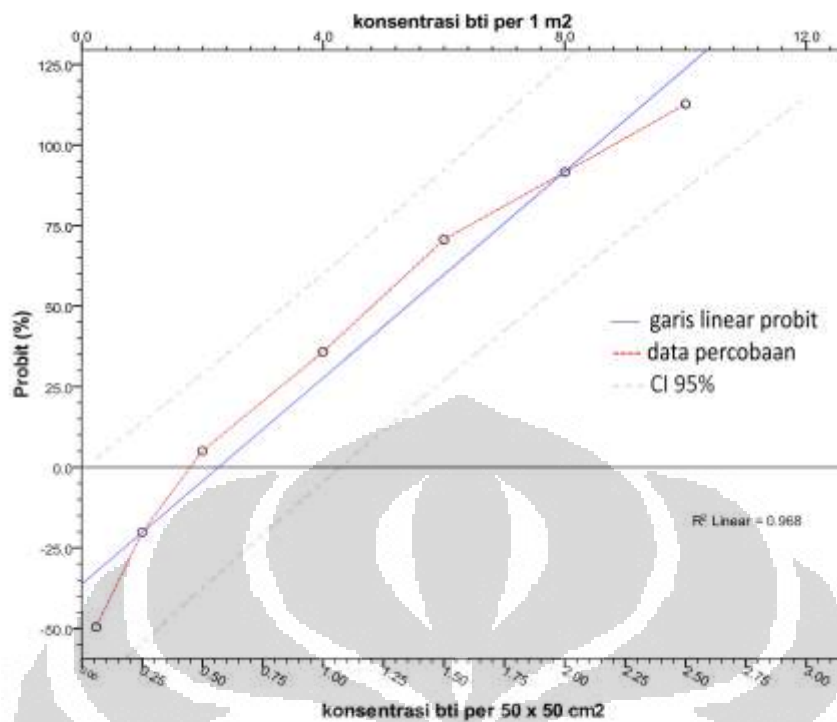
Tabel 4.1 Angka Kematian Larva *Cx.quinquefasciatus* pada Berbagai Konsentrasi Bti

Konsentrasi Bti (ml/m ²)	Jumlah Larva Hidup	Jumlah Larva Mati
	(n)	(n)
0,06	69	31
0,25	58	42
0,50	48	52
1,00	36	64
1,50	24	76
2,00	18	82
2,50	13	87
3,00	0	100

Tabel 4.2. Hasil Analisis Probit Bti pada Larva *Cx.quinquefasciatus*

LC	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
(%)		(ml/m ²)	
50	0,575	0,288	0,801
95	2,839	2,431	3,482
96	2,984	2,552	3,673
97	3,163	2,699	3,908
98	3,401	2,893	4,220
99	3,777	3,199	4,715

LC₅₀ dan LC₉₅ untuk *Cx.quinquefasciatus* adalah 0,575 (0,288-0,801) ml/m² dan 2,839 (2,431-3,482) ml/m² dengan *slope* ± (SE) 12.588 ± (0.06). LC₉₅ tersebut menunjukkan bahwa 2,839 ml Bti dapat membunuh 95% dari 100 larva di *container* dengan luas permukaan 0,25 m². Karena penelitian ini dilakukan di laboratorium, untuk penerapan di lapangan digunakan konsentrasi maksimal yang mampu membunuh larva tersebut karena di lapangan efektivitas akan berkurang 20%. Jadi, untuk membunuh 95% larva *Cx.quinquefasciatus* dibutuhkan konsentrasi maksimal yaitu 3,482 ml/m². Sediaan Bti yang diproduksi oleh pabrik adalah 2, 3, 4, dan 5 ml/m², oleh karena itu konsentrasi Bti untuk di lapangan adalah 4 ml/m².



Gambar 4.1 Grafik transformasi probit Bti

Pada gambar 4.1 terlihat bahwa koefisien determinasi (R^2) selama pengamatan 24 jam sebesar 0,968, artinya kontribusi konsentrasi Bti dalam membunuh larva *Cx. quinquefasciatus* adalah sebesar 96,8 %, dan kontribusi faktor lainnya sebesar 3,2%.

BAB V

DISKUSI

Toksik Bti bersifat mengendap ke dasar serta melekat ke dinding *container*. Bti terdapat dalam formulasi cair, granul, tablet dan pellet. Pada penelitian ini formulasi yang digunakan adalah bentuk cair yang akan segera larut dalam air. Pada penelitian ini, konsentrasi Bti cair yang digunakan terdiri atas 8 konsentrasi yaitu 0,06 ml, 0,25 ml, 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml, 2,5 ml dan 3,00 ml. Kematian terendah didapat pada konsentrasi 0,06 ml lalu kematian meningkat secara linear sesuai peningkatan konsentrasi. Hal itu memperlihatkan bahwa terdapat hubungan linear antara konsentrasi Bti dengan daya bunuhnya terhadap larva *Cx.quinquefasciatus* sehingga data ini dapat dianalisis menggunakan analisis probit.

Slope pada gambar 4.1 adalah 12.588 yang menggambarkan kecepatan perubahan konsentrasi Bti yang dibutuhkan dalam membunuh *Cx.quinquefasciatus*. Hasil positif pada *slope* menggambarkan terdapat korelasi positif dan sebab akibat antara perubahan konsentrasi Bti dan kematian larva.¹⁵ Hal ini juga terlihat pada penelitian Zulhasril et al¹⁶ yang melaporkan bahwa *slope* Bt terhadap *Cx.quinquefasciatus* dan *Ae.aegypti* adalah 4,45 dan 4,44. Berbeda dengan *slope Bacillus sphaericus* (Bs) terhadap *Cx.quinquefasciatus* hanya sebesar 1,66 pada penelitian Poopathi et al.¹⁷

Pada penelitian ini dilaporkan LC_{50} dan LC_{95} Bti terhadap *Cx. quinquefasciatus* adalah 0,575 ml/m² dan 2,839 ml/m², dengan koefisiensi determinan (R^2) 96,8%. Hal ini membuktikan bahwa terdapat 3,2 % faktor lain yang berperan terhadap efikasi Bti. Efikasi Bti juga ditentukan oleh formulasi Bti, spesies nyamuk, dan suhu air.¹⁸ Bti juga bersifat ramah lingkungan, karena tidak toksik bagi organisme nontarget dan tidak mengubah keseimbangan lingkungan.

Efisiensi daya bunuh Bti terhadap larva juga bergantung pada tipe formulasi Bti dan spesies larva tersebut. Mittal¹³ mengungkapkan, formulasi berbentuk cairan memiliki efek yang lebih baik terhadap *Cx.quinquefasciatus*, sementara formulasi Bti dalam bentuk serbuk lebih aktif terhadap spesies *Anopheles*, dan formulasi granular dan tablet lebih efektif terhadap *Ae. aegypti*.

Sifat *Ae. aegypti* yang lebih rentan terhadap tablet dan formulasi granular ini salah satunya disebabkan oleh sifat larva *Ae. aegypti* yaitu *bottom feeder*. Sebaliknya, suspensi cair memungkinkan toksin larut pada keseluruhan air secara merata sehingga memudahkan *Cx. quinquefasciatus* memakan toksin Bti tersebut. Penggunaan formulasi Bti dalam bentuk cairan pada penelitian ini merupakan salah satu penyebab dibutuhkan konsentrasi yang kecil untuk LC₅₀. Hal ini sesuai dengan penelitian Lopes et al¹⁶ yang melaporkan bahwa LC₅₀ Bti terhadap *Cx. quinquefasciatus* adalah 0.271±0.039 ppm sedangkan LC₅₀ Bti terhadap *Ae. aegypti* lebih tinggi yaitu 0.332 ± 0.042 ppm.

Efikasi Bti juga dipengaruhi oleh perubahan suhu air. Suhu air mempengaruhi aktivitas larva; pada suhu di bawah 19⁰C larva akan inaktif, kebiasaan makan menurun, sehingga kurang mengonsumsi Bti. Akibatnya, efektivitas Bti pada suhu di bawah 19⁰C menurun drastis dan meningkat pada suhu di atas 33⁰C. Lacey et al¹⁹ menemukan hubungan langsung antara angka kematian larva stadium awal instar IV *Cx. quinquefasciatus* terhadap *Bacillus thuringiensis* (H-10) pada suhu 17.7⁰C, 24.3⁰C, dan 31⁰C. Zequi et al²⁰ menemukan perbandingan LC95/LC50 Bti dalam membunuh larva *Culex saltanensis* dari suhu 25,7⁰ C ke 12⁰ C menurun dari 1,68 kali menjadi 1,5 kali.

Konsentrasi yang disarankan peneliti untuk aplikasi lapangan adalah 4 ml/m², dan masih aman apabila dikonsumsi organisme nontarget, termasuk manusia. Hingga saat ini Bti telah diproduksi hingga konsentrasi 5 ml/m². Bti juga ramah lingkungan karena tidak mengubah pH dan kelembaban air. Brown et al²¹ membuktikan bahwa Bti, sebagai produk biologis, dapat digunakan dan efisien untuk mengontrol nyamuk di laboratorium dan kondisi lapangan, serta tidak mempengaruhi hidup *Leander tenuicornis*, sebagai organisme nontarget. Brown et al²² juga menyatakan Bti tidak mempengaruhi kualitas air, tidak seperti organofosfat yang mempengaruhi pH dan kekeruhan air.²¹

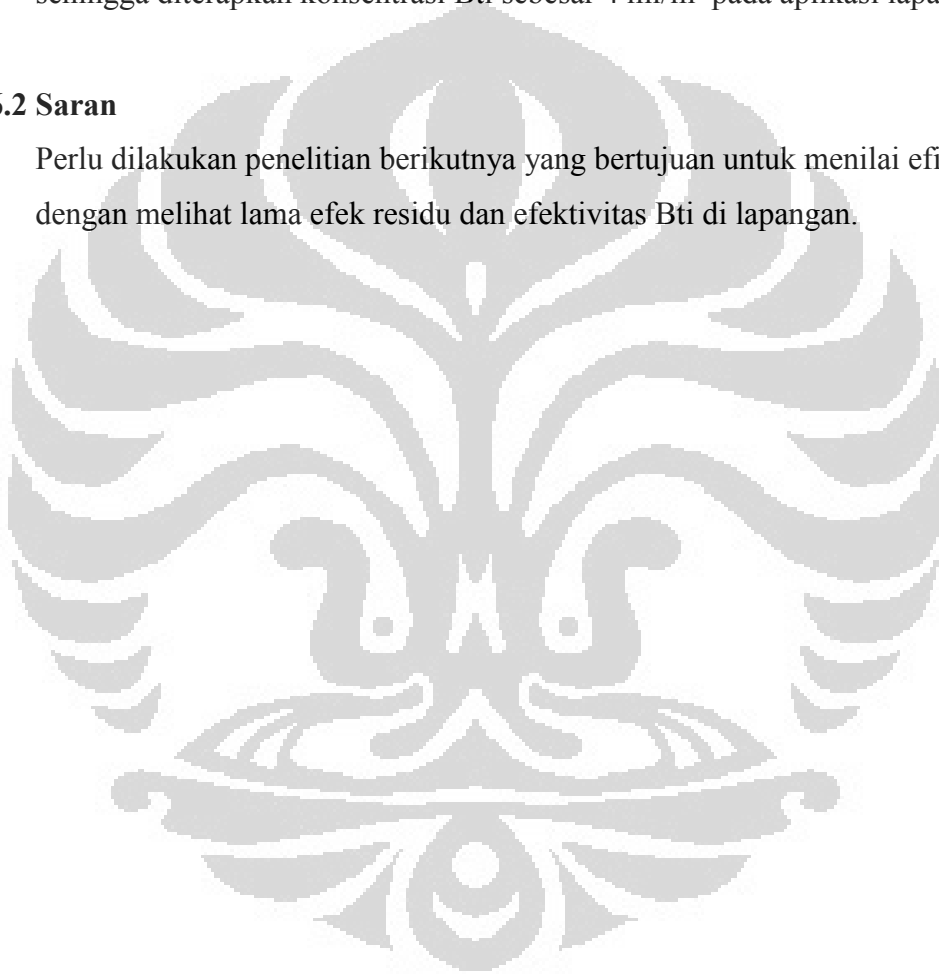
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Nilai estimasi LC_{50} Bti terhadap larva *Cx.quinquefasciatus* adalah 0,575 ml/m² dan LC_{95} adalah 2,839 ml/m².
2. LC_{95} Bti yang digunakan di lapangan adalah batas atas yaitu 3,482 ml/m² sehingga diterapkan konsentrasi Bti sebesar 4 ml/m² pada aplikasi lapangan.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian berikutnya yang bertujuan untuk menilai efikasi Bti dengan melihat lama efek residu dan efektivitas Bti di lapangan.



DAFTAR PUSTAKA

1. Dorland WAN. Kamus kedokteran Dorland. 29th edition. Jakarta: EGC; 2002.
2. Nutman TB. Lymphatic filariasis. London: Imperial College Press; 2000.
3. Despommier DD, Gwads RW, Hotez PJ, Knirsch CA. Parasitic diseases. 4th edition. New York: Apple Trees Productions; 2000.
4. McPhee SJ, Papadakis MA (editor). Current: medical diagnosis & treatment 46th edition. USA: McGraw-Hill; 2007.
5. Weil GJ, Lammie PJ, Weiss N. The ICT filariasis test: a rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. *Parasitol Today*. 1997;13:401-4.
6. More SJ, Copeman DB. A highly specific and sensitive monoclonal antibody based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. *Trop Med Parasitol*. 1990;41:403-6.
7. Williams SA. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* in blood samples from French Polynesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996;90:387-9.
8. Rahmah N, Supali T, Shenoy BK, Lim BH, Kumaraswami V, Anuar AK. Specificity and sensitivity of a rapid dipstick test (*Brugia rapid*) in the detection of *Brugia malayi* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95(6):601-4.
9. World Health Organization. Preparing and implementing a national plan to eliminate lymphatic filariasis. Geneva: WHO; 2000.
10. Hoerauf A, Adjei O, Buttner DW. Antibiotics for the treatment of onchocerciasis and other filarial infections. *Curr Opin Investif Drugs*. 2002;3(4):533-7.
11. Pei G, Oliveira CM, Yuan Z, Nielsen-LeRoux C, Silva-Filha MH, Yan J, Regis L. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Cx.quinquefasciatus*. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:3003-9.

12. Goldberg LJ, Margalit J. Bacterial spore demonstrate rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculate*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *Culex unititatus*. Mosq News 1977;37: 355–8.
13. Mittal PK. Biolarvicides in vektor control: challenges and prospects. J Vect Borne Dis. 2003;40: 20–32.
14. Glare TR, O’Callaghan M. Report for the ministry of health: environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Lincoln: Biocontrol & Biodiversity, Grasslands Division, AgResearch: 1998.
15. Ledwith J. Positive slope. The New York Times Company. 2011. Diunduh dari http://math.about.com/od/algebra1help/a/Positive_slope.htm pada 11 April 2011.
16. Zulhasril, Sungkar S. Evaluation of isolate of *Bacillus thuringiensis* against five species of mosquitoes. Maj Kedokt Indon. 1999;49(6):203-7.
17. Poopathi P, Tyagi BK. Mosquitocidal toxins of spore forming bacteria: recent advancement. African Journal of Biotechnology. 2004; 3 (12), hal 643-650.
18. Lopes J, Arantes OMN, Cenci MA. Evaluation of a new formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Braz J Biol. 2010;70(4):1109-13.
19. Lacey LA, Undeen AH. Microbial control of black flies and mosquitoes. Ann Rev Entomol. 1986;31:265-96.
20. Zequi JAC, Lopes J. Biological control of *Culex saltanensis* Dyar, (Diptera, Culicidae) through *Bacillus thuringiensis israelensis* in laboratory and field condition. Revista Brasileira de Zoologia. 2007;24(1):164-8.
21. Gill SS, Cowles EA, Pictrantonio PV. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Ann Rev Entomol. 1992;37:615–36.
22. Lacey LA, Oldacre SL. The effect of temperature, larval age, and species of mosquitoes activity on isolate of *Bacillus thuringiensis var. darmstadiensis* toxic for mosquito larvae. Mosquito News. 1983;43(2):176-80.

23. Brown MD, Darran T, Paul M, Jack GG, Brian HK. Laboratory and field evaluation of the efficacy of four insecticides for *Aedes vigilax* and toxicity to the nontarget shrimp (*Leander tenuicorcis*). *Journal of Economic Entomology*. 1999;92(5):1045-51.

