

PENGARUH pH LARUTAN BUFFER DAN SUHU PENYIMPANAN TERHADAP AKTIVITAS LARVASIDA *Bacillus sphaericus* 2362

Umi Widyastuti¹, Blondine ChP¹ dan R. A. Yuniarti¹

¹ Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP), Salatiga.

THE EFFECT OF pH AND STORAGE TEMPERATURE ON LARVICIDAL ACTIVITY OF *Bacillus sphaericus* 2362

Abstract. A study was conducted to determine 1). The effect of increasing pH buffer (4-10) and storage temperature (4°C) on larvicidal activity of *B. sphaericus* 2362, 2). The effect of increasing pH buffer (4-10) and storage temperature (25°C) on larvicidal activity of *B. sphaericus* 2362, 3) The interaction effect between increasing pH buffer and storage temperature on persistence of larvicidal activity of *B. sphaericus* 2362. This study was conducted from June-December 2005 and was done in two steps i.e. mosquito and larvae collecting (field evaluation) and mosquito and larvae rearing completed with bioassay (laboratory evaluation). *B. sphaericus* 2362 was stored in acid, neutral and alkaline buffers ranging from pH 4 to 10 at 4°C and 25°C, and was then tested on *Anopheles aconitus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Ae aegypti* early fourth instar larvae. The test was conducted according to WHO standard guidelines periodically biweekly until 224 days. Larvicidal activity was calculated based on larval mortality after 48 hours of exposure. The results showed that bioassay test of *B. sphaericus* 2362 for 48 hours exposure within the concentration of 0.0098 ppm, 0.0035 ppm and 1.3232 ppm were respectively killed 95% of *An. aconitus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Ae aegypti*. From each concentration showed that larvicidal activity of *B. sphaericus* 2362 which was stored in neutral buffer was proven to be longer compared to those which formerly stored in acid and alkaline on three species tested. Larvicidal activity of *B. sphaericus* (of more than 70%) stored at 4°C in neutral buffer (pH 7) was maintained longer than at 25°C on *An. aconitus*, respectively 112 days compared to 98 days and it is remained the same 224 days for *Cx. quinquefasciatus* and 70 days for *Ae. aegypti*. The best storage regime for maintenance of larvicidal activity of *B. sphaericus* on *An. aconitus*, *Cx. quinquefasciatus* and for *Ae. aegypti* larvae was 4°C in neutral buffer.

Keywords: *B. sphaericus*, pathogenicity, pH and storage temperature

PENDAHULUAN

Malaria, demam berdarah dan filariasis masih merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia. Berbagai upaya telah dilakukan untuk menanggulangi masalah penyakit tular vektor tersebut, baik secara fisik, kimia, maupun pengendalian hayati. Sampai sekarang pengendalian vektor masih merupakan salah satu

sasaran program, baik terhadap stadium dewasa maupun jentik.

Berbagai macam insektisida telah digunakan dalam upaya pengendalian vektor, terutama IRS (*Indoor Residual Spraying*) karena efektif, aplikasinya relatif mudah, dapat mengatasi kejadian luar biasa (KLB) dan hasilnya diketahui dengan cepat⁽¹⁾. Beberapa insektisida yang

digunakan untuk pengendalian vektor malaria di Indonesia antara lain: a). DDT (Organoklorin), digunakan sejak tahun 1950-1992, b). Fenitrothion (Organofosfat), digunakan di Jawa dan Sumatera, c). Fenthion (Organofosfat), digunakan di Kalimantan, d). Bendiocarb (Carbamat), digunakan di Jawa dan Riau, e). Lambda Cyhalothrin (Pyrethroid), didistribusikan di Sulawesi, Maluku, Irian Jaya, Nusa Tenggara Barat dan Nusa Tenggara Timur, f). Permethrin (Pyrethroid) dan g). Larvasida mikrobial *Bacillus thuringiensis israelensis* yang didistribusikan secara luas di daerah endemis malaria⁽²⁾.

Disamping harga insektisida relatif mahal, penggunaannya yang berulang-ulang dapat menimbulkan resistensi vektor, matinya hewan lain yang bukan sasaran dan pencemaran lingkungan. Oleh karena itu dicari cara lain yang lebih berwawasan lingkungan untuk menanggulangi vektor penyakit, antara lain dengan pengendalian hayati. Pengendalian hayati dengan menggunakan predator, parasit atau patogen jentik nyamuk merupakan salah satu komponen yang tergabung dalam pengendalian vektor terpadu⁽³⁾. Salah satu cara yang mulai banyak diteliti, karena potensial dan dipandang mempunyai prospek yang baik adalah penggunaan bakteri patogen jentik nyamuk, antara lain *Bacillus sphaericus*⁽⁴⁾.

Bacillus sphaericus merupakan bakteri aerob yang mampu memproduksi spora dengan toksin yang kuat.⁽⁵⁾ Beberapa strain *B. sphaericus* yang sudah diisolasi dilaporkan mempunyai aktivitas larvasida terhadap jentik nyamuk *Culex spp* dan *Anopheles spp* dengan patogenisitas tinggi pada kondisi laboratorium dan lapangan.^(6, 7, 8, 9)

Bacillus sphaericus memproduksi toksin yang merupakan racun perut dengan sasaran utamanya adalah epithelium usus

bagi jentik nyamuk yang memakannya. Setelah toksin tertelan oleh jentik nyamuk dan teraktivasi oleh kondisi usus (*midgut*), epithelium akan membengkak dan mengalami paralisis diikuti oleh kematian jentik nyamuk⁽¹⁰⁾. Efikasi *B. sphaericus* bergantung pada keberadaan toksin di zona makan jentik (*larval feeding zone*)⁽¹¹⁾ dan perilaku makan spesies nyamuk sasaran⁽¹²⁾. *Bacillus sphaericus* tidak berbahaya terhadap organisme bukan sasaran, invertebrata atau vertebrata yang lain, aman terhadap manusia, dan mempunyai kemampuan tinggal/berada dalam habitat air terpolusi^(13, 14). Mikroorganisme ini dapat dijumpai di tanah dan lingkungan akuatik⁽¹⁵⁾ dan terbukti dapat berdaur ulang oleh karena dapat meningkat secara saprofitik pada habitat air terpolusi yang kaya akan materi organik, maka dipandang memiliki aktivitas residu untuk pengendalian vektor dalam jangka waktu lama⁽⁴⁾. Beberapa negara seperti India, Thailand, Ghana dan Phillipina telah mengembangkan kemampuan teknis untuk memproduksi *B. sphaericus*⁽¹⁰⁾. Di Amerika Serikat, *B. sphaericus* telah diproduksi secara komersial dengan nama dagang yang bermacam-macam. VectoLex WDG yang diproduksi oleh Abbott Laboratories, USA, merupakan salah satu contoh insektisida biologis selektif.⁽¹⁶⁾

Aktivitas larvasida *B. thuringiensis* (baik isolat maupun produk komersialnya) akan mengalami penurunan setelah penyimpanan dalam jangka waktu tertentu. Myers & Yousten, (1980) menyatakan bahwa aktivitas larvasida akan rusak pada suhu tinggi atau dengan pemberian 0,01 N NaOH⁽¹⁷⁾. Dilaporkan pula bahwa *B. sphaericus* 1593 dan *B. thuringiensis* yang disimpan selama 2 hari pada larutan non buffer dengan kisaran pH 4,3 – 10,5; aktivitas larvasida toksin *B. sphaericus* akan mengalami deaktivasi total di atas pH 10 (kematian jentik *Culex tarsalis* instar III

sebesar 0% pada dosis 1 ppm dan 3% pada dosis 0,5 ppm) tetapi tidak demikian pada pH rendah^(8, 17). Sedangkan aktivitas larvasida *B. thuringiensis* terhadap kematian jentik *Cx. quinquefasciatus* instar II berkisar antara 94 - 100% pada dosis 0,5 ppm dan 72-90% pada dosis 0,1 ppm menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna⁽⁸⁾.

Studi akhir-akhir ini dikonsentrasikan pada *B. sphaericus* strain 2362 karena mempunyai efek residu dan menunjukkan aktivitas larvasida melebihi strain 1593⁽¹⁸⁾, sehingga isolatnya perlu dipelihara dan dilestarikan di laboratorium agar aktivitas larvasidanya tetap terjaga. Hasil penelitian menggunakan *B. sphaericus* menunjukkan prospek yang baik dalam mengendalikan jentik nyamuk, antara lain terhadap jentik *An. barbirostris* di Kecamatan Wulanggitang, Kabupaten Flores Timur dan *An. hyrcanus* group di Kecamatan Teluk Dalam, Kabupaten Nias, di mana efikasi *B. sphaericus* bertahan selama lebih kurang 4 minggu dengan persen penurunan lebih dari 70 %^(19, 20).

Berdasarkan informasi tersebut di atas, *B. sphaericus* 2362 akan diteliti aktivitas larvasidanya secara periodik di laboratorium terhadap jentik nyamuk vektor antara lain *An. aconitus*, *Aedes aegypti* dan *Culex quinquefasciatus* setelah lebih dahulu disimpan pada pH larutan buffer 4-10 dan suhu 4°C dan 25°C.

Tujuan umum penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pH larutan buffer dan suhu penyimpanan terhadap aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 di laboratorium. Sedangkan tujuan khusus yang hendak dicapai adalah:

1. Mengetahui pengaruh kenaikan pH larutan buffer (4-10) dan suhu penyim-

panan (4°C) terhadap aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362.

2. Mengetahui pengaruh kenaikan pH larutan buffer (4-10) dan suhu penyimpanan (25°C) terhadap aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362.
3. Mengetahui efek interaksi antara pH larutan buffer dan suhu penyimpanan terhadap persistensi aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362.

BAHAN DAN CARA

Bahan penelitian

Jasad hayati yang diteliti adalah *B. sphaericus* 2362 sebagai patogen jentik nyamuk. Jentik nyamuk vektor yang digunakan dalam penelitian ini adalah *An. aconitus*, *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. aegypti* instar III akhir. Sebagai bahan penyimpan *B. sphaericus* 2362 digunakan larutan buffer citrat (pH 4 dan 5), buffer fosfat (pH 6, 7, dan 8) dan buffer karbonat (pH 9 dan 10) yang dibuat dalam 2 seri, satu seri disimpan pada suhu 4°C dan seri yang lain pada suhu kamar (25°C).

Cara

Penelitian pengujian *B. sphaericus* dilaksanakan di laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) Salatiga dan pengambilan sampel nyamuk dan jentik dilakukan di Kabupaten Semarang, mulai bulan Juni-Desember 2005. Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium, merupakan penelitian eksperimental murni, di mana variabel non eksperimental dapat dikendalikan dan terkontrol, menggunakan rancangan rangkaian waktu dengan kelompok pembandingan (*control time series design*), sebagai berikut:

No.	Kelompok perlakuan	Aktivitas larvasida <i>B. sphaericus</i>										
1.	<i>B. sphaericus</i> pada pH larutan buffer (4-10) dan suhu 4°C	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2.	<i>B. sphaericus</i> pada pH larutan buffer (4-10) dan suhu 25°C	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3.	Kontrol (-)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Keterangan:

1-10, dst = pengamatan terhadap kematian jentik nyamuk

(-) = kontrol (tanpa bakteri)

Interpretasi efek perlakuan diketahui dengan melihat perbedaan fluktuasi hasil pengamatan kematian jentik nyamuk antar kelompok.

Populasi penelitian adalah jentik *An. aconitus*, *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. aegypti*, yang digunakan untuk mengetahui aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362. Jentik-jentik nyamuk tersebut merupakan hasil kolonisasi laboratorium yang berasal dari koleksi nyamuk dan jentik di lapangan.

a. Pembuatan koloni nyamuk di laboratorium:

Penangkapan nyamuk dilakukan berdasarkan pedoman WHO⁽³⁾. Penangkapan dilakukan pada malam hari (18.00 – 24.00) terhadap nyamuk yang istirahat di dalam dan luar rumah, serta pagi hari (06.00 – 08.00) terhadap nyamuk yang istirahat di dalam rumah dan di habitat aslinya di luar rumah seperti lubang-lubang di tanah/tebing sepanjang saluran irigasi dan vegetasi, lebih diutamakan pencarian nyamuk dengan kondisi perut *gravid* dan *half gravid*. Nyamuk yang berhasil ditangkap diidentifikasi menurut Stojanovich et al, (1966), O'Connor et al, (1979), dan Reid (1968)^(21, 22, 23). Nyamuk yang tertangkap dimasukkan ke dalam *cup* (gelas plastik), diberi larutan gula 10% dan kelembaban yang cukup, dilengkapi dengan pelabelan yang baik yang meliputi

antara lain kode lokasi, tanggal koleksi nama spesies, nama kolektor, dll yang dikerjakan sesuai dengan metode WHO⁽³⁾. Nyamuk dibawa ke laboratorium dan dimasukkan ke dalam kandang yang sudah disiapkan untuk masing-masing spesies. Ke dalam kandang juga disiapkan tempat perteluran berupa mangkok enamel yang di dalamnya diletakkan kertas saring untuk memperangkap telur. Telur dipindahkan ke baki plastik berisi air untuk penetasannya dan terus dipelihara hingga menjadi jentik yang akan dipakai untuk pengujian dan sebagian lagi tetap dijadikan nyamuk dewasa agar koloni tetap dapat dipertahankan.

Koleksi jentik nyamuk. dilakukan di berbagai habitat yang ada di daerah penelitian yang digunakan sebagai tempat perindukan nyamuk seperti kolam, lubang pohon, ketiak daun, sumber air, dll. dengan menggunakan ciduk volume 250 ml dan pipet. Hasil koleksi dipelihara hingga menjadi nyamuk dewasa dan penanganan selanjutnya sama seperti tersebut di atas.

b. Pengujian *B. sphaericus* 2362 terhadap jentik nyamuk vektor:

Penelitian dilakukan mulai dengan meremajakan *B. sphaericus* 2362 pada media nutrisi agar dan selanjutnya pada media NYSMA miring selama 4 hari. Sebanyak 5 ml suspensi isolat *B. sphaericus* 2362 tersebut ditambahkan ke dalam labu

takar 100 ml yang sudah diisi dengan 95 ml 0,1 M larutan buffer citrat (pH 4 dan 5), 0,07 M buffer fosfat (pH 6, 7, 8) dan 0,1 M buffer karbonat (pH 9 dan 10) sehingga terbentuk larutan stok dengan konsentrasi 100 ppm. Tujuh larutan pH buffer dan bakteri tersebut dibuat sebanyak 2 seri. Satu seri disimpan pada suhu kamar (25°C) dan seri yang lain disimpan pada suhu 4°C (*refrigerator*).

Uji hayati *B. sphaericus* 2362 di laboratorium dilakukan menurut prosedur WHO ⁽¹⁰⁾, dimaksudkan untuk mendapatkan konsentrasi *B. sphaericus* 2362 efektif (LC50 dan LC95) dalam membunuh jentik *An. aconitus*, *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. aegypti*. Pengujian diawali dengan mengencerkan larutan stok (100 ppm) sehingga diperoleh konsentrasi 10 ppm, selanjutnya diambil sebanyak 30 µl, 50 µl, 70 µl, 100 µl, 500 µl, 700 µl dan 1000 µl menggunakan *Gilson micropipette E 20680 A* dan dimasukkan ke dalam mangkok plastik yang berisi 15 ekor jentik masing-masing spesies tersebut di atas instar III akhir, dalam volume total akuades 100 ml, untuk mendapatkan konsentrasi final yang dibutuhkan yaitu 0,003 ppm, 0,005 ppm, 0,007 ppm, 0,01 ppm, 0,03 ppm, 0,05 ppm, 0,07 ppm dan 0,1 ppm, sehingga nantinya dengan analisa probit ⁽²⁴⁾ diperoleh konsentrasi tertentu dari rata-rata nilai LC95. Nilai LC 95 tersebut selanjutnya digunakan dalam pengujian untuk mengetahui aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362. Mangkok plastik diisi dengan larutan buffer masing-masing pH dan suhu tertentu dalam volume total 100 ml, ke dalamnya dimasukkan 15 ekor jentik nyamuk vektor yang akan diuji ⁽¹⁰⁾. Uji hayati dilakukan setiap 2 minggu sekali selama beberapa bulan, sehingga dapat diperoleh gambaran sampai berapa lama larvasida bakteri menunjukkan aktivitasnya, yang ditunjukkan dengan persentase kematian jentik. Kematian jentik dihitung

setelah 48 jam pengujian. Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Sebagai kontrol (tanpa bakteri), mangkok plastik hanya diisi dengan larutan buffer pada pH dan suhu yang sudah ditentukan, akuades sampai volume total 100 ml dan 15 ekor jentik nyamuk instar III akhir ⁽¹⁰⁾.

c. Analisa data:

Data penelitian yang diperoleh di-analisa regresi untuk mengetahui ada tidaknya hubungan antara kenaikan pH larutan buffer 4-10 pada suhu penyimpanan 4°C dan 25°C dengan aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362. Untuk membandingkan persen kematian jentik antar perlakuan dilakukan ANOVA dilanjutkan dengan uji Duncan.

HASIL PENELITIAN

1. Uji hayati *B. sphaericus* terhadap jentik nyamuk di laboratorium

Uji hayati *B. sphaericus* 2362 terhadap jentik *An. aconitus*, *Cx. Quinque-fasciatus* dan *Ae. aegypti* di laboratorium disajikan pada Tabel 1. Hasil uji hayati *B. sphaericus* 2362 selama 48 jam menunjukkan bahwa konsentrasi 0,0071 ppm dan 0,0256 ppm mampu membunuh jentik *An. aconitus* masing-masing sebesar 50% dan 95%. Sedangkan untuk jentik *Cx. quinquefasciatus* nilai LC50 sebesar 0,0014 ppm dan LC95 sebesar 0,0035 ppm. Pengujian *B. sphaericus* 2362 terhadap jentik *Ae. aegypti* menghasilkan nilai LC50 sebesar 0,7938 ppm dan LC95 sebesar 1,3232 ppm.

2. Pengujian aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 di laboratorium

Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan dalam larutan buffer pH 4-10 dan suhu 4°C serta 25°C terhadap jentik *An. aconitus*, *Cx. quinquefasciatus*, dan *Ae. aegypti* disajikan pada Tabel 2-7

dan Gambar 1-6 yang dipilih karena dipandang dapat mewakili pH asam (pH 4), netral (pH 7 dan 8), dan basa (pH 10).

Dari Tabel 2 dan 3 serta Gambar 1 dan 2 dapat dilihat bahwa aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan dalam larutan buffer pH netral (pH 7) mampu bertahan lebih dari 70% selama 112 hari (71,11%) pada suhu 4°C terhadap jentik *An. aconitus*. Sedangkan pada suhu 25°C mampu bertahan selama 98 hari

(71,11%) pH 7. Penyimpanan dalam larutan buffer pH asam (pH 4 dan 5) aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 lebih dari 70% hanya bertahan hingga 56 hari (71,11-73,33 %) baik pada suhu 4°C maupun 25°C. Pada pH basa (pH 9 dan 10), aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 lebih dari 70% hanya bertahan hingga 42 hari (71,11-75,56 %) baik pada suhu 4°C maupun 25°C

Tabel 1. Uji hayati *B. sphaericus* terhadap jentik nyamuk di laboratorium selama 48 jam pada pH asam (4), netral (7) dan basa (10) *

Spesies	pH 4		pH 7		pH 10		Rata-rata	
	LC50 (ppm)	LC95 (ppm)	LC50 (ppm)	LC95 (ppm)	LC50 (ppm)	LC95 (ppm)	LC50 (ppm)	LC95 (ppm)
<i>An. aconitus</i>	0,0098	0,0260	0,0069	0,0044	0,0046	0,0314	0,0071	0,0206
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0,0027	0,0076	0,0005	0,0002	0,0010	0,0027	0,0014	0,0035
<i>Ae. aegypti</i>	0,8220	1,9183	0,5473	0,8805	1,0121	1,1708	0,7938	1,3232

Kondisi laboratorium:

Kelembaban relatif : 79%-90%

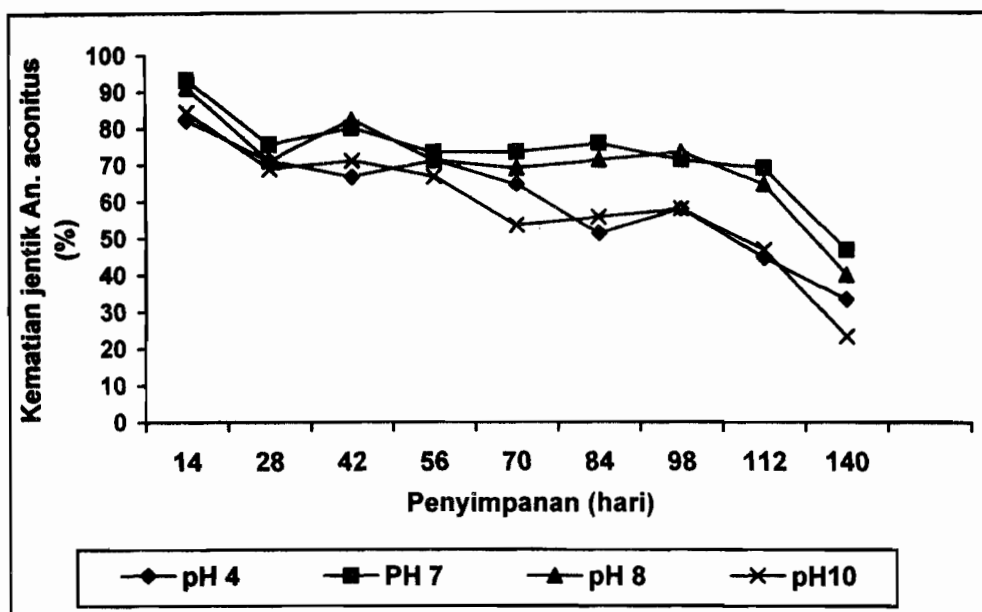
Suhu udara : 24°C -27°C

Suhu air : 22°C -25°C

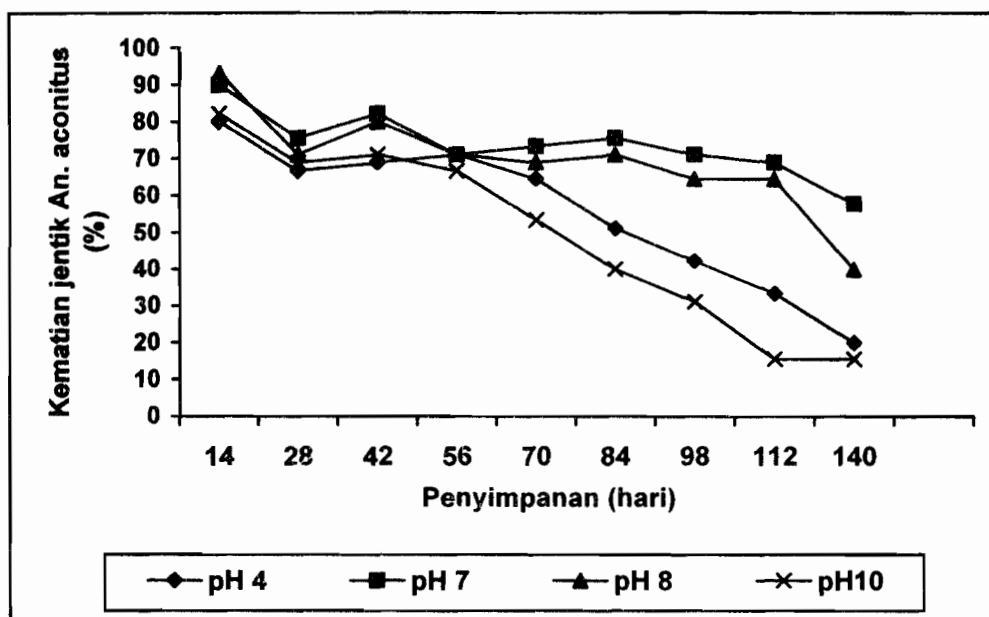
* Penyimpanan pada hari ke 0

Tabel 2. Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan pada larutan buffer pH 4-10 pada suhu 4°C terhadap jentik *An. aconitus*.

Penyimpanan (hari)	Kematian jentik <i>An. aconitus</i> (%)						
	pH larutan buffer						
	4	5	6	7	8	9	10
14	82,22	80,00	82,22	93,33 d	91,11	80,00	84,44
28	71,11	80,00	77,78	75,56	71,11	71,11	68,87
42	66,67	68,87	80,00	80,00	82,22	75,56	71,11
56	71,11	71,11	75,56	73,33	71,11	68,87	66,67
70	64,46	68,87	71,11	73,33	68,87	60,00	53,33
84	51,11	60,00	71,11	75,56	71,11	62,20	55,56
98	57,80	48,89	64,46	75,56	73,33	51,11	57,80
112	44,47	48,89	68,87	71,11	64,46	53,33	40,00
140	33,33	35,53	42,22	46,67	40,00	31,13	23,33
Kontrol	0,00	4,44	0,00	0,00	0,00	2,22	0,00



Gambar 1. Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan pada buffer pH 4, 7, 8, dan 10 pada suhu 4°C terhadap jentik *An. aconitus*



Gambar 2. Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan pada buffer pH 4, 7, 8, dan 10 pada suhu 25°C terhadap jentik *An. aconitus*.

Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan dalam larutan buffer pH netral terhadap jentik *Cx. quinque-*

fasciatus mampu bertahan lebih dari 70% hingga 224 hari (71,11- 82,22 %) masing-masing pada pH 6, 7, dan 8 pada suhu 4°C dan 71,11 – 75,56 % pada suhu 25°C.

Penyimpanan *B. sphaericus* 2362 dalam larutan buffer pH asam (pH 4 dan 5), aktivitas larvasida > 70 % bertahan selama 140 hari (71,11 – 80,00 %) pada suhu 4°C, sedangkan pada suhu 25°C selama 112 hari (71,11 – 77,78). Penyimpanan dalam larutan buffer pH basa, aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 terhadap jentik *Cx.*

quinquefasciatus > 70% bertahan hingga 140 hari (71,11 – 77,78 %) masing-masing pada pH 9 dan 10 pada suhu 4°C, sedangkan pada suhu 25°C bertahan selama 140 hari (77,78 %) dan 112 hari (80,00 %) masing-masing pada pH 9 dan 10 (Tabel 4 dan 5, Gambar 3 dan 4).

Tabel 3. Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan pada larutan buffer pH 4-10 pada suhu 25°C terhadap jentik *An. aconitus*.

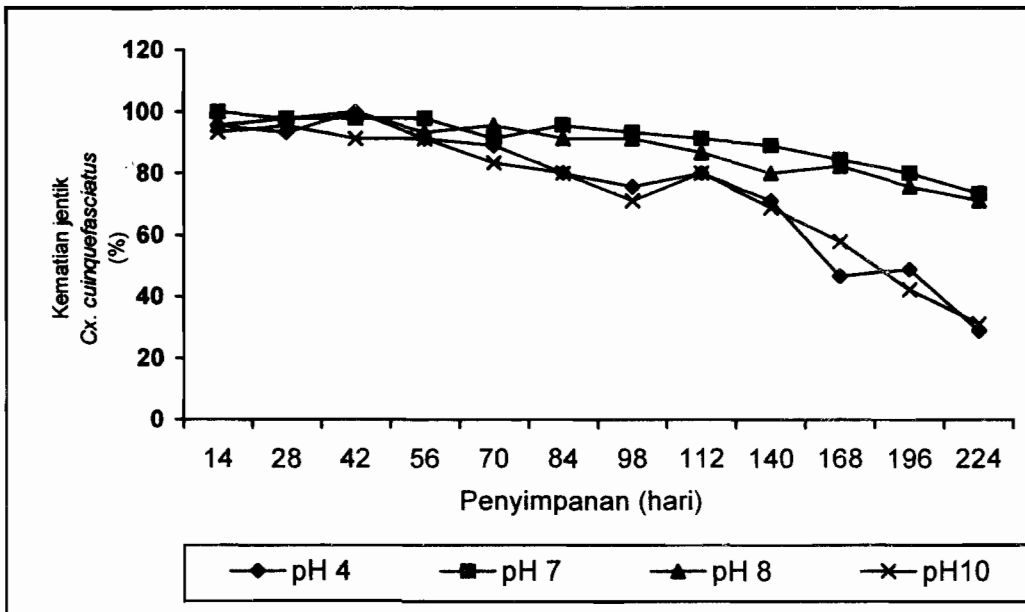
Penyimpanan (hari)	Kematian jentik <i>An. aconitus</i> (%)						
	pH larutan buffer						
	4	5	6	7	8	9	10
14	80,00	80,00	91,11	90,02	93,33	80,04	82,22
28	66,67	80,00	77,78	75,56	71,11	71,11	68,87
42	68,87	68,87	80,00	82,22	80,00	75,56	71,11
56	71,11	68,87	75,56	71,11	71,11	68,87	66,67
70	64,46	73,33	71,11	73,33	68,87	60,00	53,33
84	51,11	60,00	73,33	75,56	71,11	62,20	40,00
98	42,22	48,89	64,46	71,11	64,46	37,80	31,13
112	33,33	48,89	46,67	68,87	64,46	23,67	15,55
140	20,00	35,53	40,00	57,80	40,00	11,11	15,55
Kontrol	0,00	4,44	0,00	0,00	0,00	2,22	0,00

Tabel 4. Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan pada larutan buffer pH 4-10 pada suhu 4°C terhadap jentik *Cx. quinquefasciatus*.

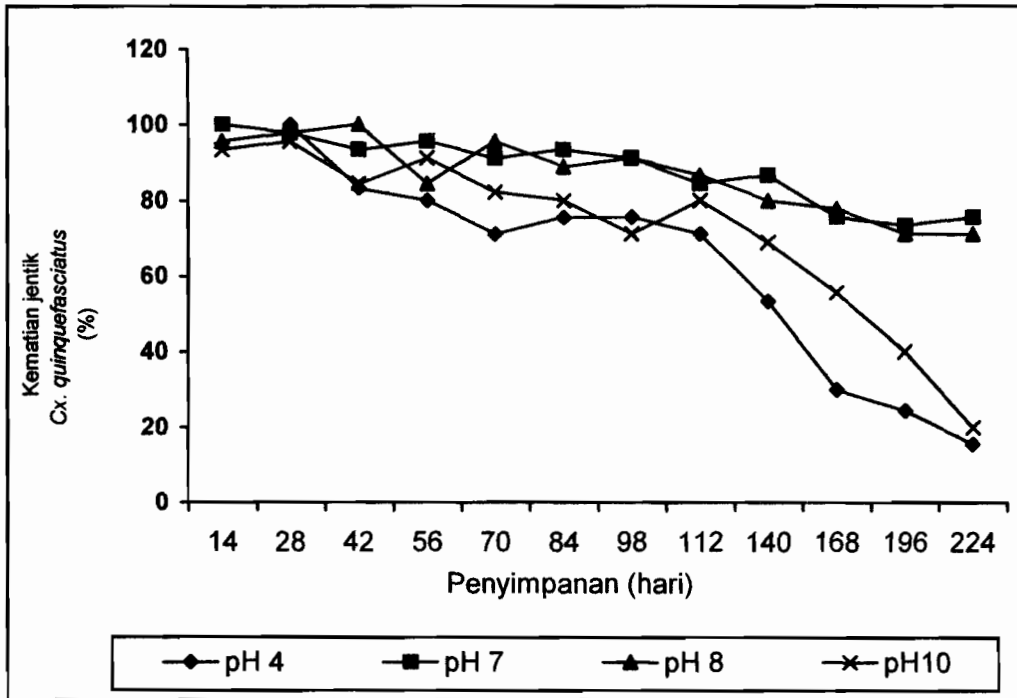
Penyimpanan (hari)	Kematian jentik <i>Cx. quinquefasciatus</i> (%)						
	pH larutan buffer						
	4	5	6	7	8	9	10
14	95,56	100,00	100,00	100,00	95,56	97,78	93,33
28	93,33	97,78	97,78	97,78	97,78	93,33	95,56
42	100,00	91,11	97,78	97,78	100,00	91,11	91,11
56	91,11	95,56	95,56	97,78	93,33	88,89	91,11
70	88,89	91,11	93,33	91,11	95,56	91,11	88,89
84	80,00	95,56	88,89	95,56	91,11	88,89	80,00
98	75,56	88,89	91,11	93,33	91,11	91,11	71,11
112	80,00	77,78	88,89	91,11	86,67	80,00	80,00
140	71,11	80,00	80,00	88,89	80,00	77,78	71,11
168	46,67	63,33	84,44	88,89	82,22	60,00	57,80
196	48,89	40,00	80,00	84,44	80,00	53,33	42,22
224	28,86	37,80	73,33	82,22	71,11	42,22	31,13
Kontrol	0,00	2,22	0,00	0,00	0,00	2,22	2,22

Tabel 5. Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan pada larutan buffer pH 4-10 pada suhu 25°C terhadap jentik *Cx. quinquefasciatus*.

Penyimpanan (hari)	Kematian jentik <i>Cx. quinquefasciatus</i> (%)						
	pH larutan buffer						
	4	5	6	7	8	9	10
14	93,33	100,00	95,56	100,00	95,56	97,78	93,33
28	100,00	93,33	100,00	97,78	97,78	88,89	95,56
42	83,33	88,89	84,44	93,33	100,00	91,11	84,44
56	80,00	88,89	91,11	95,56	84,44	93,33	91,11
70	71,11	91,11	86,67	91,11	95,56	84,44	82,22
84	75,56	80,00	88,89	93,33	88,89	88,89	80,00
98	75,56	88,89	91,11	91,11	91,11	91,11	71,11
112	71,11	77,78	88,89	84,44	86,67	80,00	80,00
140	53,33	66,67	80,00	86,67	80,00	77,78	68,87
168	30,00	60,00	75,56	75,56	77,78	53,33	55,56
196	25,56	43,33	73,33	73,33	71,11	40,00	40,00
224	15,55	35,53	71,11	75,56	71,11	22,22	20,00
Kontrol	0,00	2,22	4,44	0,00	0,00	2,22	0,00



Gambar 3. Aktivitas larvasida *B. sphaericus* yang disimpan pada buffer pH 4,7, 8, dan 10 pada suhu 4°C terhadap jentik *Cx. quinquefasciatus*.



Gambar 4. Aktivitas larvasida *B. sphaericus* yang disimpan pada buffer pH 4, 7, 8, dan 10 pada suhu 25°C terhadap jentik *Cx. quinquefasciatus*

Tabel 6. Aktivitas larvasida *B.sphaericus* 2362 yang disimpan pada larutan buffer pH 4- 10 pada suhu 4°C terhadap jentik *Ae. aegypti*.

Penyimpanan (hari)	Kematian jentik <i>Ae. aegypti</i> (%)*						
	PH larutan buffer						
	4	5	6	7	8	9	10
14	82,22	80,00	82,22	75,56	71,11	80,00	75,56
28	71,11	68,87	77,78	80,00	82,22	71,11	68,87
42	66,67	71,11	80,00	73,33	71,11	73,33	71,11
56	71,11	68,87	75,56	73,33	68,87	60,00	53,33
70	51,11	60,00	68,87	71,11	64,46	53,33	33,33
84	46,67	48,89	64,46	68,87	57,78	51,11	28,88
98	15,55	23,33	57,80	60,00	40,00	22,22	8,89
112	0,00	11,11	42,22	46,67	17,78	13,33	0,00
Kontrol	0,00	4,44	0,00	0,00	0,00	2,22	0,00

Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan dalam larutan buffer pH netral terhadap jentik *Ae. aegypti* sebesar > 70 % mampu bertahan hingga 56 hari (75,56 %), 70 hari (71,11 %), dan 42 hari (71,11 %) masing-masing pada pH 6, 7, dan 8 pada suhu 4°C. Sedangkan pada

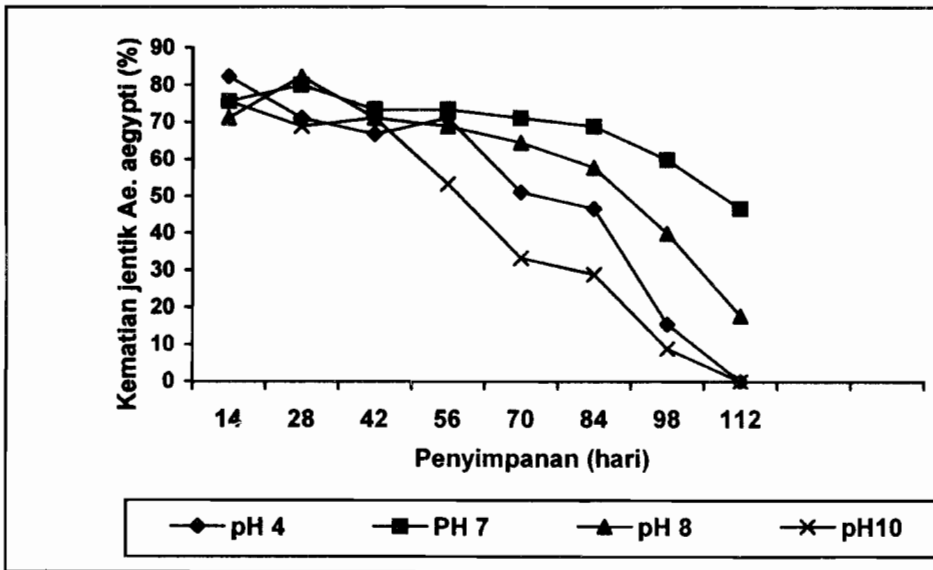
suhu 25°C bertahan lebih dari 70% selama 56 hari (56,69%) pada pH 6, 7 dan 8. Penyimpanan *B. sphaericus* 2362 dalam larutan buffer pH asam, aktivitas larvasida > 70% hanya bertahan selama 42 hari (71,11 %) dan 56 hari (71,11) masing-masing pada pH 5 dan 4 pada suhu 4°C.

Sedangkan pada 25°C mampu bertahan hanya 28 hari (71,11 %) dan 42 hari (71,11 %) masing-masing pada pH 4 dan 5. Penyimpanan dalam larutan buffer pH basa, aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362

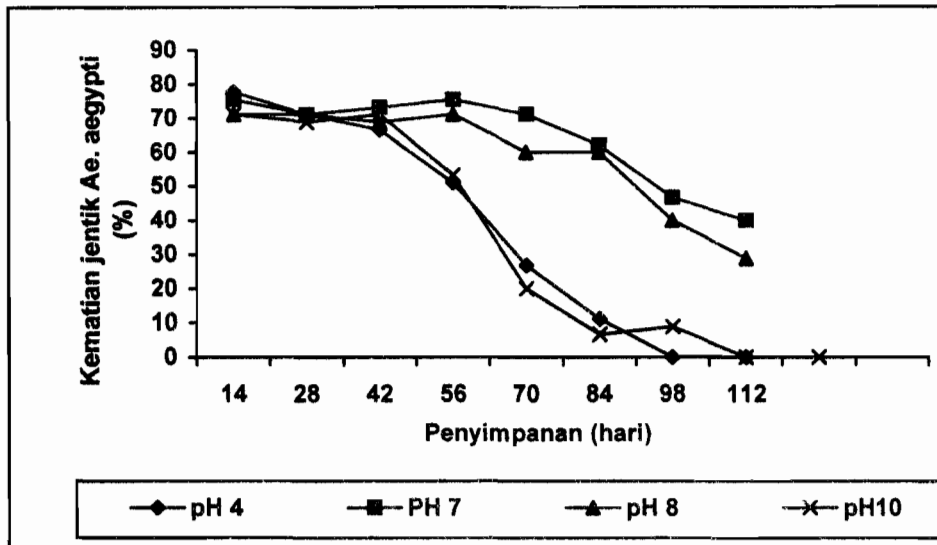
terhadap jentik *Ae. aegypti* > 70% bertahan hingga 42 hari (71,11 – 73,33 %) masing-masing pada pH 9 dan 10 pada suhu 4°C dan 25°C (Tabel 6 dan 7, Gambar 5 dan 6).

Tabel 7. Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan pada larutan buffer pH 4-10 pada suhu 25°C terhadap jentik *Ae. aegypti*.

Penyimpanan (hari)	Kematian jentik <i>Ae. aegypti</i> (%)*						
	PH larutan buffer						
	4	5	6	7	8	9	10
14	77,78	80,00	77,78	75,56	71,11	71,11	71,11
28	71,11	71,11	80,00	71,11	71,11	68,87	68,87
42	66,67	71,11	71,11	73,33	68,87	71,11	71,11
56	51,11	68,87	75,56	75,56	71,11	60,00	53,33
70	26,67	48,89	71,11	71,11	60,00	51,11	20,00
84	11,11	35,53	44,47	62,20	60,00	23,33	6,67
98	0,00	6,67	42,22	46,67	40,00	31,13	8,89
112	0,00	4,44	37,80	40,00	28,88	8,89	0,00
Kontrol	0,00	0,00	0,00	0,00	4,44	2,22	0,00



Gambar 5. Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan pada buffer pH 4, 7, 8, dan 10 pada suhu 4°C terhadap jentik *Ae. aegypti*



Gambar 6. Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan pada buffer pH 4, 7, 8, dan 10 pada suhu 25°C terhadap jentik *Ae. aegypti*

Hasil analisa regresi menunjukkan ada hubungan antara kenaikan pH 4-10 pada suhu 4°C dan 25°C dan aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 terhadap jentik *An. Aconitus*, *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. aegypti* ($P < 0,05$). Secara umum ada perbedaan bermakna ($P < 0,05$) antara aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 yang disimpan dalam larutan buffer pH asam, netral, dan basa pada suhu 4°C dan 25°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 (> 70%) yang disimpan dalam larutan buffer pH 7 (netral) pada suhu 4°C dan 25°C mampu bertahan lebih lama (98-112 hari terhadap jentik *An. aconitus*, 24 hari terhadap jentik *Cx. quinquefasciatus*, dan 70 hari terhadap jentik *Ae. aegypti*) dibandingkan dengan yang disimpan pada pH asam (56 hari terhadap jentik *An. aconitus*, 112-140 hari terhadap jentik *Cx. quinquefasciatus*, dan 42-56 hari terhadap jentik *Ae. aegypti*) dan basa (42 hari terhadap jentik *An. aconitus*, 140 hari terhadap jentik *Cx. quinquefasciatus*, dan 42 hari terhadap jentik *Ae. aegypti*). Aktivitas larvasida *B. sphaericus*

2362 yang disimpan dalam larutan buffer pH netral pada suhu 4°C tampak menunjukkan persentase kematian jentik yang lebih besar dibandingkan dengan suhu 25°C terhadap masing-masing berturut-turut jentik *An. aconitus*, *Cx. quinquefasciatus*, dan *Ae. aegypti*.

Aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 terhadap jentik *An. aconitus*, *Cx. quinquefasciatus*, dan *Ae. aegypti* dapat dipertahankan lebih lama apabila bakteri tersebut disimpan dalam larutan buffer pH netral pada suhu 4°C.

PEMBAHASAN

Aktivitas larvasida *B. sphaericus* sebagai jasad hayati sangat dipengaruhi oleh faktor ekologis, biologis, dan faktor fisik seperti halnya pH dan suhu⁽²⁵⁾. Selain itu aktivitas larvasida *B. sphaericus* terhadap jentik nyamuk dipengaruhi juga oleh instar jentik, periode pemaparan (*expose period*), kualitas air, strain bakteri, perbedaan kepekaan masing-masing spesies nyamuk yang diuji, formulasi

(khususnya tingkat pengendapan/sedimentasi), keberadaan toksin di zona makan jentik (*larval feeding zone*) dan perilaku makan dari spesies nyamuk sasaran. ^(7, 9, 26, 27)

Penyimpanan *B. sphaericus* 2362 dalam larutan buffer pH netral, khususnya pH 7, pada suhu 4°C dan 25°C, aktivitas larvasida bakteri tersebut bertahan lebih lama dibandingkan apabila disimpan dalam larutan buffer pH asam atau basa, baik terhadap jentik *An. aconitus*, *Cx. quinquefasciatus*, maupun *Ae. aegypti*. Akan tetapi penyimpanan pada suhu 4°C cenderung lebih baik dibandingkan pada suhu 25°C terhadap 3 spesies jentik nyamuk vektor yang diuji. Hasil penelitian Mian & Mulla (1983) melaporkan bahwa penyimpanan spora bakteri pada kondisi kering atau suhu rendah, aktivitas larvasidanya akan dapat dipertahankan untuk waktu lama ⁽¹⁷⁾. Penyimpanan bakteri dalam keadaan kering (dalam bentuk spora) atau suhu rendah sebenarnya juga dapat kita lakukan asal didukung oleh sarana peralatan laboratorium yang memadai, misalnya ketersediaan alat seperti *fermentor* ataupun *freeze dryer*, yang memungkinkan aktivitas larvasida dan viabilitas spora *B. sphaericus* dapat dipertahankan dalam waktu lama.

Penyimpanan dalam larutan buffer pH asam dan basa pada suhu 4°C dan 25°C selama 112 hari, menyebabkan aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362 mengalami deaktivasi total terhadap jentik *Ae. aegypti*. Hal tersebut ternyata masih lebih baik dibandingkan dengan hasil penelitian penyimpanan *B. thuringiensis* dan *B. sphaericus* 1593 dalam larutan non buffer seperti yang dilaporkan oleh Mulligan *et al*, (1980) ⁽⁸⁾.

Jentik *Cx. quinquefasciatus* tampak paling peka terhadap aktivitas larvasida *B. sphaericus* 2362, diikuti berturut-turut oleh *An. aconitus* dan *Ae. aegypti*.

Berdasarkan faktor zona makan jentik (*larval feeding zone*) dan tingkat sedimentasi/pengendapan, diduga bahwa toksin *B. sphaericus* lebih banyak berada di daerah permukaan dan di tengah yang merupakan zona makan bagi jentik *An. aconitus* dan *Cx. quinquefasciatus* daripada di dasar yang merupakan zona makan jentik *Ae. aegypti* ⁽²⁸⁾. Diantara berbagai spesies, jentik nyamuk *Cx. quinquefasciatus* paling sensitif terhadap *B. sphaericus* ⁽¹⁵⁾, meskipun jentik *Ae. aegypti* memakan toksin sama efisiennya dengan jentik nyamuk *Cx. quinquefasciatus*. ⁽¹²⁾ Kepekaan jentik *Cx. quinquefasciatus* (LC50 = 50-100 ng protein toksin/ml) lebih kurang 7 kali lipat dibandingkan dengan jentik nyamuk dari genus *Anopheles* (LC50 = 360-5000 ng protein toksin/ml) dan 800 kali lipat dibandingkan dengan jentik *Ae. aegypti* (LC50 = 42.000 ng protein toksin/ml) ⁽¹⁸⁾. Kultur sel *Cx. quinquefasciatus* sensitif terhadap toksin *B. sphaericus* tetapi tidak demikian halnya kultur sel *Aedes* spp (antara lain *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Ae. triseriatus*) dan Lepidoptera. ⁽²⁹⁾ Demikian pula pada larva *Cx. quinquefasciatus*, reseptor glycoprotein mengikat toksin di daerah lobus proksimal dari gastric caecum dan pada posterior midgut (usus tengah bagian posterior). ⁽²⁹⁾

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP), Salatiga yang telah memberi kesempatan terlaksananya penelitian ini. Para peneliti dan teknisi yang telah membantu pelaksanaan penelitian di lapangan dan laboratorium mikrobiologi B2P2VRP. Rasa terima kasih ditujukan pula kepada Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Semarang yang telah memberikan izin

terlaksananya penelitian (koleksi nyamuk) di lapangan. Pada kesempatan ini terima kasih juga ditujukan kepada segenap anggota Panitia Pembina Ilmiah Puslitbang Ekologi Kesehatan dan Badan Litbangkes yang telah mengoreksi proposal, protokol dan laporan akhir.

DAFTAR RUJUKAN

1. Rozendaal, JA. Vector Control. Methods for use by individuals and communities. WHO, 1977. 412 p.
2. Bahang, ZB, PD. Pitojo, FJ. Laihad & Barodji. Insecticide uses in public health and other sectors (1990-1996) and insecticide resistance status in mosquito vectors (1985-1996). Paper presented at intercountry workshop on insecticide resistance of mosquito vectors. Salatiga, Indonesia. 5-8 August 1977.
3. WHO. Entomological field techniques for malaria control. Part I: Learner's Guide, 1994. 78 p.
4. WHO. Biological control of vectors of disease. Sixth report of the WHO expert committee on vector biology and control, 1982.
5. Burges, HD. Microbial control of pests and plant diseases (1970-1980). Ac. Press, New York & London, 1981. 949 p.
6. Lacey, LA & S. Singer. Larvicidal activity of new isolates of *B. sphaericus* and *B. thuringiensis* H-14 against Anopheline and Culicine mosquitoes. Mosq. News, 1982. 42: 537-543.
7. Mulla, MS, HA. Darwazeh & NS. Tietze. Efficacy of *B. sphaericus* 2362 formulations against floodwater mosquitoes. J. Am. Mosq. Contr. Assoc., 1988. 4(2): 172-174.
8. Mulligan FS, CH. Schaefer & WH. Wilder. Efficacy and persistence of *B. sphaericus* and *B. thuringiensis* H-14 against mosquito under laboratory and field conditions. J. Econ. Ent., 1980. 73:684-688.
9. Mulla, MS. Efficacy on the microbial agent *B. sphaericus* against mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Southern California. Bull.Soc. Vector Ecol., 1986. 11: 247-254.
10. WHO. Informal consultation on the development of *B. sphaericus* as a microbial larvicide, 1985. TDR/BCV/sphaericus/85.3
11. Aly C. Feeding behavior of *Ae. vexans* larvae (Diptera: Culicidae) and its influence on the effectiveness of *Bti*. Bull. Soc. Vector Ecol., 1983. 8:94-100
12. Ramoska WA & TL. Hopkins. Effects of mosquito larval feeding behavior on *B. sphaericus* efficacy. J. Invert. Pathol., 1981. 37:269-272
13. Mulla MS, HA. Darwazeh, EW. Davidson and HT. Dulmage. Efficacy and persistence of the microbial agent *B. sphaericus* against mosquito larvae in organically enriched habitats. Mosq. News, 1984. 44: 166-173.
14. Regis L, MHNL. Silva-Filha, CMF. De Oliveira, EM. Rios, SB. Da Silva & AF. Furtado. Integrated control measures against *Cx. quinquefasciatus* vector of filariasis in Resife. Mem. Inst. Osw.Cruz, 1995. 90(1): 115-119.
15. Chohanadisai L, S. Krairiksh & Thanasripukdikul. Toxicity of *B. sphaericus* 2362 against *Cx. quinquefasciatus*. Mosquito-Borne Disease Bull.. 1989. 6(4): 96-100
16. Abbot Laboratories. Testing protocol: Laboratory bioassay for *B. sphaericus* (VectoLex), 1997.
17. Lacey, LA. Effects of pH and storage temperature on spore viability and larvicidal activity of *B. sphaericus*. Bull. Soc. Vector Ecol., 1985. 10(2): 102-106.
18. Davidson EW. Biochemistry and mode of action of the *B. sphaericus* toxin. Mem. Inst. Osw. Cruz, 1985. 90(1):81-86.
19. Widyastuti U & Widiarti. Uji coba *B. sphaericus* 2362 terhadap jentik *An. Barbirostris* di Kec. Wulanggintang, Kab. Flores Timur. Maj. Parst. Ind., 1996. 9(2): 107-112.
20. Widyastuti U, Blondine Ch P & Mujiyono. Uji coba *B. sphaericus* 2362 (*Spherimos* PP) terhadap jentik *Anopheles* spp di Desa Bawonifaoso, Teluk Dalam, Nias. CDK, 1997. 118:28-32
21. Stojanovich, CJ & HG. Scott. Illustrated key to mosquitoes of Vietnam. U.S. Dept. Hlth. Educ. & Welfare Pub. Hlth Service. CDC Atlanta, 1966.

22. O'Connor, CT & A. Soepanto. Kunci bergambar untuk Anopheles betina dari Indonesia. Dit. Jen. P3M, Depkes RI, Jakarta, 1979.
23. Reid, JA. Anopheline mosquitoes of Malaya and Borneo. Studies from the Institute of Medical Research Malaysia, 1968. 31. Government of Malaysia.
24. Finney DJ. Probit analysis. Cambridge Univ. Press, London. 1971. 3 rd Ed.
25. Mulla, MS & HA. Darwazeh. Larvicidal efficacy of various formulations of *B. thuringiensis* serotype H-14 against mosquitoes. Bull. Soc. Vector Ecol., 1984. 9(1): 51-58.
26. Mian LC & MS. Mulla. Factor influencing activity of the microbial agent *B. sphaericus* against mosquito larvae. Bull. Soc. Vector Ecol. 1983. 8(2): 128-134.
27. Becker N & J. Margalit. Control of Diptera with Bti. 1992.
28. Becker N, S. Djakaria, A. Kaiser, O. Zulhasril & HW. Ludwig. Efficacy of new tablet formulation of an asporogenous strain of *B. thuringiensis israelensis* against larvae of *Ae. aegypti*. Bull. Soc. Vector Ecol., 1991. 16(1): 1-7.
29. Davidson, EW. Binding of the *B. sphaericus* (Eubacteriales: Bacillaceae) toxin to midgut cell of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae: relationship to host range. J. Med. Ent., 1988. 25 (3): 151-157.