

011

# BERKALA ILMU KEDOKTERAN (Journal of the Medical Sciences)

ISSN 0126 — 1312      CODEN: BIKEDW

Diterbitkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

**Jilid XXIII**

**Juni 1991**

**Nomor 2**

## Pengkajian Toksisitas *Bacillus* spp. Hasil Isolasi Terhadap Larva Nyamuk di Laboratorium<sup>1)</sup>

Oleh: Sugeng Juwono Mardihusodo<sup>2)</sup>, Soesanto<sup>3)</sup>, Donny Widiyanto<sup>4)</sup>, Siti Rahmah Umniyati<sup>2)</sup> dan Siti Sumarmi<sup>4)</sup>

Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran<sup>2)</sup>, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian<sup>3)</sup>, Laboratorium Entomologi Fakultas Biologi<sup>4)</sup>, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

---

### ABSTRACT

Sugeng Juwono Mardihusodo, Soesanto, Donny Widiyanto, Siti Rahmah Umniyati and Siti Sumarmi — *Toxicity testings of isolated Bacillus spp. against mosquito larvae in the laboratory*

Studies on the spectrum of insecticidal activities of any entomopathogens indigenously obtained from any mosquito larval habitats should be accomplished to realize its respective degree of potency and specificity as a biological control agent.

These studies aimed at testing of comparative toxicities of four bacilli isolates: *B. sphaericus* I (23A), *B. sphaericus* II (51C), *B. pumilus* (25C) and *B. cereus* (142A) against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles aconitus* larvae in laboratory conditions.

Pathogenicity and toxicity testings were undertaken after the four bacilli isolates and their controls (*B. thuringiensis* H-14 and *B. sphaericus* 1593) being cultured in slant media or produced through fermentations with a defined medium (Prof. Sam Singer) as final whole cultures (FWCs) and primary powders. Titrations of all primary powders produced were carried out against standard powders of *B. t.* H-14 (IPS 82) and *B. sphaericus* 1593 (RB 80).

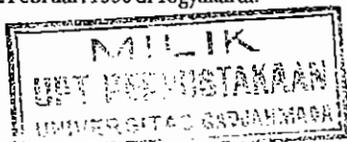
The results of the testings showed that:

1. the four bacilli isolates were respectively pathogenic for *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* and *An. aconitus* larvae;
2. the degree of sensitivities of the three species of mosquito larvae against the four bacilli isolates from higher to lower levels were *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* and *An. aconitus*;
3. toxicities of the four bacilli isolates were still much lower than that of either *B. t.* H-14 or *B. sphaericus* 1593, and
4. results of the attempts of primary powder production with a Sam Singer's medium for the four isolates, *B. t.* H-14 and *B. sphaericus* 1593 were considered satisfactory.

**Key Words:** entomopathogens – bacilli isolates – *B. thuringiensis* H-14 – *B. sphaericus* 1593 – biological control

---

1) Disajikan dalam Seminar Hasil Penelitian PAU Bioteknologi UGM, 22 Februari 1990 di Yogyakarta.



## PENGANTAR

Pengendalian hama penyakit tetumbuhan dan vektor penyakit yang merupakan masalah kesehatan masyarakat dengan wawasan terhadap pelestarian mutu baik lingkungan hidup manusia kian menarik perhatian para pakar, sehubungan dengan dampak negatif yang timbul akibat pemakaian insektisida kimiawi dengan efek residual yang lama (Burgess, 1981; WHO, 1984). Diantara banyak jenis entomopatogen yang pernah ditemukan dari berbagai macam sumber ada beberapa jenis dan galur basili pembentuk spora yang sangat potensial sebagai larvisida, yaitu dari jenis *B. thuringiensis* dan *B. sphaericus* (WHO, 1984). Bioinsektisida yang dibuat dari kedua jenis bakteri tersebut terbukti sangat spesifik, efektif dan aman terhadap lingkungan (WHO, 1985). Penggunaan galur-galur lokal, yang terbukti potensial sebagai insektisida dan dapat diproduksi di tempat (daerah endemik) di mana produk bioinsektisida akan dipakai, akan mengoptimalkan dayaguna dan hasilgunanya (WHO, 1985).

Sehubungan dengan telah adanya masalah resistensi beberapa nyamuk vektor malaria di Indonesia (Kirnowardoyo, 1985), maka telah kami (Mardihusodo *et al.*, 1988a) lakukan percobaan isolasi bakteri yang patogenik terhadap larva nyamuk di Yogyakarta dan sekitarnya. Dari penelitian pendahuluan tersebut didapat *B. pumilus* yang sangat patogenik terhadap larva *Culex quinquefasciatus* dan *Cx. tritaeniorhynchus*. Penelitian semacam itu diteruskan di wilayah Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Tengah dan Jawa Timur. Basili pembentuk spora diisolasi dari larva nyamuk, tanah dan air dari berbagai macam habitat larva nyamuk. Dari 203 sampel yang terkumpulkan diperoleh 549 isolat, yang empat di antaranya, yaitu *B. pumilus*, *B. cereus* dan dua galur baru *B. sphaericus* (Mardihusodo *et al.*, 1988b).

Efektivitas mikrobial sebagai insektisida terbukti beragam tergantung kepada banyak faktor, antara lain macam spesies, serotipe dan cara kerja faktor pembunuh (toksin) bakteri, juga keadaan faali, perilaku dan kebiasaan istirahat larva nyamuk (Foo & Yap, 1982). Karena itu isolat-isolat baru yang ternyata positif pada uji patogenisitas, untuk pengembangannya lebih lanjut sebagai kandidat bioinsektisida harus melewati tahap-tahap (I s/d IV) yang sistematis sebagaimana yang digariskan oleh Komite Ahli WHO (1984; 1985). Apa yang telah dikerjakan oleh tim Mardihusodo *et al.* (1988ab) masih dalam tahap I, dan masih termasuk tahap ini adalah penetapan spektrum aktivitas larvisidal terhadap serangga sasaran (larva nyamuk), dan juga uji toksisitas terhadap organisme bukan sasaran. Langkah ini merupakan prasarat yang harus ditempuh dalam pengembangan suatu entomopatogen sebagai bioinsektisida terpilih, yang diharapkan dapat dipakai dalam pengendalian vektor penyakit di kemudian hari.

Berikut ini disajikan hasil penetapan toksisitas relatif keempat basili hasil isolasi sebelumnya (Mardihusodo *et al.*, 1988b) terhadap larva nyamuk vektor penyakit-penyakit penting di Jawa, dalam kondisi laboratorium.

## BAHAN DAN CARA

Bahan uji entomotoksitas yang digunakan adalah 4 basili hasil isolasi, yaitu: *B. sphaericus* I (23A), *B. sphaericus* II (51C), *B. pumilus* (25C) dan *B. cereus* (142A). Percobaan fermentasi dengan bahan medium basal dan pembuatan puder primer dilakukan untuk keempat isolat tersebut ditambah dengan dua

galur *B. thuringiensis*H-14 (1897) dan *B. sphaericus* 1593 yang diperoleh dari Prof. Sam Singer (USA).

Pekerjaan penelitian terdiri atas empat kegiatan, yaitu:

1. pembuatan koloni nyamuk uji,
2. uji patogenisitas basili isolat lokal terhadap larva nyamuk uji,
3. pengerjaan fermentasi basili entomopatogen, dan
4. pembuatan puder primer basili dari hasil fermentasi.

### 1. Kolonisasi Nyamuk Uji

Untuk keperluan kolonisasi nyamuk uji dikerjakan koleksi nyamuk *Aedes aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, dan *Anopheles aconitus* di Kotamadya Yogyakarta dan sekitarnya. Pemeliharaan nyamuk dan larva *Ae. aegypti* dikerjakan menurut Gerberg (1970), *Cx. quinquefasciatus* menurut De Meillon & Thomas (1966), dan *An. aconitus* menurut Barodji *et al.* (1985).

### 2. Uji Toksisitas

Uji spektrum toksisitas empat basili hasil isolasi dilakukan terhadap larva instar III dari *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *An. aconitus* dalam kondisi laboratorium (temperatur kamar biasa) dengan mengadakan reinfeksi basili isolat kepada larva nyamuk uji hasil kolonisasi (Mardihusodo *et al.*, 1988b). Untuk tiap uji dibuat tiga replikat. Pendedahan berlangsung selama 24 jam dan 48 jam, dengan larva tidak diberi makan. Ditetapkan besarnya  $LC_{50}$  setelah angka kematian dikoreksi dengan formula Abbott secara grafikal dan hasilnya dinyatakan dalam log dosis.

### 3. Fermentasi

Fermentasi basili hasil isolasi dan dari Prof. Sam Singer bertujuan untuk memperbanyak sel dan spora basili tersebut sebelum dibuat puder primer. Untuk fermentasi tiap basili dipakai medium basal dengan komposisi sebagai berikut (Sam Singer, komunikasi pribadi): skim milk, 1 g; yeast extract, 0,2 g;  $CaCl_2$ , 0,1 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,03 g;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,002 g;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,002 g per 100 ml, dengan pH = 7,00.

Urutan langkah kerja fermentasi tiap isolat *Bacillus* sp. diatur menurut jadwal waktu sebagai berikut:

*Hari ke-1.* Kegiatan meliputi:

- a. penyiapan medium miring,
- b. sterilisasi alat gelas dan fermentor,
- c. inokulasi isolat ke dalam medium miring.

*Hari ke-2.* Penyiapan dan sterilisasi medium basal untuk fermentasi.

*Hari ke-3.* Mulai pukul 6.00 WIB dilakukan:

- a. inokulasi isolat dari medium miring ke tabung Erlenmeyer,
- b. pengecatan sediaan *Bacillus* sp. untuk pemantauan kemurnian kultur.

Pukul 11.00 WIB dilakukan:

- inokulasi isolat dari Erlenmeyer ke dalam fermentor kecil (1 liter),
- diamati pH dan *Total Viable Count* (TVC) untuk memantau pertumbuhan sel bakteri, dan
- pegecatan sediaan *Bacillus* sp. Pukul 16.00 dikerjakan inokulasi dari fermentor kecil ke fermentor besar (5 l), dan (b) diamati pH, TVC dan pegecatan sediaan isolat.

*Hari ke-4.* Pukul 7.00 WIB dilakukan pegecatan pertama sediaan isolat. Pukul 8.00 dilaksanakan (a) pegecatan kedua, (b) pengamatan TVC dan TVSC (*Total Viable Spore Count*) dan pH.

Hasil akhir fermentasi ini adalah suatu *Final Whole Culture* (FWC). Uji toksisitas atau *bioassay* terhadap hasil FWC dilakukan dengan menggunakan kondisi atau parameter sebagai berikut:

- pH medium tetap sama dengan 7.00;
- jumlah TVC =  $3 \times 10^8$  CFU/ml dan TVSC =  $5 \times 10^8$  CFU/ml (CFU = *Colony Forming Unit*), pada penjadwalan waktu fermentasi 26 jam. Medium dan hasil proses fermentasi yang memenuhi ketentuan parameter tersebut dianggap baik (optimal), selanjutnya FWC diteruskan untuk pembuatan puder primer.

Uji toksisitas (*bioassay*) terhadap FWC dikerjakan menurut petunjuk Sam Singer (komunikasi pribadi) sebagai berikut: Diambil 0,5 ml FWC yang telah dihomogenkan dengan pipet, lalu dipindahkan ke dalam cawan Petri yang telah diisi 49,5 ml air *awaion*, sehingga didapat suspensi isolat (FWC) berkonsentrasi  $10^2$ . Selanjutnya dari suspensi itu dibuat rangkaian pengenceran kelipatan  $10^{-1}$  dengan memindahkan 5 ml suspensi secara berurutan ke dalam Petri berikutnya yang telah diisi air *awaion* 45 ml, sehingga akhirnya diadakan suspensi dengan konsentrasi  $10^{-10}$ . Ke dalam tiap Petri yang berisi suspensi isolat ditambahkan 25 ekor larva uji, demikian juga ke dalam Petri yang hanya diisi 50 ml air (sebagai kontrol). Untuk tiap *bioassay* dibuat dua replikat. Pendedahan berlangsung selama 24 dan 48 jam, dengan larva tidak diberi makanan. Dihitung jumlah kematian larva uji secara kumulatif dalam tiap jangka waktu pendedahan dan ditetapkan besarnya  $LC_{50}$ , setelah dikoreksi dengan formula Abbott dengan cara grafikal dan dinyatakan dalam log dosis.

#### 4. Pembuatan Puder Primer

Puder primer dibuat dari FWC tiap isolat yang telah memenuhi parameter yang telah ditetapkan. Cara kerja menurut apa yang disarankan Sam Singer (komunikasi pribadi) sebagai berikut: FWC (500 ml) dipusing selama 30 menit pada 7 200 RPM dalam *centrifuge refrigerator*. Supernatan dibuang. Kepada pellet isolat yang diperoleh ditambahkan  $\frac{1}{10}$  bagian volume mula-mula (5 ml) *ascorbic acid* 1%, yang disuspensikan dalam Erlenmeyer steril. Suspensi ini dipindahkan ke dalam tabung *freeze drier* untuk kemudian dilakukan proses liofilisasi, dengan hasil akhir suatu puder primer yang kering. Puder primer tiap basili ditimbang, dipindahkan dalam botol untuk disimpan dalam tempat sejuk dan kering.

Dari tiap puder primer yang diperoleh ditetapkan besarnya TVC dan TVSC, dan dilakukan *bioassay*. Larva uji untuk *B. sphaericus* adalah *Cx. quinquefasciatus*,

sedangkan untuk *B. pumilus*, *B. cereus* dan *B. t. H-14* adalah *Ae. aegypti*. Sebagai pembandingan titrasi puder primer buatan lokal ini adalah puder primer baku dari Institut Pasteur Paris (atas bantuan Prof. H. de Barjac), yaitu IPS 82 (mengandung *B. t. H-14*) dan RB 80 (mengandung *B. sphaericus* 1593).

*Bioassay* puder primer dikerjakan menurut langkah kerja yang telah dilakukan oleh WHO (1988a, b). Analisis hasil *bioassay* tiap isolat dikerjakan setelah angka kematian kumulatif pada 24 dan 48 jam pendedahan dikoreksi dengan formula Abbott, dan besarnya  $LC_{50}$  dihitung dengan analisis probit (Finney, 1971). Tingkat toksisitas suatu isolat *Bacillus* sp. dinyatakan berbeda bermakna dari yang lain, jika ada perbedaan nyata (tidak saling tumpang-tindih) antara tiap-tiap tingkat kepercayaan (CL) 95%.

Didasarkan atas  $LC_{50}$  puder primer baku (IPS 82 atau RB 80) dan puder primer yang dibuat, maka titer puder primer yang dibuat ditetapkan dengan formula sebagai berikut:

$$\text{Titer puder primer yang dibuat} = \frac{15\ 000 \text{ ITU} \times LC_{50} \text{ puder baku (IPS 82)}}{LC_{50} \text{ puder primer yang dibuat}}$$

atau

$$\text{Titer puder primer yang dibuat} = \frac{1\ 000 \text{ ITU} \times LC_{50} \text{ puder baku (RB 80)}}{LC_{50} \text{ puder primer yang dibuat}}$$

## HASIL

Hasil uji toksisitas keempat basili hasil isolasi (23A, 51c, 25C dan 142A) terhadap 3 jenis nyamuk: *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *An. aconitus* dirangkum dan disajikan dalam TABEL 1. Dari hasil uji itu tampak bahwa *B. sphaericus* I (23A) telah menunjukkan aktivitas larvisidal yang nyata terhadap *Cx. quinquefasciatus* pada 24 jam pendedahan ( $LC_{50} = -4,43$ ) dan belum nyata terhadap *Ae. aegypti* dan *An. aconitus* (jumlah kematian larva untuk semua konsentrasi kurang dari 50%). Pada pendedahan selama 48 jam basilus itu lebih nyata potensinya sebagai larvisida terhadap ketiga jenis nyamuk uji, dan basilus uji lebih toksik 100 kali terhadap *Cx. quinquefasciatus* ( $LC_{50} = -5,44$ ) daripada terhadap *Ae. aegypti* ( $LC_{50} = -3,56$ ) dan *An. aconitus* ( $LC_{50} = -3,41$ ). Kesimpulan: *B. sphaericus* I (23A) paling toksik terhadap larva *Cx. quinquefasciatus* di antara 3 jenis nyamuk uji.

Isolat *B. sphaericus* II (51C) ternyata juga bersifat larvisidal terhadap yang serupa dengan *B. sphaericus* I (23A) pada 24 jam pendedahan, khususnya terhadap *Cx. quinquefasciatus* ( $LC_{50} = -4,14$ ). Pada pendedahan 48 jam aktivitas larvisidal itu semakin nyata terhadap ketiga jenis larva nyamuk uji. Toksisitas *B. sphaericus* (51C) masih lebih nyata terhadap *Cx. quinquefasciatus* ( $LC_{50} = -5,59$ ), baru kemudian terhadap *Ae. aegypti* ( $LC_{50} = -5,31$ ) dan *An. aconitus* ( $LC_{50} = -3,03$ ). Terlihat toksisitas basilus uji sekitar 100 kali terhadap *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. aegypti* daripada terhadap *An. aconitus*.

Isolat *B. pumilus* (25C) terbukti juga memberikan hasil yang mirip dengan penampilan insektisidal kedua isolat terdahulu (23A dan 51C) terhadap 3 jenis larva nyamuk uji. Pada pendedahan selama 24 jam *B. pumilus* telah menunjukkan potensinya sebagai larvisida terhadap *Cx. quinquefasciatus* ( $LC_{50} = -5,59$ ) dan juga

terhadap *Ae. aegypti* ( $LC_{50} = -4,23$ ) dan belum nyata terhadap *An. aconitus*. Ini berarti bahwa toksisitas *B. pumilus* (25C) terhadap larva *Cx. quinquefasciatus* masing-masing sekitar 10–100 kali terhadap larva *Ae. aegypti* dan *An. aconitus*. Tetapi pada pendedahan selama 48 jam toksisitas basilus uji hampir sama terhadap *Cx. quinquefasciatus* ( $LC_{50} = -5,91$ ) dan *Ae. aegypti* ( $LC_{50} = -5,78$ ), tetapi rendah terhadap *An. aconitus* ( $LC_{50} = -3,39$ ).

Berbeda dari ketiga basili uji terdahulu *B. cereus* (142A) pada pendedahan 24 jam menunjukkan toksisitas lebih baik terhadap larva *Ae. aegypti* ( $LC_{50} = -5,35$ ) daripada *Cx. quinquefasciatus* ( $LC_{50} = -4,24$ ), apa lagi terhadap *An. aconitus* (jumlah kematian kurang dari 50%). Namun demikian, pada pendedahan 48 jam toksisitas *B. cereus* (142A) kurang lebih sama terhadap larva *Cx. quinquefasciatus* ( $LC_{50} = -6,13$ ) dan *Ae. aegypti* ( $LC_{50} = -6,08$ ), tetapi juga masih jauh lebih tinggi terhadap *An. aconitus* ( $LC_{50} = -3,39$ ).

TABEL 1. – Toksisitas relatif *Bacillus* spp. hasil isolasi terhadap larva nyamuk di laboratorium: Suhu  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  dan kelembaban nisbi  $80 \pm 5\%$ . Rata-rata 3 replikat

Isolat & Spesies	Nyamuk Uji	LC <sub>50</sub> (Log Dosis)	
		24 JAM	48 JAM
<i>B. sphaericus</i> I (23A)	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	-4,43	-5,44
	<i>Ae. aegypti</i>	- <sup>1)</sup>	-3,55
	<i>An. aconitus</i>	-	-3,41
<i>B. sphaericus</i> II (51C)	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	-4,14	-5,59
	<i>Ae. aegypti</i>	-	-5,31
	<i>An. aconitus</i>	-	-3,03
<i>B. pumilus</i> (25C)	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	-5,59	-5,91
	<i>Ae. aegypti</i>	-4,23	-5,78
	<i>An. aconitus</i>	-	-3,10
<i>B. cereus</i> (142A)	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	-4,24	-6,13
	<i>Ae. aegypti</i>	-5,35	-6,08
	<i>An. aconitus</i>	-	-3,39

<sup>1)</sup> Jumlah kematian larva untuk semua konsentrasi < 50%

Kesimpulan dari uji toksisitas relatif keempat basili hasil isolasi terhadap tiga jenis larva nyamuk uji tersebut adalah:

1. keempat basili 23A, 51C, 25C dan (142A) bersifat toksik terhadap ketiga jenis nyamuk: *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *An. aconitus*;
2. keempat jenis basili terutama aktif terhadap larva *Culex* (dengan *B. pumilus* yang tertinggi), selanjutnya terhadap *Aedes* dan kurang terhadap *Anopheles*.

Hasil percobaan fermentasi empat basili isolat lokal dan dua isolat dari Sam Singer dan pemantauannya selama proses pengerjaannya dirangkum dan disajikan dalam TABEL 2. Dari pengalaman ini didapat kesan bahwa fermentasi dengan menggunakan medium basal memberikan pertumbuhan yang memuaskan terhadap basili hasil isolat dan *B. t. H-14* (1897). Pada pemantauan FWC hasil fermentasi selama 26 jam didapat bahwa medium basal yang dipakai sangat baik (optimal) untuk pertumbuhan *B. sphaericus* I (23A), *B. sphaericus* II (51C), *B. pumilus* (25C), *B. cereus* (142A) dan *B. t. H-14* (1897) (TVC masing-masing

adalah  $6,95 \times 10^8$ ,  $6,80 \times 10^8$ ,  $1,34 \times 10^8$ ,  $1,03 \times 10^8$  dan  $1,00 \times 10^8$  CFU/ml) dan cukup baik untuk *B. sphaericus* 1593 (TVC =  $2,55 \times 10^7$  CFU/ml). Dari pengalaman fermentasi dengan medium basal ini juga didapat bahwa medium memberikan kondisi optimal untuk sporulasi *B. sphaericus* I dan II (23A dan 51C) (TVC masing-masing adalah  $6,60 \times 10^8$  dan  $6,65 \times 10^8$  CFU/ml) dan cukup baik untuk *B. cereus* (142A), *B. t. H-14* (1897) dan *B. sphaericus* 1593 (TVSC masing-masing adalah  $6,65 \times 10^7$ ,  $9,95 \times 10^7$  dan  $6,35 \times 10^7$  CFU/ml), tetapi tidak baik untuk *B. pumilus* (25C) (TVSC = 0 CFU/ml).

Dari hasil-hasil *bioassay* FWC dengan menggunakan larva uji *Cx. quinquefasciatus* untuk *B. sphaericus* I (23A), *B. sphaericus* II (51C) dan *B. sphaericus* 1593 terbukti bahwa aktivitas larvisidal kedua basili isolat baru masih lebih rendah daripada isolat *B. sphaericus* 1593 ( $LC_{50}$  berturut-turut selama 48 jam pendedahan adalah -4,52, -4,22 dan -7,68). Dari hasil-hasil *bioassay* FWC itu pula didapat bahwa toksisitas terhadap larva uji *Ae. aegypti* dari *B. pumilus* (25C) dan *B. cereus* (142A) ternyata juga masih lebih rendah daripada *B. t. H-14* (1897) ( $LC_{50}$  berturut-turut adalah -4,99, -5,36 dan -7,68). Kesimpulan umum dari hasil *bioassay* keseluruhan isolat menunjukkan bahwa potensi larvisidal keempat basili isolat baru masih lebih rendah daripada *B. t. H-14* dan *B. sphaericus* 1593.

TABEL 2.- Pertumbuhan *Bacillus* spp. hasil isolasi, *B. thuringiensis* H-14 dan *B. sphaericus* 1593 dalam medium basal, dan hasil fermentasi 26 jam

Isolat	TVC (CFU <sup>a</sup> /ml)	TVSC (CFU/ml)	LC <sub>50</sub> (Log Dosis)
<i>B. sphaericus</i> I (23A)	$6,95 \times 10^8$	$6,60 \times 10^8$	-4,52 <sup>b)</sup>
<i>B. sphaericus</i> II (51C)	$6,80 \times 10^8$	$6,65 \times 10^8$	-4,22 <sup>b)</sup>
<i>B. pumilus</i> (25C)	$1,34 \times 10^8$	0	-4,99 <sup>c)</sup>
<i>B. cereus</i> (142A)	$1,03 \times 10^8$	$6,65 \times 10^7$	-5,36 <sup>c)</sup>
<i>B. t. H-14</i> (1897)	$1,00 \times 10^8$	$9,95 \times 10^7$	-6,72 <sup>c)</sup>
<i>B. sphaericus</i> (1593)	$2,55 \times 10^7$	$6,35 \times 10^7$	-7,68 <sup>b)</sup>

a) CFU = Colony Forming Unit

b) Larva Uji : *Cx. quinquefasciatus*

c) Larva Uji : *Ae. aegypti*

Pembuatan puder primer hanya dapat dilaksanakan untuk dua isolat dari Prof. Sam Singer (*B. t. H-14* dan *B. sphaericus* 1593), karena setelah pembuatan puder primer *B. t. H-14* alat *freeze drier* untuk liofilisasi tidak lagi vakum. Karena itu *bioassay* puder primer hanya dapat dilaksanakan terhadap kedua bioinsektisida itu yang dibandingkan aktivitasnya dengan puder baku dari Institut Pasteur (Paris). Hasil-hasilnya dirangkum dan disajikan dalam TABEL 3.

Dari hasil-hasil yang disajikan itu terbukti tidak ada perbedaan nyata dalam hal tingkat toksisitas antara *B. t. H-14* (1897) dari Sam Singer dan *B. t. H-14* (IPS 82) dari Institut Pasteur (Paris) terhadap larva uji *Ae. aegypti* di Yogyakarta,  $LC_{50}$  (CL 95%) berturut-turut adalah 6,43 (4,31 - 10,56) ITU dan 7,19 (5,14 - 10,05) ITU, demikian pula halnya antara *B. sphaericus* 1593 dari Sam Singer dan *B. sphaericus* 1593 (RB 80) dari Institut Pasteur (Paris) terhadap larva uji *Cx. quinquefasciatus* di Yogyakarta  $LC_{50}$  (CL 95%) berturut-turut adalah 13,87 (7,65 - 19,90) ITU dan 15,53 (9,93 - 24,38) ITU.

TABEL 3. – Hasil produksi dan bioassay puder primer *B. thuringiensis* H-14 (1897) dan *B. sphaericus* 1593 dibandingkan dengan puder primer baku *B. thuringiensis* H-14 (IPS 82) dan *B. sphaericus* 1593 (RB 80)

Patogen	TVC <sup>a</sup> / <sub>r</sub>	LC <sub>50</sub> (CL 95%) ITU <sup>b)</sup>		Titer (ITU)
		24 Jam	48 Jam	
<i>B. t.</i> H-14 (1897)	1,39 x 10 <sup>10</sup>	6,43 (4,31-10,56)	–	16 733 <sup>c)</sup>
<i>B. sphaericus</i> (1593)	4,63 x 10 <sup>7</sup>	13,87 (7,65-19,90)	6,45 (4,22-9,98)	1 120 <sup>d)</sup>
<i>B. t.</i> H-14 (IPS 82)	–	7,19 (5,14-10,05)	–	15 000 <sup>c)</sup>
<i>B. sphaericus</i> (RB 80)	–	15,53 (9,93-24,38)	8,20 (5,67-11,86)	1 000 <sup>d)</sup>

a) TVC = Total Viable Count

b) ITU = International Toxic Unit

c) Larva Uji : *Ae. aegypti*

d) Larva Uji : *Cx. quinquefasciatus*

Titer puder primer hasil produksi fermentasi dengan medium basal yang digunakan terhadap kedua jenis basili dari Sam Singer tampak relatif lebih baik daripada titer puder primer baku dari Institut Pasteur (Paris), yaitu berturut-turut 16 773 dan 1 120 ITU untuk *B. t.* H-14 (1897) dan *B. sphaericus* 1593, sedangkan untuk *B. t.* H-14 (IPS 82) dan *B. sphaericus* 1593 (RB 80) berturut-turut adalah 15 000 dan 1 000 ITU. Medium basal yang digunakan kiranya dapat digunakan sebagai medium baku untuk produksi puder primer basili entomopatogen.

## PEMBAHASAN

Keempat isolat uji (23A, 51C, 25C dan 142A) berturut-turut diidentifikasi sebagai *B. sphaericus* n. str. (*new strain*), *B. sphaericus* n. str., *B. pumilus* dan *B. cereus* dengan bantuan dari Prof. H. de Barjac (Institut Pasteur, Paris) dan telah terbukti patogenik terhadap larva nyamuk *Cx. quinquefasciatus* (Mardihusodo *et al.*, 1988b).

Hasil uji ulang keempat basili isolat baru tersebut terhadap larva *Cx. quinquefasciatus*, yang diperluas terhadap larva *Ae. aegypti* dan *An. aconitus*, tampak mempertegas patogenisitas dan potensinya sebagai bioinsektisida harapan sebagaimana hasil penelitian sebelumnya (Mardihusodo *et al.*, 1988ab). Uji spektrum aktivitas larvisidal keempat basili isolat itu sekaligus juga memperlihatkan tingkat potensi relatif tiap-tiap bakterium sebagai bioinsektisida khususnya terhadap *Culex*, *Aedes* dan *Anopheles*. Dalam penelitian ini memang disengaja memakai jenis nyamuk yang diketahui mampu menularkan penyakit, yaitu berturut-turut adalah filariasis bancrofti tipe perkotaan, Demam Berdarah Dengue (DBD) dan malaria (WHO, 1972).

Dari data yang diperoleh pada pengkajian patogenisitas (TABEL 1) dan toksisitas dalam bentuk FWC (TABEL 2) terlihat nyata aktivitas larvisidal *B. sphaericus* (23A, 51C dan 1593) terbukti paling kuat khususnya terhadap larva *Cx. quinquefasciatus*, yaitu sekitar 10–100 kali terhadap larva *Ae. aegypti* dan

*An. aconitus*. Kenyataan ini menimbulkan kesan, bahwa *B. sphaericus* pada dasarnya cenderung aktif terhadap larva *Culex*, khususnya *Cx. pipens* dan *Cx. quinquefasciatus*, sehingga larva kedua jenis nyamuk tersebut dianjurkan sebagai larva nyamuk uji pembandingan untuk *bioassay* insektisida yang mengandung *B. sphaericus* (WHO, 1985).

Juga dari rangkuman data hasil penelitian ini (TABEL 1) didapat bahwa isolat *B. pumilus* (25C) terutama efektif terhadap *Cx. quinquefasciatus*, kurang terhadap larva *Ae. aegypti*, dan semakin kurang lagi terhadap larva *An. aconitus*. Dari hasil penelitian ini kiranya dapat disarankan pemilihan *Cx. quinquefasciatus* sebagai serangga uji untuk *B. pumilus* hasil isolasi dalam pencarian entomopatogen dengan alternatif larva *Ae. aegypti*. Hasil isolasi beberapa waktu yang lalu (Mardihusodo *et al.*, 1988a) menyokong pendapat ini, karena *B. pumilus* yang entomopatogenik pernah diisolasi dari larva *Cx. tritaeniorhynchus*.

Dari pihak larva nyamuk tampak perbedaan dalam tanggapan masing-masing terhadap stimulan yang berupa isolat basili. Sebab-sebab yang menerangkan adanya keragaman efek larvisidal itu belum dapat terungkap dengan hasil penelitian ini, karena memang tujuan penelitian tidak mengarah ke pemecahan masalah-masalah demikian. Untuk yang berminat dapat berkonsultasi dengan banyak pakar patologi serangga antara lain Burges (1981). Dari pengamatan ini larvae *Ae. aegypti* dan *An. aconitus* tampak bereaksi lebih lambat terhadap kerja larvisidal *B. sphaericus* hasil isolasi (23A dan 51C), hal yang sama juga ditemui dalam percobaan uji larva nyamuk tersebut terhadap *B. sphaericus* 1593 (Mardihusodo, 1989). Fenomenon yang sama juga tampak pada uji isolat *B. pumilus* (25C) dan *B. cereus* (142A) terhadap ketiga jenis larva nyamuk uji. Larva *Ae. aegypti* dan *An. aconitus* juga bereaksi lebih lambat terhadap kedua isolat itu daripada larva *Cx. quinquefasciatus*, sedangkan *Ae. aegypti* terlihat lebih peka daripada *An. aconitus* terhadap kedua basili isolat. Perbedaan itu mungkin karena perbedaan kecepatan larva nyamuk dalam hal memakan bakteri sampai jumlah tertentu yang letal terhadapnya, sebagaimana yang didapat pada *An. albimanus* yang lebih lambat memakan bakteri daripada *Cx. quinquefasciatus* oleh Ramoska dan Pacey (1979).

Pengkajian patogenisitas dan toksisitas keempat basili isolat baru (23A, 51C, 25C dan 142A) menunjukkan kesan bahwa keempat isolat uji memperlihatkan aktivitas larvisidal terhadap ketiga jenis nyamuk *Culex*, *Aedes* dan *Anopheles*, meskipun dalam tingkatan yang berbeda dan masih jauh lebih rendah daripada aktivitas *B. t. H-14* dan *B. sphaericus* 1593. Di samping itu dari hasil pengkajian toksisitas keempat isolat itu juga timbul dugaan kuat, bahwa keempat jenis basili itu dalam beberapa tingkatan dan kondisi yang optimal dan sesuai mungkin juga berperan dalam pengendalian alami ketiga jenis larva nyamuk uji itu. Karena itu penelitian lebih lanjut ke arah itu perlu dilakukan, di samping juga pencarian dan penelitian isolat-isolat baru dari alam di Indonesia, yang tidak diragukan lagi, pasti kaya dengan mikrobia yang dapat didayagunakan untuk pengendalian nyamuk vektor penyakit di Indonesia sendiri.

## KESIMPULAN

Dari pengalaman uji toksisitas basili isolat dan percobaan pembuatan puder primer basili isolat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Keempat basili isolat (23A, 51C, 25C dan 142A) bersifat toksik terhadap larva *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *An. aconitus*.
2. Tingkat sensitivitas keempat spesies nyamuk terhadap isolat basili dari tinggi ke rendah adalah: *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti*, *An. aconitus*.
3. Toksisitas keempat basili isolat baru masih jauh lebih rendah daripada toksisitas *B. t. H-14* (1897) dan *B. sphaericus* 1593.
4. Hasil fermentasi dan pembuatan puder primer *B. t. H-14* (1897) dan *B. sphaericus* 1593 memuaskan.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan banyak terima kasih disampaikan kepada Direktur dan Pengelola Pusat Antar Universitas Bioteknologi Universitas Gadjah Mada yang telah meluluskan proyek penelitian ini, kepada Dekan Fakultas Kedokteran UGM yang telah menyetujui pelaksanaan proyek penelitian ini, dan kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

#### KEPUSTAKAAN

- Barodji, Sularto, T., Bambang Haryanto, Widiarti, Pradhan, G. D., & Shaw, R. F. 1985 Life cycle study of malaria vector *Anopheles aconitus* Donitz in the laboratory. *Bul. Penelit. Kes. (Bull. Hlth Stud.)* 13(1):1-7.
- Burges, H. D. 1981 *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, London.
- De Meillon, B., & Thomas, V. 1966 *Culex pipens fatigans* Wied, dalam C. N. Smith (ed.): *Insect Colonization and Mass Production*, pp. 101-114. Academic Press, London.
- Finney, D. J. 1971 *Probit Analysis*. Cambridge Univ. Press, London.
- Foo, A. E. S., & Yap, H. H. 1982 Comparative bioassays of *Bacillus thuringiensis* H-14 formulations against four species of mosquitoes in Malaysia. *SE Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth* 13(2):206-210.
- Gerberg, E. J. 1970 *Manual for Mosquito Rearing and Experimental Techniques*. AMCA Bull. 5, AMCA Inc., Fresno, Calif.
- Kirnowardoyo, S. 1985. Vektor malaria di Indonesia dan status kerentanannya terhadap insektisida, dalam Soenarto: *Kumpulan Naskah Lengkap Simposium dan Panel Diskusi Malaria*, pp. 119-48, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Mardihusodo, S. J., Romas, M. A., & Situmorang, J. 1988a Percobaan isolasi bakteri yang patogenik terhadap larva nyamuk di Yogyakarta. *M. Parasit. Indon.* 1(3-4):47-54.
- , Situmorang, J., Romas, M. A., & Makin, I. M. 1988b Isolasi, identifikasi dan karakterisasi bakteri patogen pada larva nyamuk. *Sem. Hasil Penelitian Pangan Gizi, Ilmu Hayat Dan Biotek, Yogyakarta*.
- 1989 *Sensitivitas Larva Nyamuk Anopheles aconitus Terhadap Bacillus thuringiensis H-14 dan Bacillus sphaericus 1593 di Laboratorium*. Proyek Penelitian DPPM/UGM Tahun 1988/1989. Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ramoska, W. A., & Pacey, C. 1979 Food availability and period of exposure as factors and *Bacillus sphaericus* efficacy on mosquito larvae. *J. Econ. Entomol.* 72(4):523-5.
- World Health Organization 1972 *Vector Control in International Health*. WHO, Geneva.
- 1984 *Report of the Seventh Meeting of the Scientific Working Group on Biological Control of the Vectors*. TDR/BCV/SWG-7/84.3, Geneva.
- 1985 *Biological Control of Vectors*. Tropical Disease Research (TDR), Seventh Programme Report 1983-1984. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases. WHO, Geneva.