

## Aktivitas Larvisidal *Bacillus thuringiensis* H-14 dan *Bacillus sphaericus* 1593 Terhadap Tiga Spesies Nyamuk Vektor Penyakit di Jawa

Oleh: Sugeng Juwono Mardihusono

Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran  
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

### ABSTRACT

Sugeng Juwono Mardihusono — *Larvicidal activities of Bacillus thuringiensis H-14 and Bacillus sphaericus 1593 against three species of mosquitoes of disease vectors in Java*

*Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bac. sphaericus* 1593 are quite promising as biological control agents utilized as alternatives of chemical insecticides in controlling mosquitoes of disease vectors.

The present studies are aimed at determining the larvicidal activities of *Bac. thuringiensis* H-14 and *Bac. sphaericus* 1593 against *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles aconitus*, respectively recorded as the main vectors of dengue haemorrhagic fever, bancroftian filariasis and malaria in Java.

Two types of primary powder of *Bac. thuringiensis* H-14 (IPS 82) and *Bac. sphaericus* 1593 (RB 80) were tested on their respective activities against larval stages of the three species of mosquitoes under laboratory conditions.

It was concluded that, ranked from the high to low level, *Bac. thuringiensis* H-14 was larvicidal to *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* and *An. aconitus*, whereas *B. sphaericus* 1593 was larvicidal to *Cx. quinquefasciatus*, *An. aconitus* and *Ae. aegypti* mosquitoes.

*Key Words:* *Bacillus thuringiensis* H-14 – *Bacillus sphaericus* 1593 – *Aedes aegypti* – *Culex quinquefasciatus* – *Anopheles aconitus*

### PENGANTAR

Pemakaian insektisida kimiawi secara terus-menerus dan tidak terkendali baik untuk keperluan di bidang kesehatan maupun pertanian terbukti menimbulkan dampak negatif berupa terjadinya resistensi vektor atau serangga hama, dan pencemaran lingkungan dengan akibat terbunuhnya predator dan musuh-musuh alami serangga vektor dan hama sasaran (WHO, 1984). Untuk mengatasi masalah-masalah tersebut cara-cara lain dalam pengendalian vektor yang setara dayagunanya, aman dan ekonomis perlu dicari dan diterapkan secara terpadu dengan cara kimiawi. Salah satu cara yang kini mendapat banyak perhatian adalah cara hayati dengan menggunakan entomopatogen terutama basili pembentuk spora.

Beberapa galur dan serotype dari jenis *Bacillus* spp. yang terbukti berdaya insektisidal antara lain adalah *Bac. thuringiensis israelensis* serotype H-14 (*B. t. H-14*) yang diisolasi di Israel (Goldberg & Margalit, 1977) dan *Bac. sphaericus* 1593 yang diisolasi di Jakarta (Singer, 1975). *Bac. thuringiensis* H-14 berdaya bunuh tinggi terhadap larvae nyamuk (Culicidae) dan lalat hitam (Simuliidae), sedangkan *Bac. sphaericus* 1593 lebih khusus lagi, yaitu hanya terhadap larvae Culicidae (WHO, 1984). Karena sasaran kerjanya demikian spesifiknya, kedua bioinsektisida itu aman terhadap lingkungan biotik dalam air, terhadap mamalia dan manusia. Di samping itu, penggunaannya dalam jangka lama (26 generasi) ternyata tidak menimbulkan kekebalan larva nyamuk terhadapnya ataupun kekebalan silang antara mikrobia itu dan insektisida kimia (WHO, 1984).

Berdasarkan atas lembar data tentang kedua galur basili itu (WHO, 1979, 1980) diduga bahwa keduanya juga berdaya bunuh tinggi terhadap larva nyamuk di Indonesia. Namun demikian, selama ini masih sangat sedikit uji larvisidal kedua jenis insektisida mikrobial itu terhadap nyamuk yang menjadi vektor penyakit di Indonesia, khususnya di Jawa. Sebenarnya kajian demikian perlu sekali dilakukan lebih dahulu sebelum bioinsektisida itu digunakan dalam skala besar di lapangan.

Berikut ini dilaporkan suatu hasil kajian aktivitas larvisidal *Bac. thuringiensis* H-14 dan *Bac. sphaericus* 1593 terhadap nyamuk *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* dan *Anopheles aconitus*, yang berturut-turut dikenal sebagai vektor utama penyakit demam berdarah dengue, filariasis bancrofti, dan malaria di Jawa (Gubler *et al.*, 1981; Joesoef & Cross, 1978; Kirnowardoyo, 1985).

## BAHAN DAN CARA

Bioinsektisida uji yang dipakai adalah:

1. puder baku berisi *Bac. thuringiensis* H-14 (IPS 82) yang berkekuatan 1000 International Toxic Unit (ITU) terhadap larva *Ae. aegypti*, dan
2. puder baku yang mengandung *Bac. sphaericus* 1593 yang berkekuatan 1000 ITU terhadap larva *Cx. pipiens* per mg.

Keduanya diperoleh dari Institut Pasteur di Paris lewat budi baik Profesor H. de Barjac.

Larva nyamuk uji yang digunakan adalah larva *instar IV* ( $L_4$ ) awal dari *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus*, dan *instar III* ( $L_3$ ) *An. aconitus* yang dikolonisasi di laboratorium.

Kerja uji bioinsektisida terhadap larva nyamuk dimulai dengan kolonisasi dan penyiapan larva nyamuk uji. Nyamuk *Ae. aegypti* betina yang kenyang darah ditangkap dengan aspirator dari Kotamadya Yogyakarta dan dikolonisasi sampai beberapa generasi di dalam insektarium dengan kondisi alami sesuai dengan cara yang pernah dikerjakan sebelumnya (Mardihusodo, 1988). Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* betina yang gravid atau kenyang darah ditangkap dengan aspirator dari Kotamadya Yogyakarta dan dikolonisasi menurut cara De Meillon & Thomas (1966). Nyamuk *An. aconitus* betina yang kenyang darah ditangkap di daerah Pakem (Sleman, DIY) dengan aspirator dan dikolonisasi menurut cara yang diberikan oleh Barodji *et al.* (1985).

Uji toksisitas (*bioassay*) untuk menetapkan tingkatan aktivitas insektisidal puder baku *Bac. thuringiensis* H-14 (IPS 82) dan *Bac. sphaericus* 1593 (RB80) terhadap larva ketiga jenis nyamuk uji dilaksanakan sesuai dengan petunjuk dari Institut Pasteur di Paris (Anon., 1988a, b) dalam kondisi kamar (temperatur udara  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Jika angka kematian (AK) kelompok pembanding antara 5–10%, maka AK larva nyamuk yang dikenai bioinsektisida dikoreksi dengan formula Abbott (1925). Apabila ternyata AK kelompok pembanding melebihi 10%, uji toksisitas diulangi lagi. Besarnya  $\text{LD}_{50}$  (dosis letal yang membunuh 50% jumlah larva nyamuk uji) dihitung dengan analisis probit (Finney, 1971). Tingkat toksisitas atau aktivitas larvisidal bioinsektisida uji ditentukan atas dasar tingkatan besarnya  $\text{LD}_{50}$  dan batas kepercayaan (*confidence limits*: CL) 95% bahan uji, yang masing-masing dinyatakan dalam ITU.

Perbedaan antar  $\text{LD}_{50}$  kedua bioinsektisida uji terhadap larva nyamuk uji dinyatakan bermakna, jika tidak ada tumpang-tindih di antara tiap-tiap CL 95%.

## HASIL

Keseluruhan hasil uji aktivitas *Bac. thuringiensis* H-14 dan *Bac. sphaericus* 1593 terhadap larva tiga jenis nyamuk uji *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* dan *An. aconitus* dirangkum dan disajikan dalam TABEL 1.

TABEL 1. – Aktivitas puder baku *Bacillus thuringiensis* H-14 (IPS 82) dan *Bac. sphaericus* (RB 80) terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* dan *An. aconitus* di Laboratorium (temperatur udara  $25,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ ; kelembaban relatif  $80 \pm 2\%$ )

Bioinsektisida Uji (Puder Baku)	Jenis Nyamuk Uji	$\text{LD}_{50}$ (CL 95%) ITU <sup>a)</sup>	
		24 jam	48 jam
<i>Bac. thuringiensis</i> (IPS 82)	1. <i>Ae. aegypti</i>	7,19 (5,14 – 10,05)	— <sup>b)</sup>
	2. <i>Cx. quinquefasciatus</i>	20,05 (12,84 – 31,31)	7,52 (3,98 – 14,21)
	3. <i>An. aconitus</i>	0 <sup>c)</sup>	11,25 (6,11 – 18,09)
<i>Bac. sphaericus</i> (RB 80)	1. <i>Ae. aegypti</i>	0 <sup>c)</sup>	15,78 (8,81 – 28,27)
	2. <i>Cx. quinquefasciatus</i>	15,53 (9,93 – 24,30)	8,20 (5,67 – 11,86)
	3. <i>An. aconitus</i>	0 <sup>c)</sup>	13,71 (9,11 – 20,60)

a) ITU = International Toxic Unit

b) Angka kematian larva nyamuk: 1) yang didedah = 90-100%

2) pembanding = 0%

c) Angka kematian larva nyamuk: 1) yang didedah = 0%

2) pembanding = 0%

*Bac. thuringiensis* H-14 (IPS 82) menunjukkan aktivitas yang beragam pada dua masa pendedahan (24 dan 48 jam) terhadap larva ketiga jenis nyamuk uji. Pada pendedahan selama 24 jam pola tingkatan aktivitas larvisidal *Bac. thuringiensis* H-14 terhadap larva ketiga jenis nyamuk uji itu dari tinggi ke

rendah sangat nyata, yaitu terhadap larva *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* dan *An. aconitus* ( $LD_{50}$  *Bac. thuringiensis* H-14 berturut-turut terhadap ketiga jenis nyamuk adalah 7,19 ITU, 20,05 ITU dan 0 ITU). Pada akhir masa pendedahan ini terlihat seluruh larva *An. aconitus* masih hidup, berarti mereka belum terpengaruh kerja larvisidal toksin *Bac. thuringiensis* H-14. Pada pendedahan selama 48 jam pola tingkatan aktivitas larvisidal *Bac. thuringiensis* H-14 terhadap larva ketiga jenis nyamuk uji boleh dikatakan sama dengan pola pada masa pendedahan 24 jam. Pada akhir masa pendedahan ini seluruh larva *Ae. aegypti* telah mati pada semua konsentrasi sehingga  $LD_{50}$  tidak terhitung.

Meskipun kurang nyata *Bac. thuringiensis* H-14 tampaknya sedikit lebih toksik terhadap larva *Cx. quinquefasciatus* daripada terhadap larva nyamuk *An. aconitus* ( $LD_{50}$  *Bac. thuringiensis* H-14 berturut-turut terhadap kedua jenis nyamuk itu adalah 7,52 ITU dan 11,25 ITU). Menurut urutan peringkat dari tinggi ke rendah *Bac. thuringiensis* H-14 mempunyai aktivitas larvisidal terhadap *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* dan *An. aconitus*.

*Bac. sphaericus* 1593 (RB 80) juga menunjukkan keragaman dalam aktivitasnya terhadap larva ketiga jenis nyamuk uji pada dua masa pendedahan (24 dan 48 jam). Pada pendedahan 24 jam galur *Bacillus* ini tampak paling aktif terhadap larva *Cx. quinquefasciatus*, tetapi sebaliknya, belum berpengaruh sedikit pun terhadap kedua jenis nyamuk uji lain (*Ae. aegypti* dan *An. aconitus*).  $LD_{50}$  bioinsektisida uji berturut-turut terhadap ketiga larva uji adalah 15,33 ITU, 0 ITU dan 0 ITU. Pola aktivitas larvisidal *Bac. sphaericus* 1593 pada masa pendedahan 48 jam menunjukkan kesamaan dengan keadaan pada masa pendedahan sebelumnya (24 jam), jaitu *Bac. sphaericus* paling aktif terhadap larva *Cx. quinquefasciatus* ( $LD_{50} = 8,20$ ). Aktivitas bioinsektisida uji ini terhadap larva *An. aconitus* sama dengan atau lebih kuat daripada terhadap *Ae. aegypti* ( $LD_{50}$  berturut-turut adalah 13,71 ITU dan 15,78 ITU). Menurut urutan peringkat dari tinggi ke rendah *Bac. sphaericus* 1593 memiliki aktivitas larvisidal terhadap *Cx. quinquefasciatus*, *An. aconitus* dan *Ae. aegypti*.

Dalam hal sensitivitas relatif ketiga jenis larva uji terhadap *Bac. thuringiensis* H-14 dan *Bac. sphaericus* 1593 tampak bahwa:

1. larva *Ae. aegypti* lebih sensitif dikenai pengaruh *Bac. thuringiensis* H-14 daripada pengaruh *Bac. sphaericus* 1593 (CL 95% dari *Bac. thuringiensis* H-14 dan *Bac. sphaericus* 1593 terhadap larva *Ae. aegypti* berturut-turut adalah 5,14–10,05 ITU dan 0 ITU pada masa pendedahan 24 jam);
2. larva *Cx. quinquefasciatus* setingkat sensitivitasnya terhadap kedua basili uji (misalnya pada 24 jam pendedahan CL 95% *Bac. thuringiensis* H-14 dan *Bac. sphaericus* 1593 berturut-turut adalah 12,84–31,31 ITU dan 9,93–24,30 ITU).
3. Larva *An. aconitus* didapat juga setingkat sensitivitasnya terhadap kedua jenis bioinsektisida uji (misalnya pada 24 jam pendedahan angka kematian larva nyamuk masih 0% terhadap *Bac. thuringiensis* H-14 dan *Bac. sphaericus* 1593).

## PEMBAHASAN

Dari data yang didapat dalam penelitian ini (TABEL 1) tampak bahwa aktivitas larvisidal suatu bioinsektisida bergantung kepada jenis nyamuk yang

mengjadi sasaran, dan sebaliknya, aktivitas larvisidal terhadap suatu jenis nyamuk bergantung kepada jenis atau galur basili entomopatogenik.

*Bac. thuringiensis* H-14 tampak paling aktif terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti* daripada terhadap larvae *Cx. quinquefasciatus* dan *An. aconitus*. Dipandang dari segi nyamuk uji, tingkat sensitivitas ketiga nyamuk uji terhadap *Bac. thuringiensis* H-14 dari tinggi ke rendah, maka jelas bahwa sensitivitas larva *Ae. aegypti* > *Cx. quinquefasciatus* > *An. aconitus*, pada masa pendedahan 24 dan 48 jam. Kejadian ini mirip dengan yang ditemui oleh Foo & Yap (1982) di Malaysia, yaitu *Bac. thuringiensis* H-14 paling aktif terhadap *Ae. aegypti*, kemudian menurut urutan peringkat ke yang lebih rendah *Cx. quinquefasciatus*, *An. abalabacensis*, dan *Mansonia indiana*. Uji aktivitas larvisidal ini juga mempertegas lagi bahwa *Bac. thuringiensis* H-14 sesungguhnya paling efektif terhadap larva *Ae. aegypti* sebagaimana didokumentasikan sejak lama oleh WHO (1979). Di samping itu, hasil kajian ini dapat digunakan sebagai landasan rasional untuk memilih jenis bioinsektisida ini sebagai sarana pengendalian vektor demam berdarah dengue (DBD) jika suatu saat diperlukan, khususnya di Jawa.

Dalam kondisi laboratorium yang sama *Bac. sphaericus* 1593 pada pendedahan 24 jam tampak aktif hanya terhadap larvae *Cx. quinquefasciatus*. Aktivitas larvisidal bioinsektisida ini tampaknya setara terhadap kedua jenis larvae *Aedes* dan *Anopheles*, pada kedua masa pendedahan, tetapi masih lebih rendah tingkatannya terhadap larva *Culex*. Urutan peringkat aktivitas dari tinggi ke rendah dari *Bac. sphaericus* 1593 ketiga jenis larva nyamuk menjadi *Cx. quinquefasciatus* > *An. aconitus* = *Ae. aegypti*. Hasil ini juga mempertegas lagi kejadian yang didapat sebelumnya di banyak tempat, bahwa secara umum *Bac. sphaericus* 1593 efektivitasnya terhadap *Culex* > *Anopheles* > *Aedes* (WHO, 1985). Dengan demikian bioinsektisida ini dapat menjadi pilihan yang rasional, jika suatu saat diperlukan untuk mengendalikan populasi *Cx. quinquefasciatus* dalam upaya pengendalian penyakit filariasis bancrofti di pekotaan Jawa.

Aktivitas larvisidal *Bac. thuringiensis* H-14 dan *Bac. sphaericus* 1593 terhadap larvae *Cx. quinquefasciatus* dan *An. aconitus*, tampaknya setara pada kedua masa pendedahan. Ini menunjukkan bahwa sensitivitas larvae kedua jenis nyamuk itu tidak bergantung kepada jenis atau galur bioinsektisida. Dengan demikian berdasarkan atas hasil kajian ini *Bac. thuringiensis* H-14 dan *Bac. sphaericus* 1593 dapat digunakan sebagai pilihan baik untuk pengendalian populasi larvae *Cx. quinquefasciatus* maupun *An. aconitus*. Tetapi jika diingat bahwa *Bac. sphaericus* 1593 lebih luwes aktivitasnya dan dapat berkhasiat larvisidal tinggi baik dalam lingkungan air jernih maupun air keruh, dan berkemampuan untuk berdaur ulang (WHO, 1985), sifat-sifat yang tidak dimiliki oleh *Bac. thuringiensis* H-14, maka *Bac. sphaericus* 1593 lebih diutamakan sebagai pilihan untuk pengendalian nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dan *An. aconitus*, vektor utama filariasis bancrofti dan malaria di Jawa (Gubler *et al.*, 1981; Kirnowardoyo, 1985).

Adanya keanekaragaman tanggapan berbagai jenis larva nyamuk terhadap efek larvisidal dari basili telah lama dikenal. Dalam uji kali ini formulasi *Bac. thuringiensis* H-14 (IPS 82) dan *Bac. sphaericus* 1593 (RB 80) adalah sama, sebagai puder primer dengan kekuatan sama, yaitu 1000 ITU. Cara aplikasi pendedahan, tempat dan medium air serta kedalamannya juga sama, dan dalam kondisi laboratorium yang sama pula. Dengan demikian cara kerja insektisidal kedua basili itu yang mengakibatkan perbedaan hasil *bioassay*, meskipun terhadap satu

jenis larva nyamuk, misalnya terhadap larvae *Ae. aegypti*. Di samping itu, dari pihak larva nyamuk uji terdapat perbedaan dalam hal perilaku makan. Larva *Anopheles* adalah pemakan permukaan (*surface feeder*), sedangkan larvae *Aedes* dan *Culex* berturut-turut pemakan dasar (*ground feeder*) dan pemakan bawah permukaan (*subsurface feeder*). Karena itu bila partikel-partikel bioinsektisida itu lebih banyak yang tenggelam daripada yang mengapung atau melayang, maka larva *Aedes* yang lebih banyak makan bahan insektisida itu daripada larvae *Anopheles* dan *Culex*.

Dari pengalaman ini kiranya perlu diingat bahwa formulasi bioinsektisida yang akan diaplikasikan haruslah disesuaikan dengan perlilaku makan larva nyamuk yang akan menjadi sasaran. Data dasar yang berkaitan dengan tingkat sensitivitas larva nyamuk sasaran (vektor penyakit) terhadap bioinsektisida yang akan dipakai sebagai agen pengendali, seperti yang diperoleh dalam kajian ini, sangat penting untuk pertimbangan penerapannya dalam skala yang lebih besar di lapangan pada masa diperlukan.

## KESIMPULAN

Dari hasil kajian aktivitas insektisidal *Bac. thuringiensis* H-14 dan *Bac. sphaericus* 1593 berturut-turut dalam bentuk puder baku IPS 82 dan RB 80 terhadap larvae *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* dan *An. aconitus* dalam kondisi laboratorium dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. aktivitas larvisidal *Bac. thuringiensis* H-14 (IPS 82) dalam masa pendedahan 24 dan 48 jam dalam tingkatan tinggi ke rendah terhadap nyamuk *Ae. aegypti* > *Cx. quinquefasciatus* > *An. aconitus*;
2. aktivitas larvisidal *Bac. sphaericus* 1593 (RB 80) dalam masa pendedahan 24 dan 48 jam, dalam tingkatan tinggi ke rendah, terhadap nyamuk *Cx. quinquefasciatus* > *Ae. aegypti* = *An. aconitus*;
3. dalam hal sensitivitas relatif ketiga jenis larva nyamuk terhadap *Bac. thuringiensis* H-14 dan *Bac. sphaericus* 1593:
  - a. larva *Ae. aegypti* lebih sensitif dikenai pengaruh *Bac. thuringiensis* H-14 daripada pengaruh *Bac. sphaericus* 1593;
  - b. larva *Cx. quinquefasciatus*, dan juga *An. aconitus*, tampak setingkat sensitivitasnya terhadap kedua jenis bioinsektisida.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Banyak terima kasih disampaikan kepada Prof. H. de Barjac dari Institut Pasteur, Paris, yang telah berkenan memberikan secara cuma-cuma puder baku IPS 82 dan RB 80, Kepala Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, yang memberikan kesempatan penelitian ini, dan Sdr. Djoko Trimuratno, laboran Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, yang telah membantu kolonisasi nyamuk uji.

## KEPUSTAKAAN

- Abbott, W. S. 1925 A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18(3): 265-7.
- Anon. 1988a *Bioassay Method of the Titration of Bacillus thuringiensis israelensis Preparations with IPS Standard*. Laboratoire de Lutte Bactériologique, Institut Pasteur, Paris.

- Anon. 1988b *Bioassay Method of the Titration of Bacillus sphaericus Preparations with RB 80 Standard.* Laboratoire de Lutte Bactériologique, Institut Pasteur, Paris.
- Barodji, Sularto, T., Haryanto, B., Widiarti, Pradhan, G. D., & Shaw, R. F. 1985 Life cycle study of malaria vector *Anopheles aconitus* Donitz in the laboratory. *Bul. Penelit. Kes.* 13(1): 1-7.
- De Meilon, B., & Thomas, V. 1966 *Culex pipiens 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 University 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. *SEA J. Trop. Med. Publ. Hlth* 13(2): 206-210.
- Golberg, L. S., & Margalit, J. 1977 A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenti*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News* 37(3): 355-8.
- Gubler, D. J., Suharyono, W., Lubis, I., Eram, S., & Gunarso, S. 1981 Epidemiologic dengue 3 in Central Java, associated with low viremia in man. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30(5): 1094-9.
- Joesoef, A., & Cross, J. H. 1978 Human filariae in Indonesia. *SEA J. Trop. Med. Publ. Hlth* 9(1): 15-19.
- Kirnwardoyo, S. 1985 Vector malaria di Indonesia dan status kerentanannya terhadap insektisida, dalam Soenarto (ed.): *Kumpulan Naskah Lengkap Simposium dan Diskusi Panel Malaria*, pp. 119-48. Univ. Diponegoro, Semarang.
- Mardihusodo, S. J. 1988 Pengaruh perubahan lingkungan fisik terhadap penetasan telur nyamuk *Aedes aegypti*. *B. Ked. Masy.* 4(6):185-9.
- Singer, S. 1975 Isolation and development of bacterial pathogens of vectors, dalam J. D. Briggs (ed.): *Biological Regulation of Vectors - The Saprophytic and Aerobic Bacteria and Fungi*, pp. 3-17. A Conference Report US DHEW Publ. Hlth Serv. NIH, Maryland, USA.
- World Health Organization 1979 Data sheet on the biological control agent *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 (de Barjac, 1978). *WHO/VBC/79.750*. W.H.O., Genève.
- 1980 Data sheet on the biological control agent *Bacillus sphaericus* 1593. *WHO/VBC/80.777.VBC/BCDS/80.10*. W.H.O., Genève.
- 1984 Report of the seventh meeting of the scientific working group on biological control of the vectors, pp. 1-32. *TDR/BCV/SWG-7/84.10*. W.H.O., Genève.
- 1985 Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. *TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3*. W.H.O., Genève.