

## EFIKASI *Bacillus thuringiensis* H-14 ISOLAT SALATIGA SEDIAAN BUBUK DAN CAIR TERHADAP JENTIK *Culex quinquefasciatus*

Yusnita M. Anggraeni✉, Esti Rahardianingtyas, Rendro Wianto

Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit  
Jl. Hasanudin No. 123 Salatiga, Jawa Tengah, Indonesia  
Email: raennita@gmail.com

### **EFFICACY OF SALATIGA ISOLATE *Bacillus thuringiensis* H-14 POWDER AND LIQUID PREPARATIONS AGAINST *Culex quinquefasciatus* LARVAE**

Naskah masuk : 23 April 2015 Revisi 1 : 03 Juli 2015 Revisi 2 : 22 September 2015 Naskah diterima : 30 September 2015

#### Abstrak

Filariasis merupakan salah satu penyakit tular vektor yang masih menjadi masalah di Indonesia dengan prevalensi 19% pada tahun 2009. Salah satu nyamuk yang menjadi vektor filariasis adalah *Culex quinquefasciatus*. Pengendalian nyamuk vektor dengan *Bacillus thuringiensis* H-14 (Bt H-14) isolat Salatiga sediaan cair dan bubuk merupakan salah satu cara mengendalikan filariasis secara hayati. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan efikasi Bt H-14 isolat Salatiga sediaan cair dan bubuk terhadap *Cx. quinquefasciatus*. Penelitian dilakukan dengan membuat Bt H-14 isolat Salatiga sediaan cair dan bubuk, menghitung jumlah sel dan spora pada masing-masing sediaan serta mengujikan pada jentik *Cx. quinquefasciatus* hasil pemeliharaan insektarium B2P2VRP Salatiga. Nilai kematian kemudian dianalisis menggunakan analisis Probit Hasil penelitian menunjukkan sediaan cair memiliki jumlah sel  $1,55 \times 10^8$  sel/ml sedangkan sediaan bubuk  $1,72 \times 10^6$  sel/g. Nilai  $LC_{90}$  Bt H-14 sediaan cair dan bubuk terhadap *Cx. quinquefasciatus* berturut-turut 0,056 ppm dan 10,94 ppm. Hal ini menunjukkan potensi keduanya dalam membunuh jentik *Cx. quinquefasciatus* sebagai vektor filariasis.

**Kata kunci:** *Bacillus thuringiensis*, cair, bubuk, efikasi, *Culex quinquefasciatus*,

#### Abstract

Filariasis as a vector-borne disease become a problem in Indonesia with prevalence of 19% in 2009. *Culex quinquefasciatus* is one of its vectors. Larvae control using Salatiga isolate of *Bacillus thuringiensis* H-14 liquid and powder preparations are filariasis mosquito control method. This study aimed to determine the efficacy of Bt H-14 isolates Salatiga liquid and powder preparations against *Cx. quinquefasciatus*. The study was conducted by formulating Salatiga isolate Bt H-14 liquid and powder preparation, cells and spores counting of Bt H-14 in each preparation, and conducting the toxicity assay on *Cx. quinquefasciatus* larvae. The mortality was analyzed using Probit analysis. The results showed that liquid preparations had  $1,55 \times 10^8$  cells/ml while the powder preparation had  $1,72 \times 10^6$  cells/g.  $LC_{90}$  value of Bt H-14 liquid and powder preparations against *Cx. quinquefasciatus* were respectively 0.056 ppm and 10.94 ppm. This shows the potential of both preparations in killing *Cx. quinquefasciatus* larvae as vectors of filariasis.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, liquid, powder, efficacy, *Culex quinquefasciatus*

## PENDAHULUAN

Filariasis atau biasa disebut sebagai penyakit kaki gajah merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi cacing *Filaria*. Cacing dewasa yang ada di kelenjar getah bening manusia merusak kelenjar getah bening dan akan mengakibatkan cairan getah bening tidak tersalurkan dengan baik sehingga menyebabkan pembengkakan pada tungkai dan lengan. Orang yang terkena filariasis akan mengalami kecacatan, stigma psikososial dan penurunan produktivitas. Kasus filariasis di Indonesia dilaporkan semakin bertambah setiap tahun. Tahun 2000 dilaporkan 6233 kasus filariasis di Indonesia, meningkat menjadi 11.914 kasus pada tahun 2009 yang tersebar di 401 kabupaten/kota. Prevalensi kasus filaria di Indonesia sebesar 19% sehingga diperkirakan 40 juta penduduk akan terkena penyakit ini. Berdasarkan laporan Program Pengendalian penyakit Dinas Kesehatan Jawa Tengah pada tahun 2013 berhasil ditemukan adanya kasus kronis baru di Kota Semarang, Kab. Pekalongan dan Kota Pekalongan. Total kasus kronis elephantiasis di Propinsi Jawa Tengah sebanyak 358 orang dengan jumlah kasus terbesar terjadi di Kota Pekalongan, yaitu 109 orang. (Ditjen PP&PL, 2010; Wahyono, 2010; Dinkes Jateng, 2014).

Penyakit filariasis ditularkan satu orang ke orang lain dengan perantara nyamuk vektor. Dua puluh tiga spesies nyamuk dari genus *Mansonia*, *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, dan *Armigeres* dilaporkan berpotensi sebagai vektor filariasis di Indonesia (PP&PL, 2008). *Culex quinquefasciatus* dilaporkan sebagai spesies nyamuk yang berperan sebagai vektor filariasis di Pekalongan (Febrianto *et al.*, 2008). Salah satu upaya eliminasi filariasis yang dapat dilakukan adalah pengendalian jentik nyamuk vektor filariasis. Biolarvisida *Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14) atau *Bt* H-14 merupakan salah satu alternatif pengendalian nyamuk tersebut. Bakteri *Bt* H-14 menghasilkan kristal protein pada masa sporulasi. Kristal protein akan bersifat toksik apabila termakan oleh jentik, berikatan dengan sel epitel usus dan mengakibatkan lubang pada usus sehingga jentik mati (WHO, 1999).

Balai Besar Litbang Vektor dan Penyakit Salatiga telah mengembangkan *Bt* H-14 isolat Salatiga dalam sediaan cair dan bubuk yang telah terbukti efektif mengendalikan jentik nyamuk vektor *Ae. aegypti*, *An. aconitus* dan *Cx. quinquefasciatus* (Blondine, 2003). Sediaan bubuk *Bt* H-14 efektif menurunkan kepadatan jentik *Ae. aegypti*  $\geq 80\%$  pada 23 tempat penampungan air selama 14 hari di Kelurahan Salatiga, Kecamatan Sidorejo, Kota Salatiga (Blondine & Boewono, 2007). Penelitian dilakukan untuk mengetahui efikasi pemanfaatan *Bacillus thuringiensis* isolat Salatiga

dalam sediaan cair dan bubuk dalam mengendalikan jentik nyamuk vektor filariasis *Cx. quinquefasciatus*.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, B2P2VRP pada tahun 2014. Penelitian menggunakan desain eksperimental murni dengan sampel penelitian adalah jentik nyamuk *Cx. quinquefasciatus* instar III awal. Variabel bebas adalah berbagai konsentrasi sediaan cair dan bubuk *Bt* H-14, sedangkan variabel terikat adalah jumlah kematian jentik *Cx. quinquefasciatus* ( $LC_{50}$  dan  $LC_{90}$ ).

### Bahan dan Alat

Bahan penelitian berupa isolat *Bt* H-14 asal Salatiga koleksi B2P2VRP, nutrisi agar (NA), *tryptose phosphate broth* (TPB), kapas, aluminium foil, alkohol 95%, spiritus, *naphtalene black*, *Gurrs improved* R66, akuades, *masking tape*, *tissue*, pakan jentik. Alat penelitian meliputi cawan petri, jarum ose, pipet *pasteur*, *magnetic stirrer*, autoklaf, *rotary shaker*, mikroskop, *object glass*, gelas ukur 100 ml, 250 mL dan 500 ml, sentrifus, *freeze dryer*, mikropipet, *Beaker glass*, mangkok plastik, *dipper*, *tray* plastik, senter, dan mangkok plastik.

### Cara Kerja

#### 1. Kultur dan Purifikasi *Bt* H-14 Isolat Salatiga

Isolat *Bt* H-14 ditumbuhkan pada media NA selama 48 jam, pada suhu 30°C. Selanjutnya dilakukan pengecatan koloni yang tumbuh menggunakan *naphtalene black* selama 2 menit dan *Gur's improved* R66 selama 1 menit untuk melihat keberadaan kristal protein toksin dan spora (Chilcott & Wigley, 1988). Kultur murni *Bt* H-14 dari media NA diambil 1 ose penuh, dimasukkan ke dalam 10 mL TPB (*Tryptose Phosphate Broth*) steril dan digoyang dengan *rotary shaker* selama 24 jam dengan kecepatan 175 rotasi tiap menit (rpm) pada suhu 30°C. Pengecatan dilakukan kembali untuk mengetahui kemurnian koloni *Bt* H-14. Kultur bakteri murni yang diperoleh dibiakkan kembali dengan memasukkan 5 mL kultur murni tersebut dalam 100 mL TPB. Kultur selanjutnya digoyang selama 24 jam dengan kecepatan 175 rpm pada suhu 30 °C.

#### 2. Pembuatan sediaan cair *Bt* H-14

Sebanyak 50 mL kultur murni dalam media TPB diinokulasikan pada 950 mL TPB dalam fermentor steril pada suhu 30°C dengan kecepatan 350 rpm dan aerasi sebanyak 10%. Fermentasi dilakukan selama 24 jam dalam temperatur kamar.

### 3. Pembuatan sediaan bubuk *Bt* H-14

Sediaan bubuk *Bt* H-14 dilakukan dengan cara memisahkan supernatan dari 500 mL sediaan cair *Bt* H-14. Pemisahan dilakukan dengan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Pelet yang diperoleh kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis sebanyak 2 kali. Sesudah itu dilakukan liofilisasi dengan menggunakan *freeze dryer* pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

### 4. Perhitungan Jumlah Sel Hidup *B. thuringiensis* sediaan cair (Petran et al., 2013)

Sediaan cair *Bt* H-14 isolat Salatiga diambil 1 ml, ditambahkan 9 mL akuades steril dalam tabung gelas, dikocok hingga homogen, kemudian dibuat pengenceran berseri  $10^{-1} - 10^{-10}$  (v/v) dalam akuades steril. Masing-masing pengenceran diambil 0,1 ml, dituangkan ke dalam cawan petri, dan ditambahkan nutrisi agar sebanyak 20 ml. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ . Jumlah koloni *Bt* H-14 isolat Salatiga yang tumbuh pada petri berisi nutrisi agar dihitung.

### 5. Perhitungan Jumlah Sel Hidup *B. thuringiensis* Sediaan Bubuk (Petran et al., 2013)

Sediaan bubuk *Bt* H-14 isolat Salatiga diambil 1 g, ditambahkan akuades steril hingga volume 9 mL, dikocok hingga homogen, kemudian dibuat pengenceran seri  $10^{-1} - 10^{-10}$  (v/v) dalam akuades steril. Masing-masing pengenceran diambil 0,1 mL, dituangkan ke dalam cawan petri dan ditambahkan nutrisi agar sebanyak 20 mL. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ . Jumlah koloni *Bt* H-14 isolat Salatiga yang tumbuh pada petri berisi nutrisi agar dihitung.

### 6. Penghitungan Jumlah Spora *B. thuringiensis* Sediaan Cair (Valicente et al, 2010)

Sediaan cair *Bt* H-14 isolat Salatiga diambil 1 ml, ditambahkan 9 mL akuades steril dalam tabung gelas, dikocok hingga homogen, kemudian dibuat pengenceran berseri  $10^{-1} - 10^{-10}$  (v/v) dalam akuades steril kemudian dipanaskan  $80^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Masing-masing pengenceran diambil 0,1 ml, dituangkan ke dalam cawan petri, dan ditambahkan nutrisi agar sebanyak 20 ml. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ . Jumlah koloni *Bt* H-14 isolat Salatiga yang tumbuh pada petri berisi nutrisi agar dihitung.

### 7. Penghitungan Jumlah Spora *B. thuringiensis* Sediaan Bubuk (Valicente et al, 2010)

Sediaan bubuk *Bt* H-14 isolat Salatiga diambil 1 g, ditambahkan 9 mL akuades steril dalam tabung gelas, dikocok hingga homogen, kemudian dibuat pengenceran berseri  $10^{-1} - 10^{-10}$  (v/v) dalam akuades

steril kemudian dipanaskan  $80^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Masing-masing pengenceran diambil 0,1 ml, dituangkan ke dalam cawan petri, dan ditambahkan nutrisi agar sebanyak 20 ml. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ . Jumlah koloni *Bt* H-14 isolat Salatiga yang tumbuh pada petri berisi nutrisi agar dihitung.

### 8. Uji Efikasi Sediaan Cair *Bt* H-14 di Laboratorium (WHO, 2005)

Sediaan cair *Bt* H-14 diambil 1 mL, dimasukkan dalam 99 mL akuades dan dihomogenkan. Larutan diambil 30  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 70  $\mu\text{l}$ , 90  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 300  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 700  $\mu\text{l}$  dan 900  $\mu\text{l}$  dengan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam mangkok plastik berisi air dan 20 ekor jentik *Culex quinquefasciatus* instar 3 akhir dengan volume larutan total 100 ml. Diperoleh konsentrasi akhir 3, 5, 7, 9, 10, 30, 50, 70, dan 90 ppm. Sebagai kontrol, mangkok plastik hanya diisi dengan 100 mL air tanpa penambahan sediaan cair *Bt* H-14. Setiap perlakuan diberikan ulangan 3 kali. Kematian diamati selama 24 dan 48 jam setelah pengujian. Untuk mendapatkan nilai  $\text{LC}_{50}$ ,  $\text{LC}_{90}$  dan  $\text{LC}_{95}$  *Bt* H-14, dilakukan analisis Probit (Finney, 1971; Vincent, 1980).

### 9. Uji Efikasi Sediaan Bubuk *Bt* H-14 di Laboratorium (WHO, 2005)

Sediaan bubuk *Bt* H-14 diambil 10 gram, dimasukkan ke dalam *beaker* glass 500 ml, ditambahkan 100 mL akuades, dan dikocok hingga homogen. Larutan diambil 0,1 mL dan ditambahkan 99,9 mL akuades sebagai larutan stok. Selanjutnya diambil berturut-turut sebanyak 10  $\mu\text{l}$ , 30  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 70  $\mu\text{l}$ , 90  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 300  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 700  $\mu\text{l}$  dan 900  $\mu\text{l}$  dengan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam mangkok plastik berisi air dan 20 ekor jentik *Cx. quinquefasciatus* dengan volume total 100 ml. Konsentrasi akhir yang dihasilkan berturut-turut 0,01 ppm, 0,03 ppm, 0,05 ppm, 0,07 ppm, 0,09 ppm, 0,1 ppm, 0,3 ppm, 0,5 ppm, 0,7 ppm, dan 0,9 ppm. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Sebagai kontrol, mangkok plastik hanya diisi dengan 100 mL air dan jentik. Kematian jentik diamati selama 24 dan 48 jam setelah pengujian. Untuk mendapatkan nilai  $\text{LC}_{50}$ ,  $\text{LC}_{90}$  dan  $\text{LC}_{95}$  *Bt* H-14, dilakukan analisis Probit (Finney, 1971; Vincent, 1980). Perbedaan konsentrasi antara sediaan cair dan sediaan bubuk dilakukan berdasarkan uji pendahuluan.

### 10. Analisis Data

Penghitungan kematian jentik *Cx. quinquefasciatus* sebesar 50% ( $\text{LC}_{50}$ ) dan 90% ( $\text{LC}_{90}$ ) pada uji efikasi *Bt* H-14 isolat Salatiga di

laboratorium dilakukan dengan menggunakan SPSS (Vincent, 1980).

## HASIL

### Penghitungan Jumlah Sel Hidup *Bt* H-14 Sediaan

#### Cair dan Bubuk

Hasil penghitungan jumlah sel hidup *Bt* H-14 sediaan cair dan bubuk dapat dilihat pada Tabel 1.

dilakukan oleh Blondine (2003) menunjukkan bahwa jumlah sel hidup formulasi bubuk dan cair *B. thuringiensis* H-14 sangat menentukan besar kecilnya konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh larva nyamuk.

Hal lain yang mungkin mempengaruhi perbedaan kebutuhan konsentrasi adalah jenis dan komposisi bahan pengisi pada formulasi bubuk dan cair, serta perbedaan teknologi pembuatan formulasi (Burgess, 1998). Faktor-faktor seperti instar larva, makanan, periode pemaparan

**Tabel 1. Jumlah Sel Hidup dan Sora *Bt* H-14 Sediaan Cair dan Bubuk**

Sediaan	Jumlah Sel Hidup	Jumlah Spora
Bubuk	$1,72 \times 10^9$ sel/g	$1,85 \times 10^9$ sel/g
Cair	$1,55 \times 10^8$ sel/ml	$1,9 \times 10^7$ sel/ml

### Uji efikasi di laboratorium

Hasil uji efikasi *Bt* H-14 terhadap jentik *Cx. quinquefasciatus* di Laboratorium B2P2VRP dapat dilihat pada Tabel 2.

(*exposure period*), kualitas air, suhu air, formulasi dan kepekaan masing-masing larva yang diuji, khususnya tingkat sedimentasi/pengendapan dilaporkan sangat

**Tabel 2. Uji efikasi *Bt* H-14 koleksi B2P2VRP terhadap jentik *Culex quinquefasciatus***

Sediaan	Kematian 50% dan 90% jentik setelah 24 jam pengujian	
	LC <sub>50</sub> (ppm)	LC <sub>90</sub> (ppm)
Bubuk	0,019 (0,013 - 0,025)*	0,056 (0,043 - 0,052)*
Cair	3,99 (1,17 - 5,69)*	13,055 (9,99 - 27,17)*

\* = range konsentrasi sediaan bubuk dan cair *Bt* H-14 koleksi B2P2VRP

## PEMBAHASAN

Konsentrasi sediaan bubuk *Bt* H-14 sebanyak 0,056 ppm mampu mengakibatkan kematian hingga 90% populasi setelah paparan selama 24 jam terhadap jentik *Cx. quinquefasciatus*. Nilai ini lebih kecil apabila dibandingkan dengan rekomendasi WHOPEP (2012), yaitu *Bt* H-14 sediaan granula membutuhkan konsentrasi 1-5 ppm untuk digunakan dalam jentik nyamuk *Aedes* atau *Culex*.

Sediaan cair *Bt* H-14 membutuhkan konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu 13,055 ppm untuk membunuh 90% populasi jentik *Cx. quinquefasciatus*, diduga hal ini disebabkan oleh aktivitas patogenitas yang berbeda di dalam usus tengah larva nyamuk. Penelitian yang

mempengaruhi efikasi *Bt* H-14 terhadap larva nyamuk (Becker dan Margalit, 1992).

Hasil penghitungan jumlah sel hidup dan uji efikasi menunjukkan adanya perbedaan pada masing masing sediaan. Sediaan cair memiliki jumlah sel yang lebih banyak daripada sediaan bubuk. Sediaan cair memerlukan konsentrasi yang tinggi jika dibandingkan dengan sediaan bubuk pada uji efikasi. Perbedaan ini disebabkan karena komposisi bahan dasar pembuatan dan proses pembuatan yang berbeda.

Salah satu proses pembuatan sediaan bubuk adalah tahap pengendapan dengan cara pemusingan pada 4000 rpm selama 15 menit yang berakibat pecahnya sebagian dinding sel bakteri. Isi sel termasuk kristal protein

toksin keluar dari sel. Hal ini menyebabkan jumlah sel hidup pada sediaan bubuk lebih kecil tetapi memiliki toksisitas yang lebih besar daripada sediaan cair. Hasil ini berbeda dengan penelitian Gama *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa persentase kematian larva terbanyak terdapat pada jumlah sel terbanyak. Hal lain yang mungkin berpengaruh terhadap hasil uji efikasi *Bt* H-14 terhadap jentik nyamuk adalah tingkat sedimentasi/pengendapan (Becker & Margalit, 1992). Perbedaan sediaan biolarvasida sangat berpengaruh terhadap laju pengendapannya di dalam air. Untuk jentik yang mencari makanan di dasar perairan, seperti *Culex*, hal ini tidak adanya faktor ini tidak menyebabkan kebutuhan akan peningkatan konsentrasi biolarvasida.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Uji efikasi di laboratorium menunjukkan potensi *Bt* H-14 koleksi B2P2VRP formulasi cair dan bubuk dalam membunuh jentik *Cx. quinquefasciatus* sebagai vektor filariasis, dengan konsentrasi sebesar 0,056 ppm (sediaan bubuk) dan 13,055 ppm (sediaan cair). Sediaan bubuk lebih disarankan untuk target jentik *Cx. quinquefasciatus* karena konsentrasi yang dibutuhkan lebih kecil daripada sediaan cair.

### Saran

Perlu dilakukan uji efektivitas kedua macam sediaan untuk skala yang lebih besar, yaitu uji lapangan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala, Ketua PPI B2P2VRP, Dra. Blondine Ch.P., M.Kes, dan Triwibowo A.G., M.Kes atas bimbingan dan arahan selama proses penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

Becker, N. & Margalit, J., 1992. *Control of Diptera with B. thuringiensis israelensis*, Geneva.  
Blondine, C.P., 2003. Patogenisitas 2 Formulasi (bubuk dan cair) dari *Bacillus thuringiensis* H-14 Galur Lokal Terhadap Jentik *Anopheles aconitus* dan *Culex quinquefasciatus* di dalam Laboratorium. *Jurnal Kedokteran YARSI*, 11(3), pp.24–29.  
Blondine, C.P. & Boewono, D.T., 2007. Pengendalian vektor DBD *Aedes aegypti* menggunakan

*Bacillus thuringiensis* H-14 galur lokal formulasi bubuk (Powder) di Kota Salatiga. *Jurnal Vektora*, XVII(4), pp.1–7.

- Chilcott, C.W. & Wigley, P.J., 1988. Technical note an Improved Method for Differential Staining of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Letters in Applied Microbiology*, 7, pp.67–70.
- Dinkes Jateng. Analisis Penyakit Tular Vektor di Jawa Tengah. Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Tengah 2014.
- Ditjen PP&PL, 2010. *Rencana Nasional Program Akselerasi Eliminasi Filariasis di Indonesia*, Jakarta: Kemenkes RI.
- Febrianto, B. et al., 2008. Studi Faktor Resiko Filariasis di Desa Sambirejo, Kecamatan Tirto Kabupaten Pekalongan Jawa Tengah. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 36(2), pp.48–58.
- Finney, D.J., 1971. *Probit Analysis* 3rd ed., London: Cambridge University Press.
- Gama, Z.P. et al., 2013. Toxicity studies for indigenous *Bacillus thuringiensis* isolates from Malang city, East Java on *Aedes aegypti* larvae. *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(2), pp.111–117.
- Mulla, M. et al., 1984. Efficacy and Persistence of the Microbial Agent *B. sphaericus* Against Mosquito Larvae in Organically Enriched Habitats. *Mosq. News.*, 44, pp.166–173.
- Petran, R.L., Grieme, L.E. & Foong-Cunningham, S.C.C., 2013. Culture Methods for Enumeration of Microorganisms. In S. Doores et al., eds. *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association.
- PP&PL, D., 2008. *Pedoman Program Eliminasi Filariasis di Indonesia*, Jakarta: Depkes RI.
- Valicente, F.H., Tuelher, E.D.S., Leite, M.I.S., Freire, F.L., and Vieira, C.M., 2010. Production Of *Bacillus Thuringiensis* Biopesticide Using Commercial Lab Medium And Agricultural By-Products As Nutrient Sources. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.9, n.1, p. 1-11, 2010
- Vincent, B.K., 1980. Probit Analysis. diunduh di [userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/probit/ProbitAnalysis.pdf](http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/probit/ProbitAnalysis.pdf) pada 12 September 2013.
- Wahyono, T.Y., 2010. Epidemiologi Deskriptif Filariasis di Indonesia. *Buletin Jendela*, I, pp.9–14.

WHO, 1999. *Microbial Pest Control Agent "Bacillus Thuringiensis,"* Geneva: WHO Press.  
WHO, 2005. *Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides,* WHO.

WHOPES. 2012. WHOPE Working Group Meetings. Diunduh di <http://www.who.int/whopes/recommendations/wgm/en/> pada 12 September 2013.