

PENELITIAN | RESEARCH

## Enkapsulasi *B. bassiana* menggunakan maizena dan daya infeksiya terhadap larva *Aedes aegypti*, *Anopheles sp.*, *Culex sp*

*Cornstarch-encapsulated B. bassiana and its infection on Aedes aegypti, Anopheles sp., and Culex sp.*

Mutiara Widawati<sup>1,2\*</sup>, Heni Prasetyowati<sup>2</sup>, Dewi Nur Hodijah<sup>2</sup>, Muhammad Umar Riandi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Public Health, University of Sydney, Edward Ford Building (A27), Fisher Road, NSW 2006, Australia

<sup>2</sup>Loka Litbang Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang (P2B2) Ciamis, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jl. Raya Pangandaran KM.03 Ds. Babakan Kp. Kamurang, Pangandaran 53415, Jawa Barat, Indonesia

**Abstract.** Encapsulation formulae of mycoinsecticide have to be able to maintain fungus viability and pathogenicity. This mycoinsecticide was developed as an alternative way to control mosquito borne disease. The aim of this study was to encapsulate *Beauveria bassiana* as viable storage and have the capability to kill larvae of *Aedes aegypti*, *Anopheles sp.* and *Culex sp.* Mosquito larvae obtained from laboratory reared at health research laboratory; Loka Litbang P2B2 Ciamis. The treatments made in this study were the formulation of cornstarch and controls for comparison. This study showed potential formulation of cornstarch encapsulation as a biolarvacidal. Cornstarch formulations proven to be succeed in maintaining fungus viability, however, the pathogenicity of the microcapsule still not effective to kill *Aedes*, *Culex* and *Anopheles* larvae.

**Keywords:** encapsulation, *Beauveria bassiana*, *Ae.aegypti*, *Anopheles sp.*, *Culex sp.*

**Abstrak.** Pembuatan formula bioinsektisida yang optimal sebagai salah satu alternatif untuk pengendalian nyamuk vektor perlu di kembangkan. Sediaan mikoinsektisida yang dibuat harus dapat mempertahankan viabilitas jamur *B. bassiana* sehingga masih efektif pada saat penggunaannya. Salah satu cara yang digunakan untuk menjaga kestabilan sediaan mikoinsektisida yang berdampak langsung pada viabilitas jamur adalah dengan menerapkan metode enkapsulasi. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan sediaan mikokapsul dari *Beauveria bassiana* melalui proses enkapsulasi menggunakan maizena yang memiliki kapabilitas tinggi sebagai penyimpan *B. bassiana* dan efektif dalam membunuh larva dan telur *Aedes aegypti*, *Anopheles sp.* dan *Culex sp.* Semua larva uji berasal dari insektarium laboratorium penelitian kesehatan Loka litbang P2B2 Ciamis. Pembuatan enkapsulasi dimulai dengan kultur dan pemanenan *B. bassiana*, uji viabilitas, proses enkapsulasi serta uji larvasida di laboratorium. Uji dilakukan dengan satu perlakuan dan satu kontrol untuk masing masing spesies dengan tiga kali ulangan. Pada penelitian ini dihasilkan formulasi maizena yang yang berpotensi untuk menjadi larvasida alami. Formulasi ini menghasilkan sediaan mikokapsul yang viable dalam menyimpan jamur *B. bassiana*, akan tetapi belum cukup efektif untuk menjadi salah satu alternatif pengendalian larva nyamuk *Aedes*, *Anopheles* dan *Culex*.

**Kata Kunci:** enkapsulasi, *Beauveria bassiana*, *Ae. aegypti*, *Anopheles sp.*

Naskah masuk: 24 April 2015 | Revisi: 30 Oktober 2015 | Layak terbit: 09 Desember 2015

\* Korespondensi: mwid9329@uni.sydney.edu.au | Telp/Faks: +62 (0)81220871418

## LATAR BELAKANG

Penyakit yang ditularkan oleh vektor hingga saat ini masih merupakan masalah kesehatan di beberapa negara beriklim tropis seperti Indonesia. Penyakit seperti Demam Berdarah Dengue (DBD), Malaria, Chikungunya ditularkan oleh nyamuk seperti *Aedes aegypti*, *Culex sp.* dan *Anopheles sp.*<sup>1</sup> Penyakit tersebut juga memiliki angka kematian yang cukup tinggi di beberapa daerah. Hingga saat ini, upaya pengendalian penyakit vektor seperti di atas masih difokuskan pada pemutusan rantai penularan. Cara yang dilakukan pemerintah untuk memutus rantai penularan penyakit ini diantaranya penyemprotan (*fogging*, *Insectisida Residual Spraying*) untuk nyamuk dewasa, pemberian larvasida, pengarahannya kepada masyarakat dan lain-lain.

Permasalahan baru mulai muncul ketika banyak laporan penelitian menunjukkan adanya peningkatan kekebalan nyamuk vektor terhadap insektisida yang biasa digunakan untuk *fogging* dan pemberantasan jentik nyamuk. Sehingga berbagai penelitian dilakukan untuk menanggulangi masalah ini. Salah satunya adalah penggunaan bioinsektisida sebagai agen hayati pengendali populasi nyamuk. Beberapa jenis jamur entomopatogen merupakan agen pengendali hayati terhadap beberapa serangga. Dari beberapa jenis jamur entomopatogen, jamur *Beuvaria bassiana* sudah dikembangkan di seluruh dunia untuk pengendalian berbagai serangga hama pertanian.<sup>2</sup> Selain itu *B. bassiana* juga dapat digunakan sebagai pengendali serangga vektor penyakit. *B. bassiana* dapat membunuh dan dapat mengurangi aktifitas menggigit dari *Ae. aegypti* dalam kondisi semi-lapangan dan di laboratorium.<sup>3</sup>

Isolat *B. bassiana* juga memperlihatkan potensi yang cukup berpengaruh terhadap *Culex quinquefasciatus*. Gayathri et al., menyatakan bahwa pada konsentrasi  $10^8$  *B. bassiana* mampu membunuh semua nyamuk uji *Cx. quinquefasciatus* dalam waktu 2 hari.<sup>4</sup> Bukhari et al. juga menyatakan bahwa spora *B. bassiana* (IMI- 391.510) menginfeksi dan membunuh larva nya-muk *Anopheles stephensi* dan *An. gambiae* dalam kondisi laboratorium.<sup>5</sup>

Beberapa hasil studi menunjukkan bahwa *B. bassiana* memiliki potensi untuk membunuh larva nyamuk. Tingkat kematian larva oleh jamur *B. bassiana* tergantung pada konsentrasi spora jamur, tahap larva yang ditargetkan, kepadatan larva dan jumlah nutrisi yang tersedia untuk larva. Penambahan konsentrasi spora jamur untuk mengurangi waktu paparan spora ternyata tidak menunjukkan peningkatan proporsional dan penurunan angka kematian larva. Hal ini disebabkan karena spora mengelompok bersama-

sama. Akibatnya spora tidak tersebar merata dalam media. Oleh karena itu, diperlukan adanya pengembangan formulasi yang memungkinkan spora menyebar di atas permukaan air.<sup>5</sup>

Formulasi dilakukan dengan maksud meningkatkan efikasi dari bioinsektisida. Hal ini terjadi karena formulasi dapat meningkatkan kontak dengan inang dan juga dapat melindungi zat aktif dari faktor lingkungan. Selain itu formulasi juga dimaksudkan untuk menjaga kestabilan mikoinsektisida. Salah satu formulasi yang digunakan untuk menjaga kestabilan sediaan mikoinsektisida yang berdampak langsung pada viabilitas jamur adalah dengan menerapkan metode enkapsulasi. Menurut Risch, enkapsulasi adalah suatu proses dimana satu bahan atau campuran bahan disalut atau dijebak dalam bahan atau sistem lain.<sup>6</sup> Bahan yang disalut atau dijebak biasanya sebuah cairan, tetapi dapat pula berupa partikel padat atau gas.

Penelitian mengenai formulasi enkapsulasi *B. bassiana* terhadap beberapa nyamuk vektor masih jarang dilakukan. Karena itu dianggap perlu dilakukan penelitian mengenai enkapsulasi *B. bassiana* yang menghasilkan mikokapsul stabil dan memiliki viabilitas tinggi untuk mengendalikan populasi nyamuk. Maizena merupakan salah satu bahan enkapsulasi yang mudah didapat dan mampu mempertahankan viabilitas spora jamur.<sup>7</sup> Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui viabilitas formulasi maizena untuk enkapsulasi *B. bassiana* dan daya infeksi terhadap larva *Ae. aegypti*, *Culex sp.* dan *Anopheles sp.*

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian dasar dengan desain eksperimental. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA program studi Kimia Institut Teknologi Bandung untuk pengujian bioassay, sedangkan peremajaan jamur dilakukan di tiga tempat yaitu Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik Bogor, Laboratorium Biologi Tanaman SITH ITB dan Loka Litbang P2B2 Ciamis. Karakterisasi kapsul dilakukan di Pusat Penelitian Biologi LIPI. Semua kegiatan dilakukan pada tahun 2014 dari bulan Maret hingga bulan Oktober. Populasi penelitian ini adalah Isolat *B. bassiana* produksi Balitro, larva *Ae. aegypti*, *Culex sp.* dan *Anopheles sp.* hasil kolonisasi Loka Litbang P2B2 Ciamis. Sampel penelitian adalah isolat *B. bassiana* yang tumbuh selama dilakukan kultur serta larva *Ae. aegypti*, *Culex sp.* dan *Anopheles sp.* instar III.

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah BUCHI mini spray dryer, freeze dryer, freezer, micropump, Scanning Elec-

tron Microscope (SEM), sentrifus suhu rendah, refrigerator, otoklaf, waterbath, laminar air flow, inkubator, neraca digital, magnetik stirer, vortex, mikropipet, alat gelas, ose dan Bunsen, Isolat *B. bassiana* dari Balitro, medium Potato Dextrose Agar (PDA), bahan untuk enkapsulasi yang terdiri dari isolat *B. bassiana*, Tween 80, maizena, dan bahan-bahan optimalisasi.

Sebanyak 1 ose penuh isolat *B. bassiana* diambil dan ditanamkan pada medium PDA dalam tabung reaksi. Tabung ditutup menggunakan kapas dan diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari. Setelah 5 hari jamur pertumbuhan jamur akan terlihat memenuhi media. Pelepasan spora jamur dari media padat (PDA) dilakukan dengan cara menambahkan 10 ml aquades ke dalam tabung kemudian di kocok pelan-pelan sampai jamur dalam media PDA larut di dalamnya. Hasil luruhan spora jamur ini selanjutnya disebut medium cair dan ditampung ke dalam tabung reaksi. Kumpulan spora akan terlihat mengambang di permukaan medium. Kedalam medium ditambahkan tween 80 sebanyak 20 ml dengan tujuan menghomogenkan larutan spora pada medium cair.

Untuk mengetahui viabilitas sebelum pembuatan mikokapsul, 0,1 mL suspensi cair dimasukan ke dalam tabung reaksi berisi 9,9 mL larutan pengencer steril, kemudian dilakukan pengocokan dengan vortex. Satu tetes suspensi cair diteteskan pada kaca preparat dan ditutup dengan kaca penutup serta di inkubasi selama 24 jam. Viabilitas spora ditentukan dengan cara menghitung konsentrasi spora pada bidang pandang di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali.

Enkapsulasi *B. Bassiana* menggunakan maizena dibuat dengan memasukan 75 gr tepung maizena ke dalam 500 mL larutan spora. Campuran ini kemudian di aduk sampai homogen, selanjutnya disaring dengan kertas Whatman no 40. Hasil saringannya di freeze dry/spray dry sehingga dihasilkan mikokapsul spora *B. bassiana*. Untuk uji viabilitas sesudah miko-kapsul, sebanyak 0,1 g mikokapsul dimasukan ke dalam tabung reaksi berisi 9,9 mL larutan pengencer steril (diperoleh pengenceran  $10^{-2}$ ), dilakukan pengocokan dengan vortex. Deretan pengenceran dipersiapkan sampai  $10^{-8}$ . Satu tetes suspensi cair diteteskan pada kaca preparat dan ditutup dengan kaca penutup. Agar steril, lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , viabilitas dihitung seperti pada menghitung viabilitas pada suspensi cair.

Bioassay dilakukan berdasarkan uji formulasi terhadap larva nyamuk seperti yang pernah dilakukan oleh Bukhari.<sup>8</sup> Bioassay dilakukan pada gelas uji dengan menggunakan air keran yang digunakan selama proses kolonisasi nyamuk se-

bagai media uji. Sebanyak 6 gelas uji disiapkan untuk masing masing spesies dengan satu perlakuan mikokapsul dan satu perlakuan air keran tanpa mikokapsul sebagai kontrol dan dilakukan ulangan sebanyak 3 kali. Tween 80 tidak bersifat toksik pada larva sehingga tidak digunakan sebagai kontrol, hal ini di dasarkan pada uji formulasi cair sebelumnya yang menyebutkan bahwa penggunaan Tween 80 tidak menyebabkan adanya kematian larva.<sup>7</sup> Gelas uji diisi dengan 200 ml air keran dan diaklimatisasi semalaman dan 25 larva instar tiga dihitung dan dipindahkan dari gelas uji. Jumlah larva yang mati atau menjadi pupa dicatat setiap hari hingga hari ke delapan untuk mengetahui ada tidaknya kematian akibat perlakuan yang ditandai dengan adanya hifa *B. bassiana* pada larva. Munculnya hifa dalam tubuh larva membutuhkan pengamatan sekitar 4 hari setelah kontak sehingga pengamatan sampai hari ke empat. Menurut WHO, larva dinyatakan mati jika, pada akhir jam ke 24, larva tidak bergerak bahkan setelah disentuh pelan dengan batang pengaduk.<sup>9</sup>

## HASIL

Hasil uji viabilitas spora sebelum proses enkapsulasi dihasilkan rata rata jumlah spora  $7,98 \times 10^7$ . Proses enkapsulasi terhadap spora dilakukan dengan bahan kapsul dari maizena. Proses ini menghasilkan mikokapsul dengan bentuk sediaan yang berupa serbuk halus berwarna putih seperti yang terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Karakteristik sediaan mikokapsul

Hasil uji viabilitas setelah dilakukan enkapsulasi menunjukkan rata-rata jumlah spora  $7,72 \times 10^4$ . Pengujian viabilitas ini juga memperlihatkan bahwa konsentrasi spora pada formulasi setelah melalui proses enkapsulasi berkurang dari  $10^7$  menjadi  $10^4$ .

Pengujian daya infeksi mikokapsul *B. Bassiana* terhadap larva *Ae. aegypti*, *Anopheles sp.* dan *Culex sp.* menunjukkan hasil bahwa mikokapsul mampu menginfeksi larva *Ae aegypti* dan *Culex sp.* namun tidak dapat menginfeksi larva *Anopheles sp.* Rata-rata jumlah larva yang terinfeksi untuk masing-masing spesies tercantum dalam Tabel 1.

**Tabel 1.** Rata-rata Jumlah Larva yang terinfeksi

Larva	Kontrol		Mikokapsul ( $7,72 \times 10^4$ )	
	N	Kematian	N	Kematian
<i>Aedes aegypti</i>	25	0	25	5
<i>Culex sp.</i>	25	0	25	6
<i>Anopheles sp.</i>	25	0	25	0

**PEMBAHASAN**

Proses produksi biomassa jamur *B.bassiana* dilakukan dengan membiakkan *B. bassiana* pada media PDA. Dalam proses pembiakan ini faktor sterilisasi alat, sterilisasi ruangan, suhu, kelembaban sangat berpengaruh pada pertumbuhan jamur pada media. English *et al.* (1996) dalam Putri *et al.* menyatakan pengaruh suhu terutama pada perkembangan koloni dan konidia yang berkecambah. Pada suhu tinggi koloni lebih lambat dan konidia yang berkecambah menurun. Rata-rata dalam waktu 5 hari jamur akan tumbuh memenuhi permukaan media. Pada kondisi ini jamur sudah siap panen. Pemanenan dilakukan dengan meluruhkan jamur menggunakan aquades.<sup>10</sup>

Dalam kondisi normal, spora jamur *B. bassiana* tidak mampu bercampur secara homogen dengan aquades. Kebanyakan spora jamur akan mengambang pada permukaan air. Hal ini akan menyulitkan pada saat aplikasi jamur di lapangan. Penambahan zat atau senyawa untuk menghomogenkan larutan spora ini diperlukan agar spora bisa tercampur merata di air. Penggunaan Tween 80 sebagai senyawa yang menghomogenkan larutan didasarkan pada uji formulasi cair dimana uji ini menunjukkan penggunaan Tween 80 dapat menghomogenkan larutan spora dan tidak bersifat toksik bagi larva. Larutan Tween 80 tidak memberikan angka kematian pada saat pre-larva dan saat larva tetapi memberikan efek gagal pre-pupa.<sup>7</sup> Penggunaan tween 80 sebagai bahan dalam pembuatan formulasi cair juga dilakukan oleh Indrayani *et al.*<sup>11</sup> pada penelitian efektifitas formula jamur *Beuveria bassiana* dalam pengendalian penggerek buah kapas (*Helicoverpa armigera*).

Uji viabilitas larutan spora menunjukkan konsentrasi spora sebesar  $7,98 \times 10^7$  pada medium cair tersebut. Konsentrasi dari larutan

spora ini sebenarnya masih berbeda dengan literatur dimana pabrik *B. bassiana* menggunakan konsentrasi terstandarisasi untuk *B. bassiana* sebesar  $6 \times 10^9$ . Dengan jumlah spora tersebut, larutan spora induk cair dapat digunakan sebagai bahan aktif dalam pembuatan sediaan kapsul.<sup>12</sup> Perbedaan konsentrasi larutan spora ini diduga dikarenakan proses produksi jamur *B. bassiana* tidak maksimal sehingga menghasilkan jumlah spora yang kurang dari konsentrasi standar.

Untuk aplikasi dilapangan, perlu adanya formulasi yang efektif dan efisien. Dalam penelitian ini dilakukan proses enkapsulasi spora jamur *B. bassiana*. Tujuan dari proses enkapsulasi ini, selain untuk mempermudah dalam penyimpanan dan penggunaan juga untuk menjebak konidia *B. bassiana* dalam sediaan mikokapsul. Dengan demikian, jumlah konidia nya masih efektif untuk membunuh ketiga serangga target saat diaplikasikan di lapang. Sediaan kapsul dibuat dengan metoda enkapsulasi yang terbuat dari maizena memiliki bentuk sediaan berupa serbuk halus putih. Berdasarkan daya kelarutannya bentuk formulasi dari tepung maizena mudah larut dan bercampur dalam air. Namun formulasi dari tepung maizena memberikan banyak endapan setelah dilarutkan ke dalam aquades.

Konidia bersifat hidrofob, sehingga tanpa formulasi lanjut akan mengambang di atas permukaan, diharapkan dengan formulasi enkapsulasi nyamuk yang mencari makan dibawah permukaan dapat terinfeksi. *B. bassiana* sendiri bersifat racun kontak, dimana sebagai racun kontak, insektisida yang diaplikasikan dapat menembus kutikula serangga, trachea atau kelenjar sensorik dan organ lain yang berhubungan dengan kutikula. Bahan aktif dapat saja masuk melalui lemak kutikula walaupun tidak diaplikasikan secara langsung.<sup>13</sup> Penelitian Bezalwar *et al.* menyatakan bahwa *B. bassiana* mengandung senyawa bioaktif yang mampu menghambat dan membunuh terhadap larva *Ae. aegypti* dan *Culex pipiens*.<sup>14</sup> Pereira *et al.* Menambahkan bahwa paparan larva untuk suspensi konidia mengakibatkan kematian 6-90%. Tidak semua larva yang masih hidup mampu membentuk pupa.<sup>15</sup> Beberapa larva yang terinfeksi spora *B. bassiana* menunjukkan adanya pertumbuhan hifa pada tubuhnya. Paralisis menyebabkan kehilangan koordinasi sistem gerak, sehingga gerakan serangga tidak teratur dan lama-kelamaan melemah, kemudian berhenti sama sekali.<sup>16</sup>

Dari uji viabilitas sediaan mikokapsul terlihat bahwa jumlah spora yang menurun setelah proses enkapsulasi. Hal ini diduga terjadi kerusakan spora *B. bassiana* akibat proses *freeze dry* dan proses penghalusan. Proses produksi enkapsulasi

*B. bassiana* yang didapatkan dari larutan induk yang terbuat dari Tween 80 memberikan konsentrasi rata-rata sebesar  $7,98 \times 10^7$  spora/mL. Setelah enkapsulasi konsentrasi spora rata-rata sebesar  $7,72 \times 10^4$ . Proses enkapsulasi umumnya memang menurunkan viabilitas spora. Menurut Mishra *et al.*, enkapsulasi *B. bassiana* menggunakan susu bubuk skim, polivinil piro-lidon K-90 dan glukosa sebagai aditif menunjukkan 100% perkecambahan konidia dan dipertahankan 78% viabilitas konidia, bahkan setelah penyimpanan selama 12 bulan pada 30°C.<sup>17</sup>

Konsentrasi setelah enkapsulasi sebesar rata-rata  $7,72 \times 10^4$  berpotensi untuk menginfeksi larva *Ae. aegypti* dan *Culex sp.* namun belum berhasil untuk menginfeksi larva *Anopheles sp.* Tidak berhasilnya formula ini menginfeksi *Anopheles sp.* diduga karena penggunaan Tween 80 yang menyebabkan spora cenderung tidak dipermukaan air, sedangkan larva *Anopheles* cenderung berada di permukaan air. Berbeda dengan formulasi yang menggunakan Shellsol T yang mampu menginfeksi larva *Anopheles*. Menurut Bukhari *et al.*, ShellSol T adalah pembawa efektif untuk spora jamur bila menargetkan larva *Anopheles* di bawah kondisi laboratorium dan lapangan.<sup>8</sup>

## KESIMPULAN

Formulasi enkapsulasi *B. bassiana* menggunakan maizena terbukti dapat menjadi formulasi yang *viable* untuk menyimpan jamur *B. bassiana*, akan tetapi berdasarkan uji larvasida formulasi maizena yang diuji belum cukup efektif untuk menjadi salah satu alternatif pengendalian larva nyamuk *Aedes*, *Anopheles* dan *Culex*.

Disarankan untuk melakukan penelitian pengembangan formulasi dengan bahan lain dimulai dengan proses produksi yang mampu menghasilkan konsentrasi standar dan penambahan formulasi yang menjaga agar konsentrasi spora tidak menurun pada saat pasca enkapsulasi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak ucapan terima kasih kepada para reviewer sekaligus mentor risbin IPTEKDOK, untuk saran-sarannya yang membangun. Penulis juga berterima kasih kepada para anggota peneliti Loka Litbang P2B2 Ciamis atas kontribusinya pada penelitian ini. Penelitian ini didanai oleh Balitbangkes sebagai salah satu proyek RISBIN IPTEKDOK.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Ditjen P2M&PL. Kebijakan Program P2-DBD dan Situasi Terkini DBD Indonesia. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2004
2. Shahid, A.A, A.Q.Rao, A. Bakhish, T. Husnain. Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. Arch. Biol. Sci. 2012; 64(1) : 21-42.
3. JM. Darbro, PH. Johnson, MB. Thomas, Scott A. Ritchie, Brian H. Kay, and PA. Ryan. Effects of *Beauveria bassiana* on Survival, Blood-Feeding Success, and Fecundity of *Aedes aegypti* in Laboratory and Semi-Field Conditions. Am J Trop Med Hyg. 2012; 86(4): 656-664
4. Gayathri G, Balasubramanian C, Vinayaga Moorthi P, Kubendran T. Larvacidal potential of *B. bassiana* (Balsamo) *vuillemin* and *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith on *Culex quinquefasciatus*. Journal of Biopesticides 3 (1 special issue). 2010; 147-151.
5. Bukhari T, Middelmann A, Koenraadt CJM, Takken W, Knols BGJ: Factors affecting fungus-induced larval mortality in *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. Malaria Journal. 2010; 9 : 22.
6. Risch, S. Encapsulation: Overview of uses and techniques, encapsulation and controlled release of food ingredients. American Chemical Society. 1995; 2-7.
7. Widawati M, Prasetyowati H, Riandi MU. Pengembangan Sistem Mikokapsul Lepas Lambat sebagai Bioinsektisida dengan Entomopatogen *Beauveria bassiana* terhadap Larva dan Telur *Aedes aegypti*, *Anopheles sp.*, dan *Culex sp.* Laporan Penelitian. Badan Litbang Kesehatan RI. (Unpublished). 2013
8. Bukhari, T., Takken, W., & Koenraadt, C. J. M. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. Parasites & Vectors. 2011; 4(1): 23
9. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO Press. 1981.
10. Putri MHO, Kasmara H, Melanie. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo, 1912) as a biological control agent of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Prossiding Seminar Nasional Masyarakat BioDiv Indonesia. 2015; 1 (6): 1472-1477
11. Indrayani I, Soetopo D, Hartono J. Efektifitas Formula Jamur *B. bassiana* dalam Pengendalian Penggerek Buah Kapas (*Helicoverpa armigera*). Jurnal Littri. 2013; 19 (4): 178-185
12. Ferron, P. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In H. Burgess (Ed.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases* (1970th-1980, ed., pp. 465-482). London: Academic Press. 1981.
13. Soetopo, D., Indrayani, I. Status Teknologi dan Prospek *Beauveria bassiana* Untuk Pengendalian Serangga Hama Tanaman Perkebunan Yang

- Ramah Lingkungan. *Perspektif*. 2007; 6(1): 29–46.
14. Bezalwar PM, Gomashe AV and Gulhane PA. Laboratory-based Evaluation of The Potential of *Beauveria bassiana* Crude Metabolites for Mosquito Larvae. Annihilation IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS). 2014; 9 (1):15-20
  15. César Ronald Pereira, Adriano Rodrigues de Paula, Simone Azevedo Gomes, Paulo César Oliveira Pedra Jr, Richard Ian Samuels. The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. Journal: Biocontrol Science and Technology – Biocontrol scitechnol. 2009; 19(8) : 881-886
  16. Prasad, A., & Veerwal, B.. Biototoxicity of entemopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, against early larval instars of Anopheline mosquitoes. *Jurnal of Herbal Medicine and Toxicology*; 2010 4(2); 181–188.
  17. Mishra SKP, Malik A. Preparation, characterization, and insecticidal activity evaluation of three different formulations of *Beauveria bassiana* against *Musca domestica*. Parasitol Res. 2013;112(10):3485-95.