

Isolasi dan Karakterisasi Basili Pembentuk Spora yang Patogenik Terhadap Larva Nyamuk di Jawa

Oleh: Sugeng Juwono Mardihusodo¹⁾, M. Amin Romas²⁾, Jestmandt Situmorang³⁾ dan M. Makin Ibnu Hadjar⁴⁾

¹⁾Laboratorium Parasitologi, ²⁾Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, ³⁾Laboratorium Entomologi Fakultas Biologi dan ⁴⁾Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Sugeng Juwono Mardihusodo, M. Amin Romas, Jestmandt Situmorang & M. Makin Ibnu Hadjar – *Isolation and characterization of spore-forming bacilli pathogenic for mosquito larvae in Java*

The use of chemical insecticides for controlling mosquito vector of diseases has resulted in a lot of negative impacts. The objective of this study was to search for spore-forming bacilli effective as larvicides for prospective production and being determined as one of the alternatives in the vector control strategies.

The bacilli were tried to be isolated from mosquito larvae, soil and water of various mosquito larval habitats surveyed in several areas of Yogyakarta Special Territory, Central Java and East Java. A number of 549 isolates was obtained from 203 total samples collected. Tests of pathogenicity of all isolates against early fourth stage larvae of *Culex quinquefasciatus* mosquito revealed the existence of 4 positive bacilli, namely *B. pumilus*, *B. cereus* and two new strains of *B. sphaericus*.

Key Words: spore-forming bacilli – entomopathogens – *B. pumilus* – *B. cereus* – *B. sphaericus*

PENGANTAR

Penggunaan insektisida kimiawi dengan efek residual yang lama untuk pengendalian nyamuk vektor penyakit telah terbukti menimbulkan banyak dampak negatif. Kenyataan itu telah mengubah pikiran banyak pakar dan penanggung jawab pengendalian nyamuk vektor penyakit untuk mencari pilihan di antara banyak metode pengendalian yang berdayaguna, lebih spesifik dan lebih aman, seperti cara sanitasi lingkungan, genetik dan hayati. Juga strategi kini telah berganti dari program yang vertikal ke program yang dipadukan dengan tugas-tugas pusat kesehatan masyarakat dan peningkatan peranserta masyarakat (WHO, 1984).

Salah satu pilihan yang dalam dua dasawarsa terakhir ini mendapat banyak perhatian adalah cara pengendalian vektor dengan menggunakan agen hayati yang berlaku sebagai pemangsa, parasit atau entomopatogen. Mereka sejak semula telah diakui sebagai pengatur alami terhadap fluktuasi populasi serangga,

dan akan membiarkan biota lain yang menguntungkan tidak terganggu, sehingga dengan demikian mereka tetap dilestarikan (WHO, 1984).

Kegiatan yang meningkat para pakar entomologi, mikrobiologi dan parasitologi dalam pencarian, penelitian dan pengembangan berbagai jenis entomopatogen, ditandai dengan keberhasilan besar Goldberg dan Margalit (1977). Keduanya berhasil mengisolasi *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotipe H-14 (*B. T. H-14* atau *B. t. i.*) dari habitat larva nyamuk *Culex pipiens* di Israel, yang terbukti sangat toksik tidak hanya terhadap banyak jenis larva nyamuk (Culicidae), tetapi juga terhadap larva lalat hitam (Simuliidae). Penemuan besar tersebut kemudian diikuti pula dengan penemuan-penemuan lain, antara lain *B. sphaericus* strain 1593, 2297 dan 2362 yang masing-masing diisolasi dari Indonesia (Jakarta), Sri Lanka dan Nigeria (WHO, 1985).

Meskipun tampaknya penelitian dan pengembangan entomopatogen telah demikian luas di luar Indonesia, tetapi pencarian entomopatogen baru atau galur-galur baru yang lebih toksik, lebih tahan lama dan dapat berdaur ulang (*recycling*) dan sesuai dengan ekologi vektor sasaran, masih sangat perlu (WHO, 1985, 1987). Penelitian demikian jelas sangat didambakan sebab dengan didapatkannya basili yang berpotensi tinggi sebagai larvisida di wilayah Indonesia sendiri yang masih endemik dengan penyakit malaria, filariasis dan Demam Berdarah Dengue, maka bioinsektisida itu dapat didayagunakan dan dibudidayakan sebagai pengganti insektisida DDT yang telah menimbulkan resistensi beberapa jenis nyamuk vektor malaria di Jawa dan luar Jawa (Kirnowardoyo, 1985).

Jika basili yang entomopatogenik itu ternyata lebih poten daripada *B. t. H-14* atau *B. sphaericus* yang kini tersedia, dan kemudian diproduksi secara masal, maka selain dapat dipakai dan dipasarkan di dalam negeri, maka bioinsektisida asli Indonesia itu dapat juga diekspor ke luar negeri. Jelas bioinsektisida semacam itu akan mempunyai nilai ekonomis yang tinggi bagi upaya pembangunan nasional.

Berikut ini disajikan hasil penelitian yang bertujuan mencari basili yang patogenik terhadap larva nyamuk dengan:

1. mendapati, dan mengisolasi basili pembentuk spora sebarang larva nyamuk yang berhabitat di wilayah propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Tengah dan Jawa Timur;
2. mendapati dan mengisolasi basili pembentuk spora dari sampel tanah dan air habitat larva nyamuk di lokasi-lokasi yang sama; dan
3. menguji patogenisitas isolat-isolat basili yang diperoleh terhadap larva nyamuk *Culex quinquefasciatus* Say.

BAHAN DAN CARA

Lokasi Pengumpulan Sampel

Beberapa tempat yang ditentukan lebih dahulu untuk pengumpulan sampel meliputi daerah-daerah di wilayah propinsi-propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY), Jawa Tengah dan Jawa Timur (GAMBAR 1).



GAMBAR 1.- Tempat-tempat pengumpulan sampel: 1. Kodya Yogyakarta, 2. Bantul, 3. Kulonprogo, 4. Purworejo, 5. Cilacap, 6. Jepara, 7. Semarang, 8. Klaten, 9. Magelang, 10. Merubetiri.

Bahan

Yang dijadikan subjek penelitian adalah bakteri, khususnya *Bacillus* sp. pembentuk spora yang terkandung di dalam sampel larva nyamuk, tanah dan air yang menjadi habitat larva nyamuk. Bakteri pembentuk spora genus *Bacillus* sangat terkenal untuk pengendalian hayati, karena:

1. endospora mampu hidup dalam jangka lama di alam;
2. untuk produksi masal dengan cara *submerged fermentation* sangat ekonomis, dan
3. anggota-anggota (spesies atau *strain*) kelompok bakteri ini sasarannya spesifik, tidak membahayakan lingkungan dan sama sekali tidak toksik terhadap mamalia (Singer, 1981).

Cara Kerja

Koleksi larva nyamuk

Larva berbagai jenis nyamuk dikumpulkan dari berbagai macam habitat: comberan, sawah, parit, tepi sungai, rawa, tandon-tandon air yang lama tidak dibersihkan. Larva bersama air setempat dikumpulkan dalam jerigen kecil. Setelah di *label*, dibawa ke laboratorium untuk pengerjaan lebih lanjut.

Koleksi sampel tanah dan air

Sejumlah volume tanah dan air dari habitat larva atau tempat yang dicurigai diambil dan dikumpulkan dalam pot plastik. Tiga sampel diambil untuk tiap lokasi dan habitat.

Proses pengamatan, identifikasi dan isolasi basili

Basili dari larva nyamuk

Dari hasil pengamatan awal dilakukan seleksi larvae untuk mendapati dan penelitian bakteri entomopatogenik di laboratorium. Setelah dikerjakan identifikasi larvae (genus), dikerjakan pengamatan tanda-tanda penyakit, isolasi dan identifikasi basili, menurut cara kerja Gordon *et al.* (1973) serta Poinar & Thomas (1984).

Basili dari tanah

Sampel tanah yang dikumpulkan dari lokasi survei diproses di laboratorium menurut metode WHO (1985).

Basili dari air

Sampel air dari habitat larva atau tempat lain yang dicurigai juga diproses di laboratorium menurut metode yang dimodifikasi untuk isolasi basili dari tanah (WHO, 1985).

Setelah didapat suspensi yang diperkirakan mengandung bakteri, maka urutan pengerjaan isolasi praktis sama. Suspensi dipanaskan di atas *waterbath* temperatur 65°C selama 30 menit, sehingga semua mikroorganisme mati, kecuali *Bacillus* spp. dan bakteri pembentuk spora lain.

Suspensi yang telah mendingin kemudian diencerkan secara berangakai dari 10^{-1} sampai 10^{-7} , yang masing-masing ditanam dalam media agar nutrien (AN). Setelah 20–30 menit media memadat, petri yang berisi media dibalik dan di-eramkan dalam inkubator pada suhu 30°C.

Pengamatan terhadap koloni dikerjakan sesudah pengeraman 48 jam.

Isolasi dan kultur yang murni dikerjakan dari koloni yang diperoleh pertama kali dengan menggunakan media AN miring.

Identifikasi basili dilakukan dengan membuat:

1. pengamatan pada tipe dan gambaran koloni pada media;
2. sediaan segar atau basah dari kultur isolat;
3. sediaan dari kultur isolat yang dicat Gram;
4. sediaan dari kultur isolat yang dicat menurut metode Smirnoff (1962) khusus untuk deteksi spora dan kristal parasporal;

Uji Postulat Koch

Uji patogenisitas (Postulat Koch) dilaksanakan dengan melakukan reinfeksi bakteri (*Bacillus* sp.) yang didapat dari tiap sampel terhadap instar IV larva nyamuk *Culex quinquefasciatus* yang diketahui rentan terhadap *B. sphaericus* (WHO, 1985). Larva nyamuk uji berasal dari kolonisasi di laboratorium, bermula dari nyamuk betina kenyang darah yang ditangkap di Kodya Yogyakarta.

Suspensi *Bacillus* diencerkan berangakai dari 10^{-1} sampai 10^{-7} untuk masing-masing diaplikasikan terhadap larva uji dalam konsentrasi 20 ekor/25 ml air.

Untuk tiap isolat dibuat tiga replikat dengan isolat *B. T. H-14* sebagai pembandingan I dan tanpa isolat sebagai pembandingan II. Diamati perilaku larva dan jumlah larva yang mati dalam waktu 24 jam dan 48 jam perlakuan. Postulat Koch dinyatakan positif, jika besarnya angka kematian (rata-rata) larva dari 50%.

Penegasan identitas spesies Bacillus

Isolat *Bacillus*, yang terbukti positif untuk postulat Koch dan telah diidentifikasi spesiesnya, dibuat kultur baru dan dikirim ke Lembaga Pasteur di Bandung dan juga ke Institut Pasteur (Prof. H. de Barjac) di Paris untuk penegasan nama spesies dan galurnya.

HASIL

Dari kegiatan pengumpulan sampel larva nyamuk, tanah dan air dari habitat larva nyamuk pada beberapa lokasi di tiga propinsi (GAMBAR 1), diperoleh total 203 sampel yang terdiri atas 25 sampel populasi larva nyamuk, 92 sampel tanah dan 86 sampel air dengan rincian untuk lokasi masing-masing disajikan dalam TABEL 1.

Dari 203 sampel yang didapat telah berhasil diperoleh sejumlah 549 isolat basili pembentuk spora yang terdiri atas 77 isolat dari larva nyamuk dan 236 isolat masing-masing dari sampel tanah dan air. Perincian lebih lanjut untuk tiap lokasi dan jenis sampel dirangkum dalam TABEL 2.

Dari 549 isolat basili hanya ada 4 isolat, yaitu: 23A, 25C, 51C dan 142A, yang menunjukkan postulat Koch positif. Isolat tersebut berturut-turut diidentifikasi sebagai *B. sphaericus*, *B. pumilus*, *B. sphaericus* dan *B. cereus*. Identifikasi penegasan oleh Prof. H. de Barjac (1988; Institut Pasteur, Paris) mereka berturut-turut adalah: *B. sphaericus* (strain baru), *B. pumilus*, *B. sphaericus* (strain baru) dan *B. cereus*. Keterangan lebih lanjut tentang besarnya angka kematian larva nyamuk uji, jenis sampel, jenis habitat, dan lokasi pengumpulan sampel isolat masing-masing disajikan dalam TABEL 3.

Berikut ini (DAFTAR 1) disampaikan hasil pengamatan beberapa ciri dan gambaran morfologis koloni isolat basili yang menunjukkan postulat Koch positif.

Atas dasar ciri dan gambaran morfologis tubuh *Bacillus* isolat tersebut, maka menurut Parry *et al.* (1983) isolat 25C dan 142A termasuk basili kelompok I, sedangkan isolat 23A dan 51C termasuk kelompok morfologi III.

PEMBAHASAN

Pencarian bakteri yang entomopatogenik pada penelitian ini mencakup daerah yang lebih luas, demikian pula jenis dan jumlah sampelnya jauh lebih banyak daripada penelitian serupa yang telah dikerjakan oleh Mardihusodo *et al.* (1988). Harapannya adalah agar kemungkinan diperolehnya bakteri (basili), yang kemudian hari dapat dimanfaatkan sebagai bioinsektisida, jauh lebih besar.

Selama pelaksanaan pekerjaan lapangan telah dapat dikumpulkan sejumlah 203 sampel, yang terdiri atas 25 sampel populasi larvae nyamuk (1500 ekor), 92 sampel tanah dan 86 sampel air (TABEL 1). Jumlah sampel tanah dan air relatif lebih banyak daripada sampel populasi larva nyamuk, karena kerja lapangan terpaksa dilaksanakan pada waktu menjelang dan sewaktu musim hujan. Pada waktu menjelang musim hujan (Oktober) atau akhir musim kemarau banyak sumber dan genangan air yang kering, termasuk sawah, sungai dan rawa-rawa. Sedikit sekali tempat perindukan larva nyamuk dijumpai, seperti kejadian pada kerja lapangan di Kodya Yogyakarta, Bantul, Kulonprogo, Klaten, Purworejo, Jepara dan Magelang. Pada kerja lapangan berikutnya sewaktu musim hujan tiba (Desember), hujan yang lebat dan terus-menerus menyebabkan banyak daerah terlanda banjir. Akibatnya adalah sebagian tempat perindukan nyamuk yang ada atau tersembunyi menjadi terlarut, sehingga sangat sedikit larva nyamuk yang tinggal. Kejadian ini ditemui di Cilacap, Semarang dan Merubetiri. Atas dasar kenyataan itu maka pada waktu pengumpulan sampel, kerja lebih banyak dipusat-

kan pada usaha memperbanyak jumlah sampel tanah dan air yang didapati atau kemungkinan menjadi habitat larva nyamuk.

TABEL 1.- Jenis dan jumlah sampel yang dikumpulkan dari beberapa lokasi di tiga Propinsi di Jawa

Lokasi Pengumpulan Sampel	Jenis dan Jumlah Sampel			Total
	Populasi Larva Nyamuk (Jumlah Ekor)	Tanah	Air	
<i>Propinsi DIY</i>				
Kodya Yogyakarta	1 (43)	2	2	5
Bantul	1 (65)	1	1	3
Kulonprogo	2 (31)	6	6	14
<i>Propinsi JATENG</i>				
Purworejo	5 (81)	17	15	37
Cilacap	1 (24)	3	3	7
Jepara	4 (512)	10	10	24
Semarang	2 (54)	22	22	46
Klaten	2 (41)	1	1	4
Magelang	5 (623)	4	4	13
<i>Propinsi JATIM</i>				
Merubetiri	2 (26)	26	22	50
Total	25 (1500)	92	86	203

TABEL 2.- Jumlah isolat basili yang diperoleh dan diuji patogenitasnya dari sampel larva nyamuk, tanah dan air di Jawa

Lokasi Pengumpulan Sampel	Jumlah Isolat Basili yang Diuji Patogenitasnya (Postulat Koch Positif) Dari Jenis Sampel			Total
	Larva Nyamuk	Tanah	Air	
<i>Propinsi DIY</i>				
Kodya Yogyakarta	3 (0)	7 (0)	6 (0)	16 (0)
Bantul	2 (1)	5 (0)	6 (0)	13 (1)
Kulonprogo	9 (0)	20 (0)	20 (0)	49 (0)
<i>Propinsi JATENG</i>				
Purworejo	12 (7)	44 (0)	36 (2)	92 (9)
Cilacap	0	7 (0)	10 (0)	17 (0)
Jepara	12 (0)	26 (0)	25 (0)	63 (0)
Semarang	0	48 (0)	57 (0)	105 (0)
Klaten	9 (0)	0	0	9 (0)
Magelang	25 (0)	13 (0)	14 (0)	52 (0)
<i>Propinsi JATIM</i>				
Merubetiri	5 (0)	66 (1)	62 (0)	133 (1)
Total	77 (8)	236 (1)	236 (2)	549 (11)

TABEL 3.— Catatan isolat basili yang menunjukkan Postulat Koch positif terhadap larva nyamuk *Culex quinquefasciatus* Say pada pengenceran suspensi 10^{-2} (jumlah spora: $1,7 - 2,5 \times 10^6$ org./ml)

No. Kode Isolat	Angka Kematian (%) Larva Uji (48 jam)	Jenis Sampel	Jenis Habitat	Lokasi Pengumpulan Sampel	Spesies <i>Bacillus</i>
23 A	65	Air	Tepian sungai	Pituruh, Purworejo	<i>B. sphaericus</i> (strain baru)
25 C	70	Air	Tepian sungai	Pituruh, Purworejo	<i>B. pumilus</i>
51 C	52,5	Tanah (lumpur)	Comberan	Sewon, Bantul	<i>B. sphaericus</i> (strain baru)
142 A	62,5	Tanah (lumpur)	Rawa bakau	Merubetiri	<i>B. cereus</i>

Pembanding

I. B. t. H-14 100^{ab} Teknar^{ab}

II. —

a) 24 jam

DAFTAR 1.— Ciri dan gambaran morfologis tubuh dan koloni isolat basili yang patogenik terhadap larva nyamuk

No. Kode Isolat	Ciri dan Gambaran Morfologis	
	Tubuh <i>Bacillus</i>	Koloni <i>Bacillus</i>
23 A <i>B. sphaericus</i>	Bentuk batang; spora: bulat, subterminal, sedikit menonjol; cat Gram \pm	Bulat, cembung, tepi agak rata, abu-abu, tebal, basah, diameter 3–4 mm.
25 C <i>B. pumilus</i>	Bentuk batang; spora elipsoidal, sentral, tidak menonjol; cat Gram +	Bulat, cembung, tepi kasar, abu-abu, tebal, basah, diameter 3–4 mm.
51 C <i>B. sphaericus</i>	Bentuk batang, spora: bulat, terminal, menonjol; cat Gram \pm	Bulat, cembung, tepi agak kasar, putih, tebal, keriting, diameter 3–4 mm.
142 <i>B. cereus</i>	Bentuk batang; spora: elipsoidal, sentral, menonjol; cat Gram \pm	Bulat, agak datar, tepi kasar, putih, kering, diameter 2–3 mm.

Dari total 203 sampel yang terkumpul diperoleh 549 isolat basili pembentuk spora. Uji patogenisitas seluruh isolat itu menunjukkan adanya 4 isolat positif untuk postulat Koch. Keempatnya tampaknya memberi harapan untuk diangkat sebagai kandidat bioinsektisida. Angka kematian larva uji yang diakibatkannya beragam dari 52,5–70% (TABEL 3), yang jauh lebih tinggi daripada angka kematian pada pembanding II (0%) dalam waktu 48 jam perlakuan. Isolat nomor 25C (*B. pumilus*) tampak relatif paling potensial sebagai larvisida (angka kematian 70%). Isolat tersebut diperoleh dari sampel air yang dikumpulkan dari tepi sungai di desa Kaligintung, kecamatan Pituruh, kabupaten Purworejo, *B. pumilus*, pernah pula diisolasi dari larva nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dan bersifat patogenik terhadap larva nyamuk *Aedes togoi* (Mardihusodo *et al.*, 1988).

Bila dibandingkan dengan *B. t. H-14* kekuatan larvisidal keempat isolat yang diperoleh ini memang masih jauh lebih rendah. Pada konsentrasi yang sama *B. t. H-14* dalam waktu 24 jam telah mampu membunuh semua (100%) larva uji, *Cx. quinquefasciatus*, sedangkan keempat isolat dalam waktu 48 jam mematikan larva uji hanya sebesar 52,5-70%.

Perbedaan efek insektisidal tersebut kemungkinan disebabkan oleh banyak faktor, antara lain perbedaan cara kerja antara mereka. *B. t. H-14* mengandung kristal parasporal yang toksik dan spesifik terhadap larva nyamuk (Culicidae) dan lalat hitam (Simuliidae). Bahan toksin tersebut adalah endotoksin yang apabila tertekan oleh larva nyamuk akan tergiatkan menjadi bentuk yang aktif dan menyebabkan paralisis saluran pencernaan larva nyamuk. Sebagai akibatnya larva akan berhenti makan dan akhirnya ia akan mati (Davidson, 1979).

Kerja larvisidal keempat isolat yang diperoleh tampak lebih lambat daripada kerja larvisidal *B. t. H-14*. *B. sphaericus*, *B. cereus* dan mungkin *B. pumilus* termasuk kelompok *Bacillus* yang cara kerjanya mirip dengan *B. t. H-14*, yaitu menyebabkan intoksikasi terhadap larva nyamuk yang menjadi penjamunya (Davidson, 1984). Meskipun spora dan kristal parasporal yang toksik telah tertelan dengan cepat oleh larva nyamuk, *B. sphaericus* tampak lambat mematikan larva nyamuk, yaitu setelah hampir 48 jam (WHO, 1980), jauh berbeda dari *B. t. H-14* yang kerjanya sangat cepat, yaitu hanya dalam waktu beberapa menit saja (WHO, 1979).

Crowding effect pada uji patogenisitas isolat uji tampaknya tidak ada pada larva nyamuk uji, meskipun sebenarnya rasio larva-medium cukup tinggi, yaitu 1 : 1,5. Hal itu terbukti dengan tidak adanya (0%) kematian larva nyamuk uji pada pembandingan II yang tanpa bakteri uji (TABEL 3).

Ada kemungkinan spektrum aktivitas larvisidal isolat masing-masing itu berbeda satu sama lain, dan berbeda pula dari spektrum *B. t. H-14*. Sebagai contoh *B. sphaericus* 1593 sangat aktif terhadap larva *Culex* dan *Anopheles*, tetapi kurang toksik terhadap larva *Aedes* (WHO, 1980), sedangkan *B. t. H-14* sangat toksik terhadap larva *Aedes* dan *Culex*, di samping juga terhadap larva lalat hitam (*Simulium*), tetapi kurang efektif terhadap larva *Anopheles* (WHO, 1979).

Karena itu penelitian lebih lanjut mengenai spektrum larvisidal dan segi-segi biosidal keempat isolat kandidat biosida itu perlu dikerjakan pada masa yang akan datang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktur Pusat Antar-Universitas Bioteknologi Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan dana untuk pelaksanaan penelitian ini kepada Prof. H. de Barjac dari Institut Pasteur, Paris, yang telah membantu mengidentifikasi basili isolat; dan kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

KEPUSTAKAAN

- Davidson, E. W. 1979 Ultrastructure of midgut events in the pathogenesis of *Bacillus sphaericus* strain SS II-1 infections of *Culex pipens quinquefasciatus* larvae. *Can. J. Microbiol.* 25(1): 178-84.
- 1984 Microbiology, pathology and genetics of *Bacillus sphaericus*: Biological aspects which are important to field use. *Mosquito News* 44(2-Part 1):142-52.

- Goldberg, L. J., & 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.
- Gordon, R. F., Hayne, W. C., & Hor-Nay Pang, C. 1973 *The Genus Bacillus*. *Agriculture Handbook* 427. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Washington, D. C.
- Kirnowardoyo, S. 1985 Vektor malaria di Indonesia dan status kerentanannya terhadap insektisida, dalam Soenarto (ed.): *Kumpulan Naskah Lengkap Simposium dan Panel Diskusi Malaria*, pp. 119-48. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Mardihusodo, S. J., Situmorang, J., & Romas, M. A. 1988 Percobaan isolat bakteri yang patogenik terhadap larva nyamuk di Yogyakarta. *M. Parasit. Indon.* 1 (3 - 4):47-54.
- Parry, J. M., Turnbull, P. C. B., & Gibson, J. R. 1983 *A Colour Atlas of Bacillus Species*. Wolfe Med. Pub. Ltd., London.
- Poinar, G. O., & Thomas, G. M. 1984 *Laboratory Guide to Insect Pathogens and Parasites*. Plenum Press, New York.
- Singer, S. 1981 Potential *Bacillus sphaericus* and related sporeforming bacteria for pest control, in H. D. Burges (ed.): *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*, pp. 283-98. Academic Press, London.
- Smirnof, W. A. 1962 Staining method for spores, crystals and vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Insect Pathol.* 4(1):384-5.
- World Health Organization (WHO) 1979 Data sheet on the biological control agents *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 (de Barjac 1978). *WHO/VBC/79.750 Rev. I. VBC/BCDS/79.01*, Geneva.
- 1980 Data sheet on the biological control agent *Bacillus sphaericus* strain 1593. *WHO/VBC/80.777. VBC/BCDS/80.10*, Geneva.
- 1984 Report of the Seventh Meeting of the Scientific Working Group on Biological Control of Vectors. *TDR/BCV/SWG-7/84.3*, Geneva.
- 1985 Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. *TDR/BCV/SPAERICUS/85. 3*, Geneva.
- 1987 Report of an informal consultation on the use of biological control agents for vector control programme. *WHO/VBS/TDR/87.938*, Geneva.
-