

EFIKASI *Bacillus thuringiensis* H-14 ISOLAT SALATIGA SEDIAAN CAIR TERHADAP LARVA *Aedes aegypti* DENGAN BERBAGAI KONSENTRASI SALINITAS AIR

Arief Nugroho[✉], **Rendro Wianto, Arum Trias Wardani, Esti Rahardianingtyas**
Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit Jl. Hasanudin No. 123,
Salatiga, Jawa Tengah, Indonesia
Email: ariefnugroho12@gmail.com

EFFICACY OF SALATIGA ISOLATE Bacillus thuringiensis H-14 LIQUID PREPARATION AGAINST Aedes aegypti LARVAE WITH VARIOUS WATER SALINITY CONCENTRATIONS

Naskah masuk : 12 Februari 2019 Revisi I : 13 Mei 2019 Revisi II : 09 Agustus 2019 Naskah diterima : 20 September 2019

Abstrak

Demam berdarah dengue (DBD) merupakan satu diantara penyakit tular vektor yang masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) adalah biolarvasida alternatif yang berpotensi untuk mengendalikan larva nyamuk vektor. Kendati demikian, efikasi toksik Bti umumnya dipengaruhi oleh salinitas air. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi salinitas air yang mempengaruhi efikasi Bt H-14 isolat Salatiga terhadap larva *Aedes aegypti*. Disain penelitian ini adalah laboratorium eksperimen dengan rancangan post test only group control design. Penelitian diawali dengan membuat formula cair Bt H-14 isolat Salatiga dilanjutkan menghitung jumlah sel dan spora. Efikasi formula cair terhadap larva *A. aegypti* instar III diuji dalam berbagai konsentrasi garam, yaitu 1 gr/l; 2 gr/l; 3 gr/l; 4 gr/l; dan 5 gr/l. Hasil penelitian membuktikan bahwa formula cair Bt H-14 mengandung $2,60 \times 10^7$ sel/ml dan jumlah spora mencapai $2,42 \times 10^7$ sel/ml. Hasil uji efikasi menunjukkan bahwa mortalitas larva pada air mengandung garam mencapai 87,68% dengan dosis 8 ppm pasca ditantang dengan formula cair Bt H-14 selama 24 jam. Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan air tanpa garam yang mencapai angka mortalitas hingga 100%. Hal ini mengindikasikan bahwa salinitas air tidak menurunkan tingkat efikasi formula cair Bt H-14 Isolat Salatiga dalam membunuh larva *A. aegypti*.

Kata Kunci : *Bacillus thuringiensis*, cair, efikasi, salinitas, *Aedes aegypti*

Abstract

Dengue hemorrhagic fever (DHF) is one of the vector-borne diseases remaining a health problem in Indonesia. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) is a potential alternative biolarvicide to control vector mosquito larvae. However, the efficacy of Bti toxin is generally influenced by water salinity. The objective of the study was to investigate concentration of water salinity affecting the efficacy of Bt H-14 Salatiga isolate against *Aedes aegypti* larvae. This study was an experimental laboratory with a post-test only control group design. The study was commenced by producing Salatiga isolate Bt H-14 liquid formula, followed by counting cells and spores of the Bti. Efficacy of the Bti formula against the larva of *A. aegypti* was assessed using various water salinity concentrations e.g. 1 gr/l; 2 gr/l; 3 gr/l; 4 gr/l; and 5 gr/l. The results revealed that the Bti liquid formula contained $2,60 \times 10^7$ cells/ml with number of spores was $2,42 \times 10^7$ cells/ml. The efficacy assay results showed larval mortality in a water with salt achieved 87,68% at a dose of 8 ppm after being exposed to the Bti formula for 24 hours. The result was lower compared with a water without salt treatment causing 100% mortality. It indicated that the water salinity did not significantly reduce the efficacy of the Salatiga isolate Bt H-14 liquid formula to kill *A. aegypti* larvae.

Keywords : *Bacillus thuringiensis*, liquid, efficacy, salinity, *Aedes aegypti*

PENDAHULUAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan penyakit yang sering menimbulkan masalah kesehatan karena dapat menyerang semua orang dan menimbulkan kematian khususnya pada anak-anak serta dapat menjadi wabah. Kasus endemik DBD pertama kali dilaporkan pada akhir abad ke 18 dan berdampak di Asia, Afrika, dan Amerika Utara. Selama kurun waktu 50 tahun terakhir, dampak DBD telah meningkat 30 kali lipat hingga meluas ke 100 negara di seluruh dunia. Berdasarkan laporan *World Health Organization* (WHO) diperkirakan 50 – 100 juta penderita demam dengue dan sekitar 500.000 penderita berlanjut ke arah DBD, serta sekitar 22.000 di antaranya meninggal terutama pada anak-anak (Sanyaolu et al., 2017). Demam berdarah dengue di Indonesia pada tahun 2018 telah tersebar di 34 provinsi dan 440 (85,60%) kabupaten/kota. Jumlah kasus DBD tahun 2018 sebesar 65.602 penderita dengan jumlah kasus meninggal sebesar 462 orang. *Incidence Rate* (IR) nasional tahun 2018 sebesar 24,73 per 100.000 penduduk dan angka kematian akibat DBD sebesar 0,70% (Kementerian Kesehatan RI, 2019).

Pemberantasan DBD yang efektif diutamakan untuk mengendalikan vektor karena belum ditemukan vaksin yang efektif untuk membunuh virus dengue. Pengendalian dengan cara penyemprotan menggunakan insektisida kimia dalam jangka waktu lama akan menimbulkan masalah seperti serangga vektor sasaran menjadi resistensi, pencemaran lingkungan, efek buruk pada manusia, ataupun efek buruk pada organisme non-target (Yuantari et al., 2015; Sukhthankar et al., 2014). Biolarvisida *Bacillus thuringiensis* (H-14) atau *Bt* H-14 merupakan salah satu alternatif pengendalian larva nyamuk DBD. Bakteri *Bt* akan membentuk parasporal kristal yang tersusun atas protein protoxin. Kristal protein akan bersifat toksik apabila termakan oleh larva nyamuk, berikatan dengan sel epitel usus dan mengakibatkan lubang pada usus sehingga larva mati (Ben-Dov, 2014). Toksisitas *Bt* H-14 terhadap larva nyamuk di lapangan dipengaruhi oleh faktor lingkungan antara lain adanya polutan, salinitas, partikel organik dan anorganik, serta kualitas air. Terdapat hubungan langsung antara keberadaan polutan organik dengan dosis dari *Bt* untuk membunuh larva nyamuk (Greif, 2014). Penelitian Dambach et al. (2014) di Burkina Faso menyebutkan bahwa efikasi *Bt* produk luar (VectoBac) terhadap *Anopheles spp.* nilai konsentrasi LC_{95} mengalami penurunan akibat intensitas matahari dan suhu air yang tinggi. Selain itu, beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa

larva *Aedes aegypti* dapat bertahan hidup pada kondisi salinitas tertentu yang tidak sesuai dengan kondisi aslinya. Penelitian Ramasamy et al. (2014) dan Arduino et al. (2015) menerangkan bahwa larva *Aedes aegypti* mampu bertahan hidup di daerah payau atau air asin di pesisir. Oleh karena itu, perlu adanya upaya pengendalian larva *Aedes aegypti*.

Balai Besar Litbang Vektor dan Reservoir Penyakit telah mengembangkan *Bt* H-14 isolat Salatiga berbentuk sediaan cair dan bubuk yang telah terbukti efektif membunuh larva nyamuk vektor *Aedes aegypti*, *Anopheles aconitus*, dan *Culex quinquefasciatus* (Anggraeni et al. 2015). Adanya pengaruh faktor lingkungan terhadap toksisitas *Bt*, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan konsentrasi salinitas air mempengaruhi *Bt* H-14 isolat Salatiga dalam efikasi dan patogenitasnya terhadap larva *Aedes aegypti*.

BAHAN DAN METODE

Desain penelitian ini adalah eksperimental skala laboratorium dengan rancangan *post test only group control design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, B2P2VRP pada tahun 2018. Percobaan dilakukan dengan membagi subjek dalam dua kelompok yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Sampel penelitian adalah 25 ekor larva *Aedes aegypti* instar III dengan 6 macam konsentrasi perlakuan dan 5 kali ulangan. Variabel bebas yang digunakan adalah salinitas air dengan konsentrasi yang berbeda. Salinitas air yang digunakan adalah 1 gr/l, 2 gr/l, 3 gr/l, 4 gr/l, 5 gr/l serta 0 gr/l sebagai kontrol. Variabel bebas penelitian ini adalah jumlah kematian larva nyamuk *Aedes aegypti*.

Bahan penelitian berupa isolat *Bt* H-14 asal Salatiga koleksi B2P2VRP, *Bt var. israelensis* h-14 (BACTIVEC), Nutrien agar (NA), *tryptose phosphate broth* (TPB), kapas, aluminium foil, alkohol 70%, spiritus, *naphthalene black*, *Gurrs improved R66 Giemsa*, akuades, *masking tape*, tisu, *indicator autoclave tape*, pakan larva, NaCl. Alat penelitian meliputi pH meter, refraktometer, autoklaf, inkubator, mikroskop, mikropipet, *rotary shaker*, spektrofotometer, *object glass*, cawan petri, jarum ose, mangkok enamel, mangkok plastik, pemanas bunsen, erlenmeyer 2000 ml, tabung reaksi.

Cara Kerja

1. Pembuatan sediaan cair *Bt* H-14 isolat Salatiga

Sebanyak 4 ose penuh kultur murni *Bt* h-14 isolat Salatiga dalam media NA dimasukkan pada 200 mL media TPB steril dalam erlenmeyer 2000 ml. Selanjutnya digoyang dengan *rotary shaker* selama

48 jam dengan kecepatan 175 rpm dan suhu 30°C. Selanjutnya setelah 48 jam dilakukan pengecatan koloni yang tumbuh menggunakan *naphthalene black* selama 2 menit dan *Gur's improved R66* selama 1 menit untuk melihat keberadaan kristal protein toksin dan spora.

2. Perhitungan sel hidup *B. thuringiensis* sediaan cair

Sediaan cair *Bt* H-14 isolat Salatiga diambil 1 ml kemudian ditambah 9 mL akuades steril dalam tabung reaksi. Selanjutnya tabung raksi dikocok hingga homogen. Selanjutnya dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi $10^{-1} - 10^{-8}$ (v/v) dalam akuades steril. Tiap seri pengenceran diambil 0,1 ml kemudian dituangkan dalam cawan petri dan ditambahkan nutrien agar steril sebanyak 20 ml. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Jumlah koloni *Bt* H-14 isolat Salatiga yang tumbuh pada cawan petri berisi nutrient agar dihitung.

3. Perhitungan jumlah spora *B. thuringiensis* sediaan cair (Valicente et al. 2010; Reynolds 2011)

Sediaan cair *Bt* H-14 isolat Salatiga diambil 1 ml kemudian ditambah 9 mL akuades steril dalam tabung reaksi, dikocok hingga homogen, kemudian dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi $10^{-1} - 10^{-8}$ (v/v) dalam akuades steril dan dipanaskan pada suhu 80°C selama 15 menit. Tiap seri pengenceran diambil 0,1 ml kemudian dituangkan dalam cawan petri dan ditambahkan nutrien agar steril sebanyak 20 ml. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Jumlah koloni *Bt* H-14 isolat Salatiga yang tumbuh pada cawan petri berisi nutrient agar dihitung.

4. Uji efikasi Sediaan Cair *Bt* H-14 di Laboratorium terhadap berbagai konsentrasi salinitas air

Pengujian menggunakan mangkok enamel yang diisi air sebanyak 1 liter dan larva *Aedes aegypti* instar 3 sebanyak 25 ekor. Konsentrasi salinitas air yang digunakan sebesar 1 gr/l, 2

gr/l, 3 gr/l, 4 gr/l, dan 5 gr/l. Sediaan cair *Bt* h-14 dihomogenkan selanjutnya diambil 1 µl, 5 µl, 8 µl, 10 µl, 20 µl, dan 30 µl dengan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam mangkok enamel berisi air yang telah bercampur dengan garam (NaCl) dan 25 ekor larva *Ae. aegypti* instar 3 dengan volume larutan total 1 liter sehingga diperoleh dosis akhir pemberian *Bt* H-14 isolat Salatiga sebesar 1, 5, 8, 10, 20, dan 30 ppm. Tiap-tiap konsentrasi *Bt* h-14 diujikan ke masing-masing konsentrasi salinitas air. Sebagai kontrol digunakan salinitas air 0 gr/L serta konsentrasi salinitas 1 gr/L, 2 gr/l, 3 gr/l, 4 gr/l, 5 gr/l tanpa pemberian *Bt* H-14. Setiap perlakuan diberikan ulangan 5 kali sesuai Rumus Federer. Kematian larva *Ae. aegypti* diamati selama 24 jam setelah pengujian. Hasil pengamatan kemudian dilakukan analisis Probit untuk mendapatkan nilai LC₅₀, dan LC₉₀ *Bt* h-14.

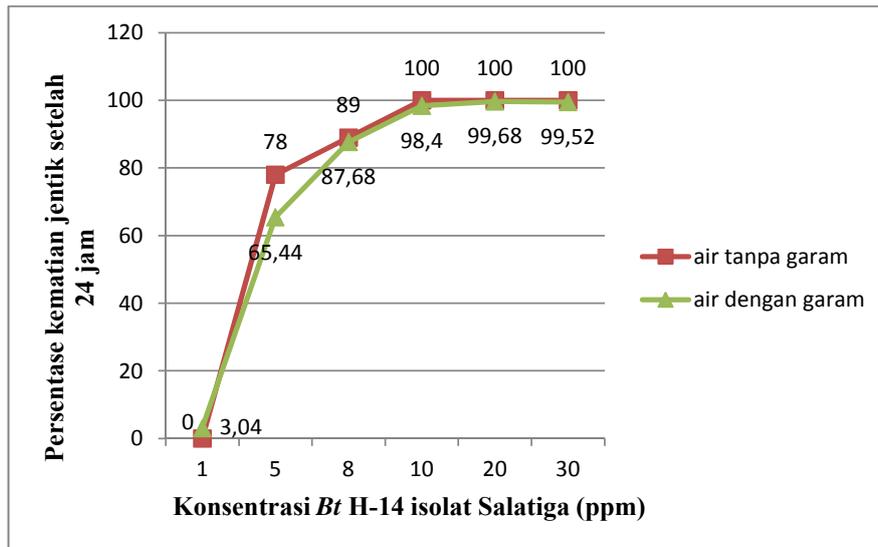
5. Analisis data

Semua analisis data menggunakan program SPSS. Penentuan nilai LC₅₀ dan LC₉₀ menggunakan analisis probit (Finney, 1971). Analisis data untuk mengetahui perbedaan konsentrasi toksisitas dari *B. thuringiensis* H-14 Isolat Salatiga pada tingkat salinitas air yang berbeda terhadap kematian larva *Aedes aegypti* menggunakan uji Kruskal Wallis dan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rerata kematian larva *Aedes aegypti* dari perbedaan tingkat salinitas air digunakan uji Mann Whitney.

HASIL

Hasil penghitungan jumlah sel hidup *Bt* H-14 isolat Salatiga sediaan cair sebanyak $2,60 \times 10^7$ sel/ml dan jumlah spora sebanyak $2,42 \times 10^7$ sel/ml sedangkan hasil penghitungan jumlah sel hidup *Bt* H-14 produk luar (BACTIVEC) sediaan cair sebanyak 5×10^8 sel/ml dan jumlah spora sebanyak $6,3 \times 10^8$ sel/ml.

Hasil uji patogenitas *Bt* H-14 isolat Salatiga terhadap larva *Ae. aegypti* dengan adanya penambahan garam (NaCl) pada air dengan pengamatan selama 24 jam dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Persentase kematian larva *Aedes aegypti* oleh Bt H-14 setelah pengujian selama 24 jam

Berdasarkan gambar 1 terlihat bahwa air dengan garam pada konsentrasi *Bti* 8, 10, 20, dan 30 ppm selama 24 jam sudah mampu membunuh larva *Ae. aegypti* antara >80% - <100%, sedangkan pada pengujian dengan air tanpa garam pada konsentrasi *Bti* 10, 20, dan 30 ppm selama 24 jam mampu membunuh larva *Aedes aegypti* hingga 100%. Hasil ini menunjukkan adanya penambahan garam pada air memberikan pengaruh terhadap konsentrasi *Bti* yang diberikan.

Hasil uji efikasi *Bt* H-14 isolat Salatiga sediaan cair terhadap larva *Ae. aegypti* dengan berbagai konsentrasi salinitas air setelah pengamatan 24 jam dapat dilihat pada tabel 1 berikut.

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa nilai LC_{90} dari tiap-tiap dosis salinitas yang diuji memiliki range yang hampir berdekatan. Hasil analisis *Kruskal Wallis* menunjukkan nilai p value sebesar 0,942 ($p > 0,05$). Hal ini berarti perbedaan tingkat salinitas pada dosis NaCl yang diuji tidak memberikan pengaruh yang bermakna terhadap konsentrasi toksisitas *B. thuringiensis* H-14 Isolat Salatiga. Hasil analisis *Mann Whitney* menunjukkan nilai p value sebesar 0,568 ($p > 0,05$). Hal ini berarti tidak ada perbedaan rata-rata kematian larva *Ae. aegypti* dari berbagai tingkat salinitas.

Tabel 1. Hasil uji efikasi *Bt* H-14 isolat Salatiga sediaan cair terhadap larva *Aedes aegypti* pada berbagai dosis salinitas

Dosis Salinitas (gr/L)	Kematian 50% dan 90% larva setelah 24 jam		<i>p value</i> Kruskal Wallis	<i>p value</i> Mann Whitney
	LC_{50} (ppm)	LC_{90} (ppm)		
1	4,097 (3,152-4,859)	8,421 (7,195-10,504)	0,942	0,568
2	4,080 (3,069-4,835)	7,769 (6,688-9,631)		
3	3,800 (2,137-5,158)	8,325 (6,179-13,705)		
4	3,830 (1,239-5,507)	7,902 (5,494-17,155)		
5	2,914 (2,104-3,738)	8,498 (6,583-11,988)		
0	3,683 (2,684-4,415)	6,876 (5,923-8,337)		

PEMBAHASAN

Hasil perhitungan jumlah sel hidup dan jumlah spora *Bt* H-14 isolat Salatiga lebih sedikit dibandingkan dengan *Bt* produk luar (Bactivec). Keberadaan spora *Bt* H-14 yang semakin banyak maka jumlah kristal toksin atau protein yang diproduksi akan semakin banyak sehingga daya bunuh terhadap larva nyamuk akan semakin besar. Kristal protein yang mengandung racun tersebut akan merusak saluran pencernaan larva nyamuk sehingga menyebabkan kematian pada larva (Palma et al., 2014; Dambach et al., 2014). Selain itu, menurut Dylo et al. (2014), daya bunuh *Bt* H-14 dipengaruhi oleh keberadaan toksin di tempat perindukan larva. Semakin lama toksin pada suatu substrat, maka akan terjadi pengendapan larvisida *Bt* H-14. Tabel 1 menunjukkan bahwa salinitas pada air tidak menunjukkan hubungan yang linier terhadap LC_{50} dan LC_{90} sediaan cair *Bt* h-14. Hal ini dibuktikan dengan analisis statistis yang dilihat dari nilai R dosis salinitas terhadap LC_{50} yaitu 0,607 dan nilai R dosis salinitas terhadap LC_{90} yaitu 0,625.

Uji pengaruh salinitas air terhadap efektivitas sediaan cair *Bt* H-14 dilakukan pada tingkat salinitas rendah karena disesuaikan dengan habitat larva *Ae. aegypti* di mana larva tersebut cenderung menempati tempat dengan salinitas air 0 permil atau salinitas rendah. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Anggraini & Cahyati (2017) yang menyebutkan bahwa larva *Ae. aegypti* hanya mampu berkembang pada salinitas air 0 gr/l – 6 gr/l. Hasil review penelitian Ramasamy et al. (2015) menunjukkan hasil berbeda yang menyebutkan bahwa larva *Ae. aegypti* mampu beradaptasi pada salinitas air yang tinggi hingga 15 ppt.

Hasil yang diperoleh dari uji patogenitas baik pada air yang tidak mengandung garam maupun yang diberi garam sama-sama menunjukkan reaksi patogenitas terhadap larva *Ae. aegypti* lebih dari 80% pada paparan 24 jam. Hal ini berkaitan dengan dosis yang diujikan. Semakin rendah konsentrasi *Bt* H-14 Isolat Salatiga yang diaplikasikan kepada larva maka rata-rata tingkat kematian larva juga semakin rendah begitu juga sebaliknya. Berdasarkan hasil pengujian didapat bahwa rata-rata kematian larva *Ae. aegypti* setelah 24 jam pada air yang mengandung garam pada dosis 10, 20, dan 30 ppm tidak mencapai 100 %, berbeda dengan air yang tidak mengandung garam pada dosis 10, 20, dan 30 ppm kematian larva mencapai 100%. Hasil ini menunjukkan bahwa salinitas sedikit berpengaruh pada penurunan toksisitas *Bt* H-14 Isolat Salatiga. Hasil ini sesuai dengan penelitian Jude et al. (2012) yang menyebutkan salinitas terbukti signifikan berdampak negatif meskipun kecil terhadap toksisitas *Bt* saat diujikan dengan larva *Ae. aegypti* di Sri Lanka. Selain itu, menurut Duchet et al.

(2014) bahwa keberadaan spora dari *Bti* dapat bertahan berbulan-bulan di lingkungan tanpa dipengaruhi oleh salinitas. Salinitas dapat mempengaruhi laju makan larva nyamuk maupun stabilitas dari toksin, akan tetapi salinitas tidak berpengaruh secara langsung terhadap kelangsungan hidup spora dari *Bti*.

Hasil analisis perbedaan tingkat salinitas terhadap konsentrasi toksisitas *B. thuringiensis* h-14 Isolat Salatiga menggunakan analisis *Kruskall Wallis* menunjukkan nilai p value sebesar 0,942 ($p > 0,05$). Hal ini berarti perbedaan tingkat salinitas pada dosis NaCl yang diuji tidak memberikan pengaruh yang bermakna terhadap konsentrasi toksisitas *B. thuringiensis* h-14 Isolat Salatiga. Walaupun pada hasilnya persen kematian larva lebih besar pada air yang tidak diberi garam untuk dosis *B. thuringiensis* H-14 sediaan cair yang sama. Hasil analisis perbedaan rerata kematian larva *Ae. aegypti* dari perbedaan tingkat salinitas menggunakan analisis *Mann Whitney* menunjukkan nilai p value sebesar 0,568 ($p > 0,05$). Hal ini berarti tidak ada perbedaan rata-rata kematian larva *Ae. aegypti* dari berbagai tingkat salinitas. Hasil ini sejalan dengan penelitian Yee et al. (2014) bahwa dalam kondisi garam tinggi, tidak mempengaruhi dalam penetasan telur maupun kelangsungan hidup larva dan pupa *Ae. aegypti*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa perbedaan kadar salinitas air yang diuji tidak berpengaruh pada toksisitas dari enam konsentrasi *Bt* H-14 isolat Salatiga sediaan cair terhadap larva *Ae. aegypti*. Dosis 8, 10, 20, dan 30 ppm dengan air yang diberi garam masih mampu membunuh larva *Ae. aegypti* dengan kematian antara >80% sampai dengan <100% setelah paparan 24 jam.

Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah dilakukan penelitian untuk mengetahui toksisitas *B. thuringiensis* H-14 sediaan cair isolat Salatiga dengan target larva berbeda yang terdapat tempat perkembangbiakan alami larva pada habitat dengan kadar salinitas tinggi.

KONTRIBUSI PENULIS

Penulis pertama berkontribusi utama sebagai pengkonsep artikel, penulis artikel, analisis data, investigasi, dan sumber daya. Penulis kedua berkontribusi anggota sebagai investigasi dan sumber daya. Penulis ketiga dan keempat berkontribusi anggota sebagai penulis artikel dan analisis data.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dra. Blondine Ch.P., M.Kes, atas bimbingan dan arahan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraeni YM, Rahardianingtyas E, Wianto R. Efikasi *Bacillus thuringiensis* H-14 Isolat Salatiga Sediaan Bubuk dan Cair Terhadap *Culex quinquefasciatus*. *Vektora*. 2015; 7(2): 51–56.
- Angraini TS, Cahyati WH. Perkembangan *Aedes aegypti* Pada Berbagai pH Air dan Salinitas Air. *Higea*. 2017; 1(3): 1–10.
- Arduino MDB, Mucci LF, Serpa LL, Rodrigues MM. Effect of salinity on the behavior of *Aedes aegypti* populations from the coast and plateau of southeastern Brazil. *J Vect Borne Disease*. 2015; 52(1): 79–87.
- Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins*. 2014; 6(4): 1222–1243.
- Dambach P, Louis VR, Kaiser A, Ouedraogo S, Sie A, Sauerborn R, Becker N. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against malaria mosquitoes in northwestern Burkina Faso. *Parasites & Vectors*. 2014; 7(371): 1–8.
- Duchet C, Tetreau G, Marie A, Rey D, Besnard G, Perrin G. Persistence and Recycling of Bioinsecticidal *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Spores in Contrasting Environments : Evidence from Field Monitoring and Laboratory Experiments. *Microbial Ecology*. 2014; 67(3): 576– 586.
- Dylo PF, Martin C, Mhango C. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bti*) on *Culex* and *Anopheline* mosquito larvae in Zomba. *Malawi journal of science and technology*. 2014; 10(1): 40–52.
- Finney D. *Probit analysis*. 3rd ed. London: Cambridge University press; 1971.
- Greif MM. 2014. Field Study on the Efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis* Tablets on the Larvae of *Aedes aegypti* in Buhisan, Cebu City, Philippines. *J Higher Educ*. 2014; 8: 152–161.
- Jude PJ, Tharmasegaram T, Sivasubramaniyam G, Senthilnathanan M, Kannathasan S, Raveendran S, Ramasamy R, Surendran SN. Salinity-tolerant larvae of mosquito vectors in the tropical coast of Jaffna, Sri Lanka and the effect of salinity on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* to *Aedes aegypti* larvae. *Parasites & Vectors*. 2012; 5(269): 1–8.
- Kementerian Kesehatan RI. Data dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia 2018. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2019.
- Palma L, Munoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*. 2014; 6(12): 3296–3325.
- Ramasamy R, Sinnathamby NS, Pavilupillai JJ, Sangaralingam D. Adaptation of Mosquito Vectors to Salinity and Its Impact on Mosquito-Borne Disease Transmission in the South and Southeast Asian Tropics. *In* *Socio-Ecological Dimensions of Infectious Diseases in Southeast Asia*; 2015. p. 107–122.
- Ramasamy R, Jude PJ, Veluppillai T, Eswaramohan T, Surendran SN. Biological Differences between Brackish and Fresh Water-Derived *Aedes aegypti* from Two Locations in the Jaffna Peninsula of Sri Lanka and the Implications for Arboviral Disease Transmission. *PLoS-ONE*. 2014; 9(8): 1–10.
- Reynolds J. Counting bacteria. 2011: pp.1–9. Sanyaolu A, Okorie C, Badaru O, Adetona K, Ahmed M, Akanbi O, Foncham J, Kadavil S, Likaj L, Raza SM, Pearce E, Sylvester R, Elizabeth E. Global Epidemiology of Dengue Hemorrhagic Fever : An Update. *J Human Virol & Reترivirology*. 2017;5(6): 1–7.
- Sukhthankar JH, Kumar H, Godinho MHS, Kumar A. Larvicidal activity of methanolic leaf extracts of plant, *Chromolaena odorata* L. (Asteraceae) against vector mosquitoes. *Intern J Mosquito Res*. 2014; 1(3):33–38.
- Valicente FH, Tuelher EDS, Leite MIS, Freire FL, Vieira CM. Production of *Bacillus thuringiensis* Biopesticide Using Commercial Lab Medium and Agricultural by-Products as Nutrient Sources. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 2010; 9(1): 1–11.
- Yee DA, Himel E, Reiskind MH, Vamosi SM. 2014. Implications of saline concentrations for the performance and competitive interactions of the mosquitoes *Aedes aegypti* (*Stegomyia aegypti*) and *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopictus*). *Med Vet Entomology*. 2014; 28(1): 60–69.
- Yuantari MGC, Widianarko B, Sunoko HR. 2015. Analisis Resiko Pajanan Pestisida Terhadap Kesehatan Petani. *J Kes. Mas*. 2015; 10(2): 239–245.