

Effectiveness of Storage Time Formulation of *Bacillus Thuringiensis* Against *Aedes aegypti* Larvae (Linnaeus)

Melanie^{1*}, Mia Miranti Rustama², Inriyani Sintia Sihotang² dan Hikmat Kasmara²

¹Doctoral student of Study Program of Environmental Sciences, Universitas Padjadjaran, Jatinangor, West Java, Indonesia, 45363

²Departement Biology, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Universitas Padjadjaran, Jatinangor, West Java, Indonesia, 45363

²Graduate of Departement Biology, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Universitas Padjadjaran, West Java, Indonesia, 45363

*Corresponding author: melie_entobio@yahoo.com

ABSTRACT

Aedes aegypti is known as the main vector of dengue fever in Indonesia which causes a high number of deaths and become an outbreak every year. This disease is generally controlled by breaking the life cycle of mosquitoes with restricted breeds and using synthetic insecticides. So far biological agents from natural enemies and natural pathogens have been developed to anticipate the negative effects of synthetic insecticides. *Bacillus thuringiensis* is well known as entomopathogenic bacteria that can control various insect pests of cultivated plants and vector insects, such as *Ae. aegypti*. *B. thuringiensis* can form endospores that produced toxin to *Ae. aegypti*, while the advantages are safe against non-target organisms such as natural predators and parasites, safe for mammals and humans and do not pollute the environment. Effective duration of *B. thuringiensis* in infecting *Ae. aegypti* is an important thing to be studied, moreover it is important to know the effectiveness of the expired formulation on the market and the residual effect. This ensures that the use of *B. thuringiensis* remains safe and does not create new problems such as *Ae. aegypti* resistance. The experimental research was used bioassay method, toxicity test was performed *B. thuringiensis* expired and non expire as comparison at concentration 0 ppm (control), 0,3 ppm; 0.1 ppm; 0.07 ppm; 0.05 ppm; 0.03 ppm; 0.01 ppm. The parameters observed were mortality for 48 hours of toxicity test that results were indicated by LC₅₀, LC₉₀ and residual values. The results obtained were LC₅₀ and LC₉₀ formulations *B. thuringiensis* expired 0.305 ppm and 1.513 ppm much higher than the non expire LC₅₀ and LC₉₀ formulations of 0.036 ppm and 0.897 ppm. The residual effect of expired *B. thuringiensis* on larvae *Ae. Aegypti* was only effective until day 12, whereas *B. thuringiensis* that non expire formulation was effectively until day 14.

Keywords : *Ae. aegypti*, *B. thuringiensis*, mortality, residual values, expired formulation

ABSTRAK

Efektivitas Waktu Simpan Formulasi *Bacillus thuringiensis* Terhadap Larva *Aedes aegypti* (Linnaeus)

Nyamuk *Aedes aegypti* dikenal sebagai vektor utama Penyakit DBD di Indonesia yang merupakan penyakit dengan tingkat kematian yang tinggi dan menjadi wabah setiap tahun. Cara pengendalian yang umum dilakukan dengan memutus siklus hidup nyamuk melalui membatasi perkembangbiakan nyamuk serta menggunakan insektisida sintetik. Pengendalian hayati yang menekan efek negatif insektisida sintetik sejauh ini dikembangkan dari musuh alami nyamuk baik predator maupun entomopatogen. Musuh alami dari jenis bakteri entomopatogen *Bacillus thuringiensis* telah lama dikenal mampu mengendalikan berbagai serangga hama tanaman budidaya maupun serangga vektor penyakit, diantaranya *Ae. aegypti*. *B. thuringiensis* memiliki metabolit sekunder yang di produksi oleh endosporanya yang bersifat toksik terhadap nyamuk *Ae. aegypti*, kelebihan adalah aman terhadap organisme non target seperti predator dan parasit alami, aman bagi mamalia maupun manusia serta tidak mencemari lingkungan. Rentang waktu efektivitas *B. thuringiensis* dalam menginfeksi *Ae. Aegypti* hal yang penting untuk diteliti terlebih lagi penting mengetahui efektivitas dari formulasi yang telah lewat masa simpan di pasaran serta efek residunya. Hal ini yang memastikan penggunaan *B. thuringiensis* tetap aman dan tidak menimbulkan masalah baru yaitu resistensi nyamuk *Ae. Aegypti*. Melalui penelitian yang menggunakan metode eksperimental dengan *bioassay*, dilakukan uji toksisitas *B. thuringiensis* kadaluarsa dan tidak kadaluarsa sebagai pembandingan pada konsentrasi 0 ppm (kontrol), 0,3 ppm; 0,1 ppm; 0,07 ppm; 0,05 ppm; 0,03 ppm; 0,01 ppm. Parameter yang diamati mortalitas selama 48 jam pengujian yang ditunjukkan oleh nilai LC₅₀ dan LC₉₀ selama 48 jam, dan nilai residu. Hasil yang diperoleh adalah LC₅₀ dan LC₉₀ formulasi *B. thuringiensis* yang kadaluarsa 0,305 ppm dan 1,513 ppm jauh lebih tinggi dari nilai LC₅₀ dan LC₉₀ formulasi yang tidak kadaluarsa yaitu 0,0363 ppm dan 0,8971 ppm. Efek residu *B. thuringiensis* yang kadaluarsa terhadap larva *Ae. Aegypti* efektif hanya hingga hari ke-12, adapun *B. thuringiensis* yang tidak kadaluarsa efektif hingga hari ke-14.

Kata kunci: *Ae. aegypti*, *B. thuringiensis*, mortalitas, efek residu, kadaluarsa

PENDAHULUAN

Aedes aegypti merupakan vektor utama dalam penyebaran penyakit Demam Berdarah Dengue (Depkes, 2007). Penyakit ini menimbulkan kematian yang cukup tinggi setiap tahun, sampai saat ini vaksin Virus Demam Berdarah Dengue (DBD) masih terus

dikembangkan dan belum umum digunakan, sehingga salah satu cara pencegahannya adalah dengan memutuskan rantai penularan dengan memberantas vektornya (Fathi dkk. 2005). Usaha penanggulangan umumnya melalui pengendalian nyamuk dengan *fogging*, yaitu pengasapan yang dilakukan dengan

ultra low volume (ULV) (Boesri 2008). Penanggulangan terhadap larva nyamuk dilakukan dengan penebaran abate sebagai larvasida pada tempat pembiakan nyamuk (Depkes, 2007). Penggunaan insektisida kimiawi secara umum dirasa sangat berhasil dalam mengendalikan serangga vektor penyakit seperti nyamuk, namun penggunaan insektisida yang terus menerus akan menyebabkan resistensi nyamuk, meninggalkan residu dan mengganggu kesehatan seperti gangguan pernafasan dan iritasi kulit.

Upaya pengendalian nyamuk dikembangkan pula melalui pengendalian hayati menggunakan bio agen yang merupakan patogen serangga, diantaranya menggunakan bakteri entomopatogen *Bacillus thuringiensis*. Bakteri ini berbentuk batang, gram positif, dapat membentuk endospora yang menghasilkan kristal protein. Kristal protein merupakan kelas endotoksin delta yang dikenal dengan protein atau toksin *Cry*. Dalam tubuh serangga toksin tersebut mengakibatkan kematian, oleh karena itu, *Cry* dapat dimanfaatkan sebagai insektisida alami. Keuntungan dalam pemanfaatan kristal protein tersebut, bersifat toksik bagi larva nyamuk, namun tidak mencemari lingkungan dan aman terhadap organisme lain termasuk mamalia.

Penelitian terkait pemanfaatan *B.thuringiensis* telah banyak dilakukan diantaranya oleh Weyai (2004) yang menggunakan *B.thuringiensis israelensis* untuk melihat pengaruh mortalitasnya terhadap larva *Ae. Aegypti* melalui nilai LC₅₀ dalam 24 dan 48 jam. Widyastuti, dkk (1995) menguji kristal endotoksin *B.thuringiensis* H-14 selama 24 jam untuk mengetahui nilai LC₅₀ 90 jam, yaitu sebesar 0,06 ppm. *B. thuringiensis* saat ini telah diformulasi dan dipasarkan, diantaranya formulasi Vectobac® dan VCRC B17®, yang biasa digunakan dengan dosis 1 sampai 25 mg/L di tempat-tempat penampungan air untuk mengendalikan populasi larva/jentik nyamuk dalam waktu 16 sampai 60 hari. Akan tetapi seringkali faktor penyimpanan mempengaruhi kualitas dari formulasi dan ditemukan formulasi yang sudah kadaluarsa. Formulasi yang sudah kadaluarsa mengakibatkan rendahnya efektifitas sehingga kematian larva rendah dan hal ini berpotensi memicu terjadinya resistensi larva nyamuk terhadap formulasi *B. thuringiensis*.

Melalui penelitian ini dilakukan uji efektifitas formulasi *B. thuringiensis* Vectobac® yang sudah kadaluarsa lebih dari 14 hari tanggal *expired* (H-14) dibandingkan dengan yang tidak kadaluarsa terhadap persentase mortalitas larva, yang dilihat dari nilai LC₅₀ dan LC₉₀ 48 jam serta efek residunya. Hal ini untuk melihat sejauh mana penurunan toksisitas dari formulasi *B. thuringiensis* kadaluarsa dibandingkan yang tidak kadaluarsa.

BAHAN DAN METODE

Metode yang digunakan dalam penelitian adalah eksperimental dengan uji hayati (*bioassay*

test), dengan 7 taraf dan 3 kali pengulangan yaitu : 0 ppm (Kontrol); 0,3 ppm; 0,1 ppm ; 0,07 ppm : 0,05 ppm, 0,03 ppm, 0,01 ppm (Weyai, 2004)

2.1 Uji hayati mortalitas

100 mL suspensi formulasi *B. thuringiensis* VectoBac® (kadaluarsa H-14 dan tidak kadaluarsa) masing-masing diujikan terhadap terhadap 10 ekor larva pada 7 taraf konsentrasi. Parameter yang diamati adalah persentase kematian larva yang telah didedahkan selama 48 jam setelah perlakuan. Analisis data menggunakan analisis probit (Finney, 1971) untuk mendapat nilai LC₅₀ pada 48 dan 90 jam.

1.2. Uji hayati residu

Suspensi formula *B. thuringiensis* yang menyebabkan LC₉₀ 48 jam ditambahkan 100 mL aquades diinfeksi terhadap 10 ekor larva nyamuk, diamati tiap periode 48 jam untuk dicatat jumlah larva yang mati, dan pengamatan dihentikan bila telah tercapai 70 % kematian larva.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini formulasi *B. thuringiensis* yang diujikan terdiri dari 2 kategori yaitu Formulasi *B. thuringiensis* yang sesuai waktu penggunaan dan formulasi yang telah kadaluarsa (1 bulan dari *expired date* / batas tanggal kadaluarsa). Hasil uji mortalitas dari setiap konsentrasi *B. thuringiensis* tidak kadaluarsa dan kadaluarsa pada larva nyamuk *Ae. aegypti* dapat dilihat pada Tabel 3.1

Dari Tabel 3.1 dapat dilihat bahwa mortalitas larva dalam waktu pengamatan 48 jam dengan konsentrasi tertinggi 0.3 ppm mortalitas larva tidak mencapai 100%. Mortalitas 50% terjadi pada larva yang diinfeksi formulasi *B. thuringiensis* kadaluarsa dengan konsentrasi 0.3 ppm adapun pada formulasi yang tidak kadaluarsa mortalitas 50% larva terjadi pada konsentrasi yang jauh lebih rendah (0.05 ppm). Data ini menunjukkan bahwa dengan konsentrasi yang lebih kecil, formulasi *B. thuringiensis* yang tidak kadaluarsa sudah efektif membunuh larva nyamuk 50% dibandingkan dengan formulasi *B. thuringiensis* yang kadaluarsa.

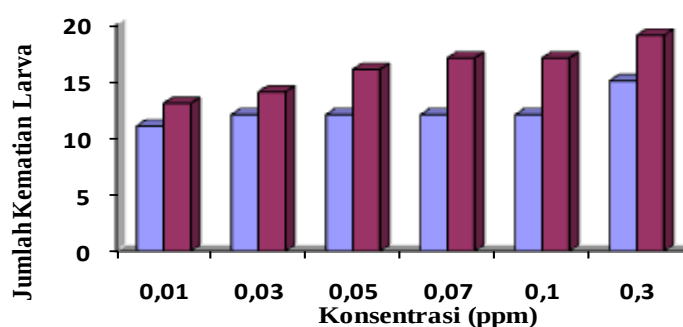
Pada penelitian diketahui pula bahwa peningkatan konsentrasi formulasi *B. thuringiensis* yang kadaluarsa (0,03 ppm – 0,1 ppm) tidak terlalu berpengaruh terhadap mortalitas larva ditunjukkan oleh nilai mortalitas yang tetap sebesar 40%, berbeda dengan formula yang tidak kadaluarsa semakin tinggi konsentrasi tingkat kematian pun semakin tinggi. Dengan demikian diketahui formulasi *B.thuringiensis* yang kadaluarsa telah mengalami penurunan efektifitas terhadap kematian larva *Ae. Aegypti*.

Larva *Ae.aegypti* pada Formulasi *B. thuringiensis* yang kadaluarsa dan tidak kadaluarsa Pada penelitian ini dilakukan penentuan konsentrasi yang tepat untuk menyebabkan LC₅₀ dan LC₉₀ dari *B. thuringiensis* yang kadaluarsa dan tidak kadaluarsa terhadap uji larva. Berikut ini nilai LC₅₀ dan LC₉₀ dari *B. thuringiensis* yang kadaluarsa dan tidak kadaluarsa

terhadap larva pada waktu 48 jam yang disajikan pada Tabel 3.2.

Tabel 3.1. Mortalitas Larva *Ae. aegypti* yang diinfeksi *B. thuringiensis* yang kadaluarsa dan yang tidak kadaluarsa

Konsentrasi	Jumlah Larva Uji (ekor)	Mortalitas Larva pada Formulasi yang Kadaluarsa (%)	Mortalitas Larva pada Formulasi yg tdk Kadaluarsa (%)
Kontrol	30	0	0
0,3 ppm	30	50	63,3
0,1 ppm	30	40	56,6
0,07 ppm	30	40	56,6
0,05 ppm	30	40	53,3
0,03 ppm	30	40	46,6
0,01 ppm	30	36,6	43,3



Gambar. 3.1 : Grafik Perbandingan Jumlah Kematian

Tabel 3.2. Nilai LC₅₀ dan LC₉₀ 48 Jam dari formulasi *B. thuringiensis* yang kadaluarsa dan yang tidak kadaluarsa

Jenis Formulasi	LC ₅₀ (ppm)	LC ₉₀ (ppm)
<i>B. thuringiensis</i> yang kadaluarsa	0,305	1,513
<i>B. thuringiensis</i> yang tidak kadaluarsa	0,036	0,897

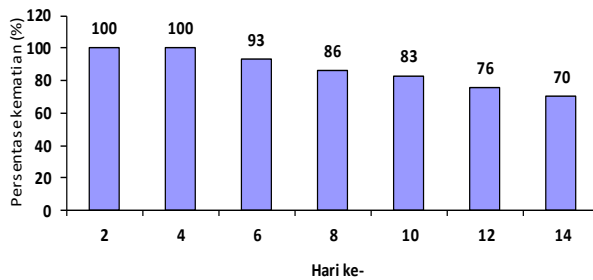
Formulasi *B.thuringiensis* yang tidak kadaluarsa dengan konsentrasi yang lebih rendah telah memiliki efek toksisitas terhadap larva *Ae.aegypti*, dibandingkan formulasi *B. thuringiensis* yang kadaluarsa. Dari Nilai LC₅₀ & LC₉₀ 48 jam formulasi tidak kadaluarsa lebih toksik dibandingkan dengan *B. thuringiensis* yang kadaluarsa. Hal ini diduga terjadi karena kualitas dan kuantitas toksin dari formulasi *B. thuringiensis* yang kadaluarsa mengalami penurunan karena sudah melewati masa simpan. Kedua formulasi *B. thuringiensis* tersebut memiliki cara kerja yang sama dalam menyerang larva *Ae. aegypti*, akan tetapi konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% dan 90% berbeda. Konsentrasi formulasi *B. thuringiensis* dilihat dari nilai LC₅₀ 48 jam. Toksisitas Formulasi *B. thuringiensis* yang kadaluarsa berkurang 5 kali lipat dibandingkan

dengan formulasi *B. thuringiensis* yang belum kadaluarsa.

Uji Residu *B. thuringiensis* terhadap larva *Aedes aegypti*

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui waktu kematian yang diperlukan residu *B. thuringiensis* yang dapat mematikan larva sampai 70% dari jumlah awal larva. Pengamatan dilakukan tiap 48 jam. Konsentrasi *B. thuringiensis* yang digunakan adalah LC₉₀ 48 Jam yang diperoleh dari uji hayati. Kematian larva hingga hari ke-2 (48 jam pertama) sebesar 100% terus menurun sampai dengan 70% di hari ke-14 (Gambar.3.2) untuk formulasi tidak kadaluarsa adapun untuk formulasi yang kadaluarsa formulasi *B. thuringiensis* efektif mengakibatkan kematian larva hingga 70% hanya sampai hari ke-12

dan tidak terjadi kematian 100% di 48 jam pertama pengujian (Gambar 3.3). Hal ini menunjukkan bahwa toksin *B. thuringiensis* yang tidak kadaluarsa lebih



Gambar.3.2 : Grafik Persentase Kematian Larva *Ae.aegypti* Pada Uji Residu Formulasi *B. thuringiensis* yang Tidak Kadaluarsa

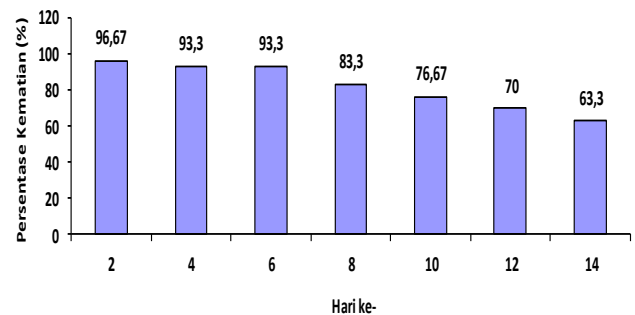
Larvasida *B. thuringiensis* di dalam suspensi dapat menurun toksisitasnya diantaranya disebabkan oleh perubahan pH. Protein endotoksin yang terdapat di *B. thuringiensis* sangat sensitif terhadap paparan sinar ultraviolet (Mulla, 1985). Ada beberapa faktor yang turut serta mempengaruhi kemampuan formulasi *Bacillus thuringiensis* dalam membunuh larva. Adapun faktor-faktor tersebut adalah:

Faktor Pertama disebabkan kebiasaan makan dari larva *Aedes aegypti*, larva *Ae.aegypti* ini mempunyai kebiasaan mengambil makanan di dasar dan dinding tempat penampungan air (*bottom feeders*). Hal ini dapat mempengaruhi daya bunuh spora *B. thuringiensis* dimana kebiasaan makan larva tersebut dengan keberadaan endapan dari spora *B.thuringiensis*.

Faktor Kedua disebabkan tersedianya toksin di daerah makan larva (*larval feeding zone*). Keberadaan toksin dari *B.thuringiensis* pada daerah makan larva tersebut sangat mempengaruhi daya bunuhnya. Larva yang mengambil makan pada dasar penampungan akan lebih cepat mati dibandingkan yang makan di daerah permukaan saja. Dilaporkan bahwa jumlah spora bakteri *B.thuringiensis* adalah sama banyak dipermukaan dan dasar air pada hari ke 3 dan ke 7 sesudah aplikasi (Blondine, 2004).

Faktor Ketiga disebabkan oleh tingkat kerentanan larva terhadap toksin yang dihasilkan Masing-masing larva memiliki kerentanan yang berbeda-beda terhadap konsentrasi toksin dari *B.thuringiensis*. Tingkat instar larva dari I, II, III dan IV memiliki daya tahan terhadap toksin juga berbeda. Hal ini juga menyebabkan perbedaan konsentrasi toksin yang harus diberikan terhadap larva tersebut. Dilaporkan bahwa besar kecilnya konsentrasi *B.thuringiensis* dalam mematikan larva, tergantung pula pada tingkat

bertahan disuspensi dibandingkan Formulasi *B. thuringiensis* yang sudah kadaluarsa.



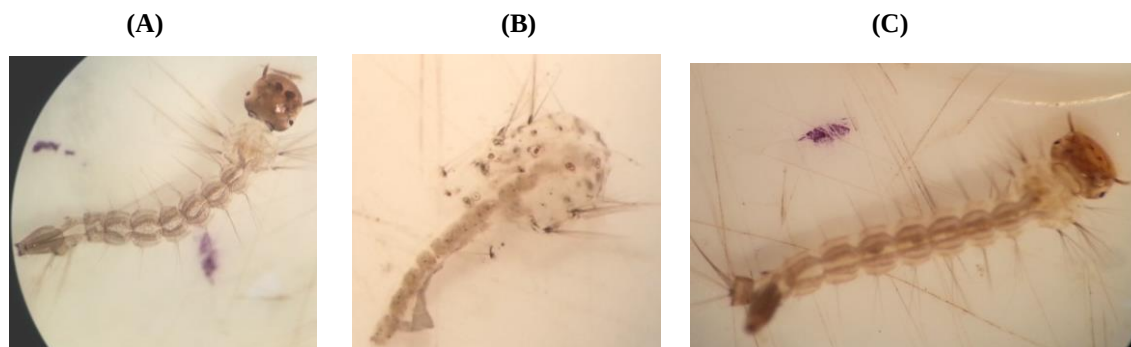
Gambar.3.3 : Grafik Persentase Kematian Larva *Ae.aegypti* Pada Uji Residu Formulasi *B. thuringiensis* yang Kadaluarsa

kerentanan larva sasaran terhadap toksin yang dihasilkan (Knowles, 1993).

Toksin *B. thuringiensis* sangat spesifik terhadap serangga inang, tergantung pada struktur toksin dan kehadiran reseptor toksin dalam midgut serangga. Toksin tersebut berikatan dengan reseptor khusus yaitu kaderin dan aminopeptidase yang terdapat pada membran sel epitel usus tengah. Ikatan reseptor fragmen beracun tersebut membentuk pori-pori dan menyebabkan kebocoran pada epitelium usus tengah sehingga permeabilitas dan fungsi sel terganggu dan mengganggu transfer ion Na^+ dan K^+ . Peran reseptor toksin dalam membentuk formasi pori pada tingkat molekuler masih belum dipahami dengan baik (Knowles and Dow, 1993). Epitelium usus tengah yang mengalami kebocoran akan mempermudah masuknya spora *B.thuringiensis* dan bakteri lain yang ada di saluran pencernaan ke dalam rongga tubuh serangga. Bakteri tersebut akan menggunakan hemolimf serangga sebagai media pertumbuhan. Setelah 2-3 hari, septisemia yang disebabkan oleh *B.thuringiensis* akan menyebabkan kematian serangga (Weinzierl, et al., 1997; Khetan, 2001).

Pembentukan pori yang terjadi akan menyebabkan sel-sel membengkak dan akhirnya lisis. Model yang dibuat oleh Knowles dan Dow (1993) menekankan pada penghentian pompa K^+ yang mengarah ke pembengkakan sel kolumnar dan lisis osmotik. Gangguan integritas usus inilah yang akhirnya menyebabkan kematian.

Pada penelitian ini juga dilakukan pengamatan pada larva yang mati terinfeksi *B. thuringiensis* (Gambar 3.4) menunjukkan bahwa larva *Ae.aegypti* yang terinfeksi oleh *B.thuringiensis* membuat sel membengkak dan akhirnya lisis atau pecahnya isi sel ke bagian lumen.



Gambar 3.4. (A) Larva *Ae.aegypti* yang telah terinfeksi toksin *B. thuringiensis* yang telah didedahkan selama 48 jam dengan ditandai dengan membengkaknya sel dengan lekukan yang lebih tajam dan kosongnya ruangan pada tiap segmen; (B) terjadinya lisis atau pecahnya isi sel ke bagaian lumen ; (C) Larva *Ae.aegypti* yang tidak diberi perlakuan (Kontrol) (perbesaran = 100×) (Sumber : Data Primer).

KESIMPULAN

Efektifitas formulasi *B. thuringiensis* yang kadaluarsa (H-14) telah jauh menurun (5 kali lipat) dibandingkan formulasi *B. thuringiensis* yang tidak kadaluarsa, hal ini terbukti dari nilai LC_{50} dan LC_{90} formulasi *B. thuringiensis* yang kadaluarsa (H-14) 0,305 ppm dan 1,513 ppm jauh lebih tinggi dari nilai LC_{50} dan LC_{90} formulasi yang tidak kadaluarsa yaitu 0,036 ppm dan 0,897 ppm. Toksisitas formulasi *B. thuringiensis* kadaluarsa (H-14) yang telah menurun terlihat pula dari efek residu *B. thuringiensis* kadaluarsa terhadap larva *Ae. Aegypti* efektif hanya hingga hari ke-12, adapun *B. thuringiensis* yang tidak kadaluarsa efektif hingga hari ke-14.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terselenggara melalui bantuan dana riset Hibah Kompetensi Nasional tahun 2015, untuk itu ucapan terimakasih kami berikan kepada DPMPI Unpad dan Dirjen Ristekdikti.

DAFTAR PUSTAKA

- Sutrisno, S. 1991. Current fruit fly problem in Indonesia. K. Kawasaki, O. Iwashashi, and K.Y. Kaneshiko (Eds.). Proceeding of the International Symposium on the Biology and Control of Fruit Flies. Okinawa Prefecture. p.72-78
- Blondine Ch.P. 2004. Efektivitas Vectobac 12 AS (*Bt* H-14) dan *Bacillus thuringiensis* H-14 terhadap vektor malaria *Anopheles maculatus* di kobakan desa Hargotirto, kecamatan Kokap, kabupaten Kulon Progo. Buletin Penelitian Kesehatan. 32(1): 17-28
- Boesri, H. & D.T. Boewono. 2008. Perbandingan kematian nyamuk *Aedes aegypti* pada penyemprotan aerosystem menggunakan bifenthrine dengan system thermal fogging menggunakan malathion. Jurnal kedokteran Yarsi. 16(2): 130-14.
- Depkes RI, 2007. Pemberantasan Serangan Nyamuk Demam Berdarah Dengue (PSN DBD). Edisi : ke tiga. Depkes Dirjen PP dan PL. Jakarta
- Fathi, S, Keman, & Wahyuni, C.U. 2005. Peran Faktor Lingkungan dan Perilaku Terhadap Penularan Demam Berdarah Dengue di Kota Mataram. Jurnal Kesehatan Lingkungan 2(1): 1-10
- Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press. London, 125 pp.
- Khetan, S.K. (2001). Microbial Pest Control. Marcel Dekker, Inc. USA. 141 pp.
- Knowles, B.H. & J.A.T. Dow. 1993. The crystal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *Bioassays*, 15, p. 469-476
- Mulla, M.S. 1986. Role of *Bti* and *Bacillus sphaericus* in mosquito control programs, in fundamental and applied aspects of invertebrate pathology, Foundation of the 4th Int'l Colloq. of Invertebrae. Pathol. p. 494-496
- Weinzier, R., T. Henn & P.G. Koehler. 1997. Microbial Insecticides. University Of Florida publication ENY. 275 pp.
- Weyai, M.N. 2004. Efikasi *Bacillus thuringiensis* H-14 (Vectobac WDG) terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* di Laboratorium. Laporan Skripsi. Universitas Diponegoro Semarang
- Widyastuti, U., Widiarti & Blondine Ch. 1995. Uji Coba *Bacillus thuringiensis* H-14 Terhadap Larva Nyamuk *Anophles Barbirostris* di Laboratorium dan Lapangan. Buletin Penelitian Kesehatan Vol 23.

