

# Uji Patogenisitas Zoospora Kapang *Lagenidium giganteum* terhadap Larva Instar-2 Nyamuk *Aedes aegypti* Skala Laboratorium

(PATHOGENICITY TEST OF ZOOSPORA LAGENIDIUM GIGANTEUM FUNGI AGAINST AEDES AEGYPTI LARVAE 2<sup>nd</sup> UNDER LABORATORY CONDITION)

Agustin Indrawati<sup>1</sup>, Mirnawati Sudarwanto<sup>2</sup>, Mangaraja Pidoli Tampubolon<sup>3</sup>, Retno Damayanti Soejoedono<sup>1</sup>, I Wayan Teguh Wibawan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bagian Mikrobiologi Kesehatan, <sup>2</sup>Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner, <sup>3</sup>Bagian Protozoologi Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jln Agatis Dramaga Bogor.  
Telpon : 0251- 8629466. Email: tienis@yahoo.com

## ABSTRAK

Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan salah satu penyakit yang menakutkan dalam masyarakat. Kejadian penyakit ini semakin meningkat. DBD disebabkan oleh virus dan ditularkan melalui vektor nyamuk *Aedes aegypti*. Beberapa bahan kimia telah digunakan sebagai bahan pencegahan penyebab penyakit tetapi kandungan zat aktif dalam pestisida tersebut diduga menyebabkan efek negatif pada lingkungan di antaranya resistensi vektor, kematian makhluk hidup non target dan munculnya residu. Penelitian ini bertujuan menemukan alternatif pengendalian vektor DBD dengan menggunakan kapang entomopatogen sebagai agen hayati. Dalam penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi kapang dari jentik-jentik nyamuk dan secara mikroskopis ditemukan 9 isolat kapang dan satu di antaranya teridentifikasi sebagai *Lagenidium giganteum*. Uji efektivitas zoospora terhadap larva instar 2 pada skala laboratorium menunjukkan LD<sub>50</sub> 2,35 x 10<sup>6</sup> zoospore/ml, sedangkan LD<sub>95</sub> adalah 1,35 x 10<sup>7</sup> zoospore/ml. Uji efektivitas oospora LD<sub>50</sub> 6,7 x 10<sup>2</sup> oospore/ml dan LD<sub>95</sub> 1,94 x 10<sup>3</sup> oospore/ml. Untuk melikat mekanisme infeksi dari kapang *L. giganteum* terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti* digunakan pemeriksaan mikroskopik dengan menggunakan pewarnaan Lactophenol Cotton Blue (LPCB) dan tolouidin blue 2,5%. Kesimpulan dari penelitian ini adalah kapang entomopatogen *L. giganteum* dapat sebagai alternatif pengendali hayati terhadap vektor penyebab penyakit DBD

Kata kunci : Demam Berdarah Dengue, *Aedes aegypti*, *Lagenidium giganteum*.

## ABSTRACT

Dengue Haemorrhagic fever (DHF) is one of fearsome diseases in society. Incidence of the disease is increasing. Dengue fever is caused by dengue virus and transmitted by *Aedes aegypti* mosquito vector. Various chemical controls have been conducted to prevent the spread of the disease, but active contents of the chemical controlling substances are suspected causing many negative effect, in environment, such as vector resistance, death of non target living creatures, and environmental contamination. This research objective was to find an alternative solution in order to control the dengue vector by using entomopathogenic fungi as biological control agent. This research was conducted by isolation and identification of fungi infecting mosquito larvae. Macroscopic observation revealed that one of the nine isolation products was *Lagenidium giganteum*. The effectiveness test in laboratory showed the zoospore LD<sub>50</sub> to *Ae. aegypti* larvae of instar 2<sup>nd</sup> was 2,35 x 10<sup>6</sup> zoospore/ml, while the LD<sub>95</sub> value was 1,35 x 10<sup>7</sup> zoospore/ml. The oospore effectiveness test showed LD<sub>50</sub> was 6,7 x 10<sup>2</sup> oospore/ml and LD<sub>95</sub> was 1,94 x 10<sup>3</sup> oospore/ml. Using LPCB dye and blue tolouidin 2,5%, the infection mechanism of *L. giganteum* fungi in *Ae. aegypti* mosquito larva was detected. The research is concluded that the entomopathogen fungi *L. giganteum* was very prospective to be used as a biological control agent against vector of DHF.

Keyword : Dengue Haemorrhagic fever (DHF), *Aedes aegypti*, *Lagenidium giganteum*.

## PENDAHULUAN

Di Indonesia penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan salah satu penyakit yang ditakutkan oleh masyarakat. Penyakit ini dilaporkan berjangkit sejak tahun 1968. Penyakit ini disebabkan oleh virus dan ditularkan oleh nyamuk. Penyakit ini menyebar ke seluruh negeri dan tidak mengenal status pola hidup baik di pedesaan maupun di perkotaan (Gubler 1997) Hingga sekarang DBD merupakan salah satu masalah kesehatan di Indonesia yang makin lama makin bertambah penderitanya dan terus meningkat serta meluas daerah penyebarannya serta menimbulkan Kejadian Luar Biasa (KLB) (Muchlastriningsih *et al.*, 2001).

Jumlah penderita DBD meningkat pada musim hujan dan akan menurun pada musim kemarau. Penyebaran nyamuk vektor di daerah perkotaan berhubungan dengan lingkungan hidup dan kondisi perumahan, dengan distribusi paling tinggi di perumahan kumuh.

Sampai sekarang cara pengobatan DBD hanya bersifat simptomatis, sedangkan cara vaksinasi sebagai tindakan pencegahan, pada saat sekarang masih dikembangkan dan hasilnya belum memuaskan. Pencegahan yang tepat adalah dengan cara menekan perkembangan vektor. Tindakan yang dianjurkan oleh Departemen Kesehatan dikenal dengan istilah 3 M yaitu menguras atau menabur larvasida, menutup penampungan air dan mengubur barang-barang bekas. Cara yang umum dilakukan adalah dengan menggunakan insektisida yang berbahan kimia salah satunya adalah malathion dan aplikasinya menggunakan sistem aerosol dengan teknik *ultra low volume*, *fogging* maupun *mist blower*. Aplikasi lain yang biasa digunakan di rumah tangga adalah penggunaan obat nyamuk bakar, *tissue*, oles, dan elektronik. Cara – cara pengendalian tersebut efektif pada nyamuk dewasa, sedangkan larva nyamuk sebagai calon nyamuk dewasa tidak terbasmi. Di sisi lain penggunaan insektisida sebagai pembasmi nyamuk sangat berbahaya, terkait dengan pencemaran lingkungan, pengaruh terhadap residu dan faktor resikonya terhadap mahluk hidup. Mengingat makin maraknya penggunaan insektisida, perlu dikembangkan bahan pengendali biologis.

Pengendalian hayati merupakan suatu teknik pengendalian populasi hama pengganggu

tumbuhan, hewan ataupun vektor penyakit dengan memanfaatkan musuh alami yang ada di alam baik berupa parasit, predator ataupun organisme patogen. Teknik pengendalian hayati ini hanya berfungsi menekan perkembangan hama, mempunyai toksisitas yang sangat rendah terhadap manusia dan bersifat spesifik. Teknik pengendalian hayati telah lama dikenal dan digunakan sebelum manusia menggunakan pestisida berbahan kimia Namun pada tiga dasawarsa terakhir, pengendalian hayati sudah banyak ditinggalkan akibat semakin maraknya jenis pestisida yang beredar. Dengan menggunakan musuh alami diharapkan tidak hanya menghilangkan salah satu mata rantai tetapi juga mampu menekan perkembangan dari siklus kehidupan organisme sasaran

Studi pemanfaatan kapang entomopatogen sebagai salah satu agen pengendali hayati pada beberapa jenis vektor penyakit sudah banyak dilakukan. Kapang *Lagenidium giganteum* (*L. giganteum*) merupakan salah satu parasit fakultatif dari larva nyamuk yang pada beberapa tahun terakhir ini banyak diteliti tentang potensinya sebagai agen pengendali hayati.

Penelitian ini bertujuan memanfaatkan kapang entomopatogen *L. giganteum* sebagai pengendali hayati alternatif larva nyamuk *Aedes aegypti*.

## METODE PENELITIAN

### Pemeliharaan Nyamuk *Aedes aegypti*

*Ae. aegypti* dikolonisasi dalam insektari berukuran 76x76x76 cm. Selama pemeliharaan di dalam insektari dimasukkan sukrosa 10% sebagai sumber makanan nyamuk. Sumber makanan lain yaitu darah tikus dengan cara memasukkan tikus yang telah difiksasi dalam kawat berjaring, sedangkan untuk tempat bertelur disiapkan kertas saring berbentuk kerucut diletakkan di atas cawan petri berisi air (untuk menjaga kelembaban). Selama pemeliharaan nyamuk bertelur di atas kertas saring. Apabila diperkirakan tidak ada lagi nyamuk yang bertelur kertas saring diangkat dan dikeringkan pada suhu kamar. Selanjutnya kertas saring berisi telur tersebut sebagian dimasukkan dalam kantong polietilen untuk disimpan dan sebagian ditetaskan. Proses penetasan dilakukan di laboratorium. Kertas saring berisi telur direndam dalam air sumur yang telah diendapkan semalam dan ditunggu

kurang lebih selama 5-7 hari telur akan menetas. Makanan pada stadium larva berupa tepung hati kering.

**Uji Patogenisitas Zoospora *L. giganteum***

Dalam uji patogenisitas ini dibutuhkan zoospora (Humber 1998), larva instar 2 nyamuk *Ae. aegypti*. Tepung hati, air sumur yang diendapkan, gelas plastik, dan penutup kasa

Zoospora hasil pemanenan (Humber, 1998) dihitung di bawah mikroskop menggunakan *malazzes hemocytometer*. Selanjutnya dibuat suatu pengenceran (Tabel 1). Suspensi zoospora dari masing-masing pengenceran kemudian dimasukkan ke dalam gelas-gelas plastik yang didalamnya sudah berisi media untuk pertumbuhan larva nyamuk serta makanannya. Larva instar 2 dimasukkan dalam gelas-gelas yang sudah berisi zoospora sesuai pengenceran sebanyak 25 ekor. Media cair yang digunakan adalah 50 ml air sumur yang sudah diendapkan. Sebagai kontrol gelas plastik berisi air sumur, dan larva nyamuk. Masing-masing perlakuan diulang 4 kali. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai hari kelima. Penghitungan LD<sub>50</sub> dan LD<sub>95</sub> dengan menggunakan metode Reed dan Muench (1938). Larva yang mati diambil dan disimpan untuk dilihat secara mikroskopis dengan mengguna-

kan pewarnaan Toluidin Blue 2,5%.

**Mekanisme Infeksi Zoospora terhadap Larva**

Mulai dari awal pemeriksaan patogenisitas, setiap larva yang mati mulai hari pertama dikumpulkan dari tiap-tiap perlakuan. Pada Larva yang mati dilakukan pewarnaan terlebih dahulu dengan *Lacto Phenol Cotton Blue* (LPCB) dan *Toluidin Blue 2.5%*, selanjutnya diamati di bawah mikroskop.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil pengujian efektivitas dan patogenisitas zoospora kapang *L. giganteum* terhadap larva instar 2 nyamuk *Ae. aegypti* disajikan pada Tabel 1.

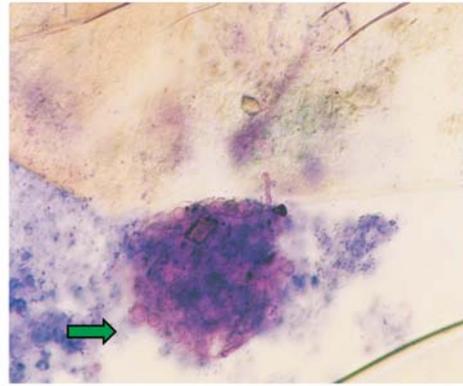
Berdasarkan hasil pengamatan ternyata larva kelompok kontrol juga ditemukan adanya kematian, hal ini kemungkinan disebabkan faktor individual dari larva sendiri : seperti daya tahan tubuh, kemampuan mencari makanan, dan stadium larva. Menurut Mian dan Mulla (1983) bahwa faktor ekologi, fisik dan biologi sangat berpengaruh terhadap kehidupan larva nyamuk. Apabila dibandingkan dengan perlakuan, angka kematian pada larva kontrol

Tabel 1. Hasil penghitungan LD<sub>50</sub> dan LD<sub>95</sub> zoospora terhadap kematian larva

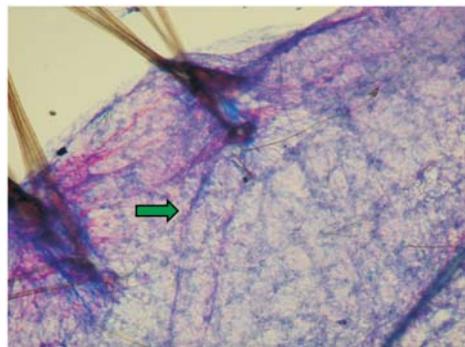
No	Jumlah Zoospora/ml	Jumlah Larva		Akumulasi Larva		Perbandingan Larva Mati/total	Persentase Kematian larva
		Mati	Hidup	Mati	Hidup		
1.	3 x 10 <sup>5</sup>	8	17	8	182	8/190	4.2
2.	6.0 x 10 <sup>5</sup>	7	18	15	165	15/170	8.33
3.	9.0 x 10 <sup>5</sup>	18	7	33	147	33/180	18.33
4.	1.2 x 10 <sup>6</sup>	12	13	45	140	45/185	24.32
5.	1.5 x 10 <sup>6</sup>	15	10	60	127	60/187	32.09
6.	1.8 x 10 <sup>6</sup>	18	7	78	117	78/195	40
7.	2.1 x 10 <sup>6</sup>	13	12	91	110	91/201	45.27
8.	2.4 x 10 <sup>6</sup>	11	14	102	98	102/200	51.00
9.	2.7 x 10 <sup>6</sup>	17	8	119	84	119/203	58.62
10.	3.0 x 10 <sup>6</sup>	15	10	134	76	134/210	63.81
11.	4.5 x 10 <sup>6</sup>	16	9	150	66	150/216	69.44
12.	6.0 x 10 <sup>6</sup>	15	10	165	57	165/222	74.34
13.	7.5 x 10 <sup>6</sup>	17	8	182	47	182/229	79.48
14.	9.0 x 10 <sup>6</sup>	17	8	199	39	199/238	83.61
15.	1.05 x 10 <sup>7</sup>	15	10	214	31	214/245	87.73
16.	1.2 x 10 <sup>7</sup>	17	8	231	21	231/252	91.67
17.	1.35 x 10 <sup>7</sup>	18	7	249	13	249/262	95.04
18.	1.5 x 10 <sup>7</sup>	19	6	268	6	268/274	97.81



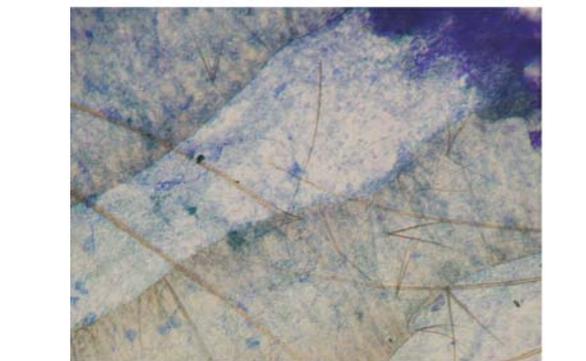
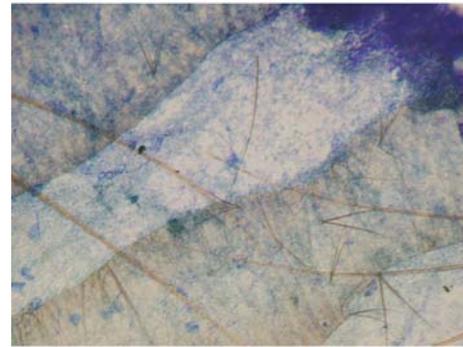
Gambar 1. Zoospora menyebar disekeliling tubuh larva pada hari pertama setelah diberi perlakuan (100X)



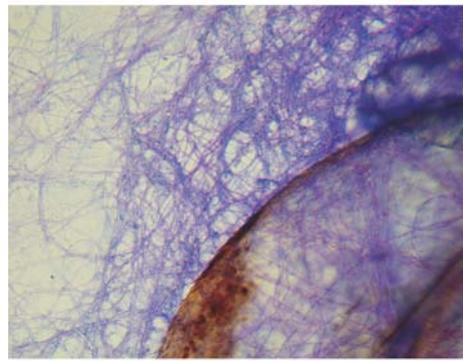
Gambar 2. Zoospora mulai menempel, mengkista dan membentuk *germ tube* (100X)



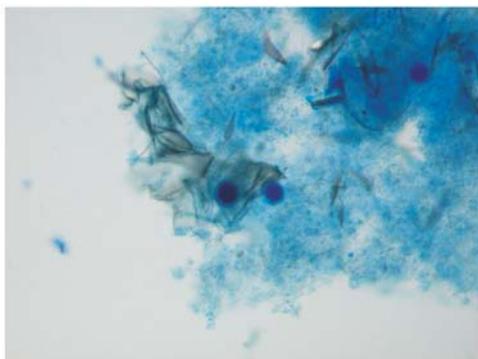
Gambar 3. Percabangan hifa sudah meluas didalam tubuh larva (100X)



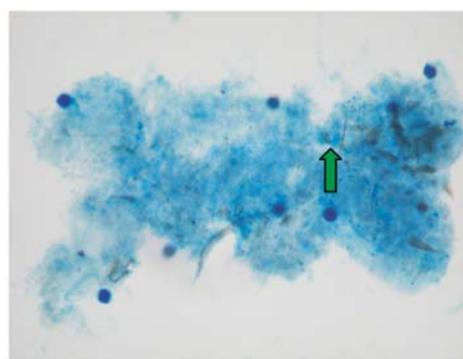
Gambar 4. hifa menyebar didalam tubuh larva (100X)



Gambar 5. hifa sudah memenuhi tubuh bagian luar larva (100X)



Gambar 6. Oospora yang terbentuk enam hari setelah kematian larva (100X)



nilai yang kecil. Pada larva perlakuan yaitu larva yang diberi paparan zoospora dalam berbagai konsentrasi ditemukan adanya kematian yang bervariasi. Pada pemaparan dengan menggunakan konsentrasi zoospora terkecil yaitu  $3 \times 10^5$  zoospora/ml diperoleh jumlah larva yang mati sebanyak 8 ekor (32%) sedangkan pada konsentrasi  $6 \times 10^5$  zoospora/ml jumlah larva yang mati sebanyak 7 ekor (28%) dari masing-masing 25 larva perlakuan. Pada konsentrasi  $9 \times 10^5$  zoospora/ml sampai  $1.5 \times 10^7$  zoospora/ml mampu mematikan lebih dari 40% larva. Bervariasinya angka kematian larva ini selain dipengaruhi oleh konsentrasi zoospora, kemungkinan dipengaruhi oleh daya tahan tubuh dari masing-masing larva, makanan, serta viabilitas zoospora dalam menyerang larva. Penyerangan larva nyamuk oleh zoospora sangat dipengaruhi faktor mekanis ataupun faktor enzimatik (Dean dan Domnas 1983). Umur larva sangat berpengaruh terhadap patogenesis zoospora. Penelitian ini digunakan larva nyamuk instar 2 karena pada instar 2 ini lapisan kulit pelindung masih sangat tipis sehingga diharapkan pada saat zoospora menyerang, penetrasi zoospora *L. giganteum* lebih mudah sehingga mampu menginfeksi lebih cepat. Penelitian serupa telah dilakukan oleh Zattau dan McInnis (1985) bahwa kemampuan menyerang kapang *Leptolegnia chapmanii* terhadap larva nyamuk instar 1 dan 2 lebih mudah dibanding pada larva tua. Zoospora mudah mengkista dan melakukan germinasi pada kutikula. Secara mekanis kemampuan menginfeksi sangat dipengaruhi oleh umur larva. Semakin muda umur larva, kepekaan terhadap infeksi kapang lebih tinggi dibanding dengan larva stadium yang lebih tua ataupun pupa (Federici 1981; Lord dan Roberts 1987). Faktor enzimatik sangat mempengaruhi kemampuan zoospora melakukan penetrasi pada tubuh larva, yaitu pengaruh aktifitas enzim proteolitik dan enzim lipolitik (Domnas *et al*, 1974). Pada Tabel 1 tersaji bahwa konsentrasi efektif zoospora untuk mengendalikan larva nyamuk *Ae. aegypti* di laboratorium yakni sebesar  $2.35 \times 10^6$ . Semakin tinggi konsentrasi zoospora berakibat semakin tinggi presentase kematian larva, dan pada konsentrasi  $1.35 \times 10^7$  zoospora/ml mampu membunuh larva nyamuk sampai 95%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi zoospora maka angka mortalitas larva juga semakin besar. Menurut WHO (1985), pada seekor larva yang terinfeksi dapat

ditemukan sekitar 178.640-250.000 zoospora dan tingkat kematian larva 100% diperoleh dengan pemberian 715.000 zoospora/100ml air *L. giganteum* isolat California. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa zoospora dari kapang *L. giganteum* mempunyai potensi tinggi dalam menekan perkembangan larva nyamuk *Ae. aegypti* walaupun dalam mematikan 100% harus menggunakan konsentrasi yang tinggi.

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis dari larva yang mati dan diwarnai dengan *Lactophenol cotton blue* ataupun pewarna *Toluidin blue* 2,5% mulai dari hari pertama sampai hari keenam menunjukkan bahwa pada hari pertama zoospora masih mengumpul di sekitar tubuh larva. Zoospora mulai bergerombol dan mengkista pada hari pertama (Gambar 1 dan 2).

Pada hari pertama zoospora sudah mulai membentuk *germ tube* proses perkecambahan untuk mulai melakukan penetrasi. Kematian larva pada hari pertama kemungkinan besar bukan disebabkan oleh zoospora melainkan akibat yang lain seperti daya tahan tubuh ataupun pengaruh nutrisi. Pada hari kedua, zoospora mulai menempel pada kutikula larva dan melakukan penetrasi. Di dalam tubuh larva, kapang membentuk percabangan hifa dan secara cepat meluas ke seluruh tubuh dan di dalam tubuh ini kapang melakukan segmentasi dan membentuk *presporangial* yang nantinya akan menembus kembali dinding larva, melepaskan zoospora dan disisi lain akan menghasilkan hifa vegetatif (Gambar 3,4, dan 5). Hifa vegetatif menyebar dipermukaan dan sampai menutupi tubuh. Pada tahap ini biasanya larva mulai mengalami kematian. Lima hari setelah kematian larva, kehancuran tubuh larva sudah mulai dan dilakukan pengamatan secara mikroskopis. Dengan menggunakan pewarna *Lactophenol Cotton Blue* diperoleh gambaran bahwa larva sudah terpisah-pisah sedangkan hifa vegetatif masih berkembang dan reproduksi secara seksual terjadi. Terjadinya siklus reproduksi seksual ditandai dengan adanya sejumlah oospora yang terlihat pada permukaan tubuh larva yang hancur dan berbentuk bulat dan ber dinding jelas (Gambar 6). Pada penelitian ini oospora mulai terbentuk setelah hari keenam kematian larva dan jumlah oospora yang dihasilkan tidak banyak. Oospora yang terbentuk ini akan siap memulai perkembangan, menjadi stadium yang infeksiif dan siap untuk menyerang inang kembali.

Tahap penyerangan zoospora terhadap larva nyamuk sangat erat kaitannya dengan siklus hidupnya. Menurut Washino dalam Misman *et al.*, (1990) bahwa kematian larva terjadi pada saat pertumbuhan miselium vegetatif terhenti, reproduksi mulai terjadi yaitu 48-72 jam setelah infeksi. Kadang-kadang larva mati selama infeksi dan bila larva mati lebih awal maka kapang juga ikut mati tanpa sempat bereproduksi. Tahapan infeksi *L. giganteum* pada larva *Culex pipiens quinquefasciatus* menurut Domnas *et al* (1974) meliputi 4 tahap dan menurut Kerwin (2000) meliputi 5 tahap. Tahap 1 : terlihatnya suatu lubang akibat penetrasi dari ujung hifa; Tahap 2 : Terjadinya percabangan hifa didalam tubuh larva; Tahap 3 : Terbentuknya presporulasi keseluruhan tubuh yang bersifat potensial dan setiap sel secara individual akan siap membentuk saluran keluar dan melepaskan 10-50 spora aseksual. Pada Tahap ke-4 adalah terjadinya perubahan dua sel bergabung menjadi satu. Pada tahap ke-5 Pembentukan oospora diluar tubuh larva serta membentuk miselium vegetatif. Oospora yang terbentuk bersifat tahan terhadap kekeringan dan pada kondisi yang cocok oospora akan berkembang menjadi fase infektif dan siap mencari inang baru.

### SIMPULAN

Pengendalian larva instar 2 nyamuk *Ae. aegypti* membutuhkan konsentrasi zoospora sebesar  $2.35 \times 10^6$  / ml untuk menekan sampai 50% populasi larva nyamuk, sedangkan kematian sebanyak 95% terjadi apabila menggunakan konsentrasi  $1,35 \times 10^7$  zoospora/ml.

Dengan menggunakan *Laktophenol Cotton Blue* (LPCB) ataupun *Toluidin Blue 2.5%* proses infeksi zoospora *L. giganteum* dapat teramati.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada BPPS Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia. Penulis juga mengucapkan terima kasih karena penelitian ini juga dibiayai oleh dana penelitian Hibah Bersaing X dan XI. Terima kasih juga disampaikan kepada drh. Titiek Sunartati MS, Prof Rubiyanto Misman yang sangat banyak membantu dalam penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Chan YC, Chan KL, Ho BC. 1972. Integrate control of *Ae. species* in Singapore : Public Health Education, Law Enforcement and surveillance. In : Vektor control in Southeast Asia Proceeding of the first SEAMEO workshop. Singapore, August 17-18, 1972, Pp. 78-143.
- Dean DD, Domnas AJ. 1983. The extracellular proteolytic enzymes of the mosquito parasitizing fungus *Lagenidium giganteum*. *Exp Mycol* 7: 31-39 .
- Domnas AJ, Giebel PE, Innis TM. 1974. Biochemistry of mosquito infection : Preliminary studies of biochemical change in *Culex quinquefasciatus* following infection with *Lagenidium giganteum*. *J Invertebr Pathol* 24 : 293-304.
- Federici BA. 1981. Mosquito control by the fungi *Culicinomyces*, *Lagenidium* and *Coelomomyces*. In *Microbial Control of pests dan Plant Diseases*. New York. Academic Press. Pp. 555-572.
- Gubler DJ. 1997. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever history and resurgence as a global public health problem. In Gubler DJ and G. Kuno. Colorado. Pp. 175-191.
- Gubler DJ. 1997. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever history and resurgence as a global public health problem. In Gubler DJ and G. Kuno. Colorado. Pp. 175-191.
- Humber RA. 1998. Entomopathogenic fungal identification. ASP/ESA Join Annual Meeting (Serial on line). <http://www.ppru.cornell.edu/mycology/insect-mycology.html>.
- Kerwin JL. 2000. *Lagenidium giganteum* <http://www.Nysaes.Cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/L.giganteum.html> (30 September 2000)
- Lord JC, Roberts DW. 1987. Host age as a determinant of infection rates with the mosquito pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes : Lagenidiales). *J. Invertebr. Pathol.* 50 : 70-71
- Mian LC, Mulla MS. 1983. Factor influencing activity of the Microbial Agent *B. sphaericus* against mosquitoes Larvae. *Bull Soc Vector Ecol* 8(2):128-134
- Misman R. 1989. Pengaruh pH terhadap pertumbuhan koloni cendawan *Lagenidium giganteum* Couch. patogen nyamuk Demam Berdarah. Laporan hasil penelitian Pusat Antar Universitas Bidang Ilmu Hayati. Institut Teknologi Bandung.

- Muchlastriningsih E, Susilawati S, Hutaaruk DS, Wasiyo. 2001. Analisis hasil pemeriksaan spesimen penderita tersangka DBD pada Kejadian Luar Biasa di Surabaya, 1998. *Cermin Dunia Kedokteran* 126: 14-16
- Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27 : 437-497.
- WHO. 1985. Data sheet on the biological control agent. WHO/VBC/753. Rev. 1. VBC/BCDS/79.02. Rev.1 : 1-21
- Zattau CW, McInnis T. 1985. Life Cycle and Mode of *Leptolegnia Chapmanii* (Oomycetes) Parasitizing *Ae. aegypti*. *J Invertebr Pathol* 50 : 134-145