

# UJI TOKSISITAS JAMUR *METARHIZIUM ANISOPLIAE* TERHADAP LARVA NYAMUK *AEDES AEGYPTI*

Ni Luh Putu Manik Widiyanti\*, Sanusi Muyadihardja\*

## Abstract

Beside being the vector for dengue fever, *Aedes aegypti* also disturbs human life since the female bites and absorbs blood particularly in the morning between 08.00 – 12.00 and in the afternoon between 15.00 – 17.00

A lot of efforts have been made to solve dengue fever problems. These include chemical method, physical method and biological control. So far mosquito control still emphasizes chemical method, that is by using insecticide. Repeated use of insecticide causes a new problem, namely, it kills non target insect and vector resistance. The negative effect caused by chemical or insecticide encouraged scientists to find an alternative method, that is biological control. One of the methods that given priority to be developed as a controlling agent is entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* fungus because it has destruxins that has been considered to be a new generation of insecticide substance.

This study aimed at finding out the toxicity of *M. anisopliae* to *Aedes aegypti* mosquito larvae by determining its Lethal Concentration (LC) at 50 and 90. In addition, it also aimed at finding out the number of *M. anisopliae* conidiospore at the respective concentrations.

The result of the study shows that entomopathogen kills 50% (LC 50) larvae instar III *Ae aegypti* that comes from Denpasar at the  $2.955 \times 10^{-2}$  dilution level in 200 ml of water and 90% (LC 90) at the  $8.861 \times 10^{-1}$  dilution level in 200 ml of water in laboratory condition. There is a significant difference in the number of conidia and the entomopathogenic lethal power at each concentration.

Key words : biological control, *Metarhizium anisopliae*, *Aedes aegypti*

## Pendahuluan

Demam berdarah dengue (DBD) masih merupakan salah satu masalah kesehatan di Indonesia.<sup>1</sup> Di Indonesia kota yang pertama kali dilaporkan terjangkit DBD adalah Jakarta dan Surabaya pada tahun 1969. Sudana (2001) dalam "Bisnis Bali" menyatakan bahwa, hampir 70% desa atau kelurahan di kota Denpasar berpredikat endemik demam berdarah dengue.<sup>2</sup> Dinyatakan pula dari bulan Januari sampai dengan Mei 2001, kasus DBD di Denpasar sekitar 160 kasus. Jika dibandingkan dengan kasus DBD pada tahun 2000, dalam satu tahunnya adalah 141 kasus. Denpost (15-1-2002) juga menyatakan bahwa selama 14 hari, tercatat dari tanggal 1- 14 Januari 2002, penderita DBD yang sempat masuk IRD Sanglah Denpasar tercatat 79 orang.<sup>3</sup> Dicatat pula, selama tahun 2001 penderita DBD adalah 815 orang yang dirawat di rumah sakit, dan 8

orang dinyatakan meninggal dunia. Anonim (1990) menyatakan bahwa, nyamuk *Aedes aegypti* merupakan vektor utama penyakit DBD di Indonesia.<sup>1</sup>

Nyamuk *Ae. aegypti* di samping sebagai vektor penyakit DBD juga mengganggu kehidupan manusia karena nyamuk betina menggigit dan mengisap darah terutama pada pagi hari antara pukul 08.00 – 12.00 dan sore hari pukul 15.00 sampai dengan pukul 17.00.<sup>1</sup> Nyamuk ini hidup secara domestik yaitu lebih senang tinggal di dalam rumah daripada di luar rumah.<sup>4</sup>

Tempat perindukan yang paling potensial untuk perkembangan larva nyamuk adalah tempat penampungan air yang dipergunakan sehari-hari seperti drum, tempayan, bak mandi dan bak WC. Tempat perindukan tambahan adalah bukan tempat penampungan air, misalnya tempat

\* Fakultas Pendidikan MIPA IKIP Negeri Singaraja

minuman hewan, vas bunga, perangkap semut dan barang-barang bekas yang menampung air.<sup>5</sup>

Untuk mengatasi masalah penyakit DBD telah banyak usaha dilakukan antara lain dengan cara terapi spesifik dan pengembangan vaksin.<sup>6</sup> Tetapi sampai saat ini hasilnya masih belum memuaskan. Alternatif yang paling memberi harapan untuk pemberantasan penyakit DBD adalah pengendalian kepadatan populasi vektornya.

### Latar Belakang

Upaya untuk mengendalikan perkembangan nyamuk *Ae. aegypti* telah banyak dilakukan, antara lain dengan cara kimia, cara fisik dan pengendalian hayati. Sampai sekarang pengendalian nyamuk masih dititikberatkan pada penggunaan insektisida kimia. Akibat penggunaan insektisida yang berulang-ulang menimbulkan masalah baru yaitu membunuh serangga bukan target dan timbulnya resistensi vektor.<sup>7</sup> Damar (1997) menyatakan bahwa, nyamuk *Ae. aegypti* sudah toleran terhadap insektisida kelompok sintetik pyrethroid.<sup>8</sup>

Akibat dampak negatif yang ditimbulkan oleh insektisida kimiawi, telah merangsang para pakar untuk mencari alternatif pemberantasan vektor yaitu dengan cara pengendalian hayati. Salah satu yang mendapat prioritas untuk dikembangkan saat ini adalah pengendalian hayati dengan menggunakan jamur entomopatogenik *Metarhizium anisopliae*. Dinyatakan bahwa jamur *Metarhizium anisopliae* memiliki aktifitas destrusidal karena menghasilkan *cyclopeptida*, destruxin A, B, C, D, E dan *desmethyldestruxin* B.<sup>9</sup> Destruksin telah dipertimbangkan sebagai bahan insektisida generasi baru. Mittler (1994) menyatakan bahwa efek destruxin berpengaruh pada organella sel target (mitokondria, retikulum endoplasma dan membran nukleus), menyebabkan paralisa sel dan kelainan fungsi lambung tengah, tubulus malphigi, hemocyt dan jaringan otot.<sup>10</sup>

### Perumusan Masalah

1. Apakah jamur *M. anisopliae* bersifat toksik terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*
2. Berapakah LC (Lethal Concentration) 50 dan LC 90 jamur *M. anisopliae* terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*
3. Berapah jumlah konidiospora jamur *M. anisopliae* pada masing-masing konsentrasi

### Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui toksisitas jamur *M. anisopliae* terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*
2. Mengetahui LC (*Lethal Concentration*) 50 dan LC 90 jamur *M. anisopliae* terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*
3. Mengetahui jumlah konidiospora jamur *M. anisopliae* pada masing-masing konsentrasi

### Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental murni yang dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi IKIP Negeri Singaraja. Sedangkan pengambilan sampel larva nyamuk dilakukan di Tempat Penampungan Air di Denpasar.

### Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan *post test only control group design*. Strategi yang dirancang dalam penelitian ini melalui tahapan-tahapan sebagai berikut .

### Identifikasi Larva Nyamuk *Ae. aegypti*

Sampel larva nyamuk diambil dari TPA di pemukiman penduduk di Denpasar dan kemudian diidentifikasi berdasarkan Soedarto (1989),<sup>11</sup> dan dibuat preparat awetan larva nyamuk dengan cara menurut Sucharet & Supavej (1987).<sup>12</sup>

### Pembiakan Jamur *M. anisopliae*

Isolat jamur *M. anisopliae* di dapat dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Depkes RI, Jakarta. Pembiakan massal jamur dilakukan dengan cara di mana jamur dibiakkan pada suhu 26°C selama 2 minggu.<sup>13</sup>

### Pembuatan Suspensi Jamur *M. anisopliae*

Pembuatan suspensi jamur didasarkan pada penelitian Umayah dan Umniyati (1994) yaitu : ke dalam tabung yang berisi koloni jamur dimasukkan aquadest steril 5 ml; digojok sampai seluruh jamur yang menempel di media terlepas.<sup>14</sup> Untuk memisahkan konidiospora jamur dari hifanya, ke dalam suspensi ditambahkan Tween 80. Suspensi disimpan pada suhu 4°C.

## Uji Hayati

Pengujian hayati ini dilakukan berdasarkan pengujian menurut Umayah dan Umniyati (1994) yaitu : Dibuat pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-6}$  dengan 15 ekor larva pada 200 ml air.<sup>14</sup> Perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Dari masing-masing tingkat pengenceran dihitung jumlah konidiosporanya.

## Teknik Pengumpulan Data

Data dikumpulkan berdasarkan angka kematian larva nyamuk pada masing-masing konsentrasi.

## Analisis Data

### A. Menentukan toksisitas

Toksisitas entomopatogen jamur *M. anisopliae* terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti* ditetapkan berdasarkan nilai LC 50 dan LC 90. Penentuan nilai LC 50 dan LC 90 dihitung dengan analisis probit.<sup>15</sup>

### B. Membedakan Toksisitas antar Perlakuan

Untuk membedakan toksisitas antar perlakuan (*entomopatogen*) dianalisis dengan analisis varian.<sup>16</sup> Jika ada perbedaan yang bermakna antar perlakuan, dilanjutkan dengan Uji BNT. Taraf signifikansi ditentukan 5%.

## Hasil dan Pembahasan

### Hasil Penelitian

#### A Daya Bunuh Jamur *M. anisopliae*

Daya bunuh jamur *M. anisopliae* terhadap persentase kematian larva uji berkisar antara, seperti tabel 01. Pada tabel tersebut di atas tampak bahwa, semakin sedikit jumlah konidiospora dalam air semakin sedikit larva nyamuk yang mati.

## Analisis Data

### A. Jumlah Konidia

Jumlah konidia pada masing-masing konsentrasi berbeda yang juga berpengaruh terhadap kematian larva, dengan analisis varians (anova) disajikan pada tabel 0.2. Dari uji lanjut pasca anova yaitu LSD didapatkan bahwa terdapat perbedaan jumlah konidia pada masing-masing perlakuan

## B. Kematian Larva Uji

Uji hayati secara statistik diukur melalui LC 50 dan LC 90, yaitu konsentrasi toksin yang dapat membunuh 50% dan 90% larva serangga uji, yang dirangkum pada tabel 0.3.

Berdasarkan analisis probit terhadap angka kematian larva uji, maka diperoleh nilai LC 50 dan LC 90 (CL 95%) masing-masing pada tingkat pengenceran  $2,955 \times 10^{-2}/200$  ml dan tingkat pengenceran  $8,861 \times 10^{-2}/ml$  dalam 200 ml air, artinya bahwa pada tingkat pengenceran ( $2,955 \times 10^{-2}$ ) dalam 200 ml aquades jamur *M. anisopliae* dapat membunuh 50% larva nyamuk *Ae. aegypti* dengan batas bawah  $1,54 \times 10^{-2}$  dan batas atas  $5,885 \times 10^{-2}$  pada tingkat kepercayaan 95%, dalam kondisi laboratorium. Pada tingkat pengenceran  $8,861 \times 10^{-2}/ml$  dalam 200 ml aquades jamur *M. anisopliae* dapat membunuh 90% larva nyamuk *Ae. aegypti* dengan batas bawah  $5,916 \times 10^{-2}$  dan batas atas  $1,7822 \times 10^{-1}$  pada tingkat kepercayaan 95%, dalam kondisi laboratorium.

Berdasarkan angka kematian larva uji analisis dengan analisis varians terhadap angka kematian larva uji nampak perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) pada masing-masing tingkat pengenceran, datanya diolah dan disajikan pada tabel 06. Dari uji lanjut pasca anova (SD) didapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada taraf signifikansi 0,05 terhadap angka kematian pada masing-masing tingkat pengenceran.

## Pembahasan

Kualitas *M. anisopliae* yang dipergunakan akan mempengaruhi kematian larva uji. Semakin virulen entomopatogen yang digunakan akan mempercepat kematian larva. Hal ini erat kaitannya dengan media yang dipergunakan untuk pembiakan entomopatogen. Media yang dipergunakan dalam pembiakan jamur *M. anisopliae* adalah media *Potato Dextrosa Agar* (PDA) karena tidak merusak virulensi, patogenitas serta toksisitasnya. Dari penelitian Munif dan Supraptini (1996) yang mengkultur *M. anisopliae* pada berbagai media antara lain *Sabouraud Dextrosa Agar* (SDA), medium gandum, medium beras, medium jagung dan medium *Potato Dextrosa Agar* ternyata media yang paling banyak menghasilkan konidiospora dan paling virulen terhadap larva nyamuk adalah jamur yang dikultur pada medium PDA.<sup>17</sup>

**Tabel 1. Hasil Uji Hayati setelah Pendedahan**

Tingkat Pengenceran	Jumlah rata-rata konidia/ml	Jumlah larva terdedah	Rata-rata kematian larva (%)
10 <sup>-1</sup>	8,73 x 10 <sup>7</sup>	45	91.1
10 <sup>-2</sup>	5,20 x 10 <sup>7</sup>	45	64.44
10 <sup>-3</sup>	3,73 x 10 <sup>7</sup>	45	46.67
10 <sup>-4</sup>	3,06 x 10 <sup>7</sup>	45	33.33
10 <sup>-5</sup>	2,13 x 10 <sup>7</sup>	45	15.55
10 <sup>-6</sup>	1,46 x 10 <sup>7</sup>	45	8.88

**Tabel 2. Analisis Varians Jumlah Konidia**

Sumber var	db	JK	KT	F-hitung	SigF 0,05
Antar Group	6	3657,619	609.603	20,952	0.000
Dalam Group	14	407.333	29,095		
Total	20	4064,952			

**Tabel 3. Nilai Rata-rata LC 50 dan LC 90 ( CL 95% ) terhadap Larva Instar III *Aedes aegypti* Linn**

Nilai Rata-rata	LC 50(95% CL)	LC90(95% CL)	Garis Regresi
	0.02955	0.8861	Y= 21.70059X - 0.64126

**Tabel 4. Analisis Varians Angka Kematian Larva *Ae. Aegypti***

Sumber Var	Db	JK	KT	F-hitung	SigF 0,05
Antar Group	6	432,476	72,079	79,667	0,000
Dalam Group	14	12,667	0,905		
Total	20	445,143			

Suhu yang dipergunakan untuk menumbuhkan jamur *M. anisopliae* ialah 26°C. Dalam suatu Penelitian ditemukan bahwa suhu yang paling baik bagi pertumbuhan *M. anisopliae* adalah 27°C. Sedangkan Muller dalam Mc.Coy (1990) memberikan kisaran suhu antara 20°C sampai 30°C.<sup>18</sup> Diamati dari pertumbuhan jamur pada penelitian, di mana pertumbuhan dan perkembangannya baik pada suhu 26°C pada media PDA.

Koloni jamur *M. anisopliae* mula-mula berwarna putih dan setelah tua berwarna hijau gelap. Menurut Friederich dalam Mc.Coy ( 1990 ) warna hijau merupakan salah satu ciri untuk identifikasi *M. anisopliae*.<sup>18</sup> Secara mikroskopis konidia berbentuk oval. Dari kunci identifikasi jamur menurut WHO ( 1984 ), *M. anisopliae* mempunyai ciri : *miselium septat* (bersekat), reproduksi hanya dengan konidia, dan konidia berbentuk oval.<sup>19</sup>

Faktor-faktor lingkungan yang diukur dalam laboratorium antara lain : suhu ruang, kelembaban nisbi udara, suhu media dan pH

medium. Suhu ruangan yang terukur selama penelitian berkisar antara 27 sampai dengan 30°C, kelembaban nisbi antara 70-74%, pH medium rata-rata 7 dan suhu medium berkisar antara 27-28°C; berarti kondisi udara ruangan penelitian cukup lembab, sehingga memenuhi syarat untuk pertumbuhan dan perkembangan larva nyamuk. Kondisi medium ini juga memungkinkan larva tumbuh normal dalam air karena suhu optimal larva dalam air antara 25°C sampai dengan 35°C.<sup>17</sup> Demikian juga pH air yang terukur adalah 7, kondisi ini merupakan pH netral. Demikian juga suhu ruangan memungkinkan hidup normal karena menurut Munif dkk ( 1994 ), nyamuk dapat hidup baik pada ruangan yang hangat dan lembab, suhu optimum bagi pertumbuhan dan perkembangan larva nyamuk adalah 30-35°C. Secara umum, faktor-faktor luar yang teramati tidak berpengaruh terhadap angka kematian larva, dimana pada perlakuan kontrol selama penelitian berlangsung adalah nol.

Mortalitas larva *Ae. aegypti* terjadi karena konidia *M. anisopliae* mengandung destruxin A

(C<sub>29</sub>H<sub>47</sub>O<sub>7</sub>N<sub>5</sub>), destruxin B (C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>), destruxin C,D,E dan dipertimbangkan sebagai bahan aktif insektisida generasi baru. Menurut Mittler et al ( 1994 ), destruxin berakibat pada organela sel target (mitokondria, endoplasmik retikulum dan membran inti ), menyebabkan paralisis sel dan berubahnya fungsi midgut, tubulus malphigi dan jaringan otot. Dijelaskan pula, destruxin yang dihasilkan oleh *M. anisopliae* toksisitasnya berbeda tergantung dari jenis larva serangga.<sup>16</sup>

Dalam percobaan laboratorium, tingkat pengenceran yang dipergunakan bervariasi. Tabel 1 menunjukkan bahwa semakin besar tingkat pengenceran, maka semakin banyak larva nyamuk uji yang terbunuh. Kalau dibandingkan dengan penelitian Umayah & Umniyati (1994) pada larva nyamuk instar II *Cx. quinquefasciatus* hanya membutuhkan 2,48 x 10<sup>4</sup> spora untuk membunuh 100% larva uji pada tingkat pengenceran 10<sup>-2</sup>.<sup>14</sup> Sedangkan dari penelitian Widiyanti (1999) dinyatakan bahwa untuk membunuh larva nyamuk instar III *Cx. quinquefasciatus* dibutuhkan spora 2,176 10<sup>9</sup>/ml membunuh 97,77% larva uji pada konsentrasi 8/250 ml air.<sup>21</sup> Ini berarti jumlah larva yang mati untuk kedua spesies tersebut hampir sama. Tetapi kalau dibandingkan jumlah spora yang digunakan yaitu perbandingannya adalah 4%. Ini berarti bahwa jumlah spora yang dibutuhkan untuk membunuh larva nyamuk instar III *Ae. aegypti* jauh lebih sedikit dibandingkan larva instar III *Cx. quinquefasciatus* yaitu perbandingannya hanya 4%. Hal ini menunjukkan bahwa larva nyamuk instar III *Ae. aegypti* lebih rentan terhadap konidiospora *M. anisopliae*. Hal ini disebabkan karena dari penelitian yang banyak dilaporkan, bahwa nyamuk *Cx. quinquefasciatus* sudah resisten terhadap berbagai bahan aktif insektisida jika dibandingkan dengan nyamuk *Ae. aegypti*. Jika dibandingkan dengan jumlah spora penelitian ini dengan penelitian Umayah & Umniyati, dimana penelitian Umayah & Umniyati mendapatkan jumlah spora yang berbeda dengan penelitian ini.<sup>14</sup> Pada tingkat pengenceran 10<sup>-2</sup> penelitian Umayah & Umniyati hanya mengandung 2,84x10<sup>4</sup> spora/ ml. Sedangkan dari penelitian ini mendapatkan rata-rata jumlah spora yaitu 5,2 x 10<sup>7</sup>/ ml. Hal ini tergantung dari jumlah spora yang didapatkan pada waktu pemanenan spora atau spora induk.

Hasil uji anova untuk jumlah konidia menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada angka kematian larva instar III *Ae.*

*aegypti* oleh pengaruh konidio-spora. Uji lebih lanjut dengan BNT (LSD) menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antara masing-masing perlakuan. Artinya ada perbedaan daya bunuh konidiospora jamur terhadap angka kematian larva nyamuk *Ae. aegypti* akibat pengaruh jumlah konidiospora pada masing-masing tingkat pengenceran dalam kondisi laboratorium.

Penentuan LC 50 dan LC 90 (CL 95%) dilakukan untuk menentukan kematian larva nyamuk uji 50% dan 90% setelah pendedahan 48 jam. Untuk membunuh 50% larva nyamuk *Ae. aegypti* dibutuhkan tingkat pengenceran 2,955.10<sup>-2</sup> dengan batas terendah pada tingkat pengenceran 1,54.10<sup>-2</sup> dan batas tertinggi 5,885. 10<sup>-2</sup> pada kepercayaan 95%. Sedangkan untuk membunuh 90% larva *Ae. aegypti* dibutuhkan tingkat pengenceran 8,861. 10<sup>-1</sup> dengan batas terendah 5,916.10<sup>-2</sup> dan batas tertinggi 1,7822.10<sup>-1</sup> pada kepercayaan 95%.

Untuk aplikasi di lapangan, bionomik dan sifat biologi larva *Ae. aegypti* dan jamur *M. anisopliae* perlu dipelajari. Munif me-nyatakan bahwa, jamur parasit pada larva nyamuk dapat berkembang biak secara alami dengan larva sebagai inang infinitif.<sup>20</sup> Sedangkan Munif menyatakan bahwa keberhasilan pemanfaatan jamur entomopatogenik sebagai pengendali vektor di lapangan sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan (suhu, kelembaban dan pH ), jumlah konidia dan viabilitasnya.<sup>4</sup>

## Kesimpulan

1. Pada tingkat pengenceran 2,955 x 10<sup>-2</sup> dalam 200 ml air *M. anisopliae* membunuh 50% ( LC 50 ) dan tingkat pengenceran 8,861 x 10<sup>-1</sup> dalam 200 ml air membunuh 90% ( LC 90 ) larva nyamuk instar III *Ae. aegypti* asal Denpasar pada kondisi laboratorium.
2. Terdapat perbedaan jumlah konidia *M. anisopliae* yang bermakna antar berbagai tingkat pengenceran
3. Terdapat perbedaan daya bunuh *M. anisopliae* yang bermakna pada masing-masing konsentrasi terhadap larva *Ae. aegypti*.

## Saran

Dalam usaha pengendalian terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti* menggunakan entomopatogen

konidiospora *M. anisopliae* di tempat perindukannya sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut.

#### Daftar Pustaka

1. Anonim. Survey Entomology Demam Berdarah Dengue. Dit.Jen PPM & PLP. Depkes R.I. Jakarta. 1990.
2. Sudana. Tujuh Puluh Persen Wilayah Denpasar Endemik Demam Berdarah Dengue. Bisnis Bali. Denpasar 2001.
3. Denpost. Lima Puluh Penderita Demam Berdarah dengue Dirawat di Rumah Sakit Sanglah. Denpasar, 2002.
4. Cowan, G.O and B.J. Heap. Clinical Tropical Medicine. Chapman & Hall Medical. London, 1993.
5. WHO. Biological Control of Vector. UNDP/World Bank/WHO. Geneva, 1991.
6. Sukowati, S. Pengendalian Vektor Penyakit dengan Pengelolaan Lingkungan. 1989.
7. Damar T.B; Widiarti; R.A. Yuniarti. Uji Bioefikasi Beberapa Insektisida Rumah Tangga Cair Semproet (Aerosol) Terhadap Nyamuk Rumah *Culex quinquefasciatus*. Maj. Kes Masy. Depkes 1997; 56 : 28 – 30
8. Tanada Y and H.K. Kaya. Insect Pathology. Academic Press. California. 1993.
9. Mittler T.E; F.J. Radovsky; V.H Resh. Animal Review of Entomology. Editorial Com. California
10. Soedarto. Pola Kekebalan Nyamuk *Cx. fatigans* di Surabaya Terhadap Insektisida. Lemlit. Univ. Airlangga. Surabaya, 1994.
11. Sucharit S and S. Supavej. Practical Entomology Malaria and Filariasis. Siryod. Thailand, 1987.
12. Bold H.C; C. Alexopoulos; T. Dele-voras. Morphology of Plant and Fungi. Harper & Row Pub. New York, 1980.
13. Umayah & S.R Umniyati. Uji Toksisitas Jamur *M. anisopliae* Terhadap Larva Nyamuk *Cx. Quinquefas-ciatus*. Proseding Seminar Nasional Hasil Penelitian Perguruan Tinggi Bidang kesehatan. Ciawi Bogor, 1994
14. Sudjana. Metode Statistika. Tarsito. Bandung, 1996.
15. Munif, A dan Supraptini. Perbedaan Virulensi Cendawan *Metarhizium anisopliae* yang dikultur pada berbagai Medium Terhadap Larva *Aedes Aegypti*. Cermin Dunia Kedokteran. 1996 ; 107 : 31-33
16. Munif, A. Prevalensi Cendawan Patogen Pada Larva Nyamuk Vektor Malaria. Cermin Dunia Kedokteran. 1994 : 38-40
17. McCoy, C.W. Entomogenous Fungi as Microbial Pesticides. Alan R. Liss, Inc Florida, 1990.
18. Munif, A. Cendawan Patogen pada Larva Nyamuk *Culex quinque-fasciatus* Berasal dari Kubangan Air Limbah Rumah Tangga untuk menunjang Penge-n-dalian Hayati. Cermin Dunia Kedok-teran. 1996. 106 : 41-43 Sanitas II (1)
19. Finney D.J. Probit Analysis. Cambridge Univ.Press London, 1971.
20. WHO. Report of Seven Meeting as Scientific Working Group on Biological Control of Vector. TDR/BCV/SWG-7/84-3. Geneva 1984.
21. Widiyanti, N.L.P.M. Daya Bunuh Jamur *Metarhizium anisopliae* Sebagai Pengendali Hayati terhadap Larva Nyamuk *Culex quinquefas-ciatus*. Tesis. Univ. Airlangga. Surabaya, 1999.
22. Anonim. Pedoman Pengamatan Serangga Penular Penyakit untuk Penataran Petugas Daerah Tk II Jawa timur.Dit.Kes.Prop. Dati II Jawa Timur. Surabaya, 1993.
23. Borror D.J & De Long. An Introduce to Study of Insect. 6 ed. Sounders College Publ. RENEHART & WISTON, 1982.
24. Beckage N.E; S.N. Thompson; B.A. Federici. Parasites and Pathogens of Insect. Vol 2. Academic Press, Inc. San Diego,1993.
25. Craft, B.A. Arthropod Biological Control Agent and Pesticides. A Wiley Interscience Pub. John Wiley & Sons. New York, 1990.
26. Gordon, R.M & M.M.J. Lavoipiere. 1978. Entomology for Student of Medicine. Black Scientific Pub. Oxford. London
27. Liu H; M. Skinner; B.L. Parker; B.M. Brown. Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *M. Anisopliae* (Deuteromycotina hypomycetes) and Other Entomophatogenic. J. Con. Entomol. 95 (4) 2002.
28. Munif, A dan Mardiana. Patogenitas Cendawan *Beauveria bassiana* Terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti* dan *Cx. pipiens fatigans* di Laboratorium. Bull.Pen.Kes. 1991. 3: 33-35