

HASIL PENELITIAN

Pengaruh *B. thuringiensis* H-14 Formula Tepung pada Berbagai Instar Larva *Aedes aegypti* di Laboratorium

Amrul Munif

Pusat Penelitian Ekologi Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Departemen Kesehatan RI, Jakarta

ABSTRAK

Aedes aegypti merupakan salah satu vektor penyakit demam berdarah yang disebabkan oleh virus dengue. Pengendalian populasi terhadap vektor (*Ae. aegypti*) telah banyak dilakukan diantaranya dengan menggunakan insektisida baik terhadap dewasa maupun pradewasa. Secara umum hasilnya memang memuaskan, namun penggunaan insektisida yang terus menerus dapat merangsang timbulnya kekebalan pada *Ae. aegypti*. Salah satu alternatif menggunakan cara menanggulangi permasalahan ini adalah dengan pengendalian hayati dengan menggunakan *Bacillus thuringiensis* H-14. Pentingnya penggunaan *B. thuringiensis* H-14 dalam formulasi tepung tidak menimbulkan efek samping atau keracunan terhadap manusia maupun organisme yang bukan sasarannya. Kejadian ini disebabkan karena daya racunnya yang spesifik terhadap serangga dan mempunyai spektrum yang sempit. Pengujian *B. thuringiensis* H-14 formula tepung pada berbagai instar larva *Ae. aegypti* dilakukan dengan cara menyemprotkan *B. thuringiensis* pada habitat larva *Ae. aegypti* dengan 4 macam konsentrasi dan 4 kali ulangan. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan faktorial dengan variabel macam konsentrasi, waktu dan banyaknya ulangan. Pengamatan dilakukan secara langsung dengan melihat jumlah larva yang lumpuh selama satu jam dan jumlah larva yang mati selama 48 jam kemudian dilakukan uji daya bunuh *B. thuringiensis* H-14 setiap satu minggu sekali sampai *B. thuringiensis* H-14 tidak mempunyai daya bunuh.

PENDAHULUAN

Penyakit demam berdarah dengue telah menyebabkan kesakitan dan kematian yang cukup tinggi setiap tahun. Pada tahun 1983 saja jumlah penderita sebanyak 11.062 jiwa dengan angka kematian 442 jiwa (CFR = 4,1%), kemudian pada tahun 1988 jumlah penderita 47.573 jiwa dengan angka kematian 1.527 (CFR = 3,2%); selanjutnya pada tahun 1991 jumlah penderita sebanyak 21.120 jiwa dengan angka kematian 578 jiwa (CFR = 2,8%) dan pada tahun 1993 jumlah penderita menurun menjadi 7.392 kasus dengan angka kematian 171 jiwa (CFR = 2,3%); tahun 1993 jumlah penderita mencapai 14.427 jiwa dengan angka kematian 461 jiwa (CFR = 3,4%). Kejadian luar biasa penyakit DBD secara nasional terjadi setiap 5 tahun sekali.

Mengingat sampai saat sekarang belum ditemukan obat untuk membunuh virus dengue, penanggulangan penyakit ini berupaperawatan penderita dan pemberantasan vektor. Pengendalian vektor secara kimia untuk memutuskan transmisi penyakit dilakukan dengan *fogging* untuk membunuh nyamuk dewasa dan larvasida dilakukan dengan menebar Abate pada tempat pembiakan nyamuk, juga melibatkan masyarakat berupa pembersihan sarang nyamuk di lingkungan daerah endemis.

Secara umum penggunaan insektisida sangat berhasil mengendalikan beberapa jenis serangga pengganggu maupun hama; namun penggunaan insektisida yang terus menerus akan menyebabkan resistensi dari berbagai masalah lingkungan. Salah satu cara untuk menanggulangi permasalahan tersebut adalah

dengan pengendalian biotik atau cara hayati.

Pemberantasan dengan carapengendalian biotik merupakan pengaturan populasi vektor oleh musuh-musuhnya di alam di antaranya pemangsa, parasit, virus, bakteri maupun cacing yang hidup pada tempat yang sama dengan cara menyebarkan agen di tempat pembiakan vektor, sehingga dapat menurunkan populasi vektor, di samping dampak terhadap lingkungan dapat diperkecil (Debach, 1974).

Salah satu pengendali hayati yang sedang digalakkan penggunaannya adalah *Bacillus thuringiensis* H-14 dengan berbagai formulasi. *B. thuringiensis* dibagi menjadi beberapa varietas atau subspecies berdasarkan H. antigen atau serotipe flagella dan serotipe kristalnya (Aronson et al, 1986); merupakan basil gram positif aerob – artinya untuk pertumbuhannya memerlukan oksigen, soliter atau berantai pendek. Bakteri ini berukuran panjang 3–5 mikron dan lebar 1–1,2 mikron. Endospora berbentuk batang dan dapat menghasilkan endotoksin pada masa pembentukan spora (Gibson and Gordon, 1974).

Karakteristik *B. thuringiensis* adalah kemampuannya untuk menghasilkan endotoksin yang disebut *paraspora crystal* (kristal paraspora) yang bersifat toksik terhadap serangga terutama dari Ordo Diptera dan Lepidoptera (Baumen et al, 1984). Kristal parasporal dapat berbentuk kubik, bipiramidal, ovoid ataupun amorph; setiap sel bakteri dapat menghasilkan 2 sampai 3 kristal parasporal (Tyrell et al, 1981).

Patogenitas *B. thuringiensis* berkaitan erat dengan toksin yang dihasilkan dan sampai saat ini telah diketahui ada 4 jenis toksin yaitu eksotoksin alpha, eksotoksin beta, eksotoksin gamma dan endotoksin delta. Eksotoksin alpha dan gamma tidak banyak dibicarakan karena bukan merupakan komponen yang aktif merusak tubuh induk semang (Burgerjon dan Martouret, 1971). Eksotoksin beta disebut juga *fly toxin* atau *fly vector* yang sangat toksik dan digunakan untuk membunuh larva Lepidoptera, Hymenoptera dan Diptera. Toksin ini larut dalam air, tahan panas dan akan merembes ke dalam media fermentasi padat selama proses pertumbuhan vegetatif (Dubois dan Lewis, 1981). Eksotoksin beta ini terbukti toksik terhadap larva serangga pada fase pergantian kulit atau selama proses metamorfosa. namun sebaliknya tidak toksik terhadap serangga dewasa (Bond et al, 1971).

Eksotoksin beta terdiri dari adenin, gula ribosa dan fosfat dengan perbandingan masing-masing berbanding satu. Eksotoksin beta ini mempunyai struktur yang mirip dengan ADP dan ATP, bekerja menghambat sintesis RNA, terutama RNA polimerase yang memerlukan DNA untuk bergerak di sepanjang utas yang akan ditranskripsi menjadi RNA. Enzim ini memerlukan empat ribonukleosida tri fosfat (ATP, GTP, CTP dan UTP); karena struktur eksotoksin beta mirip dengan ATP maka akan mengakibatkan pertumbuhan rantai RNA terhenti (Sabesta dan Horska, 1970).

B. thuringiensis menginfeksi inang masuk melalui mulut, setelah sampai di usus sporanya akan pecah dan menembus dinding sel. Kemudian masuk ke haemocoel dan berkembang dalam haemolymph. Dari sinilah baru tersebar ke seluruh tubuh induk semangnya. Daya racun dari *B. thuringiensis* disebabkan

oleh larutnya elemen toksik yang terdapat di dalam spora. Proses pelarutan ini berlangsung di dalam menesteron dengan melibatkan enzim proteolitik (Laksma dan Yoni, 1990). Akibat pengaruh enzim proteolitik dan pH usus yang alkalis dalam tubuh induk semangnya maka kristal-kristal akan lepas, sehingga toksinnya atau racunnya akan ke luar. Racun ini akan menyebabkan terjadinya pembengkakan sel-sel epitel usus tengah. Kerusakan struktur dan fungsi usus tengah ini menyebabkan keseimbangan pH dan ion di dalam hemolimfe terganggu, akibatnya terjadi kelunipuhan yang mengakibatkan kematian.

Efektivitas *B. thuringiensis* dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satu di antaranya adalah formulasi yang diberikan pada serangga sasaran dapat berbentuk granula, cair maupun tepung.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan yang digunakan adalah larvasida *Bacillus thuringiensis* H- 14 dalam bentuk tepung wadah air plastik dengan ukuran 36,5 cm x 28,5 cm x 8 cm, air kran berasal dari air tanah, larva *Aedes aegypti* dan berbagai instar, pH meter dan sebagainya.

Metode penelitian menggunakan rancangan faktorial dengan 4 macam dosis, terhadap perlakuan berbagai instar, selama waktu 4 minggu dan masing-masing dikerjakan 4 ulangan. Apabila dalam pengamatan ada perbedaan maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) (Steel and Tornie, 1991). Perlakuan larvasida *B. thuringiensis* yang diuji cobakan terdiri dari 4 dosis yaitu 832 mg/m² 624 mg/m² 416 mg/m² dan 208 mg/m² serta kontrol tanpa perlakuan larvasida *B. thuringiensis* H- 14.

Ke dalam wadah air diisikan air kran sebanyak 4,5 liter; sebanyak 20 wadah air digunakan sebagai tempat pengujian. Kemudian pada setiap wadah yang telah terisi air dimasukkan larva masing-masing 25 ekor. Selanjutnya setiap dosis larvasida dimasukkan ke dalam alat semprot yang telah berisi air kran sebanyak 0,5 liter. Penentuan dosis dan cara aplikasi ini disesuaikan dengan petunjuk WHO. Setelah larut homogen, disemprotkan ke dalam permukaan air. Indikator kemampuan kerja larvasida *B. thuringiensis* H- 14 adalah persentase kematian larva yang ditandai seluruh tubuh larva berwarna hitam dihitung mulai dari 1 Jam, 2 jam, 4 jam, 24 jam dan 48 jam setelah kontak dengan *B. thuringiensis*.

Untuk melihat lama kerja efektif *B. thuringiensis* H-14 formula tepung dalam membunuh larva *Aedes aegypti*, maka setiap minggu dimasukkan kembali 25 ekor larva dari berbagai instar ke dalam wadah air yang telah mengandung *B. thuringiensis* H-14. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam aplikasi dengan melihat secara langsung dan menghitung jumlah larva yang mati. Percobaan dihentikan apabila hasil pengamatan 0% untuk kematian larva *Ae. aegypti*. Bila ternyata kematian larva kontrol melebihi 15% maka data hasil pengujian harus dikoreksi dengan formula ABBOT. (Brown and Pal, 1971)

$$AI = \frac{(A - C) \times 100\%}{100 - C}$$

dimana:

AI = angka kematian setelah dikoreksi C = angka kematian pada kontrol A = angka kematian pada perlakuan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara kumulatif persentase kematian larva instar 1 lebih tinggi jika dibandingkan dengan instar yang lebih lanjut, karena larva instar 1 pertumbuhannya masih harus mengalami adaptasi dengan lingkungannya; kejadian ini serupa dengan penelitian di lapangan terhadap larva *Culex quinquefasciatus* instar awal (Seregeg dan Sukirno, 1987). Selain itu mungkin instar lain dalam keadaan kenyang sehingga tingkat tertelannya *B. thuringiensis* H-14 relatif menjadi rendah; karena ternyata *B. thuringiensis* H-14 tidak dapat membunuh pupa serangga sasaran yang tidak makan lagi, hal tersebut disebabkan karena proses infeksiya melalui mulut dan pengaruhnya terjadi di dalam tubuh serangga sasaran. Menurut Garcia dan Tozer (1976) larva *Ae. aegypti* instar 4 lebih rentan dibandingkan dengan tingkat instar lainnya; disebutkan juga bahwa tingkat kerentanan larva berbeda-beda tergantung dari tingkat instar larva (Ghuterland dan Khoo, 1987). Pernyataan di atas hampir sama dengan hasil penelitian pada instar 3 dan 4 (Tabel 1). Walaupun persentase angka kematian pada instar I ini cukup tinggi namun kematian bukan hanya disebabkan oleh infeksi *B. thuringiensis* H-14 melainkan juga oleh faktor lain; Larva instar I yang berumur beberapa jam belum dapat beradaptasi dengan lingkungan atau mungkin untuk mendapatkan makanan masih sulit. Hal ini juga ditunjang dan hasil pengamatan larva yang mati, warna tubuhnya tidak menghitam, yang menandakan matinya larva bukan karena *B. thuringiensis* H-14.

Kematian larva setelah kontak 48 jam dengan *B. thuringiensis* H-14 dalam bentuk tepung ternyata bila dilihat dari dosis yang digunakan, secara kumulatif dosis terbesar yaitu 832 mg/m² dapat membunuh lebih banyak dibandingkan dengan dosis lainnya; bahkan pada seluruh instar semuanya mengalami kematian 100% (Tabel 1). Namun pada umumnya kematian larva pada dosis terendahpun rata-rata cukup tinggi (86,1%); untuk mematikan separuh populasi larva uji, dosis yang diperlukan masih di bawah 208 mg/m² sedangkan untuk mematikan 95% populasi larva uji dosisnya di antara 416 mg/m² dan 624 mg/m².

Tabel 1. Jumlah persentase kematian larva *Aedes aegypti* dari berbagai instar setelah disemprot *Bacillus thuringiensis* H-14 formulasi tepung dalam berbagai dosis setelah kontak 48 jam

Dosis mg/m ²	Kematian larva instar (%)				Jumlah	% rata rata kematian
	Satu	Dua	Tiga	Empat		
208	100	56	95	94	345	86,1
416	100	76	96	96	371	92,7
624	99	96	98	100	393	98,2
832	100	100	100	100	400	1 (8)

Kemampuan daya bunuh *B. thuringiensis* H-14 formula tepung ternyata hanya bertahan sampai minggu ke tiga setelah diaplikasikan pada instar larva 4; sedangkan pada instar larva 1, 2, dan 3 hanya bertahan sampai 2 minggu (Tabel 2). *B. thuringiensis* H-14 formulasi tepung dengan dosis terendah 208 mg/m² hanya membunuh 3% larva instar satu pada minggu pertama

sedangkan dosis tertinggi hanya 38%. Pada minggu ke dua dengan dosis 208 mg/m² daya kemampuan *B. thuringiensis* membunuh larva menurun menjadi 0%, sedangkan pada dosis yang tertinggi yaitu 832 mg/m² pada minggu ke dua hanya dapat membunuh 10% dari seluruh larva uji.

Tabel 2. Jumlah kematian kumulatif berbagai instar larva *Aedes aegypti* setelah diaplikasi *B. thuringiensis* H-14 kaitannya dengan waktu.

Instar	Dosis	Waktu pengamatan (minggu)				Jumlah
		(%)				
		I	II	III	IV	
I	208	3	0	0	0	3
	416	24	4	0	0	28
	624	23	4	0	0	27
	832	38	1	0	0	39
II	208	8	0	0	0	8
	416	9	3	0	0	12
	624	9	3	0	0	12
	832	12	9	0	0	21
III	208	1	0	0	0	1
	416	6	3	0	0	9
	624	22	4	0	0	26
	932	11	9	0	0	20
IV	208	9	0	0	0	9
	416	34	6	11	0	51
	624	38	8	10	0	56
	832	39	10	12	0	61

B. thuringiensis H-14 formulasi tepung terhadap larva instar dua pada minggu pertama dengan dosis 208 mg/m² mampu membunuh 8% sedangkan pada dosis tertinggi yaitu 832 mg/m² daya bunuhnya mencapai 21%; pada minggu ke dua kemampuan daya bunuh menurun yaitu pada dosis terendah tidak ditemukan adanya larva yang mati, pada dosis tertinggi hanya mencapai 9%. Pada pengujian lebih lanjut pada minggu ke tiga dan empat pada dosis terendah maupun dosis tertinggi larva uji tidak ada yang mati.

Terhadap larva instar ke III pada minggu pertama ternyata pada dosis 208 mg/m² hanya mampu membunuh 1% dan dosis 832 mg/m² jumlah persentase larva yang mati hanya 11%. Perkembangan lebih lanjut pada minggu ke dua ternyata dengan dosis terendah semua larva dalam keadaan hidup namun sebaliknya pada dosis tertinggi angka kematian larva mencapai 9%, sedangkan pada minggu ke 3 dan 4 baik pada dosis tertinggi maupun terendah jumlah angka kematian 0%.

Kemampuan daya bunuh *B. thuringiensis* H-14 formula tepung terhadap larva instar IV ternyata pada dosis terendah persentase kematian mencapai 9% dan pada dosis tertinggi yaitu 832 mg/m² jumlah kematian mencapai 39% pada minggu pertama. Ternyata larva instar IV lebih rentan dibandingkan instar lainnya pada pengujian minggu pertama. Pada minggu ke dua hasil uji coba larva instar IV dengan dosis terendah tidak ada yang mati sedangkan pathi dosis 832 mg/m² mencapai 10% larva yang inati, sedangkan pada minggu ke empat semua larva dalam keadaan hidup.

Dari hasil pengamatan di lapangan ternyata aktivitas larva-sida *B. thuringiensis* H-14 cepat hilang jika diaplikasikan di dalam air yang berlumpur karena bakteri tersebut diserap oleh

partikel-partikel yang terdapat dalam lumpur. Besarnya persentase bakteri yang diserap tersebut sangat tinggi mencapai 99,8% dalam waktu 45 menit setelah aplikasi. Namun *B. thuringiensis* H-14 masih mampu mempunyai daya bunuh 90% dan populasi larva *Ae. aegypti* bila dipisahkan dari lumpur (Ohana et al, 1987).

Hasil analisis faktorial untuk mengetahui efektivitas *B. thuringiensis* H-14 formula tepung terhadap larva *Ae. aegypti* berdasarkan faktor waktu, variasi dosis, dan bentuk instar tertera pada **Tabel 3**. Pada analisis sidik ragam ternyata F hitung > F tabel, berarti ada perbedaan jumlah kematian larva yang bermakna antar perlakuan berbagai dosis *B. thuringiensis* H-14 formula tepung yang diberikan; sedangkan di antara berbagai instar sendiri mempunyai perbedaan jumlah kematian larva yang bermakna. Selanjutnya interaksi antara faktor dosis dan instar diperoleh F hitung = 9,15 dan F tabel = 2,80 (a = 0,01) dan 2,08 (a = 0,05), hal ini berarti bahwa interaksi antar faktor dosis dan instar terhadap jumlah kematian mempunyai hubungan yang erat. Hasil uji BNT untuk kematian larva *Ae. aegypti* antar perlakuan dosis ternyata berbeda sangat nyata pada dosis 208 mg/m² (**Tabel 4**). Sedangkan hasil uji BNT untuk kematian larva *Ae. aegypti* antar perlakuan instar memperlihatkan perbedaan yang sangat nyata pada instar II.

Kematian larva *Ae. aegypti* yang disebabkan oleh *B. thuringiensis* H-14 berdasarkan pengamatan selama penelitian ditandai dengan seluruh tubuh larva *Ae. aegypti* berwarna hitam, disebabkan kristal yang tertelan larva yang melepaskan toksin akibat keasaman tubuh larva *Ae. aegypti*; toksin yang keluar mengakibatkan sel-sel di saluran pencernaan mengalami paralisis dan epiteliumnya hancur atau rusak (Munif, 1996).

Efektivitas *B. thuringiensis* H-14 yang digunakan sebagai pengendali hayati terhadap serangga dipengaruhi oleh sifat khas spesies bakteri, metode pembiakan dan cara memformulasikan-**Tabel 3**. Analisis sidik ragam jumlah kematian larva *Aedes aegypti* dengan perlakuan penggunaan *Bacillus thuringiensis* H-14 formula tepung.

Sumber keragaman	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F hitung	F tabel	
					0,01	0,05
Dosis	3	115,3	38,43	16,2	4,2	2,8
Instar	3	182,05	60,7	25,5	4,2	2,8
Interaksi	9	196,01	21,8	9,2	4,2	2,8
Galat	48	114,25	2,4			
Total	63	607,61				

Tabel 4. Hasil uji beda nyata terkecil (BNT) jumlah kematian larva *Ae. aegypti* antar perlakuan dosis aplikasi dan *B. thuringiensis* H-14 formula tepung.

Dosis mg/m ²	Rata-rata	Dosis aplikasi			
		832 mg/m ²	624 mg/m ²	416 mg/m ²	208 mg/m ²
832	25	–			
624	24,56	0,44	–		
416	23,19	1,81	1,37	–	
208	21,56	3,44**	3,00**	1,63	–
BNT 5% = 2,21		BNT 1% = 2,95			

Tabel 5. Hasil uji beda nyata terkecil (BNT) kematian larva *Aedes aegypti* antar perlakuan instar.

Instar	Rata-rata	Satu	Empat	Tiga	Dua
Satu	24,94	–			
Empat	24,38	0,56	–		
Tiga	24,31	0,63	0,07	–	
Dua	19,44	5,5**	4,93**	4,87**	–
BNT 5% = 2,21		BNT 1% = 2,95			

Keterangan:

** = berbeda sangat nyata

* = berbeda nyata

nya (Prihatintyas, 1989). Walaupun bahan dasar pembuatan biosida sama yaitu *B. thuringiensis*, namun pengaruhnya terhadap serangga dapat berbeda karena perbedaan bentuk keemasan dan pembuatannya, sedangkan banyaknya toksin yang dihasilkan tidak berbanding langsung dengan banyaknya kristal paraspora. Juga suatu pembuatan yang berhasil menumbuhkan banyak spora belum menjamin akan memproduksi banyak kristal paraspora yang menghasilkan toksin.

B. thuringiensis yang mempunyai daya insektisida yang spesifik terhadap beberapa famili serangga dalam ordo diptera saja mempunyai arti penting di masa depan sebagai pengendali serangga karena aplikasinya akan sangat memperkecil kerusakan lingkungan dengan memperkecil risiko matinya serangga lain ataupun mikroorganismenya yang bukan sasaran.

KESIMPULAN

- 1) Tingkat kerentanan larva *Ae. aegypti* berbeda-beda tergantung tingkat instar larva dan instar larva 4 merupakan larva yang paling rentan dibandingkan instar larva lainnya.
- 2) *B. thuringiensis* H-14 formula tepung mempunyai kemampuan daya bunuh yang berbeda terhadap larva *Ae. aegypti* setelah kontak 48 jam; dosis tertinggi yaitu 832 mg/m² merupakan dosis yang efektif terhadap seluruh instar larva nyamuk.
- 3) *B. thuringiensis* H-14 formula tepung mempunyai daya bunuh sampai minggu ke tiga pada dosis 832 mg/m² walaupun persentase kematian larva hanya mencapai 12%. Sebaliknya pada dosis terendah yaitu 208 mg/m² hanya mampu membunuh dalam waktu 1 minggu.
- 4) Terdapat hubungan antara kemampuan membunuh larva *Aedes aegypti* dengan besarnya dosis serta tingkatan instar larva.

KEPUSTAKAAN

1. Debach P. Biological Control by N Enemies. Canridge University Press, London. 1974.
2. Aronson A, Tyrell DJ, James PC, Bulla LA. Relationship of the syntheses of spora coat protein and parasporal crystal protein in *Bacillus thuringiensis*. J Bacteriol 1982; 151: 339–410.
3. Gibson T, Gordon RE. Endospore Forming Rods and Cocci. Dalani Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. ed. 8. Baltimore: William and Wilkins Company.

4. Baumen L, Okamoto K, Unterman BM, Linch Ini, Baumen P. Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *J Invertebrate Pathol* 1984; 44: 329-41.
5. Burgejon A, Martouret D. Determination and significance of the host spectrum of *Bacillus thuringiensis*, Dalam *Microbial Control of Insects and Mites*, London: Acad Press.
6. Bond RPM, Boyce CBC, Rogof FHM, Shieh TR. The Thermostable Ecotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Dalam: *Microbial Control of Insect and Mites*. London: Academic Press. 1971.
7. Sabesta K, Horská K. Mechanism of inhibition of DNA dependent RNA Polymerase by ecotoxin of *Bacillus thuringiensis*, *Biochem Biophys Acta* 1970; 209: 357-67.
8. Laksmayoni AMA. Uji biokimiawi terhadap isolasi *Bacillus thuringiensis* dari peternakan ulat sutera di Kabupaten Sukabumi, Kediri dan Blitar. Skripsi Sarjana FKH IPB Bogor. 1990.
9. Stell RQD, Tome JH. *Prinsip and Prosedur Statistika*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta 1991 : h 210.
10. Brown AWA, Pal R. *Insecticide Resistance in Arthropoda*. WHO. Monograph No. 38, 1971.
11. Seregeg, Sukirno M. Perbandingan pengaruh biosida Sandoz dengan hactimos terhadap pencemar biologi *Culex quinquefasciatus* dalam satu uji coba lapangan di Jakarta, Indonesia. *Bull Penelit Kes* 1987; 15(1): 45-50.
12. Garcia R, Tozer W. *Endospore Forming Rods and Cocci*. Dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. ed. 8. Baltimore: William and Wilkins Company, 1974.
13. Hana B, Margaliti, Barak. 2,19 Fate of *Bacillus thuringiensis* sub spesies israelis under simulated field conditions. *J Appl Environment Microbiol* 1987; 53: 828-31.
14. Munif A. Pengaruh beberapa dosis *Bacillus thuringiensis* formula granula terhadap larva *An. aconitus* dan *Culex quinquefasciatus* pada simulasi air tergenang. *Maj Kes Masy Indon* 1996 tahun; XX(IV): S.
15. Prihatinatyas D. Pengaruh pemberian *B. thuringiensis* terhadap perkembangan stadium pradewasa lalat rumah *Musca domestica*. FKH - IPB. Bogor. 1989.



Nederland dan Jepang adalah dua negara yang telah memproduksi tempe secara modern dengan standar ukuran yang diteliti dan tepat. Menjadikan tempe alternatif pengganti daging !