

INVENTARISASI *Bacillus thuringiensis* DENGAN METODE CAWAN SEBAR PADA HABITAT HIDUP LARVA *Anopheles sp* PADA TANAMAN ECENG GONDOK (*Eichornia crassipes*) DI KABUPATEN LOMBOK TENGAH

Putriawati¹, Nurul Inayati², Agrijanti³

¹Jurusan Analisis Kesehatan, Poltekkes Kemenkes Mataram, Indonesia

Article Info

Article history:

Received Jun 12th, 2018

Revised July 20th, 2018

Accepted Agustus 26th, 2018

Keyword:

ABSTRACT

There are several ingredients can be used to prevent mosquito larvae, one of them is *B. thuringiensis* which is an enthopathogenic microbe that become biolarvasida to prevent *Anopheles Sp.* Larvae.

This research aims to inventory *Bacilus Thuringiensis* from the habitat of *Anopheles Sp* larvae on Eceng Gondok plants in Central Lombok district.

The method used in this study is using descriptive observation method which analyze the data with a description in aims to determine the existence of *B. Thuringiensis* after being inoculated on the media. The bacterial growth after sample preparation at 80 °C for 10 minutes was incubated at 30 °C for 24 hours. Next, the sample is identified or examine through macroscopically and microscopically identification, and it was carried out to obtain *B. thuringiensis* results in larval samples. The results of this identification have similar characteristics as *B. thuringiensis*, which are the form of round colonies, flat edges, white cream colony color, flat and smooth colony surface, and gram properties, gram positive bacilli with endospores located in the terminal or subterminal. With the presence of crystals in these bacteria which indicates that *B. bacteria thuringiensis* are toxic to the larvae of *Anopheles sp*.

Based on the research that has been carried out, the Inventory of *Bacilus Thuringiensis* is found in samples of *Anopheles sp* larvae in *Eichomia Crassipies* in Central Lombok district. But there is no *Bacilus Thuringiensis* in soil samples.

Copyright © *Jurnal Analisis Medika Bio Sains*
All rights reserved.

ABSTRAK (bahasa Indonesia)

Beberapa bahan dapat digunakan untuk menekan larva nyamuk, diantaranya *B. thuringiensis* yang merupakan mikroba enthopatogenik yang dapat menjadi biolarvasida untuk menekan larva *Anopheles sp*. Penelitian ini bertujuan untuk menginventarisasi *B.thuringiensis* dari habitat hidup larva *Anopheles sp* pada tanaman Eceng gondok di Kabupaten Lombok Tengah (Desa Batujai). Metode yang digunakan pada penelitian ini yaitu deskriptif observatif dengan analisa data secara deskriptif untuk menentukan terdapat atau tidaknya *B. Thuringiensis* setelah diinokulasi pada media. Pertumbuhan bakteri setelah dilakukan preparasi sampel pada suhu 80°C selama 10 menit, diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Kemudian di lakukan identifikasi/pemeriksaan sampel secara makroskopik dan mikroskopik di dapatkan hasil *B.thuringiensis* terdapat pada sampel larva. Hasil dari identifikasi ini memiliki ciri-ciri yang sama dengan *B.thuringiensis* yaitu bentuk koloni bulat, pinggiran yang rata, warna koloni putih krim, permukaan koloni datar dan halus serta sifat Gram yaitu basil Gram positif dengan endospora terletak di terminal/subterminal,

dengan adanya kristal pada bakteri ini yang menandakan bahwa bakteri *B.thuringiensis* ini bersifat toksin terhadap larva *Anopheles sp.* Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan inventarisasi *Bacillus thuringiensis* terdapat pada sampel Larva *Anopheles sp* pada tanaman Eceng gondok (*Eichornia crassipes*) di Kabupaten Lombok Tengah. Namun tidak terdapat *Bacillus thuringiensis* pada sampel tanah.

Kata Kunci : *B. thuringiensis* , Habitat hidup, Larva *anopheles sp*

Copyright © Jurnal Analisis Medika Bio Sains

Pendahuluan

Bacillus thuringiensis merupakan jenis bakteri gram positif yang terdiri dari sejumlah besar *subspecies* atau varietas dan galur-galur (*strains*) yang ditemukan hampir di semua habitat. Bakteri ini pertama kali ditemukan tahun 1901 oleh Ishiwata, yaitu peneliti Jepang pada ulat sutera (*Bombyx Mori*) yang diketahui bersifat patogen terhadap serangga (Herlambang, 2007). Dilihat dari sifat morfologi maupun fisiologinya bakteri ini memiliki persamaan dengan *Bacillus cereus*, yang membedakan dengan *B.thuringiensis* adalah adanya *kristal protein* yang bersifat *toksin* terhadap serangga (Benhard *et al.*, 1993).

Bacillus thuringiensis merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang, panjang 3-5 μm dan lebar 1-1,2 μm , memiliki *flagela*, bersifat aerob, ciri khas dari bakteri ini yang membedakan dengan *spesies Bacillus* lainnya adalah kemampuan membentuk kristal paraspora yang berdekatan dengan endospora selama fase sporulasi ke III dan IV. Bakteri ini termasuk patogen fakultatif dan penyebaran bakteri ini sangat luas didapatkan di tanah, pada makanan ternak, pada batang dan daun pepohonan dan lingkungan perairan (Martin dan Travers 1989).

Bangkai serangga merupakan sumber Nutrisi yang memenuhi dalam kelangsungan Hidup Bakteri ini, dimana pada saat nutrisi akan habis makan *Bacillus thuringiensis* akan membentuk spora dan mensintesis protein *kristal toksik* terhadap jenis serangga tertentu. (Zeigler, 1999).

Larva *Anopheles sp* merupakan serangga penyebab Malaria yang tempat berkembangbiakan larva *Anopheles sp* dipengaruhi oleh faktor lingkungan fisik perairan antara lain suhu, kecepatan arus perairan dan kekeruhannya. Lingkungan kimia perairan diantaranya adalah kadar garam dan oksigen terlarut, yang memiliki kadar garam dalam air yang kondusif antara 12%-18%. Lingkungan biologi perairan diantaranya adalah keberadaan biota perairan misalnya lumut, dan berbagai tanaman air yang membuat *spesies Anopheles* dapat hidup dan berkembang biak.

Eceng Gondok (*Eichornia crassipes*) merupakan tumbuhan air mengapung karena memiliki daun yang tebal dan gelembung (Rorong & Suryanto 2010) yang berkembangbiak sangat cepat sehingga dianggap sebagai tanaman yang dapat merusak lingkungan perairan. Anggapan negatif lainnya tentang Eceng Gondok adalah tanaman tersebut dapat menjadi salah satu penyebab datangnya banjir. Pada tanaman eceng gondok tidak banyak yang menduga bahwa larva *Anopheles* juga sering hinggap pada tanaman tersebut. Eceng Gondok juga sering dianggap merupakan tumbuhan pengganggu, merusak pemandangan dan tidak mempunyai nilai ekonomis atau tidak berfungsi (Mirawati 2007).

Penelitian sebelumnya telah berhasil mengisolasi *Bacillus thuringiensis* di beberapa lokasi di pulau Lombok. Dari beberapa isolat hanya satu yang berhasil ditemukan bahwa *Bacillus thuringiensis* dapat ditemukan pada tanaman Eceng Gondok. (Suryadi dkk, 2015).

Bacillus thuringiensis ini diisolasi menggunakan berbagai macam metode yakni metode cawan gores, metode cawan tuang dan metode cawan sebar. Pada penelitian sebelumnya isolasi bakteri *Bacillus thuringiensis* biasanya menggunakan metode cawan tuang, kekurangan metode ini bakteri tidak dapat tersebar dengan rata sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme.

Metode cawan sebar adalah metode ini digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme di dalam media *Nutrient Agar* dengan cara menuangkan *stock* kultur bakteri yang telah memadat, sedangkan *Pour Plate Kultur* dicampurkan ketika media masih cair (belum padat). Kelebihan teknik ini adalah mikroorganisme yang tumbuh dapat tersebar merata pada bagian permukaan agar.

Penelitian ini akan mengisolasi dan mengidentifikasi *Bacillus thuringiensis* dengan metode cawan sebar pada habitat hidup larva *Anopheles sp* pada tanaman Eceng gondok (*Eichornia crassipes*) di Kabupaten Lombok Tengah.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat Deskriptif Observatif, yaitu peneliti mengamati secara langsung obyek yang akan diteliti, kemudian digambarkan secara deskriptif untuk mengetahui ada atau tidaknya *Bacillus thuringiensis* pada habitat hidup larva *Anopheles sp*. (Notoatmojo 2012).

Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel menggunakan teknik *Purposive Sampling* yaitu pengambilan sampel berdasarkan kriteria yang dibuat oleh peneliti sendiri. Adapun kriteria sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kriteria inklusi (danau), dan kriteria eksklusi larva nyamuk *Anopheles Sp*.

Hasil Penelitian

A. Gambaran Umum Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui terdapat atau tidaknya *Bacillus thuringiensis* pada habitat hidup larva *Anopheles sp.* Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah habitat hidup larva *Anopheles sp* yang terdiri dari larva serta lingkungan tempat hidup larva (tanah). Pengambilan sampel dilakukan di Kabupaten Lombok tengah (Desa Batujai) serta pemeriksaan atau identifikasi dilakukan di Instalasi Litbangkes (Unit Riset Biomedik) Graha Mandalika RSUD Provinsi NTB. Kriteria sampel yang digunakan yaitu habitat hidup larva *Anopheles sp* yang dimana pada habitat itu juga terdapat larva *Anopheles sp.* Pengambilan sampel ini terletak pada satu lokasi namun sampel diambil pada tempat yang berbeda-beda.

B. Hasil Penelitian dan Analisa Data

Berdasarkan pemeriksaan/identifikasi yang di lakukan pada sampel habitat hidup larva *Anopheles sp* yang terdiri dari larva serta lingkungan tempat hidup larva (tanah) yang di ambil pada satu lokasi yang sama dengan 3 titik pengambilan yang berbeda-beda, didapatkan data hasil pengamatan pertumbuhan bakteri dari masing-masing sampel pada media pertumbuhan NA yang telah disuplementasi dengan antibiotik *amxicilin* .

Hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 4.1 sebagai berikut:

Tabel 4.1 Hasil Identifikasi *B. thuringiensis* pada Sampel Larva *Anopheles sp.*

No	Sampel	Jenis smpel	Makroskopis	Mikroskopis	Hasil
1.	Sampel I	Larva	Bentuk : bulat Warna : putih susu Permukaan : halus Konsistensi : lembek Tepian : rata Ukuran: bulat kecil	Bentuk : basil, panjang gemuk Warna : merah Penataan : mono, diplo Sifat:gram positif	Positif
		Tanah			Negatif
2.	Sampel II	Larva	Bentuk : bulat Warna : putih susu Permukaan : halus Konsistensi : lembek Tepian : rata Ukuran: bulat kecil	Bentuk : basil, panjang gemuk Warna : merah Penataan : mono, diplo Sifat:gram positif	Positif
		Tanah			Negatif

3.	Sampel II	Larva	Bentuk : bulat Warna : putih susu Permukaan : halus Konsistensi : lembek Tepian : rata Ukuran: bulat kecil	Bentuk : basil, panjang gemuk Warna : merah Penataan : mono, diplo Sifat:gram positif	Positif
		Tanah			Negatif

Keterangan: (positif) *Bacillus thuringiensis*, (negatif) tidak terdapat *Bacillus thuringiensis*,

Rincian identifikasi terdapat pada lampiran 3.

Pembahasan

Bacillus thuringiensis (*Bt*) merupakan bakteri Gram positif, berbentuk Batang dengan panjang 3-5 μm dan lebar 1-1,2 μm , memiliki spora yang khusus, bersifat aerob. Bakteri ini hidup ditanah, tanaman air pakan ternak, dan serangga yang sudah mati. *Bt* termasuk Bakteri Mesofil dengan kisaran suhu pertumbuhan 15-45°C dan suhu optimum 26-37°C (Zeigler,1999). Apabila kondisi Lingkungan tidak menguntungkan seperti suhu tinggi, kekeringan, asam, radiasi, dan kontak dengan desinfektan, Bakteri ini akan masuk ke fase sporulasi membentuk Endospora

(Hidayat, 2006). Saat sporulasi terjadi selain membentuk Endospora tubuh juga akan membentuk protein *cry* (Wainhouse, 2005).

Protein *Cry* pada Bt bersifat toksik bagi beberapa Hewan invertebrata terutama serangga dengan ordo Coleoptera (Zeigler,1999). Diptera (Arrieta,2004).dan Lepidoptera (Brown dan Whiteley, 1992). Toksin *Cry* bersifat sangat spesifik terhadap Serangga yang menjadi target sehingga cukup aman bagi Manusia, Hewan vertebrata, dan tumbuhan, serta mudah didegradasi secara alami oleh Tanah (IPSC-WHO, 1999). Oleh karena itu tidak larut dalam air ataupun pelarut organik, tetapi larut dalam larutan alkali yang terdapat pada sistem pencernaan serangga. Jika terkena suasana panas, asam lambung, dan enzim protease. Protein *Cry* akan terdenaturasi dan akan membentuk toksin aktif yang akan tetap aktif meskipun dipanaskan hingga suhu 80°C selama 10 menit (Dini, 2005).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan untuk menginventarisasi *Bacillus thuringiensis* pada habitat hidup larva *Anopheles sp* pada tanaman Eceng gondok yang terdiri dari larva, serta lingkungan tempat Hidup larva (tanah), didapatkan hasil *B. Thuringiensis* diisolasi dan banyak ditemukan pada sampel larva. Pertumbuhan yang paling banyak setelah dilakukan penggerusanyanglebihhalus

dikarenakan toksin racun pada *Bacillus thuringiensis* tersebut sudah tertelan oleh larva sehingga ditemukan *Bacillus thuringiensis* yang ber Endospora maupun kristalnya .

Bacillus thuringiensis adalah bakteri yang bersifat Gram positif, berbentuk batang yang memiliki kristal, dan *Endospora* terminal diujung sel, yang diisolasi dari sampel larva maupun tanah. Faktor kesalahan pada sampel larva dikarenakan pada saat penanaman sampel larva tidak terlalu digerus dengan halus sehingga pada saat inkubasi 1×24 pada suhu 30°C tidak ada nampak koloni pada media NA. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Suryadi dkk (2015), tentang Evaluasi entomopatogen *Bacillus thuringiensis* diisolasi dari daerah pantai Lombok terhadap larva nyamuk. Namun penelitian tersebut hanya ditemukan *Bacillus thuringiensis* pada isolasi pada sampel tanah. Penelitian tersebut mengisolasi *Bacillus thuringiensis* dari 20 lokasi dekat daerah pantai sekitar pulau Lombok dan berhasil mengisolasi *Bacillus thuringiensis* . Isolat toksik *B. thuringiensis* hanya diperoleh dari 4 lokasi. Isolat lainnya dari sisa 16 lokasi tersebut terdapat toksik rendah dan tidak toksik sama sekali. Hal ini menunjukkan bahwa tanah merupakan habitat potensial *B. thuringiensis*.

Inventarisasi *Bacillus thuringiensis* dilakukan juga pada sampel tanah pada saat pemeriksaan makroskopik ditemukan koloni yang tumbuh, setelah dilakukan pengecatan gram akan tetapi pada saat pemeriksaan mikroskopik muncul *Bacillus* namun bukan *Bacillus thuringiensis*. Faktor yang menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus thuringiensis* dikarenakan pada saat pengambilan sampel tersebut tidak memenuhi prosedur. Syarat ketentuan pengambialan sampel *Bacillus thuringiensis*, menurut F. Al. Momami and M. Obeidat (2011) dengan cara pengambilan sampel dilakukan sebagai berikut :

Permukaan tanah yang akan diambil sebagai sampel dibersihkan dari rumput, krikil dan akar tanaman, kemudian dibuat luban diameter 5-10 cm dan kedalaman 10 cm dari permukaan dan dilakukan pengukuran pH tanah. Sampai tanah diambil 10-20 gram, disimpandikantongplastikdan diberikan label berisi keterangan kode/No. Urut pengambilan sampel, tanggal pengambilan, kode habitat, lokasi dan pH. Sampel tanah disimpan dalam box pada temperatur kamar.

Bacillus thuringiensis merupakan bakteri yang termasuk patogen fakultatif dan dapat hidup pada tanaman maupun dalam tanah. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan di dapatkan bakteri *Bacillus thuringiensis* dapat ditemukan pada tanaman Eceng gondok (*Eichornia crassipes*). Dikarenakan kondisis lingkungan yang menguntungkan seperti suhu kelembapan maka bakteri ini akan membentuk fase sporulasi. Apabila larva dapat memakan toksik maka kristal protein tersebut akan tercerna dan menghasilkan reseptor pada sel epitelium usus tengah larva maka larva tersebut akhirnya mati (Gill *et al.*,1992).

Adapun hasil penelitian/identifikasi yang dilakukan pada semua sampel yaitu melakukan pewarnaan diferensial dengan pewarnaan kristal untuk mengetahui apakah dari ciri-ciri yang sudah ada terdapat kristal, dikarenakan salah satu ciri dari *B.thuringiensis* yang bersifat toksik yaitu dengan memiliki kristal parasporal. Inklusi kristal-seperti pertama kali muncul (7 jam) dan Pelepasan masuknya kompleks spora-kristal terjadi pada 22 jam setelah inkubasi. Tidak semua strain *B. thuringiensis* memiliki aktivitas antilarva. *Strain* yang mampu menghasilkan kristal protein akan bersifat toksik bagi larva nyamuk, sementara strain yang tidak menghasilkan kristal protein akan bersifat toksik lemah atau tidak toksik sama sekali (Vanlalhraia dkk, 2011).

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan setelah diinkubasi selama 72 jam ditemukan bakteri *Bacillus thuringiensis* setelah melakukan pewarnaan diferensial dan pewarnaan kristal dapat ditemukan pada sampel larva dikarenakan larva tersebut telah memakan toksik yang terdapat pada bakteri *Bacillus thuringiensis* tersebut.

Media *Nutrient Agar* merupakan Media yang sering digunakan untuk menumbuhkan berbagai jenis bakteri, diaantaranya Bakteri *Bacillus thuringiensis* secara primer, sedangkan media alternatif seperti (santen) untuk menyuburkan pertumbuhan bakteri *Bacillus thuringiensis* yang telah murni (Anisah,2015).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan kesimpulan sebagai berikut :

1. Identifikasi secara makroskopik dan mikroskopik menunjukkan bahwa *Bacillus thuringiensis* terdapat pada sampel Larva *Anopheles sp* pada tanaman Eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) di Kabupaten Lombok Tengah Desa (Batujai).
2. Inventarisasi *B.thuringiensis* di dapatkan pada sampel larva *Anopheles sp* pada tanaman Eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) di Kabupaten Lombok Tengah Desa (Batujai) .

Daftar Pustaka

- Herlambang, W. 2007. Profil Plasmid *Bacillus thuringiensis* Isolat Jakarta, Bogor, Depok, Tangerang, dan Bekasi. Skripsi Jurusan Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Bernhard, K. dan Urtz, R. 1993 *Production of Bacillus thuringiensis for Experiment and Commercial Use in Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. (Enwistle P.F., Cory J.S., Bailey M.J. & Higgs S. eds.). Bristol: John Walley & Sons.
- Martin, P. A. W dan Travers R. S. 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 55, No.10.
- Zeigler, D.R. 1999, *Bacillus Genetic Stock Center of strains, part 2; Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus*. The Ohio state University. Ohio
- Joshi, G. P., L. S. Usman C. P. Pant, M. J. Nelson & Supalin (1977). Ecological studies on *Aopheles sundaicus* in The Semarang Area of Central java . Indonesia WHO/VBC/77.677.
- Rorong JA, Suryanto E. 2010. Analisis Fitokimia Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) dan Efeknya sebagai Agen Photoreduksi Fe³⁺. *Chemistry Progress*. 3(1): 33-41.
- Mirawati A. 2007. Perancangan buku bertema pemanfaatan eceng gondok beserta media, promosinya. [Tesis]. Surabaya (ID): Petra Christian University.
- Suryadi, B. F., B. Yanuwidi, T. Ardyati, and Suharjono. 2015. "Evaluation of Entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* Isolated from Lombok Beach Area against Mosquito Larvae." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6 (2):148-54.
- Poopathi, S and Abidha, S 2011. Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis serovar israelensis*): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. *Journal of Physiology and Pathophysiology* Vol. 1(3), pp. 22-38
- Darnely., 2010. Penggunaan *Bacillus thuringiensis israelensis* untuk Memberantas *Aedes aegypti*. *Majalah Kedokteran FK UKI 2010 XXVII* No.4.

- Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS* 103: 15196-15199.
- Abidha, S 2011. Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis serovar israelensis*):
- Bravo A *et al.* 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis galur* collection. *Appl Environ Microbiol* 64: 4965-4972.
- Klein, D., Uspensky, I., & Braun, S. 2002. Tightly bound binary toxin in the cell wall of *Bacillus thuringiensis* *Appl Environ Microbiol.* 68: 3300-3307.
- Solihat, 2005. Insulation and purification and classification *Bacillus thuringiensis*:
- WHO. 1997. Ecology and control of vektor of public health no 555. Geneva
- Depkes RI. 2006. Profil kegiatan program pengendalian penyakit bersumber binatang tahun 2005, Dirjen PP&PL. Jakarta
- Silaiman DS. 2004. Studi komunitas dan populasi Nyamuk *Anopheles* di Desa Bolapapu Sulawesi Tengah kaitannya dengan.
- Santoso, Budi. 2002. Studi karakteristik habitat Larva Nyamuk *Anopheles maculatus* Theobald dan *Anopheles balabacensis* Baisas serta beberapa faktor yang mempengaruhi populasi Larva di Desa Hargotirto kecamatan kokap Kabupaten Kulon progo DIY. <http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/2000nbs.pdf?sequence=4>. Diakses pada tanggal 20 maret 2012.
- Departemen kesehatan republic indonesia. Pemberantasan serangan Nyamuk demam berdarah dengue di perkotaan. Jakarta: depkes RI. 2004
- Gandahusada, S., H. H. D Ilahudedan E. WPribadi, 1998. *Parasitologi Kedokteran*, edisi 3. FKUI, Jakarta.
- https://en.m.wikipedia.org/wiki/Anopheles_albimanus
- Depkes RI. (1999). modul parasitologi Malaria 2. Jakarta.
- Saputra. 2011. pengaruh lingkungan terhadap Nyamuk *Anopheles* pada proses transmisi Malaria. <http://uripsantoso.wordpress.com>. Dikes pada tanggal 30 Mei 2012
- Sittadewi EH. 2007. Pengolahan Bahan Organik Eceng Gondok Menjadi Media Tumbuh untuk Mendukung Pertanian Organik. *Jurnal Teknik Lingkungan.* 8(3): 229-234.
- Nuryanto H. 2006. *Dari Eceng Gondok Menjadi Rupiah*. Jakarta (ID): Azka Mulia Media.
- Notoadmojo, S. 2012. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Rineka Cipta. Jakarta.
- Zeiger, D.R. 1999. *Bacillus Genetic Stock Center of Strains, part 2; Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus*. The Ohio State University. Ohio.
- Wainhouse, D. 2005. *Ecological methods in forest pest management*. Oxford University press. Oxford.
- Arrieta, G 2004. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains Isolated from Coffe Plantations infested With the Coffe Berry Borer *Hypothenemus hsmpei* *J Tropikal* 52 (3): 757-764.
- Brown, K.L. dan Whiteley, H.R 1992. Molecular Characterization of Two Novel Crystallin Protein Genes from *Bacillus thuringiensis subsp Thompsoni* *J Bacteriol* 174:549-557.

F.Al. Momami and M. Obeidat, 2011. Abundance and Serotyping of pathogenic isolated from Ajloun Forestes. Journal Of biodiversity and Ecological Science Vol 1, issues 4:16-21.

Gill *et al.*,1992. Kerusakan. Pencernaan larva disebabkan bakteri *Bacillus thuringiensis*.

Vanlalhraia N, Kumar S, Guru subramanian G. 2011. *Bacillus sphaericus* in the biological control of mosquito vector complex. Sci Vis. 11(2):61–71.

Anisah. 2015 “Media Alternatif untuk pertumbuhan bakteri menggunakan sumber karbohidrat yang berbeda”.