|  |  |
| --- | --- |
| Jurnal Biologi dan Pembelajarannya (JB&P) | **F:\UNP KEDIRI\Jurnal Biologi dan Pembelajarannya-semnas 2015\admin jurnal dan logo\revisi-oke.jpg** |
| Nomor e-ISSN: 2406 – 8659  http://efektor.unpkediri.ac.id/index.php/biologi |

**Pemanfaatan Jamur *Metarhizium anisopliae* sebagai Pengendalian Hayati**

**Larva Nyamuk *Culex* sp.**

**Trio Ageng Prayitno1 dan Dwi Wahyuni**

1. IKIP Budi Utomo
2. Universitas Jember

Jl. Simpang Arjuno No. 14B Malang - Jl. Kalimantan No. 37, Kampus Tegalboto Jember

Email: [trioageng@gmail.com](mailto:trioageng@gmail.com)

**Abstrak**

Penggunaan insektisida kimia yang berlebihan sejauh ini banyak menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan. Salah satu solusi pengendalian hayati larva nyamuk *Culex* sp. ialah menggunakan jamur *Metarhizium anisopliae* yang ramah lingkungan. Pengendalian hayati merupakan salah satu upaya pemberantasan hama dengan memanfaatkan mikroorganisme atau tumbuhan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis LC50 dan LC90 larva instar III nyamuk *Culex* sp. yang diperlakukan dengan beberapa macam serial konsentrasi jamur *Metarhizium anisopliae*. Penelitian ini merupakan jenis penelitian laboratoris. Variabel bebas pada penelitian adalah beberapa macam serial konsentrasi jamur *Metarhizium anisopliae*, sedangkan variabel terikatnya ialah mortalitas larva instar III nyamuk *Culex* sp.. Data hasil penelitian ini adalah mortalitas larva instar III nyamuk *Culex sp*. yang diamati selama 48 jam, selanjutnya data tersebut diuji dengan menggunakan analisis Probit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa LC50 dan LC90 larva instar III nyamuk *Culex* sp. yang diperlakukan dengan beberapa macam serial konsentrasi jamur *Metarhizium anisopliae* berturut-turut adalah 8,782% dan 14,674%.

Kata kunci:

*Metarhizium anisopliae*, *Culex* sp.

|  |
| --- |
|  |

**PENDAHULUAN**

Nyamuk adalah serangga kelas Arthropoda yang sering menimbulkan penyakit, bisa berupa gigitan maupun sebagai penular virus *dengue* dan cacing *filaria*. Menurut Guimaraes dkk (2000), nyamuk penyebab penyakti dibagi menjadi 2 famili, yaitu nyamuk dari famili Anopheline dan famili Culicidae. Nyamuk famili Anopheline termasuk nyamuk yang aktif pada malam hari, sedangkan nyamuk famili Culicidae merupakan nyamuk yang aktif siang dan malam hari. salah satu Genus nyamuk yang merupakan famili Anopheline yaitu *Anopheles*, sedangkan Genus nyamuk yang termasuk famili Culicidae yakni; Genus *Aedes* dan *Culex*.

Spesies nyamuk dari Genus *Culex* yaitu *Culex* sp. yang merupakan nyamuk berbahaya bagi kesehatan karena spesies ini dikenal sebagai vektor penyebar cacing *filaria*. Wahyono (2010) menambahkan vektor penyebar cacing *filaria* di Indonesia diperkirakan lebih dari 23 spesies nyamuk dan salah satunya adalah nyamuk dari Genus *Culex*. Soepardi (2010) juga mengatakan bahwa penyakit filariasis atau yang dikenal dengan penyakit kaki gajar disebabkan oleh cacing *filaria*. Cacing filaria hidup di kejenjar dan saluran getah bening sehingga menyebabkan kerusakan berat pada sistem limfatik. Kerusakan berat ini berupa peradangan kelenjar dan saluran getah bening terutama di daerah pangkal paha, bisa juga organ vital laki-laki, payudara pada wanita, ketiak, dan dapat pula di daerah lain dari tubuh manusia.

Soepardi (2010) menambahkan penyakit filariasis menyebar hampir diseluruh wilayah Indonesia, 5 tahun terakhir ini jumlah provinsi yang melapor tentang kasus filariasis terus bertambah dan beberapa daerah diduga memiliki tingkat endemisitas yang relatif tinggi. *World Health Assembly* (2009) melaporkan 3 Provinsi dengan jumlah kasus filariasis tertinggi adalah Nanggroe Aceh Darussalam (2.359 orang), Nusa Tenggara Timur (1.730 orang) dan Papua (1.158 orang). Dinas Kesehatan Provinsi Jatim (2012) melaporkan jumlah penderita filariasis kronis di Jawa Timur sampai tahun 2012 yakni sebanyak 341 kasus yang tersebar di 32 kabupaten/kota pada 180 kecamatan dan 259 desa/kelurahan. Kasus filariasis terbanyak di Kabupaten Lamongan dengan 56 kasus, Kabupaten Malang dengan 37 kasus dan Kabupaten Ponorogo 29 kasus. Beberapa upaya Pemerintah untuk mengatasi kasus di atas yaitu dengan menggunakan insektisida kimia.

Menurut Widiyanti dan Mulyadihardja (2004), upaya pengendalian nyamuk penyebar penyakit masih dititik beratkan pada penggunaan insektisida kimia. Penggunaan insektisida kimia yang terus menerus akan menimbulkan dampak negetif yaitu dapat menyebabkan kerusakan lingkungan, keracunan bila tertelan oleh manusia, bisa menyebabkan iri tasi pada kulit manusia bila kontak secara langsung. Sukowati (2010) menambahkan pengunaan insektisida kimia dalam jangka panjang akan menyebabkan resistensi vektor dan akan membunuh organisme bukan target, sehingga perlu adanya solusi baru dalam pengendalian populasi nyamuk yang bersifat aman bagi manusia, hewan, dan lingkungan.

Salah satu solusi atau alternatif dalam pengendalian larva nyamuk sebagai pengganti insektisida kimia adalah *Metarhizium anisopliae*. Hasil penelitian Prayogo dkk (2005) menjelaskan mekanisme infeksi jamur *Metarhizium anisopliae* pada larva serangga dengan cara mekanik melalui saluran pernapasan serangga, sehingga mengganggu metabolisme larva serangga dan larva tersebut akan mengalami kematian. Jamur *Metarhizium anisopliae* ialah salah satu mikroorganisme patogen pada serangga, sehingga disebut agen kontrol untuk pengendalian serangga.

Hasil penelitian Widiyanti dan Mulyadihardja (2004) menunjukkan bahwa jamur *Metarhizium anisopliae* mampu membunuh larva nyamuk *Aedes aegypti*. Penelitian Prayogo dkk (2005) menunjukkan jamur *Metarhizium anisopliae* dapat mematikan larva serangga hama kedelai. Prayogo (2006) menunjukkan jamur *Metarhizium anisopliae* mampu mengendalikan serangga hama tanaman pangan. Hasil penelitian Suryadi dan Kadir (2007) menunjukkan jamur patogen serangga *Metarhizium anisopliae* mampu mematikan wereng coklat. Penelitian Sambiran dan Hosang (2007) juga menunjukkan bahwa jamur *Metarhizium anisopliae* mampu mengendalikan populasi kumbang tanduk.

Menurut Soegijanto (2006), siklus hidup nyamuk secara umum terdiri atas; telur, larva, pupa, dan dewasa. Telur nyamuk akan menetas menjadi larva pada umur 1-2 hari, larva nyamuk terbagi atas larva instar I, II, III, dan VI. Pupa akan terbentuk bila larva nyamuk berumur 4-9 hari. Nyamuk dewasa akan terbentuk bila pupu sudah berumur 2-3 hari. Fase larva instar III dipilih pada penelitian ini karena tubuhnya dilindungi eksoskeleton dan saluran udara pernapasannya terdiri atas spirakel dan siphon, serta fase ini merupakan fase aktif mencari makan, sehingga jamur *Metarhizium anisopliae* efektif dalam mengendalikan larva nyamuk. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis LC50 dan LC90 larva instar III nyamuk *Culex* sp. yang diperlakukan dengan beberapa macam serial konsentrasi jamur *Metarhizium anisopliae*.

**METODE PENELITIAN**

Rancangan dalam penelitian ini ialah rancangan faktorial, dengan desain percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL). penelitian ini memiliki 5 macam serial konsentrasi larutan jamur *Metarhizium anisopliae* untuk diperlakukan pada larva instar III nyamuk *Culex* sp. yakni 1%, 3%, 6%, 9%, 12%, dan 15% serta kontrol. masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali ulangan. Setiap ulangan diisi 20 ekor larva instar III nyamuk *Culex* sp. Sampel penelitian ini sebesar 420 ekor larva instar III nyamuk *Culex* sp. yang diperoleh dari Lembaga Penyakit Tropis Unair Surabaya. Jamur *Metarhizium anisopliae* diperoleh dari Balai Proteksi Tanaman Pertanian (BPTP), Yogyakarta. Urutan kegiatan penelitian diuraikan sebagai berikut.

1. Pembuatan Biakan dan Memanen Jamur *Metarhizium anisopliae*

Tahapan pembuatan biakan dan memanen jamur *Metarhizium anisopliae* diuraikan sebagai berikut.

1. Medium lempeng dibuat dalam 20 cawan petri.
2. Dengan menggunakan *Laminar Air Flow*, menginokulasikan isolat kapang *Metarhizium anisopliae* pada seluruh permukaan medium lempeng.
3. semua biakan tersebut diinkunasikan dalam inkubator dengan suhu 27°C selama 7 hari.
4. Biakan Jamur *Metarhizium anisopliae* dipanen dengan jarum inokulasi steril secara aseptis, sehingga sebagian tubuh vegetatif dan konidia jamur dapat terpisah dari media.
5. Seluruh bagian jamur *Metarhizium anisopliae* diambil dan diletakkan pada cawan petri steril kemudian siap digunakan untuk membuat beberapa macam serial konsentrasi larutan jamur *Metarhizium anisopliae*.
6. Penetasan Telur dan Seleksi Larva Instar III Nyamuk *Culex* sp.

Tahapan penetasan dan seleksi larva instar III nyamuk *Culex* sp. diuraikan berikut ini.

1. Telur-telur nyamuk *Culex* sp. diletakkan pada bak kecil berukuran 34 cm x 28 cm x 12 cm, masing-masing ± 300 butir secara terpisah, masing-masing bak tersebut diisi dengan aquades sebanyak 500 ml.
2. berikutnya ditunggu selama 1 sampai 2 hari hingga telur nyamuk menetas menjadi larva instar I.
3. Larva instar I nyamuk tersebut diberi makan dengan *pelet* lele sehari 3 kali dan dipelihara sampai menjadi larva instar III.
4. Selanjutnya ukuran sampel larva diamati dan dilihat secara langsung dan dibawah mikroskop, bila ukuran larva 7 sampai 8 mm dan memiliki rambut samping lebat maka sampel itu adalah instar III nyamuk *Culex* sp.
5. Kemudian larva instar III nyamuk *Culex* sp. diambil dengan menggunakan pipet plastik dan larva itu siap diperlakukan.
6. Pembuatan Beberapa Macam Konsetrasi Larutan Jamur *Metarhizium anisopliae*

Tahap-tahap pembuatan beberapa macam konsentrasi larutan jamur dapat diuraikan sebagai berikut.

1. sebanyak 1 g, 3 g, 6 g, 9 g, 12 g, dan 15 g bagian vegetatif dan konidia jamur *Metarhizium anisopliae* ditimbang dengan neraca analitik.
2. Selanjutnya 1 g bagian jamur tersebut diletakkan pada gelas ukur steril dan ditambah dengan aquades sampai skala mencapai 100 ml, sehingga didapat konsentrasi larutan jamur *Metarhizium anisopliae* 1%. Kegiatan ini diulang sampai mendapatkan konsentrasi 3%, 6%, 9%, 12%, dan 15%.
3. Perlakuan Larva Instar III Nyamuk *Culex* sp. dengan Beberapa Macam Konsentrasi Larutan Jamur *Metarhizium anisopliae*

Tahapan perlakuan larva instar III nyamuk *Culex* sp. diuraikan sebagai berikut.

1. Beberapa macam serial konsentrasi larutan jamur *Metarhizium anisopliae* disiapkan.
2. Masing-masing konsentrasi larutan jamur dilarutkan dalam 50 ml aquades yang dimasukan ke botol selai agar perkembangan larva mudah diamati.
3. Masing-masing sebanyak 20 larva instar III nyamuk *Culex* sp. dimasukkan dalam botol selai yang berisi larutan jamur *Metarhizium anisopliae* dengan konsetrasi yang ditentukan.
4. Mortalitas larva instar III nyamuk tersebut dihitung pada lama waktu 48 jam setelah perlakuan. Mortalitas larva instar III nyamuk dapat diketahui dengan menggunakan rumus = .
5. Data hasil penghitungan mortalitas larva nyamuk tersebut dicatat.
6. Analisis Data Penelitian

Data penelitian ini adalah mortalitas larva instar III nyamuk *Culex* sp. yang diamati selama 48 jam. LC50 dan LC90 larva instar III nyamuk *Culex* sp. didapatkan dari analisis Probit dengan SPSS *For Windows* versi 21.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata mortalitas larva instar III nyamuk *Culex* sp. yang diperlakukan dengan beberapa macam serial konsentrasi larutan jamur *Metarhizium anisopliae* pada lama waktu pengamatan 48 jam dapat dilihat pada Tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1. Mortalitas (%) Larva Instar III Nyamuk *Culex* sp. yang Diperlakukan dengan Beberapa Macam Serial Konsentrasi Larutan Jamur *Metarhizium anisopliae* pada Lama Pengamatan 48 jam

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Perlakuan (%) | Ulangan Ke- | | | Rata-rata Mortalitas (%) |
| 1 | 2 | 3 |
| K | 0 | 0 | 0 | 0,00 |
| 1 | 0 | 5 | 15 | 6,67 |
| 3 | 10 | 10 | 10 | 10,00 |
| 6 | 0 | 30 | 45 | 25,00 |
| 9 | 60 | 45 | 45 | 50,00 |
| 12 | 75 | 75 | 75 | 75,00 |
| 15 | 95 | 100 | 85 | 93,00 |

K (kontrol) = berisi aquades saja

Berdasarkan Tabel 1 di atas bahwa rata-rata mortalitas larva instar III nyamuk *Culex* sp. pada konsentrasi larutan jamur *Metarhizium anisopliae* 1% sebesar 6,67%; konsetrasi larutan jamur 3% sebesar 10,00%; konsentrasi larutan jamur 6% sebesar 25,00%; konsentrasi larutan jamur 9% sebesar 50,00%; konsentrasi larutan jamur 12 % sebesar 75,00%, dan konsentrasi larutan jamur 15% sebesar 93,00%. Hasil tersebut membuktikan bahwa bahwa semakin tinggi konsentrasi larutan jamur *Metarhizium anisopliae*, maka semakin besar mortalitas larva instar III nyamuk *Culex* sp.

Ringkasan hasil analisis Probit konsentrasi larutan jamur *Metarhizium anisopliae* terhadap tarva instar III nyamuk *Culex* sp. pada lama waktu pengamatan 48 jam dapat dilihat seperti Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Hasil analisis Probit Konsentrasi Larutan Jamur *Metarhizium anisopliae* terhadap Larva Instar III Nyamuk *Culex* sp. pada lama waktu pengamatan 48 jam

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Perlakuan | *Lethal Concentration* (LC) (%) | |
| LC50 | LC90 |
| Konsentrasi larutan jamur *Metarhizium anisopliae* | 8,782 | 14,674 |
| Batas atas | 9,743 | 16,710 |
| Batas bawah | 7,878 | 13,262 |

Hasil analisis Probit seperti terlihat pada Tabel 2 di atas, menunjukkan bahwa LC50 larva instar III nyamuk *Culex* sp. yang diperlakukan dengan beberapa macam serial konsentrasi jamur *Metarhizium anisopliae* sebesar 8,782% dengan batas bawah konsetrasi larutan jamur sebesar 7,878% dan batas atas sebesar 9,743%. LC90 larva instar III nyamuk *Culex* sp. yang diperlakukan dengan beberapa macam serial konsentrasi jamur *Metarhizium anisopliae* sebesar 14,674% dengan batas bawah sebesar 13,262% dan batas atas sebesar 16,710%.

Adanya kematian pada larva instar III nyamuk *Culex* sp. yang diperlakukan dengan beberapa macam konsentrasi larutan jamur *Metarhizium anisopliae* mengindikasikan bahwa konsentrasi larutan jamur memberikan efek yang mematikan pada larva instar III nyamuk tersebut. Pernyataan tersebut di atas sesuai dengan pendapat Prayogo dkk (2005) bahwa jamur *Metarhizium anisopliae* berpotensi dalam membunuh larva serangga hama. Prayogo (2006) menambahkan jamur *Metarhizium anisopliae* dapat dimanfaatkan sebagai alternatif pengendalian larva serangga hama karena jamur ini memiliki konidia yang bisa hidup di darat dan di air, sehingga tingkat patogenisitas dan efektivitasnya sangat tinggi dalam pengendalian larva serangga. Rustama dkk (2008) menjelaskan salah satu agensia hayati yang dapat digunakan untuk mengendalikan serangga hama adalah *Metarhizium anisopliae*.

Berdasarkan hasil penelitiannya Widiyanti dan Mulyadihardja (2004) menambahkan bahwa jamur *Metarhizium anisopliae* dapat digunakan sebagai biokontrol dalam pengendalian larva nyamuk karena jamur ini dapat mematikan larva nyamuk *Aedes aegypti*. Bruce dkk (2010) berargumen jamur *Metarhizium anisopliae* dapat mematikan larva nyamuk karena reseptor protein membran sel jamur *Metarhizium anisopliae* dapat mengenali protein membran sel larva nyamuk sehingga jamur ini akan mudah dalam menempel di tubuh larva nyamuk. Mekanisme infeksi jamur *Metarhizium anisopliae* pada larva serangga targe dilakukan secara mekanik melalui sistem pernapasan dan sistem pencernaan.

Mekanisme infeksi jamur *Metarhizium anisopliae* melalui sistem pernapasan yakni konidia jamur yang terlarut pada aquades masuk ke dalam *siphon* larva nyamuk *Culex* sp. ketika larva tersebut melakukan proses pernapas. Konidia yang berada pada saluran pernapasan larva nyamuk akan berkecambah membentuk hifa, selanjutnya hifa mendapatkan makanan dalam saluran pernapasan larva nyamuk dan kemudian tumbuh menjadi miselium dalam saluran pernapasan larva, sehingga menyumbat saluran pernapasan larva tersebut. Tersumbatnya salauran pernapasan larva itu menyebabkan oksigen tidak dapat masuk dan metabolisme larva nyamukpun terganggu, sehingga energi berupa ATP yang dihasilkan menurun.

Berikutnya karena larva nyamuk kekurangan energi maka aktivitas hidup larva itu terganggu dan kemudian larva itu mengalami kematian. Saat larva mati, hifa jamur *Metarhizium anisopliae* yang ada ditubuh larva nyamuk akan keluar lagi melewati spirakel, kemudian hifa tumbuh menjadi miselium, dan selanjutnya miselium menutupi seluruh permukaan tubuh larva nyamuk sehingga larva nyamuk terlihat seperti mumi. fenomenan itu biasa disebut *mumifikasi*. Penjelasan mekanisme infeksi di atas sesuai dengan pernyataan Prayogo dkk (2005) yakni hifa yang ada di dalam tubuh larva akan menembus keluar integumen larva serangga, lalu menjadi miselium dan menutupi seluruh tubuh larva serangga.

Berdasarkan hasil penelitian Sembel (2010) menjelaskan bahwa infeksi jamur entomopatogen dapat melewati sistem pencernaan. Saat larva nyamuk mencari makan da memakan nutrisi yang terlarut dalam aquades, konidia jamur *Metarhizium anisopliae* juga ikut tertelan. Konidia yang terdapat pada saluran pencernaan larva nyamuk akan tumbuh menjadi hifa, hifa tumbuh menjadi miselium. Miselium yang berada pada saluran pencernaan akan menyumbat jalannya makanan, sehingga metabolisme larva nyamuk terganggu. Terganggunya metabolisme larva nyamuk menyebabkan energi yang dihasilkan menurun. Menurunnya energi yang dihasilakan tidak sebanding dengan aktivitas larva nyamuk, sehingga larva nyamuk akan mengalami kematian.

**SIMPULAN**

Berdasarkan tujuan penelitian, maka kesimpulannya yaitu jamur *Metarhizium anisopliae* dapat mematikan larva instar III nyamuk *Culex* sp. serta LC50 dan LC90 larva instar nyamuk *Culex* sp. yang diperlakukan dengan beberapa macam serial konsentrasi jamur *Metarhizium anisopliae* berturut-turut adalah 8,782% dan 14,674%.

**DAFTAR PUSTAKA**

Guimaraes, A.E., C.Gentile, C.M. Lopes, R.P. de Mello. 2000. Ecology of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. III– Daily Biting Rhythms and Lunar Cycle Influence. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 95(6): 753-760*, Nov./Dec. 2000

Prayogo, Tengkano, dan Marwoto. 2005. *Prospek Cendawan Entomopatogen Metarhizium anisopliae untuk Mengendalikan Ulat Grayak Spodoptera litura pada Kedelai*. Malang: Balai Penelitian Tanaman Kacang-Kacangan dan Umbi-Umbian. (Online). Diakses 1 Februari 2014.

Prayogo. 2006. Upaya Mempertahankan Keefektifan Cendawan Entomopatogen untuk Mengendalikan Hama Tanaman Pangan. Malang: Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (Online). [8 Agustus 2011].

Rustama, Melanie, dan Irwan. 2008. Patogenitas Jamur Entomopatogen *Metarhizium anisopliae* terhadap *Crocidolomia pavonana* Fab. dalam Kegiatan Studi Pengendalian Hama Terpadu Tanaman Kubis dengan Menggunakan Agensia Hayati. Bandung: Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran (Online). [8 Agustus 2011].

Sambiran dan Hosang. 2007. Patogenisitas *Metarhizium anisopliae* dari Beberapa Media Air Kelapa terhadap Kumbang Tanduk (*Oryctes rhinoceros* L.). Sulawesi Utara: Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palm Lain Indonesia Coconut and Other Palmae Research Institute (Online). [8 Agustus 2011].

Sembel, Dantje T. 2010. *Pengendalian Hayati Hama-hama Serangga Tropis & Gulma*. Yogyakarta: ANDI Yogyakarta.

Silverthorn Andrew, Ober William; Garrison Claire; Johnson Bruce. 2010.

*Human Physiology an Integrated Approach*. New York: Pearson

Soepardi, Jane. 2010. *Masalah Vektor Demama Berdarah Dengue (DBD) dan Pengendaliannya di Indonesia, Buletin Jendela Epidemiologi*. Jakarta: Pusat Data dan Surveilans Epidermiologi Kementrian Kesehatan RI.

Sukowati, Supratman. 2010. *Masalah Vektor Demama Berdarah Dengue (DBD) dan Pengendaliannya di Indonesia, Buletin Jendela Epidemiologi*. Jakarta: Pusat Data dan Surveilans Epidermiologi Kementrian Kesehatan RI.

Wahyono. 2010. *Analisis Epidemiologi Deskriptis Filariasis di Indonesia, Buletin Jendela Epidemiologi*. Jakarta: Pusat Data dan Surveilans Epidermiologi Kementrian Kesehatan RI.

Widiyanti dan Mulyadihardja. 2004. Uji Toksisitas Jamur *Metarhizium anisopliae* terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti.* Singaraja: Laboratorium Mikrobiologi IKIP Negeri Singaraja. [8 Agustus 2011].

Widiyanti dan Mulyadihardja. 2004. Uji Toksisitas Jamur *Metarhizium anisopliae* terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti.* Singaraja: Laboratorium Mikrobiologi IKIP Negeri Singaraja. [8 Agustus 2011].