

# PENGUJIAN TOKSISITAS AKUT ORAL DAN DERMAL PADA BIOLARVASIDA *Metarhizium anisopliae* TERHADAP TIKUS PUTIH *SPRAQUE DAWLEY*

Deni Zulfiana\*

UPT BPP Biomaterial-LIPI

\*Corresponding author: zulfiana@yahoo.com

## Abstract

Acute oral and dermal toxicity test against white rats was conducted to determine the toxicity and side effects of bio-larvacide (*Metarhizium anisopliae* crude extract) on humans. In the oral test used a maximum dose 5000 mg/kg and dermal testing used a maximum dose of 2000 mg/kg. Dose treatment and control tested to 5 Spraque Dawley male rats. The results showed that oral treatment with a dose of 5000 mg/kg did not cause mortality and did not cause changes in anatomic pathology of visceral organs. In the dermal treatment with a dose of 2000 mg/kg did not cause mortality and did not cause changes in anatomic pathology of visceral organs. Based on these results LD50 acute oral *M. anisopliae* biolarvacide above 5000 mg/kg and the acute dermal is above 2000 mg/kg. It was therefore concluded that the formulation of *Metarhizium anisopliae* biolarvasida classified as not hazardous when used in accordance with the recommendation of the class I (WHO, 2003).

**Keywords:** Biolarvacide, *Metarhizium anisopliae*, toxicity test

---

## PENDAHULUAN

Penelitian dan pengembangan jamur entomopatogen *Metarhizium anisopliae* sebagai agen biokontrol dan biolarvasida sedang giat-giatnya dilakukan di berbagai belahan dunia. Hal ini dilakukan sebagai alternatif untuk mengurangi penggunaan larvasida kimia secara terus menerus yang berdampak buruk terhadap lingkungan dan kesehatan manusia. Berbagai strain *M. anisopliae* telah terbukti virulen terhadap vektor penyakit malaria (Scholte *et al.*, 2003) dan *Aedes aegypti* yang merupakan vektor penyakit demam berdarah (Scholte *et al.*, 2007; Darbro *et al.*, 2011). Namun keamanan penggunaan biopestisida ini terhadap lingkungan perlu dikaji lebih dalam.

Beberapa formulasi pestisida dapat bersifat sangat toksik sehingga dapat menimbulkan kematian pada hewan, dan makhluk lain yang bukan sasaran. Beberapa pestisida juga dapat mengiritasi kulit dan mata serta bersifat karsinogenik (Cabral *et al.*, 2006). Oleh karena itu perlu dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui reaksi tubuh terhadap bahan suatu pestisida dan mengukur kemam-

puan pestisida dalam menimbulkan perubahan patologi akibat keracunan.

Uji toksisitas terhadap tikus putih merupakan satu diantara upaya untuk mengetahui daya racun dan efek sampingnya terhadap manusia. Uji toksisitas yang umum dilakukan adalah secara oral dan dermal. Uji toksisitas akut oral bertujuan untuk mengetahui daya racun suatu bahan kimia apabila langsung masuk ke dalam saluran pencernaan, sedang uji toksisitas akut dermal bertujuan untuk mengetahui daya racun suatu bahan kimia melalui kontak dengan kulit. Pengujian secara oral dan dermal dilakukan karena keracunan sering terjadi melalui makanan dan minuman serta kontak dengan kulit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas oral dan dermal dari biolarvasida *M. anisopliae* dengan menentukan dosis yang menyebabkan kematian 50% tikus putih *Spraque Dawley*.

## MATERIAL DAN METODE

### Persiapan Ekstrak Jamur *M. anisopliae*

Ekstrak kasar jamur diperoleh dari penelitian sebelumnya (Zulfiana *et al.*, 2009).

Jamur ditumbuhkan dalam media *Czapex-dox broth* (CDB) dan diinkubasi di atas *rotary shaker* dengan agitasi 120 rpm selama 8 hari pada suhu kamar. Filtrat hasil fermentasi selanjutnya digunakan sebagai bahan untuk pengujian toksistas pada tikus.

### **Pengujian ekstrak jamur *M. anisopliae* pada tikus**

#### **Pengujian toksisitas akut oral**

Pada pengujian ini digunakan satu dosis maksimal (dosis tunggal) dari biolarvasida *M. anisopliae* yaitu dosis 5000 mg/kg BB. Masing-masing dosis dan kontrol dicobakan kepada 5 ekor tikus jantan *Sprague Dawley*. Berat badan tikus *Sprague Dawley* jantan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 180-190 gram untuk perlakuan dan 185-195 gram untuk kontrol dengan umur antara 2-3 bulan. Sebelum diberi perlakuan, tikus dipuaskan selama 24 jam. Setelah diberi perlakuan, dilakukan pengamatan perubahan perilaku dan reaksi fisiologis pada 1 jam, 2 jam, 3 jam 4 jam dan 24 jam setelah perlakuan. Pengamatan berupa penimbangan berat badan, perhitungan jumlah tikus yang mati dan gejala-gejala klinis yang tampak, dilakukan sampai hari ke 14 setelah perlakuan. Pada hari ke-14 semua tikus yang masih hidup dimatikan dan dilakukan pengamatan makroskopis (patologi anatomi) terhadap organ *visceral*. Apabila dengan dosis maksimal terjadi kematian selama masa pengamatan, pengujian dilakukan dengan dosis bertingkat (Deptan, 2004).

#### **Pengujian toksisitas akut dermal**

Pada pengujian secara dermal digunakan satu dosis yaitu 2000 mg/kg BB. Dosis perlakuan dan kontrol dicobakan pada 5 ekor tikus jantan. Berat badan tikus yang digunakan 185-195 gram dan untuk kontrol 175-185 untuk perlakuan. Tikus yang akan diberi perlakuan dicukur rambutnya pada bagian punggung seluas 3x3 cm menggunakan alat pencukur, dibiarkan selama 24 jam sebelum diberi perlakuan. Pemberian bahan uji dilakukan dengan meneteskan bahan uji pada bagian kulit yang dicukur. Bagian kulit yang telah diberi perlakuan ditutup dengan plastik supaya cairan tidak menguap, lapis paling luar ditutup dengan kain kasa dan diperban.

Pengamatan perubahan perilaku dengan reaksi fisiologis dilakukan pada 1 jam, 2 jam, 3 jam, 4 jam dan 24 jam setelah perlakuan. Setelah selesai pengamatan 24 jam perban dibuka, kulit dibersihkan dengan air dan diamati perubahan yang terjadi pada kulit tersebut. Pengamatan berupa penimbangan berat badan, penghitungan jumlah tikus yang mati, dan gejala klinis yang tampak dilakukan sampai hari ke-14 setelah perlakuan. Pada hari ke-14 semua tikus yang masih hidup dimatikan dan dilakukan pengamatan makroskopis (patologi anatomi) terhadap organ *viseral*. Apabila dalam 14 hari pengamatan terjadi kematian dan perubahan dermal yang nyata, maka pengujian dilakukan dengan dosis bertingkat (Deptan, 2004).

Analisis data dilakukan secara statistik menggunakan program statistik probit berdasarkan jumlah kematian tikus untuk masing-masing dosis, untuk mengetahui nilai LD<sub>50</sub> dan dilakukan pada batas kepercayaan 95%.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Toksisitas akut oral**

#### **Kematian**

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa setelah dilakukan pengujian secara oral biolarvasida *M. anisopliae* dengan dosis 5000 mg/kg BB, selama 14 hari setelah inokulasi tidak terjadi kematian tikus, karena biolarvasida ini tidak menyebabkan gangguan pada sistem pernafasan tikus. Menurut Lorgue *et al.*, (1996), kematian akan terjadi bila terjadi gangguan dan kegagalan respirasi (pernafasan) pada tikus. Tidak adanya tikus yang mati sehingga pengujian toksisitas oral akut tidak dilanjutkan dengan dosis bertingkat. Tikus perlakuan yang tidak mati, dieuthanasi dan dilakukan nekropsi pada hari ke-14 perlakuan untuk diamati perubahan patologi anatomi yang terjadi pada organ *viseral*.

#### **Perilaku**

Hasil pengamatan terhadap perilaku menunjukkan bahwa tikus-tikus yang diberi perlakuan dengan biolarvasida *M. anisopliae* pada dosis maksimal (5000 mg/kg BB) memperlihatkan gejala klinis yaitu hiperlakrimasi, hipersalivasi, lemah dan rambut

berdiri sampai pada jam ke-4 setelah intoksikasi (Tabel 1). Hal ini disebabkan karena adanya proses adaptasi dari biolarvasida dengan badan tikus selama beberapa jam pertama perlakuan. Hal ini tidak terjadi lagi setelah 4 jam perlakuan sampai hari terakhir perlakuan.

#### **Perubahan patologi anatomi**

Hasil pengamatan secara makroskopis pada organ *viseral* kelompok tikus yang diberi perlakuan dengan biolarvasida *M. anisopliae* menunjukkan adanya perubahan patologi anatomi yaitu degenerasi hati, dilatasi ventrikel kanan, dilatasi ventrikel kiri, apeks jantung tumpul (Tabel 2). Akan tetapi biopestisida tidak menyebabkan perubahan dan gangguan pada organ *viseral* lainnya seperti paru-paru, hati, ginjal, otak, usus, lambung, diafragma dan limpa.

#### **Berat badan**

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kelompok tikus perlakuan dengan biolarvasida *M. anisopliae* pada dosis 5000 gram/kg BB menunjukkan penghambatan berat badan sampai hari ke-3 setelah intoksikasi jika dibandingkan dengan berat sebelum intoksikasi (Tabel 3). Penghambatan berat badan diduga disebabkan dosis biopestisida yang cukup tinggi sehingga mempengaruhi dengan cepat sistem pencernaan dan mengganggu proses absorpsi pada saluran pencernaan. Akan tetapi penghambatan berat badan yang ditunjukkan akibat perlakuan biopestisida ini tidak sampai merusak dan menghancurkan permukaan internal dari lambung dan usus. Hal ini bertolak belakang dengan pestisida kimia yang mengandung peritoid (Manahan, 2003). Menurut Lorgue *et al.* (1996), gejala klinis yang juga terlihat akibat terpapar insektisida piretroid berupa efek gastro-intestinal.

#### **Toksisitas akut dermal**

##### **Kematian**

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa setelah dilakukan pengujian secara dermal dengan dosis 2000 mg/kg BB tidak terjadi kematian pada tikus percobaan sama seperti pengujian secara akut oral. Pengujian toksisitas akut dermal tidak dilanjutkan dengan dosis bertingkat. Semua tikus dieuthanasi dan

dinekropsi pada hari ke-14 setelah perlakuan untuk mengetahui perubahan makroskopis yang terjadi pada organ *viseral*.

#### **Perilaku**

Selama pengamatan perilaku sampai hari ke-14, menunjukkan bahwa sampai jam ke-4 setelah intoksikasi tikus mengalami lemah, dan rambut berdiri. Pada pengamatan hari ke-2 tikus tidak menunjukkan adanya perubahan perilaku (Tabel 4), tidak seperti pada pengujian akut oral yang menunjukkan perubahan perilaku sampai jam ke-4 setelah perlakuan. Hal ini diduga disebabkan dosis yang diberikan pada pengujian akut dermal lebih rendah dibandingkan dengan pengujian akut oral.

#### **Perubahan patologi anatomi**

Hasil pengamatan secara makroskopis pada organ *viseral* kelompok tikus yang diberi perlakuan dengan biolarvasida *M. anisopliae* tidak menunjukkan adanya perubahan patologi anatomi (Tabel 5). Hal ini diduga disebabkan karena perlakuan akut dermal tidak secara langsung berpengaruh pada organ-organ *viseral* karena perlakuan dilakukan melalui kulit.

#### **Berat badan**

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kelompok tikus perlakuan dengan biolarvasida *M. anisopliae* pada dosis 5000 g/kg BB menunjukkan penghambatan berat badan sampai hari ke-3 setelah intoksikasi jika dibandingkan dengan berat sebelum intoksikasi (Tabel 3). Penghambatan berat badan diduga disebabkan dosis biopestisida yang cukup tinggi sehingga mempengaruhi dengan cepat sistem pencernaan dan mengganggu proses absorpsi pada saluran pencernaan. Akan tetapi penghambatan berat badan yang ditunjukkan akibat perlakuan biopestisida ini tidak sampai merusak dan menghancurkan permukaan internal dari lambung dan usus. Hal ini bertolak belakang dengan pestisida kimia yang mengandung peritoid (Manahan, 2003). Menurut Lorgue *et al.*, (1996), gejala klinis yang juga terlihat akibat terpapar insektisida piretroid berupa efek gastrointestinal.

**Tabel 1.** Gejala klinis kelompok tikus *Sprague Dawley* yang mendapat perlakuan toksisitas akut oral, setelah pemberian biolarvasida *Metarhizium anisopliae* dengan dosis 5000mg/kg BB

Waktu	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5
1 jam pi	Rambut berdiri, lemah, hiperlakrimasi	Rambut berdiri, lemah, hiperlakrimasi	Rambut berdiri, lemah, hiperlakrimasi	TAK	Rambut berdiri, lemah
2 jam pi	Rambut berdiri, lemah, hiperlakrimasi hipersalivasi	Rambut berdiri, lemah, hipersalivasi	Rambut berdiri, lemah, hipersalivasi	TAK	Rambut berdiri, lemah, hipersalivasi
3 jam pi	TAK	Rambut berdiri, lemah	Rambut berdiri, lemah, hipersalivasi	TAK	Rambut berdiri, lemah, hipersalivasi
4 jam pi	TAK	TAK	Rambut berdiri, lemah, hipersalivasi	TAK	TAK
24 jam pi	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-1	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-2	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-3	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-4	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-5	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-6	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-7	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-8	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-9	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-10	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-11	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-12	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-13	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-14	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK

Keterangan: TAK: Tidak Ada Kelainan

### Toksisitas akut dermal

#### Kematian

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa setelah dilakukan pengujian secara dermal dengan dosis 2000 mg/kgBB tidak terjadi kematian pada tikus percobaan sama seperti pengujian secara akut oral sehingga pengujian toksisitas akut dermal tidak dilanjutkan dengan dosis bertingkat. Semua tikus dieuthanasi dan dinekropsi pada hari ke-14 setelah perlakuan untuk mengetahui perubahan makroskopis yang terjadi pada organ viseral.

### Perilaku

Selama pengamatan perilaku sampai hari ke-14, menunjukkan bahwa sampai jam ke-4 setelah intoksikasi tikus mengalami lemah, dan rambut berdiri. Pada pengamatan hari ke-2 tikus tidak menunjukkan adanya perubahan perilaku (Tabel 4), tidak seperti pada pengujian akut oral yang menunjukkan perubahan perilaku sampai jam ke-4 setelah perlakuan. Hal ini diduga disebabkan dosis yang diberikan pada pengujian akut dermal lebih rendah dibandingkan dengan pengujian akut oral.

**Tabel 2.** Temuan patologi anatomi kelompok tikus *Sprague Dawley* yang mendapat perlakuan toksisitas akut oral, setelah pemberian biolarvasida *M. anisopliae* dengan dosis 5000 mg/kg BB

Organ	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5
Paru-paru	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hati	TAK	TAK	Degenerasi	TAK	TAK
Ginjal	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Otak	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Usus	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Lambung	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Jantung	Dilatasi ventrikel kanan, dilatasi ventrikel kiri, apeks tumpul	TAK	TAK	Dilatasi ventrikel kanan, dilatasi ventrikel kiri, apeks tumpul	Dilatasi ventrikel kanan, dilatasi ventrikel kiri, apeks tumpul
Diafragma	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Limpa	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Lain-lain	Dieuthanasi pada hari ke-14 setelah intoksikasi	Dieuthanasi pada hari ke-14 setelah intoksikasi	Dieuthanasi pada hari ke-14 setelah intoksikasi	Dieuthanasi pada hari ke-14 setelah intoksikasi	Dieuthanasi pada hari ke-14 setelah intoksikasi

Keterangan: TAK: Tidak Ada Kelainan

**Tabel 3.** Rata-rata berat badan kelompok tikus *Sprague Dawley* yang mendapat perlakuan toksisitas akut oral, setelah pemberian biolarvasida *M. anisopliae* dengan dosis 5000 mg/kg BB

Hari Ke-	Berat Badan Tikus (gram)	
	Kontrol	Dosis 5000 mg/kgBB
0	183,42	185,32
1	185,35	177,54
2	189,56	179,16
3	191,23	182,52
4	195,43	185,43
5	197,65	186,75
6	199,33	189,45
7	201,24	190,16
8	205,78	193,23
9	209,76	196,40
10	213,90	196,75
11	214,19	199,68
12	218,37	203,77
13	223,34	208,34
14	231,56	213,92

**Tabel 4.** Gejala klinis kelompok tikus *Sprague Dawley* yang mendapat perlakuan toksisitas akut dermal, setelah pemberian biolarvasida *M. anisopliae* dengan dosis 2000 mg/kg BB

Waktu	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5
1 jam pi	Rambut berdiri, lemah	Rambut berdiri, lemah	Rambut berdiri, lemah	Rambut berdiri, lemah	Rambut berdiri, lemah
2 jam pi	Rambut berdiri, lemah	Rambut berdiri, lemah	Rambut berdiri, lemah	Rambut berdiri, lemah	Rambut berdiri, lemah
3 jam pi	TAK	TAK	Rambut berdiri, lemah	TAK	TAK
4 jam pi	TAK	TAK	TAK	TAK	Rambut berdiri, lemah, hipersalivasi TAK
24 jam pi	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-1	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-2	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-3	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-4	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-5	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-6	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-7	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-8	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-9	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-10	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-11	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-12	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-13	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hari ke-14	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK

Keterangan: TAK=Tidak Ada Kelainan

**Tabel 5.** Temuan patologi anatomi kelompok tikus *Sprague Dawley* yang mendapat perlakuan toksisitas akut dermal, setelah pemberian biolarvasida *M. anisopliae* dengan dosis 2000 mg/kg BB

Organ	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5
Paru-paru	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Hati	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Ginjal	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Otak	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Usus	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Lambung	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Jantung	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Diafragma	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Limpa	TAK	TAK	TAK	TAK	TAK
Lain-lain	Dieuthanasi pada hari ke-14 setelah intoksikasi	Dieuthanasi pada hari ke-14 setelah intoksikasi	Dieuthanasi pada hari ke-14 setelah intoksikasi	Dieuthanasi pada hari ke-14 setelah intoksikasi	Dieuthanasi pada hari ke-14 setelah intoksikasi

Keterangan: TAK: Tidak Ada Kelainan

**Tabel 6.** Rata-rata berat badan kelompok tikus *Sprague Dawley* yang mendapat perlakuan toksisitas akut dermal, setelah pemberian biolarvasida *M. anisopliae* dengan dosis 2000 mg/kg BB

Hari Ke-	Berat Badan Tikus (gram)	
	Kontrol	Dosis 2000 mg/kg BB
0	183,42	180,70
1	185,35	184,87
2	189,56	197,23
3	191,23	190,75
4	195,43	194,43
5	197,65	200,23
6	199,33	203,45
7	201,24	208,35
8	205,78	210,27
9	209,76	215,14
10	213,90	219,09
11	214,19	223,12
12	218,37	229,57
13	223,34	233,87
14	231,56	238,73

**Perubahan patologi anatomi**

Hasil pengamatan secara makroskopis pada organ viseral kelompok tikus yang diberi perlakuan dengan biolarvasida *M. anisopliae* tidak menunjukkan adanya perubahan patologi anatomi (Tabel 5). Hal ini diduga disebabkan karena perlakuan akut dermal tidak secara langsung berpengaruh pada organ *viseral* karena perlakuan dilakukan melalui kulit.

**Berat badan**

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kelompok tikus perlakuan dengan biolarvasida *M. anisopliae* tidak mengalami penghamabatan berat badan sampai pengamatan hari ke-14 setelah intoksikasi. Hal ini disebabkan karena perlakuan akut dermal tidak berdampak secara langsung pada organ-organ viseral terutama pada organ-organ viseral. Hasil penimbangan berat badan tikus selama 14 hari ditampilkan pada Tabel 6.

**Hasil Analisis Data Penentuan LD<sub>50</sub>**

Dalam pengujian ini, penentuan LD<sub>50</sub> tidak dapat ditentukan karena dosis yang dipergunakan adalah dosis maksimal yaitu 5000 mg/kg BB untuk oral dan 2000 mg/kg BB untuk dermal.

**KESIMPULAN**

1. Perlakuan oral dengan dosis 5000 mg/kg BB tidak menimbulkan kematian dan menimbulkan perubahan patologi anatomi organ *viseral* pada tikus percobaan.
2. Pada perlakuan dermal dengan dosis 200 mg/kg BB tidak menyebabkan kematian pada tikus perlakuan dan tidak menimbulkan perubahan patologi anatomi pada organ *viseral*.
3. Berdasarkan point 1 dan 2, biolarvasida *M. anisopliae* tergolong dalam klasifikasi tidak berbahaya jika digunakan sesuai dengan anjuran yaitu kelas I (WHO, 2003).

**DAFTAR PUSTAKA**

- Cabral, R., Hasegawa, R., Hoshiya, T., Hakoi, K., Ogiso, T., Boonyaphiphat, P., Shirai, T., & Ito, N. (2006). Carcinogenic Potential of some Pesticides in a Mediumterm Multiorgan Bioassay in Rats. *International Journal of Cancer*. 54. 489-493.
- Deptan. (2004). Pedoman Metode Pengujian Toksisitas Akut Formulasi pada Tikus, Ikan dan Cacing Tanah. Jakarta: Direktorat Jenderal Bina Sarana

- Pertanian, Direktorat Pupuk dan Pestisida.
- Darbro, J. M., Graham, R. I., Kay, B. H., Ryan, P. A., & Thomas, M. B. (2011). Evaluation of Entomopathogenic Fungi as Potential Biological Control Agents of the Dengue Mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Sci Technol.* 21. 1027-1047.
- Farenhorst, M., Hunt, R. H., Thomas, M. B., & Coatzee M. (2010). The Infectivity of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* to Insecticide-Resistant and Susceptible *Anopheles arabiensis* Mosquitoes at Two Different Temperatures. *Malar J.* 9. 71.
- Lorgue, G., Lechnet, J., & Riviere, A. (1996). *Clinical Veterinary Toxicology*. Oxford: Blackwell Science.
- Manahan, S. E. (2003). *Toxicological Chemistry and Biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. USA: Lewis Publisher.
- Scholte, E-J., Njiru, B. N., Smallegange, C., Takken, W., & Knols, B. G. (2003). Infection of Malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and Filariasis (*Culex quinquefasciatus*) Vectors with the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malar J.* 2. 29.
- Scholte, E-J., Takken, W., & Knols, B. G. (2007). Infection of Adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* Mosquitoes with the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Trop.* 102. 151-158.
- WHO. (2003). Space Spray Application of Insecticides for Vector and Public Health Pest Control. A Practitioner's Guide. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2003.5 Communicable Disease Control, Prevention and Eradication. Geneva: WHO Pesticides Evaluation Scheme (WHOPES), World Health Organization.
- Zulfiana, D. (2009). Pengaruh Komposisi Media Fermentasi *Metarhizium* sp. terhadap Mortalitas Larva *Aedes aegypti*. Prosiding Seminar Nasional Hari Nyamuk. 10 Agustus 2009. Bogor. Hal: 75-84.