

Penelitian

Aktivitas Larvasida Biji Bengkuang Sebagai Insektisida Nabati terhadap Larva Lalat *Cryomya Bezziana*

(Larvacide Activity of Yam Bean Seed as Bioinsecticides against *Chrysomya bezziana* Larvae)

Aulia Andi Mustika^{1,2*}, Upik Kesumawati Hadi³, April Hari Wardhana⁴, Min Rahminiwati²,
Ietje Wientarsih⁵

¹Mahasiswa Pascasarjana, ²Divisi Farmakologi dan Toksikologi,
³Divisi Parasitologi dan Entomologi, ⁵Divisi Penyakit Dalam. Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga Kabupaten Bogor, 16680

⁴Balai Besar Penelitian Veteriner, Jalan R.E. Martadinata No.30 P.O Box 151, Bogor3

*Penulis untuk korespondensi: aluyamusculus@gmail.com

Diterima 3 Agustus 2015, Disetujui 21 Maret 2016

ABSTRAK

Bengkuang merupakan salah satu tanaman obat yang berpotensi sebagai bioinsektisida. Penelitian ini bertujuan mengetahui efektivitas biji bengkuang sebagai insektisida nabati terhadap larva lalat *Cryomya bezziana* (*C. bezziana*) agen penyebab miasis secara *in vitro*. Penelitian ini terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Masing-masing sebanyak 20 Larva instar 1 (L1), Larva instar 2 (L2), dan Larva instar 3 (L3) *C. bezziana* digunakan untuk pengujian *in vitro* menggunakan pot plastik yang berisi media larva dan ekstrak *ethanol* biji bengkuang dengan konsentrasi bertingkat 0,06, 0,12, dan 0,25%. *Coumaphos* 0,06% dan akuades steril digunakan sebagai kontrol positif dan negatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0,25% mampu menyebabkan 100% kematian larva dan 100% pupa tidak menetas. Pengujian L3 menunjukkan bahwa ekstrak *ethanol* biji bengkuang mampu menyebabkan penurunan daya tetas pada semua konsentrasi. Pengujian L1 dan L2 untuk mengindikasikan efektifitas ekstrak sebagai racun perut, sedangkan pengujian pada L3 sebagai indikasi racun kontak. Biji bengkuang memiliki daya larvasida terhadap beberapa jenis larva serangga *C. bezziana*.

Kata kunci: biji bengkuang, *C. bezziana*, miasis

ABSTRACT

One potential medicinal plants as a bioinsecticides is a yam bean plant (*Pachyrhizuserosus*). This study is expected to examine the effectiveness of yam bean seeds as a bioinsecticides against fly larvae *C. bezziana* as a causative agent *in vitro*. This study is divided into 5 treatment groups. As many as 20 Larvae instar 1 (L1), Larvae instar 2 (L2), and Larvae instar 3 (L3) of *C. bezziana* used for *in vitro* testing using plastic pots containing larvae media and ethanol extracts of seed of yam bean with graded concentrations of 0,06, 0,12, and 0,25%. *Coumaphos* 0,06% and sterile distilled water were used as positive and negative controls. The result showed that at a concentration of 0,25%, it was capable of causing 100% death larvae and 100% pupae did not hatch. At L3 testing showed that the ethanol extract of the seed was able to cause a decrease in hatchability at all concentrations. Testing L1 and L2 indicated the effectiveness of the extract as a stomach poison, while testing L3 showed an indication of a contact poison. The seed of yam bean has larvicidal efficacy against some insects of *C. bezziana*.

Keywords: seed of yam bean, *C. bezziana*, myiasis

PENDAHULUAN

Miasis adalah masuknya larva lalat ke dalam jaringan hidup, penyakit ini masih menjadi kendala di dunia peternakan Indonesia. Penyakit ini menyerang semua jenis hewan vertebrata berdarah panas termasuk manusia. Berdasarkan geografi penyebarannya, agen primer penyebab miasis terbagi menjadi tiga, yaitu lalat *Cochliomya hominivorax* (*The New World Screwworm Fly*) yang tersebar di benua Amerika, lalat *Wohlfahrtia magnifica* yang tersebar di Eropa hingga China serta lalat *Chrysomya bezziana* yang tersebar di kawasan Afrika bagian tropis dan subtropis, subkontinen India, Asia Tenggara termasuk Indonesia dan Papua New Guinea (Geal et al., 2009).

Kerugian ekonomi yang ditimbulkan akibat miasis sangat besar, terutama di daerah yang menjadi sentral peternakan. Lee (2002) melaporkan bahwa kejadian miasis pada ternak dan manusia di daerah endemik mencapai 95%. Oleh karena itu, badan kesehatan hewan dunia atau *Office International de Epizootica* (OIE) menggolongkan penyakit ini ke dalam daftar B, yaitu penyakit menular yang mempunyai dampak sosial ekonomi atau mempunyai nilai kepentingan kesehatan pada suatu negara dalam perdagangan internasional terkait dengan produk-produk asal hewan. Miasis yang disebabkan oleh lalat *Chrysomya bezziana* (*C. bezziana*) telah tersebar luas di kepulauan Indonesia dan beberapa pulau diantaranya merupakan daerah endemik (Wardhana, 2012). Penelitian pendahuluan mengenai studi epidemiologi penyebaran kasus miasis di kabupaten Bogor menunjukkan bahwa hampir semua lokasi peternakan sapi perah di Kunak ditemukan lalat penyebab miasis. Selain itu, data kejadian miasis menunjukkan sebanyak 62.5% dari 40 peternak pernah mengalami kasus miasis pada ternaknya.

Peternak belum mampu mengendalikan kasus miasis secara optimal sampai dengan saat ini. Pengendalian miasis pada kasus di lapangan umumnya menggunakan antibiotik dan insektisida sintetik seperti *coumaphos*, *diazinon*, *fenthion*, *ivermectin*, *amitraz*, *enrofloksasin*, *spiramycin*, melalui pengobatan topikal (*spray*) dan perendaman (*dipping*) (Nielson, 2003; Wardhana, 2006). Penggunaan insektisida sintetik tersebut dilaporkan menimbulkan dampak negatif seperti berkembangnya ras resisten, terbunuhnya musuh alami hama, keracunan pada manusia dan ternak peliharaan, residu pada daging dan susu, serta menimbulkan pencemaran lingkungan (De Roos et al., 2003). Oleh karena itu, diperlukan sediaan alternatif untuk pengobatan miasis di lapang, misalnya sediaan berbasis tanaman obat.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa famili tanaman yang bersifat sebagai insektisida nabati adalah *leguminosae*, *meliaceae*, *annonaceae*, *asteraceae*, *piperaceae*, dan *rutaceae*. Tanaman dari famili *leguminosae* yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi insektisida nabati untuk pengendalian miasis adalah tanaman bengkuang (*Pachyrhizus erosus*). Senyawa rotenon yang terkandung didalam bengkuang diduga berkhasiat sebagai larvasida dan telah diuji mampu membunuh jentik nyamuk *Aedes aegypti* dan larva lalat *Musca domestica*. Senyawa ini dilaporkan memiliki mekanisme kerja dengan menghambat metabolisme serangga (Koul & Walia, 2009).

Ekstrak etanol biji bengkuang mengandung senyawa bioaktif yang bermanfaat sebagai insektisida nabati. Informasi efikasi dan keamanan biji bengkuang terhadap kasus miasis sampai saat ini belum ditemukan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efikasi dari biji tanaman tersebut secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan. Tahap pertama yaitu ekstraksi biji bengkuang, tahap kedua *screening* fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa aktif. Kedua tahapan ini dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Selanjutnya dilakukan penapisan efek larvasidal terhadap larva *C. bezziana* secara *in vitro* yang dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor.

Ekstraksi Tanaman Bengkuang

Biji bengkuang didapatkan dari petani binaan LPPM IPB yang ada di desa Sukawening Darmaga Bogor, biji yang dipilih adalah biji dari tanaman yang sudah berumur diatas 3 bulan. Selanjutnya proses pembuatan simplisia dilaksanakan di Laboratorium Farmasi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Simplisia biji bengkuang kering diekstraksi menggunakan metode maserasi. Maserasi dilaksanakan selama 3 x 24 jam dengan menggunakan konsentrasi pelarut etanol 96%. Perbandingan simplisia dan pelarut adalah 1:10. Ekstrak kental yang diperoleh dari maserasi dilakukan evaporasi menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C dan kecepatan 50 rpm.

Profil Fitokimia

Penapisan fitokimia dilaksanakan untuk mengetahui adanya senyawa yang termasuk dalam metabolit sekunder antara lain: alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, antrakuinon, dan terpenoid. Prosedur penapisan fitokimia yang digunakan berdasarkan metode Reji and Rixin (2013).

Uji In Vitro Ekstrak Tanaman Bengkuang pada L1 dan L2

Uji *in vitro* dilakukan pada dua media yang berbeda, yaitu media *meat-blood mixture* (MBM) untuk uji larva instar I (L1) dan *larval rearing media* (LRM) untuk uji larva instar II (L2) (Sukarsih et al., 2000).

Media MBM yang telah dicampur ekstrak etanol biji bengkuang dengan konsentrasi bertingkat dimulai dari 0%, 0,5%, 1%, dan 2% serta *Coumaphos* 0,06% sebagai kontrol obat diletakkan di dalam kontainer plastik berukuran 18,5 x 13,5 x 4,5 cm. Sebanyak 20 (L1) setiap ulangan diletakkan di atas media dan dipelihara pada ruangan dengan suhu 30–32 °C. Larva yang masih hidup sampai hari ke-2 dipindahkan ke kontainer plastik yang baru dan dipelihara pada media LRM sampai menjadi pupa dan menetas menjadi imago. Pengujian L2 menggunakan metode seperti yang digunakan pada L1, tetapi menggunakan media LRM (Wardhana et al., 2014).

Uji In Vitro Ekstrak Tanaman Bengkuang pada L3

Pengujian dilakukan di dalam pot obat yang berisi ekstrak biji bengkuang dengan konsentrasi bertingkat dimulai dari 0%, 0,5%, 1%, dan 2% serta *Coumaphos* 0,06% sebagai kontrol obat. Uji efek racun kontak dilakukan dengan cara merendam larva (*dipping*) ke dalam larutan uji pada satuan waktu tertentu yaitu 10 detik. Larva sebanyak 20 per ulangan direndam dalam masing-masing larutan perlakuan (10 mL) selama 10. Larva tersebut diinkubasi pada suhu 30-32°C sampai menjadi pupa dan menetas menjadi imago (Spradbery, 2002).

Peubah dan Analisis Data

Peubah yang diamati adalah jumlah kematian larva, bobot pupa, daya tetas pupa menjadi lalat dewasa dan kondisi fisik lalat dewasa yang menetas. Data hasil penelitian dianalisis menggunakan *general linear model* (GLM) dengan program Minitab 16.

HASIL

Ekstraksi dan Kandungan Metabolit Sekunder dalam Tanaman

Hasil penapisan fitokimia dari ekstrak etanol biji bengkuang menunjukkan hasil yang positif mengandung senyawa golongan flavonoid, terpenoid, tanin, dan alkaloid. Salah satu senyawa golongan flavonoid dari tanaman bengkuang adalah rotonon. Senyawa ini dilaporkan bersifat insektisida/larvasida pada beberapa jenis serangga (Mustika et al., 2016).

Efikasi In Vitro Ekstrak Etanol Biji Bengkuang terhadap Larva *C. bezziana*

Tabel 1 menunjukkan bahwa bahwa biji bengkuang memiliki aktivitas sebagai larvasidal terhadap L1. Biji bengkuang 0,25% memiliki aktifitas larvasida paling efektif, yaitu mampu membunuh 100% larva dalam waktu kurang dari 24 jam. Aktifitas ini tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol obat (*coumaphos* 0,06%). Sementara itu, pada konsentrasi yang lain menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstraknya maka semakin tinggi tingkat kematian larvanya. Pada konsentrasi 0,12% dan 0,06%, larva mampu berkembang hingga ke stadia pupa, tetapi bobotnya di bawah normal (kurang dari 26 mg). Akibatnya, larva pada kelompok tersebut tidak mampu menetas menjadi lalat. Larva pada kelompok 0,06% tidak ada yang menetas menjadi lalat, karena semua pupa yang terbentuk menjadi kering. Larva pada konsentrasi 0,12% mampu menetas menjadi imago, tetapi kondisi imago mengalami cacat pada sayapnya sebesar 90% dan 10% lainnya tidak mampu keluar dari pupa secara sempurna. Kondisi tersebut menyebabkan imago tidak dapat bertahan hidup lama.

Hasil-hasil tersebut mengindikasikan bahwa senyawa aktif yang terdapat dalam biji bengkuang memiliki aktifitas sebagai racun perut dan *antifeedant*. Racun perut dapat dilihat dari kematian yang akut dari larva 1 sejak dilakukan *treatment*, sedangkan *antifeedant* dapat dilihat dari bobot pupa yang terbentuk (Wardhana et al., 2011).

Tabel 2 menunjukkan bahwa aktivitas larvasida ekstrak etanol biji bengkuang terhadap L2 cenderung memiliki efek yang sama dengan L1. Kelompok perlakuan 0,25% memiliki aktifitas paling efektif, yaitu mampu membunuh 100% larva dalam waktu kurang dari 24 jam. Kelompok konsentrasi 0,06% sudah mampu membunuh L2 lebih dari 50%.

Tabel 1 Efikasi Ekstrak Etanol Biji Bengkuang terhadap Larva Instar 1 (L1) *C. bezziana* yang Diamati Selama 7 Hari Pasca Perlakuan

Perlakuan	Jumlah larva 1 yang diuji	Kematian L1 <i>C. bezziana</i> (%)	Pupa	
			Jumlah pupa yang terbentuk (%)	Bobot pupa (mg)
0 %	20,00	0,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^c	73 ± 0,00 ^c
0,06 %	20,00	67,00 ± 1,12 ^b	33,00 ± 1,12 ^b	27 ± 0,01 ^b
0,12 %	20,00	96,00 ± 0,58 ^c	2,00 ± 0,58 ^a	4 ± 0,03 ^a
0,25 %	20,00	100,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Kontrol obat	20,00	100,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a

Keterangan : Huruf superskript yang berbeda pada kolom atau baris yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada $p < 0,05$. Kematian larva, jumlah pupa yang terbentuk, serta bobot pupa dianalisis statistik secara terpisah.

Tabel 2 Efikasi Etanol Biji Bengkuang terhadap Kematian Larva Instar 2 (L2) *C. bezziana* yang Diamati Selama 7 Hari Pasca Perlakuan

Perlakuan	Jumlah L2 yang diuji	Kematian L2 <i>C. bezziana</i> (%)	Pupa	
			Jumlah pupa yang terbentuk (%)	Bobot pupa (mg)
0 %	20,00	0,00 ± 0,00 ^e	100,00 ± 0,00 ^a	72 ± 0,00 ^a
0,06 %	20,00	52,00 ± 0,81 ^c	48,00 ± 0,81 ^b	11 ± 0,00 ^b
0,12 %	20,00	78,00 ± 1,07 ^b	22,00 ± 1,07 ^c	4 ± 0,02 ^c
0,25 %	20,00	100,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^d	0,00 ± 0,00 ^d
Kontrol obat	20,00	20,00 ± 0,00 ^d	0,00 ± 0,00 ^d	0,00 ± 0,00 ^d

Keterangan : Huruf superskript yang berbeda pada kolom atau baris yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada $p < 0,05$. Kematian larva, jumlah pupa yang terbentuk, serta bobot pupa dianalisis statistik secara terpisah.

PEMBAHASAN

Tabel 3 menunjukkan bahwa kelompok ekstrak biji bengkuang 0,25% memiliki aktifitas larvasida yang paling efektif terhadap L3. Efektifitas sedian ini dapat dilihat dari jumlah pupa yang terbentuk dan hambatan stadia pupa untuk menetas. Hasil penelitian membuktikan bahwa kelompok biji bengkuang pada konsentrasi tertinggi mampu menghambat terbentuknya pupa, jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Hambatan pembentukan pupa diakibatkan efektifitas senyawa aktif yang mampu berperan sebagai racun kontak. Waktu kontak yang relatif singkat mampu memberi kesempatan senyawa aktif hanya kontak dengan kutikula larva uji instar akhir (L3) yang tidak lagi melakukan aktifitas makan.

Bahan aktif tanaman bengkuang yang berpotensi sebagai insektisida adalah rotenon. Hal ini dapat dilihat gejala klinis larva yang terpapar dengan ekstrak yang menunjukkan adanya larva yang hiperaktif dan konvulsi sebelum akhirnya larva tersebut mati (10%) serta larva yang lemah sebelum akhirnya mati tanpa adanya konvulsi (90%). Senyawa ini masuk ke dalam tubuh serangga melalui aliran hemolimfe dan bekerja dua mekanisme yang berbeda. Mekanisme yang pertama bekerja dengan cara menghambat fungsi enzim kolinesterase, sehingga pemecahan asetilkolin menjadi kolin dan asam asetat tidak terjadi. Akibatnya, terjadi penimbunan senyawa asetilkolin pada ujung-ujung saraf, karena sebagian besar asetilkolin tidak dapat terhidrolisis. Hal ini dapat mengakibatkan aktivitas ko-

Tabel 3 Efikasi Ekstrak Etanol Biji Bengkuang terhadap Daya Tetas Larva Instar 3 (L3) *C. bezziana* Pasca Perendaman Selama 10 Detik

Perlakuan	Jumlah larva III yang diuji	Daya tetas larva (%)	Pupa	
			Jumlah pupa yang terbentuk (%)	Bobot pupa (mg)
0 %	20,00	100,00 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^a	84 ± 0,01 ^c
0,06 %	20,00	100,00 ± 0,00 ^c	76,00 ± 1,50 ^c	40 ± 0,05 ^a
0,12 %	20,00	100,00 ± 0,00 ^b	69,00 ± 1,30 ^b	66 ± 0,01 ^b
0,25 %	20,00	100,00 ± 0,00 ^b	65,00 ± 1,65 ^b	45 ± 0,00 ^a
Kontrol obat	20,00	84,00 ± 1,52 ^b	26,00 ± 1,20 ^b	41 ± 0,00 ^a

Keterangan : huruf superskript yang berbeda pada kolom atau baris yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada $p < 0,05$. Daya tetas larva, jumlah pupa yang terbentuk, dan bobot pupa dianalisis statistik secara terpisah.

linergik yang berlebihan, karena sel-sel efektor menerima signal-signal secara terus menerus. Gejala klinis yang dapat dilihat pada mekanisme pertama ini adalah depresi saluran pernafasan, konvulsi serta mengeluarkan cairan dari anus (diare) sebagai respon terhadap peristaltik yang meningkat (Mustika et al., 2016).

Mekanisme kerja yang kedua adalah dengan menghambat metabolisme energi yang terjadi di mitokondria, gejala klinis yang terlihat adalah larva yang mulai terlihat lemah dan mati secara akut/cepat (Han et al., 2014)

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak etanol biji bengkuang pada konsentrasi 0,25 % memiliki aktifitas larvasida yang paling efektif terhadap larva *C. bezziana*. Senyawa aktif (rotenon) yang terkandung di dalam biji bengkuang memiliki sifat sebagai racun perut dan antifeedant.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Pendidikan Nasional yang telah mendanai sebagian dari penelitian ini melalui program Beasiswa Unggulan, serta Kementerian Pertanian melalui program Kerjasama Kemitraan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Nasional (KKP3N) sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan lancar.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak terkait dalam penelitian ini”

DAFTAR PUSTAKA

- De Roos AJ, Zahm SH, Cantor KP, Weisenburger DD, Holmes FF, Burmeister LF, Blair A. 2003. Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occupational and Environmental Medicine* 60: e11.
- Gealh WC, Ferreira GM, Farah JG, Teodoro U, Camarini ET. 2009. Treatment of oral miasis caused by *cochlomya hominivorax*, two cases treated with ivermectin. *Journal Oral Maxillofacial Surgery* 47: 23-26.
- Han G, Casson RJ, Chidlow G, Wood JP. 2014. The mitochondrial complex I inhibitor rotenone induce endoplasmic reticulum stress and activation of GSK-3beta in cultured rat retinal cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55: 5616-5628
- Koul O, Walia S. 2009. Comparing impacts of Plant Extract and Pure Allelochemicals and Implication for Pest Control. *CAB Review : Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* No. 049. doi:10.1079/PAVS-NNR20094049
- Lee J. 2002. Hunting screwworm fly. Proc. of screwworm fly emergency preparedness conference Canberra. Canberra, 12-15 November 2001. Departement of Agriculture Fisheries and Forestry Australia . p 8-91.
- Mustika AA, Hadi UK, Wardhana AH, Rahminiwati M, Wientarsih I. 2016. The efficacy of larvasides of leaves of yam bean as botanical insecticides against fly larvae myiasis *Crysomya bezziana*. *IOSR Journal of Pharmacy* 6: 76-81.

- Nielson SC. 2003. *Chrysomya bezziana* in pets dogs in Hongkong : A potential threat to Australia. Australian Veterinary Journal 81: 202-205.
- Reji AF, Rexin NA. 2013. Phytochemical study on *Sesbania grandiflora*. Journal of Chemical and Pharmacheutical Research 5(2): 196-201.
- Spradbery JP . 2002 . The screwworm fly problem : A background briefing. Proc. of screwworm fly emergency preparedness conference Canberra. 12-15 November 2001. Departement of Agriculture Fisheries and Forestry Australia. p 33.
- Sukarsih S, Partoutomo G, Weijffels, Willadsen P. 2000. Vaccination rials in sheep a g a i n t s *Chrysomya bezziana* larvae using the recombinant peritrophin antigens Cb 15, Cb 4 2 and C 48 . Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner 5(3): 192-196.
- Wardhana AH. 2006. *Chrysomya bezziana*, the case of miasis on animal and human, problem and control. Wartazoa 16:146-159.
- Wardhana AH, Muharsini S, Santosa S, Arambewela LSR, Kumarasinghe SPW. 2011. Pengobatan myiasis dengan sediaan krim minyak atsiri daun sirih hijau (*Piper betle* L) pada domba yang diinfeksi dengan larva *Chrysomya bezziana*. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor
- Wardhana AH. 2012. Geographical characteristic of *Chrysomya bezziana* based on external morphology study. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner 17(1): 36-48.
- Wardhana AH, Cecchi, Muharsini G, Cameron S, Cameron MM, Ready PD, Hall MJR. 2014. Environmental and phylogeographical determinants of the distribution of the Old World Screwworm Fly in Indonesia. Actatropica. Pii: S0001-706X(14)00198-3. doi:10.1016/j.actatropica. 2014.06.001.