

## **Aktivitas Larvasida Berbagai Pelarut pada Ekstrak Biji Kayu Besi Pantai (*Pongamia pinnata*) terhadap Mortalitas Larva *Aedes* spp.**

### ***Larvicidal Activity of Various Solvents of Pongamia pinnata Seed Extract on the Mortality of Aedes spp.***

Yuneu Yuliasih\*, Mutiara Widawati

Loka Litbang Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang (P2B2) Ciamis, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia

Jalan Raya Pangandaran Km.03 Ds. Babakan Kp. Kamurang, Pangandaran 53415, Jawa Barat

\*E\_mail: yuneu.y@gmail.com

*Received date: 14-12-2016, Revised date: 21-08-2017, Accepted date: 11-12-2017*

#### **ABSTRAK**

Upaya pengendalian Demam Berdarah Dengue (DBD) secara kimiawi dapat berbahaya bagi manusia dan lingkungannya, sehingga perlu insektisida hayati yang berasal dari tumbuhan seperti *Pongamia pinnata*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas larvasida berbagai ekstrak biji *P. pinnata* terhadap kematian larva *Aedes* spp. Jenis penelitian adalah eksperimen dengan *post test only with control group design*. Bahan yang digunakan yaitu ekstrak biji *P. pinnata* dengan pelarut air, metanol dan kloroform. Ekstrak biji *P. pinnata* diuji terhadap larva instar III *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dengan konsentrasi masing-masing kelompok 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm, kemudian diamati selama 24 jam. Masing-masing uji dilakukan dengan 3 kali pengulangan pada hari yang sama. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kematian larva hanya ditemukan pada ekstrak biji *P. pinnata* dengan pelarut metanol dan kloroform. Nilai  $LC_{50}$  ekstrak *P. pinnata* dengan pelarut metanol adalah 141,88 ppm terhadap *Ae. aegypti* dan 108,19 ppm terhadap *Ae. albopictus*. Sedangkan nilai  $LC_{50}$  ekstrak *P. pinnata* dengan pelarut kloroform adalah 346,06 ppm terhadap *Ae. aegypti* dan 222,29 ppm terhadap *Ae. albopictus*. Hasil tersebut membuktikan bahwa ekstrak biji *P. pinnata* dengan pelarut air tidak efektif sebagai larvasida, sedangkan ekstrak dengan pelarut metanol dan kloroform mempunyai potensi sebagai larvasida.

**Kata kunci:** *Pongamia pinnata*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, larvasida

#### **ABSTRACT**

*The use of chemical compound as a way to control DHF may cause harmful effect for humans and environment. It is necessary to develop biological insecticides derived from plants such as Pongamia pinnata. This study was designed to determine the larvicidal activity of P. pinnata seeds extract with various solvent on Aedes spp. This study was an experimental research with post test only control group design. Materials used in the research were P. pinnata seed extracts with water, methanol and chloroform solvents of concentration; 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm and 500 ppm. Larvicidal activity of P. pinnata seed extracts was tested against third instar larvae of Ae. aegypti and Ae. albopictus, 24 hours observation was carried out within each treatment. Every test was repeated for 3 times. The result showed that larvae mortality was found in the methanol extract with  $LC_{50}$  value of 141.88 ppm for Ae. aegypti and 108.19 for Ae. albopictus, and in the chloroform extract with  $LC_{50}$  value of 346.06 ppm for Ae. aegypti and 222.29 ppm for Ae. albopictus. The water extract of P. pinnata seed was not effective as a larvicidal, while methanol and chloroform of P. pinnata seed extracts act as potential natural insecticide.*

**Keywords:** *Pongamia pinnata*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, larvicidal

## PENDAHULUAN

Demam Dengue (DD) atau Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan penyakit menular yang masih merupakan masalah kesehatan dunia. Penularan dengue terjadi di 128 negara dan setidaknya 4 milyar orang beresiko terkena penyakit ini.<sup>1</sup> Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) menyatakan bahwa negara Indonesia sebagai negara dengan kasus DBD tertinggi di Asia Tenggara.<sup>2</sup> Penyakit ini ditularkan oleh *Aedes aegypti* sebagai vektor utama dan *Aedes albopictus* sebagai vektor potensial.<sup>3</sup>

Upaya pengendalian telah banyak dilakukan di berbagai wilayah dengan memutus kontak antara vektor dan manusia sehingga dapat menurunkan angka kesakitan. Pengendalian vektor yang paling efektif adalah dengan memutuskan siklus hidup di tempat-tempat perkembangan mereka. Larvasida merupakan salah satu teknik pengendalian yang dapat dilakukan untuk menghambat kepadatan populasi.<sup>4</sup>

Larvasida yang banyak digunakan untuk pengendalian vektor merupakan insektisida sintetik. Namun hal ini dapat merugikan kesehatan masyarakat, menyebabkan pencemaran lingkungan, mengganggu keseimbangan ekologi, bahkan dapat meningkatkan resistensi terhadap vektor.<sup>5</sup> Insektisida dari tanaman merupakan salah satu alternatif yang lebih selektif dan aman, mudah terurai di alam dan tidak berbahaya bagi organisme non target.<sup>6</sup>

Salah satu tanaman yang sangat potensial untuk dikembangkan sebagai insektisida adalah *Pongamia pinnata*. Tanaman ini banyak tumbuh di Indonesia terutama daerah dekat pantai.<sup>7</sup> Semua bagian tanaman mulai dari akar, kulit kayu, bunga, daun dan biji dapat digunakan sebagai obat herbal dan insektisida.<sup>8</sup> Salah satu bagian dari tumbuhan *P. pinnata* yaitu biji mengandung senyawa kimia golongan alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, steroid dan tannin.<sup>9</sup> Metabolit sekunder yang ada pada tumbuhan ini mempunyai potensi sebagai insektisida terutama terhadap nyamuk.<sup>10</sup> Penelitian

Suganthi *et al.* tahun 2015 menunjukkan bahwa ekstrak air dan metanol dari daun dan biji *P. pinnata* mempunyai potensi sebagai larvasida nyamuk *Culex quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *Anopheles stephensi*.<sup>11</sup> Ekstrak kulit kayu dan daun *P. pinnata* ternyata dapat mematikan 100% larva *Cx. quinquefasciatus* pada konsentrasi 25 ppm sampai 200 ppm.<sup>12</sup>

Aktivitas larvasida dari ekstrak tanaman terhadap nyamuk tergantung juga pada pelarut yang digunakan selama ekstraksi.<sup>13</sup> Adanya perbedaan polaritas pelarut yang akan melarutkan senyawa kimia pada tanaman dapat menghasilkan aktivitas larvasida yang berbeda.<sup>14</sup> Berdasarkan permasalahan tersebut, maka diperlukan penelitian tentang pengaruh pemberian berbagai ekstrak biji *P. pinnata* menggunakan pelarut air, metanol dan kloroform sebagai larvasida terhadap nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* di laboratorium. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas larvasida ekstrak biji *P. pinnata* dengan berbagai pelarut terhadap persentase kematian larva *Aedes* spp. Hasil dari penelitian diharapkan dapat menghasilkan insektisida hayati yang berpotensi sebagai bahan pengendalian vektor.

## METODE

Penelitian dilakukan di Loka Litbang P2B2 Ciamis, pembuatan ekstrak dilakukan di Balai Tanaman Obat dan Aromatik Bogor. Penelitian dilakukan selama bulan Juli tahun 2014. Penelitian ini berupa penelitian eksperimental.

Biji *P. pinnata* yang dikeringkan dikoleksi dari pantai Pangandaran Kabupaten Pangandaran Jawa Barat dan dihaluskan hingga sebanyak 1 kg. Selanjutnya dibuat ekstrak dengan cara maserasi yaitu direndam menggunakan pelarut air, metanol dan kloroform.<sup>15</sup> Ekstrak yang diperoleh diencerkan sesuai dengan 5 dosis yang akan diujikan. Serangga uji yang digunakan berupa larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* instar III yang diperoleh dari hasil kolonisasi insektarium Loka Litbang P2B2 Ciamis.

Uji larvasida menggunakan ekstrak biji

*P. pinnata* dengan pelarut air, metanol dan kloroform. Cara untuk menentukan konsentrasi yang sesuai, dilakukan uji pendahuluan terhadap larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dengan ekstrak biji *P. pinnata* dalam beberapa variasi konsentrasi. Setelah didapatkan kematian larva pada berbagai konsentrasi tersebut, dilanjutkan dengan memilih konsentrasi ekstrak biji *P. pinnata* yang dapat membunuh 10-90% larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Masing-masing pelarut terdiri dari 5 variasi konsentrasi ekstrak sebagai perlakuan yaitu 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm, 1 kontrol. Aquades digunakan untuk keseluruhan proses uji larva. Metode ini merupakan metode modifikasi dari metode pengujian larva WHO dimana jumlah pengulangan yang dilakukan diperkecil dikarenakan keterbatasan jumlah larva uji. Masing-masing perlakuan dan kontrol diulang 3 kali. Setiap perlakuan menggunakan dua puluh (20) ekor larva. Selama 24 jam larva uji ditaruh di tempat dengan suhu ruang dan tidak terkena paparan sinar matahari. Pengamatan dilakukan 24 jam dan dihitung larva yang mati.<sup>16</sup> Jika persentase kematian larva pada kontrol antara 5-20% maka dilakukan koreksi dengan menggunakan rumus Abbot sebagai berikut:<sup>17</sup>

$$M = ((T-C) / (100-C)) \times 100\%$$

M: Angka kematian setelah koreksi (%)

T: Angka kematian kelompok perlakuan (%)

C: Angka kematian kelompok kontrol (%)

Data pengamatan berupa persentase kematian larva dianalisis dengan *One way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui pasangan kelompok yang paling berbeda. Efektivitas dan nilai LC50 dilakukan analisis probit.<sup>18</sup>

## HASIL

Uji larvasida dengan berbagai perlakuan ekstrak pelarut biji *P. pinnata* terhadap larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* menunjukkan aktivitas yang berbeda-beda. Ekstrak biji *P.*

*pinnata* dengan pelarut air tidak mampu menyebabkan kematian larva sampai konsentrasi tertinggi. Ekstrak biji *P. pinnata* dengan pelarut metanol dan kloroform terhadap larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* menunjukkan kematian yang bervariasi. Rata-rata kematian meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi. Pada konsentrasi tertinggi (500 ppm) ekstrak dengan pelarut metanol, setelah 24 jam dapat mematikan larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* masing-masing sebesar 100% dan 96,73%, sedangkan ekstrak dengan pelarut kloroform mematikan larva tersebut sebesar 60,33% dan 78,34% (Tabel 1).

## PEMBAHASAN

Perbedaan aktivitas larvasida ini dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan. Pemilihan pelarut yang tepat sangat penting karena dapat berpengaruh terhadap kualitas hasil ekstraksi.<sup>13</sup> Ekstraksi tumbuhan akan berhasil sempurna tergantung pada polaritas pelarut yang digunakan. Senyawa polar akan larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa non polar akan larut dalam pelarut non polar.<sup>19</sup> Ekstraksi menggunakan pelarut yang berbeda akan menghasilkan jenis senyawa yang berbeda pula, sehingga pada akhirnya menyebabkan aktivitas larvasida yang berbeda.<sup>14</sup> Senyawa bioaktif yang terdapat dalam biji *P. pinnata* yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan terpenoid.<sup>9</sup> Semua senyawa bioaktif tersebut dapat larut sempurna dalam pelarut organik yaitu metanol dan kloroform, tetapi diantaranya ada yang tidak dapat larut dalam air yaitu alkaloid, tanin, steroid dan terpenoid.<sup>20</sup> Semakin sedikit kandungan senyawa bioaktif dalam ekstrak biji *P. pinnata* maka semakin berkurang aktivitas larvasida terhadap kedua spesies yang digunakan.

Senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak mempunyai peran besar dalam kematian larva nyamuk. Tanin bersifat racun pada serangga, senyawa ini akan mengikat protein pada kelenjar ludah dan menurunkan aktivitas enzim pencernaan, sehingga akan menurunkan laju pertumbuhan dan gangguan

nutrisi.<sup>21</sup> Hal ini menyebabkan larva mati dan sesuai yang dilaporkan oleh Chowdhury *et al.* pada tahun 2008 bahwa tanin dari ekstrak *Eclipta prostrate*, *Hemidesmus indices* dan *Gymnema sylvestre* menyebabkan kematian larva *C. quinquefasciatus*.<sup>22</sup> Saponin merupakan bahan mirip deterjen yang mempunyai kemampuan untuk merusak membran. Saponin akan mengganggu lapisan lipid dari epikutikula tetapi juga mengganggu lapisan protein endokutikula sehingga berakibat senyawa toksik dapat masuk dengan mudah ke dalam tubuh larva.<sup>23</sup> Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa saponin pada ekstrak batang *Sapindus mukorossi*, ekstrak buah *Cestrum nocturnum* dan ekstrak daun *Cestrum diurnum* dengan konsentrasi 60 ppm menunjukkan kematian 100% larva *Ae. aegypti*.<sup>24</sup> Steroid akan berpengaruh pada penebalan dinding sel kitin pada tubuh larva, sehingga larva menjadi tidak normal.

Sesuai dengan hasil penelitian Jawale<sup>24</sup> tahun 2010 yang mengevaluasi aktivitas larvasida pada ekstrak metanol daun *Cestrum nocturnum* yang mengandung steroid ternyata dapat mematikan 100% larva *Ae. aegypti* pada konsentrasi 100 ppm. Alkaloid bersifat sebagai *antifeedant* yang dapat mencegah larva untuk makan. Alkaloid akan mempengaruhi protein kinase yang terlibat dalam transduksi sinyal dan proses perkembangan sel juga jaringan.<sup>26</sup> Penelitian Liu *et al.* tahun 2012 menunjukkan bahwa alkaloid yang terdapat dalam ekstrak buah *Evodia rutaecarpa* efektif sebagai larvasida terhadap *Ae. albopictus*.<sup>27</sup>

Flavonoid yang terkandung dalam biji *P. pinnata* yang paling utama adalah karanjin dan pongamol.<sup>9</sup> Senyawa ini memiliki sifat sebagai *antifeedant*, sehingga proses makan larva akan terganggu. Flavonoid dapat menghambat reseptor pada daerah mulut yang mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa, sehingga larva tidak mampu mengenali makanan yang ada di sekitarnya, akibatnya larva tidak dapat mencapai berat

maksimal untuk dapat berubah ke tahap selanjutnya.<sup>28</sup> Terpenoid mempunyai sifat *antifeedant*, sehingga menyebabkan larva mati. Senyawa terpenoid yang mempunyai aktivitas larvasida diantaranya monoterpen yang diisolasi dari tanaman *Magnolia salicifolia*, sesquiterpen pada biji *Apium graveolens*, diterpen pada *Pterodon polygalaeflorus*.<sup>10</sup>

Spesies nyamuk yang berbeda mempunyai sensitivitas yang berbeda pula terhadap paparan insektisida.<sup>29</sup> Larva *Ae. albopictus* lebih rentan daripada *Ae. aegypti* baik terhadap paparan ekstrak biji *P. pinnata* dengan pelarut metanol maupun pelarut kloroform, dengan konsentrasi ekstrak yang lebih kecil sudah mampu mematikan lebih banyak larva. Sesuai dengan hasil penelitian Cheng *et al.* tahun 2009 bahwa larva *Ae. albopictus* lebih rentan daripada *Ae. aegypti* terhadap paparan minyak atsiri dari daun *Eucalyptus camaldulensis* dengan LC<sub>50</sub> masing-masing 95,5 ppm, 285,8 ppm dan *Eucalyptus urophylla* dengan 31,0 ppm, 55,3 ppm.<sup>30</sup>

Ekstrak biji *P. pinnata* dengan pelarut metanol dan kloroform mempunyai potensi sebagai larvasida. Kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam biji *P. pinnata* ternyata dapat mematikan larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Secara umum senyawa bioaktif yang terdapat dalam ekstrak mengandung racun perut, sehingga merusak sistem pencernaan dan menyebabkan larva mati. Pengendalian vektor pada tempat perkembangbiakan nyamuk sangat efektif untuk dilakukan sehingga dapat mengurangi atau bahkan menghilangkan populasi nyamuk.

Keterbatasan penelitian ini terdapat pada kontrol dimana yang digunakan yaitu air dikarenakan jika digunakan metanol dan kloroform diperkirakan akan ada bias terhadap kematian larva.<sup>31</sup>

Tabel 1. Aktivitas Larvasida Ekstrak Biji *P.pinnata* dengan Berbagai Pelarut Terhadap *Ae.aegypti* dan *Ae. albopictus*

Spesies nyamuk	Jenis Pelarut	Konsentrasi (ppm)	Kematian±SD (%)	LC50 (ppm) (LL-UL)	LC90 (ppm) (LL-UL)	p*	
<i>Ae. aegypti</i>	Air	Kontrol	0.00±0	-	-		
		100	0.00±0				
		200	0.00±0				
		300	0.00±0				
		400	0.00±0				
		500	0.00±0				
	Metanol	Kontrol	0.00±0		141,88	248,83	0,000
		100	33.34±2,89		(100,20-180,091)	(188,95-297,10)	
		200	85.00±5,00				
		300	95.00±5,00				
		400	98.30±2,89				
		500	100.00±0				
	Kloroform	Kontrol	0.00±0		346,06	649,27	0,000
		100	16.72±2,89		(311,49-386,61)	(576,79-758,99)	
		200	30.00±5,00				
		300	55.00±5,00				
		400	61.67±2,89				
		500	63,33±2,89				
<i>Ae. albopictus</i>	Air	Kontrol	0.00±0	-	-		
		100	0.00±0				
		200	0.00±0				
		300	0.00±0				
		400	0.00±0				
		500	0.00±0				
	Metanol	Kontrol	0.00±0		108,19	271,91	0,000
		100	63.33±7,64		(-7,92-179,71)	(197,647-459,35)	
		200	91.72±2,89				
		300	93.34±2,89				
		400	96.73±2,89				
		500	96.73±2,89				
	Kloroform	Kontrol	0.00±0		222,29	561,82	0,000
		100	48.33±2,89		(156,39-280,34)	(465,80-749,02)	
		200	58.34±2,89				
		300	68.35±2,89				
		400	70.00±5,00				
		500	78.34±7,63				

p\* uji signifikan pada taraf 5% ( $P < 0,05$ )

LCL - Lower confidence limits ; UCL - Upper confidence limits

## KESIMPULAN

Aktivitas larvasida hanya ditemukan pada ekstrak biji *P. pinnata* dengan pelarut metanol dan kloroform, sedangkan pada ekstrak dengan pelarut air tidak ditemukan kematian larva baik *Ae. aegypti* maupun *Ae. albopictus*. Ekstrak biji *P. pinnata* dengan pelarut air tidak mempunyai potensi sebagai larvasida. Ekstrak biji *P. pinnata* dengan pelarut metanol menunjukkan aktivitas larvasida yang lebih tinggi daripada ekstrak dengan pelarut kloroform terhadap *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*.

## SARAN

Perlu penelitian lebih lanjut uji aktivitas larvasida dan ovisida biji *P. pinnata* terhadap nyamuk spesies lain dan penelitian lebih lanjut untuk uji aktivitas *P. pinnata* dari bagian tumbuhan lain, misalnya akar, daun dan batang, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai insektisida hayati.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Loka Litbang P2B2 Ciamis yang telah memberikan dana riset dan memfasilitasi penelitian ini. Penulis juga berterimakasih kepada teknisi laboratorium Loka Litbang P2B2 Ciamis yang telah membantu selama proses penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(8). doi:10.1371/journal.pntd.0001760.
- EGC. Pencegahan; Pengendalian dengue; demam berdarah dengue: Panduan Lengkap (WHO). Jakarta: EGC; 2005.
- Vijaya KS, Panagal M, Bastin J, Gosh R. Mosquito larvicidal, oviposition deterrent and repellent properties of *Acalypha indica* L extracts against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus*. Int J Med Biosci. 2012;1(3):33-41.
- Balaji P, Sakthivadivel M, Bharath P, Hariharan G. Larvicidal activity of various solvent extracts of *Lichen roccella montagnei* against filarial vector *Culex quinquefasciatus*. Drug Discovery. 2012;2(6):36-9.
- Tennyson S, Ravindran KJ, Arivoli S. Screening of twenty five plant extracts for larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). Asian Pac J Trop Biomed. 2012;2(2 SUPPL.):1130-4. doi:10.1016/S2221-1691(12)60372-4.
- Mullai K, Jebanesan A. Larvicidal, ovicidal and repellent activities of the leaf extract of two cucurbitaceous plants against filarial vector *Culex quinquefasciatus* (say) (Diptera : Culicidae). Trop Biomed. 2007;24(1):1-6.
- Alimah D. Budidaya potensi malapari (*Pongamia pinnata* L.) sebagai tanaman penghasil bahan bakar nabati. Galam. 2010;IV(2):147-59.
- Arote SR, Yeole PG. *Pongamia pinnata* L: a comprehensive review. Int J PharmTech Res. 2010;2(4):2283-90.
- Dubey S, Sharma PK, Rajput J, Tomar R, Baghel A. Phytochemical analysis of seeds of certain medicinal plants. Int Res J Pharm. 2014;5(2):102-5. doi:10.7897/2230-8407.050221.
- Kishore N, Mishra BB, Tiwari VK, Tripathi V, Lall N. Natural products as leads to potential mosquitocides. Phytochem Rev. 2014;13(3):587-627. doi:10.1007/s11101-013-9316-2.
- Suganthi A, Vasudevan K, Thiraviaraj S. Larval and ovicidal effects of *Pongamia pinnata* (Linn) pierre (*Papilionaceae*) leaf and seed extracts against *Culex quinquefasciatus* say, *Aedes aegypti* (Linn) and *Anopheles stephensi* Liston. Int J Curr Res Dev. 2015;3(2):102-10.
- Nayak JB. Efficacy of crude extracts of *Annona reticulata* and *Pongamia pinnata* as Larvicidal for the management of filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say Diptera : Culicidae. Universal Research Publication 2014;4(1):1-5.
- Ghosh A, Chowdhury N, Chandra G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. Indian J Med Res. 2012;135(5):581-98.

14. Nour A, Sandanasamy J, Nour A. Larvicidal activity of extracts from different parts of neem (*Azadirachta indica*) against *Aedes Aegypti* mosquitoes larvae. *Sci Res Essays*. 2012;7(31):2810-15. doi:10.5897/SRE12.133.
15. Raaman N. *Phytochemical Technique*. New Delhi; 2006.
16. WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization. 2005:1-41. doi:Ref: WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11.
17. World Health Organization. Manual on practical entomology in malaria. part II. methods and techniques. *Man Pract Entomol malaria Part II Methods Tech*. 1975:6+191 pp. doi:10.1038/148423c0.
18. Suirta IW, Puspawati NM, Gumiaty NK. Isolasi dan identifikasi senyawa aktif larvasida dari biji nimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap larva nyamuk demam berdarah (*Aedes aegypti*). *J Kim*. 2007;1(2):47-54.
19. Gupta V, Naraniwal M, Kothari V. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *Int J Appl Nat Sci*. 2012;1(1):8-26.
20. Sembiring HB, Barus T, Marpaung L, Simanjuntak P. Antioxidant and antibacterial activity of some leaves extracts (methanol, ethyl acetate and n-hexane) of *Scurrula fusca* G.Don. *Int J PharmTech Res*. 2015;8(9):24-30.
21. Adeyemi MMH. The potential of secondary metabolites in plant material as deterrents against insect pests : A Review. *African J Pure Appl Chem*. 2010;4(11):243-46.
22. Chowdhury N, Ghosh A, Chandra G. Mosquito larvicidal activities of *Solanum villosum* berry extract against the dengue vector *Stegomyia aegypti*. *BMC Complement Altern Med*. 2008;8(1):10. doi:10.1186/1472-6882-8-10.
23. Hopkins H, Huner N. Introduction to Plant Physiology. *Agronomy Journal* Vol 43.; 2009. doi:10.2134/agronj1951.00021962004300010013x.
24. Jawale CS. Larvicidal activity of some saponin containing plants against the dengue vector *Aedes aegypti*. *Trends Biotechnol Res*. 2014;3(1):1-11.
25. Jawale C, Kirdak R, Dama L. Larvicidal activity of *Cestrum nocturnum* on *Aedes aegypti*. *Bangladesh J Pharmacol*. 2010;5(1):39-40.
26. Arnason JT, Sims SR, Sims IM. Natural products from plants as insecticides. *Encycl Life Support Syst*. 2010:18.
27. Liu ZL, Liu QZ, Du SS, Deng ZW. Mosquito larvicidal activity of alkaloids and limonoids derived from *Evodia rutaecarpa* unripe fruits against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*. 2012;111(3):991-6. doi:10.1007/s00436-012-2923-9.
28. Tjokropranoto R, Evacuasiyany E, Nugroho AS. The effectivity of beluntas herb infusion (*Pluchea indica* L.) as a larvicide against *Aedes sp*. *J Med Planta*. 2010;1(2):76-80.
29. Cheah S-X, Tay J-W, Chan L-K, Jaal Z. Larvicidal, oviposition, and ovicidal effects of *Artemisia annua* (asterales: Asteraceae) against *Aedes aegypti*, *Anopheles sinensis*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*. 2013;112(9):3275-82. doi:10.1007/s00436-013-3506-0.
30. Cheng S-S, Huang C-G, Chen Y-J, Yu J-J, Chen W-J, Chang S-T. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. *Bioresour Technol*. 2009;100(1):452-56. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.038.
31. Thorpe WH. The biology of the petroleum fly (*Psilopa petrolii*, Coq.). *Ecol Entomol*. 1930;78(2):331-344.

