

PENELITIAN | RESEARCH

## Evaluasi Toksisitas Ekstrak Metanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap Kematian Larva Nyamuk *Aedes aegypti*

*Toxicity Evaluation of Key Lime (Citrus aurantifolia) Leaves Methanol Extract against Aedes aegypti Larvae Mortality*

Hebert Adrianto<sup>1</sup>, Hamidah<sup>2</sup>

Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Ciputra, Surabaya

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya

**Abstract.** *The vector-borne diseases transmitted by the mosquito of Aedes aegypti are considered causes of serious health problems. Moreover, the use of chemical insecticides for Ae. aegypti control has resulted in resistance in mosquito populations and environmental problem. The aims of this study are to evaluate the toxicity of methanol extract (CH<sub>3</sub>OH) from key lime leaves against Ae. aegypti larvae after 24 hours exposure. This was experimental laboratory study, with six treatments and five replicates. Larvae mortality was observed after 24 hours exposure. Then, data were analyzed by descriptive analyze and probit. Visualization of the damage that occurs in the body was observed through microscope. The result showed that mortality of larvae increased with an increase of the concentration of extract. LC<sub>50</sub> and LC<sub>99</sub> of the extract are 2,197 ppm and 4,266 ppm. The extract can cause morphological damages of larvae, such as head lost, neck elongation, exo-skeleton lost, abdomen transparent, digestive tract full of extract, and loss of setae on the side of the body. In conclusion, Citrus aurantifolia leaves methanol extract cause mortality and morphological damages of larvae.*

**Keyword:** *methanol extract, key lime, Aedes aegypti, morphological damages*

**Abstrak.** Penyakit tular vektor yang disebarkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* merupakan masalah kesehatan yang serius. Penggunaan insektisida kimia untuk mengontrol nyamuk *Ae. aegypti* dapat menyebabkan resistensi pada populasi nyamuk, masalah kesehatan, dan masalah lingkungan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi toksisitas ekstrak metanol (CH<sub>3</sub>OH) daun jeruk nipis (*C. aurantifolia*) terhadap larva *Ae. aegypti* setelah paparan ekstrak 24 jam. Penelitian ini merupakan eksperimen laboratorium dengan enam konsentrasi dan lima kali ulangan. Kematian larva diobservasi setelah 24 jam perlakuan. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisa dengan analisis deskriptif dan probit. Visualisasi kerusakan tubuh larva dilihat melalui mikroskop. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kematian larva meningkat dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Nilai LC<sub>50</sub> dan LC<sub>99</sub> ekstrak adalah 2.197 ppm dan 4.266 ppm. Ekstrak dapat menyebabkan kerusakan morfologi tubuh larva *Ae. aegypti* seperti kepala lepas, leher panjang, kulit ekso-skeleton lepas, abdomen transparan, saluran pencernaan penuh dengan ekstrak, dan bulu lateral abdomen lepas. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak metanol daun *C. aurantifolia* menyebabkan mortalitas dan kerusakan tubuh larva.

**Kata kunci:** ekstrak metanol, jeruk nipis, *Aedes aegypti*, kerusakan morfologi

Naskah masuk: 18 Oktober 2017 | Revisi: 20 Februari 2018 | Layak terbit: 10 April 2018

<sup>1</sup>Korespondensi: hebert.rubay@ciputra.ac.id | Telp: +62 812-3524-5620

## PENDAHULUAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) adalah penyakit tular vektor yang ditularkan oleh serangga nyamuk *Aedes aegypti*.<sup>1,2</sup> Penyakit DBD selalu muncul di Indonesia setiap tahun dan sering menjadi wabah atau kejadian luar biasa (KLB)<sup>2</sup>, hal ini dikarenakan nyamuk tinggal dekat dengan manusia dan habitat perkembangbiakannya banyak di dalam rumah. Diperkuat dengan hasil penelitian dari Prasetyowati dan Ginanjar<sup>3</sup> bahwa bak mandi rumah dan ember adalah habitat yang banyak ditemukan larva nyamuk *Ae. aegypti*. *World Health Organization* (WHO) mencatat bahwa Indonesia adalah negara dengan jumlah kasus DBD tertinggi di Asia Tenggara.<sup>4</sup> Profil Kesehatan Indonesia tahun 2017 melaporkan di tahun 2016 terdapat 204.171 kasus dengan jumlah kematian sebanyak 1.598 orang. Angka ini meningkat dari tahun 2015 sebelumnya.<sup>5</sup>

Penanggulangan dan pencegahan oleh Kementerian Kesehatan Republik Indonesia lebih banyak difokuskan pada pemutusan rantai penularan melalui pengendalian vektor nyamuk.<sup>6,7</sup> Upaya pengendalian nyamuk yang terpopuler di Indonesia adalah pengasapan (*fogging* dan obat nyamuk bakar), 3 M (menutup, menguras, dan menimbun), pemberian temephos di kontainer seperti bak mandi, dan mengoles badan dengan *repellent*.<sup>7</sup>

Akhir-akhir ini di beberapa negara mendapat permasalahan baru yaitu nyamuk yang resisten terhadap berbagai jenis insektisida. Di Indonesia juga dilaporkan adanya resistensi nyamuk *Ae. aegypti* terhadap *malathion*, *permethrin*, dan *temephos* seperti di Tasikmalaya, Banjarmasin, Semarang, dan Ambon.<sup>8,9,10,11</sup> Permasalahan yang lain repelen nyamuk umumnya mengandung DEET, *dimetil fatat*, dan *iridin* yang dapat membahayakan manusia, bersifat teratogenik, dan terabsorpsi masuk ke dalam kulit.<sup>7,12</sup>

Dengan adanya resistensi, pencemaran lingkungan, dan bahaya bagi kesehatan, maka diperlukan metode alternatif pengendalian nyamuk *Ae. aegypti*. Metode pengendalian vektor yang paling efektif adalah dengan membunuh larva nyamuk sehingga larvasida dipilih sebagai pengendalian alternatif dalam penelitian ini.<sup>2</sup> Larvasida alternatif yang berpotensi untuk dikembangkan adalah larvasida herbal dari tanaman. Penggunaan larvasida herbal memberikan banyak keuntungan yaitu ramah lingkungan, mudah terurai di alam, tidak memberikan dampak buruk pada kesehatan dan bahan bakunya mudah diperoleh di masyarakat.

Indonesia adalah negara tropis yang memiliki flora yang beranekaragam. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai larvasida herbal adalah

jeruk (*Citrus* spp.). Keanekaragaman spesies jeruk sangat tinggi. Beberapa *Citrus* yang telah diteliti dan bersifat toksik terhadap nyamuk adalah *Citrus hystrix*, *C. maxima*, *C. amblycarpa*, *C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. grandis*, *C. microcarpa*, *C. medica*, *C. aurantium*, dan *C. aurantifolia*.<sup>13,14,15,16,17</sup> Ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dari Yogyakarta dilaporkan bersifat toksik terhadap larva *Ae. aegypti*.<sup>16</sup> Ekstrak etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) 70% kulit buah jeruk nipis dapat menyebabkan mortalitas pada larva *Ae. aegypti*.<sup>17</sup>

Penelitian ini menggunakan daun jeruk nipis yang dimaserasi dengan pelarut metanol (CH<sub>3</sub>OH). Pemilihan daun jeruk nipis dalam penelitian ini karena mudah diperoleh dalam jumlah banyak dan jeruk nipis populer dimanfaatkan sebagai bahan masakan atau minuman. Ekstrak metanol daun jeruk nipis (*C. aurantifolia*) dari Sudan dilaporkan mengandung senyawa kimia saponin, fenolik, dan antrakuinon.<sup>18</sup> Ekstrak metanol daun jeruk nipis dari Nigeria mengandung banyak senyawa metabolit sekunder, yaitu flavonoid, steroid, alkaloid, tannin, dan cardiac glikosida.<sup>19</sup> Minyak atsiri daun jeruk nipis memiliki 81 jenis komponen yang lebih banyak dibandingkan daun jeruk siam (*C. nobilis*).<sup>20</sup> Senyawa-senyawa ini bekerja sebagai racun serangga. Pemilihan metanol dalam penelitian ini berfungsi sebagai pelarut universal yang dapat melarutkan senyawa kimia polar, semi polar, dan non polar yang lebih banyak dibandingkan etanol.<sup>21,22</sup>

Penelitian Saranya *et. al.*<sup>23</sup> dan Procopio *et. al.*<sup>24</sup> menunjukkan kerusakan morfologi tubuh larva *Ae. aegypti* setelah paparan ekstrak herbal terutama pada saluran pencernaan larva. Belum banyak laporan penelitian larvasida dari Indonesia yang mengungkapkan kerusakan morfologi tubuh larva. Penelitian dasar mengenai kerusakan tubuh larva penting dilakukan agar dapat mengetahui sasaran organ dari kerja larvasida.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi toksisitas ekstrak metanol (CH<sub>3</sub>OH) daun jeruk nipis terhadap larva *Ae. aegypti* melalui angka mortalitas, analisis probit, dan kerusakan yang terjadi pada tubuh larva *Ae. aegypti* setelah paparan ekstrak 24 jam.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, dilakukan di laboratorium *Basic Science*, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga Surabaya. Bahan yang diuji dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dan nyamuk *Ae. aegypti* stadium

larva instar III dari Laboratorium Entomologi, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga Surabaya. Alat dan bahan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain nampan, blender, toples kaca kedap udara ukuran besar 8 L, corong kaca, kertas saring kasar, sendok sayur, erlenmeyer, rotary evaporator, neraca analitik, gelas plastik, akuades, tween 20, dan spatula stainless steel.

Tahapan kerja adalah mengumpulkan 800 gram daun jeruk nipis dari kota Taman-Sidoarjo yang berkualitas baik (warna dark green dan permukaan daun tidak rusak). Daun jeruk nipis dicuci bersih dengan air kemudian dikering-anginkan di nampan. Setelah satu bulan, daun diblender untuk dibuat serbuk. Serbuk dimasukkan ke toples kaca dan dimaserasi dengan pelarut metanol selama seminggu. Setelah satu minggu, menyiapkan erlenmeyer dan di atas mulut erlenmeyer diberi corong kaca beralas kertas saring. Maserat diambil dan disaring. Hasil saringan dipekatkan menjadi ekstrak kental dengan alat rotary evaporator.<sup>13,23</sup> Hasil rendemen ekstrak adalah 1,019 gram dari 20 gram massa daun (5,095%) dan warna ekstrak adalah hitam.

Pengujian dilakukan dengan menggunakan kontrol (akuades) dan lima konsentrasi (500 ppm, 1.375 ppm, 2.250 ppm, 3.125 ppm, dan 4.000 ppm) yang sebelumnya telah ditentukan berdasarkan hasil uji pendahuluan. Setiap konsentrasi dilakukan replikasi sebanyak lima kali. Larutan ekstrak dibuat dengan melarutkan ekstrak (mg) sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan dalam tween 20 dan akuades sampai volume 100 ml. Lalu dituangkan ke gelas plastik. Masing-masing konsentrasi larutan diisi 20 ekor larva nyamuk *Ae. aegypti*. Kelompok kontrol menggunakan air akuades ditambah tween 20. Kemudian dibiarkan selama 24 jam.

Setelah 24 jam berakhir, larva nyamuk yang mati dihitung dan dicatat untuk dibuat analisis deskriptif. Lima larva yang mati setiap konsentrasi diambil dan diamati di bawah mikroskop foto maupun cahaya untuk dilihat ada tidaknya kerusakan pada tubuhnya. Untuk menentukan konsentrasi letal (*Lethal Concentration/LC*) dari ekstrak metanol daun jeruk nipis (*C. aurantifolia*) dilakukan dengan analisis statistik probit.<sup>13,23</sup>

## HASIL

### Angka Mortalitas Larva Nyamuk

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa masing-masing konsentrasi dari ekstrak metanol daun jeruk nipis memiliki daya bunuh larva nyamuk (toksisitas) yang berbeda-beda. Semakin

tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin tinggi pula angka mortalitas larva nyamuk (Tabel 1). Konsentrasi terendah ekstrak metanol jeruk nipis dalam penelitian ini, yaitu 500 ppm, menyebabkan mortalitas larva *Ae. aegypti* sebesar 3% sedangkan konsentrasi tertinggi, 4.000 ppm, menyebabkan mortalitas 95% larva *Ae. aegypti* instar III (Tabel 1)

**Tabel 1.** Mortalitas Larva *Ae. aegypti* Instar III Setelah 24 Jam Paparan Ekstrak Metanol Daun Jeruk Nipis (*C. aurantifolia*)

Konsentrasi (ppm)	Mean Mortalitas Larva <i>Ae. aegypti</i> Instar III	
	Ekor	Persentase (%)
0	0	0
500	0,6 ± 0,89	3
1.375	2,6 ± 0,54	13
2.250	12,4 ± 1,51	62
3.125	17,2 ± 1,30	86
4.000	19 ± 1,00	95

### Analisis Probit

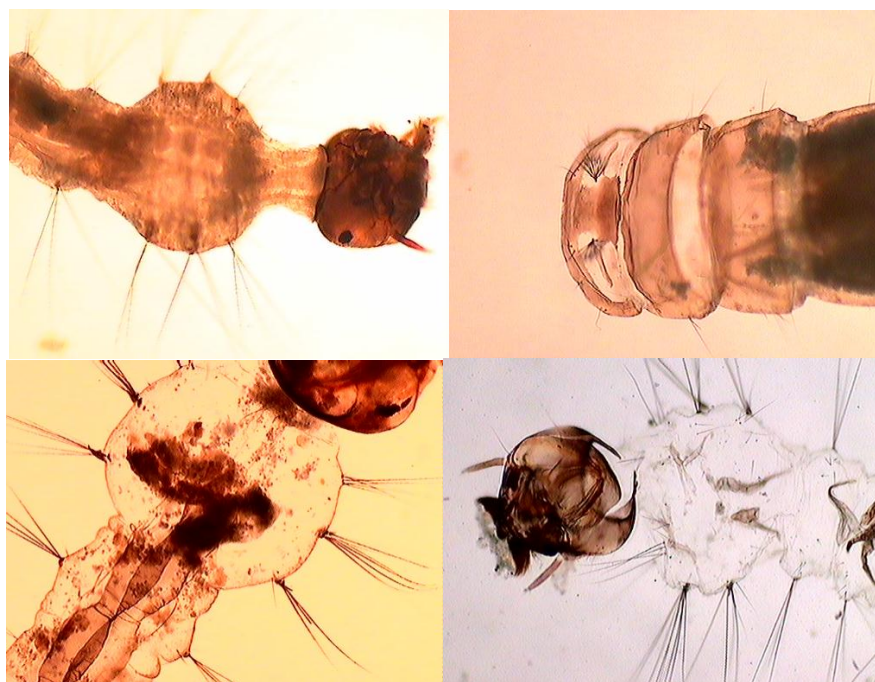
Hasil analisis probit ditunjukkan pada Tabel 2. Nilai LC<sub>50</sub> dari ekstrak metanol daun jeruk nipis (*C. aurantifolia*) adalah 2.197 ppm dan nilai LC<sub>99</sub> adalah 4.226 ppm. Hasil analisis probit ini menjelaskan bahwa konsentrasi ekstrak metanol daun *C. aurantifolia* untuk membunuh 50% larva nyamuk *Ae. aegypti* adalah 2.197 ppm dan untuk membunuh 99% larva nyamuk *Ae. aegypti* diperlukan konsentrasi ekstrak sebesar 4.226 ppm

**Tabel 2.** Analisis Probit Ekstrak Metanol Daun *C. aurantifolia*

Ekstrak	LC <sub>50</sub> (ppm) dan Interval	LC <sub>99</sub> (ppm) dan Interval
Jeruk nipis ( <i>C. aurantifolia</i> )	2.197 (2.068-2.327)	4.266 (3.997-4.606)

### Kerusakan Tubuh Larva

Hasil pemeriksaan makroskopik didapatkan larva nyamuk *Ae. aegypti* instar III yang mati tampak berwarna putih atau kuning. Pada larva *Ae. aegypti* yang diberi perlakuan ekstrak metanol *C. aurantifolia* dengan konsentrasi 500-1.375 ppm, tubuh larva *Ae. aegypti* membengkok, kepala lepas, dan memiliki bentuk leher yang cukup panjang. Pada konsentrasi ekstrak sebesar 2.250-4.000 ppm ditemukan kepala lepas, kulit eksoskeleton lepas sehingga tubuh (abdomen) dan isi tubuh terlihat transparan serta saluran pencernaan penuh dengan ekstrak dan bulu lateral abdomen lepas. Secara visual disajikan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Visualisasi kerusakan tubuh larva *Ae. aegypti* instar III (perbesaran 40x)

Keterangan. kiri atas = leher larva panjang; kanan atas = kepala larva dan bulu lateral (*lateral hair*) lepas dari tubuh; kiri bawah = saluran pencernaan penuh dengan gumpalan ekstrak; kanan bawah = dinding tubuh lepas.

## PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, ekstrak metanol daun jeruk nipis (*C. aurantifolia*) bersifat toksik dan dapat menyebabkan mortalitas pada larva nyamuk *Ae. aegypti* instar III. Pemberian ekstrak dengan konsentrasi yang semakin tinggi maka semakin tinggi pula kematian larva (Tabel 1). Konsentrasi 2.197 ppm dari analisis probit dapat menyebabkan mortalitas 50% larva uji. Kemampuan membunuh larva nyamuk *Ae. aegypti* dari ekstrak metanol jeruk nipis dalam penelitian ini mirip dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa ekstrak metanol daun jeruk purut, jeruk limau, dan jeruk bali dari Sidoarjo bersifat toksik dan dapat menyebabkan mortalitas pada larva nyamuk *Ae. aegypti*.<sup>13</sup> Penelitian terdahulu juga menemukan hasil yang sama yaitu bahwa ekstrak metanol batang dan daun *C. grandis* juga memiliki daya bunuh terhadap larva nyamuk.<sup>25</sup> Kesamaan penelitian ini membuktikan bahwa daun dari berbagai spesies jeruk (*Citrus* spp.) memiliki potensi sebagai biolarvasida nyamuk *Ae. aegypti*.

Ekstrak etanol ( $C_2H_5OH$ ) daging buah jeruk nipis memiliki toksisitas terhadap larva *Ae. albopictus* dengan  $LC_{50}$  sebesar 2.95 mg/ml (setara 2.950 ppm).<sup>26</sup> Jika dibandingkan dengan analisis probit penelitian ini maka  $LC_{50}$  ekstrak metanol daun jeruk nipis lebih rendah. Ekstrak metanol daun jeruk nipis memiliki  $LC_{50}$  sebesar 2.197 ppm dengan interval 2.068-2.327 ppm. Angka ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol

daun jeruk nipis membutuhkan jumlah ekstrak (gram) sedikit dibandingkan ekstrak etanol daging buah jeruk nipis untuk dapat membunuh 50% larva nyamuk. Selain itu dari sisi pengembangan produk larvasida, daun lebih mudah diperoleh dalam jumlah yang sangat besar dibandingkan daging buah.

Sampel daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang diperoleh dari Yogyakarta bersifat toksik terhadap larva *Ae. aegypti* dan memiliki  $LC_{50}$  sebesar 1.212,914 ppm.<sup>16</sup> Ini berarti  $LC_{50}$  ekstrak etanol daun jeruk nipis yang diperoleh dari Yogyakarta lebih rendah dibandingkan hasil penelitian ini (2.197 ppm). Hal ini menunjukkan bahwa dalam hal jumlah ekstrak yang diperlukan untuk membunuh larva nyamuk, ekstrak etanol daun jeruk nipis lebih sedikit (1.212 mg ekstrak per 1000 ml akuades) dibandingkan ekstrak metanol daun jeruk nipis (2.197 mg ekstrak per 1000 ml akuades). Hasil ini berbeda dengan penelitian terdahulu menemukan bahwa toksisitas ekstrak pelarut metanol daun *Paederia foetida* ( $LC_{90} = 52,12 \mu\text{g/mL}$ ) lebih tinggi dibandingkan pelarut lain, seperti etanol ( $LC_{90} = 98,87 \mu\text{g/mL}$ ) dan n-heksana ( $LC_{90} = 114,11 \mu\text{g/mL}$ ).<sup>27</sup> Ekstrak metanol *Leucas aspera* juga dilaporkan memiliki  $LC_{50}$  dan  $LC_{90}$  yang lebih kecil dibandingkan ekstrak etanol dalam menyebabkan mortalitas pada larva *Ae. aegypti* instar 4.<sup>28</sup> Perbedaan ini dimungkinkan karena perbedaan tanah dan geografis sehingga menyebabkan perbedaan metabolit sekunder.

Ekstrak metanol daun jeruk nipis (*C. aurantifolia*) dari Sudan dilaporkan memiliki senyawa metabolit sekunder saponin, fenolik, dan antrakuinon.<sup>18</sup> Daun jeruk nipis dari Nigeria mengandung lebih banyak senyawa metabolit sekunder, yaitu flavonoid, steroid, alkaloid, tannin, dan cardiac glikosida.<sup>19</sup> Informasi kandungan metabolit sekunder dari tempat berbeda dapat menjadi masukan penelitian di masa mendatang.

Ekstrak metanol daun jeruk nipis tidak hanya menyebabkan kematian pada larva tetapi dapat menyebabkan kerusakan tubuh larva. Kerusakan pada tubuh larva *Ae. aegypti* dapat ditemukan dari kepala hingga abdomen. Dalam penelitian ini ditemukan kepala (*cephal*) larva yang lepas dari tubuhnya (Gambar 1). Kerusakan morfologi ini mirip dengan penelitian terdahulu yang melaporkan bahwa konsentrasi 0,1% ekstrak biji bengkuang dapat menyebabkan thorax larva *Ae. aegypti* transparan dan 0,2-0,4% dapat menyebabkan kepala rusak dan hancur.<sup>29</sup> Hasil ini tidak ditemukan pada penelitian Saranya *et. al.*<sup>23</sup> dan Procopio *et. al.*<sup>24</sup>.

Bentukan leher panjang pada larva dalam penelitian ini (Gambar 1) juga ditemukan pada penelitian terdahulu yang menggunakan ekstrak etanol 70% teripang laut *H. atra*.<sup>30</sup> Pemanjangan leher ini diduga disebabkan oleh saponin dan terpen.<sup>30</sup> Senyawa saponin ada di dalam daun jeruk nipis.<sup>18</sup>

Pada konsentrasi ekstrak 2.250-4.000 ppm ditemukan isi tubuh larva terlihat transparan, kulit eksoskeleton dan bulu lateral abdomen lepas. Hal ini mengindikasikan bahwa organ dalam seperti saluran pencernaan telah rusak.<sup>23</sup> Senyawa saponin dalam ekstrak yang terminum oleh larva *Ae. aegypti* dapat mengiritasi membran kutikula dan mukosa traktus digestivus larva *Ae. aegypti*.<sup>13,25</sup> Senyawa *limonoid* dari jeruk juga dapat bekerja sebagai *anti feedant* dan racun perut.<sup>31</sup> Hasil penelitian terdahulu juga menunjukkan hilangnya bulu lateral dari tubuh larva nyamuk setelah paparan konsentrasi 0,3%. Kerusakan tubuh ini terjadi karena dinding tubuh nyamuk yang dapat menyerap zat toksik dalam jumlah besar. Dengan ukuran tubuh serangga yang berukuran kecil maka luas permukaan tubuh yang terpapar relatif lebih besar.<sup>29</sup>

Saluran pencernaan larva yang penuh dengan gumpalan larutan ekstrak juga ditemukan pada penelitian ini (Gambar 1). Ekstrak daun *Schinus terebinthifolius* konsentrasi 1% dilaporkan juga dapat menyebabkan gumpalan pada daerah thorax dan sepanjang abdomen larva *Ae. aegypti* yang sama dengan penelitian ini. Saluran pencernaan pada larva kelompok perlakuan dijumpai bentukan inti (nukleus) dan anak inti

sel memanjang, susunan sel tidak terorganisir, dan beberapa sel mengalami hipertrofi.<sup>24</sup> Parameter ini menjadi masukan penelitian mendatang untuk mendalami model kerusakan pada tubuh larva *Ae. aegypti* di tingkat jaringan dan seluler.

## KESIMPULAN

Ekstrak metanol daun jeruk nipis (*C. aurantifolia*) menyebabkan mortalitas larva nyamuk *Ae. aegypti* instar III dengan LC<sub>50</sub> dan LC<sub>99</sub> adalah 2.197 ppm dan 4.266 ppm. Mortalitas larva semakin tinggi seiring peningkatan konsentrasi ekstrak. Kerusakan tubuh larva *Ae. aegypti* setelah paparan ekstrak metanol daun jeruk nipis 24 jam berupa kepala lepas, leher yang cukup panjang, kulit eksoskeleton lepas, abdomen transparan, saluran pencernaan penuh dengan ekstrak, dan bulu lateral abdomen lepas.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada pimpinan Fakultas dan Program Studi Pendidikan Dokter di Universitas Ciputra untuk kesempatan berkarya di Universitas Ciputra dan yang telah mendukung terciptanya artikel penelitian ini. Terima kasih pula diberikan kepada Bapak Eko Tjahjono di Departemen Matematika Universitas Airlangga selaku konsultan statistik yang telah banyak membantu penulis.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Queen M, Martin P, Elumalai K, Kandeepan C, Kalaimathi R, Sivamani P. Effect of selected plant fumigants against dengue fever vector *Aedes aegypti* (Linn). *Int J Curr Res Acad Rev.* 2014;2(8):294-303.
2. Isnawati R, Murni, Nelfita. Uji daya bunuh ekstrak daun *Nerium oleander* L. terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* dan *Culex quinquefasciatus*. *J Vektor Penyakit.* 2015;9(2):59-64.
3. Prasetyowati H, Ginanjar A. Maya Indeks dan kepadatan larva *Aedes aegypti* di daerah endemis DBD Jakarta Timur. *J vektora.* 2017;9(1):43-49.
4. Zumaroh. Evaluasi pelaksanaan surveilans kasus demam berdarah dengue di Puskesmas Putat Jaya berdasarkan atribut surveilans. *J Berk Epidemiol.* 2015;3(1):82-94.
5. Kementerian Kesehatan RI. *Profil*

- Kesehatan Indonesia Tahun 2016. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2017.
6. Indonesia KKR. *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 374/Menkes/Per/III/2010 Tentang Pengendalian Vektor*. Jakarta; 2012:1-94.
  7. Boesri H, Heriyanto B, Susanti L, Handayani SW. Uji repelen (daya tolak) beberapa ekstrak tumbuhan terhadap gigitan nyamuk *Aedes aegypti* vektor demam berdarah dengue. *J Vektora*. 2015;7(2):79-84.
  8. Fuadzy H, Wahono T, Widawati M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae against temephos in dengue hemorrhagic fever endemic area Tasikmalaya City. *J Aspirator*. 2017;9(1):29-34.
  9. Istiana. Uji efektivitas beberapa larvasida terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* dari Banjarmasin Barat. *J Berk Kedokt*. 2015;11(1):51-61.
  10. Tasane I. Uji resistensi insektisida malathion 0,8% terhadap nyamuk *Aedes aegypti* di wilayah fogging kantor kesehatan pelabuhan kelas II Ambon. *J Kesehat Masy*. 2015;3(3):162-174.
  11. Sunaryo, Ikawati B, Rahmawati, Widiastuti D. Status resistensi vektor demam berdarah dengue (*Aedes aegypti*) terhadap malathion 0,8% dan permethrin 0,25% di provinsi Jawa Tengah. *J Ekol Kesehat*. 2014;13(2):146-152.
  12. Kusmawati W. Kelainan rangka fetus mencit (*Mus musculus*) galur balb/c akibat pemberian DEET (Diethyltoluamide). *el-Hayah*. 2016;5(4):177-182.
  13. Adrianto H, Yotopranoto S, Hamidah. Efektivitas ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*), jeruk limau (*Citrus amblycarpa*), dan jeruk bali (*Citrus maxima*) terhadap larva *Aedes aegypti*. *J Aspirator*. 2014;6(1):1-6.
  14. Sarma R, Khanikor B, Mahanta S. Essential oil from *Citrus grandis* (Sapindales: Rutaceae) as insecticide against *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae). *Int J Mosq Res*. 2017;4(3):88-92.
  15. Soonwera M. Efficacy of essential oils from *Citrus* plants against mosquito vectors *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Int J Agric Technol*. 2015;11(3):669-681.
  16. Upa RAP. Uji larvasida ekstrak ethanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap larva *Aedes aegypti* di laboratorium. 2015. [http://etd.repository.ugm.ac.id/index.php?act=view](http://etd.repository.ugm.ac.id/index.php?act=view&buku_id=84683&mod=penelitian_detail&sub=PenelitianDetail&typ=html)
  17. Ekawati ER, Santoso SD, Purwanti YR. Pemanfaatan kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai larvasida *Aedes aegypti* instar III. *J Biota*. 2017;3(1):1-5.
  18. Abdallah E. Preliminary phytochemical and antibacterial screening of methanolic leaf extract of *Citrus aurantifolia*. *Pharm Biotechnol Curr Res*. 2016;1(2):1-5.
  19. Akinnibosun F, Edionwe O. Evaluation of the phytochemical and antimicrobial potential of the leaf extracts of *Bryophyllum pinnatum* L. and *Citrus aurantifolia* Sw. and their Synergy. *J Appl Sci Environ Manag*. 2015;19(4):611-619.
  20. Wulandari MJ, Riska L, Prunama AL, Jamaludin MA, Fauzi I, Nurmilawati M. Jenis-jenis komponen minyak atsiri yang diisolasi dari daun *Citrus aurantifolia* dan *Citrus nobilis*. In: *Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS 2015*. ; 2015:662-666.
  21. Rahmawati M, Hidajati N. Isolasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder dari ekstrak metanol kulit batang tumbuhan mengkudu (*Morinda citrifolia*). *UNESA J Chem*. 2017;6(2):113-118.
  22. Firdausi I, Retnowati R, Sutrisno. Fraksinasi ekstrak metanol daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) dengan pelarut n-butanol. *Kim Student J*. 2015;1(1):785-790.
  23. Saranya M, Mohanraj RS, Dhanakkodi B. Larvicidal, pupicidal activities and morphological deformities of *Spathodea campanulata* aqueous leaf extract against the dengue vector *Aedes aegypti*. *Eur J Exp Biol*. 2013;3(2):205-213.
  24. Procópio TF, Fernandes KM, Pontual EV, et al. *Schinus terebinthifolius* Leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. *PLoS One*. 2015;10(5):1-19.
  25. Gutierrez P, Antepuesto A, Eugenio B, Santos M. Larvicidal activity of selected plant extracts against the dengue vector *Aedes aegypti* mosquito. *Int Res J Biol Sviences*. 2014;3(4):23-32.
  26. Adipven PS, Subramanian P. Toxicity of *Citrus aurantifolia* and *Citrus hystrix* against *Aedes albopictus* larvae. *Int J Biosci*. 2017;10(6):48-54.
  27. Rollando, Hariono M. Aktivitas larvasida ekstrak etanol, fraksi n-heksan, etil asetat, dan metanol daun sembung terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* dan

- Anopheles* instar III. *Tradit Med J.* 2016;21(3):137-142.
28. Elumalai D, Hemalatha P, Kaleena PK. Larvicidal activity and GC-MS analysis of *Leucas aspera* against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *J Saudi Soc Agric Sci.* 2017;16(4):306-313.
29. Aisah S, Sulistyowati E, Sari YDA. Potensi ekstrak biji bengkuang (*Pachyrrhizus Erosus* URB.) sebagai larvasida *Aedes aegypti* L. instar III. *Kaunia.* 2013;9(1):1-11.
30. Mahyoub J, Hawas U, Al-Ghamdi K, *et al.* The biological effects of some marine extracts against *Aedes aegypti* (L.) mosquito vector of the dengue fever in Jeddah Governorate, Saudi Arabia. *J Pure Appl Microbiol.* 2016;10(3):1-8.
31. Noshirma M, Willa RW. Larvasida hayati yang digunakan dalam upaya pengendalian vektor penyakit Demam berdarah di Indonesia. *J sel.* 2016; 3(1):31-40.

