



PENELITIAN

EFEK BIOLARVISIDA EKSTRAK ETANOL BUAH *CITRUS HYSTRIX* TERHADAP LARVA *AEDES AEGYPTI*

I Gusti Ngurah Ananda Wira Kusuma¹, I Made Sudarmaja², I Kadek Swastika², Putu Ayu Asri Damayanti²

ABSTRAK

Pendahuluan: Infeksi dengue merupakan penyakit dengan vektor nyamuk dengan insidensi yang tinggi dan menyebabkan berbagai kondisi klinis dari yang ringan hingga berat. Membasmi larva nyamuk *Ae. aegypti* merupakan strategi umum untuk mencegah penyebaran infeksi dengue. Penelusuran bahan herbal sebagai biolarvisida penting dilakukan agar didapat bahan larvisida yang ramah lingkungan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek biolarvisida ekstrak etanol buah *Citrus hystrix* terhadap larva *Ae. aegypti*.

Metode: Penelitian dilakukan menggunakan uji bioassay dengan larva *Ae. aegypti* instar III dan IV sebagai sampel. Pengujian dibagi menjadi 7 kelompok yakni kelompok kontrol, dan kelompok perlakuan pada konsentrasi 400, 800, 1200, 1600, 2000, dan 2400 ppm, tiap kelompok terdiri atas 20 ekor larva. Seluruh kelompok kemudian diamati pada 1, 24, dan 48 jam. Kematian larva dicatat dan data dianalisis untuk mengetahui efek biolarvisida, nilai LC50 dan LC95, dan hubungan dosis-efek.

Hasil: Total larva diujikan sebanyak 590 ekor, didapat total kematian larva 315 ekor dan 418 ekor setelah 24 dan 48 jam. Uji *one-way ANOVA* menghasilkan nilai *F* 26,03 dan 65,69 ($p < 0,05$) masing-masing pada periode 24 dan 48 jam. Nilai *R*² sebesar 0,745 dan 0,635 masing-masing pada periode 24 dan 48 jam ($p < 0,05$). Nilai LC50 24 jam = 989,55 ppm, dan LC95 24 jam = 2785,89 ppm sedangkan LC50 48 jam = 483,16 ppm dan LC95 48 jam = 1555,49 ppm.

Simpulan: Penulis menyimpulkan bahwa ekstrak etanol buah *Citrus hystrix* memiliki efek biolarvisida terhadap larva *Ae. aegypti*, hubungan dosis-efek yang linier, serta korelasi yang positif, kuat, dan signifikan.

Kata kunci: *Aedes aegypti*, Biolarvisida, *Citrus hystrix*, LC50, dan LC95.

ABSTRACT

Introduction: Dengue infection is a high-incidence-mosquito-vector disease that causes various clinical conditions ranging from mild to severe. Eradicating *Ae. aegypti* mosquito larvae is a common strategy to prevent the spread of dengue infection. This study aims to explore the biolarvicide effect of the ethanol extract of *Citrus hystrix* fruit on *Ae. aegypti* larvae.

Method: The study was conducted using a bioassay with *Ae. aegypti* larvae in instars III and IV as samples. The test was divided into 7 groups, namely the control group and the treatment groups at concentrations of 400, 800, 1200, 1600, 2000, and 2400 ppm, each group consisting of 20 larvae, then observed at 1, 24, and 48 hours. Larval mortality was recorded, and data were analyzed to determine the biolarvicide effect, LC50 and LC95 values, and dose-effect relationships.

Result: A total of 590 larvae were tested, total mortality was 315 and 418 after 24 and 48 hours, respectively. The *one-way ANOVA* test resulted in *F* values of 26.03 and 65.69 ($p < 0.05$) in the periods of 24 and 48 hours, respectively. The *R*² values were 0.745 and 0.635 at 24 and 48-hour periods, respectively ($p < 0.05$). The values of LC50 for 24 hours are 989.55 ppm and LC95 for 24 hours are 2785.89 ppm, while LC50 for 48 hours is 483.16 ppm and LC95 for 48 hours is 1555.49 ppm.

Conclusion: The authors concluded that the ethanolic extract of *Citrus hystrix* fruit had a biolarvicidal effect on *Ae. aegypti* larvae, a linear dose-effect relationship, and a positive, strong, and significant correlation.

Keywords: *Aedes aegypti*, Biolarvicide, *Citrus hystrix*, LC50, and LC95.

PENDAHULUAN

Infeksi Dengue merupakan penyakit dengan vektor nyamuk yang keberadaannya memiliki insidensi yang tinggi baik pada negara tropis maupun non tropis. Sekitar 390 juta infeksi terjadi tiap tahunnya dan lebih dari 70% populasi dunia beresiko terinfeksi oleh virus dengue (DENVs).^[1] Secara spesifik, Pulau Bali yang telah lama dikenal sebagai destinasi wisata internasional memiliki kasus dengue yang tinggi. Penyakit ini amat berpengaruh terhadap keberlangsungan hidup masyarakat lokal maupun wisatawan asing dan memiliki efek yang buruk pada

perekonomian di masyarakat.^[2] Arus pekerja pendatang serta wisatawan juga sangat berpengaruh terhadap penyebaran virus dengue di Bali melalui berbagai strand nyamuk *Aedes aegypti*.^[3] Wabah terparah terjadi pada tahun 2010 dan 2015 dengan masing-masing telah tercatat 12.574 kasus dengan 35 kematian serta 10.704 kasus dengan 28 kematian.^[4] Dengue dapat menimbulkan manifestasi klinis dan gejala yang ditimbulkan bervariasi mulai dari demam dengue klasik, hingga dengue *shock syndrome* (DSS).^[5] *Aedes aegypti* merupakan vektor bagi arbo-virus penyebab infeksi dengue, merupakan spesies

¹Program Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana
²Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana

endemic di daerah Asia Tenggara, Asia Pasifik, Afrika, dan Amerika. Nyamuk ini umumnya berkembang di daerah kosmotropis, berkembangbiak dengan cara bertelur di genangan-genangan air di daerah perumahan ataupun daerah lain yang kumuh dan tidak terurus.⁽⁶⁾

Penanggulangan penyakit dengue saat ini lebih dititikberatkan pada pembasmian larva nyamuk *Aedes aegypti*, memanfaatkan siklus reproduksinya yang memerlukan genangan air untuk menampung telur. Cara ini telah populer, terutama pada negara-negara berkembang akibat pengadaaan vaksin sebagai salah satu solusi terbaik masih belum dapat terlaksana.^[7] Pembasmian larva nyamuk di Indonesia dilakukan melalui program pemerintah menggunakan "juru pemantau jentik" (jumantik). Kendati demikian, sangat disayangkan peran jumantik masih belum sepenuhnya efisien dalam upaya penurunan angka demam berdarah akibat virus dengue di Bali.^[8] Hal ini juga dibuktikan dengan jumlah insidensi infeksi dengue yang meningkat sepanjang 2012 hingga tahun 2017.^[4] Program lain yang telah digunakan dalam pencegahan penyakit infeksi dengue ialah penggunaan bubuk abate (*temephos*), suatu senyawa organofosfat yang bekerja dengan cara merusak sistem saraf pada larva nyamuk. *Temephos* biasanya ditaburkan pada daerah genangan air tempat larva *Aedes aegypti* berkembang. Metode ini cukup ampuh untuk digunakan, namun memiliki beberapa kekurangan. Kekurangan yang pertama yaitu sifat nonspesifik dalam mencegah perkembangbiakan nyamuk *Ae. aegypti*, sehingga berpotensi mengganggu proses hidup makhluk hidup lainnya apabila tercemar. Kekurangan kedua ialah potensi bioakumulasi pada rantai makanan, dapat menjadi toksik apabila konsentrasinya terakumulasi melalui alur rantai makanan. Kekurangan ketiga, *temephos* cenderung sulit untuk diuraikan sehingga keberadaannya akan destruktif bagi lingkungan sekitarnya. Kekurangan keempat, penggunaan *temephos* juga mampu memicu resistensi fisiologis pada larva nyamuk, membuat pengaplikasiannya tidak lagi efisien.^[9]

Pendekatan dalam membuat insektisida, khususnya larvisida menggunakan bahan-bahan herbal (biolarvisida) saat ini telah banyak diteliti dan dapat memberi keunggulan dibanding pendekatan kimiawi dan biologis lainnya. Profil larvisida dari beberapa tanaman lokal di daerah Asia juga telah terdokumentasi dengan baik pada beberapa studi.^[10] Tanaman-tanaman dengan potensi untuk dijadikan biolarvisida umumnya secara alami menyintesis senyawa fitokimia sebagai metabolit sekunder untuk melindungi diri dari hewan-hewan herbivora.^[11] Penggunaan biolarvisida ini juga dapat digunakan untuk hama-hama tanaman dan di sekeliling rumah.^[12]

Jeruk purut (*Citrus hystrix*) dapat menjadi

kandidat yang tepat karena memiliki efek biolarvisida yang telah teruji terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*.^[13] Sejauh ini beberapa penelitian telah mencoba menggunakan jeruk purut sebagai bahan biolarvisida nyamuk *Aedes aegypti*, dan telah memberikan efek yang baik.^[14,15] Namun beberapa penelitian tersebut umumnya menggunakan kulit dan daun jeruk purut, sehingga penggunaan daging buah jeruk purut menjadi bagian yang perlu untuk dieksplorasi lebih jauh lagi. Oleh karena itu, dalam penelitian ini penulis tertarik untuk membuat penelitian terkait dengan efek biolarvisida dari buah jeruk purut.

METODE

Model penelitian dan kelaikan etik

Penelitian menggunakan model *true experimental* dengan menggunakan intervensi pemberian ekstrak etanol buah *Citrus hystrix* pada uji bioassay. Penelitian ini telah mendapat izin kelaikan etik dengan nomor 969/UN14.2.2.VII.14/LT/2022.

Persiapan ekstrak

Jeruk purut didapat dari perkebunan di kabupaten Magetan, Provinsi Jawa Timur. Sebanyak 300 gram jeruk purut dibersihkan kemudian dikeringkan. Buah jeruk purut kemudian dipotong kecil-kecil. Ekstrak etanol disiapkan dengan melarutkan 100 gram bagian buah jeruk purut pada etanol 95% dengan perbandingan 1:9 w/v. Hal ini berarti 100 gram buah dilarutkan dalam 900 ml etanol 95%. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi pada suhu ruangan selama 2 x 24 jam. Pelarut kemudian dipisahkan dari ekstrak etanol melalui *glass rotary evaporator*. Proses ini akan menghasilkan 8 gram ekstrak etanol. Sebanyak 1.680 mg ekstrak etanol kemudian dilarutkan kembali pada 700 ml akuades untuk membuat *stock solution* 2400 ppm. Larutan stok kemudian dicairkan dan dilarutkan pada 200 ml air di gelas plastik berukuran 250 ml untuk menghasilkan konsentrasi sebesar 400, 800, 1200, 1600, 2000, dan 2400 ppm.

Persiapan larva

Larva nyamuk dipilih yang berada pada fase instar III dan IV karena ketahanan mekanis yang dimiliki cukup untuk tidak mengalami kematian saat dilakukan pemindahan.

Uji Bioassay

Efek biolarvisida diuji melalui pemberian ekstrak etanol buah jeruk *Citrus hystrix* dengan konsentrasi 400, 800, 1200, 1600, 2000, dan 2400 ppm pada tempat yang berisikan larva Instar III dan IV. Tiap kelompok uji dilakukan replikasi sebanyak 4 kali. Setelah 24, dan 48 jam, jumlah kematian larva kemudian diamati. Larva yang tidak bergerak dan tidak merespons terhadap rangsangan sentuhan maka dianggap telah mati.

Analisis statistik

Analisis statistik dilakukan berupa uji univariat, bivariat dan analisis probit.

Uji univariat dilakukan untuk mengetahui rata-rata kematian larva dalam tiap kelompok uji, dan kemudian disajikan dalam diagram batang. Uji bivariat digunakan untuk mengetahui hubungan konsentrasi ekstrak etanol buah *Citrus hystrix* terhadap larva *Aedes aegypti*.

Analisis probit dilakukan untuk mengetahui nilai

Lethal Concentration 50% (LC50) dan Lethal Concentration 90% (LC90) dari ekstrak etanol buah Citrus hystrix.

HASIL

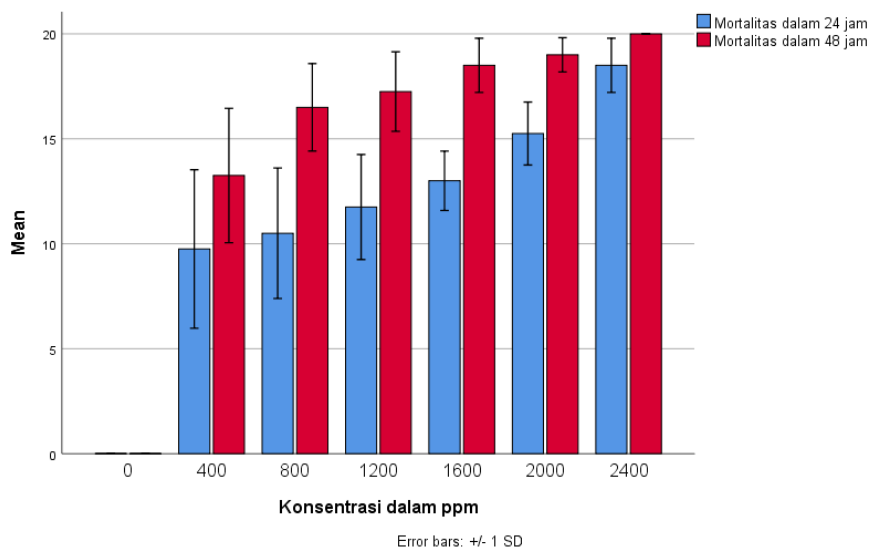
Kematian pada 24 jam didapat total kematian larva sebanyak 315 ekor, dengan jumlah kematian tertinggi pada konsentrasi 2400 ppm mencapai total kematian 74 ekor (92,5%) dengan rata-rata \pm simpangan baku (SB) 18.5 ± 1.29 . Hasil uji biolarvisida pada periode 24 jam dapat dilihat secara terperinci pada tabel 1. Kematian pada 48 jam didapat total kematian larva sebanyak 418 ekor, dengan jumlah kematian tertinggi pada konsentrasi 2400 ppm mencapai total kematian 80 ekor (100%) dengan rata-rata 20. Hasil uji biolarvisida pada periode 48 jam dapat dilihat secara terperinci pada tabel 2.

Tabel 1. Kematian larva dalam 24 jam

No.	Konsentrasi	Jumlah kematian larva pada setiap replikasi				Total Larva	Kematian larva setelah 24 jam		
		1	2	3	4		Jumlah	Persentase (%)	Rata-rata \pm SB
1	Kontrol	0	0	0	0	80	0	0	0
2	400 ppm	10	16	11	16	80	53	66.25	13.25 \pm 3.20
3	800 ppm	17	19	14	16	80	66	82.5	15.50 \pm 2.08
4	1200 ppm	17	20	16	16	80	69	86.25	17.25 \pm 1.89
5	1600 ppm	19	20	17	18	80	74	92.5	18.50 \pm 1.29
6	2000 ppm	19	19	20	18	80	76	95	19 \pm 0.81
7	2400 ppm	20	20	20	20	80	80	100	20

Tabel 2. Kematian larva dalam 48 jam

No.	Konsentrasi	Jumlah kematian larva pada setiap replikasi				Total Larva	Kematian larva setelah 48 jam		
		1	2	3	4		Jumlah	Persentase (%)	Rata-rata \pm SB
1	Kontrol	0	0	0	0	80	0	0	0
2	400 ppm	7	7	10	15	80	39	48.75	9.75 \pm 3.77
3	800 ppm	8	9	10	15	80	42	52.5	10.5 \pm 3.10
4	1200 ppm	9	12	11	15	80	47	58.75	11.75 \pm 2.5
5	1600 ppm	11	14	13	14	80	52	65	13 \pm 1.41
6	2000 ppm	16	14	14	17	80	61	76.25	15.25 \pm 1.5
7	2400 ppm	18	17	19	20	80	74	92.5	18.5 \pm 1.29



Gambar 1. Diagram batang perbandingan jumlah kematian larva pada periode 24 jam dan 48 jam

Diagram batang perbandingan jumlah kematian larva pada periode 24 jam dan 48 jam dapat dilihat pada gambar 1.

Analisis normalitas persebaran data dengan uji *Saphiro-wilk* menunjukkan distribusi data pada nilai rata-rata kematian larva periode 24 dan 48 jam bersifat normal sehingga uji untuk membandingkan rata-rata antarvariabel digunakan uji parametrik yang sesuai yaitu *One-way ANOVA*. Hasil analisis *One-way ANOVA* menunjukkan nilai F untuk periode 24 dan 48 jam masing-masing sebesar 26,03 dan 65,69, keduanya memiliki nilai $p < 0,05$. Dengan demikian dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang signifikan pada tiap kelompok konsentrasi yang diujikan baik pada periode 24 ataupun 48 jam.

Nilai LC_{50} dan LC_{95} Ekstrak Etanol Buah *Citrus*

Tabel 3. Nilai LC_{50} , dan LC_{95} ekstrak etanol buah *Citrus hystrix*

Durasi	LC_{50} (95% CI) dalam ppm	LC_{95} (95% CI) dalam ppm
24 jam	989,55 (753,46-1198,23)	2785,89 (2375,42-3491,28)
48 jam	483,16 (24,51-665,71)	1555,49 (1303,95-1985,69)

PEMBAHASAN

Pemberantasan vektor penyakit merupakan bagian sentral dari pencegahan penyebaran penyakit, terutama di negara berkembang. Pendayagunaan bahan herbal dapat memberi manfaat lebih baik dibandingkan bahan kimia sintesis karena sifatnya yang lebih murah dan ramah lingkungan. Oleh karena, itu penelusuran efek biolarvisida dari bahan herbal yang diperoleh dari hasil perkebunan lokal akan mendukung upaya pencegahan penyakit yang disebarkan oleh vektor

hystrix

Nilai LC_{50} dan LC_{95} pada periode 24 masing-masing sebesar 989,55 dan 2785,89 ppm, sementara pada periode 48 jam sebesar 2785,89 dan 1555,49 ppm. Nilai LC_{50} dan LC_{95} secara terperinci dapat dilihat pada tabel 3.

Hubungan Dosis-Efek Ekstrak Etanol Buah *Citrus hystrix*

Uji korelasi menunjukkan nilai R^2 sebesar 0,745 dan 0,635 masing-masing untuk periode 24 jam dan 48 jam dengan nilai $p < 0,05$. Hal ini berarti dosis pemberian ekstrak berhubungan kuat dan signifikan secara statistik dengan efek biolarvisida yang dihasilkan.

serangga dan meningkatkan taraf kualitas kesehatan nasional.

Suatu studi membandingkan buah-buah dari genus *Citrus* sebagai biolarvisida *Aedes aegypti* menunjukkan *Citrus hystrix* memiliki potensi yang baik dibandingkan buah lain dalam genus yang sama.^[16] Selain itu melalui penelitian sebelumnya juga didapatkan ekstrak yang didapat dari buah *Citrus hystrix* memiliki keunggulan lebih baik dibandingkan kulit, daging buah ataupun daun.^[17,18]

Saat ini telah digunakan beberapa cara untuk menguji efek biolarvisida dari *Citrus hystrix*, diantaranya menggunakan ekstraksi alkohol dan

minyak essential. Ekstraksi alkohol bersifat polar dan bisa dilakukan melalui beberapa cara diantaranya maserasi *counter current*, sokletasi, atau perkolasi. Ekstrak yang dihasilkan dari proses ini mudah larut pada air. [19] Ekstrak etanol akan menghasilkan zat aktif terpenoid, flavonoid, dan saponin, terutama pada kulit buah. Penelitian *in vitro* dan *in silico* menunjukkan terpenoid dapat berinteraksi dengan *sterol carrier protein* yang mengganggu proses katabolisme lemak pada larva nyamuk. [20] Zat flavonoid mampu menghambat protein *Nobo* yang merupakan enzim penting dalam sintesis hormon ecdison sehingga menghambat proses metamorfosis larva nyamuk. [21]

Ekstraksi yang menghasilkan minyak esensial juga banyak digunakan pada studi efek biolarvisida *Citrus hystrix* terhadap *Aedes aegypti*. Ekstraksi ini umumnya menggunakan proses distilasi dan reagen berupa n-heksana. Kandungan paling dominan yang didapat dari ekstraksi ini ialah *b-pinene* dan *d-limonene*. [22]

Pada penelitian ini penulis menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol, dan mengekstraksi bagian buah yang meliputi biji, daging buah, dan kulit dari jeruk *Citrus hystrix*. Nilai LC_{50} didapat pada penelitian ini lebih tinggi dari percobaan yang dilakukan oleh Mya *et al* (138 ppm). [14] Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan proses pembuatan ekstrak yaitu dengan menggunakan sokletasi dan dengan komposisi perbandingan alkohol yang berbeda. Selain itu perbedaan tempat pengambilan larva *Aedes aegypti*, dan varietas buah yang berbeda antarnegara juga bisa berpengaruh terhadap nilai LC_{50} pada studi tersebut. Di sisi lain, nilai LC_{50} pada penelitian ini lebih rendah jika dibandingkan dengan studi oleh Adrianto *et al*, bisa diakibatkan oleh kecenderungan zat aktif yang terakumulasi pada kulit buah dibandingkan daun, dan penggunaan metanol yang merupakan pelarut hidrokarbon berantai pendek sehingga lebih mudah menguap pada proses evaporasi. [23]

Penggunaan metode ekstraksi distilasi yang menghasilkan minyak esensial seperti yang dilakukan oleh Wikandari *et al.*, Subekti *et al*, dan Sutthanont *et al*, menghasilkan LC_{50} yang lebih rendah. Hal ini disebabkan karena sifat zat non-polar yang dihasilkan dapat lebih mudah menembus tubuh larva. Namun, penggunaan minyak esensial membutuhkan zat pengemulsi agar bisa larut dalam air yang merupakan media pengujian larvisida. [24] Ekstraksi dengan bahan etanol di lain sisi bersifat larut air, maka tidak membutuhkan zat tambahan untuk diujikan pada medium air.

Terdapat beberapa kekurangan pada penelitian ini, diantaranya masih belum diketahui kandungan zat aktif apa saja yang terdapat dalam buah *Citrus hystrix* yang diekstraksi dengan metode maserasi, kemungkinan terjadinya bias dalam perhitungan efek larvisida karena larva yang mati akibat faktor mekanis masih belum bisa dibedakan dari larva yang

mati akibat paparan ekstrak, serta masih belum menggunakan kontrol positif dalam kelompokujinya. Sejauh yang penulis ketahui, semenjak dimulainya perencanaan penelitian hingga penyusunan laporan penelitian, penelitian ini merupakan penelitian pertama di Indonesia yang menguji efek biolarvisida ekstrak maserasi *Citrus hystrix* yang menggunakan buah sebagai bahan maseratnya. Keterbatasan dalam biaya dan pengalaman penulis menjadi tantangan utama dalam penyusunan penelitian ini. Kedepannya diharapkan penelitian ini dapat menjadi referensi dalam mengembangkan formulasi biolarvisida dengan memanfaatkan bahan herbal dari petani lokal serta penelitian dapat dilanjutkan hingga dapat diaplikasikan dengan aman pada kehidupan sehari-hari.

SIMPULAN

Melalui hasil penelitian efek biolarvisida ekstrak etanol buah *Citrus hystrix* terhadap larva *Aedes aegypti*, didapat kesimpulan sebagai berikut:

(1) Ekstrak buah *Citrus hystrix* memiliki efek biolarvisida terhadap larva *Aedes aegypti*, (2) Nilai LC_{50} dan LC_{95} dari ekstrak etanol buah *Citrus hystrix* pada periode 24 jam masing-masing sebesar 989,55 dan 2785,89 ppm, (3) Dosis dan efek aktivitas biolarvisida yang ditimbulkan oleh ekstrak etanol buah *Citrus hystrix* terhadap larva *Aedes aegypti* berhubungan secara positif, kuat, dan signifikan.

SARAN

Adanya penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas terhadap lingkungan, kandungan zat aktif yang berperan sebagai biolarvisida, dan pengujian lapangan ekstrak etanol buah *Citrus hystrix* penting untuk dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013;496:504–7. <https://doi.org/10.1038/nature12060>.
- 2 Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Stanaway JD. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infect Dis* 2016;16:935–41.
- 3 Yoshikawa MJ, Kusriastuti R. Surge of dengue virus infection and chikungunya Fever in Bali in 2010: the burden of mosquito-borne infectious diseases in a tourist destination. *Trop Med Health* 2013;2005–11.
- 4 Suarjaya K. Profil Kesehatan Provinsi Bali 2017. Dinas Kesehatan Provinsi Bali 2017:36.
- 5 Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol* 2013;158:1445–59.
- 6 Kovendan K, Murugan K, Vincent S. Evaluation of larvicidal activity of *Acalypha alnifolia* Klein ex Willd. (Euphorbiaceae) leaf extract against the malarial vector, *Anopheles stephensi*,

- dengue vector, *Aedes aegypti* and Bancroftian filariasis vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culici. Parasitol Res 2012;110:571–81. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2525-y>.
- 7 Tsheten T, Gray DJ, Clements ACA, Wangdi K. Epidemiology and challenges of dengue surveillance in the WHO South-East Asia Region. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2021;115:583–99.
 - 8 Rubianti I. Evaluasi Peran Juru Pemantau Jentik (Jumantik) Dalam Pemberantasan Vektor Demam Berdarah Dengue (DBD) Di Kota Denpasar Tahun 2017. *ORYZA Jurnal Pendidikan Biologi* 2019;8:1–9.
 - 9 Melo-Santos MA V, Varjal-Melo JJM, Araújo AP, Gomes TCS, Paiva MHS, Regis LN, et al. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop* 2010;113:180–9.
 - 10 Pavela R, Maggi F, Iannarelli R, Benelli G. Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. *Acta Trop* 2019;193:236–71.
 - 11 Bansal SK, Singh K V, Sharma S, Sherwani MRK. Laboratory observations on the larvicidal efficacy of three plant species against mosquito vectors of malaria, dengue/dengue hemorrhagic fever (DF/DHF) and lymphatic filariasis in the semi-arid desert. *J Environ Biol* 2012;33:617.
 - 12 Koul O. Plant biodiversity as a resource for natural products for insect pest management. Geoff, M, Gurr, GM, Wratten, SD, Snyder, WE & Read, D MY (Eds), *Biodiversity and Insect Pests: Key Issues for Sustainable Management* John Wiley & Sons, Ltd 2012:85–105.
 - 13 Adrianto H. EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN JERUK PURUT (*Citrus hystrix*), JERUK LIMAU (*Citrus amblycarpa*), DAN JERUK BALI (*Citrus maxima*) TERHADAP LARVA *Aedes aegypti*. *Aspirator* 2014;6:1–6. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
 - 14 Mya, Zarzar A, Chitthath N, Aye WO, Than MH, Sein T, et al. Larvicidal, Ovicidal and repellent effect of *Citrus hystrix* DC (Kaffir lime) fruit, peel and internal materials extracts on *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Biological Engineering Research and Review* 2017;4:34–43.
 - 15 Wikandari RJ, Surati S. Efek Ekstrak Kulit Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC) terhadap Morfologi dan Histologi Larva *Aedes aegypti*. *ASPIRATOR - Journal of Vector-Borne Disease Studies* 2018;10:119–26. <https://doi.org/10.22435/asp.v10i2.193>.
 - 16 Adrianto H, Yotopranoto S, Hamidah H. EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN JERUK PURUT (*Citrus hystrix*), JERUK LIMAU (*Citrus amblycarpa*), DAN JERUK BALI (*Citrus maxima*) TERHADAP LARVA *Aedes aegypti*. *ASPIRATOR - Journal of Vector-Borne Disease Studies* 2014;6:1–6. <https://doi.org/10.22435/asp.v6i1.3516.1-6>.
 - 17 Mya, Aye YY, Oo AW, Saxena RK. Effect of *Citrus hystrix* DC Leaves Ethanol Extract on Larvae of *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Engineering Research and Review* 2015;2:1–6.
 - 18 Ansori ANM, Adrianto H, Hamidah H. Biolarvicidal effectivities of polar fraction extract from *Citrus hystrix* and *Citrus aurantifolia* leaf against *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Disease Vector* 2018;12:33–8.
 - 19 KEMENKES. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia 2008.
 - 20 Ochoa SA, Basurto JC, Valdez LMR, Torres LES, Torres BN. In vitro and in silico studies of terpenes, terpenoids and related compounds with larvicidal and pupaecidal activity against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Chem Cent J* 2018;1:–21. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0425-2>.
 - 21 Inaba K, Ebihara K, Senda M, Yoshino R, Sakuma C, Koiwai K, et al. Molecular action of larvicidal flavonoids on ecdysteroidogenic glutathione S-transferase Noppera-bo in *Aedes aegypti*. *BMC Biol* 2022;20:43. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01233-2>.
 - 22 Sutthanont N, Choochote W, Tuetun B, Junkum A, Jitpakdi A, Chaithong U, et al. Chemical composition and larvicidal activity of edible plant-derived essential oils against the pyrethroid-susceptible and -resistant strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology* 2010;35:106–15. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2010.00066.x>.
 - 23 Truong DH, Nguyen DH, Ta NTA, Bui AV, Do TH, Nguyen HC. Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of *severinia buxifolia*. *J Food Qual* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8178294>.
 - 24 Pandiyan GN, Mathew N, Munusamy S. Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2019;174:549–56. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.019>.