

Efek Ekstrak Kulit Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC) terhadap Morfologi dan Histologi Larva *Aedes aegypti*

Effect of Citrus hystrix DC Peels Extract against Morphology and Histology of Aedes aegypti Larvae

Ririh Jatmi Wikandari¹, Surati¹

¹ Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Semarang, Jl. Wolter Monginsidi 115 Pedurungan Semarang 50192, Indonesia

Abstract. Essential oils can be used as an alternative to naturally control *Ae. aegypti*. Essential oil can affect morphology and histology of *Aedes aegypti* larvae. The aims of this study were to determine the effect of larvacide essential oil of kaffir lime against mortality and to know morphological and histological changes of *Ae. aegypti* larvae. The study was conducted in June 2016 at the Parasitology and Entomology Laboratory of University Jenderal Soedirman. This study was an experimental study with three concentrations and three replications. The death of the larvae is calculated after 24 hours of exposure. Data were analyzed descriptively. The results showed that 10^3 ppm concentration was effective in killing larvae by 96%. Exposure of kaffir lime peel oils results in the color of the abdomen becoming black. Histological observation preparation larvae showed midgut epithelial cell damage.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Citrus hystrix*, morphology, histology

Abstrak. Minyak esensial dapat digunakan sebagai alternatif pengendalian *Aedes aegypti*. Minyak esensial dapat memengaruhi morfologi dan histologi larva. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh minyak esensial kulit jeruk purut terhadap kematian, perubahan morfologi dan histologi larva *Ae. aegypti*. Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2016 di Laboratorium Parasitologi dan Entomologi Universitas Jenderal Soedirman. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan tiga konsentrasi dan tiga kali ulangan. Kematian larva dihitung setelah 24 jam. Data dianalisa secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi 10^3 ppm efektif mematikan larva sebesar 96%. Paparan minyak esensial kulit jeruk purut mengakibatkan warna abdomen menjadi hitam. Pengamatan sediaan histologi larva menunjukkan adanya kerusakan sel epitel *midgut*.

Kata Kunci: *Aedes aegypti*, *Citrus hystrix*, morfologi, histologi

PENDAHULUAN

Kejadian demam berdarah secara global telah meningkat dalam beberapa dekade terakhir. Saat ini sekitar setengah dari populasi dunia berisiko, terutama di wilayah tropis dan sub tropis.¹ Virus Dengue sangat endemik di negara tropis. Di Asia, penyakit ini sering menyerang di Cina Selatan, Pakistan, India, dan semua negara di Asia Tenggara. Data dari seluruh dunia menunjukkan Asia menempati urutan pertama dalam jumlah penderita Demam Berdarah Dengue (DBD) setiap tahunnya. World Health Organisation (WHO) mencatat Indonesia sebagai negara dengan kasus Demam Berdarah Dengue tertinggi di Asia Tenggara.²

Kasus DBD di Indonesia fluktuatif setiap tahunnya. Data dari Direktorat Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Tular Vektor dan Zoonotik, Kemenkes RI, pada 2014 jumlah penderita mencapai 100, 347, 907 orang di antaranya meninggal. Pada 2015, sebanyak 129.650 penderita dan 1.071 kematian. Sedangkan di 2016 sebanyak 202.314 penderita dan 1.593 kematian.³ Hingga saat ini belum ditemukan vaksin ataupun obat yang efektif bagi penderita DBD. Untuk menanggulangi DBD dengan mengendalikan vektor nyamuk dengan cara mengurangi populasi nyamuk di tempat perkembangbiakan. Usaha ini diharapkan akan memutus perkembangan siklus hidup nyamuk sehingga larva nyamuk tidak dapat berkembang menjadi dewasa.^{4,5}

Pengendalian vektor merupakan komponen penting dari strategi untuk melawan penyakit yang ditularkan melalui vektor.⁶ Pengendalian vektor demam berdarah melibatkan penggunaan insektisida kimia sintesis. Aplikasi insektisida kimia sintesis, memberikan pengendalian vektor yang cepat dan efektif. Namun, penggunaan insektisida sintesis telah dibatasi karena menimbulkan masalah seperti, efek buruk pada kesehatan manusia, mahal, munculnya resistensi pada nyamuk.⁷ Oleh karena itu, untuk mengurangi efek tersebut, maka diupayakan penggunaan insektisida alami berasal dari tumbuhan sebagai pengendali vektor yang ramah lingkungan.

Saat ini telah banyak dilaporkan penelitian tentang tumbuhan yang berpotensi sebagai insektisida alami.^{5, 6, 7} Salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai insektisida alami adalah jeruk purut. Bagian tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai insektisida adalah kulit buah jeruk purut. Kulit buah jeruk purut dapat dimanfaatkan sebagai larvasida karena adanya senyawa aktif yang terkandung dalam minyak esensial kulit.⁸

Minyak esensial diketahui memiliki aktivitas larvasida terhadap larva *Ae. aegypti*.^{9, 10, 11} Sifat

lipofilik minyak esensial memudahkan minyak esensial untuk mengganggu fungsi metabolisme, biokimia, fisiologis, morfologi dan perilaku serangga.⁶ Minyak esensial juga berpengaruh terhadap histologis larva *Ae. aegypti* yang menyebabkan kerusakan sel epitel *midgut*.^{12, 13} Ekstrak kulit jeruk purut juga dilaporkan memiliki aktivitas larvasida terhadap larva instar *Ae. aegypti*.¹⁴ Namun, belum ada informasi mengenai efek histopatologis dari minyak esensial kulit jeruk purut pada larva *Ae. aegypti*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek minyak esensial kulit jeruk purut terhadap kematian, perubahan morfologi dan histologi larva nyamuk *Ae. aegypti*.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit buah jeruk purut, berasal dari tumbuhan pekarangan di Kuncen Banguntapan Bantul Yogyakarta. Selanjutnya, kulit buah jeruk purut, dipotong, dimasukkan ke dalam ketel sampel, dan dipanaskan menggunakan alat destilasi. Minyak esensial yang diperoleh, dilarutkan dengan *tween 80*, selanjutnya dibuat sesuai konsentrasi yang dibutuhkan (10^1 , 10^2 , 10^3 ppm) yang diperoleh melalui pencampuran ekstrak dengan sejumlah akuades. Penentuan konsentrasi mematikan, dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Entomologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto pada bulan Juni 2016. Penentuan konsentrasi letal berdasarkan pada penelitian Mya¹⁴, dengan LC 50 sebesar 0,0142% (142 ppm). Berdasar hal tersebut maka dikembangkan penelitian menggunakan konsentrasi dibawah dan diatas nilai LC 50.

Larva yang digunakan adalah larva instar IV *Ae. aegypti*. Pemilihan larva instar IV karena ukurannya relatif besar dan organ tubuhnya telah lengkap, memiliki ketahanan terhadap faktor mekanis saat terjadi pemindahan tempat larva dari habitat asli ke tempat uji.¹⁵ Selain itu, larva instar IV *Ae. aegypti* merupakan sampel penelitian yang menjadi standar WHO. Selanjutnya dilakukan pengujian sesuai dengan prosedur standar WHO.¹⁶ Uji dilakukan pada kondisi lingkungan terkendali (suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$; kelembaban 80%) dengan merendam 25 larva ke dalam gelas plastik yang berisi 100 ml air suling dan konsentrasi ekstrak. Kontrol berisi akuades dan *tween 80* dengan masing-masing konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Kematian larva ditentukan setelah 24 jam paparan. Larva dianggap mati saat tidak bergerak ketika disentuh. Persentase kematian larva dilaporkan dari rata-rata tiga ulangan.

Selanjutnya, larva yang terpapar minyak esensial dan larva kontrol dibuat sediaan histologi. Larva difiksasi, dehidrasi, dan dipasang di blok lilin parafin. Blok jaringan larva dipotong dengan ketebalan 4 μm menggunakan mikrotom, dan dilekatkan di atas gelas objek, diwarnai dengan *hematoxylin* dan *eosin*, dan diamati di bawah mikroskop.¹⁷

HASIL

Kematian Larva *Ae. aegypti*

Hasil pengamatan terhadap kematian larva instar IV *Ae. aegypti* dapat dilihat dalam Tabel 1.

Tabel 1. Persentase Kematian Larva *Ae. aegypti* setelah Pemberian Minyak Esensial Kulit Jeruk Purut

Konsentrasi (ppm)	Rerata Kematian Larva (%)	Kematian Larva (%)
0	0	0
10 ¹	0	0
10 ²	3	12
10 ³	24	96

Minyak esensial kulit jeruk purut menunjukkan pengaruh yang berbeda terhadap kematian larva instar IV *Ae. aegypti*. Pada konsentrasi minyak esensial 10³ ppm menunjukkan kematian tertinggi sebesar 96%, konsentrasi 10² ppm dengan kematian sebesar 12% dan konsentrasi 10¹ ppm tidak ditemukan kematian larva.

Morfologi dan Histologi Larva *Ae. aegypti*

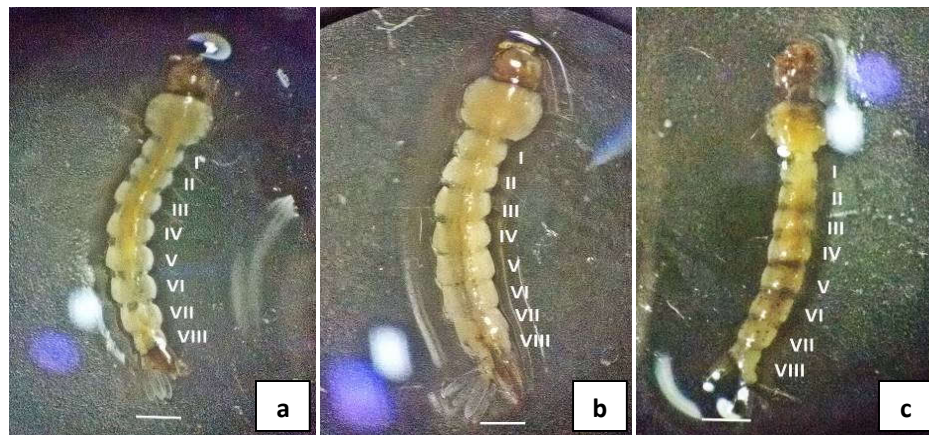
Evaluasi morfologi larva *Ae. aegypti* dan histologis *midgut Ae. aegypti* menunjukkan perbedaan antara larva kontrol dan larva yang

diberi minyak esensial kulit jeruk purut. Pengamatan morfologi larva instar IV *Ae. aegypti* kontrol, memperlihatkan warna kuning yang jelas pada bagian kepala, *toraks* dan *abdomen* (Gambar 1).

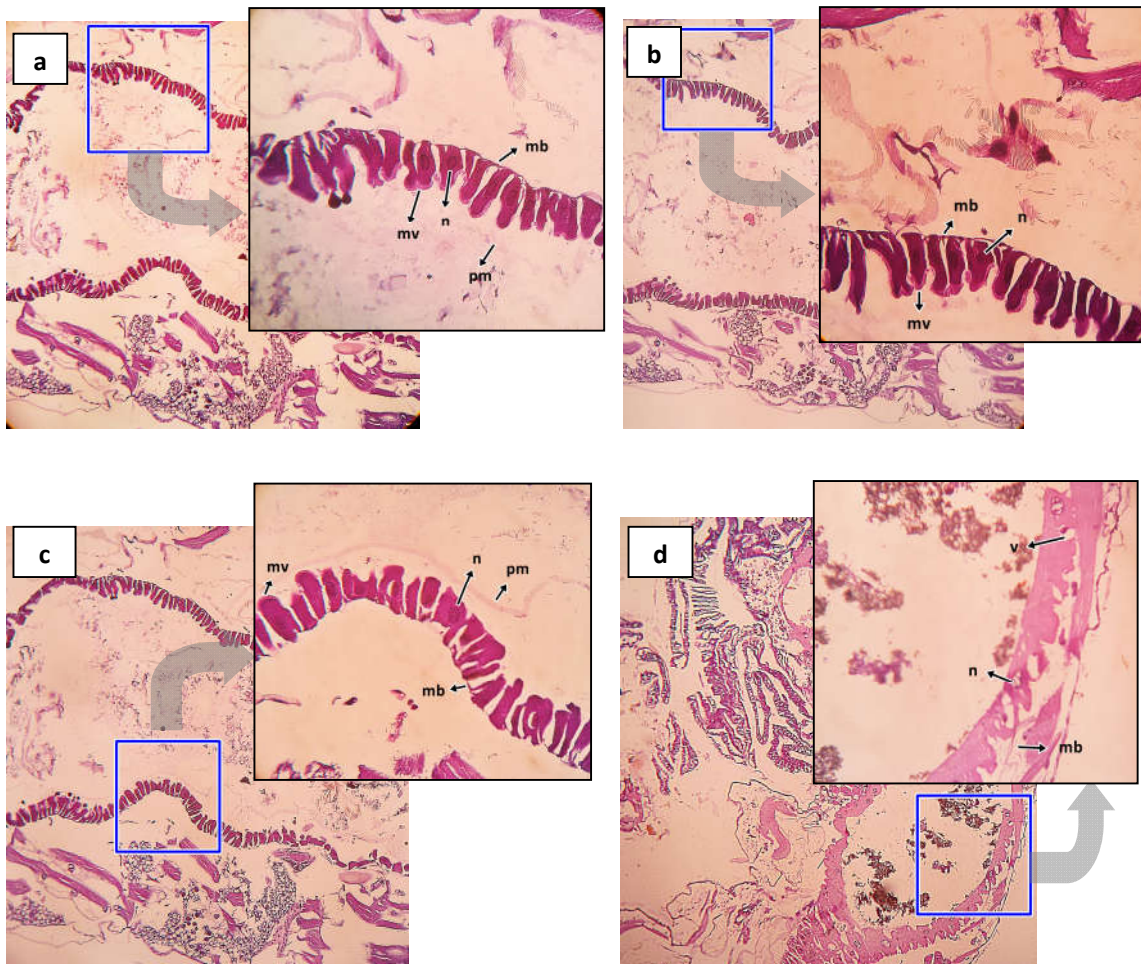
Morfologi larva instar IV *Ae. aegypti* yang terpapar minyak esensial kulit jeruk purut konsentrasi 10¹ ppm dan 10² ppm (Gambar 2a dan 2b) memperlihatkan tidak adanya perubahan warna bagian kepala, *toraks* dan *abdomen*. Pada ketiga bagian tersebut berwarna kuning. Minyak esensial kulit jeruk purut memengaruhi morfologi larva pada konsentrasi 10³ ppm. Perubahan morfologi pada konsentrasi ini, terlihat warna hitam pada segmen abdomen ke-6 (Gambar 2c).



Gambar 1. Morfologi larva instar IV *Ae. aegypti* kontrol (Pengamatan dengan mikroskop stereo pada perbesaran 30x).



Gambar 2. Morfologi larva *Ae. aegypti* dilihat dengan perbesaran 30x yang dipapar dengan minyak esensial kulit jeruk purut selama 24 jam pada (a) konsentrasi 10¹ ppm, (b) konsentrasi 10² ppm, dan (c) konsentrasi 10³ ppm.



Gambar 3. Mikrograf irisan melintang *midgut* larva instar IV *Ae. aegypti* diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x pada: (a) larva kontrol; (b) larva terpapar minyak esensial kulit jeruk purut konsentrasi 10^1 ppm, (c) 10^2 ppm, dan (d) 10^3 ppm. Keterangan: *pm* = peritropik matrix, *mv* = mikrovili, *mb* = membran basal, *n* = nukleus, *v* = vakuolasi.

Hasil evaluasi sediaan histologis larva instar IV *Ae. aegypti* kontrol menunjukkan bahwa *midgut* larva tersusun dari sel-sel epitel, berbentuk silindris berlapis tunggal, melekat pada membran basal, berinti bulat terletak di tengah. Permukaan apikal sel epitel terdapat *mikrovili*. Sitoplasma berwarna merah muda, inti terpulas ungu dengan pewarnaan *Hematoxilin-Eosin* dan terdapat peritropik matrix (Gambar 3a).

Sediaan histologi Gambar 3b dan 3c memperlihatkan sel epitel silindris berlapis tunggal, dengan mikrovili, sitoplasma berwarna merah akibat pewarnaan *Hematoxilin-Eosin*, terdapat peritropik matrik. Minyak esensial kulit jeruk memengaruhi histologi larva *Ae. aegypti*. Pengaruh tersebut seperti tampak pada Gambar

3d yang memperlihatkan vakuolasi, sel epitel lepas dari membran basal.

PEMBAHASAN

Minyak esensial tidak larut dalam air. Oleh karena itu, untuk melarutkan minyak esensial, dibutuhkan pengemulsi/emulsifier. Pada penelitian ini *tween 80* digunakan sebagai pengemulsi. *Tween 80* juga ditambahkan pada kontrol. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh bahwa tidak terdapat kematian terhadap larva kontrol, tidak merubah warna abdomen dan histologi sel epitel *midgut* yang diberi pelarut *tween 80*. Hal ini sesuai dengan penelitian Santos¹⁸, Fujiwara¹⁹, Araujo²⁰, dan Rocha⁶ yang menemukan bahwa penambahan *tween 80* pada kontrol tidak

menimbulkan kematian larva *Ae. aegypti* dan tidak memengaruhi perubahan warna abdomen maupun histologi sel epitel *midgut*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah kematian larva meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi minyak esensial kulit jeruk purut. Hal ini sama dengan yang diungkapkan oleh Ithmanma²¹, bahwa semakin tinggi konsentrasi, maka ekstrak akan memiliki kadar toksik yang tinggi sehingga makin banyak jumlah larva yang mati. Larva yang mati memperlihatkan warna *abdomen* menjadi lebih hitam. Perubahan morfologi warna *abdomen* disebabkan oleh adanya senyawa toksik dalam saluran pencernaan.²² Perubahan warna terjadi terutama pada *midgut* karena *midgut* berperan dalam penyerapan nutrisi dari makanan yang dicerna.¹³ Melihat kondisi perut larva yang tampak berwarna hitam setelah terpapar minyak esensial kulit jeruk purut, maka untuk mengevaluasi kemungkinan penyebab kematian larva *Ae. aegypti* maka dilakukan evaluasi terhadap histologi larva.

Histologi larva nyamuk yang dipapar dengan minyak esensial kulit jeruk purut, memiliki kesamaan kerusakan struktur dengan larva *midgut Culex pipiens* yang dipapar dengan minyak esensial *Nigella sativa*. Histologi larva nyamuk menunjukkan persamaan perubahan morfologi pada *midgut* seperti vakuolasi dan pemisahan beberapa sel epitel dari membran basal, rusaknya peritropik matrix.²³ Struktur peritropik matrix melapisi lumen *midgut*, melindungi sel *midgut* dari substansi racun dan patogen yang masuk melalui makanan. Kerusakan sel epitel *midgut* disebabkan oleh minyak esensial. Minyak esensial mampu merusak membran peritropik dan melewatinya kemudian masuk ke sel epitel *midgut*.²⁴ Kandungan terbesar minyak esensial kulit jeruk purut yaitu limonene.²⁵ Limonene merupakan kelompok monoterpen yang memiliki aktivitas insektisida yang kuat dan aktivitas penghambatan AChE.²⁶ Penghambatan AChE adalah salah satu mekanisme yang menyebabkan kematian dan kelumpuhan pada serangga dengan memblokir transduksi sinyal saraf.²⁷

Sebagai racun perut, *limonene/limonoida* dapat masuk ke dalam tubuh larva *Aedes* sp. Limonoida masuk ke pencernaan melalui rendaman konsentrasi ekstrak yang termakan. Insektisida akan masuk ke organ pencernaan serangga dan diserap oleh dinding *midgut* kemudian beredar bersama darah yang akan mengganggu metabolisme tubuh larva. Akibatnya larva akan kekurangan energi untuk aktivitas hidupnya hingga dapat mengakibatkan larva kejang dan akhirnya mati.² Hal ini didukung oleh penelitian Rocha⁶ yang menyatakan bahwa

limonene pada minyak esensial *Foeniculum vulgare* yang termakan oleh larva masuk ke pencernaan dan diserap oleh dinding *midgut* menyebabkan perubahan warna abdomen sehingga menimbulkan kerusakan *midgut* dan ekstruksi konten *hemolymphatic* yang akan mengganggu metabolisme tubuh nyamuk sehingga kekurangan energi yang mengakibatkan kejang dan akhirnya mati.

Data morfologi dan histologi mengarahkan kepada kesimpulan bahwa minyak esensial kulit jeruk purut bekerja sebagai racun perut. Minyak esensial kulit jeruk purut masuk melalui mulut menuju saluran pencernaan. Minyak menyebar ke dalam air, tertelan oleh larva masuk ke dalam *midgut* dan dicerna oleh larva *Ae. aegypti*. Setelah masuk ke dalam saluran pencernaan, minyak berdifusi melewati peritropik matrix kemudian akan terikat pada reseptor yang terdapat pada *mikrovili* sel epitel saluran pencernaan tengah (*midgut*) sehingga mengakibatkan struktur tiga dimensi protein terganggu dan terbuka. Hal ini yang menyebabkan protein terdenaturasi dan aktivitas biologis larva terganggu, selanjutnya dinding saluran pencernaan menjadi rusak. Terjadinya gangguan pada bagian *midgut* tersebut berdampak pada terganggunya proses metabolisme sehingga larva pada akhirnya mengalami kematian.²⁸

KESIMPULAN

Minyak esensial kulit jeruk purut efektif mematikan larva *Ae. aegypti*. Paparan minyak esensial kulit jeruk purut mengakibatkan perubahan morfologi warna abdomen menjadi hitam. Pengamatan sediaan histologi larva menunjukkan adanya kerusakan sel epitel *midgut*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas bantuan dana beasiswa yang telah diberikan oleh Kementerian Kesehatan RI melalui Program Pengembangan dan Pemberdayaan SDM Kesehatan dan pihak lain yang telah membantu dalam proses penelitian ini.

KONTRIBUSI PENULIS

Peran penulis pada artikel ini yaitu Ririh Jatmi Wikandari sebagai kontributor utama dan Surati sebagai kontributor anggota. Kontribusi penulis dapat dilihat pada rincian berikut:

Menulis-Mengkaji & Mengedit : Ririh Jatmi Wikandari, Surati

DAFTAR RUJUKAN

1. Nunes F, Jacqueline A, Louise H, et al. The larvicidal activity of *Agave sisalana* against L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production. *Parasitol Res.* 2015;114(2):543-549. doi:10.1007/s00436-014-4216-y.
2. Nirma., Andi S, Hasbi I, Munawir A. Efektivitas larvasida ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dalam membunuh jentik nyamuk *Aedes* sp (studi di daerah epidemi DBD di wilayah kerja Puskesmas Antang Kecamatan Manggala). *Higiene.* 2015;3(2):87-96.
3. Anonim. Demam berdarah biasanya mulai meningkat di Januari. *Kementerian Kesehat RI.* 2015:1-2.
4. Dias C, Denise F. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. *Parasitol Res.* 2014;113:565-592. doi:10.1007/s00436-013-3687-6.
5. Gutierrez P, Aubrey N, Bryle A, Maria F. Larvicidal activity of selected plant extracts against the dengue vector *Aedes aegypti* mosquito. *Int Res J Biol Sci.* 2014;3(4):23-32.
6. Rocha D, Olivia M, Maria T, Ana C, Manuel D, Chtistina M. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of *Foeniculum vulgare* essential oils from Portugal and Cape Verde. *Nat Prod Commun.* 2015;10(4):677-682. doi:10.1073/pnas.0703993104.
7. Mallick S, Banerjee R, Chandra G. Mosquito larvicidal potential of ethanol leaf extract of the plant, *Annona reticulata* L. against *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *J Mosq Res.* 2015; 5(19):1-7. doi:10.5376/jmr.2015.05.0019.
8. Sihombing JR, Abdi D, Zulkarnain C, Almahdy., Edi F, Edison M. Phytochemical screening and antioxidant activities of 31 fruit peel extract from Sumatra, Indonesia. *J Chem Pharm Res.* 2015;7(11):190-196.
9. Jayaraman M, Senthilkumar A, Venkatesalu V. Evaluation of some aromatic plant extracts for mosquito larvicidal potential against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi*. *Parasitol Res.* 2015;114:1511-1518. doi:10.1007/s00436-015-4335-0.
10. Chellappandian M, Annamalai T, Prabhakaran V, et al. Toxicological effects of *Sphaeranthus indicus* Linn. (Asteraceae) leaf essential oil against human disease vectors, *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* Linn., and impacts on a beneficial mosquito predator. *Environ Sci Pollut Res.* 2017;1-13. doi:10.1007/s11356-017-8952-2.
11. Srinivasan P, Sengottayan S, Athirstam P, et al. Comparative analysis of mosquito (Diptera: Culicidae: *Aedes aegypti* Liston) responses to the insecticide temephos and plant derived essential oil derived from *Piper betle* L. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017;139:439-446. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.01.026.
12. Pavela R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A Review. *Ind Crops Prod.* 2015;76:174-187. doi:10.1016/j.indcrop.2015.06.050.
13. Tehri K, Naresh S. The role of botanicals as green pesticides in integrated mosquito management – A review. *Int J Mosq Res.* 2015;2(1):18-23.
14. Mya M, Zarzar A, Chit T, et al. Larvicidal, ovicidal and repellent effect of *Citrus hystrix* DC (kaffir lime) fruit, peel and internal materials extracts on *Aedes aegypti* Mosquitoes. *J Biol Eng Res Rev.* 2017;4 (1):34-43.
15. Ardiyansyah., Sri W, Ita A. Efektivitas larvasida infusa daun sirih (*Piper betle*, Linn.) terhadap mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti*. *J Cerebellum.* 2016;2(4):636-645.
16. WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides.; 2005. doi:Ref: WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005. 11.
17. Edwin E, Prabhakaran V, Sengottan S, et al. Anti-dengue efficacy of bioactive andrographolide from *Andrographis paniculata* (Lamiales: Acanthaceae) against the primary dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Acta Trop.* 2016;163 :167-178. doi:10.1016/j.actatropica.2016.07.009.
18. Santos L, Jessica S, Mirela A, et al. Fatty acid-rich volatile oil from *Syagrus coronata* seeds has larvicidal and oviposition-deterrent activities against *Aedes aegypti*. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2017;100:35-40. doi:10.1016/j.pmpp.2017.05.008.
19. Fujiwaraa G, Vinicius A, Camila F, et al. Ecotoxicology and environmental safety. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017;139:238-244. doi:x.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.04.
20. Araujo A, Joao T, Juliana T, et al. Larvicidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their antagonistic effects with temephos in resistant populations of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(7):443-

449. doi:10.1590/0074-02760160075.
21. Ihemanna C, Adindu R, Kalu M, Kalu E. Laboratory evaluation of ethanolic extracts of Citrus sinensis peels and Piper guineense (seeds and leaves) on mosquito larvae. *J Environ Hum.* 2014;1(1):19-24.
 22. Perumalsamy H, Jun R, Sang M, Je W, Young J. Novel histopathological and molecular effects of natural compound pellitorine on larval midgut epithelium and anal gills of *Aedes aegypti*. *PLoS One.* 2013;8(11):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0080226.
 23. Mahasen A, Mahmoud S. Effects of some essential oils against *Culex pipiens* larvae. *J Cell Tissue Res.* 2016;16(2):5559-5566.
 24. Begum M. Histo-Morphology of the larvae of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *J Biodivers Conserv Bioresour Manag.* 2016; 2(1):69-74.
 25. Othman S, Muhammad A, Lutfun N, Norazah B, Shajarahtunnur J, Satyajit D. Essential oils from the Malaysian Citrus (Rutaceae) medicinal plants. *Medicines.* 2016;3(13):1-11. doi:10.3390/medicines3020013.
 26. Gnankiné O, Imaël H. Essential oils as an alternative to pyrethroids resistance against *Anopheles species complex* Giles. *Molecules.* 2017;22:1-23. doi:10.3390/molecules22101321.
 27. Botas G, Rodrigo A, Fernanda B, et al. *Baccharis reticularia* DC. and limonene nanoemulsions: Promising larvicidal agents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control. *Molecules.* 2017;22:1-14. doi:10.3390/molecules22111990.
 28. Wahyuni D, Dyah P, Suratno. Toksisitas granula ekstrak biji alpukat (*Persea americana*) terhadap mortalitas larva nyamuk *Aedes aegypti*. *Artik Ilm Penelit Mhs Tahun 2014.* 2014:1-5.

