

UJI AKTIVITAS REPELLENT FRAKSI N-HEKSAN EKSTRAK ETANOLIK DAUN MIMBA (*Azadirachta indica* A. Juss) TERHADAP NYAMUK *Aedes Aegypti*

Muhamad Djatmiko, Yance Anas, dan Sri Murti Handayani
Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

ABSTRAK

Daun mimba dipercaya masyarakat dapat menolak hinggapan nyamuk *Aedes aegypti*, sehingga dapat digunakan sebagai *repellent*. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan aktifitas *repellent* fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba terhadap nyamuk *Aedes aegypti*, dan mengidentifikasi senyawa golongan terpenoid dalam fraksi n-heksan tersebut.

Ekstrak etanolik daun mimba dibuat dengan menggunakan metode Maserasi dan selanjutnya difraksinasi dengan menggunakan pelarut n-heksan. Fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba konsentrasi 10, 20, 40% dalam pelarut etanol dioleskan pada pergelangan tangan bagian atas hingga ujung jari dan kemudian dimasukkan ke dalam sangkar nyamuk. Tiap sangkar nyamuk berisi 30 ekor nyamuk *Aedes aegypti* betina berumur 3-5 hari yang telah dipuasakan selama 24 jam. Pengujian dihentikan apabila terdapat hinggapan nyamuk untuk pertama kalinya. Data yang diperoleh berupa rata-rata waktu penolakan terhadap hinggapan nyamuk. Analisa statistik dilakukan terhadap data waktu penolakan menggunakan uji Kruskal-Wallis yang dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney pada taraf kepercayaan 95%. Identifikasi senyawa aktif golongan terpenoid dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba mengandung senyawa aktif golongan terpenoid. Pada konsentrasi 20 dan 40%, fraksi n-heksan tersebut memiliki aktivitas sebagai *repellent* karena dapat menolak hinggapan nyamuk *Aedes aegypti* secara berturut-turut selama 329 dan 915 detik (5,48 dan 15,25 menit).

Kata kunci : *Repellent*, fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba, *Aedes aegypti*

PENDAHULUAN

Angka kejadian penyakit demam berdarah (DBD) meningkat secara dramatis dalam 10 tahun belakangan ini. Demam Berdarah Dengue disebabkan oleh virus dengue yang ditularkan melalui nyamuk *Aedes aegypti* (Satari dan Meiliasari, 2004). Saat ini, belum ada obat atau vaksin yang terbukti efektif mengobati demam berdarah. Salah satu cara untuk mencegah penularan penyakit ini adalah dengan mencegah transmisi virus dengue penyakit yang ditularkan oleh serangga (Misni, dkk., 2008), yaitu dengan menggunakan *repellent* serangga. *Repellent* adalah suatu senyawa yang beraksi secara lokal, atau pada jarak tertentu yang mempunyai kemampuan mencegah antropoda (termasuk nyamuk) untuk terbang, mendarat atau menggigit pada permukaan kulit manusia (Nerio, dkk., 2010). Penularan DBD hanya terjadi melalui gigitan nyamuk *Aedes* yang didalam sungutan ada virus demam berdarahnya (Nadesul, 2007). Hanya jenis betinanya saja yang menghisap darah manusia dan menularkan virus dengue ke dalam tubuh manusia.

Salah satu upaya pencegahan yang dapat dilakukan dalam kehidupan sehari-hari adalah dengan menggunakan bahan alami yang terdapat disekitar kita. Salah satu tanaman

yang bisa digunakan sebagai insektisida adalah tanaman mimba. Salah satu komponen aktif dalam biji dan daun mimba adalah senyawa golongan terpenoid azadirachtin yang diyakini memiliki daya bunuh terhadap serangga (Oesman dan Rukmana, 2002).

Beberapa penelitian terdahulu menyimpulkan bahwa minyak atsiri dan senyawa golongan terpenoid memiliki aktivitas *repellent* terhadap serangga. Ekstrak kulit buah jeruk nipis dalam sediaan lotion dengan konsentrasi 55% mengandung senyawa golongan terpenoid dan dapat menolak nyamuk *Aedes aegypti* selama 36 menit 1 detik (Tesaviani, 2009). Pada penelitian Choi, dkk. (2002), minyak atsiri *Thymus vulgaris* (thyme) memiliki potensi aktivitas repellensia. Pada konsentrasi 0,05%, minyak atsiri tersebut dapat menolak hinggapan nyamuk sebesar 91%. minyak atsiri *T.vulgaris* (thyme) memiliki kandungan 5 monoterpen yaitu thymol, p-cymene, carvacrol, linalool dan α -terpentine. Monoterpen α -terpinene memiliki aktifitas *repellent* yang cukup poten dengan efek perlindungan terhadap hinggapan nyamuk *Culex pipiens pallens* sebesar 97 % pada konsentrasi 0,05 %. Pada penelitian Jebanesan dan Rajkumar (2005), minyak atsiri dari tanaman *Moschosma polystachyum* pada konsentrasi 4% memberikan perlindungan 332,2 menit terhadap gigitan nyamuk *Culex quinquefasciatus*. Minyak atsiri *Solanum xanthocarpum* pada konsentrasi 8% memberikan perlindungan 311,4 menit. Minyak atsiri tersebut mengandung terpenoid yang dapat menghasilkan aktivitas *repellent*. Berdasarkan literatur di atas, penelitian ini mencoba untuk melihat apakah fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba yang diduga kaya akan senyawa aktif golongan terpenoid memiliki aktivitas *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti*, sehingga ekstrak daun mimba diharapkan dapat digunakan sebagai *repellent*.

METODOLOGI

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa : daun mimba (kebun Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta); Nyamuk *Aedes aegypti* betina, umur 3-5 hari (Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta); Soffel® dan bahan kimia lainnya (*pharmaceutical grade*) seperti etanol 70 %, n-heksan, terpineol, toluene, etil asetat, silica gel 60 F₂₅₄, vanilin asam sulfat.

Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan diantaranya adalah : seperangkat alat gelas, *oven automatic thermo controller* (mammert, type: IL-70-110/220 Volt max 3A 50/60), timbangan elektronik (AND GE 600 Japan), stopwatch, aspirator, sangkar nyamuk berukuran 22 x 22 x 22 cm, pengayak serbuk no. 40., water bath (Mammert).

Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman Mimba

Daun mimba diperoleh dari kebun Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Proses determinasi tanaman mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan mengacu pada buku *Flora of Java* karangan Backer dan Van De Brink (1968).

2. Pengumpulan Simplisia

Daun mimba dikumpulkan pada saat daun mimba mulai menua, dengan parameter daun yang berwarna hijau tua. Daun mimba dicuci dengan air sampai bersih

untuk menghilangkan pengotor lain yang melekat pada daun, kemudian ditiriskan agar terbebas dari air cucian (Depkes RI, 1985).

3. Pembuatan Fraksi N-heksan Ekstrak Etanolik Daun Mimba

Daun mimba segar seberat 8,5 kg yang telah bersih, dikeringkan dalam oven dengan pengaturan suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$, selanjutnya diserbuk sehingga didapatkan serbuk halus daun mimba sebanyak 1 kg. Serbuk selanjutnya dimaserasi dengan pelarut etanol 70 %. Sisa pelarut ekstrak etanolik daun mimba dikeringkan dengan cara diuapkan di atas *waterbath* pada suhu 50°C . Ekstrak etanolik kental daun mimba yang didapatkan adalah seberat 187 gram. Selanjutnya, ekstrak kental ini disuspensikan dengan menggunakan air sebanyak 187 mL dan difraksinasi dengan pelarut n-heksan (1:1). Fraksinasi dilakukan sebanyak tiga kali. Fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba yang didapatkan adalah sebanyak 20,12 gram.

4. Uji Aktivitas *Repellent*

Uji aktivitas *repellent* fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba dilakukan dengan metode Fradin dan Day (2002) yang dimodifikasi. Sebelum pengujian, dilakukan penyiapan sangkar nyamuk berukuran (22 x 22 x 22) cm yang berisi 30 ekor nyamuk *Aedes Aegypti* yang berumur 3-5 hari dan telah dipuaskan selama 1 hari. Setiap percobaan menggunakan nyamuk *Aedes aegypti* yang belum pernah dipakai untuk uji aktifitas *repellant* senyawa uji. Data penelitian berupa total waktu penolakan senyawa uji terhadap hinggapan nyamuk *Aedes aegypti* (detik). Tangan yang sudah diolesi senyawa uji dimasukkan ke dalam sangkar nyamuk selama 1 menit setiap 1 menit sampai 20 menit, apabila nyamuk belum ada yang hinggap, maka tangan dimasukkan kembali ke dalam sangkar nyamuk selama 1 menit setiap 15 menit. Apabila nyamuk juga belum ada yang hinggap, maka selanjutnya tangan dimasukkan kembali ke dalam sangkar nyamuk selama 1 menit setiap 1 jam. Dari setiap percobaan tersebut dicatat waktu gigitan pertama kali. Pada penelitian ini, dilakukan replikasi sebanyak tiga kali dan menggunakan 3 orang probandus yang berumur 19-26 tahun.

Kelompok perlakuan (senyawa uji) dibagi menjadi lima kelompok. Kelompok I merupakan kelompok kontrol negatif (KN), kulit punggung telapak tangan probandus hanya diolesi dengan etanol 70 %. Kelompok II adalah kelompok kontrol positif (KP), kulit punggung telapak tangan probandus diolesi dengan lotion Sofel® yang mengandung DEET 13 %. Kelompok III-V merupakan kelompok senyawa uji (F1, F2 dan F3) dengan konsentrasi fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba berturut-turut sebanyak 10%, 20% dan 40%.

5. Identifikasi Senyawa Aktif Golongan Terpenoid

Identifikasi senyawa aktif golongan terpenoid daun mimba dilakukan pada ekstrak etanolik daun mimba dan fraksi n-heksan dengan menggunakan teknik kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam yang digunakan adalah silica gel F₂₅₄ dan sebagai fase gerak digunakan pelarut toluene : etil asetat (93:7). Sebagai penampak bercak digunakan vanillin asam sulfat, sinar UV 254 nm dan 366 nm. Ekstrak etanolik dan fraksi n-heksan mimba dinyatakan mengandung senyawa aktif golongan terpenoid apabila memberikan warna merah violet dengan penampak bercak vanillin asam sulfat. Selanjutnya, nilai R_f pada bercak yang berwarna merah violet ini dihitung (Wagner, 1984). Sebagai pembanding digunakan terpineol.

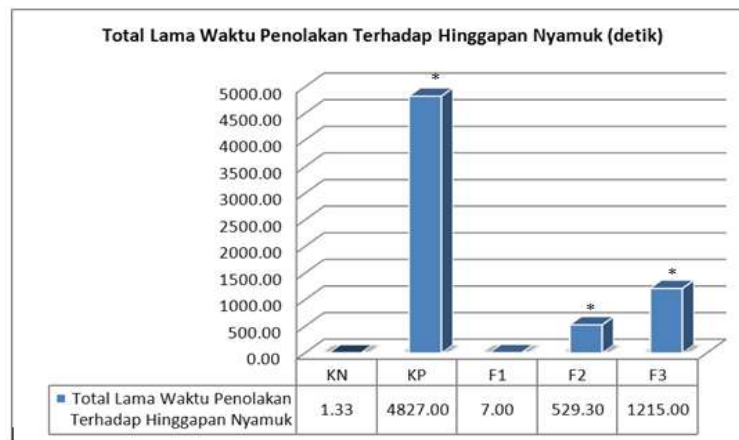
6. Analisa Data

Data penelitian berupa total waktu penolakan senyawa uji terhadap nyamuk yang hinggap (detik) dan profil KLT pada uji identifikasi senyawa aktif golongan terpenoid. Senyawa uji dinyatakan memiliki efek repellent apabila data total lama waktu penolakan terhadap hinggapan nyamuk *aedes aegypti* kelompok senyawa uji lebih lama dibandingkan kelompok kontrol. Uji statistik yang digunakan adalah uji Kruskal-Wallis dan Uji Mann-Withney pada taraf kepercayaan 95%. Data profil KLT pada identifikasi senyawa aktif golongan terpenoid pada ekstrak etanolik dan fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba dibahas secara deskriptif.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas *Repellent* Fraksi n-Heksan Ekstrak Etanolik Daun Mimba

Uji aktivitas *repellent* dari senyawa uji dilakukan dengan mengamati total lama waktu penolakan terhadap hinggap nyamuk pada permukaan tangan probandus. Pada pengujian ini tangan probandus tidak dimasukkan ke dalam sangkar terus menerus, melainkan dengan interval waktu tertentu. Hal ini dikarenakan pemejanan secara terus menerus akan mengakibatkan nyamuk kelelahan serta menginduksi *blockade* dari antenna kemoreseptornya, hal tersebut akan menyebabkan penolakan nyamuk untuk mengigit. Selama pengujian tangan probandus tidak boleh ditambah dengan senyawa uji, tidak boleh dicuci dan tidak boleh melawan apabila ada nyamuk yang akan hinggap. Data total waktu lama penolakan terhadap hinggapan pertama nyamuk *Aedes aegypti* pada tangan naracoba tersaji pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram batang rata-rata total waktu penolakan terhadap hinggapan nyamuk *Aedes aegypti* perlakuan fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba, kontrol negatif dan kontrol positif.

Keterangan :

- * : Hasil uji Mann-Withney menunjukkan perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$)
- KN : Kelompok perlakuan kontrol negatif (perlakuan dengan)
- KP : Kelompok perlakuan kontrol positif (Soffel)
- F1 : Kelompok perlakuan uji (konsentrasi 10%)
- F2 : Kelompok perlakuan uji (konsentrasi 20%)
- F3 : Kelompok perlakuan uji (konsentrasi 40%)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata waktu penolakan terhadap hinggapan nyamuk *Aedes aegypti* yang paling cepat terlihat pada kelompok kontrol negatif, sedangkan yang paling lama dicapai adalah pada kelompok kontrol positif (Soffel[®]), dengan rata-rata total waktu penolakan sebesar 4527 detik (1 jam 15,45 menit). Pada penelitian ini, fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba konsentrasi 20% dan 40% terlihat mempunyai aktifitas *repellent* karena menolak hinggapan nyamuk selama 329,3 detik (5,48 menit) dan 915 detik (15,25 menit). Aktifitas *repellent* fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba jauh lebih kecil dibandingkan dengan Soffel[®] dan perbedaan tersebut bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Peningkatan konsentrasi fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba memperpanjang efek *repellent*, karena dapat memperpanjang waktu penolakan terhadap hinggapan nyamuk *Aedes aegypti*. Hal ini disebabkan karena kandungan senyawa aktif yang lebih tinggi dalam fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba.

Dietiltoluamide (DEET) merupakan *repellent* sintesis yang memiliki spektrum luas dan telah digunakan secara luas di Eropa dan Amerika Serikat setelah diperkenalkan pada tahun 1950-an. Akan tetapi, penggunaan DEET jangka panjang dilaporkan telah menimbulkan berbagai efek samping yang merugikan, diantaranya adalah hipotensi, terganggunya sistem pernafasan, depresi SSP, dan terkadang mengakibatkan kematian. Penggunaan secara topical terkadang dapat menimbulkan reaksi setempat, seperti urtikaria dan kontak dermatitis (Goodyer dan Behrens, 1998). Oleh karena itu, beribu tanaman telah diuji sebagai sumber potensial senyawa *repellent*. Tanaman yang mengandung minyak atsiri dilaporkan mempunyai aktifitas sebagai *repellent* termasuk citronella, pohon pinus, verbena, pennyroyal, geranium, lavender, mimba, buah pinus, dan lain sebagainya (Fradin, 1998).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba memiliki aktivitas *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti* betina dalam kondisi laboratorium. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa, fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba mengandung senyawa aktif golongan terpenoid. Aktifitas *repellent* ekstrak etanolik daun mimba jauh lebih kecil dibandingkan dengan DEET. Hal ini diakibatkan karena senyawa aktif yang bertanggung jawab diduga kuat adalah senyawa golongan terpenoid. Senyawa golongan ini relatif lebih mudah menguap dan cepat hilang dari tempat aplikasi. Seperti halnya aktifitas *repellent* dari minyak atsiri yang umumnya merupakan senyawa monoterpen dan sesquiterpen memiliki aktifitas penolakan terhadap hinggapan nyamuk yang rendah dan efek tersebut relatif cepat hilang. Senyawa monoterpen yang telah terbukti memiliki efek *repellent* terhadap nyamuk diantaranya adalah α -pinen, cineol, eugenol, limonene, terpinolen, citronellol, citronellal, camphor dan timol. Begitu juga dengan senyawa sesquiterpen, seperti β -cariopillen (Nerio, dkk., 2010).

Banyak faktor yang berperan dalam menentukan efektifitas *repellent*, diantaranya adalah frekuensi dan pemakian yang tidak merata, jumlah dan jenis organisme yang akan menggigit, ketertarikan serangga/inthropoda penghisap darah terhadap individu, dan aktifitas calon individu potensial yang akan menjadi korban. Pengikisan oleh pakaian, penguapan dan absorpsi melalui permukaan kulit, tercuci karena keringat atau air hujan, temperatur yang tinggi dan kecepatan aliran angin di lingkungan akan mengurangi efektifitas *repellent*. Saat ini *repellent* yang tersedia harus diaplikasikan pada seluruh area permukaan kulit yang terbuka. Kulit yang tidak terlindungi beberapa centimeter saja dari area yang dioleskan dengan *repellent* dapat diserang oleh nyamuk yang dalam kondisi lapar (Fradin, 1998).

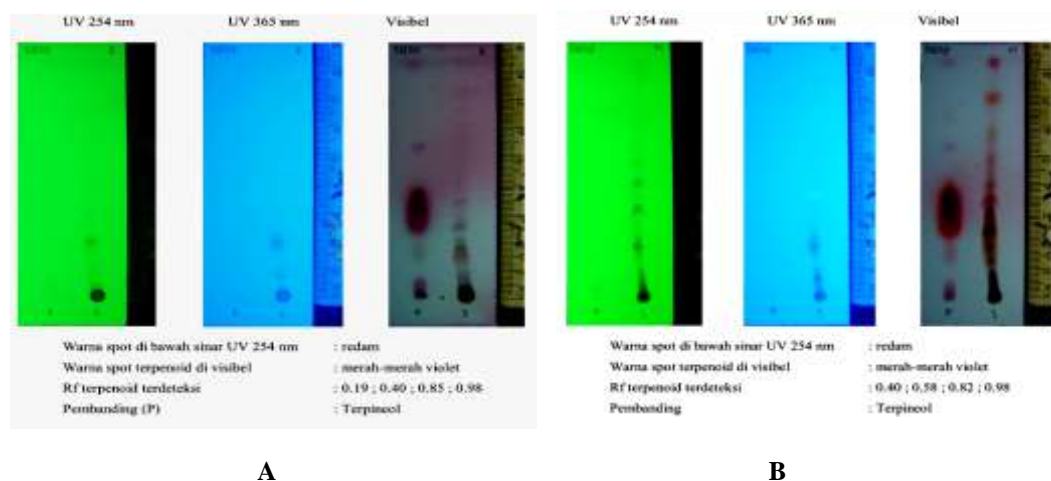
Repellent botani yang lebih lama adalah *soybean oil* dapat memberikan proteksi terhadap nyamuk selama 3,5 jam. Sebuah *repellent* dikatakan ideal apabila *repellent*

tersebut memiliki daya *repellent* terhadap banyak spesies, efektif selama 8 jam, tidak menyebabkan iritasi, tidak bersifat toksis secara sistemik, tidak mudah hilang di kulit, tidak lengket dan tidak meninggalkan bau yang mengganggu (Fradin, 1998).

Identifikasi Senyawa Golongan Terpenoid

Identifikasi senyawa aktif daun mimba dilakukan 2 kali yaitu pada ekstrak etanol daun mimba dan fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam daun mimba yang memiliki potensi sebagai *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti*. Identifikasi senyawa aktif dalam ekstrak etanolik daun mimba dan fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba hanya senyawa terpenoid saja karena yang diduga sebagai *repellent* pada daun mimba.

Identifikasi dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam yang digunakan adalah silikagel 60 F₂₅₄ dan fase gerak campuran toluen dan etil asetat dengan perbandingan 93:7. Pembandingnya menggunakan terpineol dan yang digunakan sebagai penampak bercak adalah pereaksi vanilin asam sulfat. Pengamatan bercak dilakukan di bawah sinar UV 254, 365 nm dan sinar visible (Wagner, 1984). Hasil kromatogram dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kromatogram identifikasi senyawa aktif golongan terpenoid dalam (A) ekstrak etanolik daun mimba, (B) fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba

Hasil kromatogram ekstrak etanolik daun mimba dan fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba di bawah sinar UV 254 nm menunjukkan bercak berwarna hijau kehitaman, dan pada pengamatan di bawah sinar UV 365 nm terlihat bercak berwarna biru muda. Pengamatan bercak di bawah sinar visibel menghasilkan lebih dari satu bercak berwarna merah violet. Warna bercak tersebut menyerupai warna bercak pembanding yang digunakan (terpeneol).

Bercak terpenoid ekstrak etanolik daun mimba terdeteksi dengan nilai Rf pada 0.19 ; 0.40 ; 0.85 ; 0.98. Pada fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba, bercak terpenoidnya terdeteksi dengan nilai Rf sebesar 0.40 ; 0.58 ; 0.82 ; 0.98. Hasil tersebut mendekati bercak terpineol. Hal ini menunjukkan di dalam ekstrak etanolik daun mimba dan fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba terdapat berbagai senyawa terpenoid yang diduga kuat memiliki aktivitas *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti*.

KESIMPULAN

1. Fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba memiliki aktivitas *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti*.
2. Waktu penolakan paling lama yang dimiliki oleh fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba terhadap nyamuk *Aedes aegypti* adalah pada konsentrasi 40% dengan rata-rata waktu 915 detik (15,25 menit).
3. Fraksi n-heksan ekstrak etanolik daun mimba mengandung senyawa aktif golongan terpenoid yang diduga kuat sebagai salah satu senyawa aktif yang bertanggung jawab terhadap aktifitas repellent daun mimba.

DAFTAR PUSTAKA

- Backer, C.A., Van De Brink, R.C.B. 1968, *Flora of Java*. Vol III. Noordhof N.V. Gronigen. The Nether Lands.
- Choi, W.S., Park B.S., Ku S.K., Lee S.E, 2002, Repellent activities of essential oils and monoterpenes againts *Culex pipiens pallens*, *J. Am. Msog. Control. Assoc.* **18** (4): 348-351.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1985, *Cara Pembuatan Simplisia*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Fradin, M.S., 1998, Mosquitoes and Mosquito Repellents: A Clinician's Guide, *Ann Intern Med.* **128** : 931-940.
- Fradin, M.S., dan Day, J.F. 2002. Comparative Efficacy of Insect Repellent against mosquito Bites. *N. Eng. J. Med*, **347** : 13-18.
- Goodyer, L. dan Behrens, R.H., 1998, Short Report : The Safety anf Toxicity of Insect Repellent, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **59**(2), : 323–324
- Jebanesan, A. and Rajkumar, S., 2005, Repellency of volatile oils from *Moschosma polystachyum* and *Solanum xanthocarpum* againts filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say, *Trop. Biomed*, **22** (2) : 139-142.
- Misni, N., Sulaiman, S., and Othman, H., 2008, The Repellent Activity of Piper aduncum Linn (Family: Piperaceae) Essential Oil against *Aedes aegypti* Using Human Volunteers, *J Trop Med Parasitol*, **31**(2) : 63-69.
- Nadesul, H, 2007, *Cara Mudah Mengalahkan Demam Berdarah*, Kompas, Jakarta.
- Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., and Stashenko, E., 2010, Repellent Activity of Essential Oils: A Review, *Bioresour. Technol*, **101** : 372–378
- Oesman, Y., dan Rukmana R., 2002, *Nimba Tanaman Penghasil Pestisida Alami*, Kanisius, Yogyakarta.
- Satari, H. dan Meiliasari, M., 2004, *Demam Berdarah Perawatan di Rumah dan Rumah Sakit.Plus menu*, Puspa swara, Jakarta.
- Tesaviani, K., 2009, *Daya Repelan Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia Swingle)* dalam Sediaan Lotion Terhadap Nyamuk *Aedes aegypti*, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta.
- Wagner, H., 1984, *Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas*, Spinger-Verlag, Berlin Hedelberg New York.