

## Bioaktivitas Larvasida Nyamuk *Anopheles* sp. Dari Ekstrak Bunga *Tagetes erecta* L. Yang Berasal Dari Kota Tomohon

Dina V. Rombot,<sup>1</sup> Mokosuli Y. Samuel.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi, Manado, Sulawesi Utara, Indonesia

<sup>2</sup>Program Studi Biologi FMIPA Universitas Negeri Manado, Tondano, Sulawesi Utara, Indonesia

Email: [yeriamokosuli@unima.ac.id](mailto:yeriamokosuli@unima.ac.id)

**Abstract:** Until now, *Anopheles* sp is a vector of *Plasmodium* sp as a parasite that causes malaria. Global climate change makes the development of the *Anopheles* mosquito unpredictable. Therefore, the use of plants as biological larvicides is an alternative to control the *Anopheles* population. A study aimed at obtaining the phytochemical content of the crude extract of *Tagetes erecta* L. and the toxicity of the extract against larvae of *Anopheles* sp. *Tagetes erecta* flowers are obtained from the city of Tomohon, North Sulawesi which is known as the city of flowers. Mosquito larvae were obtained by rearing method in the biology laboratory of FMIPA, Manado State University. This study applies a laboratory experimental method. Lethal concentration 50 was determined by probit analysis using SPSS IBM 20. The study consisted of the extraction of *Tagetes erecta* flowers using the maceration method, analysis of phytochemical content and toxicity tests of extracts on larvae of *Anopheles* sp. The results showed that the dominant phytochemical groups were alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. The best LC 50 was obtained in ethanol extract, namely 43.073 mg / L.

**Keywords :** Toxicity, Larvae, *Anopheles*, *Tagetes erecta* L.

**Abstrak:** *Anopheles* sp sampai saat ini merupakan vektor *Plasmodium* sp sebagai parasite yang menyebabkan penyakit malaria. Perubahan iklim global menyebabkan perkembangan nyamuk *Anopheles* sulit diprediksi. Oleh karena itu pemanfaatan tumbuhan sebagai larvasida hayati menjadi alternative penanggulangan populasi *Anopheles*. Telah dilakukan penelitian yang bertujuan mendapatkan kandungan golongan fitokimia ekstrak kasar *Tagetes erecta* L dan toksisitas ekstrak terhadap larva *Anopheles* sp. Bunga *Tagetes erecta* di peroleh dari Kota Tomohon Sulawesi Utara yang dikenal sebagai kota bunga. Larva nyamuk diperoleh dengan metode rearing di laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Manado. Penelitian ini menerapkan metode eksperimen laboratorium. *Lethal concentration* 50 ditentukan dengan analisis probit menggunakan SPSS IBM 20. Penelitian terdiri atas tahap ekstraksi bunga *Tagetes erecta* dengan metode maserasi, analisis kandungan golongan fitokimia dan uji toksisitas ekstrak pada larva *Anopheles* sp. Hasil penelitian menunjukkan bahwa golongan fitokimia yang dominan adalah alkaloid, flavonoid, saponin dan tannin. LC 50 terbaik diperoleh pada ekstrak etanol yaitu 43,073 mg/L.

**Kata kunci :** Toksisitas, Larva, *Anopheles*, *Tagetes erecta* L.

### PENDAHULUAN

Tahun 2020 Dinas Kesehatan Sulawesi Utara menargetkan enam daerah di Sulawesi Utara yaitu Bolaang Mgondow Utara, Minahasa, Bolaang Mongondow Selatan, Bolaang Mongondow Timur, Kota Tomohon dan Kota Kotamogabu menda-

patkan status eliminasi malaria. Sedangkan daerah lain di Sulawesi Utara ditargetkan tercapai pada tahun 2021.<sup>1</sup>

*Anopheles* sp sebagai vektor penyakit merupakan titik awal penyebaran penyakit sehingga sangat perlu ditanggulangi. Pengobatan setelah terkena penyakit mala-

ria lebih beresiko dibandingkan dengan tindakan pencegahan yaitu penanggulangan populasi nyamuk malaria pada kawasan domestik. Pengobatan penyakit malaria di Indonesia dengan menggunakan klorokuin telah menimbulkan resistensi sejak tahun 1973; selanjutnya sulfadoksin pirimethamin (SP) juga dilaporkan telah menimbulkan resistensi terhadap *Plasmodium* sehingga tidak efektif lagi digunakan.<sup>2</sup>

Peningkatan resistensi obat malaria mengharuskan adanya alternative penanggulangan vector. Dari berbagai alternatif penanggulangan vector nyamuk, pemanfaatan ekstrak tumbuhan masih merupakan upaya yang memiliki resiko dan efek samping rendah bahkan dapat dikatakan tidak memiliki resiko berbahaya pada manusia.

Kasus resistensi terhadap insektisida pada nyamuk telah banyak dilaporkan di Indonesia. Beberapa laporan penelitian tentang resistensi nyamuk terhadap insektisida : resistensi *Aedes* sp pada insektisida organofosfat di Bayuwangi,<sup>3</sup> resistensi insektisida malathion nyamuk *Aedes aegypti* di Pekalongan,<sup>4</sup> resistensi nyamuk daerah endemis dan non endemis di DIY.<sup>5</sup> Kasus resistensi insektisida sintetik terhadap nyamuk juga dilaporkan terjadi di kota Salatiga dengan resistensi sekitar 16,60-33,30% terhadap insektisida organofosfat. Lebih lanjut, untuk insektisida malathion telah terjadi resistensi sekitar 66-82%.<sup>6</sup> (Boewono et. al. 2006). Dari Kota Bandung dilaporkan resistensi *Ae aegypti* juga terhadap d-*Allethrin*, *Permethrin*, dan *Cypermethrin* dengan LT<sub>90</sub> pada sebaran 9 – 43 jam.<sup>7</sup>

Pengendalian nyamuk dengan pengasapan (*fogging*) yang menjadi program rutin Kementerian Kesehatan, hanya efektif membunuh nyamuk dewasa. Disamping itu membutuhkan biaya yang sangat besar (5 milyar per tahun), menyebabkan resistensi nyamuk serta berdampak negative pada manusia yang menghirup asap.<sup>3</sup> Untuk menekan laju resistensi nyamuk dan mencegah terjadi proses resurgensi sehingga munculnya strain yang tahan insektisida sintetik maka perlu di cari insektisida

alternatif. Sebagai negara tropis Indonesia memiliki budaya etnobotani dan etnomedikal yang berkembang turun temurun yaitu pemanfaatan tumbuhan atau hewan sebagai obat dan insektisida alamiah. Penggunaan insektisida botani berkembang karena mekanisme kerjanya tidak bersifat neurotoksik dan memiliki persisten yang rendah terhadap lingkungan.

Pemanfaatan tumbuhan sebagai insektisida nabati berkembang di daerah tropis didasarkan pada interaksi biologis antara tumbuhan dan serangga. Tumbuhan menghasilkan senyawa tertentu sebagai bentuk pertahanan diri dari serangan mikroba ataupun organisme multiseluler terutama serangga yang menjadi hama. Beberapa tumbuhan yang mengandung senyawa bioaktif insektisida antara lain *Acer rubrum* L. (Aceraceae), betula allenghaniensis Britton (Betulaceae), *Betula papyrifera* Britton, *Caryaa cordiformis* K. *Prunus serotina* Ehrh (Rosaceae).<sup>8</sup>

Sebagai daerah endemis Malaria, masyarakat Minahasa sejak lama telah memiliki dan mengenal dan menggunakan jenis-jenis tumbuhan tertentu sebagai insektisida botani. Untuk menanggulangi nyamuk masyarakat Minahasa telah memanfaatkan Serei ungu (*Cymbopogon citratus*) dan bunga tembelek (*Lantana camara*) sebagai insektisida botani.<sup>9</sup>

Salah satu bunga khas kota Tomohon yang berpotensi sumber bioaktif anti-nyamuk adalah bunga tahi ayam (nama lokal) atau dikenal sebagai *Tagetes erecta*. Sampai saat ini masih sangat terbatas informasi ilmiah eksplorasi *Tagetes erecta* sebagai sumber bioaktif antinyamuk. Disamping itu kandungan bioaktif tumbuhan sangat dipengaruhi dimana tumbuhan itu dibudidayakan. Iklim kota Tomohon dikenal sangat baik untuk budidaya tanaman bunga. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan data kandungan golongan fitokimia ekstrak Bunga *Tagetes erecta* L. Mendapatkan data toksisitas ekstrak kasar Bunga *Tagetes erecta* L. terhadap larva nyamuk *Anopheles* sp sebagai vector malaria.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Laboratorium Kimia FMIPA Universitas Negeri Manado. Penelitian ini berlangsung dari bulan Maret sampai dengan September 2019.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Blender Philips, Neraca analitik merek Kern, Rotavapor *Bunchi* untuk proses evaporasi ekstrak, Corong kaca, Gelas piala, Corong pisah, Vial-vial kosong, Tabung reaksi, Rak tabung reaski, Hot plate, Mikropipet *eppendorf* 1000-100  $\mu$ l, Gelas ukur, Lampu, Kertas saring whatman 04, Alat tulis menulis, Kamera, dan lain-lain.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu bunga *Tagetes erecta* L. (*Tagetes erecta* L.), metanol PA merck, klorofom PA merck etanol teknis Kimia Farma, air bebas ion, pereaksi Dragendorff, pareaksi Mayer's, pareaksi Wagner, HCL, logam Mg, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, anhidrida asetat, plat KLT silika gel F254 merk.

Variabel penelitian terdiri dari variabel bebas yaitu bunga *Tagetes erecta* L. (*Tagetes erecta* L.), dan variabel terikat berupa toksisitas ekstrak terhadap larva *Anopheles sp.*



**Gambar 1.** Bunga *Tagetes erecta* L.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen laboratorium dengan menggunakan analisis probit untuk menentukan LC50. Penelitian terdiri atas beberapa tahapan.

### Penangkapan Nyamuk di Lapangan dan Pemeliharaan di Laboratorium

Teknik penangkapan nyamuk di lapangan menggunakan metode Widiarti et.

al. (2005) yang dimodifikasi.<sup>10</sup> Nyamuk diperoleh dari habitat alamnya antara lain daerah saluran air pemukiman sekitar pemukiman penduduk, daerah rawah yang sedikit intensitas cahaya mahatari. Nyamuk dewasa yang diperoleh dengan teknik tangkapan langsung diidentifikasi kedudukan spesiesnya menggunakan buku determinasi nyamuk Reid (1968).<sup>11</sup> Penangkapan nyamuk dilakukan pada pagi haru pukul 05,00–07.00 Wita, Nyamuk dipelihara di laboratorium sampai menghasilkan generasi pertama (F1). Generasi pertama jentik instar IV digunakan untuk uji toksisitas ekstrak.

Pemeliharaan nyamuk secara individual dengan diletakkan secara terpisah untuk bertelur. Telur yang menetas menjadi jentik, dipindahkan ke tempat pemeliharaan berupa nampan yang berukuran panjang 26 cm dan lebar 15 cm. Jentik diberi makanan berupa makanan pelet ikan. Larva nyamuk *Anopheles sp* stadium 3 dan stadium 4 digunakan untuk uji toksisitas. Nyamuk dewasa diberi makan berupa serbuk campuran bekatul dan daging dengan perbandingan 10:4 sebanyak 75 mg-200 mg.<sup>10</sup>

### Eksraksi bunga *Tagetes erecta* L.

Eksraksi dilakukan dengan metode maserasi.<sup>12,13</sup> Bunga *Tagetes erecta* diperoleh dari Kakaskasen 2 Tomohon. Bunga yang telah dicuci bersih selanjutnya keringanginkan dalam ruangan (pada suhu kamar). Setelah kering dengan kadar air 5%, diblender halus kemudian dimaserasi bertingkat menggunakan pelarut etanol, methanol pa dan chloroform pa. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Perbandingan pelarut dengan simplisia adalah 1:4 atau 50gr simplisia bunga *Tagetes erecta* L. di ekstraksi dengan 200ml pelarut. Filtrat yang diperoleh selanjutnya di rotary evaporator untuk memperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental selanjutnya dilabel sebagai ekstrak etanol bunga *Tagetes erecta* Ampas yang diperoleh dilanjutkan dengan maserasi menggunakan pelarut methanol pa selama 1x 24 jam. Setelah 24 jam, maserat disaring yang diperoleh selanjutnya di

rotary evaporator untuk memperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental selanjutnya dilabel sebagai ekstrak methanol bunga *Tagetes erecta*. Ampas hasil ekstraksi dengan pelarut methanol dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan clorform pa dengan prosedur yang sama. Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya dilabel sebagai ekstrak clorform. Eksrak disimpan pada referigrator.

### Analisa Fitokimia

Analisis kandungan golongan fitokimia dilakukan menggunakan metode Harborne (1996).<sup>12</sup> Golongan fitokimia yang dianalisis yaitu alkaloid, samponin, flavonoid, tannin, steroid, dan triterpenoid.

### Uji Aktivitas Lavasida Ekstrak

Larva *Anopheles sp* sebagai hewan uji sasaran, menurut Tarumingkeng (1992) larva *Anopheles sp* memiliki integumen yang mudah rusak sehingga untuk pengujian toksisitas ini metode yang digunakan adalah metode celup (dipping method), yaitu hewan uji dicelupkan atau dimasukkan ke dalam larutan ekstrak, pada suhu kamar. Uji toksisitas dilakukan dengan modifikasi metode uji toksisitas.<sup>13,14</sup> Masing masing vial uji berisi 10 ekor larva *Anopheles sp*.

### Analisis Data

Data hasil ekstrak tanaman dianalisis deskriptif. Data hasil uji larvasida dianalisis probit menggunakan SPSS IBM 20 untuk menentukan nilai LC<sub>50</sub> ekstrak.

## HASIL PENELITIAN

### Ekstraksi

Ekstrak etanol berwarna kuning cerah, ekstrak methanol berwarna kuning gelap sedangkan ekstrak chloroform berwarna kuning kecoklatan. Ekstrak memiliki bau khas bunga *Tagetes erecta* L. Rendemen tertinggi yaitu 5,42 gr sedangkan rendemen terendah ditemukan pada ekstrak chloroform yaitu 2,15 gr (Tabel 1).

**Tabel 1.** Rendemen ekstrak bunga *Tagetes erecta* L.

No	Ekstrak	Berat rendemen (gr)
1	BTMet1	4,55
	BTMet2	3,43
	BTMet3	5,42
2	BTClr1	2,86
	BTClr1	2,15
	BTClr1	3,12

Keterangan :

BTMet = bunga tahi ayam ekstrak methanol; BTClr = bunga tahi ayam ekstrak cloroform

### Analisis Fitokimia

Ekstrak methanol bunga *Tagetes erecta* L. menunjukkan kandungan flavonoid dalam konsentersasi yang tinggi. Selain flavonoid, ekstrak methanol juga ditemukan kandungan alkaloid, saponin dan steroid dalam konsentersasi yang cukup tinggi. Kandungan tannin ditemukan dalam konsentersasi yang rendah. Ekstrak cloroform bunga *Tagetes erecta* L. juga menunjukkan kandungan flavonoid yang tinggi akan tetapi kandungan alkaloid yang rendah. Kandungan saponin, steroid dan triterpenoid tergolong tinggi sedangkan kandungan tannin negative (Tabel 2).

**Tabel 2.** Hasil analisis kandungan fitokimia ekstrak bunga *Tagetes erecta* L.

No.	Kandungan Golongan Fitokimia*	Ekstrak	
		BTMet	BTClr
1	alkaloid	+++	++
2	flavonoid	+++	++
3	saponin	+++	++
4	tanin	+	-
5	steroid	++	+++
6	triterpenoid	-	-

\*Keterangan:

(-): indikator menunjukkan senyawa tidak terdeteksi.  
(+, ++, +++): indikator tntensitas warna atau jumlah endapan yang terbentuk

BTMet = bunga tahi ayam ekstrak methanol  
BTClr = bunga tahi ayam ekstrak cloroform

### Uji toksisitas ekstrak pada Larva nyamuk (*Anopheles spp*).

Ekstrak kasar bunga *Tagetes erecta* L. dibuat dalam beberapa sebaran konsentersasi

yaitu 10 ppm, 100 ppm, 500 ppm dan 1000 ppm. Metode uji toksisitas ini didasarkan pada Metode McLaughlin (1996)<sup>14</sup> untuk uji hayati, yang dimodifikasi. Kematian larva tertinggi ditunjukkan pada konsentrasi uji tertinggi yaitu 1000 ppm baik pada ekstrak methanol maupun ekstrak kloroform (Tabel 3)

## BAHASAN

Kematian larva dapat disebabkan oleh senyawa toksik yang tidak dapat dibiotransformasi oleh larva *Anopheles* sp sehingga menyebabkan sitotoksik dan kematian larva. Toksisitas kandungan

**Tabel 3.** Mortalitas Larva Nyamuk *Anopheles* sp setelah pemberian ekstrak 12 jam

Jenis Ekstrak	Kosentrasi (ppm)	Larva instar IV <i>Anopheles</i> sp yang mati			LC <sub>50</sub> (ppm)
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
Etanol	1000	10	10	10	LC <sub>50</sub> = 43.0730
	500	9	9	9	
	100	8	9	7	
	10	5	4	4	
Kloroform	1000	10	9	10	LC <sub>50</sub> = 120.420
	500	9	7	7	
	100	6	4	2	
	10	4	2	1	

Hasil uji larvasida menunjukkan adanya perbedaan jumlah larva *Anopheles* sp yang mati pada berbagai sebaran konsentrasi. Tampak adanya peningkatan jumlah larva *Anopheles* sp mati seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak bunga *Tagetes erecta* L. Ekstrak etanol bunga *Tagetes erecta* L. menunjukkan aktifitas antilarva nyamuk *Anopheles* yang sangat kuat. Dengan nilai LC<sub>50</sub> yang tergolong kecil yaitu 40,073 ppm. Semakin rendah konsentrasi maka semakin baik. LC<sub>50</sub> ekstrak kloroform yaitu 120,42 ppm hampir dua kali dari LC<sub>50</sub> ekstrak etanol. Etanol sebagai pelarut polar mampu mengekstrak senyawa-senyawa seperti karbohidrat, protein, tanin, flavonoid, terpenoid.<sup>13,15</sup>

Monoterpen, sesquiterpen, diterpen, triterpen, sterol, flavonoid, thiophenes, dan senyawa aromatik, yang masuk dalam golongan terpenoid merupakan senyawa

senyawa metabolit sekunder pada ekstrak bunga *Tagetes erecta* L. ini memberi efek toksik pada larva yang terlihat melalui gejala-gejala subletal hingga kematian larva. Dinding sel larva yang masih sangat tipis memungkinkan difusi senyawa toksik ke dalam sel. Berdasarkan tabel di atas dapat dilihat nilai mortalitas larva untuk nyamuk *Anopheles* sp. sebesar 50% pada larva uji ditemukan pada dosis 100 ppm. Dengan demikian, dosis ini menjadi acuan untuk menentukan kisaran-kisaran interval dosis yang digunakan pada uji toksisitas lanjutan.

aktif yang dilaporkan ada pada bunga *Tagetes erecta* L.<sup>12,15</sup> Aroma pada bunga *Tagetes erecta* disebabkan oleh kandungan senyawa sesquiterpenoid dan monoterpenoid. Monoterpen dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan tanaman pesaing dan memiliki aktivitas insektisida terhadap hewan tingkat tinggi.<sup>16</sup>

Pada metamorphosis serangga, instar adalah salah satu tahapan/fase perkembangan (Andriani 2008). Fase instar 4, merupakan tahap atau fase akhir sebelum menjadi nyamuk dewasa sehingga memiliki daya tahan paling tinggi. Selain itu, ukuran larva nyamuk *Anopheles spp* instar-4 lebih besar sehingga lebih mudah dalam perhitungan mortalitas.

Beberapa penelitian tentang aktivitas ekstrak tumbuhan sebagai larvasida antara lain ekstrak etanol daun kenikir dapat mengakibatkan kematian larva ulat daun kubis. Konsentrasi yang dapat membunuh

50% larva ulat daun kubis (LC50) adalah konsentrasi 2.45%).<sup>17</sup> Ekstrak kayu Jati dengan LC50 9,69 µg/ml, efektif sebagai larvasida jentik nyamuk *A. aegypti*.<sup>18</sup> Beberapa tanaman lain yang dilaporkan memiliki aktivitas larvasida nyamuk yaitu Minyak atsiri daun Jukut (*Hyptis suaveolens*),<sup>18</sup> ekstrak air dari tanaman *Piper retrofractum*,<sup>19</sup> ekstrak daun *Annona muricata*,<sup>18,19</sup> ekstrak tanaman *Origanum onites*<sup>20</sup> dan minyak tumbuhan yang berasal dari tanaman (*Camphor, Thyme, Amyris, Lemon, Cedarwood, Frankincense, Dill, Myrtle, Juniper, Black Pepper, Verbena, Helichrysum and Sandalwood*) memiliki bioaktivitas sebagai larvasida nyamuk.<sup>18,19,20</sup> Hasil penelitian ini membuktikan potensi yang sangat kuat dari ekstrak bunga *Tagetes erecta* yang berasal dari Tomohon, Sulawesi Utara sebagai sumber bioaktif larvasida nyamuk.

#### SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kandungan golongan fitokimia yang dominan pada ekstrak bunga *Tagetes erecta* L. adalah alkaloid, flavonoid, saponin dan tannin. LC50 terbaik pada ekstrak kloroform yaitu 40,070 ppm

#### Ucapan Terima Kasih

Disampaikan terima kasih kepada pimpinan laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Manado yang telah mengijinkan penggunaan laboratorium.

#### Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam studi ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Enam daerah di Sulawesi Utara berhasil tekan kasus malaria. Manado: Antaranews, 11 Oktober 2019. Available from: <https://manado.antaranews.com/berita/68228/enam-daerah-disulawesi-utara-berhasil-tekan-kasus-malaria>.
2. Baskoro T, Nalim S. Pengendalian Nyamuk Penular Demam Berdarah Dengue di Indonesia. Makalah disampaikan dalam Simposium Demam Berdarah Dengue. Yogyakarta, 16 Mei 2007. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada, 2007.
3. Yudhana A, Praja RN, dan Yunita MN. Deteksi Gen Resisten Insektisida Organofosfat pada *Aedes aegypti* di Banyuwangi, Jawa Timur Menggunakan Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Veteriner*. 2017; 18(3):446-52.
4. Widiastuti D and Ikawati B. Resistensi Malathion dan Aktivitas Enzim Esterase pada Populasi Nyamuk *Aedes aegypti* di Kabupaten Pekalongan. *Balaba*, 2016;12(2):: 47-57.
5. Windyaraini DH., Giyantolin, Maulidi IS, Marsifah T. Kepadatan dan Penyebaran Serta Status Resistensi Nyamuk (Diptera: Culicidae) dari Daerah Endemis dan Non Endemis DBD di Wilayah DIY. *Majalah Ilmiah Biologi Biosfera*. 2019; 36(1):19–25.
6. Astari S dan Ahmad I. Insecticide Resistance and Effect of Piperonyl Butoxide as a Synergist in Three Strain of *Aedes aegypti* (Linn) (Diptera: Culicidae) on Insecticide Permethrin, Sypermethrin, and d-Allethrin. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 2005;33(2):73–9.
7. Omar S. Phytochemical discovery of antifeedant, antimicrobial and antimalarial principles. [Dissertation]. School of Graduate Studies and Research, University of Ottawa, Canada. 2000.
8. Kaunang ENS, Mokusuli YS. Botanical and phytochemical constituents of several medicinal plants from mount Klabat north Minahasa. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 2017;5(2):29-35
9. Utari D dan Kusuma D. Identifikasi Fraksi Daun Zodia (*Evodia Suaveolens*) yang Aktif sebagai Insektisida Botani terhadap Larva *Aedes Aegypti* [Tesis]. Bogor:

- Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. 2007.
10. Repi RA, Mokosuli YS, Worang RL, Roring VIY. Malaria Mosquito Bionomic And Local Plant Extract Bioprospecting As Botanical Insecticide In Southeast Minahasa. *Journal of Natural Sciences Research*. 2013;3(14):38–50.
  11. Reid JA. *Anopheles mosquitoes of malaya and Borneo*. Kuala Lumpur: Studies from the Institute for Medical Research Malaysia, 1968.
  12. Harborne JB.. *Metode Fitokimia, Penuntun dan cara modern menganalisis tumbuhan*. Alih bahasa: Padmawinata K, Soediro I. Bandung:Penerbit ITB, 1996.
  13. Mokosuli YS. *Aktivitas antioksidan dan antikanker ekstrak kulit batang langsung [Tesis]*. Bogor: Pascasarjana Intitut Pertanian Bogor, 2008.
  14. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols Dj, McLaughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*. 1996;45:31-4.
  15. Pethuan S, Jirakanjanakit N, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Kaewpa D, Rongnoparut P. Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Tropical Biomedicine*, 2007;24(1):7–15
  16. Ndiha BBA. *Tagetes sebagai salah satu sumber lutein*. Program Pascasarjana Universitas Kristen Satyawacana Available from: <http://jurnalits-ntt.blogspot.com> [Disitasi Juni 2020]
  17. Mourya DT, Gokhale SC, Mahadev PV, and Baneerje K. Insecticide susceptibility status of certain populations of *Aedes aegypti* mosquito from rural areas of Maharashtra state. *Indian Journal of Medical Research*. 1993;97:87–91.
  18. Marduhusodo SJ. *Microplate assay analysis of potential for organophosphate insecticide resistance in Aedes aegypti in the Yogyakarta Municipality Indonesia*. *Berkala Ilmu Kedokteran* 1995;27(2):71-9
  19. Jamaluddin A. *Pengaruh jenis insektisida terhadap kerentanan vektor nyamuk Anopheles spp di kota batam Tahun 2010*. [Tesis] Medan: Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara, 2010.
  20. Nugraha DR. *Ekstrak Kayu Jati (Tectona grandis L.F) Sebagai Bio-Larvasida Jentik Nyamuk Demam Berdarah (Aedes aegypti)*. [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kehutanan IPB, 2011.