

# EFEKTIVITAS EKSTRAK BIJI KELOR (*Moringa oleifera*) TERHADAP LARVA *Aedes aegypti* DAN *Culex sp.* INSTAR III/IV

Yosefania E.D.P. Markus, S.M.J.Koamesah, Idawati Trisno

## ABSTRAK

Penggunaan larvasida sintetik dalam waktu lama dapat menyebabkan terbentuknya strain nyamuk yang resisten. Usaha yang dilakukan untuk mengatasi resistensi vektor terhadap larvasida adalah menggunakan larvasida nabati yang terbuat dari tumbuhan yang lebih ramah lingkungan dan lebih mudah terurai di alam. Biji kelor (*Moringa oleifera*) mengandung metabolit sekunder seperti tanin, saponin dan alkaloid yang dapat berperan dalam kematian larva. Spesies nyamuk yang digunakan adalah *Aedes aegypti* dan *Culex sp.* yang merupakan vektor dari beberapa penyakit endemis dan penyakit yang diabaikan di Indonesia, yaitu Demam Berdarah (*Aedes aegypti*) dan Filariasis (*Culex sp.*). kedua penyakit ini masih memiliki angka prevalensi yang tinggi di Indonesia. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efektifitas biji kelor sebagai larvasida pada larva nyamuk *Aedes aegypti* dan *Culex sp.* Metode yang digunakan ekstrak biji kelor dibuat menggunakan pelarut aquades dengan teknik infundasi. Uji perlakuan fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dari ekstrak biji kelor. Digunakan 480 ekor larva instar III/IV dari setiap spesies nyamuk yang dibagi dalam 6 kelompok perlakuan, (kelompok kontrol positif dengan abate 0,02 ppm, kelompok ekstrak biji kelor 750 ppm, 1000 ppm, 1250 ppm, 1500 ppm, dan 1750 ppm). Pengamatan akan dilakukan selama 48 jam dengan 4 kali pengulangan. Hasil penelitian ini pada uji fitokimia didapatkan ekstrak biji kelor mengandung alkaloid, saponin, triterpenoid, dan tanin (dalam jumlah sedikit). Rata-rata kematian larva yang paling tinggi ditemukan pada konsentrasi 1750 ppm yaitu 4,5 larva *Aedes aegypti* dan 3,5 larva *Culex sp.*. Hasil analisis Kruskal Wallis menunjukkan bahwa ekstrak biji kelor efektif sebagai larvasida untuk *Aedes aegypti* ( $p=0,004$ ) dan *Culex sp.* ( $p=0,001$ ). Pada analisis probit didapatkan bahwa  $LC_{50}$  dari ekstrak terhadap *Aedes aegypti* adalah 4618 ppm, dan untuk *Culex sp.* 5242 ppm. Kesimpulan ekstrak biji kelor efektif sebagai larvasida nabati pada larva *Aedes aegypti* dan *Culex sp.*

*Kata Kunci* : Biji kelor, *Aedes aegypti*, *Culex sp.*, Larvasida nabati

Penyakit yang ditularkan oleh vektor menyumbang 17% dari penyakit menular di seluruh dunia, dengan 700.000 kematian setiap tahunnya<sup>(1)</sup>. Beberapa spesies nyamuk yang diketahui membawa penyakit adalah *Aedes aegypti* dan *Culex sp.*<sup>(1)</sup>. *Aedes aegypti* merupakan vektor dari penyakit Demam Berdarah (DBD) yang menjadi penyakit endemis di Indonesia sejak 1968<sup>(2)</sup>. Nusa Tenggara Timur (NTT) memiliki *Incidence Rate* yang memasuki tiga terendah di Indonesia, akan tetapi memiliki *Case Fatality Rate (CFR)* yang menduduki posisi tiga tertinggi<sup>(2)</sup>. Ditemukan 2.986 kasus DBD pada tahun 2013 di NTT. Jumlah kasus yang ditemukan menurun pada 2014, yaitu

sebesar 487 kasus, dan kembali meningkat pada tahun 2015 menjadi 665 kasus. Kasus DBD tertinggi ditemukan di Kota Kupang, yaitu >100 kasus<sup>(3)</sup>. *Culex sp.* sendiri merupakan vektor dari penyakit filariasis limfatik yang merupakan penyakit yang diabaikan. Pada 2014, filariasis menyerang 1.103 juta orang di 73 negara berisiko<sup>(4)</sup>. Filariasis menyebar di 34 provinsi di Indonesia, dengan provinsi dengan kasus klinis filariasis terbanyak adalah NTT (2.864 orang), dan terendah adalah Bali (18 orang) pada 2015<sup>(4)</sup>. Pencegahan penyakit di atas melalui eliminasi vektor dilakukan dengan Pencegaha Vektor Terpadu (PVT)<sup>(5,6)</sup>. Penggunaan abate sebagai pencegahan secara kimiawi sudah

diterapkan di Indonesia sejak tahun 1976<sup>(7)</sup>. Abate mengandung temephos 1% yang merupakan jenis organofosfat. Dampak penggunaan abate secara terus-menerus dapat menimbulkan resistensi<sup>(7)</sup>. Masalah resistensi inilah yang mendorong peneliti untuk mencari alternatif larvasida yang ideal untuk pengendalian vektor, terutama yang terbuat dari bahan alami yang efektif, efisien, ramah lingkungan dan tidak memberikan efek toksisitas terhadap organisme non target<sup>(8,9)</sup>. Bahan alami yang merupakan bagian dari tumbuhan ini mengandung unsur metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin yang dapat menimbulkan efek toksik pada larva, dengan keunggulan lebih mudah terurai di alam<sup>(10)</sup>. Peneliti tertarik untuk menggunakan biji tumbuhan kelor (*Moringa oleifera*) sebagai bahan larvasida. Alasan peneliti tertarik menggunakan tumbuhan ini adalah karena merupakan salah satu tumbuhan khas NTT, dan juga menurut penelitian yang dilakukan oleh Ohia Chinyenwa pada tahun 2017, disebutkan biji kelor mengandung metabolit sekunder seperti yang disebutkan di atas yang mampu menjadi senyawa aktif untuk membunuh larva nyamuk<sup>(11)</sup>.

## METODELOGI PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan rancangan *post test only group design* dengan menggunakan 480 ekor larva yang dibagi dalam 6 kelompok perlakuan. Satu kelompok kontrol positif dengan menggunakan abate dengan konsentrasi 100 ppm, dan lima kelompok lainnya digunakan konsentrasi bertingkat ekstrak biji kelor dari 750 ppm, 1000 ppm, 1250 ppm, 1500 ppm, dan 1750 ppm. Larva yang digunakan adalah larva *Aedes aegypti* dan *Culex sp.* instar III/IV, yang didapatkan dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Nusa Cendana.

Dalam pembuatan ekstrak biji kelor, digunakan teknik infundasi yaitu dengan pemanasan. Pelarut yang digunakan adalah aquades. Dilakukan pengamatan pada larva nyamuk selama 48 jam setelah perlakuan

dengan ekstrak maupun abate, dan dilakukan replikasi sebanyak 4 kali.

## HASIL DAN PEMBAHASAN.

### Hasil Simplisia

Biji kelor yang digunakan sebagai bahan dasar pembuatan ekstrak dikumpulkan dari beberapa lokasi di Kota Kupang. Buah kelor yang dikumpulkan lalu dikupas dan bijinya dikumpulkan. Dilakukan pengupasan dari lambung biji sehingga didapatkan biji bersih. Biji kelor selanjutnya diangin-anginkan lalu dilakukan pemanasan di oven dengan suhu 105<sup>0</sup>C selama dua jam. Selanjutnya biji dihaluskan menggunakan blender dan dihasilkan simplisia. Simplisia yang didapatkan adalah sejumlah 1000 gram.

### Ekstraksi

Simplisia yang dimiliki selanjutnya dicampurkan dengan pelarut aquades, dengan perbandingan 1:3 untuk simplisia berbanding pelarut. Simplisia yang digunakan sebanyak 220 gram dan pelarut 660 ml. Larutan biji kelor lalu dipanaskan menggunakan hotplate dengan suhu 90<sup>0</sup>C selama 2 jam. Inilah yang disebut teknik infundasi. Setelah pemanasan, dilakukan pemisahan ampas dari larutan. Larutan yang sudah dipisahkan lalu dipekatkan menggunakan *rotatory evaporator* dan menghasilkan 50 gram simplisia.

### Uji Fitokimia

Hasil yang didapatkan untuk kandungan metabolit sekunder dari ekstrak biji kelor adalah

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia

No	Metabolit Sekunder	Hasil	Keterangan
1	Flavonoid	-	Negatif
2	Alkaloid	+++	Positif Kuat
3	Triterpenoid	+++	Positif Kuat
4	Saponin	+++	Positif Kuat
5	Tanin	+	Positif Lemah

Berdasarkan hasil di atas, diketahui zat aktif yang ditarik secara maksimal adalah alkaloid, triterpenoid, dan saponin. Sedangkan metabolit sekunder yang tidak ditarik oleh pelarut aquades adalah flavonoid. Akan tetapi karena uji ini uji kualitatif, maka tidak dapat diketahui metabolit mana yang mendominasi dan menjadi zat utama dalam membunuh larva nyamuk.

### Hasil Deskriptif

Kematian dari larva nyamuk *Aedes aegypti* dan *Culex sp.* setelah 48 jam perlakuan dengan 4 kali replikasi adalah :

Tabel 2. Jumlah Kematian Larva *Aedes aegypti* Instar III/IV

Replikasi	Kelompok					
	K1 <sub>x</sub>	K1 <sub>a</sub>	K1 <sub>b</sub>	K1 <sub>c</sub>	K1 <sub>d</sub>	K1 <sub>e</sub>
1	20	1	3	2	2	4
2	20	1	1	3	2	5
3	20	1	3	3	3	4
4	20	1	2	3	4	5
Jumlah	80	4	9	11	11	18
Rata-rata Presentase (%)	20	1	2,25	2,75	2,75	4,5
	100	5	11,25	13,75	13,75	22,5

Berdasarkan tabel 2 ditemukan kelompok perlakuan dengan jumlah kematian larva *Aedes aegypti* instar III/IV terbanyak adalah K1<sub>x</sub>, yaitu kelompok kontrol positif yang diberikan abate. Untuk kelompok perlakuan menggunakan ekstrak biji kelor, kematian terbanyak terdapat pada

K1<sub>e</sub> yaitu 22,5%. Sedangkan kelompok dengan kematian terendah adalah K1<sub>a</sub> yaitu 5%.

Tabel 3. Jumlah Kematian Larva *Culex sp.* Instar III/IV

Replikasi	Kelompok					
	K2 <sub>x</sub>	K2 <sub>a</sub>	K2 <sub>b</sub>	K2 <sub>c</sub>	K2 <sub>d</sub>	K2 <sub>e</sub>
1	20	1	2	2	3	3
2	20	1	1	1	2	4
3	20	2	2	2	1	3
4	20	1	1	2	4	4
Jumlah	80	5	6	7	10	14
Rata-rata Presentase (%)	20	1,25	1,5	1,75	2,5	3,5
	100	6,25	7,5	8,75	12,5	17,5

Menurut tabel jumlah kematian larva *Culex sp.* jumlah kematian terbanyak pada kelompok kontrol positif (K2<sub>x</sub>), yang diberikan abate, yaitu 100%. Sedangkan untuk kelompok perlakuan ekstrak biji kelor, jumlah kematian terbanyak terdapat pada kelompok K2<sub>e</sub> dengan 17,5%, dan kematian terendah adalah kelompok K2<sub>a</sub> yaitu 6,25%.

### Uji Kruskal-Wallis

Uji hipotesis digunakan uji non parametrik Kruskal Wallis, karena uji normalitas Kolmogorov Smirnov menunjukkan hasil data tidak terdistribusi normal dan melalui uji Levene ditemukan data tidak homogen. Hasil dari uji Kruskal Wallis adalah :

Tabel 4. Hasil Uji Kruskal-Wallis

	Asymp. Sig
Larva <i>Aedes aegypti</i>	0,004
Larva <i>Culex sp.</i>	0,001

Keterangan:  $\alpha=0,05$

Dari hasil di atas, dapat dilihat bahwa nilai p dari kedua data <0,05 sehingga H<sub>0</sub> dapat ditolak dan H<sub>1</sub> dapat diterima. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak

biji kelor efektif sebagai larvasida nabati pada larva nyamuk *Aedes aegypti* dan *Culex sp.*

Hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antar kelompok uji. Namun uji Kruskal-Wallis belum menunjukkan kelompok mana yang mempunyai perbedaan nilai yang lebih signifikan. Sehingga dilakukan analisis *Post Hoc*. Analisis menggunakan uji Mann-Whitney.

Tabel 5. Hasil Uji Mann-Whitney

				Asymp. Sig. (2- tailed)
<i>Aedes aegypti</i>	Kematian Larva 48 jam	K1 <sub>x</sub> VS	K1 <sub>a</sub>	0,008
			K1 <sub>b</sub>	0,013
			K1 <sub>c</sub>	0,011
			K1 <sub>d</sub>	0,013
			K1 <sub>e</sub>	0,013
<i>Culex sp.</i>	Kematian Larva 48 jam	K2 <sub>x</sub> VS	K2 <sub>a</sub>	0,011
			K2 <sub>b</sub>	0,013
			K2 <sub>c</sub>	0,011
			K2 <sub>d</sub>	0,014
			K2 <sub>e</sub>	0,013

Keterangan:  $\alpha=0,05$

### Analisis Probit

Analisis probit dilakukan untuk mencari konsentrasi yang dapat membunuh sejumlah larva dalam suatu populasi (Lethal Concentration). Dalam penelitian ini, dicari LC<sub>50</sub> dan LC<sub>90</sub> dari ekstrak biji kelor terhadap kedua spesies nyamuk. Hasil perhitungan ditampilkan pada tabel di bawah ini.

Tabel 6. Hasil Analisis Probit

Spesies Nyamuk	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi Ekstrak		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
<i>Aedes aegypti</i>	0,500	4618,964	.	.
	0,900	20116,662	.	.
<i>Culex sp.</i>	0,500	5242,507	.	.

0,900 21162,526 . .

Berdasarkan hasil diatas diketahui bahwa LC<sub>50</sub> dari ekstrak biji kelor terhadap *Aedes aegypti* adalah 4618 ppm, dan terhadap *Culex sp.* adalah 5242 ppm.

### PEMBAHASAN

Cara kerja larvasida dalam membunuh larva nyamuk dapat melalui kontak dengan integumen larva. Larvasida akan masuk menembus integumen, trakea atau kelenjar sensorik dan organ lain yang berhubungan dengan kutikula serangga. Bahan kimia yang berada dalam ekstrak akan melarutkan lemak pada kutikula sehingga bahan aktif pada ekstrak akan dapat menembus tubuh larva<sup>(12)</sup>.

Berdasarkan hasil dari analisis data, diketahui bahwa ekstrak biji kelor secara signifikan memberikan pengaruh pada kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* dan *Culex sp.*. Dapat diketahui, melalui uji fitokimia yang dilakukan bahwa ekstrak biji kelor dengan menggunakan pelarut aquades mengandung metabolit sekunder alkaloid, triterpenoid, saponin, dan tanin. Sedangkan tidak ditemukan flavonoid pada ekstrak biji kelor dengan aquades.

Alkaloid bertindak sebagai racun perut dan racun kontak. Alkaloid berupa garam, sehingga dapat mendegradasi membran sel saluran pencernaan untuk masuk ke dalam dan merusak sel. Alkaloid juga berpengaruh pada kerja sistem saraf larva dengan menghambat kerja enzim asetilkolinesterase. Enzim ini tidak dapat bekerja sehingga terjadi hipereksitasi, dalam wujud gerakan yang tidak dapat dikendalikan<sup>(13)</sup>. Terjadinya perubahan warna pada tubuh larva sehingga menjadi lebih transparan dan gerakan tubuh yang melambat jika diberikan rangsangan sentuhan dapat disebabkan oleh senyawa alkaloid<sup>(14)</sup>

Saponin berdasarkan uji fitokimia berada banyak dalam ekstrak biji kelor. Ini

dilihat dengan terbentuknya busa pada ekstrak. Saponin memiliki rasa pahit dan tajam serta menyebabkan iritasi lambung bila dimakan. Cara kerja saponin adalah dengan menurunkan tegangan permukaan selaput mukosa saluran pencernaan dari larva sehingga dinding saluran menjadi rusak<sup>(15)</sup>. Saponin dapat menghambat kerja enzim yang menyebabkan penurunan kerja alat pencernaan dan penggunaan protein. Sifat saponin yang berbusa dalam air, mempunyai sifat detergen yang baik, dan mempunyai aktivitas hemolisis<sup>(16)</sup>.

Tanin merupakan salah satu metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak biji kelor, walaupun tidak sebanyak alkaloid, saponin, dan triterpenoid. Tanin merupakan senyawa polifenol yang tidak dapat dicerna lambung dan mempunyai daya ikat dengan protein, karbohidrat, vitamin dan mineral<sup>(17)</sup>. Karena kemampuan mengikat protein, tanin akan mengganggu sistem pencernaan larva sehingga pertumbuhan dari larva terganggu<sup>(18)</sup>.

Triterpenoid juga merupakan salah satu metabolit sekunder yang ditemukan pada ekstrak biji kelor. Triterpenoid termasuk dalam golongan steroid yang dapat mengikat sterol bebas dalam saluran pencernaan, dimana sterol bekerja sebagai prekursor hormon ecdison. Dengan menurunnya sterol, dapat mempengaruhi proses pergantian kulit pada serangga<sup>(15)</sup>.

Pada kelompok kontrol positif yang menggunakan abate, dapat dilihat bahwa kematian larva nyamuk, baik itu *Aedes aegypti* maupun *Culex sp.* masih 100%, untuk setiap pengulangan. Hal ini dapat menandakan bahwa sebenarnya di Kota Kupang, abate masih efektif digunakan sebagai larvasida<sup>(7)</sup>. Hal ini tidak sesuai dengan teori resistensi, atau pendapat yang dikemukakan oleh Georgio, yaitu bahwa resistensi serangga terhadap suatu larvasida dapat terjadi ketika suatu larvasida digunakan secara intensif selama 2-20 tahun dan terus menerus sepanjang tahun<sup>(19)</sup>. Meskipun peneliti tidak

menggunakan konsentrasi bertingkat pada abate, tetapi konsentrasi yang digunakan merupakan konsentrasi rujukan dari WHO terhadap penggunaan temephos sebagai larvasida<sup>(20)</sup>. Tidak dapat ditemukan data atau hasil penelitian mengenai status resistensi dari kedua spesies nyamuk ini terhadap abate (temephos).

## KESIMPULAN

Ekstrak biji kelor efektif sebagai larvasida nabati bagi larva *Aedes aegypti* dan *Culex sp.* instar III/IV. Lethal Concentration (LC) 50% bagi *Aedes aegypti* adalah 4618 ppm, dan bagi *Culex sp.* adalah 5212 ppm.

## SARAN

Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan survey resistensi terhadap larva nyamuk di beberapa daerah di Kupang terhadap abate, sebagai dasar penelitian pembuatan larvasida nabati. Selanjutnya dapat dilakukan penelitian mengenai uji residual untuk mengetahui berapa lama efek yang dimiliki oleh ekstrak biji kelor dalam suatu lingkungan air. Dapat juga dilakukan penelitian untuk melihat toksisitas larvasida nabati dengan dosis yang sudah ditemukan terhadap binatang/tumbuhan air.

## DAFTAR PUSTAKA

1. WHO | Vector-borne diseases. WHO [Internet]. 2017 [cited 2018 Mar 29]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/>
2. Pusat data dan Informasi Kementerian Kesehatan Indonesia. Situasi Demam Berdarah Dengue Di Indonesia. 2014. p. 1–3.
3. NTT DP. Profil Kesehatan Provinsi Nusa Tenggara Timur. 2015;1–146. Available from:

- [www.depkes.go.id/resources/download/profil/PROFIL\\_KES.../19\\_NTT\\_2015.pdf](http://www.depkes.go.id/resources/download/profil/PROFIL_KES.../19_NTT_2015.pdf)
4. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Situasi Filariasis di Indonesia Tahun 2015. 2016.
  5. Kemenkes RI. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 374/Menkes/Per/III/2010 Tentang Pengendalian Vektor. 2012;1–94.
  6. Menteri Kesehatan Republik Indonesia. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 94 tentang Penanggulangan Filariasis. 2014;1–118.
  7. Prasetyowati H, Hendri J, Wahono T, Litbang L, Ciamis P, Raya J, et al. Status Resistensi *Aedes aegypti* (Linn.) terhadap Organofosfat di Tiga Kotamadya DKI Jakarta The Resistance Status of *Aedes aegypti* (Linn.) to Organophosphate in Three District Jakarta. 2016 [cited 2018 Apr 27]; Available from: <https://media.neliti.com/media/publications/57722-ID-status-resistensi-aedes-aegypti-linn-ter.pdf>
  8. Kumar S, Wahab N, Mishra M, Warikoo R. Evaluation of 15 local plant species as larvicidal agents against an Indian strain of dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Front Physiol.* 2012;3 APR(April):1–6.
  9. Astriani Y, Widawati M. Potensi Tanaman di Indonesia sebagai Larvasida Alami untuk *Aedes aegypti*. *Bulan Desember Tahun Potensi Tanam Indones ....* 2016;8(2):37–46.
  10. Chaieb I. Saponins as Insecticides: a Review. *Tunis J Plant Prot [Internet]*. 2010 [cited 2018 Apr 26];39(1). Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/7a0b/2544dd484b919fd6afc0e5735759698d51d9.pdf>
  11. Chinenyenwa O, Ree AG. Bio-insecticidal efficacy of *Moringa oleifera* on the malaria vector, *Anopheles* and toxicity evaluation on fish behaviour. 2017;4(2):85–92.
  12. Pradani F, Ipa M, Marina R, Yuliasih Y. Status Resistensi *Aedes aegypti* dengan Metode Susceptibility di Kota Cimahi terhadap Cypermethrin. *Aspirator.* 2011;3(1):18–24.
  13. Yuantri M. Studi Ekonomi Lingkungan Penggunaan Pestisida dan Dampaknya Pada Kesehatan Petani di Area Pertanian Holtikultura Desa Sumber Rejo Kec Ngablak Jawa Tengah. Tesis Univ Diponegoro. 2009;
  14. Cania E. Efektivitas Larvasida Ekstrak Daun Lengundi (*Vitex trifolia*) Terhadap Larva *Aedes aegypti*. *Med J Lampung Univ.* 2013;2.
  15. Widawati M. Efektivitas Ekstrak Buah *Beta vulgaris* L. ( BUAH BIT ) Dengan Berbagai Fraksi Pelarut Terhadap Mortalitas Larva *Aedes aegypti*. 2013;5(1):23–9.
  16. Danusulistyo M. Uji Larvasida Ekstrak Daun Lidah Buaya (*Aloe vera* L) terhadap Kematian Larva Nyamuk *Anopheles aconitus* Donitz. Skripsi Surakarta Fak Ilmu Kesehat Univ Muhammadiyah.
  17. Ridwan Y, Satrija F, Darusmas L, Handharyani E. Efektivitas Anticestoda Ekstrak Daun Miana (*Coleus blumei* Benth) terhadap Cacing *Hymenolepis microstoma* pada Mencit. *Media Peternak.* 2010;33(1):6–11.

18. Yunita E, Suprapti N, Hidayat J. Pengaruh Ekstrak Daun Teklan (*Eupatorium riparium*) terhadap Mortalitas dan Perkembangan Larva *Aedes aegypti*. *Bioma*. 11(1):11–7.
19. Fuadzy H dkk. Kerentanan larva *Aedes aegypti* terhadap Temesfos di tiga kelurahan endemis Demam Berdarah Dengue Kota Sukabumi. *Bul Penelit Kesehat*. 2015;43(1):41–6.
20. WHO. Instructions For Determining The Susceptibility Or Resistance Of Mosquito Larvae to Insecticides. 1981. p. 1–6.