

EFEK EKSTRAK METANOL *CITRUS HYSTRIX* TERHADAP KADAR ENZIM ASETILKOLINESTERASE LARVA *Aedes Aegypti* INSTAR III

Michael Adi Wijaya¹, Hebert Adrianto^{2*}, Hanna Tabita Hasianna Silitonga³
Setyarina Indrasari⁴, Kartika Buana Sari⁴

¹ Program Sarjana Fakultas Kedokteran, Universitas Ciputra, Surabaya

² Parasitologi, Departemen Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Ciputra, Surabaya

³ Departemen Kesehatan Masyarakat dan Kedokteran Komunitas, Fakultas Kedokteran, Universitas Ciputra, Surabaya

⁴ Professor Nidom Foundation, Surabaya

*Email : hebert.rubay@ciputra.ac.id

Received 16 Desember 2022; accepted 3 Januari 2023; published 20 Januari 2023

ABSTRAK

Nyamuk *Aedes aegypti* dikenal sebagai vektor utama penyakit infeksi dengue di dunia. Vaksin dan obat infeksi dengue masih belum tersedia. Prioritas Kementerian Kesehatan untuk mencegah infeksi dengue adalah mengontrol populasi vektor nyamuk *Ae. aegypti*. Jeruk purut (*Citrus hystrix*) memiliki potensi sebagai larvasida tetapi belum banyak informasi mengenai mekanisme kerjanya. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek ekstrak metanol *C. hystrix* terhadap kadar enzim asetilkolinesterase (AChE) larva *Ae. aegypti* instar III. Penelitian ini adalah penelitian *true experimental* di laboratorium dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design*. Kelompok perlakuan terdiri dari kelompok ekstrak metanol *C. hystrix* dari Bali dosis LC₉₀, kelompok akuades sebagai kontrol negatif, dan kelompok temephos sebagai kontrol positif. Replikasi sebanyak tiga kali. Pengujian dilakukan selama 24 jam kemudian dilakukan pemeriksaan enzim AChE. Data dianalisis dengan SPSS menggunakan statistik deskriptif dan uji *Kruskall Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc Mann Whitney*. Hasil penelitian menunjukkan kadar AChE pada larva *Ae. aegypti* yang mati setelah terpapar ekstrak lebih rendah (204,9 units/L) dibandingkan dengan larva kontrol negatif (323,2 units/L) dan kontrol positif (279,9 units/L). Kadar enzim AChE larva nyamuk pada tiga kelompok perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Ekstrak metanol *C. hystrix* dari Bali memiliki mekanisme kerja sebagai racun saraf, yaitu menghambat enzim AChE.

Kata kunci: *Citrus hystrix*, Bali, asetilkolinesterase, *Aedes aegypti*, larvasida alami

ABSTRACT

The Effect of Methanol Extract from Kaffir Lime (*Citrus hystrix*) on Acetylcholinesterase Levels of *Aedes aegypti* Mosquito Larvae. The Effect of Methanol Extract from Kaffir Lime (*Citrus hystrix*) on Acetylcholinesterase Levels of *Aedes aegypti* Mosquito Larvae. *Ae. aegypti* mosquito is globally known as the main vector of dengue fever. Vaccines and drugs for dengue fever are currently unavailable. The Ministry of Health's priority in dengue fever prevention is the population control of the *Ae. aegypti* mosquito vector. Kaffir lime (*Citrus hystrix*) has the potential to be larvicidal, but not much is known about its mechanism of action. This research was conducted to investigate the effect of methanol extract from *C. hystrix* on acetylcholinesterase levels (AChE) in third instar *Ae. aegypti* larvae. This was a true laboratory experiment with only a post-test control group. The concentrations consist of methanol extract of *C. hystrix* from Bali with doses LC₉₀, aquadest as a negative control, and temephos as a positive control. Each of the concentrations was replicated three times. This experiment was conducted for 24 hours, and an AChE level test was done afterwards. Data analysis was done by SPSS with descriptive statistics, the *Kruskall Wallis* test, and a *post hoc Mann-Whitney* test afterwards. The result of the research shows that the AChE levels of dead *Ae. aegypti* due to the extract (204,9 units/L) were lower than the negative control (323,2 units/L) and the positive control (279,9 units/L). The AChE levels of the larvae at three concentrations showed a significant difference ($p < 0.05$). Methanol extract of *C. hystrix* from Bali had a mechanism of action as a nerve toxin, specifically inhibiting AChE.

Keywords: *Citrus hystrix*, Bali, acetylcholinesterase, *Aedes aegypti*, natural larvicide

1. Pendahuluan

Nyamuk *Aedes aegypti* dikenal sebagai vektor utama penyakit infeksi dengue di dunia. Insidensi infeksi dengue terjadi pada lebih dari 128 negara di dunia. WHO memperkirakan 500.000 orang dengan infeksi dengue parah dirawat di rumah sakit setiap tahun dan 2,5% dari mereka meninggal. Wilayah Asia-Pasifik memiliki beban tertinggi di antara wilayah lain di dunia.¹ Di Indonesia, Pulau Jawa menempati kasus dan kematian tertinggi setiap tahunnya.^{2,3}

Vaksin dan obat yang spesifik untuk infeksi dengue masih belum tersedia hingga saat ini sehingga upaya pencegahan yang menjadi prioritas Kementerian Kesehatan adalah dengan mengontrol populasi vektor nyamuk *Ae. aegypti*.^{4,5} Pemerintah Indonesia telah menggunakan temephos sebagai program nasional pemberantasan larva nyamuk sejak tahun 1970.⁵ Namun akhir-akhir ini beberapa negara telah melaporkan bahwa larva *Ae. aegypti* telah resisten terhadap temephos, seperti Brazil, Peru, India, Kamboja, Laos, Thailand dan di beberapa wilayah Indonesia, seperti Bali dan Sumatera Barat.⁶⁻¹⁰ Selain itu temephos juga dilaporkan memberikan efek genotoksik, dampak buruk terhadap reproduksi pria, fertilitas, dan liver meski hanya dosis yang kecil.¹¹

Dari masalah ini diperlukan adanya suatu inovasi larvasida dari bahan alam yang dapat menggantikan larvasida kimia yang sudah tidak mampu lagi mematikan larva. Kekayaan alam Indonesia yang dieksplorasi dalam penelitian ini adalah Jeruk purut (*Citrus hystrix*). *C. hystrix* merupakan salah satu spesies jeruk yang populer di Indonesia, baik digunakan sebagai bahan makanan ataupun pengobatan tradisional. *C. hystrix* termasuk dalam genus *Citrus* dan famili Rutaceae.¹²⁻¹⁴ Senyawa metabolit yang terkandung dalam daun *C. hystrix* adalah flavonoid, alkaloid, steroid, tannin, saponin, dan minyak atsiri.¹⁵⁻¹⁷ Senyawa ini bersifat toksik terhadap larva¹⁸ dan bersifat ramah lingkungan dan tidak menjadi toksin bagi makhluk hidup selain target.^{14,19} Penelitian terdahulu oleh Adrianto dkk

melaporkan bahwa ekstrak metanol *C. hystrix* lebih efektif mematikan larva *Ae. aegypti* dibandingkan dua jeruk lainnya, *C. amblycarpa* dan *C. maxima*.²⁰ Hasil yang mirip juga dilaporkan oleh Syarif bahwa *C. hystrix* dari Makassar juga toksik terhadap larva *Ae. aegypti*.²¹ Minyak atsiri dari biji buah *C. hystrix* juga toksik terhadap larva.²²

Mekanisme larvasida mematikan larva nyamuk adalah bekerja sebagai racun kontak, racun pernafasan, racun perut, dan racun saraf.²³ Racun saraf bekerja dengan cara menghambat enzim asetilkolinesterase (AChE) dalam menghidrolisis ACh sehingga ACh menumpuk, membuat larva paralisis, kejang kemudian mati.^{24,25} Beberapa tanaman yang telah diuji sebagai racun saraf adalah *Artemisia absinthium*, *Annona muricata*, *Cassia fistula*, *Gallesia integrifolia*.²⁶⁻²⁹ Kemampuan larvasida dalam mematikan larva nyamuk dinyatakan dalam dosis letal atau *lethal concentration* atau LC. Dalam penelitian ini menggunakan dosis letal 90 yang artinya 90% larva mati dan 10% larva hidup untuk menjaga keseimbangan alam.³⁰

Data ilmiah mengenai mekanisme larvasida khususnya daun *C. hystrix* belum jelas hingga saat ini karena jarang dilaporkan studi semacam ini di Indonesia. Kebaruan penelitian ini adalah melihat mekanisme larvasida bahan alam berdasarkan kadar AChE larva nyamuk. Penelitian ini memiliki tujuan menganalisis kadar enzim AChE larva nyamuk *Ae. aegypti* setelah terpapar ekstrak metanol *C. hystrix*. Selain itu, penelitian juga menganalisis ada tidaknya perbedaan kadar enzim AChE pada kelompok tidak diberi perlakuan, diberi perlakuan ekstrak, dan diberi perlakuan larvasida sintetis (temephos).

2. Metode

Penelitian ini adalah penelitian *true experimental* di laboratorium dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design*. Penelitian ini telah mendapat persetujuan Komisi Etik Penelitian

Kesehatan Universitas Ciputra dengan surat nomor 009/EC/KEPK-FKUC/VII/2022.

Penelitian dimulai pada bulan Juli hingga November 2022. Populasi dalam penelitian ini adalah larva *Ae. aegypti*. Sampel dalam penelitian ini adalah larva *Ae. aegypti* instar III.

Daun *C. hystrix* diperoleh dari Desa Banyupoh, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng, Bali. Sebanyak 500 gram daun kering yang telah dipotong kecil direndam dalam 2 L pelarut metanol menggunakan botol kaca yang tertutup rapat selama 24 jam. Hasil maserasi disaring kemudian diuapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.

Penetasan telur hingga pengujian larva *Ae. aegypti* dilakukan di Laboratorium Entomologi, Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga Surabaya. Pengujian larvasida dilakukan dua kali, yaitu pengujian pendahuluan dan pengujian sesungguhnya. Pengujian pendahuluan menggunakan tujuh perlakuan, yaitu terdiri dari: lima konsentrasi ekstrak yang berbeda untuk mencari dosis letal 90, kontrol negatif, dan kontrol positif. Untuk pengujian sesungguhnya hanya menggunakan tiga perlakuan, yaitu larutan ekstrak metanol *C. hystrix* dosis letal 90, kontrol negatif, dan kontrol positif. Tiap perlakuan dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

Larutan ekstrak dibuat dengan mencampur ekstrak, tween 20, dan akuades. Larutan kontrol negatif adalah akuades dan tween 20. Larutan kontrol positif adalah temephos dosis 1 ppm dan tween 20. Setiap gelas uji diisi larutan sebanyak 100 ml dan dimasukkan 20 ekor larva *Ae. aegypti* instar III. Kematian larva *Ae. aegypti* diperiksa setelah 24 jam perlakuan.

Larva yang mati dari ekstrak *C. hystrix* dosis letal 90, kontrol negatif, dan kontrol positif diambil dan dilanjutkan pemeriksaan aktivitas enzim AChE di Laboratorium Professor Nidom Foundation. Prosedur pemeriksaan aktivitas enzim AChE dilakukan dengan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Hutabarat dan Nurfadly (2020) dengan menggunakan QuantiChrom™ *Acetylcholinesterase Assay Kit* (Cambridge, UK).³¹ Pembacaan kadar enzim

dilakukan pada ELISA reader merk Tecan Infinite f50 dengan panjang gelombang 405 nm. Analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS menggunakan statistik deskriptif dan uji *Kruskall Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc Mann Whitney*.

3. Hasil

Ekstrak metanol *C. hystrix* pada uji pendahuluan dibuat dengan konsentrasi 1.000 ppm, 5.000 ppm, 8.000 ppm, 12.000 ppm, dan 15.000 ppm dengan dua replikasi pada setiap masing-masing konsentrasi.

Hasil penelitian didapatkan hasil pada larutan kontrol negatif kematian larva sebesar 0%, pada konsentrasi ekstrak 1.000 ppm sebesar 85%, pada konsentrasi ekstrak 5.000 ppm sebesar 100%, pada konsentrasi ekstrak 8.000 ppm sebesar 100%, pada konsentrasi ekstrak 12.000 ppm sebesar 100%, pada konsentrasi ekstrak 15.000 ppm sebesar 100%, dan pada larutan kontrol positif sebesar 100% (Tabel 1.).

Tabel 1. Mortalitas larva *Ae. aegypti* instar III setelah perlakuan selama 24 jam

Perlakuan n	Replikasi		Mortalitas larva		
	I	II	Jumlah	Ekor	%
P0	0	0	0	0	0
P1	17	17	34	17	85
P2	20	20	40	20	100
P3	20	20	40	20	100
P4	20	20	40	20	100
P5	20	20	40	20	100
P6	20	20	40	20	100

Keterangan:

P0 : Kontrol negatif (akuades dan tween 20)

P1 : 1.000 ppm

P2 : 5.000 ppm

P3 : 8.000 ppm

P4 : 12.000 ppm

P5 : 15.000 ppm

P6 : Kontrol positif (temephos dan tween 20)

Dari uji pendahuluan dilanjutkan dengan pengujian sesungguhnya didapatkan hasil mortalitas larva *Ae. aegypti* pada larutan

kontrol negatif sebesar 0%, pada ekstrak *C. hystrix* konsentrasi 1.200 ppm sebesar 91.6%, dan pada larutan kontrol positif sebesar 100%.

Tabel 2. Mortalitas larva *Ae. aegypti* instar III setelah perlakuan selama 24 jam

Perlakuan	Replikasi			Mortalitas larva		
	I	II	III	Jumlah	Ekor	%
P0	0	0	0	0	0	0
P1	18	19	18	55	18.3	91.6
P2	20	20	20	60	20	100

Keterangan:

P0 : Kontrol negatif (akuades dan tween 20)

P1 : 1.200 ppm

P2 : Kontrol positif (temephos dan tween 20)

Hasil pemeriksaan aktivitas enzim AChE didapatkan larva yang mati setelah terpapar ekstrak *C. hystrix* memiliki kadar sebesar 204.9 units/L, larva hidup kelompok kontrol negatif memiliki kadar enzim AChE sebesar 323.23 units/L, dan larva mati kelompok kontrol positif memiliki kadar enzim AChE sebesar 279.94 units/L.

Tabel 3. Hasil pemeriksaan enzim AChE larva *Ae. aegypti*

Perlakuan	Rep lika si	Enzim AChE (units/L)	
		Kadar	Rata-rata
LC ₉₀ Larva Mati	1	225.1082251	204.9062049
	2	173.1601732	
	3	216.4502165	
Akuades	1	363.6363636	323.2323232
	2	311.6883117	
	3	294.3722944	
Temephos	1	277.0562771	279.9422799
	2	285.7142857	
	3	277.0562771	

Larva dengan kadar enzim AChE paling tinggi adalah larva di kelompok kontrol negatif, sedangkan pada urutan kedua yaitu pada larva yang terpapar temephos (kontrol positif). Pada urutan terakhir yaitu pada larva yang terpapar ekstrak *C. hystrix* LC₉₀.

Uji normalitas data kadar enzim AChE pada setiap perlakuan disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji normalitas kadar enzim AChE

	<i>p</i>	Keterangan
Jeruk LC₉₀	0,298	Normal
Akuades	0,463	Normal
Temephos	0,000	Tidak normal

Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah data memiliki keragaman nilai varians yang homogen atau tidak. Uji homogenitas menggunakan uji *Levene Test*. Pada taraf signifikan sebesar 5%, jika diperoleh nilai $p > 0,05$ maka data telah memiliki keragaman nilai varians yang homogen.

Tabel 5. Hasil uji homogenitas kadar enzim AChE

	<i>p</i>	Keterangan
Jeruk LC₉₀	0,075	Homogen
Akuades		
Temephos		

Oleh karena kedua uji asumsi (uji distribusi normal dan uji homogenitas) tidak terpenuhi semuanya maka pengujian selanjutnya untuk menguji adanya perbedaan yang signifikan kadar enzim AChE akan diuji menggunakan uji *Kruskall Wallis*, kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc Mann Whitney* untuk mengetahui larva *Ae. aegypti* dari kelompok mana yang memiliki kadar enzim AChE paling berbeda signifikan.

Hasil uji *Kruskall Wallis* menunjukkan bahwa ekstrak *C. hystrix* LC₉₀, akuades dan temephos memiliki kadar enzim AChE yang berbeda-beda ($p < 0,05$).

Tabel 6. Hasil uji Kruskal Wallis kadar enzim AChE (units/L)

	Media n	(Mean ± SD)	p	Ketera ngan
Jeruk LC₉₀	216,45	204,91 ± 27,83	0,027	Berbeda signifika n
Akuades	311,69	323,23 ± 36,05		
Temephos	277,06	279,94 ± 4,99		

Uji *post hoc* dengan uji *Mann Whitney* didapatkan kadar enzim AChE ekstrak *C. hystrix* LC₉₀, akuades dan temephos ketiganya memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Tabel 7. Hasil uji Post hoc (Mann Whitney) kadar enzim AChE (units/L)

	Jeruk LC ₉₀	Akuades	Temepho s
Jeruk LC₉₀			
Akuades	0,050*		
Temephos	0,046*	0,046*	

Keterangan:

* = Berbeda nyata pada taraf signifikan 5% ($p < 0,05$)

4. Pembahasan

Dari hasil penelitian ini, ditemukan bahwa daun *C. hystrix* yang berasal dari Bali mempunyai potensi sebagai larvasida alami untuk larva *Ae. aegypti*. Dibuktikan dengan mortalitas pada larva setelah paparan selama 24 jam. Mortalitas larva meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi yang digunakan. Berdasarkan penelitian sebelumnya, daun *C. hystrix* yang berasal dari Sidoarjo juga menunjukkan mortalitas pada larva *Ae. aegypti*.²⁰ Hasil yang mirip juga dilaporkan oleh Syarif bahwa *C. hystrix* dari Makassar juga toksik terhadap larva *Ae. aegypti*.²¹ Hanif *et al.* juga melaporkan ekstrak daun *C. hystrix* juga bersifat toksik terhadap larva nyamuk *Culex quinquefasciatus*.³²

Selain *C. hystrix*, genus *Citrus* yang lain juga memiliki efek larvasida terhadap larva *Ae.*

aegypti. Penelitian Adrianto dkk (2018), Sarma *et al.* (2019) dan Nihayah, Syakbanah, dan Aniriani (2022) menunjukkan bahwa daun *Citrus aurantifolia* menunjukkan aktivitas ovisida, larvasida, dan *adulticidal*.³³⁻³⁵ Penelitian oleh Grace, Subramanian, dan Samuel (2020) menunjukkan bahwa senyawa metabolit yang terkandung dalam ekstrak metanol daun *Citrus limon* dapat mematikan larva.³⁶

Selain bersifat larvasida terhadap *Ae. aegypti*, daun *C. hystrix* juga mampu menjadi larvasida terhadap *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*.^{32,37,38} Daun *C. hystrix* juga dapat digunakan untuk mengontrol spesies lalat, seperti *Musca domestica*, *Lucilia cuprina*, *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya megacephala*.³⁹

Mekanisme kerja racun larvasida berbasis bahan alam mulai banyak dieksplorasi, khususnya racun saraf. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak *Salvia officinalis* berpengaruh pada larva *Ae. aegypti* dengan menghambat aktivitas enzim AChE.⁴⁰ Ekstrak daun *Baccharis dracunculifolia* juga merupakan penghambat aktivitas enzim AChE yang kuat pada *Culex quinquefasciatus*.⁴¹ Pada sebuah penelitian didapatkan bahwa inhibisi AChE pada *Ae. aegypti* lebih tinggi dibandingkan pada *Anopheles gambiae* setelah kedua vektor terpapar ekstrak metanol *Zanthoxylum chalybeum*.⁴²

Pada kontrol positif terlihat kadar AChE larva lebih rendah dari akuades. Hal ini sesuai dengan teori yang diakui universal bahwa temephos memiliki mekanisme kerja larvasida sebagai racun saraf dengan cara menghambat enzim AChE larva nyamuk *Ae. aegypti* untuk menghidrolisis ACh. Akibatnya ACh menjadi menumpuk dan menyebabkan larva paralisis, kejang, dan akhirnya mati.⁴³ Pada penelitian ini kadar AChE larva mati akibat ekstrak lebih rendah dibandingkan kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *C. hystrix* LC₉₀ dari Bali tampaknya memiliki kemampuan yang lebih efektif sebagai racun saraf dari temephos.

Suryani, Munawar, dan Hajaroh (2021) berhasil mengidentifikasi setidaknya lima komponen senyawa metabolit sekunder di dalam daun *C. hystrix*, seperti flavonoid, alkaloid, steroid, tannin, dan saponin. Buakaew *et al.* (2021) menemukan keberadaan triterpenoid di dalam daun *C. hystrix* dengan *nuclear magnetic resonance* (NMR) dan *Fourier-transform infrared spectrophotometer* (FT-IR) *mass spectroscopy*.⁴⁴ Turunnya kadar AChE pada kelompok perlakuan ekstrak nampaknya diprediksi ada penghambatan pada gen ace-1 sehingga sintesis AChE terganggu dan akibatnya Ach tidak terhidrolisis dan menumpuk. Gene ace-1 merupakan target dari insektisida atau larvasida organofosfat dan karbamat serta berperan dalam kejadian resistensi. Gene ace-1 mengkode sintesis enzim asetilkolinesterase.^{45,46}

Penelitian ini memiliki keterbatasan yang perlu dilakukan penelitian lebih lanjut ke depannya, yaitu penelitian ini masih terbatas pada pengujian enzim, belum dilakukan sampai level molekuler, bioinformatika / simulasi *molecular docking*, maupun proteomik. Selain itu perlu dilakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder yang ada di dalam ekstrak metanol daun *C. hystrix* dari provinsi Bali.

5. Kesimpulan

Kadar enzim AChE larva nyamuk *Ae. aegypti* setelah terpapar ekstrak metanol *C. hystrix* sebesar 204,9 units/L. Kadar enzim AChE larva nyamuk pada tiga kelompok perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Saran dari penelitian ini adalah perlu pengujian lebih lanjut identifikasi senyawa metabolit sekunder yang ada di dalam ekstrak metanol daun *C. hystrix* dari provinsi Bali, serta parameter data di level molekuler, bioinformatika / simulasi *molecular docking*, maupun proteomik.

Daftar Pustaka

1. Maula AW, Fuad A, Utarini A. Ten-years trend of dengue research in Indonesia and South-east Asian countries: a bibliometric analysis. *Glob Health Action*. 2018 Jan 1;11(1).
2. Harapan H, Michie A, Mudatsir M, Sasmono RT, Imrie A. Epidemiology of dengue hemorrhagic fever in Indonesia: Analysis of five decades data from the National Disease Surveillance. *BMC Res Notes*. 2019 Jun 20;12(1).
3. Trapsilowati W, Anggraeni YM, Prihatin MT, Pujiyanti A, Garjito TA. Indikator entomologi dan risiko penularan demam berdarah dengue (DBD) di Pulau Jawa, Indonesia. *Vektora : Jurnal Vektor dan Reservoir Penyakit*. 2019 Oct 1;11(2):79–86.
4. World Health Organization. Regional Office for South-East Asia. Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. World Health Organization Regional Office for South-East Asia; 2011.
5. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit Dan Penyehatan Lingkungan Kementerian Kesehatan RI. Pedoman pencegahan dan pengendalian demam berdarah dengue di Indonesia. 2017.
6. Gan SJ, Leong YQ, bin Barhanuddin MFH, Wong ST, Wong SF, Mak JW, et al. Dengue Fever and Insecticide Resistance in Aedes Mosquitoes in Southeast Asia: a review. *Parasit Vectors*. 2021 Dec 1;14(315).
7. Valle D, Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Martins Junior ADJ. Resistance to temephos and deltamethrin in aedes aegypti from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019 Mar 1;114(3):1–17.
8. Palomino M, Pinto J, Yañez P, Cornelio A, Dias L, Amorim Q, et al. First

- national-scale evaluation of temephos resistance in *Aedes aegypti* in Peru. *Parasit Vectors*. 2022 Dec 1;15(1).
9. Adyatma IBP, Damayanti PAA, Swastika IK. Status resistensi larva nyamuk *Aedes aegypti* terhadap temefos di Desa Peguyangan Kaja, Kota Denpasar tahun 2020. *Intisari Sains Medis* [Internet]. 2021;12(1):294–7. Available from: <http://isainsmedis.id/>
 10. Taslisia T, Rusjdi SR, Hasmiwati. Survei entomologi, maya indeks, dan status kerentanan larva nyamuk *Aedes aegypti* terhadap temephos. *Jurnal Kesehatan Andalas* [Internet]. 2018;7(1):33–41. Available from: <http://jurnal.fk.unand.ac.id>
 11. Martínez-Mercado JP, Sierra-Santoyo A, Verdín-Betancourt FA, Rojas-García AE, Quintanilla-Vega B. Temephos, an organophosphate larvicide for residential use: a review of its toxicity. *Crit Rev Toxicol* [Internet]. 2022 Feb 7;52(2):113–24. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408444.2022.2065967>
 12. Budiarto R, Poerwanto R, Santosa E, Efendi D, Agusta A. Production, post-harvest and marketing of kaffir lime (*Citrus hystrix* DC) in Tulungagung, Indonesia. *J Trop Crop Sci*. 2019 Jul 17;6(2):138–43.
 13. Suwannarach N, Khuna S, Kumla J, Cheewangkoon R, Suttiapran P, Lumyong S. Morphology characterization, molecular Identification, and pathogenicity of fungal pathogen causing kaffir lime leaf blight in Northern Thailand. *Plants*. 2022 Feb 1;11(3).
 14. Pohan DJ, Djojoputro M. Antibacterial effectiveness of extract of lime (*Citrus aurantifolia* swingle) and kaffir lime (*Citrus hystrix* DC) leaves against *Escherichia coli*. *International Journal of Modern Pharmaceutical Research* [Internet]. 2021;5(6):29–36. Available from: www.ijmpronline.com
 15. Suryani N, Munawar F, Hajaroh S. Phytochemical screening of active secondary metabolites and antibacterial activity kaffir lime leaf (*Citrus hystrix*) and turmeric leaf (*Curcuma longa* Linn.) against *Escherichia coli*. *ALKIMIA : Jurnal Ilmu Kimia dan Terapan*. 2021 Feb 28;5(2):150–8.
 16. Astuti IP, Palupi KD, Damayanti F. Essential oils composition of kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) collection of Bogor Botanic Gardens from Central Java and East Sumba. *J Trop Biodivers Biotechnol*. 2022;7(1).
 17. Husni E, Putri US, Dachriyanus. Chemical content profile of essential oil from kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) in Tanah Datar Regency and antibacterial activity. *Advances in Health Sciences Research*. 2021;40:174–81.
 18. Wahyuni MS, Cahyani SD, Azizah R, Diyanah KC. A systematic review on the effectiveness of biological larvicide the vector control efforts in dengue fever disease. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. 2019;15(3):66–9.
 19. Subekti N, Puraedah A, Susilowati D, Agustiana SD, Lidiawati A. Ovicidal, larvicidal and pupicidal activities of essential oils of *Citrus hystrix* against *Aedes aegypti* based on nanoemulsion technology. *Singaporean Journal of Scientific Research (SJSR) Journal of Selected Areas in Bioinformatics (JBIO)* [Internet]. 2017;9(2):473–81. Available from: www.sjsronline.com
 20. Adrianto H, Yotoprano S, Hamidah. Effectivity of kaffir lime (*Citrus hystrix*), nasnaran mandarin (*Citrus amblycarpa*), and pomelo (*Citrus maxima*) leaf extract against *Aedes aegypti* larvae. *Aspirator*. 2014;6(1):1–6.
 21. Syarif AN, Amansyah M. Efektifitas penggunaan ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap mortalitas larva *Aedes* sp. instar III. *Higiene*. 2019;5(1):32–8.

22. Wikandari RJ, Surati. The effect of kaffir lime (*Citrus hystrix*) essential oil on behavior and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Jurnal Riset Kesehatan*. 2020 May 1;9(1):6–11.
23. Susilowati RP, Darmanto W, Aminah NS. The effectiveness of herbal mosquito coils “morizena” against *Aedes aegypti* death. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*. 2018;7(2):50–5.
24. Rants’o TA, Koekemoer LL, Panayides JL, van Zyl RL. Potential of essential oil-based anticholinesterase insecticides against *Anopheles* vectors: A review. *Molecules*. 2022 Oct 1;27(20).
25. Hasmiwati, Rusjdi SR, Nofita E. Detection of ace-1 gene with insecticides resistance in *aedes aegypti* populations from DHF-endemic areas in Padang, Indonesia. *Biodiversitas*. 2018 Jan 1;19(1):31–6.
26. Sofi MA, Nanda A, Sofi MA, Maduraiveeran R, Nazir S, Siddiqui N, et al. Larvicidal activity of *Artemisia absinthium* extracts with special reference to inhibition of detoxifying enzymes in larvae of *Aedes aegypti* L. *J King Saud Univ Sci*. 2022 Oct 1;34(7).
27. Parthiban E, Arokiyaraj C, Ramanibai R. *Annona muricata*: An alternate mosquito control agent with special reference to inhibition of detoxifying enzymes in *Aedes aegypti*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020 Feb 1;189.
28. Fouad H, Hongjie L, Hosni D, Wei J, Abbas G, Ga’al H, et al. Controlling *Aedes albopictus* and *Culex pipiens pallens* using silver nanoparticles synthesized from aqueous extract of *Cassia fistula* fruit pulp and its mode of action. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018 Apr 3;46(3):558–67.
29. Bortolucci W de C, de Oliveira HLM, Oliva LR, Gonçalves JE, Júnior RP, Fernandez CMM, et al. Crude extract of the tropical tree *Gallesia integrifolia* (Phytolaccaceae) for the control of *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae) larvae. *Rev Biol Trop*. 2021 Mar 1;69(1):153–69.
30. Fatimah G, Rahayu R, Hasmiwati. Lethal concentration (LC 50 , 90 , and 98) and lethal time (LT 50 , 90 , and 98) at various temephos concentrations of *Aedes aegypti* L. larvae. *Int J Mosq Res [Internet]*. 2020;7(1):01–3. Available from: <http://www.dipterajournal.com>
31. Hutabarat RR, Nurfadly. Aktivitas enzim asetilkolinesterase pada larva nyamuk *Aedes aegypti* di kecamatan Medan area. *Jurnal Ilmiah Kohesi*. 2020;4(4):138–43.
32. Hanif M, Lastuti NDR, Kurnijasanti R. Effect of larvicidal extract N-Hexane lime leaves (*Citrus hystrix*) on larva instar III mosquito (*Culex quinquefasciatus*). *World’s Veterinary Journal*. 2021;11(3):416–21.
33. Sarma R, Adhikari K, Mahanta S, Khanikor B. Insecticidal activities of *Citrus aurantifolia* essential oil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Toxicol Rep*. 2019 Jan 1;6:1091–6.
34. Nihayah R, Syakbanah NL, Aniriani GW. Effectiveness of *Citrus aurantifolia* leaves and peels extract as *Aedes aegypti* biolarvicide. 1st International Conference on Environmental Health, Socioeconomic and Technology 2022 [Internet]. 2022;01(04):24–8. Available from: <https://conference.unisla.ac.id/index.php/icehst/>
35. Adrianto H, Hamidah. Evaluasi toksisitas ekstrak metanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap kematian larva nyamuk *Aedes aegypti*. *ASPIRATOR*. 2018;10(1):57–64.
36. Marin Grace, Arivoli Subramanian, Tennyson Samuel. Synergistic larvicidal action of *Citrus limon* (L.) Osbeck (Rutaceae) and *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 (Bacillaceae) against the dengue vector *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera: Culicidae). *GSC*

- Biological and Pharmaceutical Sciences. 2020 Jan 30;10(1):025–33.
37. Muhamat, Dewanti NR, Astuti MD. Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) sebagai insektisida larva nyamuk *Aedes albopictus*. *Jurnal Riset Industri Hasil Hutan*. 2012;4(1):15–9.
38. Nishan M, Subramanian P, Saahatish R, Jesudoss VAS. Toxicity of *Citrus aurantifolia* and *Citrus hystrix* against *Aedes albopictus* larvae. *International Journal of Biosciences (IJB)*. 2017 Jun 20;10(6):48–54.
39. Sukontason K, Suwannayod S, Sukontason KL, Somboon P, Junkum A, Leksomboon R, et al. Activity of kaffir lime (*Citrus hystrix*) essential oil against blow flies and house fly. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2018 Jan;49(1):32–45.
40. Castillo-Morales RM, Carreño Otero AL, Mendez-Sanchez SC, da Silva MAN, Stashenko EE, Duque JE. Mitochondrial affectation, DNA damage and AChE inhibition induced by *Salvia officinalis* essential oil on *Aedes aegypti* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part - C: Toxicology and Pharmacology*. 2019 Jul 1;221:29–37.
41. Alves KF, Caetano FH, Pereira Garcia IJ, Santos HL, Silva DB, Siqueira JM, et al. *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil toxicity to *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). *Environmental Science and Pollution Research*. 2018 Nov 1;25(31):31718–26.
42. Muema JM, Bargul JL, Mutunga JM, Obonyo MA, Asudi GO, Njeru SN. Neurotoxic *Zanthoxylum chalybeum* root constituents invoke mosquito larval growth retardation through ecdysteroidogenic CYP450s transcriptional perturbations. *Pestic Biochem Physiol*. 2021 Oct 1;178.
43. Aiub CAF, Coelho ECA, Sodr  E, Pinto LFR, Felzenszwalb I. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genetics and Molecular Research [Internet]*. 2002;1(2):159–66. Available from: www.funpecrp.com.br
44. Buakaew W, Sranujit RP, Noysang C, Thongsri Y, Potup P, Nuengchamnong N, et al. Phytochemical constituents of *Citrus hystrix* dc. leaves attenuate inflammation via nf- κ b signaling and nlrp3 inflammasome activity in macrophages. *Biomolecules*. 2021 Jan 1;11(105):1–13.
45. Ye X, Yang L, Stanley D, Li F, Fang Q. Two *Bombyx mori* acetylcholinesterase genes influence motor control and development in different ways. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
46. Samal RR, Panmei K, Lanbiliu P, Kumar S. Metabolic detoxification and ace-1 target site mutations associated with acetamidprid resistance in *Aedes aegypti* L. *Front Physiol*. 2022 Aug 30;13.

