

## **Daya Larvisida Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L) terhadap Mortalitas Larva *Aedes aegypti* L**

Agus Aulung,\* Christiani\*\*, Ciptaningsih\*\*

\* Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

\*\* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Jakarta.

### **Abstrak**

Demam berdarah dengue (DBD) merupakan penyakit yang disebabkan oleh virus dengue dengan vektor nyamuk *Aedes aegypti* L. Salah satu cara untuk menekan populasi *Ae. aegypti* L yaitu dengan memutus siklus hidupnya pada stadium larva. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirih (*Piper betle*. L) terhadap mortalitas larva *Ae. aegypti* L. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen dengan desain rancangan acak lengkap (RAL). Pengujian dilakukan dengan lima konsentrasi ekstrak daun sirih masing masing 0,05%, 0,1%, 0,2%, dan 0,4%; 0% (kontrol) terhadap larva nyamuk. Tiap konsentrasi dilakukan empat kali ulangan. Variabel bebas adalah ekstrak daun sirih, sedangkan variabel terikat adalah mortalitas larva *Ae. aegypti* L. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak daun sirih berpengaruh terhadap mortalitas larva *Ae. aegypti* L dengan  $\chi^2$  hitung >  $\chi^2$  tabel (16,81 > 9,488). Konsentrasi untuk mematikan separuh larva uji (LC.50) adalah 0,046 % dan konsentrasi untuk mematikan 90% populasi larva uji (LC.90) adalah 0,1031% ekstrak daun sirih setelah 24 jam waktu pengamatan.

**Kata Kunci** : Larvasida, *Piper betle*. L, *Aedes aegypti*. L, mortalitas.

## **Larvicidal effect of *Piper betle* leaves' extract on the *Aedes aegypti* larvae's Mortality Rate**

### **Abstract**

Dengue hemorrhagic fever is a disease caused by dengue virus which is transmitted by *Aedes aegypti* L. mosquito as the vector. One method for the control of the *Aedes aegypti* population is inference to their lifecycle. A fully randomised study was aimed to investigate the effect of piper betle leaves' extract to the *Ae. aegypti* larvae's mortality. The concentration used in the five treatments were 0% (control), 0,05%, 0,1%, 0,2% and 0,4%, with four replications. The independence variable was the betle leaves' extract and, the dependence variable was the mortality of *Ae. aegypti* larvae. The result shown that the betle leaves' extract caused larva mortality with  $\chi^2$  calculation >  $\chi^2$  table (16,81 > 9,488). The concentration for half of mortality (LC 50) was 0,046%. Finally, the extract concentration for 90% population mortality was 0,103% after 24 hours treatment.

**Key Word** : Larvicidal, *Piper betle* L, *Aedes aegypti* L, mortality

## Pendahuluan

Demam berdarah dengue (DBD) adalah penyakit yang disebabkan oleh virus dan ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti*. Penyakit itu merupakan masalah kesehatan masyarakat penting di Indonesia karena morbiditasnya cukup tinggi dan terapi spesifiknya belum ditemukan.<sup>1</sup>

Penderita DBD meningkat setiap tahunnya. Kasus DBD di DKI Jakarta pada tahun 2000-2005 berturut-turut: 3715, 8661, 40377, 52000, 79462 dan 80837 penderita, oleh karena itu perlu dilakukan pengendalian populasi nyamuk tersebut.

Berbagai cara dilakukan untuk memberantas *Ae. aegypti* antara lain pemberantasan sarang nyamuk (PSN), pemberantasan stadium larva, sampai pemberantasan stadium dewasa. Pemberantasan stadium larva dapat dilakukan secara hayati atau kimia.<sup>1,2</sup>

Pengendalian larva *Ae. aegypti* secara hayati tidak secepat pengendalian secara kimiawi, oleh karena penurunan kepadatan populasi terjadi perlahan-lahan dan tidak secepat bila menggunakan larvisida dari bahan kimiawi.<sup>3</sup>

Pemberantasan vektor penyakit dengan menggunakan zat kimia memang dapat menekan populasi larva dengan baik, namun dapat menimbulkan resistensi larva, pencemaran lingkungan, keracunan dan kematian hewan bukan sasaran.<sup>4</sup> Organisasi kesehatan dunia (WHO) sejak tahun 1985 menganjurkan untuk mencari terobosan baru, yaitu dengan pengendalian hayati atau pengendalian lingkungan.<sup>5</sup> Salah satunya adalah penggunaan zat kimia alami yang berasal dari tumbuhan.

Sirih (*Piper betle* L) merupakan tanaman obat yang sudah dikenal luas oleh masyarakat Indonesia. Tanaman ini mudah didapat, dan sering ditanam dipekarangan rumah sebagai tanaman hias. Sirih diduga mengandung zat yang bersifat larvisida terhadap larva *Ae. aegypti*. Penelitian

tentang daya larvisida ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) terhadap larva *Ae. Aegypti* akan mengungkap bagaimana pengaruh ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) terhadap mortalitas larva *Ae. aegypti* L, sehingga dapat digunakan untuk pengendalian populasi nyamuk.

## Bahan dan Cara

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Pembuatan ekstrak daun sirih dilakukan di Laboratorium Hewan Percobaan Litbangkes dan identifikasi tanaman sirih dilakukan di Herbarium Bogoriense, bidang botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Untuk analisis fitokimia dilakukan di laboratorium Kimia Bahan Alam Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Penelitian ini dilakukan sejak bulan Februari sampai dengan bulan Mei 2008. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Variabel bebas adalah konsentrasi ekstrak daun sirih dan variabel terikat adalah mortalitas larva *Ae. Aegypti*.

Larva *Ae.aegypti* dikumpulkan dari bak kamar mandi di dalam rumah di daerah penelitian (Duren Sawit, Jakarta Timur). Dilakukan survei larva dengan cara *single larva method*, dan selanjutnya dibawa ke laboratorium. Larva *Ae. aegypti* dipelihara dalam waskom berukuran 24 x 35 x 6 cm yang berisi air sumur dan diberi makan *rabbit chow*. Bila telah terbentuk pupa maka dikumpulkan dalam gelas berisi air lalu gelas tersebut diletakkan dalam kurungan nyamuk yang berukuran 25 x 25 x 25 cm. Nyamuk dewasa diberi makan air gula 10% dan setelah berumur lima hari nyamuk diberi makan darah mencit. Kedalam kurungan nyamuk juga dimasukkan ovitrap (perangkap telur) sebagai tempat peletakkan telur. Telur yang

terkumpul dari ovitrap tersebut dikering-anginkan selama satu minggu. Selanjutnya telur ditetaskan dan larva yang baru menetas dipindahkan ke waskom berisi air. Bila larva telah mencapai instar III-IV maka larva siap untuk diuji.

Uji *bioassay* dilakukan menurut prosedur WHO, (dikutip dari Fifendi<sup>6</sup>) mula-mula dipilih larva instar III-IV yang sama besar lalu sebanyak 25 larva dimasukkan ke dalam gelas beaker volume 50 ml yang berisi 25 ml air sumur. Selanjutnya disiapkan gelas minum volume 300 ml yang diisi 200 ml air. Ke dalam gelas tersebut dimasukkan ekstrak daun sirih yang telah ditentukan konsentrasinya lalu diaduk kuat-kuat dengan batang kaca sampai homogen. Sebagai medium kontrol disiapkan gelas berisi air yang diberikan 1 ml etanol 1%. Larva yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam gelas yang telah berisi ekstrak daun sirih dengan konsentrasi 0%, 0,05%, 0,1%, 0,2% dan 0,4%. Ke dalam gelas uji tersebut juga dimasukkan sedikit rabbit chow sebagai makanan larva. Angka kematian larva dihitung setelah larva terpajan ekstrak daun sirih selama 24 jam dengan interval waktu pengamatan 4, 8, 12, 16, 20, dan 24 jam.

Penelitian dilakukan dengan empat kali ulangan dan data dihitung dengan analisis probit.

Data yang diperoleh ditransformasi dengan metode  $\sqrt{x + 0,5}$  kemudian diuji normalitasnya dengan uji Kolmogorov-Smirnov dan homogenitasnya dengan menggunakan uji Bartlett, kemudian data dianalisis dengan uji F melalui Anova 1 arah, jika hasil yang didapatkan signifikan maka dilanjutkan dengan uji LSD (*least significant different*).<sup>7,8,9</sup> Untuk mengetahui efektifitas dan nilai letak konsentrasi (LC) 50 dan LC 90 dilakukan analisis probit.<sup>10</sup> Derajat kepercayaan penelitian ini 95%.

### Hasil

Hasil identifikasi tanaman oleh Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi LIPI menyatakan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Piper betle L*. Analisis fitokimia ekstrak daun sirih (*Piper betle L*) oleh laboratorium kimia bahan alam LIPI, menyatakan bahwa golongan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak daun sirih adalah flavonoid, tanin, steroid/terpenoid dan kuinon (Tabel 1).

**Tabel 1. Hasil Analisis Fitokimia Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle L*)**

Senyawa kimia	Hasil analisis
Alkaloid	-
Flovonoid	+
Saponin	-
Tanin	+
Steroid/Terpenoid	+
Kinon	+

Keterangan: (+), menunjukkan ada kandungan senyawa kimia, (-) menunjukkan tidak ada kandungan senyawa kimia

Berdasarkan hasil pemeriksaan golongan senyawa kimia ekstrak daun sirih, diketahui ada empat jenis senyawa kimia. Senyawa kimia tersebut antara lain flavonoid, tanin, steroid/terpenoid dan kuinon (Tabel 1).

Setelah 24 jam terpajan ekstrak daun sirih terlihat bahwa rata-rata mortalitas larva *Ae. aegypti* pada konsentrasi 0,05%, 0,1%, 0,2%, dan 0,4% serta medium kontrol 0% secara berurutan adalah 58%, 76%, 100% , 100% dan 2% (Tabel 2).

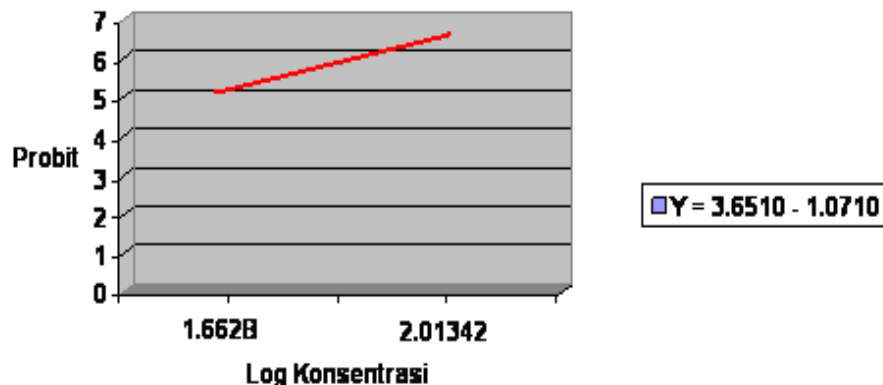
**Tabel 2. Mortalitas Larva *Ae. aegypti* dalam berbagai Konsentrasi Ekstrak Uji selama 24 jam Pengamatan**

Ulangan	Konsentrasi ekstrak daun sirih (%)				
	0,0	0,05	0,10	0,20	0,40
1	0	13	17	25	25
2	2	18	21	25	25
3	0	10	21	25	25
4	0	17	17	25	25
$\Sigma$	2	58	76	100	100
$\bar{X}$	0,5	14,5	19	25	25

Dari uji Kolmogorov-Smirnov dan uji Homogenitas Barlett terhadap data kematian larva *Ae. aegypti* setelah ditransformasikan kedalam  $\sqrt{x + 0,5}$ , ternyata variasi data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen. Hasil uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan  $x^2$  hitung  $> x^2$  tabel ( $10,17054 > 5,991$  dan uji Barlett didapatkan  $x^2$  hitung  $> x^2$  tabel ( $15,9447 > 9,488$ ). Data yang tidak normal dan tidak homogen tidak dapat dilanjutkan dengan uji F (uji parametrik), tetapi dilanjutkan dengan uji non parametrik Kruskal Wallis. Dari uji Kruskal Wallis didapatkan  $x^2$

hitung  $> x^2$  tabel ( $16,81 > 9,488$ ). Hal itu menunjukkan bahwa perlakuan dengan ekstrak daun sirih berpengaruh terhadap kematian larva nyamuk *Ae. aegypti*.

Untuk mengetahui perbedaan mortalitas larva *Ae. aegypti* pada masing-masing kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda,<sup>8</sup> dari uji tersebut dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna terhadap mortalitas larva *Ae. aegypti* pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan empat (0,2%) dan dengan kelompok perlakuan lima (0,4%).

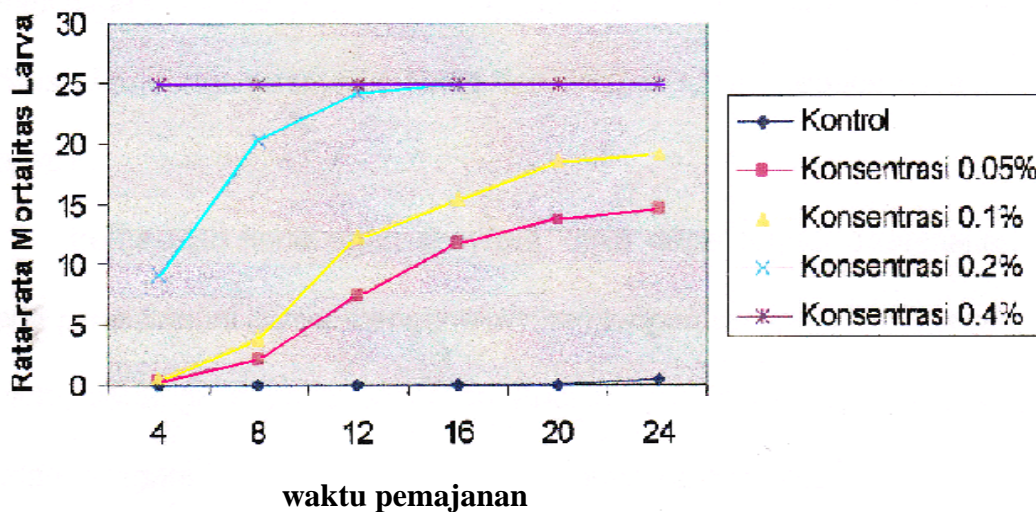


**Gambar 1.** Persamaan regresi hubungan antara ekstrak uji dengan mortalitas larva uji

Penentuan konsentrasi letal 50% dan 90% (Lc 50 dan Lc 90) adalah konsentrasi ekstrak daun sirih yang dibutuhkan untuk mematikan 50% dan 90% larva uji. Pada penelitian ini diperoleh hasil analisis probit Lc 50 adalah 0,046% dan Lc 90 adalah 0,1031%. Hasil perhitungan regresi untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak daun sirih dengan kematian larva *Ae. aegypti* diperoleh persamaan  $Y =$

$3,6510x - 1,0710$  dengan koefisien regresi  $r = 0,9176$  (Gambar 1).

Mortalitas rata-rata larva nyamuk *Ae. aegypti* pada masing-masing konsentrasi dengan interval waktu pengamatan empat jam, selama 24 jam pengamatan ternyata kematian larva pada konsentrasi ekstrak daun sirih 0,05%, 0,10% , 0,20% dan 0,40% adalah 14,5 larva, 19 larva, 25 larva dan 25 larva (Gambar 2).



**Gambar 2.** Mortalitas larva *Ae. aegypti* pada tiap-tiap konsentrasi dengan interval waktu pengamatan empat jam selama pengamatan 24 jam

### Pembahasan

Berdasarkan hasil penapisan fitokimia, ekstrak daun sirih memiliki kandungan senyawa tanin, steroid/terpenoid, flavonoid dan kuinon. Daun sirih memiliki kandungan kimia minyak atsiri yang terdiri dari kadinen, kavikol, sinel, eugenol, kariofilen, karvakrol, terminen, seskuiterpen.<sup>11</sup> Nalina dan Rachim<sup>11</sup> menemukan bahwa daun sirih memiliki komponen yang sama dengan ekstrak daun bunga matahari yang dapat menghambat pertumbuhan larva *Ae. aegypti*, antara lain *hydroxychavicol*, asam lemak dan asam

lemak hidroksi ester. Pada kedua penelitian di atas hanya melakukan analisis kandungan senyawa kimia dan tidak diuji efeknya pada larva *Ae. aegypti*. Perbedaan kandungan senyawa kimia dapat terjadi karena pada penelitian ini hanya dianalisis kandungan senyawa kimia secara umum, sedangkan pada kedua penelitian terdahulu analisis kandungan senyawa kimia diteliti dengan lebih khusus.

Terpenoid dan turunannya dapat bekerja sebagai insektisida akan tetapi banyak peneliti berpendapat bahwa fungsi terpenoid lebih bersifat ekologis daripada

fisiologis. Terpenoid dapat menghambat pertumbuhan tumbuhan pesaingnya dan terpenoid dapat bekerja sebagai insektisida atau berdaya racun terhadap hewan, penolak serangga dan sebagainya. Berbagai aktifitas fisiologis yang menarik juga ditunjukkan oleh beberapa triterpinoid. Beberapa senyawa mungkin mempunyai nilai ekologis bagi tumbuhan pengandungnya, karena senyawa itu bekerja sebagai anti fungus, insektisida, atau anti pemangsa.<sup>12</sup>

Flavonoid merupakan golongan senyawa yang berperan penting dalam penyerbukan oleh serangga. Sejumlah flavonoid mempunyai rasa pahit hingga bersifat menolak sejenis ulat tertentu.<sup>13</sup> Rotenon merupakan insektisida alami yang merupakan turunan flavonoid, selain sebagai insektisida rotenon juga merupakan racun bagi ikan.<sup>14</sup> Rotenon bekerja sebagai racun kontak dan racun perut yang membunuh serangga secara perlahan sampai aktifitas makan berhenti (*stop feeding action*). Cara kerja rotenon menghambat enzim pernapasan, antara NAD<sup>+</sup> (koenzim yang terlibat dalam oksidasi dan reduksi dalam proses metabolisme) dan koenzim Q (koenzim pernapasan yang bertanggung jawab membawa elektron pada rantai transportasi elektron) yang mengakibatkan kegagalan fungsi pernapasan.<sup>15</sup>

Berdasarkan uraian di atas maka senyawa yang diduga bersifat larvisida pada ekstrak daun sirih adalah tanin, steroid, terpenoid dan flavonoid. Bagaimana cara senyawa-senyawa tersebut membunuh larva *Ae. aegypti* belum diketahui, mungkin cara kerjanya sama dengan rotenon.

Hasil uji Kolmogorov-Smirnov dan uji Bartlett menyatakan bahwa data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen. Hal itu terjadi karena konsentrasi 0,2% dan 0,4% memberikan hasil yang sama yakni

100% dan menyebabkan varian (SD<sup>2</sup>) sama dengan nol, sehingga data dianalisis dengan uji non parametrik Kruskal Wallis. Hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak daun sirih berpengaruh terhadap kematian larva *Ae. aegypti*. Hasil uji perbandingan berganda menunjukkan perbedaan yang bermakna pada tingkat konsentrasi tertentu. Pada kontrol dan tingkat konsentrasi 0,05% tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Pada kontrol menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan konsentrasi 0,2% dan 0,4%. Hal itu terjadi karena perbedaan rata-rata mortalitas larva sangat besar (Gambar 2). Konsentrasi 0,2% juga tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan konsentrasi 0,4%. Hal itu karena mortalitas pada konsentrasi 0,2% dan 0,4% setelah 24 jam pajanan memberikan hasil sama, yaitu sebesar 100%.

Perbedaan bermakna tiap konsentrasi ditunjukkan pada tingkat konsentrasi tertentu dan setiap konsentrasi menunjukkan rata-rata persentase mortalitas yang besar yaitu > 50% (Tabel 2). Rata-rata persentase mortalitas larva terendah terjadi pada konsentrasi 0,05% yaitu 58%, sedangkan yang tertinggi terjadi pada konsentrasi 0,2% dan 0,4% yaitu 100%. Mortalitas larva 100% pada konsentrasi 0,2% terjadi pada jam ke-16 waktu pengamatan, sedangkan pada konsentrasi 0,4% terjadi pada jam ke-4 waktu pengamatan. Ada perbedaan konsentrasi yang besar antara konsentrasi 0,2% dengan 0,4%, sehingga ekstrak daun sirih pada konsentrasi 0,4% dapat membunuh larva lebih cepat dibandingkan pada konsentrasi 0,2% (Gambar 2).

Dari hasil tersebut, dapat dikatakan bahwa peningkatan jumlah kematian larva terjadi seiring dengan semakin meningkatnya waktu pajanan dan konsentrasi ekstrak daun sirih. Pada kelompok kontrol ditemukan mortalitas

sebesar 2%. Pada persentase kematian larva <5% tidak perlu dilakukan koreksi dengan rumus Abbot. Hal itu membuktikan bahwa kematian larva *Ae. aegypti* pada kelompok 4 perlakuan disebabkan oleh ekstrak daun sirih.

Kematian larva *Ae. aegypti* dalam pengujian ini memperlihatkan tanda-tanda sebagai berikut : larva tidak bergerak bila disentuh, tubuhnya berwarna putih dan kaku. Menurut Watuguly dan Wilhelmus<sup>16</sup> larva yang mati ditandai oleh tidak ada pergerakan, terapung di permukaan dalam keadaan memanjang, tubuh berwarna putih atau kuning pucat, terjadi inkoordinasi atau rigor (kaku) dan sebagian kepala terlepas atau seluruh bagian hancur.

Beberapa tanda yang diungkapkan Watuguly dan Wilhelmus<sup>16</sup> tidak semuanya ditemukan pada penelitian ini. Hal tersebut mungkin diakibatkan waktu yang digunakan dalam pengujian ini hanya 24 jam, sehingga tidak sampai menyebabkan larva hancur atau kepalanya terlepas.

Hasil analisis probit pada larva *Ae. aegypti* dengan waktu pajanan 24 jam diperoleh dari regresi linier dengan persamaan  $Y = 3,6510 X - 1,0710$  dan koefisien  $r = 0,9176$ . Nilai  $r$  menunjukkan hubungan yang sangat kuat antara peningkatan mortalitas larva dengan peningkatan konsentrasi ekstrak daun sirih.

Berdasarkan analisis probit diketahui bahwa konsentrasi ekstrak daun sirih untuk membunuh 50% larva *Ae. aegypti* (LC 50) adalah 0,046% dan konsentrasi ekstrak daun sirih untuk membunuh 90% larva *Ae. aegypti* (LC 90) adalah 0,1031%. Jika dibandingkan dengan penelitian larvisida alami menggunakan ekstrak daun bunga matahari (*Heliantus annuus*)<sup>6</sup> dan ekstrak biji mahkota dewa (*Phaleria papuana Warb*)<sup>16</sup> didapatkan hasil berbeda. Pada ekstrak daun bunga matahari konsentrasi LC 50 adalah 0,097% dan LC 90 adalah 0,195%, sedangkan pada ekstrak biji

mahkota dewa, angka LC 50 adalah 0,09255% dan LC 90 adalah 0,21694%. Hal itu menunjukkan bahwa LC 50 dan LC 90 ekstrak daun sirih lebih kecil. Ekstrak daun sirih membutuhkan konsentrasi yang lebih rendah untuk membunuh 50% dan 90% larva uji dibandingkan dengan ekstrak daun bunga matahari dan ekstrak biji mahkota dewa. Hal itu mungkin karena perbedaan komposisi kandungan senyawa kimia yang ada pada tanaman tersebut, meskipun ada beberapa kandungan senyawa kimia yang sama. Daun bunga matahari mengandung alkaloid, saponin, tanin, steroid, terpenoid, dan minyak atsiri, sedangkan ekstrak biji mahkota dewa mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, polifenol dan tanin.

Berdasarkan uji toksisitas tersebut dapat disimpulkan bahwa konsentrasi ekstrak daun sirih yang diperlukan untuk mematikan 50% dan 90% larva *Ae. aegypti* lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak daun bunga matahari dan ekstrak biji mahkota dewa.

## Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data yang telah dikemukakan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak daun sirih (*Piper betle* L) berpengaruh terhadap mortalitas larva *Ae. aegypti* dengan kadar LC 50 sebesar 0,046% dan LC 90 0,1031%. Setelah 24 jam pajanan dan konsentrasi terendah yang efektif dalam penelitian ini sebesar 0,1%.

## Daftar Pustaka

1. Sungkar SI, Ismid S.. Bionomik *Ae. aegypti*, vektor utama demam berdarah dengue. Medika 1994; 20: 64-9.
2. Hoedojo. Vektor demam berdarah dengue dan upaya penanggulangannya. Maj Parasitol Indon 1993; 6 (1): 31-45

3. Suwasono, H.. Berbagai cara pemberantasan larva *Aedes aegypti*. Cermin Dunia Kedok 1997; 19: 74-7
4. Heyne K. Tumbuhan berbunga Indonesia jilid II. Jakarta: Yayasan Sarana Wanajaya: 1997
5. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. Pemanfaatan Tanaman Obat Edisi III. 1989.
6. Fifendi M. Pengaruh Ekstrak Daun Bunga Mata Hari (*Helianthus annus L*) Terhadap *Aedes aegypti L*. Tesis. Jakarta: Universitas Indonesia; 1997.
7. Sudjana, SR. Metode Statistika. Bandung : Tarsito. 1989
8. Wayne WD. Statistika nonparametrik terapan. Jakarta: Gramedia. 1998.
9. Hastono SP. 2001. Analisis Data. Kesehatan Masyarakat Universitas Indonesia. 2001
10. Ummyati SR.. Analisis Probit Secara Aritmatis untuk Pengujian Toksisitas Terhadap Serangga. Yogyakarta: Lab Parasitologi FK-UGM; 1990
11. Nalina T, Rahim ZHA..The crude aqueous extract of *Piper betle L*. and its antibacterial effect towards *Sreptococcus mutans*. Am J Biotechnol Biochem 2007; 25: 86-90
12. Trevor R. Kandungan organik tumbuhan tinggi. Bandung: ITB Press. 1995
13. Sastrohamidjojo, Hardjono. Sintesis bahan alam. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. 1996
14. Mann, J. 1995. Secondary metabolism. New York; Oxford University, 1995
15. Wirawan Adi I. Insektisida permukiman. hama permukiman Indonesia pengenalan, biologi dan pengendalian. Bogor; Unit Kajian Pengendalian Hama Permukiman (UKPHP) Fakultas Kedokteran Hewan IPB. 2006
16. Watuguly T, Wilhelmus. Uji toksisitas bioinsektisida ekstrak biji mahkota dewa (*Phaleria papuana*, Warb) terhadap mortalitas nyamuk *Ae. aegypti L*. J Biotek Pertani 2004; 6 (3): 101-14.