

Perubahan Histopatologis Sel Epitel *Midgut* Larva Nyamuk *Aedes aegypti* Akibat Paparan Insektisida Nabati

Dwi Anggraini¹, Monica Puspa Sari², Rina Priastini Susilowati³

¹Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Kristen Krida Wacana, Jakarta, Indonesia

²Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Kristen Krida Wacana, Jakarta, Indonesia

³Departemen Biologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Kristen Krida Wacana, Jakarta, Indonesia

Email : monica.puspasari@ukrida.ac.id

Abstrak.

Nyamuk *Aedes aegypti* merupakan vektor utama penyakit Demam Berdarah *Dengue* (DBD). Berbagai upaya pencegahan dilakukan untuk menurunkan populasi nyamuk *Ae. aegypti*. Salah satunya dengan menggunakan insektisida baik sintetik maupun organik. Bioinsektisida menjadi alternatif yang banyak digunakan saat ini karena lebih aman terhadap manusia, hewan dan lingkungan. Larvasida merupakan salah satu bentuk insektisida yang menyerang tempat perindukan nyamuk di air. Larvasida bekerja dengan berbagai mekanisme dan menyerang berbagai target organ termasuk *midgut* larva. Berdasarkan beberapa penelitian, insektisida nabati terbukti menyebabkan sel epitel *midgut* larva menjadi lisis, berubah bentuk, vakuolisasi sitoplasma dan terlepas dari membran basal. Membran peritrofik, mikrovili dan *brush border* mengalami kerusakan parsial maupun total. Perubahan histopatologis sel epitel *midgut* larva *Ae. aegypti* ini disebabkan oleh senyawa metabolit baik tunggal maupun kombinasi yang terdapat dalam ekstrak tanaman.

Kata Kunci: bioinsektisida, larva *Aedes aegypti*, *midgut*

Histopathological Changes in Midgut Epithelial Cells of Aedes aegypti Mosquito Larvae Due to Exposure to Nabati Insecticides

Abstract

Aedes aegypti mosquitoes are the main vector of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF). Various prevention efforts were carried out to reduce their population. One of them is the use of synthetic or bioinsecticides. Bioinsecticides are safer for humans, animals and the environment so they had been used widely as an alternative nowadays. Larvicide is one of the insecticides product that attacks mosquito breeding sites in the water. Larvicide has various mechanisms that can attack some target organs including larvae's *midgut*. Based on several trial results, plant insecticides have been cause epithelial cells in larvae's *midgut* to lyses, change shape, vacuolize and detach from the basal membrane. Peritrophic membrane, microvilli and brush border are partially or completely damage. Histopathological changes in the *midgut* epithelial cells of *Ae. aegypti* larvae were caused by metabolite compounds, either singly or in combination that contained in plant extracts.

Keywords: *Aedes aegypti* larvae, bioinsecticide, *midgut*,

How to Cite

Monica Puspa, Anggraini, D., & Susilowati, R. P.. Perubahan Histopatologis Sel Epitel *Midgut* Larva Nyamuk *Aedes aegypti* Akibat Paparan Insektisida Nabati. *Jurnal MedScientiae*, 2022; 1 (1) : 20–27. Tautan : <http://ejournal.ukrida.ac.id/ojs/index.php/ms/article/view/2440/version/2432> DOI : <https://doi.org/10.36452/jmedscie.v1i1.2440>

Pendahuluan

Demam Berdarah Dengue (DBD) menjadi salah satu permasalahan kesehatan utama masyarakat. Hal ini berkaitan dengan peningkatan jumlah kasus, peningkatan keparahan penyakit dan perluasan distribusi kasus secara geografis. Diperkirakan 390 juta orang menderita infeksi virus dengue dengan 96 juta kasus setiap tahunnya serta kematian sekitar 12.000 jiwa di berbagai negara tropis dan subtropis. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan bahwa lebih dari 50 juta infeksi *dengue* dan 20.000 kematian terjadi setiap tahun di seluruh dunia.¹ Menurut data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI, 2019), ditemukan prevalensi DBD sebanyak 26,10% pada tahun 2017 dan mengalami peningkatan pada tahun 2018 dan 2019 menjadi 24,75% dan 51,48%. Dengan sedikit penurunan persentase *Case Fatality Rate* (CFR) dari 0,71% (2018) menjadi 0,67% (2019).²

DBD ditularkan oleh nyamuk betina yang memiliki virus dengue. Spesies nyamuk yang sering menularkan virus *dengue* adalah *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*.³ Sampai saat ini belum ada vaksin ataupun obat yang dapat mengatasi infeksi *dengue*.⁴ Cara paling mudah dan lebih efektif untuk menangani penularan yaitu dengan pengendalian vektor salah satunya larvasida. Larvasida menargetkan tempat perindukan nyamuk dalam air sehingga larva dapat mati sebelum menjadi nyamuk dewasa.⁵ Insektisida atau larvasida kimia digemari karena mudah didapat, praktis, memiliki harga yang terjangkau dan memberikan hasil yang cepat.⁶

Seiring dengan peningkatan pemakaian dan dosis insektisida kimia yang tidak tepat, angka resistensi *Ae. aegypti* juga meningkat.⁶ Selain itu, residu insektisida kimia dapat menyebabkan pencemaran lingkungan dan mengganggu organisme non-target. Pada pemakaian dengan dosis yang tinggi, insektisida kimia dapat mengiritasi mata dan kulit yang sensitif dan dapat menimbulkan keracunan jika tertelan.^{6,7} Berbagai kandungan dalam tumbuhan seperti alkaloid, steroid,

senyawa fenolik dan terpenoid dipercaya memiliki aktivitas insektisida yang tinggi dan mulai digunakan sebagai alternatif insektisida kimia.⁵

Senyawa tersebut dapat masuk melalui saluran pencernaan dan mengkorosi mukosa saluran pencernaan serangga dengan menurunkan tegangan permukaannya. *Midgut* (usus tengah) larva nyamuk merupakan tempat utama proses pencernaan yang menjadi salah satu organ target utama insektisida. Kerusakan saluran pencernaan yang terjadi dapat mengakibatkan penghambatan makan, gangguan metabolisme dan kematian pada serangga.⁸ Tujuan penulisan tinjauan pustaka ini adalah untuk mengetahui perubahan histopatologis sel epitel *midgut* larva nyamuk *Ae. aegypti* akibat paparan insektisida nabati.

Midgut Larva Nyamuk *Ae. aegypti*

Saluran pencernaan larva terbagi menjadi 3 bagian yaitu stomodeum (*foregut*), mesenteron (*midgut*) dan proctodeum (*hindgut*). Secara umum, usus serangga merupakan selapis sel epitel yang ditopang oleh lamina basalis aseluler dan dikelilingi oleh otot. *Midgut* terdiri atas area anterior, medial dan posterior. Area anterior terletak pada segmen pertama abdomen yang tersusun atas *gastric caeca*. Area medial terletak di antara segmen II dan III. Area posterior terletak pada segmen IV dan V dan merupakan dasar anatomikal pembentuk saluran pencernaan nyamuk dewasa. Sel-sel pada *gastric caeca* berbentuk agak pipih, berukuran besar dengan tepi *brush border* yang tampak jelas.⁹

Pada permukaan *midgut* terdapat sebuah lapisan aseluler seperti gel atau lapisan film ekstraseluler yang disebut dengan membran peritrofik (*peritrophic matrix* atau *peritrophic membrane*). Membran peritrofik mengelilingi lumen dan memisahkan isi lumen dengan sel sekretori epitel.¹⁰ Membran peritrofik tersusun oleh proteoglikan, kitin dan protein. Membran peritrofik melindungi *midgut* dari infeksi mikroba, kerusakan mekanik dan komponen toksin.¹¹ *Midgut* tersusun atas sel epitel selapis kolumnar yang *uniform* (seragam) serta *brush*

border yang jelas.⁹ *Brush border* terdiri dari mikrovili yang berfungsi untuk meningkatkan kapasitas sekresi dan memperluas permukaan absorpsi *midgut*. Mikrovili pada *midgut* anterior berukuran lebih kecil dibanding area posterior. Mikrovili *midgut* posterior tampak lebih memanjang karena beradaptasi dengan fungsinya sebagai tempat absorpsi nutrisi.^{10,11} Inti sel (nukleus) berada di tengah dan berbentuk bulat (globular) dengan anak inti (nukleolus) yang tampak jelas.⁹ Sitoplasma sel halus, heterogen atau sedikit bergranul dengan daerah basofilik. Pada dasar jaringannya, terdapat sel regeneratif yang tersisip di antara sel epitel.⁹ Sel regeneratif dapat mengganti sel epitel yang rusak melalui proliferasi dan diferensiasi.¹⁰ Semakin larva mendekati menjadi pupa, semakin berkurang heterogenitas sitoplasmanya. Sel epitel *midgut* tidak mengalami mitosis sehingga pertumbuhan dan pergantian jaringan dilakukan melalui diferensiasi sel embrionik (tidak membentuk organ saat dewasa).⁹ *Midgut* merupakan organ fungsional tempat terjadinya pencernaan. Sel epitel *midgut* berfungsi untuk menghasilkan enzim pencernaan yang kemudian disekresikan ke dalam lumen *midgut*. Selain itu, sel epitel *midgut* berfungsi sebagai tempat absorpsi nutrisi, tempat penyimpanan lemak dan karbohidrat, mengatur PH lumen, transport ion dan proses osmoregulasi.¹²

Insektisida

Insektisida merupakan segala senyawa yang digunakan untuk membasmi serangga. Pengertian ini tidak hanya sebatas mengenai jenis senyawa yang digunakan melainkan meliputi mekanisme kerja senyawa, respon serangga terhadap senyawa dan perbandingan hasil dari pemberian senyawa dengan berbagai metode. Penggunaannya memerlukan penilaian dari aspek kemudahan penggunaan, penyimpanan, efektivitas, biaya dan keamanan.⁶ Berdasarkan sumber atau bahan asal pembuatannya insektisida digolongkan menjadi dua yaitu bioinsektisida (organik) dan insektisida sintetik (non-organik). Insektisida

sintetik merupakan insektisida yang berasal dari bahan kimia sintetik. Beberapa bahan kimia tersebut yaitu *Diethyltoluamide* (DEET), organofosfat, piretroid, karbamat dan organoklorin.⁵ Insektisida kimia dinilai praktis, mudah didapat dan memiliki harga yang terjangkau serta memberikan hasil yang cepat sehingga banyak digunakan sebagai insektisida rumah tangga.⁶ Peningkatan pemakaian, dosis dan cara penggunaan insektisida kimia yang tidak tepat menyebabkan terjadinya gangguan keseimbangan ekosistem (mempengaruhi organisme non-target) dan resistensi nyamuk. Resistensi ini dapat mempengaruhi insektisida alternatif, efektivitas harga dan keamanan pemakaian. Selain itu, residu yang dihasilkan insektisida kimia sulit didegradasi oleh lingkungan dan dapat menyebabkan terjadinya pencemaran pada lingkungan.^{6,7} Insektisida rumah tangga seperti *spray* (aerosol) berbahan kimia dapat menimbulkan residu yang akan tertinggal di permukaan tempat penyemprotan.⁶ Residu dari *spray* atau insektisida kimia dapat menyebabkan efek toksik akut pada sistem pencernaan, pernapasan, saraf dan endokrin serta penyakit berat seperti kanker pada orang yang terpapar.

Anak-anak berisiko lebih tinggi mengalami gangguan kesehatan akibat paparan insektisida daripada orang dewasa karena memiliki mekanisme kekebalan tubuh yang lebih rendah. Selain itu, anak-anak berpeluang tinggi menyentuh permukaan berinsektisida seperti lantai dan dinding yang kemudian memasukkan tangan mereka ke dalam mulut dan menyebabkan anak secara tidak sengaja menelan insektisida.¹³ Insektisida nabati menjadi salah satu alternatif yang paling tepat karena sifatnya yang *biodegradable* dan lebih ramah lingkungan. Bioinsektisida memiliki toksisitas yang sangat rendah terhadap manusia, hewan dan lingkungan serta tidak mengganggu organisme non-target.^{6,7} Bioinsektisida merupakan produk yang dihasilkan secara alami dari organisme atau turunannya seperti mikroorganisme, tumbuhan, hewan dan jamur yang berfungsi sebagai pembunuh, penolak, penarik, penghambat pertumbuhan, antifertilitas terhadap serangga.⁵

Bioinsektisida yang berasal dari tumbuhan disebut juga dengan bioinsektisida nabati.

Histopatologis Sel Epitel *Midgut* Larva Nyamuk *Ae. aegypti* Setelah Terpapar Insektisida Nabati serta Mekanisme Kerjanya

Perubahan histopatologis sel epitel *midgut* larva *Ae. aegypti* dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor secara kuantitatif dan kualitatif. Secara kualitatif, perubahan histopatologis *midgut* dipengaruhi oleh lokalisasi organ sepanjang *midgut*. Secara kuantitatif, perubahan histopatologis *midgut* dipengaruhi oleh spesies tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan, konsentrasi bahan uji dan lama perlakuan.¹² Setelah terpapar dengan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak tumbuhan, membran peritrofik, mikrovili, sel epitel dan membran basal *midgut* larva mengalami kerusakan. Lapisan epitel menjadi lisis dan menyebabkan bolus makanan menyebar pada lumen. Hal ini didapatkan pada larva yang terpapar minyak atsiri *Cymbopogon nardus*. Minyak atsiri *Cymbopogon nardus* mengandung berbagai komponen kimia seperti *citronellal*, *linalool*, *citronellol*, *citral*, *kadinol*, *limonene*, *geraniol*, *kadinen*, *nerol*, dan *eugenol*. *Citronellal* merupakan komponen utama minyak atsiri yang bekerja sebagai racun kontak dan racun perut.¹⁴ Jenis tanaman atau tumbuhan yang dapat menyebabkan perubahan histopatologis sel epitel *midgut* larva *Ae. aegypti* beserta mekanisme kerja diantaranya adalah:

Asarum heterotropoides

Asarum heterotropoides merupakan tanaman herbal jenis jahe liar dan termasuk dalam famili *Aristolochiaceae*.¹⁵ Tanaman ini dipercaya memiliki berbagai aktivitas, diantaranya sebagai larvasidal dan nematisidal. Akar tanaman *A. heterotropoides* mengandung senyawa *pellitorine* yang dapat menyebabkan perubahan histopatologis *midgut* larva *Ae. aegypti* sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Permalsamy (2013), yang melaporkan bahwa paparan *pellitorine* dari akar tanaman *A. heterotropoides* dapat

menyebabkan perbesaran *gastric caeca* dan kerusakan pada sel epitel. Pada area tengah *midgut*, terjadi kehancuran dari lapisan epitel dan residunya yang bercampur dengan isi lumen serta pada area posterior *midgut*, tampak residu dari sel epitel dan kerusakan dari membran peritrofik. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa paparan tersebut dapat menyebabkan kerusakan *midgut* larva di daerah toraks, *midgut* dan insang anal larva instar III *Ae. aegypti*. Senyawa *pollitron* dapat mengganggu osmoregulasi di *midgut* bagian tengah dan posterior dengan menghambat ekspresi dari AaAQP4 sehingga senyawa ini dapat mengganggu transport Na^+ , Cl^- dan K^+ melalui degenerasi sel insang anal, dan kerusakan dari kutikula membran luar dari larva *Ae. aegypti*.¹⁶

***Annona squamosa* (Srikaya)**

Tanaman dari famili *Annonaceae* terdiri dari 135 genus, dan 119 spesies yang tersebar di seluruh dunia.¹⁷ *Annona squamosa* merupakan tumbuhan pepohonan atau perdu yang banyak dijumpai pada negara-negara di Asia Tenggara, Amerika Selatan dan Afrika Barat. Tanaman dari famili *Annonaceae* mengandung berbagai komponen seperti senyawa fenolik, alkaloid, steroid, megastigmanes, *lectin*, *cyclopeptide*, *flavonol triglycoside* dan minyak atsiri.¹⁸ Tanaman ini memiliki senyawa metabolit sekunder utama yaitu *acetogenin* yang memiliki aktivitas insektisida terhadap *Ae. aegypti*.¹⁹ Sekitar 400 komponen dari *acetogenin* telah ditemukan. Beberapa derivat *acetogenin* yang memiliki efek sebagai larvasida yaitu *annonacin*, *squamocin*, *muricatetrocin* dan *sylvatacin*.¹⁹ *Squamocin* atau anonin I serta *annonacin* merupakan turunan *acetogenin* yang banyak ditemukan pada *Annona squamosa*. Cincin *tetrahydrofuran* pada molekul *squamocin* dapat mengikat gugus fosfat pada membran plasma lipid pada sel *midgut* larva *Ae. aegypti*. Ikatan tersebut menyebabkan kerusakan fungsional dan struktur yang irreversibel pada membran biologis.²⁰ *Annonacin* bekerja dengan menghambat enzim pencernaan serta bersifat sitotoksik terutama terhadap *midgut* larva *Ae.*

aegypti.¹⁹ Paparan *squamosin* 50 ppm dan 100 ppm selama 120 dan 240 menit menunjukkan bahwa telah terjadi perubahan pada epitel *midgut* larva *Ae. aegypti* yaitu menyebabkan terjadinya dilatasi pada permukaan apikal dari epitel *midgut* dan kerusakan dari *brush border* dan membran peritrofik serta tampak banyak vakuol berukuran besar pada sitoplasmanya.²⁰

***Anacardium occidentale* (Chasew Tree/pohon jambu mete)**

Famili *Anacardiaceae* terdiri atas 800 genus dan 82 spesies.²¹ Genus *Anacardium* memiliki sekitar 22 spesies termasuk salah satunya *Anacardium occidentale*.²² *Anacardiaceae* merupakan famili yang diketahui memiliki banyak komponen toksik terhadap serangga seperti *coumarin*, flavonoid, saponin, steroid, triterpenoid, tanin, *anthocyanoside*, *phytosterol*, polifenol dan hidrokarbon.²³ *Anacardium occidentale* merupakan tumbuhan pepohonan yang berbunga dan dapat ditemukan terutama di India, Brazil, Indonesia, Vietnam, Thailand, Filipina dan Nigeria. Tanaman ini memiliki senyawa dengan kadar fenolik lipidnya yang tinggi sehingga dipercaya memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antigenotoksik, sitotoksik serta insektisida. Salah satu senyawa yang memiliki aktivitas insektisida, yaitu adalah asam *anacardic* yang berasal dari cairan cangkang kacang mete/*Chasew Nut Shell Liquid* (CNSL) (90%). Asam *anacardic* memiliki rantai samping yang terdiri dari 15 atom karbon dengan tingkat ketidakjenuhan yang berbeda sehingga memudahkan senyawa tersebut mengubah permeabilitas membran sel. Hal inilah yang menyebabkan peningkatan toksisitas dan kerusakan seluler pada larva *Ae. aegypti*.^{24,25} Asam *anacardic* bekerja dengan cara menghambat aktivitas enzim asetilkolinesterase, sehingga terjadi akumulasi asetilkolin yang memicu gangguan pada sistem saraf pusat, konvulsi, gangguan pernapasan dan kematian larva *Ae. aegypti*. Penelitian yang dilakukan oleh Dourado (2015) melaporkan bahwa terjadi perubahan pada epitel *midgut* larva *Ae. aegypti* akibat pemberian CNSL konsentrasi 1,0-0,01 mg/mL, yaitu terjadinya

hipersekreasi sel epitel, peningkatan jumlah vakuol, pemisahan sel epitel dari membran basalis serta kerusakan dari *brush border* dan membran peritrofik.²⁶

***Brucea javanica* (Buah Makasar)**

Brucea javanica, dikenal dengan sebutan buah makasar merupakan tanaman perdu yang tumbuh liar di hutan dan termasuk dalam famili *Simaroubaceae*. Tanaman ini tumbuh pada ketinggian 500 m diatas permukaan laut.²⁷ Tanaman ini dikenal sebagai tanaman untuk pengobatan malaria dalam pengobatan tradisional cina. Tanaman ini kaya dengan senyawa *quasinoid* seperti bruseantin, brusatol dan *brucein*. *Brucein A* dengan rumus molekul $C_{26}H_{34}O_{11}$ dengan 522,54 g/mol, diketahui memiliki beberapa aktivitas biologis, yaitu sebagai anti bakteri, anti tripanosoma, anti malaria, anti kanker dan insektisida terhadap beberapa serangga.²⁸ Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sutiningsih (2018), *Brucein A* konsentrasi 8 ppm dapat menyebabkan kerusakan secara menyeluruh disertai pelepasan sel epitel dari membran basal. *Bruceine A* merupakan komponen nonpolar yang larut dalam lemak dan dapat melakukan penetrasi melewati kutikula (racun kontak). Setelah melewati kutikula, *Bruceine A* akan terbawa oleh cairan tubuh serangga dan merusak organ target seperti sistem pencernaan, pernapasan dan saraf serta membran kulit. *Bruceine A* yang berdifusi melalui kulit dan tertelan melalui mulut menyebabkan sel epitel *midgut* menjadi lisis (racun perut). Lisisnya sel epitel *midgut* menyebabkan turunnya tegangan permukaan membran pencernaan sehingga mengganggu proses absorpsi dan pencernaan makanan pada larva. *Bruceine A* juga bekerja sebagai racun pernapasan dan neurotoksin (menghambat kerja enzim asetilkolinesterase).²⁸

Magnolia denudata

Magnolia denudata merupakan tanaman suku magnoliadeae, yang tersebar terutama di Asia Timur dan Asia Tenggara. Secara farmakologis, tanaman ini banyak digunakan dalam berbagai bentuk sediaan seperti teh,

infus, cairan, kapsul sebagai tambahan nutrisi pada manusia. Selain itu beberapa penelitian juga melaporkan bahwa tanaman ini berkhasiat menyembuhkan penyakit seperti pilek dan rhinitis kronis.²⁹ Tanaman ini juga menghasilkan beberapa metabolit sekunder seperti alkaloid, lignan, neolignane, fenilpropanoid dan terpenoid. Ekstrak dari biji *M. denudata* menghasilkan senyawa yaitu honokiol dan magnolol yang diduga memiliki aktivitas sebagai insektisida. Larva yang terpapar honokiol dan magnolol mengalami kerusakan inti sel epitel dan lapisan epitel *midgut*, kerusakan dari membran peritrofik. Hal ini terjadi akibat honokiol dan magnolol dari *Magnolia denudata* juga bekerja pada sel yang berfungsi sebagai transport ion pada *gastric caeca* (area anterior) dan posterior *midgut* larva *Ae. aegypti*. Kerusakan tersebut menyebabkan gangguan osmoregulasi yang berhubungan dengan ekspresi gen V-tipe H⁺-ATPase pada larva *Ae. aegypti*.^{16,59}

Kesimpulan

Ekstrak tanaman yang digunakan sebagai insektisida nabati memberikan perubahan terhadap histopatologis sel epitel *midgut* dan menyebabkan kematian larva *Ae. aegypti*. Perubahan tersebut disebabkan oleh komponen kimia (senyawa metabolit sekunder) yang terkandung dalam tanaman tersebut.

Daftar Pustaka

1. Yue Y, Liu X, Xu M, Ren D, Liu Q. Epidemiological dynamics of dengue fever in mainland China, 2014-2018. *Int J Infect Dis.* 2019;86:82-93.
2. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Profil kesehatan Indonesia tahun 2019. [internet]. [dikutip 1 Mei 2021]. Diunduh dari [https://pusdatin.kemkes.go.id/resources/download/pusdatin/profil-kesehatanindonesia/Profil Kesehatan-indonesia-2019.pdf](https://pusdatin.kemkes.go.id/resources/download/pusdatin/profil-kesehatanindonesia/Profil%20Kesehatan-indonesia-2019.pdf)
3. Zhang L, Wang SM. A time-periodic and reaction-diffusion dengue fever model with extrinsic incubation period and crowding effects. *Nonlinear Analysis L Real World Applications.* 2020;51:1-2.
4. Lim JK, Carabali M, Lee J-S, Lee KS, Namkung S, Lim SK, *et al.* Evaluating dengue burden in Africa in passive fever surveillance and seroprevalence studies: protocol of field studies of the dengue vaccine initiative. *BMJ Open.* 2018;8:1-15.
5. Chellappandin M, Vasantha-Srinivasan P, Senthil-Nathan S, Karthi S, Thanigaivel A, Ponsankar A, *et al.* Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. *Environ Int.* 2018;113:214-30.
6. Sunaryo, Astuti P, Widiastuti D. Gambaran pemakaian insektisida rumah tangga di daerah endemis DBD Kabupaten Grobogan Tahun 2013. *BALABA.* 2015;11(1):9-14.
7. Wigati RA, Susanti L. Hubungan karakteristik, pengetahuan dan sikap dengan perilaku masyarakat dalam penggunaan anti nyamuk di kelurahan Kutowinangun. *Buletin Penelitian Kesehatan.* 2012;40(3):130-41.
8. Cania E, Setyaningrum E. Uji efektivitas larvasida ekstrak daun legundi (*Vitex trifolia*) terhadap larva *Aedes aegypti*. *Medical Journal of Lampung University.* 2013;2(4):53-8.
9. World Health Organization. Dengue and severe dengue fact sheet. [internet]. [dikutip 13 Mei 2021]. Diunduh dari <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
10. Isnaningsih, Sukena DM. Pengaruh ekstrak bunga krisan (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) terhadap fekunditas dan fertilitas *Aedes aegypti*. *HIGEIA Journal of Public Health Research and Development.* 2018;2(1):161-70.
11. Prayuda YE. Efikasi ekstrak biji bintaro (*Cerbera manghas*) sebagai larvasida pada larva *Aedes aegypti* L. Instar III/IV. Skripsi. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah; 2014.
12. Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Editor. Buku ajar: Parasitologi kedokteran. Ed. 4. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2017. h.275-8.

13. Rosmayanti K. Uji efektivitas ekstrak biji sirsak (*Annona muricata* L) sebagai larvasida pada larva *Aedes aegypti* instar III/IV. Skripsi. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah; 2014.
14. De Lemos AB, Adam FC, De Moura KRS, De Moraes LB, Da Silva OS. Histological and histochemical characterization of the midgut of healthy *Aedes aegypti* larvae. *Annual Research and Review in Biology*. 2018;22(1):3-8.
15. Antsyshkina AM, Ars YV, Bokov DO, Pozdnyakova NA, Protodusheva TV, Zaichikova SG. The genus *Asarum* L : A phytochemical and ethnopharmacological review. *Sys Rev Pharm*. 2020;11(5):472-50.
16. Perumalsamy H, Kim JR, Oh SM, Jung JW, Ahn YJ, Kwon HW. Novel histopathological and molecular effects of natural compound pellitorine on larval midgut epithelium and anal gills of *Aedes aegypti*. *Plos One*. 2013;8(11):2-5.
17. Wahyuni D, Loren I. Perbedaan toksisitas ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) dan ekstrak biji srikaya (*Annona squamosa* L.) terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* L. *Jurnal Saintifika: Universitas Jember*. 2015; 17 (1): 44-6.
18. Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali HM, Kadir HA. *Annona muricata* (*Annonaceae*): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(7):15625-8.
19. Rodrigues AM, Martins VEP, Morais SM. Larvicidal efficacy of plant extracts and isolated compounds from Annonaceae and Piperaceae against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2020;13(9):384-96.
20. Costa MS, Cossolin JFS, Pereira MJB, Sant'Ana AEG, Lima MD, Zannuncio JC, et al. Larvicidal and cytotoxic potential of squamocin on the midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Toxins: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) Journal*. 2014;6(4):1169-76.
21. Chisom IF, Nkumah OC, Okkeke CU. A comparative foliar anatomical and morphological study on *Anacardium occidentale* L. and *Spondias mombin* L. *International Journal of Herbal Medicine*. 2014;2(2):27-30.
22. Brito ES, Silva EO, Rodrigues S. Caju: *Anacardium occidentale* in Brito ES, et al. *Exotic fruits: Reference guide*. Brazil: Academic Press; 2018. p. 85-6.
23. Yousaf A, Zuharah WF. Lethal response of the dengue vectors to the plant extracts from family Anacardiaceae. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015; 5(10):812-8.
24. Raraswati GR, Sudarsono, Mulyaningsih B. Larvicidal activity of a mixture of chasew nut shell liquid and water-soluble extract of soap nut fruit (*Sapindus rarak* DC.) against 3rd instar larvae of *Aedes aegypti*. *Biology, Medicine and Natural Product Chemistry*. 2014;3(2):53-7.
25. Paiva DR, Lima DPD, Avvari NP, Arruda EJD, Cabrini I, Marques MR, et al. A potent larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito from cardanol. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 2017;89(1):373-82.
26. Dourado DM, Rosa AC, Porto KRA, Roel AR, Cardoso CAL, Favero S, et al. Effects of chasew nut shell liquid (CNSL) component upon *Aedes aegypti* Lin. (Diptera: Culicidae) larvae's midgut. *African Journal of Biotechnology*. 2015;14(9):831-3.
27. Wulandari A, Muwardi AL, Marjanah. Potency of Makasar fruit extract (*Brucea javanica* L. Merr) as an antibactery of *Escherichia coli*. *Bioedukasi: Jurnal Biologi dan Pembelajarannya*. 2021;19(1):42-7.
28. Sutiningsih D, Mustofa M, Satoto TBT, Martono E. Morphological and histological effects of Bruceine A on the larvae of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae).

- Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2018;11(10): 422-7.
29. Park EH, Kim HS, Eom SJ, Kim KT, Paik HD. Antioxidative and anticanceric activities of Magnolia (*Magnolia denudata*) flower petal extract fermented by *Pediococcus acidilactici* KCCM 11614. 2015;20:12154-65.
 30. Wang Z, Perumalsamy H, Wang X, Ahn YJ. Toxicity and possible mechanisms of action of honokiol from *Magnolia denudata* seeds against four mosquito species. Scientific Reports. 2019; 9(1):1-20.