
EFEK LARVISIDA ALKALOID KULIT BATANG MOJO
(*Aegle marmelos* (L) Correa) TERHADAP
LARVA NYAMUK DEMAM BERDARAH *Aedes aegypti* Linnaeus

Hartati Soetjipto, A. Ign. Kristijanto, Lina Isnawati

Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Matematika UKSW
Jl. Diponegoro 52-60 Salatiga 50711 Jawa Tengah

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk memisahkan alkaloid kulit batang Mojo, menguji daya larvisida alkaloid kulit batang Mojo terhadap mortalitas larva nyamuk *Ae. aegypti* tahap instar III dan IV, serta menentukan dosis efektif alkaloid kulit batang Mojo dalam berbagai konsentrasi terhadap mortalitas larva nyamuk *Ae. aegypti* tahap instar III dan IV berdasarkan LC50.

Data hasil penelitian dianalisis dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) Sub Sampling, dengan 7 perlakuan, 4 kali ulangan dan 3 sub sampel. Sebagai perlakuan adalah konsentrasi fraksi alkaloid yaitu 0 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, dan 800 ppm. Untuk pengujian antar purata digunakan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan tingkat kebermaknaan 5%, sedangkan untuk menentukan LC50 digunakan analisa probit.

Hasil deteksi menunjukkan bahwa pada fraksi alkaloid netral kulit batang Mojo mengandung alkaloid. Hasil uji larvisida menunjukkan fraksi alkaloid netral dengan konsentrasi 800 ppm efektif terhadap larva *Ae. aegypti* tahapan instar III dan IV dalam waktu 24 jam. LC50 untuk instar III dan IV berturut-turut adalah 301,3 ppm dan 599,79 ppm.

1. Pendahuluan

Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan salah satu penyakit menular yang disebarkan oleh nyamuk *Ae. aegypti* dan disebabkan oleh virus Dengue [6, 12]. Virus ini menyebabkan gangguan pada pembuluh darah kapiler. Karena seringnya terjadi pendarahan, maka angka kematian yang disebabkan penyakit ini cukup tinggi. Selain sebagai pembawa virus yang menyebabkan penyakit DBD, nyamuk *Ae. aegypti* juga dapat membawa virus Chikungunya yang menyebabkan penyakit demam Chikungunya [3].

Tingginya angka korban infeksi virus Dengue telah menjadi masalah kesehatan yang serius pada banyak negara tropis dan sub tropis (Gubler, 1998, dalam [19]). Di Indonesia, jumlah penderita penyakit DBD semakin meningkat dari tahun ke tahun, sebagai contoh pada tahun 1999 terjadi 21.134 kasus, tahun 2001 terjadi 45.904 kasus, dan tahun 2003 terjadi 50.131 kasus dengan jumlah kematian 743 orang [15].

Beberapa usaha pencegahan, penanggulangan dan pengendalian terhadap penyakit DBD sudah dilakukan antara lain dengan pemberantasan sarang nyamuk, pengasapan (*fogging*), dan memutuskan mata rantai pembiakan *Ae. aegypti* dengan larvisida misalnya Abatisasi [25]. Pemberantasan nyamuk dewasa dan jentik-jentik penyebab DBD biasanya menggunakan insektisida sintetik seperti *Chlordane*, *Malathion*, *DDT*, *Parathion*, *Thermophos*, dan *Carbaryl* [2, 19]. Namun ternyata penggunaan insektisida sintetik menyebabkan dampak pencemaran lingkungan karena residunya tetap aktif dalam waktu yang lama di dalam tanah dan air. Hal tersebut membuktikan bahwa insektisida sintetik terbukti kurang efektif, sebab selain harganya yang relatif mahal juga beresiko terhadap kesehatan dan lingkungan. Selain itu pemakaian yang berulang-ulang pada nyamuk menunjukkan adanya efek resisten [6, 9, 12, 13, 16]. Nampaknya upaya penggunaan insektisida alami perlu ditingkatkan, karena selain lebih ramah lingkungan, mudah terurai di alam, memiliki target yang spesifik, dan juga selalu tersedia di alam [17].

Sudah banyak penelitian yang mengarah pada pemanfaatan suku tumbuhan yang memiliki aktivitas insektisida sebagai larvisida alami, beberapa contohnya adalah Asteraceae, Cladophoraceae, Piperaceae, Meliaceae, Solanaceae, dan Rutaceae (Sukumar dkk., 1991, dalam [10]) [23, 18]).

Mojo (*Aegle marmelos*) merupakan salah satu tumbuhan suku Rutaceae. Berdasarkan sejumlah pustaka, salah satu senyawa kimia yang terkandung dalam kulit batang Mojo adalah alkaloid [4, 14]. Alkaloid merupakan senyawa yang mempunyai banyak manfaat antara lain sebagai anti jamur, anti bakteri, anti malaria, dan insektisida [11, 16, 22].

Penelitian mengenai aktivitas larvisidal alkaloid kulit batang Mojo terhadap larva *A. aegypti* Linn belum banyak dilakukan. Karena itu, berdasarkan latar belakang di atas, tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memisahkan alkaloid kulit batang Mojo.
2. Menguji daya larvisida alkaloid kulit batang Mojo terhadap mortalitas larva nyamuk *Ae. aegypti* tahap instar III dan IV.
3. Menentukan dosis efektif alkaloid kulit batang Mojo dalam berbagai konsentrasi terhadap mortalitas larva nyamuk *Ae. aegypti* tahap instar III dan IV berdasarkan LC50.

2. Bahan dan Metode

2.1 Bahan dan Piranti

Bahan yang digunakan adalah kulit batang Mojo yang diperoleh di daerah Salatiga. Mula-mula kulit batang dikeringanginkan kemudian dihaluskan. Larva *Ae. aegypti* diperoleh dari Balai Vektor Pengembangan Penyakit dan Reservoir, Ngawen, Salatiga.

Bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain metanol, etil asetat, petroleum eter, larutan asam tartrat 2%, reagensia Dragendorff, reagensia Mayer, reagen Marquis, reagensia uap Iod dan akuades destilat.

Piranti yang digunakan dalam penelitian ini adalah *rotary evaporator*, lampu UV dengan panjang gelombang 350 nm dan 254 nm.

2.2 Metode Penelitian

Ekstraksi dan Isolasi Alkaloid

Sampel kering (1000 gr) disokhlet dengan petroleum eter sampai pelarut bening kemudian disaring, filtrat ditampung untuk selanjutnya diuji kandungan alkaloidnya. Residu dimaserasi dengan pelarut metanol kemudian disaring untuk diambil filtratnya, lalu dirotavapor. Filtrat kemudian ditambahkan asam tartrat 2% sampai pH 2-4 dan dipartisi dengan pelarut etil asetat. Setelah itu fraksi ini dikeringkan dengan Na_2SO_4 anhidrat, disaring dan dirotavapor untuk mendapatkan fraksi alkaloid netral (fraksi A). Lapisan larutan asam tartrat 2% ditambah amonia sampai pH 9-10, kemudian diekstraksi dengan etil asetat. Lapisan etil asetat ditambah Na_2SO_4 anhidrat, kemudian disaring dan dirotavapor untuk mendapatkan fraksi alkaloid basa (fraksi B). Kemudian fraksi A, fraksi B, dan lapisan air dilakukan uji kandungan alkaloidnya dengan menggunakan reagensia Dragendorff, reagensia Mayer, reagen Marquis, dan reagensia uap Iod. [21]

Uji Larvisida Terhadap Larva Nyamuk *Aedes Aegypti*

Untuk uji larvisida dibuat larutan induk dengan konsentrasi 10.000 ppm. Larutan induk tersebut diencerkan dan digunakan untuk uji larvisida pada instar III dan IV larva nyamuk *Ae. aegypti*. Konsentrasi yang digunakan dalam uji ini adalah 0 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 800 ppm. Untuk setiap konsentrasi ditambahkan akuades sampai volume 25 ml yang ditempatkan dalam gelas plastik, setiap gelas berisi 10 ekor larva. Pengamatan mortalitas dilakukan setelah periode 24 jam, 48 jam, dan 72 jam.

Analisis Data

Data hasil pengujian larvisida dianalisis dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) Sub sampling dengan 7 perlakuan, 4 kali ulangan, dan 3 sub sampling. Untuk membandingkan purata mortalitas *Ae. aegypti* antar berbagai konsentrasi digunakan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan tingkat kebermaknaan 5% (Steel dan Torie, 1981). Selanjutnya untuk menentukan dosis efektif dengan LC50 dilakukan analisa Probit [8].

3. Hasil dan Bahasan

3.1 Hasil Ekstraksi Alkaloid Kulit Batang Mojo

Dari 1000 gr sampel kering dengan kadar air $26,23 \pm 2,97\%$ diperoleh beberapa fraksi ekstrak yaitu fraksi petroleum eter, fraksi metanol, fraksi alkaloid netral, fraksi alkaloid basa dan fraksi air. Setelah defatisasi diperoleh 2,9254 gram (0,29%) fraksi PE, fraksi alkaloid netral sebanyak 1,0731 gram (0,11%), dan fraksi alkaloid basa sebanyak 0,4586 gram (0,046%). Namun pada fraksi alkaloid basa menunjukkan hasil negatif untuk uji alkaloid. Sementara itu, pada fraksi air dengan berat 3,6849 gram (0,37%) juga menunjukkan hasil negatif untuk uji alkaloid. Hasil uji alkaloid yang menunjukkan negatif pada fraksi alkaloid basa dan pada fraksi air kemungkinan disebabkan karena sebagian besar alkaloid sudah terekstrak pada fraksi alkaloid netral. Oleh sebab itu, untuk analisa selanjutnya hanya digunakan fraksi alkaloid netral.

3.2 Aktivitas Larvisida Fraksi Alkaloid Netral Kulit Batang Mojo terhadap Mortalitas Larva Nyamuk *Ae. aegypti* Tahapan Instar III pada Pengamatan Jam ke-24, 48, dan 72

Tabel 1: Purata mortalitas (% + SE) larva *Ae. aegypti* tahapan instar III antar berbagai konsentrasi fraksi alkaloid netral kulit batang Mojo pada pengamatan jam ke-24, 48, dan 72.

Jam ke-		Konsentrasi						
		0	200	300	400	500	600	800
24	X	0.00	18.33	34.17	49.17	63.33	75.00	97.50
	±	±	±	±	±	±	±	±
	SE	0.00	2.99	2.67	3.47	4.60	3.49	2.30
	W=10.34	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
48	X	0.00	45.00	60.00	66.67	81.67	95.83	100.00
	±	±	±	±	±	±	±	±
	SE	0.00	3.49	4.42	3.3	4.86	3.46	0.00
	W=9.13	(a)	(b)	(c)	(c)	(d)	(e)	(e)
72	X	4.17	59.17	71.67	82.50	96.67	100.00	100.00
	±	±	±	±	±	±	±	±
	SE	7.16	3.46	5.34	3.22	2.55	0.00	0.00
	W=11.88	(a)	(b)	(c)	(c)	(d)	(d)	(d)

Keterangan: W = Nilai BNJ 5%; Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan antar konsentrasi tidak berbeda secara bermakna, sedangkan angka-angka yang diikuti dengan huruf yang tidak sama menunjukkan antar konsentrasi berbeda secara bermakna.

Purata mortalitas (% ± SE) larva nyamuk *Ae. aegypti* instar III antar berbagai konsentrasi fraksi alkaloid netral kulit batang Mojo pada pengamatan jam ke-24 sampai jam ke-72 berkisar antara $0 \pm 0\%$ sampai $100 \pm 0\%$ (lihat Tabel 1). Purata mortalitas larva nyamuk *Ae. Aegypti* tahapan instar III pada jam ke-24 telah mencapai 50% pada konsentrasi antara 400 ppm dan 500 ppm yaitu $49,17 \pm 3,47\%$

dan $63,33 \pm 4,6\%$. Seiring dengan bertambahnya waktu kontak, maka efektifitas konsentrasi fraksi alkaloid netral terhadap larva nyamuk semakin meningkat

3.3 Aktivitas Larvisida Fraksi Alkaloid Netral Kulit Batang Mojo terhadap Mortalitas Larva Nyamuk *Ae. aegypti* Tahapan Instar IV pada Pengamatan Jam ke-24, 48, dan 72

Purata mortalitas (% + SE) larva nyamuk *Ae. aegypti* instar IV antar berbagai konsentrasi fraksi alkaloid netral kulit batang Mojo pada pengamatan jam ke-24 sampai jam ke-72 berkisar antara $0 \pm 0\%$ sampai $99,17 \pm 1,50\%$ (lihat Tabel 2).

Tabel 2: Purata mortalitas (% + SE) larva *Ae. aegypti* tahapan instar IV antar berbagai konsentrasi fraksi alkaloid netral kulit batang Mojo pada pengamatan jam ke-24, 48, dan 72.

Jam ke-		Konsentrasi						
		0	200	300	400	500	600	800
24	<i>X</i>	0.00	7.50	19.16	34.7	42.5	60.83	77.50
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	SE	0.00	3.45	2.67	3.46	3.22	3.46	4.99
	W=7.61	(a)	(b)	(c)	(c)	(d)	(e)	(e)
48	<i>X</i>	3.33	25.00	32.5	45.83	61.67	76.67	95.00
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	SE	5.73	3.49	3.22	4.11	1.99	2.21	3.49
	W=10.96	(a)	(b)	(b)	(c)	(d)	(e)	(e)
72	<i>X</i>	11.22	41.67	49.16	62.50	75.83	87.5	99.17
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	SE	5.73	4.13	3.47	3.89	3.46	3.22	1.5
	W=11.98	(a)	(b)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)

Dari Tabel 1 dan Tabel 2 dapat dilihat bahwa mortalitas larva selama waktu paparan bertambah dengan meningkatnya konsentrasi. Hal ini berkaitan dengan senyawa yang diujikan. Alkaloid merupakan senyawa yang biasanya mempunyai sifat toksik (Sastrohamidjojo, 1996), sehingga dengan meningkatnya konsentrasi maka mortalitas larva akan meningkat.

Pada pengamatan larva yang mati menunjukkan sebagian tubuh mengalami kerusakan dinding selaput, selain itu ukuran larva yang mati lebih panjang dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan angka mortalitas larva nyamuk *Ae. aegypti* baik pada instar III maupun instar IV (Tabel 1 dan 2), juga berkaitan dengan waktu kontak antara larva dengan bahan toksik yang diberikan. Menurut Ariens dkk. [5], semakin lama waktu kontak bahan toksik terhadap target (dalam hal ini larva nyamuk), maka semakin efektif pula daya racunnya sehingga menimbulkan peningkatan mortalitasnya. Dengan adanya mortalitas larva, baik pada instar III maupun instar IV, dalam fraksi alkaloid netral kulit batang Mojo menunjukkan bahwa alkaloid mempunyai daya larvisida.

Telaah lebih lanjut menunjukkan bahwa larva instar III lebih rentan dibandingkan larva instar IV (Tabel 1 dan Tabel 2). Adanya perbedaan daya tahan larva berkaitan dengan perbedaan umur larva, larva instar IV lebih selektif dalam penyaringan nutrisi sehingga prosentase mortalitasnya lebih rendah [2]. Selain itu larva instar IV merupakan larva atau prepupa dan memiliki kondisi tubuh yang sudah menyerupai nyamuk, sehingga pada tahap ini larva lebih banyak "puasa" (sebagai persiapan metamorfosis untuk menjadi pupa), sehingga membuat larva menjadi lebih tahan terhadap zat-zat toksik yang terserap [7]. Sebaliknya, larva instar III masih membutuhkan nutrisi untuk pertumbuhan optimalnya, sehingga bersama dengan penyerapan nutrisi maka senyawa toksik yang ada akan ikut terserap.

Dibandingkan dengan penelitian Aljabr [1], yang menggunakan fraksi Petroleum Eter pada ekstrak biji Mojo dengan kisaran konsentrasi antara 200 ppm – 1.000 ppm, diperoleh hasil bahwa fraksi alkaloid netral lebih toksik dari pada fraksi Petroleum Eter. Fraksi Petroleum Eter dengan konsentrasi 200-1000 ppm hanya dapat membunuh 16% larva, sedangkan pada fraksi alkaloid netral dengan konsentrasi 800 ppm mampu membunuh 90% larva.

3.4 Efektifitas Konsentrasi Fraksi Alkaloid Netral Kulit Batang Mojo terhadap Mortalitas Larva Nyamuk *Ae. aegypti* Tahapan Instar III dan IV pada Pengamatan Jam ke-24, 48, dan 72

Efektifitas konsentrasi fraksi alkaloid netral dari kulit batang Mojo terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti* tahapan instar III dan Instar IV ditentukan dengan nilai LC_{50} . Dalam Surat Keputusan Menteri Pertanian Nomer 434. 7/Kpts/ Tp. 210/7/2001, LC_{50} merupakan konsentrasi bahan toksik yang mampu membunuh 50% organisme uji. Nilai LC_{50} biasanya digunakan untuk menentukan konsentrasi bahan toksik dalam udara atau dalam air terhadap organisme uji hidup. LC_{50} dari alkaloid kulit batang Mojo terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti* tahapan instar III dan IV pada pengamatan jam ke-24 hingga 72 jam berkisar antara 24,97 – 599,79 ppm (lihat Tabel 3).

Dari Tabel 3 tampak bahwa LC_{50} fraksi alkaloid netral kulit batang Mojo untuk larva nyamuk *Ae. aegypti* tahap instar III pada jam ke-24 adalah 301,67 ppm, sedangkan LC_{50} untuk instar IV adalah 599,79 ppm. Menurut Prijono (1999), suatu ekstrak tumbuhan dapat dipertimbangkan sebagai larvisida alami apabila nilai LC_{50} konsentrasi bahan kurang dari 0,5% atau setara dengan 5.000 ppm. Berdasarkan hasil penelitian ini, tampak bahwa nilai LC_{50} yang diperoleh jauh di bawah 5.000 ppm, artinya alkaloid kulit batang Mojo menunjukkan keefektifannya sebagai larvisida alami.

Tabel 3: Analisa probit prosentase mortalitas larva nyamuk *Ae. Aegypti* tahapan instar III dan Instar IV antar berbagai konsentrasi fraksi alkaloid netral kulit batang Mojo pada berbagai waktu pengamatan.

Waktu (jam)	Konsentrasi Alkaloid (ppm)	
	Instar III	Instar IV
24	301,30	599,79
48	138,67	207,79
72	24,97	56,23

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat disimpulkan:

1. Hasil deteksi menunjukkan bahwa dalam kulit batang mojo mengandung senyawa alkaloid. Dari sampel awal diperoleh fraksi alkaloid netral sebanyak 1,0731 gram (0,11%).
2. Daya larvisida ekstrak alkaloid kulit batang Mojo relatif kuat terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*. Pada konsentrasi tertinggi 800 ppm, mampu membunuh 100% larva instar III pada pengamatan jam ke-24, sedangkan untuk instar IV pada konsentrasi yang sama mampu membunuh 77,5% larva.
3. LC50 ekstrak alkaloid kulit batang Mojo terhadap larva instar III dan Instar IV pada pengamatan jam ke-24 berturut-turut yaitu 301,30 ppm dan 599,79 ppm.

Daftar Pustaka

- [1] Aljabr, A., 2004, *Biorational Insecticides as Alternatives in Pest Control*, Plant Protection Departement, Faculty of Agricultural and Food Sciences.
- [2] Andrade, C. F. & M. Modolo, 1991, Susceptibility of *Aedes aegypti* Larvae to Temephos and *Bacillus Thuringiensis van israelensis* in Integrated Control. *Rev. Saude ubl., S. Paulo* 25; 3:18-47.
- [3] Anonim, 2003, *Cegah Demam Berdarah dan Chikungunya*, <http://www.pikiranrakyat.com/cetak/0303/23/1001.htm>
- [4] Anonim, 2005, Aegle marmelos (Bael Fruit) Herbs Information, <http://www.onlinevitaminguide.com/herbs/aeglemarmelos.htm>
- [5] Ariens, J. E., 1986, *Toksikologi Umum Pengantar*, Gajah Mada University, Yogyakarta.
- [6] Choochote, W. et al., 2006, Adulticidal Activity Against *Stegomyia aegypti* (DIPTERA : CULIDAE) OF THREE *Piper spp.*, *Rev. Ins. Med. Trop. S. Paulo* 48; 1:33-37.
- [7] Christophers, S. R., 1960, *Aedes aegypti (L.) The Yellow Fever Mosquito*, The Syndics of Cambridge University Press Berilley House, London.
- [8] Goulden, C. H., 1970, *Method of Statistical Analisis*, 2nd Ed., Modern Asia Edition, John Wiley & Sons Inc., New York.
- [9] Grainge, M. & S. Ahmed, 1988, Handbook of Plants with PestControl Properties, *Resource Systems Institute, EastWest Center Honolulu, Hawai* 99; 5: 541-544.

- [10] Kalyanasundaram & Sivagnaname, 2004, Laboratory Evaluation of Methanolic Extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutaceae) Against Immature Stage of Mosquitoes an Non target Organisms, *Mem Ins OswaldoCruz, Rio de Janeiro* **99**; 1:115-118.
- [11] Karou, D. et al., 2006, Antibacterial Activity of Alkaloids from *Sida acuta*, *African Journal of Biotechnologi* **5**; 2:195-200.
- [12] Karunaratne, V. et al., 2005, Phototoxic Effect of Some Porphyrin Derivatives Against The Larvae *Aedes Aegypti*, A Major Vector Dengue Fever, *Current Science* **89**; 1:170-173.
- [13] Martin, H., 1972, *Insecticidal and Fungicide Handbook*, Fourth Edition. Blackwell Scientific Publication, London.
- [14] Morton, J., 1987, *Bael Fruit: Fruits of Warm Climates*, <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/baelfruit.html>
- [15] Nikson, 2004, *Jangan Sampai Digigit Nyamuk*, <http://www.balipost.co.id/BaliPost/2004/3/5/re3h1/htm>
- [16] Nivsarkar, M., C. Bapu, P. Harish, 2001, Alphaterthienyl:A Plantderived new generation insecticide, *Current Science* **81**; 667-672.
- [17] Obomanu, F. G. et al., 2006, Larvicidal Properties of *Lepidagathis alopecuroides* and *Azadirachta indica* on *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*, *African Journal of Biotechnology* **5**; 9:761-765.
- [18] Pohlit, A. M. et al., 2004, Screening of Plants Found in The State of Amazonas, Brazil for Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti* Larvae, *Acta Amazonica* **34**; 1:97-105.
- [19] Ponlawat, A., G. S. Jeffrey, C. H. Laura, 2005, *Insecticide Susceptibility of Aedes aegypti and Aedes albopictus Across Thailand*, Entomological Society of America, Department of Entomology, Cornell University, Ithaca, New York.
- [20] Priyono, D., 1999, *Prospek dan Strategi Pemanfaatan Insectisida Alam dalam PHT*, Bahan Pelatihan, Pengembangan dan Pemanfaatan Insectisida Alam, Bogor 9-13 Agustus.
- [21] Sastrohamidjojo, H., 1996, *Sintesis Bahan Alam*, Gajah Mada University Press.
- [22] Sener, B., M. Koyuncu, F. Bingol, F. Muhtar, 1999, *Production of Bioactive Alkaloids from Turkish Geophytes*, Gazi University Faculty of Pharmacy, Departement of Pharmacognosy, Maltepeankara, Turkey.
- [23] Singh, K. V. & S. K. Bansal, 2003, Larvicidal Properties of Perennial Herb *Solanum xanthocarpum* Against Vectors of Malaria and Dengue/DHF, *Current Science* **84**; 6:749-751.
- [24] Steel, R. G. D. & J. H. Torie, 1981, *Principle and Procedures of Statistics A Biometrial Approach*, 2nd Ed, Mc. GrawHill International Book Co., Kogakusha.
- [25] Sudrajat, 2003, *Demam Berdarah Dengue (DBD)*, http://www.geocities.com/mitra_sejati2003/dbd.html