

ACUTE TOXICITY OF AQUEOUS EXTRACT OF *Eupatorium riparium* Reg. ON SPRAGUE-DAWLEY RATS

KETOKSIKAN AKUT EKSTRAK AIR *Eupatorium riparium* Reg. PADA TIKUS SPRAGUE-DAWLEY

Nurlaila ^{1*}, Sita Rina Widyarini², Subagus Wahyuono¹, Lukman Hakim¹

¹ Faculty Of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

² Faculty of Veterinary, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Eupatorium riparium Reg. is one of medicinal plant that might be used to cure a disease optimally. Some research reports and traditional uses in society show that this plant can be used as a diuretic, anti-inflammatory, hepatoprotective, immunostimulant, anti-malarial, and anti-infective agents. Therefore, it is necessary to evaluate its safety. The aim of this study is to determine the acute toxicity of the aqueous extract of *E. riparium* Reg. at Sprague-Dawley (SD) rats. The acute toxicity test was conducted using the method of OECD 423. Male SD rats were orally given aqueous extracts of *E. riparium* Reg. which was started with a dose of 2000 mg / kg. Observations were performed 24 hours after the administration with intensive observations on the first 4 hours. The result showed that there were no animals found in dead condition when treated with a dose of 2000 mg/kg; repeated testing is also showed that no animals died, so the observation was continued until 14 days. The dose was increased to 5000 mg/kg, and again there were no dead animals. From the results, it can be concluded that the potential for acute toxicity (LD_{50}) (cut off) of aqueous extract of *E. riparium* Reg., in rats is > 5000 mg/kg. In addition, toxic symptoms such as restlessness, lick, hyperactivity, forced movement, paralysis of the legs, dyspnea were shown but these symptoms were disappeared after 14 days. Histopathological study showed that there was no change on animal's organ compared to the normal control.

Keywords: aqueous extract of *E. riparium* Reg., Acute toxicity, LD_{50} , OECD 423.

ABSTRAK

Tumbuhan *Eupatorium riparium* Reg. merupakan salah satu tumbuhan berkhasiat obat yang memungkinkan dimanfaatkan dengan optimal. Beberapa hasil penelitian dan penggunaan pada masyarakat memperlihatkan bahwa tumbuhan ini dapat digunakan sebagai diuretika, antiinflamasi, hepatoprotektor, imunostimulan, antimalaria, dan antiinfeksi. Oleh karena itu perlu adanya penelitian untuk evaluasi keamanan secara menyeluruh, salah satunya yaitu penentuan ketoksikan akut ekstrak air *E. riparium* Reg. pada tikus Sprague-Dawley (SD). Uji ketoksikan akut ini dilakukan mengikuti metode OECD 423. Hewan uji tikus betina galur SD. Hewan uji diberi ekstrak air *E. riparium* Reg. yang dimulai dengan dosis 2000mg/kg BB. Pengamatan dilakukan 24 jam dengan pengamatan intensif pada 4 jam pertama. Semua tikus pada dosis 2000mg/kg tidak ada yang mati; dilakukan pengujian ulang juga tidak ada yang mati, sehingga pengamatan dilanjutkan sampai 14 hari. Dosis dinaikkan menjadi 5000mg/kg BB, ternyata tidak ada hewan yang mati, juga pada pengujian ulang. Juga dilakukan pemeriksaan histopatologis pada tikus dosis 2000mg/kg BB dan juga pada tikus dosis 5000mg/kg BB. Hasil penelitian menunjukkan bahwa potensi ketoksikan akut (LD_{50}) (cut off) ekstrak air *E. riparium* Reg., pada tikus sebesar >5000 mg/kg BB yang menunjukkan bahwa ekstrak tersebut bersifat tidak toksik (tidak terklasifikasi dan termasuk dalam kategori GHS V). Selain itu sediaan uji memperlihatkan gejala toksik berupa gelisah, menjilat, keberangasan, keterpaksaan gerak, paralisis kaki belakang, dyspnea, tetapi gejala tersebut hilang atau sembuh kembali pada pengamatan 14 hari. Tidak ada perubahan pada pemeriksaan histopatologis.

Kata kunci : ekstrak air *E. riparium* Reg., Ketoksikan akut, LD_{50} , OECD 423.

Corresponding author : Nurlaila
Email: inungind@yahoo.com

PENDAHULUAN

Salah satu tumbuhan yang digunakan masyarakat dalam pengobatan adalah *Eupatorium riparium* Reg, yang dikenal sebagai rumput tekelan. Tekelan ini termasuk dalam genus *Eupatorium* yang secara umum sudah banyak digunakan untuk pengobatan di dalam maupun di luar negeri, dapat digunakan sebagai antimalaria, antibakteri, antiinflamasi, hepatoprotektor, antikanker dan lain-lain (Nanang Fakhruddin dkk., 2007). Menurut Woerdenbag (1993), tekelan mengandung beberapa senyawa antara lain germacrene D, golongan taraksasterol, stigmasterol, benzofuran dan golongan kromen seperti ageratoriparin, ripariumkromen A, metilripariumkromen A (MRC-A), asetovanilokromen dan turunan eupatoriokromen.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak etanol daun pada konsentrasi 0,014 % (v/v) mampu menyebabkan kematian 50% larva *Aedes Aegypti* dalam pengamatan 72 jam (Yunita dkk., 2009). Selain itu tekelan juga mempunyai kandungan MRC-A seperti yang terkandung di dalam tumbuhan *Orthosiphon aristatus* (kumis kucing). Hasil penelitian Matsubara dkk., 1999, memperlihatkan bahwa MRC-A yang dipejalkan secara oral pada tikus mampu meningkatkan volume urin, menurunkan tekanan darah sistolik dan menurunkan denyut jantung.

Bentuk daun dan bunga tekelan mirip dengan kumis kucing maka di masyarakat tekelan ini banyak digunakan untuk memalsu kumis kucing. Belum ada penelitian yang mengungkap tentang keamanan dari tanaman tekelan. Untuk pengembangan suatu obat tradisional diperlukan uji toksisitas untuk mengevaluasi keamanan suatu produk. Salah satu uji toksisitas yang dipersyaratkan adalah uji ketoksikan akut. Penelitian uji ketoksikan akut ekstrak air tekelan sampai saat ini belum pernah dilakukan. Melalui penelitian ini, akan didapatkan beberapa data yang menjadi sumber informasi untuk mengetahui potensi ketoksikan akut ekstrak air tekelan. Digunakan ekstrak air, hal ini disesuaikan dengan penggunaan pada masyarakat yang biasa menggunakan dalam bentuk air rebusan tekelan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ketoksikan akut (LD_{50}), gejala toksik yang timbul, serta spektrum efek toksik dari ekstrak air *Eupatorium riparium* Reg. yang diberikan secara oral pada tikus *Sprague-Dawley* betina. Penelitian ini juga diharapkan dapat menambah khasanah ilmu pengetahuan tentang obat tradisional. Selain itu juga untuk melindungi masyarakat terhadap pemalsuan simplisia yang sering terjadi.

METODOLOGI

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan rancangan acak lengkap pola searah dengan mengikuti metode OECD 423. Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel uji yang berupa herba *Eupatorium riparium* Reg. yang diperoleh dari hutan Turgo, Taman Nasional Gunung Merapi, Pakem, Sleman, Yogyakarta. Hewan uji yang digunakan adalah tikus *Sprague-Dawley* betina, yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi UGM. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah akuades dan formalin 10 %. Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, alat bedah, spuit injeksi dengan jarum per-oral, dan alat untuk pembuatan ekstrak.

Jalannya penelitian dimulai dengan pengambilan sampel uji, kemudian dilakukan determinasi tanaman, setelah itu dicuci, dikering (suhu 40°C), lalu diserbuk. Kemudian dibuat infusa kadar 10%, setelah itu infusa hasil infundasi dibuat ekstrak kering dengan alat *rotaevaporator* dan *freeze drying*.

Uji ketoksikan akut dilakukan dengan mengikuti *Guideline* OECD 423 *Annex 2d* (Anonim, 2001) Hewan uji diaklimatisasi selama 5 hari untuk menyesuaikan kondisi laboratorium dan dipuaskan 12 jam sebelum pemberian sediaan uji. Volume pemberian sediaan uji tidak melebihi 2 ml/100 g BB tikus. Pemberian sediaan uji dimulai dari dosis 2000 mg/kgBB dilanjutkan dengan dosis 5000 mg/kgBB masing-masing dilakukan dalam dua tahapan pemberian pada tiga ekor tikus. Digunakan dosis tersebut dengan pertimbangan tanaman ini sudah digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional sehingga diperkirakan tidak toksik dan juga belum ada informasi tentang ketoksikan tanaman tersebut. Pengamatan dilakukan pada masing-masing tikus secara periodik selama 24 jam pertama dimana diberikan perhatian khusus pada 4 jam yang pertama, kemudian pengamatan dilanjutkan sehari sekali selama 14 hari. Pengamatan yang dilakukan meliputi jumlah kematian dan gejala-gejala toksik yang mungkin muncul setelah pemberian sediaan uji. Pengamatan histopatologi dilakukan pada 24 jam dan pada hari ke-14 setelah pemberian sediaan uji. Hewan uji dikorbankan dan dilakukan pemeriksaan histopatologi organ meliputi jantung, usus, ginjal, hati, limpa, paru-paru, lambung, dan pankreas. Dari hasil pengamatan uji ketoksikan akut ini akan didapat nilai LD_{50} yang menunjukkan potensi ketoksikannya, nilai ini didapatkan dari kategori-kategori yang terdapat di *Globally Harmonized*

Classification System (GHS) dan LD₅₀ cut-off yang terdapat pada OECD 423.

Data yang didapat pada uji ketoksikan akut ini adalah data kuantitatif yaitu harga LD₅₀ dan juga data kualitatif yaitu pengamatan fisik gejala toksik dan hasil histopatologi organ. Untuk data kuantitatif dicocokkan dengan tabel dari OECD 423 termasuk dalam kategori yang mana dengan taraf kepercayaan 95% dan untuk data kualitatif dilakukan perbandingan dengan kelompok kontrol negatif yang hanya diberi akuades.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil determinasi tanaman terbukti bahwa tanaman yang digunakan pada penelitian ini benar *Eupatorium riparium* Reg., dengan kunci determinasinya sebagai berikut (Backer & Van den Brink, 1965): 1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23a (166. Asteraceae) , 1b-3a-4b-5a-6b-15b-16a-17b-18a (12. Eupatorium), 1b-2b-3a (*Eupatorium riparium* Reg.). Hasil pembuatan ekstrak kering *Eupatorium riparium* Reg. didapat rendemen sebesar 11,59 %.

Potensi ketoksikan akut

Hewan uji tikus diberikan dosis sesuai dengan dosis anjuran OECD 423. Dimulai dari dosis 2000 mg/kgBB; digunakan dosis tersebut dengan pertimbangan tanaman ini sudah digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional sehingga diperkirakan tidak toksik dan juga belum ada informasi tentang ketoksikan tanaman tersebut. Jumlah kematian hewan uji dapat dilihat pada tabel I.

Dosis 2000 mg/kgBB pada tikus ternyata tidak menyebabkan timbulnya kematian, maka dilakukan pengujian ulang dengan dosis yang sama ternyata juga tidak menimbulkan kematian, pengamatan dilanjutkan sampai 14 hari, ternyata juga tidak ada kematian. Kemudian dosis dinaikkan 5000 mg/kgBB karena pada dosis 2000 ada tikus yang mengalami gejala toksik. Pada dosis inipun tidak menimbulkan kematian pada tikus, maka dilakukan pengujian ulang dengan dosis yang sama ternyata juga tidak menimbulkan kematian, pengamatan dilanjutkan sampai 14 hari untuk melihat efek toksik tertunda, ternyata juga tidak menyebabkan kematian, walaupun beberapa hewan uji mengalami gejala toksik. Tahap berikutnya adalah menetapkan potensi ketoksikannya dengan pedoman OECD 423 dan Kriteria GHS, maka ekstrak air *E. riparium* Reg. pada tikus mempunyai nilai LD₅₀ cut-off > 5000 mg/kgBB (tidak terklasifikasi dan termasuk dalam kategori GHS V (>5000 mg/kgBB) tidak terklarifikasi.

Pengamatan gejala toksik

Gejala toksik yang diamati meliputi beberapa kriteria tanda umum ketoksikan menurut Balazs (1970). Ekstrak air tekelan pada dosis 2000 mg/kgBB dan dosis 5000 mg/kgBB menyebabkan paralisis pada anggota gerak terutama kaki belakang dan semakin tinggi dosis waktu terjadinya paralisis juga semakin pendek. Untuk dosis 2000 mg/kgBB paralisis terjadi setelah 4 jam pemberian ekstrak, sedangkan untuk dosis 5000 mg/kgBB paralisis terjadi setelah 1,5 jam setelah pemberian ekstrak. Lama waktu terjadinya paralisis juga memperlihatkan bahwa ada ketergantungan dosis artinya makin tinggi dosis makin lama waktu terjadinya paralisis, pada dosis 2000 mg/kgBB 4 jam sudah kembali ke normal, untuk dosis 5000 mg/kgBB lebih dari 4 jam untuk kembali ke normal. Walaupun demikian dapat dikatakan bahwa efek paralisis anggota gerak terutama kaki belakang bersifat reversibel didukung dengan hasil pengamatan pada hari ke-14 yang tidak muncul adanya gejala toksik. Pada dosis 5000 mg/kgBB juga menyebabkan efek sedasi dan pupil mengecil. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air tekelan dengan dosis tersebut mempengaruhi kerja susunan syaraf pusat dan somatomotor yang bersifat reversibel. Hasil gejala toksik 24 jam dapat dilihat pada tabel II untuk gejala toksik pada tikus.

Pemeriksaan histopatologi

Pemeriksaan histopatologi dilakukan untuk menentukan spektrum efek toksik pada hewan uji setelah pemberian senyawa uji. Pemeriksaan ini juga dapat digunakan untuk melihat adanya kerusakan organ pada tingkat seluler yang tidak akan dapat teramati kalau hanya pemeriksaan secara makroskopis.

Setelah 24 jam dan setelah pengamatan 14 hari karena tidak ada kematian makan hewan uji dikorbankan untuk diambil beberapa organ pentingnya. Organ yang diambil meliputi hati, ginjal, paru, jantung, limfa, dan lambung. Setelah hewan uji dikorbankan dan didapat organ-organ pentingnya, maka terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan makroskopis pada organ-organ tersebut. Hasil pengamatan makroskopis dapat dilihat pada Tabel III.

Dari hasil pada tabel III terlihat bahwa tidak ada kelainan secara makroskopis sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak air tekelen tidak menyebabkan kelainan organ secara makroskopis. Selain secara makroskopis pengamatan ada tidaknya kelainan organ juga dilakukan secara mikroskopis dengan dibuat preparat histopatologis organ-organ penting tersebut yang diwarnai dengan hemaktosilineosin.

Tabel I. Jumlah kematian hewan uji setelah pemberian ekstrak air *E. riparium* Reg. secara oral dosis tunggal pada tikus

Kelompok	Jumlah Tikus Mati		
	Percobaan I	Percobaan II	Pengamatan 14 hari
Dosis 2000 mg/kgBB	0	0	0
Dosis 5000 mg/kgBB	0	0	0

Tabel II. Hasil pengamatan gejala toksik pada tikus SD 24 jam pertama setelah pemberian ekstrak air tekelan secara oral

Kelompok Perlakuan	HU	Gejala Toksik
Dosis 2000 mg/kgBB	1&3	Menjilat, keterpaksaan gerak, setelah 4 jam paralisis kaki belakang
	2	Menjilat, keterpaksaan gerak, sedikit paralisis kaki belakang
Dosis 5000 mg/kgBB	1,2 & 3	Seperti batuk2, <i>Small</i> pupil, sedasi, setelah 1,5 jam paralisis kaki belakang

Tabel III. Hasil pengamatan 24 jam dan 14 hari secara makroskopis organ – organ penting hewan uji karena pemberian ekstrak air tekelan

Waktu	Dosis (mg/kg BB)	Tikus	Keterangan
24 jam	2000	1, 2 dan 3	Tidak ada kelainan makroskopis
	5000	1,2 dan 3	Tidak ada kelainan makroskopis
14 hari	2000	1, 2 dan 3	Tidak ada kelainan makroskopis
	5000	1, 2 dan 3	Tidak ada kelainan makroskopis

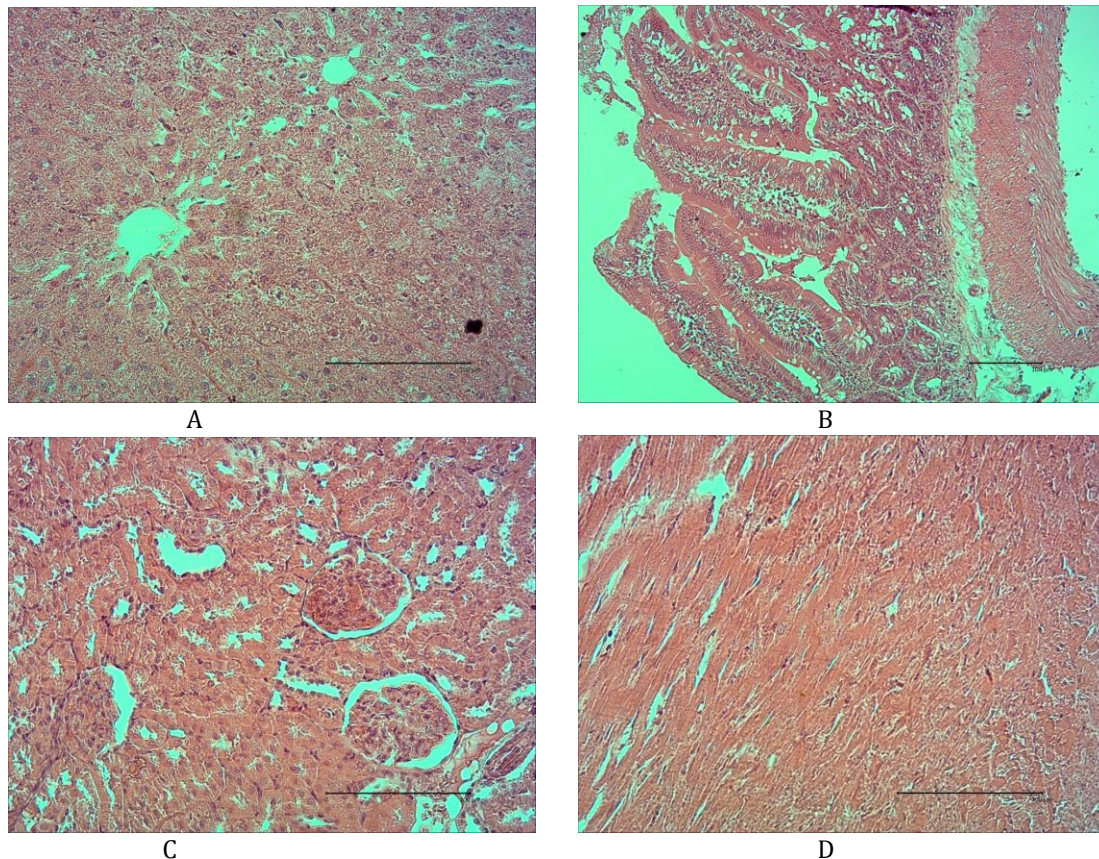
Tabel IV. Hasil pengamatan 24 jam dan 14 hari secara histopatologis organ – organ penting hewan uji karena pemberian ekstrak air tekelan

Tikus (dosis mg/kg BB)	Histopatologis Organ						
	Hati	Ginjal	Paru	Jantung	Limfa	Lambung	
24 jam (2000)	1	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.
	2	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.
	3	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.
14 hari (2000)	1	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.
	2	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.
	3	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.
24 jam (5000)	1	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.
	2	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.
	3	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.
14 hari (5000)	1	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.
	2	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.
	3	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.	t.a.p.

Keterangan : t.a.p. = tidak ada perubahan

Hasil histopatologis organ memperlihatkan tidak terjadi perubahan histopatologis organ pada tingkat seluler dari semua organ yang diambil untuk pemeriksaan histopatologis, baik pada pengamatan 24 jam maupun 14 hari. Hasil pemeriksaan histopatologis dapat dilihat pada tabel IV dan gambar 1.

Berdasarkan hasil histopatologis secara keseluruhan pada organ hati, ginjal, jantung, limfa, paru, dan lambung dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak air tekelan dosis tunggal pengamatan selama 24 jam dan 14 hari untuk melihat efek toksik yang tertunda, tidak menimbulkan efek toksik pada organ-organ tersebut.



Gambar 1. Histopatologi organ setelah pemberian akut ekstrak air *Eupatorium riparium* Reg. keseluruhan organ tampak tidak mengalami perubahan A. Hepar; B. Usus; C. Ginjal; D. Jantung.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat diambil suatu kesimpulan bahwa : Ekstrak air tekelan yang diberikan secara oral dosis tunggal pada tikus Sprague-Dawley mempunyai LD₅₀ perkiraan (cut-off) > 5000 mg/kg BB dan termasuk kategori tidak terklarifikasi, menimbulkan gejala toksik berupa paralisis pada anggota gerak terutama kaki belakang dan semakin tinggi dosis waktu terjadinya paralisis juga semakin pendek. Efek toksik bersifat reversibel. Tidak memberikan efek toksik pada organ-organ penting.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1993, *Pedoman Pengujian dan Pengembangan Fitofarmaka: Penapisan Farmakologi, Pengujian Fitokimia, dan Pengujian Klinik, Pengembangan dan Pemanfaatan Obat Bahan Alam*, Kelompok Kerja Ilmiah Phyto Medica, BPOM, Jakarta.
- Anonim, 1997, *Germplasm Resources Information Network (GRIN)*, United State Departement of Agriculture (USDA), http://www.assagrinn.gov/cgi-bin/npgs/html/tax_search.pl?Eupatorium%20riparium, diakses 18 Nopember 2010
- Anonim, 2001, *OECD Guideline For Testing Of Chemicals, Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method*, No. 423, OECD, Paris.
- Backer C. A., R.C. Bakhuizen van den Brink Jr., 1965, *Flora of Java (Spermatophytes Only)*, Vol. II, Wolters Noordhoff, Groningen, The Netherlands.
- Bhardwaj R., Singh A., Sharma O.P., Dawra R.K., Kurade N.P., Mahato S.B. 2001, Hepatotoxicity and cholestasis in rats induce by the sesquiterpene, 9-oxo-10, 11-dehydroageraphorone, isolated from *Eupatorium adenophorum*, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15 (5):279-86
- El-Seedi H.R., Sata N., Torssell K.B.G., Nishiyama S. 2002, New Labdene Diterpenes from *Eupatorium glutinosum*, *J. Nat. Prod.*, 2002, 65, 728-729.
- Huo J., Yang S.P., Ding J., Yue J.M. 2005, Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from *Eupatorium lindleyanum*, *J. Nat. Prod.*, 68 (1): 156.

- Katoch R., Sharma O.P., Dawra R.K., Kurade N.P. 2000, Hepatotoxicity of *Eupatorium adenophorum* to rats, *Toxicon*. Feb. 38(2): 309-14
- Mulyadi S.M., 1995, Isolasi dan Elusidasi Struktur kandungan Daun *Eupatorium inulifolium* yang Bersifat Sitotoksik, *Disertasi*, Fakultas Farmasi UGM, hal 1, 27-28.
- Matsubara T., 1999, Antihypertensive actions of methylripariochromene A from *Orthosiphon aristatus*, an Indonesian traditional medicinal plant, *Biol Pharm Bull*; 22 (10): 1083-1088.
- Fakhrudin N., Wahyuono S., Santosa D. 2007, Isolasi dan Identifikasi senyawa bioaktif dari *Eupatorium riparium* Reg. (# 04-KU-01-06) koleksi dari Taman Nasional Gunung Merapi, Yogyakarta, *Majalah Obat Tradisional*, vol. 11, no. 40, April-Juni, hal. 8-14.
- Nurlaila, Anggraeni M.N. 2011, Ketoksikan akut Ekstrak Air *Eupatorium Riparium* Reg. pada mencit jantan *Balb/C*, *Seminar Deseminasi Hasil Penelitian*, Fakultas Farmasi UGM
- Shen Y.C., Lo K.L., Kuo Y.H., Khail A.T. 2005, Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from *Eupatorium kiirunense*, a Coastal Plant of Taiwan, *J. Nat. Prod.*, 68 : 745-750.
- Syamsuhidayat S.S., Hutapea J.R. 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Edisi I, 240, Balai Penelitian Tanaman Obat, Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan RI, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Wahyuono S., Charles S.V., Datin M.M., Vera F., Purwantiingsih, Marchaban, 2009, Major Metabolites of Methylripariochromen-A, a Bioactive Substance in The Leaves of *Eupatorium riparium* Reg. in Male Rats Urine, *Makassar International Symposium on Pharmaceutical Science*.
- Woerdenbag H. J., 1993, *Eupatorium* Species in De Smet P. A. G. M., Keller, K., Hanzel, R., Chandler, R. F., (Editors), *Adverse Effects of Herbal Drugs*, Vol.2, 172 – 185, Springer-Verlag, Bewrlin Heidelberg.
- Yunita E.A., Suprpti N.H., Hidayat J.W. 2009, Pengaruh Ekstrak daun Teklan (*Eupatorium riparium* Reg.) terhadap Mortalitas dan Perkembangan Larva *Aedes aegypti*, *BIOMA*, 11(1), 11 – 17.