

IN VITRO INSECTICIDAL ACTIVITIES OF ETHANOL EXTRACT OF NEEM LEAVES AGAINST *Heterodoxus spiniger* LICE IN DOGS

I Made Merdana^{1*}, Monica Lewinsky¹ dan Ida Ayu Pasti Apsari²

¹Laboratorium Farmasi Veteriner, Departement Klinik Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana;

²Laboratorium Parasitologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

Jl. P.B. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234

* Alamat Korespondensi: imade_merdana@unud.ac.id

ABSTRACT

Heterodoxus spiniger is a chewing lice that have been reported to infest dogs and cats. This ectoparasite is haematophagous and as an intermediate host in transmission of cysticercoids and egg of nematode worms. This study aims to determine the in vitro insecticidal activity of ethanol extract of neem leaf (*Azadirachta indica*) against *H. spiniger*. A total of 250 *H. spiniger* were divided into five groups with five replications, namely: P0 as a negative control group given placebo, P1 as a positive control group given deltamethrin 0.5EC 0.05%, and groups P2, P3 and P4 were given ethanol extract of neem leaves with concentrations of 2.5%, 5% and 10%. In each test, 10 lice samples were put into a petridish with a cotton swab that had been sprayed with the solution of each treatment, then the lice were treated again with fine spray evenly. The results showed that the in vitro ethanol extract of neem leaves had a very significant effect ($P < 0.01$) on the mortality of *H. spiniger*. The best results are shown at 5% concentration which is capable of killing 100% of lice in 30 minutes. It can be concluded that the ethanol extract of neem leaf has insecticidal activity against *H. spiniger*.

Keywords: ethanol extract of neem leaf; *Heterodoxus spiniger*; insectisidal

PENDAHULUAN

Ektoparasit yang dilaporkan sering menginfeksi anjing dari kelas arachnida yaitu caplak dan tungau, dan dari kelas insekta yaitu pinjal dan kutu (Dobler dan Pfeffer, 2011; Puri *et al.*, 2014; Hada dan Soviana, 2015; Oke *et al.*, 2016; Kristianty *et al.*, 2018). Kutu merupakan insekta ektoparasit yang bersifat obligat permanen dan *host spesifik*. Terdapat dua jenis kutu yang umum menyerang anjing peliharaan yaitu *H. spiniger* dan *T. canis* (Hadi dan Soviana, 2010; Rao *et al.*, 2013). *H. spiniger* merupakan kutu pengunyah, termasuk kedalam famili Boopidae, sub ordo Amblycera, ordo Phthiraptera, dan kelas Insecta (Dantas-Torres and Otranto, 2014). Spesies ini termasuk haematophagous Mallophaga artinya memperoleh makanan dengan menghisap darah inang (Kristianty *et al.*, 2018). *H. spiniger* telah dilaporkan

menginfeksi anjing peliharaan, anjing liar dan hewan marsupialia (Robert dan Janovy, 2000). Penampilan anjing yang terinfeksi kutu menjadi kusam dan tidak menarik. Infeksi kutu dapat menyebabkan anemia, iritasi, reaksi hipersensitivitas, dermatitis, nekrosis kulit, kerontokan bulu, penurunan berat badan, dan memicu infeksi sekunder. Kutu juga diketahui sebagai inang perantara penularan beberapa cacing pita dan cacing nematoda ke hewan lainnya maupun manusia (Levine, 1994; Venzal *et al.*, 2012; Otranto *et al.*, 2013).

Berbagai metode penanggulangan infeksi kutu telah diupayakan dengan penggunaan insektisida sintetik melalui injeksi, penyemprotan, perendaman, bedak tabur dan juga sediaan sampo untuk mandi. Ivermectin, amitraz dan deltamethrin merupakan contoh insektisida pilihan untuk pengobatan ektoparasit (Plumb, 2008; Sardjana, 2012). Deltamethrin merupakan

pyrethroid sintetis yang bersifat neurotoksik, dilaporkan sukses untuk mengontrol ektoparasit pada peternakan (Elias, 2013). Tanpa disadari ketergantungan penggunaan pestisida sintetis telah menimbulkan resistensi dosis, tidak ramah lingkungan, dan bioakumulasi residunya telah mengurangi biodiversitas pada lingkungan dan tanah (Chaudhary *et al.*, 2017). Esch (2012), menyatakan bahwa telah terjadi resistensi terhadap beberapa produk pestisida sintetis untuk spesies ektoparasit tertentu. Dampak lainnya pemakaian berulang dapat berpengaruh buruk bagi kesehatan anjing dan juga membunuh makhluk bukan sasaran (Stenersen, 2004; Sumaryono *et al.*, 2013).

Faktor keamanan bagi hewan dan manusia penting dalam penggunaan pestisida untuk pengendalian ektoparasit. Sekarang ini penggunaan biopestisida semakin diminati oleh para penghobi karena dirasa lebih aman bagi hewan kesayangan. Penelitian pencarian bahan aktif alami yang berpotensi sebagai anti ektoparasit semakin berkembang pesat. Rotenon (senyawa flavonoid) yang terkandung pada akar tuba (*Derris elliptica*) efektif membunuh pinjal (Setiawan *et al.*, 2014) dan caplak (Hutasoit *et al.*, 2015), serta aman pada kulit kucing dan anjing (Anawenju *et al.*, 2014; Ginting *et al.*, 2015). Senyawa aktif sejenis pada pohon tuba juga ditemukan pada tanaman mimba.

Hasil penampisan tanaman mimba (*Azadirachta indica*, A. Juss) diketahui mengandung bahan aktif alkaloid, flavonoids, triterpenoids, karotenoids, steroids, keton, tannin dan quinon (Javandira *et al.*, 2016). Triterpenoid pada tanaman mimba disebut azadirachtin yang bekerja dengan cara *antifeedant*, *sterilant* dan menghambat regulasi hormone pertumbuhan pada serangga (Samsudin, 2011; Soni *et al.*, 2012). Azadirachtin bersifat neurotoxic

sehingga menyebabkan serangga mengalami paralisis dan mati (Roma *et al.*, 2013; Whiteford *et al.*, 2017). Penelitian lain menyebutkan berbagai ekstrak tanaman mimba 2% efektif membunuh serangga *A. Gossypii* pada tanaman nilam (Mardiningsih *et al.*, 2010), membunuh larva nyamuk *aedes aegypti* (Indrayani dan Sudarmaja, 2018). Ekstrak tanaman mimba secara in vivo mampu menurunkan infestasi caplak pada anjing (Wirawan *et al.*, 2010) dan secara in vitro ekstrak ethanol daun mimba konsentrasi 5% efektif membunuh caplak *Rhipicephalus sanguineus* (Merdana *et al.*, 2020). Melihat potensi bahan aktif pada tanaman mimba, maka dilakukan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas insektisidal ekstrak ethanol daun mimba terhadap ektoparasit *Heterodoxus spiniger*.

MATERI DAN METODE

Proses ekstraksi daun mimba

Pada penelitian ini daun mimba segar diambil dari Desa Jimbaran, Kecamatan Kuta, Badung, Bali, Indonesia. Daun tersebut dilakukan proses pembuatan simplisia pengeringan angin tanpa terpapar langsung sinar matahari. Simplisia kering serbuk daun mimba kemudian dimaserasi menggunakan ethanol (Alkohol 90%, One Med), dengan perbandingan volume 1:3 (b/v). Pada uji coba ini sebanyak 500 gram simplisia daun mimba direndam dengan 1,500 ml alkohol 90%, diaduk sampai tercampur merata dan didiamkan selama 72 jam. Selanjutnya campuran disaring menggunakan kain kasa untuk diambil filtratnya. Bagian ampas sesuai kebutuhan dapat dimaserasi kembali sesuai langkah pertama. Bagian filtrat kemudian di evaporasi menggunakan evaporator sampai diperoleh ekstrak daun mimba yang semisolid dan pekat (Zhang *et al.*, 2018).

Pembuatan larutan uji insektisidal ekstrak ethanol daun mimba

Pembuatan larutan ekstrak ethanol daun mimba untuk uji insektisidal dengan teknik kalibrasi. Untuk meningkatkan kelarutan ekstrak daun mimba digunakan pelarut Tween 80 2% (v/v) yang dibuat dengan melarutkan Tween 80 sebanyak 2 ml ditambahkan 98 ml aquadest. Larutan uji konsentrasi 2,5 % (b/v) dibuat dengan cara menimbang ekstrak ethanol daun mimba sebanyak 2,5 g lalu dimasukkan kedalam labu ukur dan ditambahkan pelarut Tween 80 2% sampai volumenya menjadi 100 ml. Langkah yang sama dilakukan untuk membuat larutan ekstrak ethanol daun mimba 5% (b/v) dan 10% (b/v). Larutan uji yang dibuat dimasukkan kedalam masing-masing sprayer yang telah diberi label untuk penelitian. Pembuatan konsentrasi larutan uji merujuk metode penelitian Muharsini *et al.* (2006) dan dimodifikasi dalam penelitian Setiawan *et al.* (2014) dan Hutasoit *et al.* (2015).

Pelaksanaan uji insektisidal ekstrak ethanol daun mimba

Pada tahap persiapan wadah Petri dish diberikan alas kapas sehingga tertutup merata bagian dasarnya, kemudian disemprot dengan masing-masing larutan uji secara merata. Penyemprotan secara halus ditetapkan sebanyak tiga kali *spray* (semprot). Selanjutnya kutu *H. spiniger* dewasa sebanyak 250 ekor yang dikoleksi dari anjing peliharaan, dibagi kedalam 5 kelompok perlakuan dengan 5 ulangan sehingga masing-masing Petri dish berisikan 10 ekor kutu, selanjutnya dilakukan penyemprotan kembali. Penyemprotan masing-masing kelompok yaitu P0 sebagai kontrol dengan pelarut Tween 80 2%, P1 sebagai kontrol positif dengan deltamethrin

0.5EC (Butox 50[®]) konsentrasi 0,05%, kelompok P2, P3, dan P4 secara berurutan dengan ekstrak ethanol daun mimba konsentrasi 2,5%, 5% dan 10%.

Setelah diberi perlakuan kemudian dilakukan pengamatan terhadap jumlah kutu yang mati berdasarkan waktu pengamatan yang telah ditentukan. Pada umumnya kutu *H. spiniger* akan selalu bergerak aktif pada Petri dish, dan kutu dinyatakan mati apabila tidak ada respon gerakan setelah diberikan rangsangan atau sentuhan halus menggunakan jarum pentul. Pengamatan untuk melihat jumlah kutu yang mati dilakukan pada menit ke-0 (sesaat setelah perlakuan sampai 1 menit pertama), 15, 30 dan 60. Jumlah kutu yang mati ditetapkan sebagai angka kematian akibat aktivitas insektisidal ekstrak ethanol daun mimba. Metode ini merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Setiawan *et al.*, (2014).

Analisis statistik

Data kematian kutu *H. spiniger* ditabulasi dan dinyatakan dengan persentase mortalitas, dan diuji menggunakan *one way Analysis of variance* dilanjutkan uji *Duncan* apabila terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak ethanol daun mimba memiliki aktivitas insektisidal terhadap *H. spiniger* secara *in vitro*. Kematian kutu terjadi mulai menit pertama setelah perlakuan ekstrak dan juga pada kontrol positif. Mortalitas kutu pada kelompok perlakuan ekstrak daun mimba konsentrasi 2,5% sebesar 90%, sementara pada konsentrasi ekstrak 5% dan 10% mortalitas tercapai 100%. Pada kelompok kontrol negatif dengan perlakuan placebo menggunakan pelarut tween 80 2% tidak

terjadi mortalitas (0%), sedangkan pada kelompok kontrol positif dengan perlakuan deltamethrin 0.5EC 0,05% terjadi mortalitas sebesar 98%. Mortalitas kutu *H. spiniger* setelah perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun mimba disajikan pada Tabel 1.

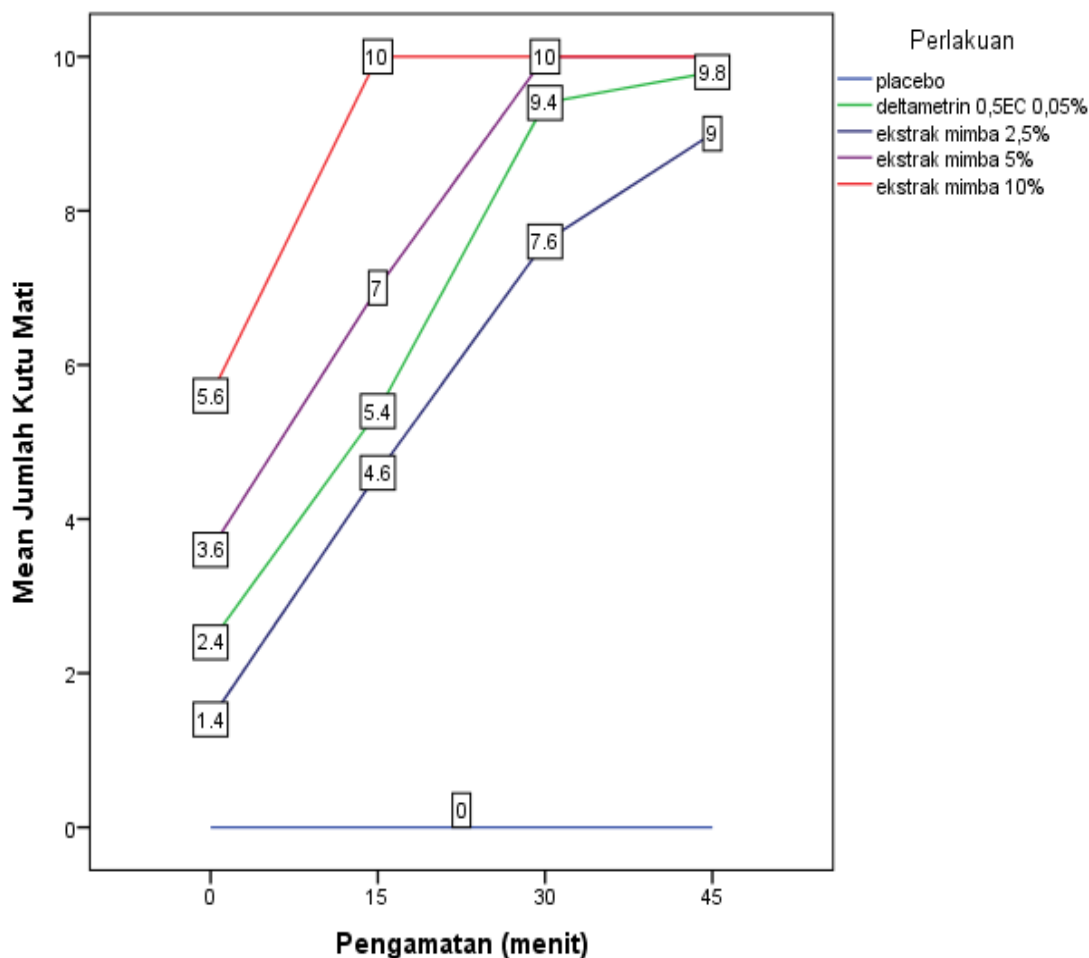
Analisis statistika menggunakan one way ANOVA menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun mimba berpengaruh sangat nyata ($P < 0.01$) terhadap kematian *H.*

spiniger secara *in vitro*. Untuk mengetahui pengaruh perbedaan konsentrasi dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil uji menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0.05$) terhadap mortalitas kutu *H. spiniger* diantara perlakuan ekstrak etanol daun mimba. Rerata mortalitas kutu tampak meningkat dan lebih cepat seiring meningkatnya konsentrasi larutan ekstrak etanol daun mimba, ditampilkan pada Gambar 1.

Tabel 1. Mortalitas *Heterodoxus spiniger* setelah perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun mimba

Kelompok	Waktu Pengamatan (menit ke-)	Jumlah Kutu awal (ekor)	Jumlah Kutu mati (ekor)	Mortalitas (%)
P0 (Placebo)	0	50	0	0
	15		0	0
	30		0	0
	45		0	0
P1 (Deltamethrin 0.5EC 0.05%)	0	50	12	24
	15		27	54
	30		47	94
	45		49	98
P2 (Ekstrak daun mimba 2.5 %)	0	50	7	14
	15		23	46
	30		38	76
	45		45	90
P3 (Ekstrak daun mimba 5 %)	0	50	18	36
	15		35	70
	30		50	100
	45			
P4 (Ekstrak daun mimba 10%)	0	50	28	56
	15		50	100
	30			
	45			

Keterangan: Mortalitas kutu setelah menit ke-45 tidak terjadi perubahan pada pengamatan menit ke-60 sampai 12 jam berikutnya, sehingga pengamatan dihentikan.



Gambar 1. Grafik kematian kutu *H. spiniger* setelah perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun mimba.

Metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman mimba yaitu alkaloid, flavonoids, triterpenoids, karotenoids, steroids, keton, tannin dan quinon (Javandira *et al*, 2016). Senyawa kompleks tetranor-triterpenoid limonoid pada tanaman mimba disebut dengan azadirachtin, yang menimbulkan efek toksik pada serangga. Molekul kimia azadirachtin berupa $C_{35}H_{44}O_{16}$, struktur molekul ini mirip dengan struktur hormon ecdysone pada serangga (Soni *et al.*, 2012). Azadirachtin bersifat neurotoksik yang menyebabkan serangga mengalami paralisis dan mati (Roma *et al.*, 2013). Senyawa azadirachtin

diduga berperan secara aktif meniru tahapan kerja hormon ecdysone (*ecdysone blocker*), dan juga mengganggu proses neuroendokrin (Samsudin, 2011; Soni *et al.*, 2012). Dampak yang ditimbulkan diantaranya sebagai antagonis pertumbuhan, efek antifeedant, gangguan perkembangan telur dan larva, kerusakan sistem reproduksi dan mandul, gangguan pembentukan kitin, sebagai repellan, gangguan sistem sirkulasi, gangguan sistem saraf, menghambat proses *moulting*, abnormalitas anatomi dan dapat mematikan serangga (Matsumura, 1985; Stenersen, 2004; Samsudin 2011; Boadu *et al.*, 2011). Pada penelitian ini, diyakini

aktivitas serupa dari azadirachtin menyebabkan mortalitas pada kutu *H. spiniger*.

Hasil penelitian mengungkapkan kekuatan dari azadirachtin pada tanaman mimba efektif mengendalikan serangga parasit pada bidang pertanian, peternakan, veteriner dan kesehatan masyarakat. Dilaporkan ekstrak daun mimba 2% mampu membunuh populasi kutu daun *A. gossypii* sampai 89,9% pada tanaman nilam (Mardiningsih *et al.*, 2010), dan toksik terhadap hama walang sangit dengan LD₅₀ dosis 29,3 % (Sumaryono *et al.*, 2013). Penelitian lain menyebutkan ekstrak tanaman mimba bersifat larvasidal terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* (Indrayani dan Sudarmaja, 2018), dan larva lalat *Sarchopaga* pada daging (Dewi *et al.*, 2017). Ekstrak tanaman mimba secara in vivo terbukti menurunkan infestasi caplak *Rhipicephalus spp* pada anjing (Wirawan *et al.*, 2010) dan juga efektif secara in vitro (Giglioti *et al.*, 2011; Roma *et al.*, 2013; Merdana *et al.*, 2020).

Aktivitas azadirachtin belum dipahami secara mendalam dan efek yang ditimbulkan bisa saja berbeda pada masing-masing spesies serangga target. Hal ini menentukan keamanan suatu bahan aktif sebagai kandidat pestisida, karena diharapkan dapat selektif terhadap serangga target dan bukan target (Whiteford *et al.*, 2017). *H. spiniger* merupakan kutu pengunyah masuk kedalam famili Boopidae, sub ordo Amblycera, ordo Phthiraptera, dan kelas Insecta (Dantas-Torres and Otranto, 2014). Insekta memiliki sistem pernafasan dan sistem sirkulasi yang terbuka dan tertutup, sistem saraf tangga tali yang dibentuk oleh serangkaian ganglion, serta sistem pencernaan buluh yang masih sederhana (Levine, 1994; Roma *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini diduga senyawa aktif ekstrak daun mimba masuk ke dalam tubuh *H. spiniger* saat penyemprotan

melalui spirakel, sistem pencernaan maupun organ sensorik lainnya seperti saraf tepi pada mata dan mulut (Stenersen, 2004). Segera setelah masuk melalui spirakel, azadirachtin akan diteruskan menuju trakhea dan trakheol, pada bagian ini terdapat sel trakheoblas tempat terjadinya pertukaran gas O₂ dan CO₂ yang memungkinkan azadirachtin ikut berdifusi masuk kedalam sistem sirkulasi hemolimfe menyebar keseluruh tubuh. Senyawa aktif ekstrak daun mimba merusak lapisan lemak tubuh serangga, dan juga menimbulkan kerusakan pada sistem ganglion dan saraf tepi (Matsumura, 1985). Mortalitas *H. spiniger* yang cepat terjadi pada menit ke-15 dengan konsentrasi ekstrak daun mimba 10% menimbulkan kematian 100%. Hal ini diduga karena tersedia cukup zat aktif untuk menimbulkan toksisitas pada sistem saraf serangga. Kerusakan sistem ganglion dan saraf tepi ini menyebabkan otot-otot tubuh mengalami paralisis. Kontraksi otot-otot tubuh pada dinding eksoskeleton bekerja untuk memompa udara masuk melalui spirakel (Levine, 1994), dengan paralisisnya otot tersebut menyebabkan kelumpuhan sistem pernafasan dan kematian. Mekanisme ini dapat menjelaskan bahwa azadirachtin bersifat neurotoksik (Roma *et al.*, 2013). Kematian yang cepat dalam hitungan menit juga terjadi pada caplak *R. sanguineus* dan *C. felis* yang diberikan paparan ekstrak akar tuba yang mengandung rotenone (Setiawan *et al.*, 2014; Hutasoit *et al.*, 2015).

Mekanisme kerja azadirachtin secara molekuler belum banyak diulas secara mendalam. Azadirachtin didalam tubuh serangga bekerja dengan cara menghambat transfer elektron antara kompleks protein besi sulfur (FeS) dengan koenzim ubiquinone (Ko-enzim Q) pada mitokondria. Pada kondisi normal siklus respirasi mitokondria sel terjadi proses oksidasi dan perpindahan elektron dari kompleks protein FeS ke Ubiquinon untuk membentuk ATP

yang dibutuhkan oleh tubuh untuk respirasi (Matsumura, 1985). Gangguan pada transfer elektron tersebut menyebabkan kekurangan energi yang berdampak pada gangguan proses fisiologis tubuh sampai kematian pada serangga. Hal ini berhubungan dengan kardiotoksitas, depresi respirasi, dan penghambatan pada konduksi sistem saraf (Katzung, 2004).

Senyawa aktif sejenis juga ditemukan pada tanaman mimba (*Azadirachta indica*, A. Juss), sehingga sangat potensial dikembangkan sebagai insektisida alami. Senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman mimba meliputi alkaloid, steroid, flavonoid, triterpenoid, polyfenol, tanin dan kuinon (Javandira *et al.*, 2016; Whiteford *et al.*, 2017).

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun mimba memiliki aktivitas insektisidal terhadap kutu *H. spiniger* pada anjing secara *in vitro*. Hasil yang paling efektif membunuh kutu hingga mencapai mortalitas 100% ditunjukkan pada konsentrasi 5% dengan waktu paparan 30 menit. Kedepannya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan lethal dosis dan dosis efektif insektisidal ekstrak etanol daun mimba terhadap *H. spiniger*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anawenju, A.Y.R., Siswanto, dan I.M. Merdana. 2014. Uji toksisitas ekstrak akar tuba secara topikal pada kucing lokal. **Indonesia Mediscus Veterinus**. 3(4): 266-273.
- Boadu, K.O., M.A. Anang, S.K. Tulashie, J. Kpan. 2011. Production of natural insecticide from neem leaves (*Azadirachta indica*). **Asian Journal of Plant Science and Research**. 1(4):33-38.
- Chaudhary, S., R.K. Kanwar, A. Sehgal, D.M. Cahill, C. J. Barrow, R. Sehgal, and J.R. Kanwar. 2017. Progress on azadirachta indica based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. **Frontiers in Plant Science**. Vol. 8: 610.
- Dewi, A.A.L., I.W. Karta, N.L. Candrawati, dan N.M.A. Dewi. 2017. Uji Efektivitas larvasida daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap larva lalat sarcophaga pada daging untuk upakara yadnya di Bali. **Jurnal Sains dan Teknologi**. 6(1): 2303-3142.
- Dobler, G., and M. Pfeffer. 2011. Review fleas as parasites of the family canidae. **Parasites and Vectors**. 4(139): 1-12.
- Elias, P. 2013. The Use of Deltamethrin on Farm Animals. Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies. **Stanislav Trdan. IntechOpen**, DOI: 10.5772/54839.
- Esch, S.A.v.d. 2012. **Role of neem animal health**. The 6th World neem conference. Nagpur, India.
- Hadi, U.K., and S. Soviana. 2015. Prevalence of ticks and tick-borne diseases in Indonesian dogs. **J. Vet. Sci. Technol**. 7(3): 15-20.
- Oke, P.O., T.T. Apaa, B. Oke-Egbodo. 2016. A case of canine pediculosis caused by *Heterodoxus spiniger* in a 6 week old male mongrel breed of dog. **IOSR-JAVS**. 9(2): 72-76.
- Hutasoit, I.H., Siswanto, dan I.M. Merdana. 2015. Uji efektivitas ekstrak akar tuba (*Derris elliptica*) terhadap caplak anjing secara *in vitro*. **Indonesia Mediscus Veterinus**. 4(2):122-128.
- Gigliotia, R., M.R. Forimb, H.N. Oliveiraa, A.C.S. Chagasc, J. Ferrezinid, L.G. Britoe, T.O.R.S. Falcokif, L.G. Albuquerquea, and M.C.S. Oliveirac. 2011. In vitro acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**. 181(4): 309-315.
- Ginting, F.C.B., Siswanto, dan I.M. Merdana. 2015. Uji toksisitas ekstrak akar tuba (*Derris elliptica*) secara topikal pada kulit anjing lokal. **Indonesia Mediscus Veterinus**. 4(2):97-103.
- Indrayani, L.M., dan I.M. Sudarmaja. 2018. Efektivitas ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap kematian larva nyamuk aedes aegypti. **E-Jurnal Medika**. 7(1): 6-9.
- Javandira, C., I.K. Widnyana, dan I.G.A. Suryadarmawan. 2016. Kajian fitokimia dan potensi ekstrak daun tanaman mimba (*Azadirachta indica*, A. Juss) sebagai pestisida nabati. **Prosiding Seminar Nasional**. Unmas Denpasar. Hal: 402-406.
- Kristianty, T.A., Z. Ichsaninayati, dan S. Arifah. 2018. Infeksi *Heterodoxus spiniger* pada *Canis lupus familiaris*. **ARSHI Vet. Lett**. 2(4): 61-62.
- Katzung BG. 2004. **Basic and Clinical Pharmacology**. 9th. The McGraw-Hill Companies. United State.
- Levine, N.D. 1994. **Buku Ajar Parasitologi Veteriner**. Yogyakarta. Terjemahan: G. Ashandi. Gadjah Mada University Press.
- Mardiningsih, T.L., C. Sukmana, N. Tarigan, dan S. Surati. 2010. Efektivitas insektisida nabati berbahan aktif azadirachtin dan saponin terhadap mortalitas dan intensitas serangan *Aphis gossypii* Glover. **Buletin Littro**. 21(2):171-183.

- Matsumura, F. 1985. *Toxicology of Pesticides*. Plenum Press. New York. Pp: 17-22.
- Merdana, I.M., I.A.P. Hapsari, dan F. Muslih. 2020. Efektivitas ekstrak ethanol daun mimba terhadap *Rhipicephalus sanguineus* secara in vitro. **Buletin Veteriner Udayana**. 12(1): 86-91.
- Otranto, D., F. Dantas-Torres, E. Brianti, D. Traversa, D. Petrić, C. Genchi, and G. Capelli. 2013. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. **Paras. Vect.** 6:16.
- Plumb, D.C. 2008. *Veterinary Drug Handbook*. Sixth Edition. Iowa. Blackwell Publishing Professional.
- Puri, K.M. Dahelmi, dan Mairawita. 2014. Jenis-jenis dan prevalensi ektoparasit pada anjing peliharaan. **Jurnal Biologi Universitas Andalas**. 3(3): 183-187.
- Stenersen, J. 2004. **Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology**. CRC Press.
- Roma, G.C., M.I.C. Mathias, P.R. Oliveira, K.C.S Furquim, and G.H. Bechara. 2013. Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks; Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. **Vet. Parasitol.** 196(3): 482-491.
- Samsudin. 2011. Biosintesa Dan Cara Kerja Azadirachtin Sebagai Bahan Aktif Insektisida Nabati. **Prosiding Seminar Nasional Pestisida Nabati IV**. Jakarta
- Sardjana, I.K.W. 2012. Pengobatan demodekosis pada anjing di rumah sakit hewan pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. **Veterna Medika J Klin Vet.** 1(1): 9-14.
- Setiawan, P.H., Siswanto, dan I.M. Merdana. 2014. Ekstrak akar tuba (*Derris elliptica*) efektif membunuh pinjal (Siphonaptera) kucing secara in vitro. **Indonesia Mediscus Veterinus**. 3(5):323-429.
- Soni, H., K. Mishra, S. Sharma, and A.K. Singhai. 2012. Characterization of azadirachtin from ethanolic extract of leaves of *Azadirachta indica*. *Journal of Pharmacy Research*. 5(1): 199-201.
- Stenersen, J. 2004. **Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology**. CRC Press.
- Sumaryono, Latifah, dan S.M.R. Sedyawati. 2013. Identifikasi dan Uji Toksisitas Azadirachtin dari Daun Mimba Sebagai Bioinsektisida Walang Sangit. *Indonesia Journal of Chemical Science*. 2(1): 45-50.
- Whiteford, F., T. Fuhremann, K.S. Rao, and J.E. Klaunig. 2017 **Pesticide Toxicology; Evaluating Safety and Risk**. Purdue University. Cooperative Extension Service. West Lafayette.
- Zhang, Q.W., L.G. Lin, and W.C. Ye. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. **Chin. Med.** 13:20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.