

AKTIVITAS REPELAN MINYAK ATSIRI DAUN JERUK PONTIANAK (*Citrus nobilis* Lour.) TERHADAP NYAMUK *Aedes aegypti* L. DENGAN METODE WHOPES

Annisa Firdausi, M. Andrie, Sri Luliana

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura

ABSTRAK

Nyamuk *Ae. aegypti* L. merupakan vektor penyakit demam berdarah *dengue* (DBD) di Kalimantan Barat. Masyarakat menggunakan repelan berbahan alam sebagai proteksi diri dari gigitan nyamuk. Repelan berbahan alam seperti minyak atsiri daun jeruk Pontianak (*C. nobilis* Lour.), bersifat aman dan ramah lingkungan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas repelan minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. dan menentukan dosis efektif median (ED₅₀) serta dosis efektif maksimal (ED₉₉) minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. dengan metode WHOPES. Tahapan dalam penelitian ini meliputi determinasi tanaman, destilasi, penentuan mutu minyak atsiri, skrining fitokimia dan pengujian aktivitas repelan. Analisis menggunakan *One-Way* ANOVA menunjukkan minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. memiliki aktivitas sebagai repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. ditandai dengan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) persentase daya proteksi antara perlakuan kontrol negatif (etanol 70%) dan larutan uji (seri konsentrasi 10; 20; 30; 40 dan 50%). Penentuan dosis efektif menggunakan regresi probit menunjukkan dosis efektif median (ED₅₀) dan dosis efektif maksimal (ED₉₉) minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. sebagai repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. masing- masing pada konsentrasi 18,44 dan 65,52%.

Kata kunci: Repelan, minyak atsiri, daun *Citrus nobilis* Lour., *Aedes aegypti* L., metode WHOPES.

REPELLENT ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF PONTIANAK ORANGE (*Citrus nobilis* Lour.) LEAVES AGAINST *Aedes aegypti* L. USING WHOPES METHOD

ABSTRACT

The *Ae. aegypti* L. mosquito is vector of dengue haemorrhagic fever (DHF) in West Kalimantan. People use the natural repellent as personal protection from mosquito bites. The natural repellent such as essential oils from Pontianak orange leaves (*C. nobilis* Lour.), is safe and environmentally friendly. The aim of this study is to determine the repellent activity, median effective dose (ED₅₀) and maximum effective dose (ED₉₉) of essential oil from *C. nobilis* Lour. leaves against *Ae. aegypti* L. using WHOPES method. The test were including plant determination, distillation, characterization of essential oils, phytochemical screening and repellent activity. Analysis using *One-Way* ANOVA showed the essential oil from *C. nobilis* Lour. leaves have activity as repellent against *Ae. aegypti* L. indicated by a significant difference in the percentage of protection ($p < 0.05$) between the treatment of negative control (ethanol 70%) and test solutions (serial concentrations of 10; 20; 30; 40 and 50%). Determination of an effective dose using probit regression showed the median effective dose (ED₅₀) and the maximum effective dose (ED₉₉) of essential oils from *C. nobilis* Lour. leaves as repelan against *Ae. aegypti* L. is 18,44 and 65,52%.

Keywords : Repellent, essential oils, *Citrus nobilis* Lour.leaves, *Aedes aegypti* L., WHOPEs method.

PENDAHULUAN

Nyamuk *Ae. aegypti* L. merupakan vektor penyakit menular demam berdarah *dengue* (DBD) di Kalimantan Barat ⁽¹⁾. Pada tahun 2014, angka kesakitan dan angka kematian DBD di Kalimantan Barat sebesar 5049 dan 68 kasus ⁽²⁾. Masyarakat menggunakan berbagai cara untuk mengusir nyamuk agar terhindar dari penyakit DBD, salah satunya menggunakan repelan berbahan alam yang aman dan ramah lingkungan ⁽³⁾. Beberapa penelitian repelan bahan alam menggunakan minyak atsiri dari buah *C. aurantifolia*, *C. aurantium*, *C. hystrix*, *C. maxima*, *C. medica*, *C. retikular*, *C. sinensis* dan *C. microcarpa* menunjukkan senyawa terpenoid yang terkandung didalamnya berpotensi sebagai repelan terhadap *Ae. aegypti* L. dan *Cx. quinquefasciatus* S. ⁽⁴⁾.

Provinsi Kalimantan Barat merupakan daerah penghasil jeruk unggulan nasional yaitu jeruk Pontianak (*Citrus nobilis* Lour.) ⁽⁵⁾, yang mana daunnya mengandung minyak atsiri (rendemen sebesar 0,431%) dengan komponen utama limonen 14,08%, linalool 11,62%, dan sitronelal 10,64% ⁽⁶⁾. Berdasarkan kondisi tersebut, perlu dilakukan penelitian mengenai aktivitas repelan minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour.

Metode uji repelan telah banyak dikembangkan, salah satunya metode WHOPEs (*World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme*) tahun 2009, yang mana metode ini menggunakan probandus manusia sehingga hasil akhir pengujian menggambarkan penggunaan repelan yang sebenarnya ⁽⁷⁾.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya aktivitas repelan dan menentukan dosis efektif median (ED₅₀) dan dosis efektif maksimal (ED₉₉) minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. sebagai repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L menggunakan metode WHOPEs 2009.

METODE

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat destilasi uap langsung, aspirator, kandang uji nyamuk (25 x 25 x 25 cm), kandang pemeliharaan nyamuk (45 x 45 x 45 cm), mikropipet (LABMate[®] 100-1000 µL), labu ukur (PYREX[®] 10 mL), *counter* dan sarung tangan.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *C. nobilis* Lour., pereaksi Lieberman-Burchard, etanol 70% dan akuades.

Pengolahan Simplisia dan Destilasi Uap Langsung

Daun jeruk Pontianak yang diperoleh dari Desa Kalimas Proyek, Kecamatan Sungai Kakap, Kabupaten Kubu Raya, Kalimantan Barat pada bulan April dan Mei 2015 diidentifikasi di Herbarium Bogoriense, bidang Botani Pusat Penelitian Laboratorium Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor, memberikan identitas tanaman berasal dari genus *Citrus* dan spesies *Citrus nobilis* Lour.

Daun *C. nobilis* Lour. diolah menjadi simplisia segar sebanyak 16 kg dan didestilasi secara bertahap menggunakan metode destilasi uap langsung pada suhu 98-99 °C. Setiap destilasi menggunakan pelarut akuades sebanyak ±4 L dan simplisia segar sebanyak 2-3 kg. Destilasi uap langsung menghasilkan minyak atsiri sebanyak 54 mL. Minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. memberikan penampakan organoleptik berupa cairan jernih berwarna kuning dan berbau khas tanaman jeruk. Minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. dan memiliki bobot jenis sebesar 0,86 g/mL, rendemen sebesar 0,29 % serta indeks bias sebesar 1,48. Skrining fitokimia minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. menunjukkan hasil positif mengandung senyawa terpenoid.

Pengujian Aktivitas Repelan Metode WHOPEs

Hewan Uji

Hewan percobaan pada penelitian ini adalah nyamuk betina dewasa dari koloni steril nyamuk *Ae. aegypti* L. yang berasal dari Balai Penelitian dan Pengembangan P2B2 Tanah Bumbu, Kalimantan Selatan. Nyamuk *Ae. aegypti* L. ditempatkan dalam kandang pemeliharaan berukuran 45 x 45 x 45 cm dan dikondisikan pada suhu 27±2°C, kelembaban relatif 60-80%; dan periode pencahayaan 12:12 (terang : gelap) ⁽⁷⁾.

Persiapan Probandus

Pengujian aktivitas repelan metode WHOPEs menggunakan teknik gigitan pada lengan manusia (probandus). Probandus berjumlah 3 orang yang memenuhi kriteria inklusi yaitu sehat, berusia 17-44 tahun, tidak memiliki riwayat penyakit DBD, malaria dan filariasis, tidak memiliki riwayat alergi, dan tidak memiliki luka di bagian lengan. Probandus tidak menggunakan produk wangi-wangian dan produk repelan serta tidak merokok. Area aplikasi uji repelan adalah lengan bawah (pergelangan tangan hingga siku) ⁽⁷⁾.

Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. terdiri atas 5 seri konsentrasi, yaitu 10; 20; 30; 40 dan 50% dalam 10 mL larutan dengan pelarut etanol 70% ⁽⁴⁸⁾.

Kondisi Pengujian

Pengujian aktivitas repelan menggunakan 3 buah kandang uji berukuran 25 x 25 x 25 cm, ditempatkan pada suhu $27 \pm 2^\circ\text{C}$, kelembaban relatif 60-80%; dan periode pencahayaan 12:12 (terang:gelap). Setiap kandang uji berisi 50 ekor nyamuk betina dewasa *Ae. aegypti* L. dalam keadaan puasa (tidak diberi makan 12 jam sebelumnya). Periode pengujian nyamuk *Ae. aegypti* L. pada pagi hari ^(3,7,10).

Pengujian Repelan Minyak Atsiri Daun *C. nobilis* Lour.

Pengujian aktivitas repelan terdiri dari perlakuan kontrol negatif (etanol 70%) dan perlakuan dengan larutan uji. Pengujian dimulai dengan perlakuan kontrol negatif pada lengan kiri, yang mana lengan kiri probandus diolesi etanol 70% kemudian lengan kiri dimasukkan ke dalam kandang uji selama 30 detik. Jika nyamuk yang hinggap 10 ekor, maka pengujian dilanjutkan dengan larutan uji.

Selanjutnya perlakuan dengan larutan uji pada lengan kiri, yang mana

lengan kiri yang sama diolesi minyak atsiri dengan konsentrasi paling rendah yaitu 10%, kemudian lengan kiri dimasukkan ke dalam kandang uji selama 30 detik untuk diamati jumlah nyamuk yang hinggap pada lengan probandus. Prosedur tersebut dilakukan pula pada seri konsentrasi larutan uji lainnya (20; 30; 40 dan 50%).

Pengujian diakhiri dengan perlakuan kontrol negatif pada lengan kanan, yang mana lengan kanan probandus diolesi etanol 70% kemudian lengan kanan dimasukkan ke dalam kandang uji selama 30 detik. Jika nyamuk yang hinggap 10 ekor, maka pengujian dapat diterima ^(7,10).

Analisis Data

Data yang diperoleh berupa data jumlah nyamuk hinggap dan diolah menjadi data persentase daya proteksi dengan persamaan berikut ⁽⁷⁾:

$$\text{Persentase Daya Proteksi } \% = \frac{C - T}{C}$$

Keterangan:

ΣC adalah rerata jumlah nyamuk hinggap pada perlakuan kontrol negatif;
 ΣT adalah jumlah nyamuk hinggap pada perlakuan kelompok uji.

Data persentase daya proteksi dianalisis secara statistik menggunakan aplikasi PASW (*Predictive Analytics Soft Ware*) *Statistic* 18 yaitu analisa *One-Way ANOVA* dan regresi *probit-plane* untuk menentukan ED_{50} dan ED_{99} .

HASIL

Pengujian aktivitas repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. dilaksanakan selama 3 hari pada pagi hari. Hasil pengujian aktivitas repelan terhadap

nyamuk *Ae. aegypti* L. berupa data persentase daya proteksi minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. (Tabel 1).

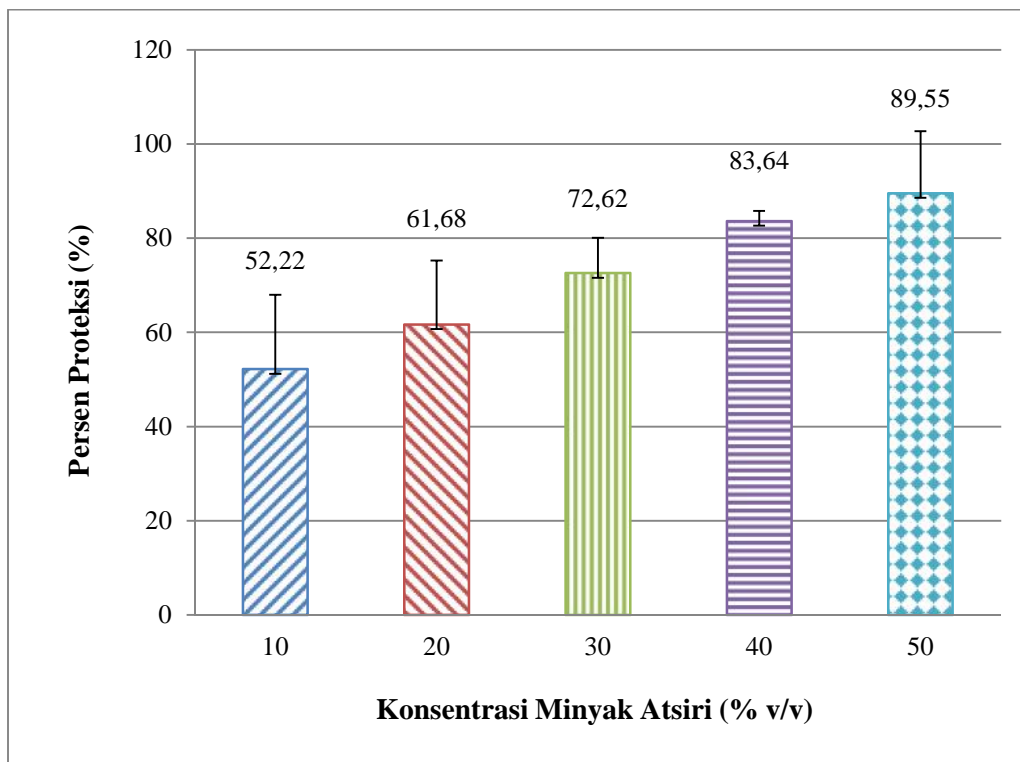
Tabel 1. Rerata Persentase Daya Proteksi Keseluruhan Minyak Atsiri Daun *C. nobilis* Lour. Terhadap Nyamuk *Ae. aegypti* L.

Perlakuan	Rerata Persen Proteksi Replikasi (%)			Rerata Persen Proteksi (%) Probandus ± SD
	Probandus I	Probandus II	Probandus III	
Rerata K(-)	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00
MA 10%	50,54	68,75	37,37	52,22 ± 15,76
MA 20%	59,11	76,39	49,55	61,68 ± 13,60
MA 30%	74,21	79,17	64,47	72,62 ± 7,48
MA 40%	82,64	86,11	82,18	83,64 ± 2,15
MA 50%	74,34	97,22	97,10	89,55 ± 13,18

Keterangan:

K (-) adalah perlakuan dengan kontrol negatif pada lengan kiri dan kanan;

MA 10–50% adalah perlakuan dengan larutan uji dengan konsentrasi 10 – 50% ml/ml (v/v).



Gambar 1. Grafik Rerata Persentase Daya Proteksi Minyak Atsiri Daun *C. nobilis* Lour. Terhadap Nyamuk *Ae. aegypti* L.

Data persentase daya proteksi pada pengujian aktivitas repelelan minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. menunjukkan bahwa semua seri konsentrasi larutan uji memberikan daya proteksi terhadap nyamuk, yang mana persentase daya proteksi pada konsentrasi 10; 20; 30; 40 dan 50% masing-masing sebesar 52,22; 61,68; 72,62; 83,64 dan 89,55% (Gambar 1).

Data persentase daya proteksi dianalisis secara statistik menggunakan perangkat PAWS *Statistic* 18 untuk mengetahui perbedaan signifikan persentase daya proteksi pada semua kelompok dalam penelitian menggunakan uji *One-Way* ANOVA serta penentuan ED₅₀ dan ED₉₉ menggunakan metode regresi probit.

Hasil uji *One-Way* ANOVA antara semua kelompok penelitian (perlakuan kontrol negatif dan larutan uji) menunjukkan nilai signifikan $p = 0,000$ ($p < 0,05$), hal ini menyatakan bahwa terdapat perbedaan persentase daya proteksi antar kelompok.

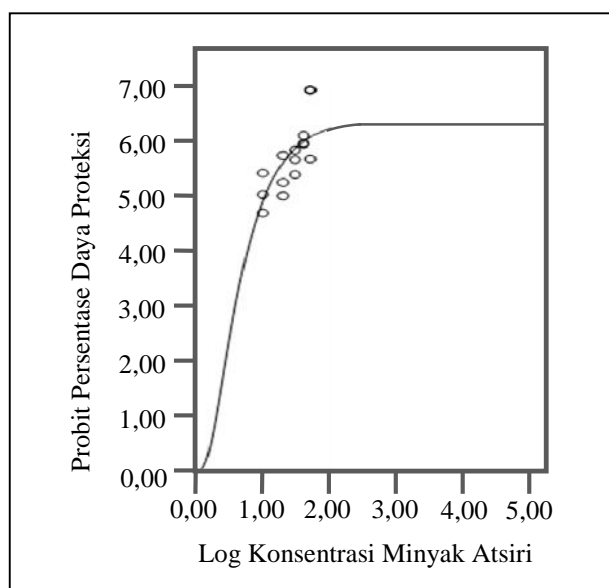
Uji lanjutan (*Post Hoc*) bertujuan untuk melihat adanya perbedaan signifikan antar kelompok penelitian. Hasil dari analisis uji lanjutan perbedaan persentase daya proteksi menunjukkan nilai signifikansi $p < 0,05$ antara kelompok perlakuan kontrol negatif (konsentrasi 0%) dan kelompok perlakuan larutan uji

(konsentrasi 10-50%). Perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan kontrol negatif (konsentrasi 0%) dan kelompok perlakuan larutan uji (konsentrasi 10-50%) menunjukkan bahwa larutan uji memiliki aktivitas repelan atau memberikan efek proteksi terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. Selanjutnya perbedaan antar perlakuan larutan uji terdapat perbedaan persentase daya proteksi yang bermakna antar konsentrasi berikut: 10% dengan 40 dan 50%; 40% dengan 10%; serta 50% dengan 10%. Persentase daya proteksi pada perlakuan larutan uji konsentrasi 20 dan 30% tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan persentase daya proteksi konsentrasi lainnya.

Data persentase daya proteksi selanjutnya juga dianalisis menggunakan metode regresi probit untuk menentukan nilai dosis efektif median (ED₅₀) dan dosis efektif maksimal (ED₉₉). Nilai ED₅₀ dan ED₉₉ menunjukkan konsentrasi yang dapat menimbulkan daya proteksi sebesar 50 dan 99% terhadap nyamuk dalam kandang uji selama 30 detik⁽⁵⁰⁾. Nilai ED₅₀ dan ED₉₉ minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. sebagai repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. masing-masing pada konsentrasi 18,44 dan 65,52% (Tabel 2). Analisis regresi probit menunjukkan probabilitas hubungan antara probit persentase daya dan konsentrasi minyak atsiri proteksi (Gambar 2).

Tabel 2. Nilai ED₅₀ dan ED₉₉ Minyak Atsiri Daun *C. nobilis* Lour. Sebagai Repelan Terhadap Nyamuk *Ae. aegypti* L.

	Konsentrasi Minyak Atsiri (% v/v)	Batas Atas	Batas Bawah
ED ₅₀	18,44	11,46	24,04
ED ₉₉	65,52	53,08	91,29



Gambar 2. Grafik Sigmoid Probit Persentase Daya Proteksi dan Log Konsentrasi Minyak Atsiri Daun *C. nobilis* Lour.

PEMBAHASAN

Pengujian aktivitas repelan dimulai dengan orientasi pengujian terhadap spesies nyamuk *Cx. quinquefasciatus* S. dan *Ae. aegypti* L. yang berada di laboratorium Entomologi, Balai Penelitian dan Pengembangan P2B2 Tanah Bumbu.

Orientasi pengujian terhadap nyamuk *Cx. quinquefasciatus* S. dilakukan selama 9 hari. Selama orientasi dilakukan berbagai upaya optimalisasi pengujian aktivitas repelan, seperti perubahan waktu pengujian menjadi malam hari,

perpanjangan periode pengujian tiap perlakuan (1 – 2 menit), perpanjangan waktu puasa nyamuk (12 – 18 jam), penangkapan nyamuk dengan metode umpan, penempatan nyamuk betina dan nyamuk jantan dalam kandang uji, penambahan populasi nyamuk dalam kandang uji (50 – 100 ekor nyamuk), pengkondisian kandang uji sesuai kandang pemeliharaan dan penggunaan kandang pemeliharaan sebagai kandang uji. Namun orientasi terhadap nyamuk ini tidak memberikan respon yang baik.

Pengembangbiakan nyamuk ini memerlukan waktu yang cukup lama sehingga tidak dilakukan pengujian aktivitas repelan terhadap nyamuk *Cx. quinquefasciatus* S.

Orientasi pengujian terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. selama satu hari memberikan hasil berupa respon nyamuk yang baik dan dilanjutkan dengan pengujian aktivitas repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. Nyamuk betina *Ae. aegypti* L. menghisap darah untuk membantu perkembangan telurnya. Nyamuk menghisap darah manusia, karena tertarik dengan adanya karbon dioksida, produk ekskresi dan asam laktat di tubuh manusia yang dikenali sebagai molekul bau oleh reseptor nyamuk. Mekanisme kerja minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. sebagai repelan nyamuk yaitu aroma minyak atsiri menghalangi molekul bau tubuh manusia menuju reseptor bau nyamuk yang menyebabkan kegagalan deteksi keberadaan tubuh manusia karena terjadi gangguan dalam pengenalan bau oleh otak nyamuk⁽¹¹⁾. Molekul bau berikatan dengan *odorant-binding proteins* (OBPs) yang kemudian dibawa menuju *olfactory receptor neurons* (ORNs). Molekul bau ditransmisikan ke lobus antena nyamuk memunculkan respon berupa tingkah laku nyamuk menghindari bau minyak atsiri tersebut⁽¹²⁾.

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak atsiri daun *C. nobilis* Lour. memiliki aktivitas sebagai repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. dengan dosis efektif median (ED₅₀) dan dosis efektif maksimal (ED₉₉) masing-masing sebesar 18,44 dan 65,52 %.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang turut membantu sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

1. Indonesia. Pusat Data dan Surveilans Epidemiologi. Buletin Jendela Epidemiologi. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Volume 2; 2010. Hal 26.
2. Indonesia. Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Barat. Data Kesakitan dan Kematian DBD Tahun 2009-2014 Provinsi Kalimantan Barat. Pontianak: Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Barat; 2015.
3. Patel EK, Gupta A, Oswal RJ. A Review On: Mosquito Repellent Methods. International Journal Of Pharmaceutical, Chemical And Biological Sciences. IJPCBS. 2012; 2(3): 310-317.
4. Phukerd U, Soonwera M, Wongnet O. Repellent activity of essential oils from Rutaceae plants against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). Journal of Agricultural Technology. 2013; 9(6): 1585-1594.
5. Naharsari ND. Bercocok Tanam Jeruk. Jakarta : Azka Press; 2007.

6. Kartini E, Jayuska A, AlimuddinAH. Uji Aktivitas Biotermitisida Minyak Atsiri Daun *Citrus nobilis* Lour Terhadap Rayap Tanah (*Coptotermes curvignathus* sp.). Jurnal Kimia Khatulistiwa. 2014; 3(1): 1.
7. World Health Organization. Guidelines For Efficacy Testing Of Mosquito Repellents For Human Skin. Control Of Neglected Tropical Diseases. World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme; 2009. Hal 3-8.
8. Kristanti AN, Aminah NS, Tanjung M, Kurniadi B. Buku Ajar Fitokimia. Surabaya: Airlangga University Press; 2008. Hal 48-50, 54.
9. Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas 2nd edition. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg ; 2001. Hal 151, 152, 358.
10. Schreck CE, McGovern TP. Repellents and other personal protection strategies against *Aedes albopictus*. J. Am. Mosq. Contr. Assoc; 1989. Hal 247-252.
11. Elissa AH, Nicole FA, Laurence J, John R. Olfaction: Mosquito receptor for human-sweat odorant. Nature. 2004: 212–213.
12. Paluch G, Bartholomay L, Coats J. Mosquito Repellents: A Review Of Chemical Structure Diversity And Olfaction. Pest Management Science. 2009; 66: 925– 935.