

Mosquito Repellent Bioactivity Combination Extract Of Nutmeg Leaf (*Myristica fragrans* Houtt), Lemongrass (*Cymbopogon nardus* L.) and *Apis dorsata* Binghami Nests

Meisa Tabita Rogahang¹, Orbanus Naharia², Yermia Samuel Mocosuli^{3*}

¹Program Studi Magister Biologi, Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam dan Kebumian, Universitas Negeri Manado, Tondano, Indonesia;

²Program Studi Biologi, Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam dan Kebumian, Universitas Negeri Manado, Tondano, Indonesia;

³Laboratorium Bioaktivitas dan Biologi Molekuler, Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam dan Kebumian, Universitas Negeri Manado, Tondano, Indonesia;

Article History

Received : May 24th, 2023

Revised : June 28th, 2023

Accepted : July 09th, 2023

*Corresponding Author:

Mocosuli Yermia Samuel,
Laboratorium Bioaktivitas dan
Biologi Molekuler, Fakultas
Matematika Ilmu Pengetahuan
Alam dan Kebumian,
Universitas Negeri Manado,
Tondano, Indonesia;
Email:

yermiamocosuli@unima.ac.id

Abstract: Nutmeg leaf, lemongrass, and bee nests contain bioactive compounds that have potential as mosquito repellents. The purpose of this study was to learn about the bioactivity of a combination extract of nutmeg leaf, lemongrass, and bee nests, as well as to determine the efficient mosquito repellent lotion recipe from a combination of nutmeg leaf, lemongrass, and bee nests extract. The maceration process was used for extraction. Total flavonoid content was estimated by comparing it to the flavonoid quercetin. The absorbance value was measured with a UV-Vis spectrophotometer. The concentration of the extract combination in the lotion used was 0%, 2.5%, 5% and 10%. The total flavonoid concentration was found to be 16.67 mgQE/g. The 2.5% formula lotion has a protective power of 22%, the 5% formula lotion has a power of 62.96%, and the 10% formula lotion has a power of 82.41%. From these results, it can be seen that a formula with a concentration of nutmeg leaf, lemongrass, and bee nests as much as 10% can be the most effective mosquito repellent. The outcomes of this study are expected to help the community select environmentally friendly and safe insect repellents.

Keywords: Extract combination, lotion, mosquito, repellent.

Pendahuluan

Penyakit malaria, demam berdarah, demam chikungunya, dan Japanese ensefalitis disebabkan oleh Nyamuk famili Culicidae. (Banneli, 2015; Manuahe et al., 2016). Indonesia merupakan negara dengan iklim tropis yang karakteristiknya mendukung untuk berkembangbiakan berbagai species nyamuk (Mocosuli *et al.*, 2017). Sulawesi Utara sejak lama dikenal sebagai daerah endemic malaria dan kasus infeksi demam berdarah tinggi (Worang *et al.*, 2013). Pada tahun 2019, nyamuk *Aedes aegypti* menyebabkan 138.127 kasus penyakit demam berdarah dengue (DBD) (Fauzi and Sari, 2021). Jumlah kasus di atas lebih besar dari pada tahun 2018 sebesar 65.602 kasus, yang

menunjukkan peningkatan. Dibandingkan tahun 2018, kematian akibat DBD meningkat dari 467 menjadi 919 pada 2019 (Tosepu et al., 2018). Data angka kesakitan DBD di Sulawesi Utara tercatat pada 94,97 per 100.000 penduduk dan merupakan posisi kelima tertinggi di Indonesia dengan Case Fatality Rate sebesar 1,13% pada tahun 2019 (Harapan *et al.*, 2019). Malaria Report 2015 menyebutkan setidaknya 106 negara di dunia telah diserang oleh penyakit malaria. Sulawesi Utara termasuk dalam daerah endemik Malaria di Indonesia (Timah and Mocosuli, 2017; Monintja *et al.*, 2021).

Penanggulangan vektor yaitu nyamuk merupakan upaya terbaik dalam pencegahan penyakit. Pengendalian vektor penting dalam situasi penyakit epidemi karena ada kebutuhan

mendesak untuk mengembangkan metode pengendalian nyamuk yang baru dan lebih baik yang ekonomis dan efektif namun aman untuk organisme non-target (Şengül Demirak and Canpolat, 2022). Penanggulangan vektor nyamuk dapat dilakukan secara mekanik, kimia dan biologis. Penanggulangan kimia menggunakan insektisida dalam jangka panjang menyebabkan resistensi, resurgensi gen pada nyamuk. Lebih lanjut, insektisida kimia sintetik meninggalkan residu yang bersifat toksik bahkan karsinogen bagi manusia (Poopathi *et al.*, 2015; Anoopkumar and Anness, 2022).

Salah satu cara untuk menghindari gigitan nyamuk adalah dengan menggunakan repelen. Cara kerja repelen adalah dengan menghalangi antenna serangga pada kemampuannya dalam mengenali asam laktat dan CO₂ (Afify *et al.*, 2019; Mapossa *et al.*, 2021). Lotion sintetik, insektisida nyamuk, antinyamuk elektrik dengan kandungan bahan kimia sintesis: DEET atau N,N-diethyle-m-toluamide paling umum digunakan (Elsayed *et al.*, 2021). Disebabkan banyaknya laporan tentang efek samping DEET, ada kebutuhan akan bahan aktif repelen nyamuk alami yang dapat menggantikan DEET. Pengembangan repelen dari bahan tumbuhan relatif aman bagi manusia karena tidak meninggalkan residu kimia dan mudah terurai.

Secara etnomedikal masyarakat Minahasa telah mengenal dan menggunakan beberapa jenis tumbuhan sebagai penolak nyamuk. Hal ini disebabkan Minahasa menjadi daerah endemik Malaria. Mekanisme kerjanya yang tidak bersifat neurotoksik dan persistennya yang rendah terhadap lingkungan, insektisida botani lebih ramah lingkungan dibandingkan sintetik (Rombot dan Samuel, 2020). Sereh wangi (*Cymbopogon nardus* L.) telah dimanfaatkan sebagai insektisida botani pada dan antiplasmodium. Tanaman ini mengandung zat aktif penolak nyamuk, geraniol dan sitronelal. (Halim, 2020). *Myristica fragrans* Houtt adalah jenis tanaman pala (*Myristica* sp) yang berkembang di Kabupaten Kepulauan Sitaro dan sangat produktif. Pala Siau memiliki ciri dan kualitas unik, seperti kadar miristisin 11% hingga 13% dan kadar fuli 20% hingga 30%. (Horonis, *et al.*, 2016). Tanaman pala mengandung zat kimia

seperti myristisin dan elemisin yang bersifat racun dan adiktif, sehingga dapat digunakan sebagai repelen. (Atmadja, 2008; Ali *et al.*, 2018). Hasil riset menunjukkan senyawa myristicine memiliki efek halusinogen dan neurotoksi serangga (Mekutika *et al.*, 2015). Potensi bioaktif tumbuhan endemik dapat dikembangkan sebagai bahan baku pengembangan repelen. Walaupun demikian sedikit laporan penelitian tentang pemanfaatan ekstrak tumbuhan sebagai bahan baku repelen nyamuk. Telah dilakukan penelitian pengembangan repelen dari kombinasi ekstrak tumbuhan endemik dan sarang Apis dorsata Binghami.

Bahan dan Metode

Lokasi penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan September 2022. Uji repelen losion dan analisis kandungan bioaktif flavonoid dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPAK Universitas Negeri Manado dan Laboratorium Dasar Universitas Sam Ratulangi. Analisis kandungan bioaktif flavonoid dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka Institut Pertanian Bogor.

Instrumen penelitian

Alat yang digunakan adalah gelas ukur *phyrex*, erlenmayer *phyrex*, micropipette *Eppendorf*, blender *Miyako*, timbangan analitik *AND EK-6100i*, orbital shaker *OS-20 bioSan*, waterbath *Memmert*, magnetic stirrer with hot plate *MSH-300 bioSan*, mikroskop binokuler *Carl Zeiss Primo Star*, rotary evaporator *Heidolp*, spektrofotometri UV-Vis *Perkin Elmer Lambda 35*. Penelitian ini menggunakan bahan antara lain; sampel daun pala diperoleh dari Siau, Kabupaten Sitaro (2° 44' 22" N, 125° 24' 20" E, 142 mdpl), sampel sereh wangi dari Kakas, Kabupaten Minahasa (1° 11' 18.6" N, 124° 51' 19.2" E, 710 mdpl), sampel sarang lebah dari Ratahan, Kabupaten Minahasa Tenggara (1° 00' 22.9" N, 124° 47' 31.8" E, 220 mdpl), kertas saring *Dr. Watts*, alumunium foil, trietanolamin (TEA), asam stearat, cetil alkohol, gliserin, nipagin, nipasol, air destilasi ddH₂O *Onelab Waterone*, alkohol 96% *Core med (food grade)*, kuersetin, AlCl₃ dan kalium asetat. Sampel daun pala, sereh wangi, dan sarang lebah kemudian di

bawah ke Laboratorium Jurusan Biologi, Universitas Negeri Manado untuk dilakukan preparasi dan analisis.

Prosedur penelitian

Metode eksperimen diaplikasikan dengan menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap), satu faktor, lima perlakuan dan tiga ulangan. Desain perlakuan yaitu :

- F0 = Pemberian formula repelen nyamuk dengan Autan (kontrol positif)
- F1 = Pemberian formula repelen nyamuk dengan ekstrak 0%
- F2 = Pemberian formula repelen nyamuk dengan ekstrak 2,5%
- F3 = Pemberian formula repelen nyamuk dengan ekstrak 5%
- F4 = Pemberian formula repelen nyamuk dengan ekstrak 10%

Penelitian ini dilaksanakan dalam empat tahap yaitu pertama ekstraksi daun pala, serah wangi dan sarang *Apis dorsata* Binghami, kedua analisis kandungan bioaktif flavonoid ekstrak daun pala, serah wangi dan sarang *Apis dorsata* Binghami, ketiga formulasi repelen nyamuk (losion) kombinasi ekstrak daun pala, serah wangi dan sarang *Apis dorsata* Binghami, dan keempat uji daya proteksi terhadap nyamuk.

Pembuatan simplisia

Mencuci dengan air mengalir, sampel daun pala dan serah wangi dikeringkan dan kemudian dihaluskan menggunakan blender sampai berbentuk serbuk kasar. Sarang *Apis dorsata* Binghami segar dihaluskan dengan blender.

Pembuatan ekstrak

Ekstraksi dilakukan dengan metode Maserasi (Harborne, 1996; Mokusuli *et al.* 2019). Simplisia daun pala (*Myristica fragrans* Houtt.) diekstraksi dengan perbandingan pelarut dan simplisia 1:4. Sebanyak 250 gram simplisia daun pala dimaserasi dalam 1000 mL etanol 96%. Maserasi dilakukan selama tiga hari. Ekstraksi dilakukan pada suhu ruang dan tidak terkena cahaya matahari langsung dalam wadah toples kaca. Setiap 3-4 jam, wadah toples digoyang selama tiga puluh menit menggunakan orbital shaker pada 60 rpm. Setelah tiga hari maserasi, hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring. Setelah itu, pelarut diuapkan

menggunakan evaporator rotasi pada suhu 54 °C dan 55 rpm. Selanjutnya diperoleh ekstrak kasar (crude extract). Proses yang sama juga dilakukan pada serah wangi (*Cymbopogon nardus* L.) dan sarang *Apis dorsata* Binghami.

Analisis Kandungan Bioaktif

Analisis kandungan senyawa fitokimia (flavonoid total) ekstrak

Metode spektrofotometri UV-Vis menggunakan $AlCl_3$ dan kuersetin sebagai pembanding digunakan untuk menghitung total kandungan flavonoid ekstrak (Stankovic., 2011).

Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Larutan kuersetin dianalisis pada rentang panjang gelombang 400-500 nm, untuk mengetahui panjang gelombang maksimum kuersetin, Hasil analisis menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum standar kuersetin adalah 435 nm, yang digunakan untuk mengukur absorbansi sampel kombinasi ekstrak etanol.

Pembuatan kurva standar kuersetin

Sebanyak 25 miligram kuersetin baku standar ditimbang dan dilarutkan dalam 25 mililiter etanol. Larutan stok dipipet sebanyak 1 mililiter dan kemudian ditambahkan hingga 10 mililiter etanol untuk mencapai konsentrasi 100 ppm. Dengan menggunakan larutan kuersetin 100 ppm standar, beberapa konsentrasi kuersetin dibuat: 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, dan 14 ppm. Untuk masing-masing konsentrasi ini, 1 mL $AlCl_3$ 2% ditambahkan dan 1 mL kalium asetat pada 120 mM. Sample diinkubasi selama 60 menit pada suhu kamar. Metode spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum 435 nm digunakan untuk mengukur absorbansi.

Pengukuran kadar flavonoid total

Melarutkan 15 mg ekstrak dalam 10 mL etanol untuk mencapai konsentrasi 1500 ppm. Pipet 1 mL larutan kemudian ditambahkan 1 mL larutan $AlCl_3$ 2% dan kalium asetat 120 mM. Sample diinkubasi selama 60 menit pada suhu kamar. Metode spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum 435 nm digunakan untuk mengukur absorbansi. Untuk setiap analisis, sampel dilakukan triplo, dengan nilai absorbansi rata-rata.

Analisis bioaktif metode HPLC

Analisis flavonoid kombinasi ekstrak daun pala, sereh wangi, dan sarang *Apis dorsata* Binghami, dilakukan dengan menggunakan metode HPLC. Dua gram sampel kombinasi ekstrak ditambah 14 mL asetonotril 70%, kemudian dibiarkan selama 24 jam. Sampel disaring menggunakan kertas filter Whatmann No.41 dan filter PVDF Milipore. Pengukuran kadar flavonoid dilakukan dengan menggunakan HPLC (Mokosuli *et al.*, 2019).

Pembuatan losion sebagai repelen nyamuk

Komposisi losion anti nyamuk dibuat sesuai formula hasil penelitian sebelumnya (Tabel 2). Massa total formula sediaan losion adalah 100 gram. Pembuatan losion menggunakan modifikasi metode Suprianto *et al.*, (2021). Untuk membuat formula losion, asam

stearat, setil alkohol, nipasol, dan gliserin dimasukkan ke dalam cawan penguap, lalu dilebur dalam waterbath dan diaduk sampai rata. TEA dimasukkan ke dalam wadah kaca dengan air panas dan diaduk sampai larut. Nipagin dilarutkan dengan air mendidih dan campuran dimasukkan ke dalam mortir panas dan diaduk sampai membentuk korpus emulsi.

Tabel 1. Perbandingan konsentrasi ekstrak

Konsentrasi	Perbandingan Ekstrak Kasar (gr)		
	Daun Pala	Sereh Wangi	Sarang Lebah
0 %	-	-	-
2,5 %	2,5	2,5	2,5
5 %	5	5	5
10 %	10	10	10

Tabel 2. Takaran Bahan Pembuat Losion

Bahan	Formula			
	I	II	III	IV
Ekstrak (gr)	0	2,5	5	10
TEA (Trietanoamin) (mL)	4	4	4	4
Asam stearat (gr)	15	15	15	15
Cetil Alkohol (gr)	2	2	2	2
Gliserin (gr)	15	15	15	15
Nipagin (gr)	0,12	0,12	0,12	0,12
Nipasol (mL)	0,12	0,12	0,12	0,12
Aquades	Disesuaikan hingga volume mencapai 100 mL			

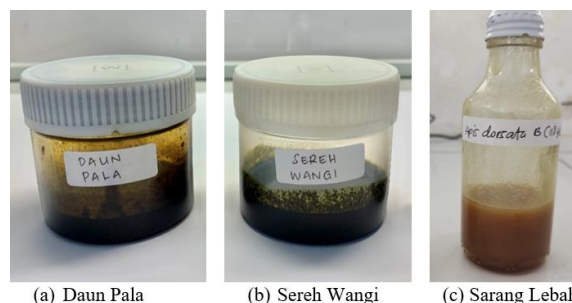
Nipagin ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai semuanya rata. Bahan-bahan yang telah tercampur tersebut kemudian dibagi menjadi empat bagian sama banyak. Kombinasi ekstrak daun pala, sereh wangi, dan sarang lebah dengan perbandingan 1:1:1 kemudian masukan ke masing-masing sediaan sehingga membentuk tiga formula losion dengan konsentrasi 0%, 2,5%, 5%, dan 10% (Tabel 1). Kemudian sediaan losion yang sudah tercampur dengan ekstrak tersebut ditambahkan akuades hingga masing-masing volume mencapai 100 mL.

Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi

Ekstrak daun pala berwarna kuning gelap kehijauan, hasil ekstraksi sereh wangi berwarna hijau gelap, dan hasil ekstraksi sarang lebah

berwarna kuning kecoklatan (Gambar 1). Aroma ekstrak menunjukkan aroma khas tiap jenis simplisia. Rendemen ekstrak daun pala 7,36 % dengan bobot ekstrak 18,4 gr. Rendemen ekstrak sereh wangi (akar, batang dan daun) 7,08 % dengan bobot ekstrak 35,4 gr sedangkan ekstrak sarang lebah menghasilkan rendemen 23,6 % dengan bobot ekstrak 118 gr (Tabel 3).



Gambar 1. Ekstrak Kasar

Tabel 3. Rendemen Ekstrak

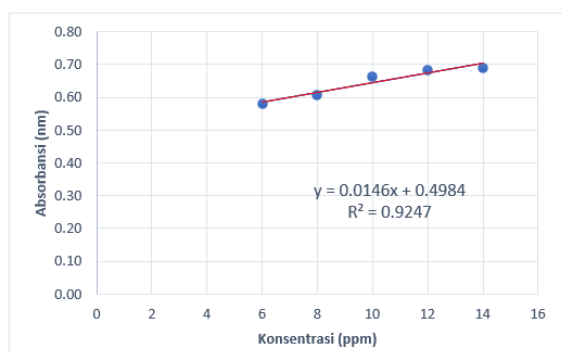
Sampel	Volume Pelarut (mL)	Bobot Simplisia (gr)	Bobot Ekstrak (gr)	Rendemen (%)
Daun Pala	1000	250	18,4	7,36
Sereh Wangi	2000	500	35,4	7,08
Sarang Lebah	2000	500	118	23,6

Analisis total flavonoid kombinasi ekstrak

Absorbansi larutan kuersetin standar pada panjang gelombang maksimal 435 nm, digunakan dalam penelitian ini untuk menentukan kadar flavonoid total pada sampel. Kandungan flavonoid ditentukan dengan persamaan regresi linear berdasarkan pengukuran konsentrasi absorbansi. Proses penentuan kadar flavonoid menggunakan metode persamaan kurva baku. Tabel 4 menunjukkan nilai absorbansi yang diperoleh dari kadar kuersetin yang dibuat tersebut. Nilai-nilai ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi larutan yang digunakan, semakin besar nilai absorbansi yang diperoleh. Selanjutnya, hasil baku kuersetin diplotkan antara kadar dan absorbannya. Ini menghasilkan persamaan regresi linear, yaitu $y = 0.014x + 0.498$, dengan nilai $R^2 = 0,924$. Persamaan regresi standar kuersetin diperoleh total flavonoid kombinasi ekstrak adalah 16,67 mgQE/g (Tabel 5).

Tabel 4. Absorbansi kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
6	0,580
8	0,608
10	0,663
12	0,682
14	0,689



Gambar 2. Kurva kalibrasi kuersetin

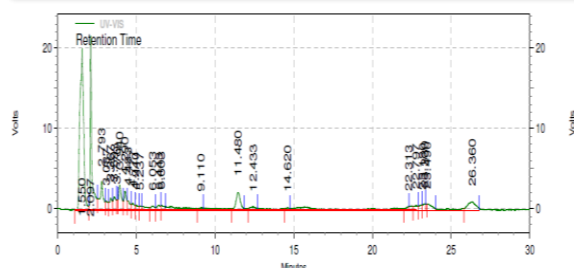
Tabel 5. Total kadar flavonoid ekstrak

Sampel	Abs (y)	Kandungan total flavonoid (mgQE/g)
Kombinasi ekstrak daun pala, sereh wangi, dan sarang lebah	0,856	16,67

Analisis bioaktif metode HPLC

Waktu yang dibutuhkan oleh senyawa komponen sampel untuk melalui kolom dan sampai ke detektor disebut waktu retensi. Waktu retensi dihitung mulai dari saat sampel diinjeksikan hingga saat detektor mencapai puncak pembacaan maksimumnya. Untuk menghitung masing-masing konsentrasi senyawa, setiap senyawa memerlukan waktu yang berbeda. Jumlah puncak yang dihasilkan dan jumlah komponen sampel ditunjukkan dalam kromatogram. Dengan membandingkan luas area puncak komponen dan konsentrasi standar, konsentrasi komponen yang akan dianalisis dapat dihitung.

Jumlah peak yang dihasilkan dan waktu retensi, terdapat 26 jenis senyawa aktif dalam kombinasi ekstrak. Dua senyawa ditemukan dengan persentase di atas 10%. Pertama, kandungan senyawa aktif sebesar 28,97% dengan waktu retensi 1,550 menit dan kandungan senyawa aktif kedua sebesar 31,31% dengan waktu retensi 2,097 menit. Berdasarkan retention time, kombinasi ekstrak mengandung kuersetin. Retention time standar kuersetin adalah 11,410. Pada kombinasi ekstrak diperoleh satu peak retention time yang mendekati kuersetin yaitu 11,480 (Gambar 3). Dengan demikian diduga ada satu jenis turunan kuersetin terdeteksi pada kombinasi ekstrak.

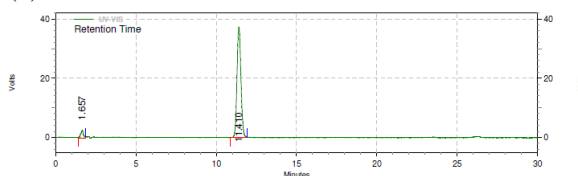


(a) Waktu Retensi Kombinasi Ekstrak

UV-VIS Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1.550	1301083	36.56	80394	28.97
2.097	604829	17.00	86889	31.31
2.793	221937	6.24	14386	5.18
3.087	50764	1.43	4586	1.65
3.367	73395	2.06	5978	2.15
3.593	90713	2.55	6490	2.34
3.770	20331	0.57	5149	1.86
3.940	160769	4.52	12416	4.47
4.290	104889	2.95	9566	3.45
4.483	52464	1.47	4761	1.72
4.777	44122	1.24	3452	1.24
4.940	36271	1.02	2460	0.89
5.237	21609	0.61	2072	0.75
6.053	39863	1.12	2247	0.81
6.443	38071	1.07	2509	0.90
6.603	36964	1.04	2432	0.88
9.110	24697	0.69	1356	0.49
11.480	178343	5.01	8871	3.20
12.433	47873	1.35	1792	0.65
14.620	22746	0.64	1402	0.51
22.313	29198	0.82	2072	0.75
22.797	42813	1.20	2464	0.89
23.180	43221	1.21	2875	1.04
23.330	38116	1.07	3297	1.19
23.490	72666	2.04	3294	1.19
26.360	160716	4.52	4338	1.56
Totals	3558463	100.00	277548	100.00

(b) UV Vis



UV-VIS Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1.657	128804	4.77	10642	6.63
11.410	2573521	95.23	149824	93.37
Totals	2702325	100.00	160466	100.00

(c) Standar Kuersetin

Gambar 3. Hasil Analisis Senyawa dengan HPLC

Uji daya proteksi / tolak nyamuk

Hasil yang diperoleh dari pengujian daya proteksi losion (Tabel 5) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan daya proteksi dari keempat losion dengan konsentrasi ekstrak 0%, 2,5%, 5% dan 10%. Losion komersial bermerek Autan digunakan sebagai kontrol positif untuk melihat dan menghitung perbedaan daya proteksi dari keempat formulasi losion. Dari hasil diatas dapat diketahui formula losion dengan konsentrasi 0% menjadi kontrol negatif dalam uji karena losion tidak mengandung kombinasi ekstrak daun pala, sereh wangi dan sarang lebah. Sedangkan untuk formula losion dengan konsentrasi ekstrak 2,5% memiliki rata-rata daya proteksi 22%. Formula losion dengan konsentrasi ekstrak 5% memiliki rata-rata daya proteksi 62,96% dan formula losion dengan konsentrasi ekstrak 10% memiliki daya proteksi tertinggi yaitu sebesar 82,41%. Hasil menunjukkan bahwa tingkat konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam losion sebanding dengan kekuatan perlindungan terhadap nyamuk.

Tabel 5. Hasil uji daya proteksi

Konsentrasi	T ₁	T ₂	T ₃	Rata-rata
Kontrol + (F0) (Autan)	100%	100%	100%	100%
Kontrol - (F1) (0%)	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%
F2 (2,5%)	25%	19,44%	22,22%	22%
F3 (5%)	66,67%	58,33%	63,89%	62,96%
F4 (10%)	88,89%	77,78%	80,56%	82,41%

Uji satu arah ANOVA dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan antara daya proteksi losion untuk masing-masing konsentrasi ekstrak. Nilai signifikansi $P < 0,05$ menunjukkan konsentrasi ekstrak nol, 2,5%, 5%, dan 10% memengaruhi daya perlindungan nyamuk. Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa daya proteksi konsentrasi 0% memiliki perbedaan nyata dengan konsentrasi 2,5%, 5%, dan 10%. Daya proteksi konsentrasi 2,5% memiliki perbedaan nyata dengan konsentrasi 0%, 2,5%, dan 10%. Dan daya proteksi konsentrasi 5% memiliki perbedaan nyata konsentrasi 0%, 2,5%, dan 5%.

Pembahasan

Ekstraksi

Ekstraksi tumbuhan dilakukan dengan metode maserasi. Metode ini paling banyak digunakan dalam riset obat (Maryam *et al.*, 2020; Candra *et al.*, 2021). Proses maserasi dilakukan pada suhu kamar untuk menjaga bioaktif yang tidak tahan panas dan volatile (Nur *et al.*, 2022). Persentase rendemen tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak sarang lebah. Hal ini disebabkan simplisia sarang lebah mengandung kadar air yang lebih sedikit dibandingkan simplisia daun pala dan sereh wangi. Ekstraksi daun pala dan sereh wangi dalam penelitian ini menggunakan simplisia segar. Simplisia yang mengandung kadar air tinggi akan mengurangi kemampuan pelarut mengekstrak senyawa metabolit sekunder.

Persentase rendemen yang besar menunjukkan ekstrak yang dihasilkan juga semakin besar (Wen *et al.*, 2018; Egra *et al.*, 2019). Selain kandungan air simplisia, waktu maserasi mempengaruhi persentase rendemen yang dihasilkan (Pobiega *et al.*, 2019). Waktu maserasi terbaik untuk mendapatkan kandungan bioaktif maksimal kurang dari 10 hari (Pobiega *et al.*, 2019). Pada penelitian ini ekstraksi hanya dilakukan dalam waktu 3 hari sehingga kandungan bioaktif masih optimal. Etanol merupakan pelarut terbaik dalam mengekstraksi bioaktif yang terdapat pada sarang lebah (Kara *et al.*, 2022). Maserasi efektif menarik bioaktif pada tumbuhan. Bioaktif atau metabolit sekunder tumbuhan dapat ditarik oleh pelarut dengan menginfiltirasi membran dan sel.

Pelarut polar seperti etanol 96% mampu mengekstrak banyak metabolit sekunder tumbuhan. Metabolit sekunder polar seperti senyawa flavonoid, fenolik, tanin dan saponin menjadi target karena memiliki aktifitas insektisida. Maserasi dilakukan selama tiga kali dua puluh empat jam dengan pengadukan agar ekstrak diperoleh optimal. Ekstrak pekat hasil penguapan pelarut menunjukkan aroma khas species tumbuhan yang digunakan. Rendemen yang diperoleh dapat menentukan kadar metabolit sekunder yang dibawa oleh pelarut, tetapi tidak dapat menentukan senyawa yang dibawa oleh pelarut (Ahmad *et al.*, 2016).

Kandungan flavonoid

Jumlah flavonoid yang terkandung dalam kombinasi ekstrak daun pala, sereh wangi, dan sarang Apis dorsata Binghami dihitung dengan

spektrofotometri UV-Vis.. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi, yang menunjukkan pita serapan yang kuat pada daerah spektrum ultraviolet dan spektrum tampak. (Harborne, 1987). Kadar flavonoid ditentukan dengan menggunakan persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi kuersetin sebelumnya.

Persamaan kurva baku digunakan untuk menghitung kadar flavonoid total pada sampel, kuersetin digunakan sebagai larutan standar dengan deret konsentrasi dalam penelitian ini. Kuersetin adalah flavonoid golongan flavonol dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5. Kuersetin biasanya digunakan sebagai larutan dengan flavon dan flavonol (Azizah dan Faramayuda 2014). Untuk mengukur absorbansi, inkubasi selama 60 menit. Ini diperlukan untuk reaksi yang ideal dan intensitas warna yang ideal (Azizah, 2014). Persamaan kurva kalibrasi kuersetin dapat digunakan untuk menghitung total konsentrasi senyawa flavonoid dalam sampel. Pengujian analisis kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan larutan blanko sebagai kontrol (Basset,1994).

Metode kromatografi cair kinerja tinggi digunakan untuk memeriksa kandungan senyawa flavonoid. Sebuah senyawa dapat dipisahkan dari campuran dalam ekstrak dengan HPLC. Waktu retensi didefinisikan sebagai jumlah waktu yang dibutuhkan oleh senyawa untuk bergerak dari saat pertama kali dimasukkan ke dalam kromatografi hingga mencapai puncak maksimumnya (Seal, 2016). Waktu retensi juga dikenal sebagai waktu di mana senyawa terpisah (Seal, 2016). Dengan absorbansi pada jarak spektrum 200–220 nm, senyawa organik dapat diamati dengan baik dengan sinar ultraviolet (De Oliveira *et al.*, 2001; Rosli *et al.*, 2016). Hasil analisis kandungan bioaktif dengan HPLC, kandungan senyawa flavonoid golongan kuersetin yang terdapat pada kombinasi ekstrak menghasilkan 26 jenis senyawa. Kandungan kimia senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun pala, sereh wangi, juga sarang lebah berfungsi sebagai inhibitor yang kuat dari pada sistem pernapasan nyamuk dewasa.

Flavonoid adalah senyawa yang melindungi tumbuhan yang bersifat toksik dan menghambat makan serangga. Memiliki bau yang sangat tajam dan pahit, dapat larut dalam air dan pelarut organik, dan mudah terurai pada suhu tinggi. Flavonoid dapat bersifat toksik pada serangga melalui sistem pernafasan (Aseptianova *et al.*, 2017). Hal

tersebutlah yang membuat nyamuk tidak menyukai bau yang ditimbulkan oleh losion. Sehingga losion dapat dikatakan sebagai repelen atau zat penolak nyamuk. Minyak atsiri, alkaloid, saponin, tannin, dan flavonoid ditemukan dalam daun pala. Zat aktif penolak nyamuk sitronelal dan geraniol ditemukan dalam tanaman serih wangi (Halim, 2020). Ekstrak sarang lebah madu *Apis dorsata* Binghami dari Minahasa memiliki fitokimia yang mengandung banyak flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, steroid, dan triterpenoid. Kandungan flavonoidnya tertinggi.

Uji daya proteksi

Jumlah nyamuk yang hinggap pada setiap perlakuan menunjukkan bahwa campuran ekstrak dalam sediaan losion memiliki daya tolak terhadap nyamuk. Hasil pengujian menunjukkan bahwa formula 2 memiliki daya proteksi paling kecil, diikuti oleh formula 3 dan 4. Formula 4 memiliki daya proteksi tertinggi, dengan konsentrasi kombinasi ekstrak yang paling tinggi sebesar 10%. Oleh karena itu, semakin tinggi konsentrasi kombinasi ekstrak, semakin besar daya proteksi sediaan losion.

Keseimbangan antara daya tarik komponen keringat tertentu dan daya tolak oleh senyawa dalam losion yang dioleskan menentukan ketertarikan nyamuk pada kulit manusia. Minyak atsiri serih wangi mengandung senyawa aktif geraniol dan sitronellol, yang memiliki kemampuan untuk melindungi dari nyamuk (Ardiana, 2022). Sebagai racun kontak, geraniol dan sitronellol meningkatkan aktivitas saraf sensorik serangga dan meningkatkan aktivitas saraf motorik, yang dapat menyebabkan kejang dan kelumpuhan (Andasari and Sunnata, 2020). Geraniol juga dapat berfungsi sebagai racun lambung, yang dapat membuat serangga keracunan dan mati (Sanjaya, 2021).

Kesimpulan

Kandungan flavonoid total kombinasi ekstrak daun pala, serih wangi, dan sarang lebah memiliki nilai 16,67 mgQE/g. Berdasarkan retensi, terdapat 26 jenis senyawa aktif dalam kombinasi ekstrak. Dua senyawa ditemukan dengan persentase di atas 10%. Kandungan flavonoid yang terdapat dalam losion memiliki senyawa yang dapat menolak nyamuk. Losion dengan kombinasi ekstrak 10% merupakan formula paling efektif dalam menolak nyamuk.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada pimpinan dan teknisi Laboratorium Biologi FMIPAK Unima yang mendukung penelitian ini.

Referensi

- Andasari, S. D., & Sunnata, E. (2020). Formulation Study of Topical Lotion from Zodia Leaf Extract (*Evodia suaveolens*) Against *Aedes Aegypti*. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1477, No. 6, p. 062013). IOP Publishing. DOI: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1477/6/062013>
- Anoopkumar, A. N., & Aneesh, E. M. (2022). A critical assessment of mosquito control and the influence of climate change on mosquito-borne disease epidemics. *Environment, Development and Sustainability*, 24(6), 8900-8929. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10668-021-01792-4>
- Afify, A., Betz, J. F., Riabinina, O., Lahondère, C., & Potter, C. J. (2019). Commonly used insect repellents hide human odors from *Anopheles* mosquitoes. *Current Biology*, 29(21), 3669-3680. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.007>
- Ali, M. A., Hamiduddin, M. Z., & Ikram, M. (2018). Phyto-pharmacological potential of Jaiphal (*Myristica fragrans* Houtt): A spice of medicinal importance and its utilization in Unani Medicine. *Int J Green Pharm*, 12(1), S26-36.
- Ardiana, C., Mulyanaingsih, S., Nursuciani, M., & Mulyani, L. S. (2022). Penggunaan Minyak Tanaman Serai Wangi (*Cymbopogon Nardus* L) Sebagai Repellent Senyawa Lipid Alami Nyamuk. *Jurnal Life Science: Jurnal Pendidikan dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 4(1), 7-12. DOI: <https://doi.org/10.31980/jls.v4i1.1656>
- Atmadja, W.R. (2008). Pengaruh minyak jahe merah, pala dan selasih terhadap *Helopeltis antonii* Sign. pada inang alternatif. *Bul. Littro* 19(2):154-163.
- Azizah, D. N., Kumolowati, E., & Faramayuda, F. (2014). Penetapan kadar flavonoid metode AlCl₃ pada ekstrak metanol kulit

- buah kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2), 33-37. DOI: <https://doi.org/10.26874/kjif.v2i2.14>
- Basset, J., Denney, R. C., Jeffery, G. H., & Mendham, J. (1994). *Buku Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*. Terjemahan oleh A. Hadyana P. dan Ir. L. Setiono. Jakarta: EGC.
- Candra, L. M. M., Andayani, Y., & Wirasisya, D. G. (2021). Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kandungan Fenolik Total dan Flavonoid Total Pada Ekstrak Etanol Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.). *Jurnal Pijar Mipa*, 16(3), 397-405. <https://doi.org/10.29303/jpm.v16i3.2308>
- Egra, S., Mardhiana, ., Rofin, M., Adiwena, M., Jannah, N., Kuspradini, H., & Mitsunaga, T. (2019). Aktivitas Antimikroba Ekstrak Bakau (*Rhizophora mucronata*) dalam Menghambat Pertumbuhan *Ralstonia Solanacearum* Penyebab Penyakit Layu. *Agrovigor: Jurnal Agroekoteknologi*, 12(1), 26. DOI: <https://doi.org/10.21107/agrovigor.v12i1.5143>
- Elsayed, G. A., & Hassabo, A. G. (2022). Insect repellent of cellulosic fabrics (a review). *Letters in Applied Nano Bio Science*, 11(1), 3181-3190. DOI: <https://doi.org/10.33263/LIANBS111.31813190>
- Fauzi, Y., & Sari, F. M. (2021). Analysis of the Relationship between the Eradication of Mosquito Nests and the Implementation of 3M Plus with the incidence of dengue fever in the working area of the Beringin Raya Public Health Center, Bengkulu City. *ISEJ: Indonesian Science Education Journal*, 2(3), 158-163.
- Halim, R., & Fitri, A. (2020). Aktivitas Minyak Sereh Wangi Sebagai Anti Nyamuk. *Jurnal Kesmas Jambi*, 4(1), 28-34. DOI: <https://doi.org/10.22437/jkmj.v4i1.8940>
- Harborne, J. B. (2008). *Metode Fitokimia, penuntun dan cara modern menganalisis tumbuhan* Penerjemah : Padmawinata K dan Soediro I. Penerbit ITB Bandung.
- Harapan, H., Michie, A., Mudatsir, M., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2019). Epidemiology of dengue hemorrhagic fever in Indonesia: analysis of five decades data from the National Disease Surveillance. *BMC research notes*, 12, 1-6. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4379-9>
- Horonis, S., Runtuuwu, S., & Pamandungan, Y. (2016). Karakterisasi Pala Siau (*Myristica Fragrans* Houtt) Berdasarkan Morfologi Buah Characterization Of Siau Nutmeg (*Myristica Fragrans* Houtt) Based On Morphology Fruit Seistelin Horonis1), Semuel Runtuuwu2), Dan Yefta Pamandungan3) Fakultas Pertanian, Univers. In *Cocos* (Vol. 7, No. 7).
- Kara, Y., Can, Z., & Kolaylı, S. (2022). What Should Be the Ideal Solvent Percentage and Solvent-Propolis ratio in the Preparation of Ethanolic Propolis Extract? *Food Analytical Methods*, 15(6), 1707–1719. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02244-z>
- Kaunang NS and Mokusuli Y. S. (2017) Botanical and phytochemical constituents of several medicinal plants from mount Klabat north Minahasa. *J Med Plants Stud* 5(2):29-35.
- Manuahe C, Mokusuli YS, Roring VIY. (2016). Optimization of DNA extraction and the position of mosquito Species from southeast minahasa in North sulawesi using NADH dehydrogenase Gene and Cytochrome oxidase Sub Unit 1 Gene. *J Entomol Zool Stud*, 4(4):498-508.
- Mapossa, A. B., Focke, W. W., Tewo, R. K., Androsch, R., & Kruger, T. (2021). Mosquito-repellent controlled-release formulations for fighting infectious diseases. *Malaria journal*, 20, 1-33. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03681-7>
- Maryam, F., Taebe, B., & Toding, D. P. (2020). Pengukuran parameter spesifik dan non spesifik ekstrak etanol daun matoa (*Pometia pinnata* JR & G. Forst). *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 6(01), 1-12. DOI: <https://doi.org/10.35311/jmpi.v6i01.39>
- Mekutika, D. F., Sambuaga, J. V., & Soenjono, S. J. (2015). Uji Efektifitas Ekstrak Daging Buah Pala (*Myristica Fragrans* Houtt) Sebagai Zat Penolak (Repellent) Terhadap *Aedes aegypti*. *Jurnal*

- Kesehatan Lingkungan*, 4(2).
- Mokosuli, S. Y., Kaunang, E. S. N., & Manopo, J. S. (2019). The bioactive contents and antioxidant activity of honey bee nest extract of *Apis dorsata* Binghami from the North Sulawesi. *Molekul*, 14(2), 92-102. DOI: <https://doi.org/10.20884/1.jm.2019.14.2.502>
- Mokosuli YS, Repi RA, Worang RL. 2017 Potential antioxidant and anticancer effect of *Apis dorsata* Binghami Crude Venom from Minahasa, North Sulawesi. *J Entomol Zool Stud*, 5(2):112-119.
- Monintja, T. C., Arsin, A. A., Amiruddin, R., & Syafar, M. (2021). Analysis of temperature and humidity on dengue hemorrhagic fever in Manado Municipality. *Gaceta Sanitaria*, 35, S330-S333. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2021.07.020>
- Nur, Y., Cahyotomo, A., Nanda, N., & Fistoro, N. (2020). Profil GC-MS Senyawa Metabolit Sekunder dari Jahe Merah (*Zingiber officinale*) dengan Metode Ekstraksi Etil Asetat, Etanol dan Destilasi. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 2(3), 198-204.
- Poopathi, S., De Britto, L. J., Praba, V. L., Mani, C., & Praveen, M. (2015). Synthesis of silver nanoparticles from *Azadirachta indica*—a most effective method for mosquito control. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 2956-2963. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3560-x>
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., Derewiaka, D., & Gniewosz, M. (2019). Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *Journal of Food Science and Technology*, 56(12), 5386–5395. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04009-9>
- Rombot, D. V., & Samuel, M. Y. (2020). Bioaktivitas Larvasida Nyamuk *Anopheles* sp. Dari Ekstrak Bunga *Tagetes erecta* L. Yang Berasal Dari Kota Tomohon. *Jurnal Biomedik: JBM*, 12(3), 161-167. DOI: <https://doi.org/10.35790/jbm.12.3.2020.30111>
- Sanjaya, Y., Dinyati, A., Syahwa, D., Aulia, I. D., Rijal, M. S., Khairiah, A., ... & Des, M. (2021, September). Studi Eksplorasi Pemanfaatan Jenis-Jenis Tanaman Sebagai Pestisida Nabati Di Perumahan Pondok Arum, Kecamatan Karawaci, Kota Tangerang, Banten. In *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, 1(1): 267-279.
- Şengül Demirak, M. Ş., & Canpolat, E. (2022). Plant-based bioinsecticides for mosquito control: Impact on insecticide resistance and disease transmission. *Insects*, 13(2), 162. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects13020162>
- Stankovic, M. S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J Sci*, 33(2011), 63-72.
- Suprianto, S., Faisal, H., & Subekti, E. (2021). Efektifitas Losion Anti Nyamuk Ekstrak Etanol Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*). *Jurnal Indah Sains dan Klinis*, 2(1), 1-5. DOI: <https://doi.org/10.52622/jisk.v1i1.1>
- Tosepu, R., Tantrakarnapa, K., Nakhapakorn, K., & Worakhunpiset, S. (2018). Climate variability and dengue hemorrhagic fever in Southeast Sulawesi Province, Indonesia. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 14944-14952. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1528-y>
- Timah, S & Mokosuli, YS. (2017). Morphometry and Phylogeny reconstruction *Aedes* sp. based DNA Mitochondrial cytochrome oxidase gene sub unit 1 (CO1) in North Sulawesi. *International Journal of Mosquito Research*, 4(3), 98-106.
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., ... & Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops—A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 48, 538-549. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>
- Worang, R. L., Samuel, M. Y., & Pendong, D. F. (2013). Antimalarial and antibacterial bioactivity of langsung (Lansium minahasae L.) bark extract. *Journal of Natural Sciences Research*, 3(14).