

Studi *In Vitro* Efek Larvasidal Minyak Atsiri Daun Sirih (*Piper betle* L) Sri Lanka dan Bogor terhadap Larva *Chrysomya bezziana*

APRIL H. WARDHANA¹, S. MUHARSINI¹, S. SANTOSA², L.S.R. ARAMBEWELA³ dan S.P.W. KUMARASINGHE⁴

¹ Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R. E. Martadinata 30, Bogor – 16114

² Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila – Jakarta

³ Industrial Technology Institute, Colombo, Sri Lanka

⁴ Consultant Dermatologist, Royal Perth Hospital, Western Australia

(Formerly at Teaching Hospital Colombo North Teaching Hospital, Ragama, Sri Lanka)

(Diterima dewan redaksi 8 November 2010)

ABSTRACT

WARDHANA, A.H., S. MUHARSINI, S. SANTOSA, L.S.R. ARAMBEWELA and S.P.W. KUMARASINGHE. 2010. *In vitro* study of larvacidal effect of *Chrysomya bezziana* between atsiri oil (Piper betle leaf) from Sri Lanka and Bogor. *JITV* 15(4): 297-307.

Treatment of myiasis caused by the larvae of *Chrysomya bezziana* resulted in various results. The aim of the experiment was to compare larvacidal effect of atsiri oil of Piper betle leaf originated from Sri Lanka and Bogor against *Chrysomya bezziana* larvae and to identify atsiri oil using Thin Layer Chromatography (TLC). Silica gel plate GF254 with toluena and ethyl acetate as diluents was used in TLC. L1 and L2 of *Chrysomya bezziana* larvae were used for *in vitro* assay using agar plate contained atsiri oil of three concentrations ie. 2, 3 and 4%. Asuntol 1% and aquadest sterile were used as positive and negative control, respectively. Ten larvae were used in five replications. The larvae were observed every 30 minutes for four hours. Larval mortality were counted and probit analysed using POLO-PC software, therefore the lethal concentration (LC₅₀ and LC₉₅) and lethal time (LT₅₀ and LT₉₅) were defined. Result showed that there was a difference on migration distance between atsiri oil from Sri Lanka and Bogor on nRf 79-88 analysed using TLC. *In vitro* assay showed that both lethal concentration and lethal time of atsiri oil from Sri Lanka was higher than that of atsiri oil from Bogor. This results indicated that larvacidal effect of atsiri oil from Bogor was stronger than atsiri oil from Sri Lanka in *in vitro* both on L1 and L2.

Key Words: Piper Bitle Leaf, Atsiri Oil, *Chrysomya bezziana*, Sri Lanka, Bogor

ABSTRAK

WARDHANA, A.H., S. MUHARSINI, S. SANTOSA L.S.R. ARAMBEWELA dan S.P.W. KUMARASINGHE. 2010. Studi *in vitro* efek larvasidal minyak atsiri daun sirih (*Piper betle* L) Sri Lanka dan Bogor terhadap larva *Chrysomya bezziana*. *JITV* 15(4): 297-307.

Pengobatan myiasis yang disebabkan oleh larva *Chrysomya bezziana* masih memberikan hasil yang bervariasi. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efek larvasidal minyak atsiri daun sirih (*Piper betle*) yang berasal dari Sri Lanka dan Bogor terhadap kelangsungan hidup larva *C. bezziana*, termasuk mengidentifikasi perbedaan kandungan kedua minyak atsiri tersebut menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Lempeng silika gel GF 254 dengan toluena dan etil asetat sebagai eluen digunakan dalam uji KLT ini, sedangkan uji *in vitro* dilakukan pada larva instar I dan II yang diletakkan ke dalam cawan petri berisi larutan minyak atsiri berkonsentrasi 2, 3 dan 4%. Asuntol 1% dan air akuades steril digunakan sebagai kontrol positif dan negatif. Setiap perlakuan menggunakan sepuluh larva dengan lima kali ulangan. Pengamatan dilakukan setiap tiga puluh menit selama empat jam. Kematian larva dihitung dan data yang diperoleh dianalisis probit dengan program POLO-PC *software*, sehingga diperoleh nilai konsentrasi letal (LC₅₀ dan LC₉₅) dan waktu letal (LT₅₀ dan LT₉₅). Hasil KLT menunjukkan adanya perbedaan jarak migrasi antara minyak atsiri Sri Lanka dan Bogor yang terletak pada hRf 79-88. Uji *in vitro* membuktikan bahwa nilai LC₅₀ dan LC₉₅ minyak atsiri Sri Lanka lebih tinggi dibandingkan dengan Bogor. Minyak atsiri Sri Lanka juga terbukti mempunyai nilai LT₅₀ dan LT₉₅ lebih lama dibandingkan Bogor. Fenomena ini mengindikasikan bahwa secara *in vitro*, efek larvasidal minyak atsiri daun sirih Bogor lebih kuat dibandingkan dengan Sri Lanka baik untuk larva instar I (L1) maupun instar II (L2).

Kata Kunci: Piper Betle Leaf, Minyak Atsiri, *Chrysomya Bezziana*, Sri Lanka, Bogor

PENDAHULUAN

Chrysomya bezziana adalah salah satu lalat penyebab myiasis yang bersifat obligat parasit dan

menyerang semua jenis hewan mamalia termasuk manusia. Larva lalat ini mampu menginfestasi jaringan tubuh hidup dan tumbuh berkembang di dalamnya dengan cara memakan jaringan segar induk semangnya

(SPRADBERY, 1991). Beberapa hasil survei telah membuktikan bahwa kasus myasis tidak hanya menjadi permasalahan yang cukup serius di luar negeri (ALI-IZZI, 2002; AL-AHMED, 2003; ABO-SHEHADA, 2005), tetapi juga di hampir seluruh kepulauan Indonesia (SUKARSIH *et al.*, 1989; PARTOUTOMO, 2000; WARDHANA *et al.*, 2003; WARDHANA *et al.*, 2004; WARDHANA dan MUHARSINI, 2005).

Metode pengobatan telah banyak dilakukan tetapi masih memberikan hasil yang sangat bervariasi. Formula topikal untuk manusia yang mengandung 1% ivermectin dalam propil glicol dan terpineol banyak digunakan di Rumah Sakit Colombo, Sri Lanka dan dilaporkan cukup efektif (KUMARASINGHE *et al.*, 2000; MOSTAFAVIZADEH *et al.*, 2003). Minyak steril dan kloroform 15% digunakan untuk pengobatan myasis yang disertai dengan pembedahan/operasi (MANGUNKUSUMO dan UTOMO, 1999; TALARI *et al.*, 2002). Vaksin rekombinan terhadap infestasi larva *C. bezziana* pada ternak juga telah dikembangkan tetapi hasilnya masih belum memuaskan (SUKARSIH *et al.*, 1999; MUHARSINI dan VUOCOLO, 2000; SUKARSIH *et al.*, 2000a). Adanya hasil yang beragam, semakin langka dan mahalnya harga obat serta dampak negatif yang ditimbulkan oleh penggunaan insektisida sintetik menimbulkan pemikiran-pemikiran baru untuk mencari pengobatan alternatif yang diarahkan pada sumber bahan-bahan alami seperti tanaman obat.

Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan untuk mengobati myasis pada manusia adalah daun sirih (*Piper betle* L.) (KUMARASINGHE *et al.*, 2000). Tanaman ini telah dikenal sebagai tanaman obat sejak tahun 600 SM dan banyak ditanam oleh masyarakat. Selain sebagai antiseptik, minyak atsiri dari daun sirih juga berpotensi sebagai insektisida dan fungisida (SOLSOLOY *et al.*, 2001; ARAMBEWELA dan DISSANAYAKE, 2001; ISMAIL dan AHMAD, 2003). Pernyataan ini didukung oleh beberapa data penelitian yang menyebutkan bahwa minyak atsiri daun sirih mampu membunuh hama kapas seperti *Aphis gossypii* dan *Amrasca biguttula* serta menggagalkan penetasan telur *Helicoverpa armigera* dan *Pectinophora gossypiella* (SOLSOLOY *et al.*, 2001; CRUZ, 2003). Efek larvasidalnya terhadap nyamuk juga telah diuji oleh ARAMBEWELA *et al.* (2001).

Di samping khasiat diatas, telah dilaporkan bahwa minyak atsiri daun sirih secara *in vitro* mampu membunuh larva *Chrysomya megacephala* yang dikenal sebagai agen myasis (KUMARASINGHE *et al.*, 2002). Hasil ini memberikan prospek yang cerah untuk dikembangkan menjadi obat myasis. Namun pada penelitian tersebut larva yang digunakan bukan larva penyebab utama penyakit myasis. Lalat *C. megacephala* merupakan agen sekunder dan tidak bersifat obligat parasit. KUMARASINGHE *et al.* (2002) mengalami kegagalan untuk mengkultur lalat *C. bezziana* di

laboratorium di Sri Lanka. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan di Indonesia untuk menguji efek larvasidal minyak atsiri daun sirih terhadap larva *Chrysomya bezziana*.

PRIJONO (2003) menyebutkan bahwa pengujian ekstrak kasar suatu tanaman dapat memberikan hasil yang beragam bergantung pada jenis ekstrak yang digunakan, faktor serangga/larva uji dan faktor lingkungan. Kandungan bahan aktif dalam tanaman sering beragam, bergantung pada keragaman genetika tanaman, keadaan geografi daerah asal tanaman, fase pertumbuhan tanaman dan musim saat pemanenan. Selain itu, cara penanganan bagian tanaman tersebut dan cara ekstraksi dapat mempengaruhi keefektifan ekstrak yang diperoleh. Penelitian ini bertujuan untuk menguji perbedaan efek larvasidal minyak atsiri daun sirih yang dikoleksi dari lokasi geografis yang berbeda (Sri Lanka dan Bogor) terhadap larva *C. bezziana* secara *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Sampel larva *C. bezziana*

Sampel larva diperoleh dari koloni larva *C. bezziana* yang dipelihara di Laboratorium Entomologi, Departemen Parasitologi, Balai Besar Penelitian Veteriner (BBalitvet), Bogor, Indonesia, berdasarkan metode SUKARSIH *et al.* (2000b).

Pembuatan simplisia daun sirih

Daun sirih hijau segar dikoleksi dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Rempah (Balitro)-Bogor sedangkan daun sirih Sri Lanka dikoleksi dari Kalutara Selatan-Colombo dengan kategori tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda. Daun-daun tersebut dicuci dan diangin-anginkan di tempat terbuka dan terlindung dari cahaya matahari hingga kering selama tujuh hari. Daun yang telah kering berwarna hijau kecoklatan dan mudah rapuh (KUMARASINGHE *et al.*, 2002).

Pembuatan minyak atsiri daun sirih

Ekstraksi minyak atsiri daun sirih Sri Lanka dan Bogor dilakukan dengan metode destilasi uap yang dilakukan di *Industrial Technology Institute* – Colombo dan Balitro – Bogor (KUMARASINGHE *et al.*, 2002). Sebanyak 1723 gram daun sirih kering Bogor didestilasi dengan uap selama 5 jam menggunakan destilator (*Clevenger arm*) pada tekanan 1-1,5 atm. Uap yang keluar dikumpulkan dan dibiarkan mengembun. Destilat yang diperoleh dipisahkan dari air menggunakan corong pisah, selanjutnya didiamkan hingga terpisah dan menghasilkan 15 ml. Daun sirih Sri Lanka diekstraksi dari 1700 gram dan menghasilkan 17 ml. Minyak atsiri

yang diperoleh berwarna kuning kecoklatan (warna minyak atsiri Bogor lebih tua dibandingkan dengan minyak atsiri Sri Lanka). Kedua minyak tersebut disimpan di dalam botol berwarna gelap pada suhu 4°C (KUMARASINGHE *et al.*, 2002).

Kromatografi lapis tipis (KLT)

Minyak atsiri yang diperoleh melalui destilasi, diencerkan dengan toluena (1:19). Sebanyak 5 µl ditotolkan ke lempeng silika gel GF 254, selanjutnya dielusi menggunakan toluena dan etil asetat dengan jarak rambat 10 cm hingga mencapai batas atas. Penampakan bercak divisualisasi menggunakan sinar ultraviolet (UV) dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm. Untuk memperjelas penampakan bercak maka dilakukan penyemprotan menggunakan pereaksi anisaldehida-asam sulfat kemudian diamati dengan sinar biasa, sinar UV 254 dan 366 nm (WIRYOWIDAGDO dan LOGAWA, 2000).

Uji *in vitro* terhadap larva *C. bezziana*

Pembuatan larutan uji

Perhitungan konsentrasi larutan minyak atsiri daun sirih berdasarkan volume pelarut (v/v). Sebelum perhitungan, volume pelarut dikurangi dengan volume pengemulsi Tween 80 (1%). Awal konsentrasi yang dibuat adalah 4%, yaitu 4 ml minyak atsiri daun sirih ditambah dengan 1 ml Tween 80 dan dilarutkan dengan 95 ml air suling steril sehingga diperoleh volume 100 ml (v/v). Larutan ini diencerkan menjadi 3% dan 2% untuk perlakuan yang lainnya. Disamping itu, dibuat juga larutan kontrol positif (asuntol 1%). Sebanyak 1 mg bubuk asuntol dilarutkan ke dalam 100 ml air suling steril (b/v). Kontrol negatif dibuat dengan cara mencampur 1 ml Tween 80 dengan 99 ml air suling steril (v/v) (KUMARASINGHE *et al.*, 2002).

Perlakuan

Uji *in vitro* untuk L1 dan L2 *C. bezziana* di lakukan berdasarkan metode KUMARASINGHE *et al.* (2002) yang dimodifikasi. Sebanyak 1000 µl larutan uji dengan konsentrasi tertentu dituangkan ke dalam cawan petri (33 x10 mm, Falcon®). Uji ini dibagi menjadi tujuh perlakuan (masing-masing lima puluh larva) dan masing-masing perlakuan terdiri dari lima ulangan (masing-masing sepuluh larva), sebagai berikut:

- P0: Kontrol negatif (Air suling + 1% Tween 80)
 P1: Minyak atsiri daun sirih Sri Lanka 2% + 1% Tween 80
 PII: Minyak atsiri daun sirih Sri Lanka 3% + 1% Tween 80

- PIII : Minyak atsiri daun sirih Sri Lanka 4% + 1% Tween 80
 PIV : Minyak atsiri daun sirih Bogor 2% + 1% Tween 80
 PV : Minyak atsiri daun sirih Bogor 3% + 1% Tween 80
 PVI : Minyak atsiri daun sirih Bogor 4% + 1% Tween 80
 PVII: Kontrol positif (Asuntol 1%)

Parameter pengamatan

Parameter yang diamati adalah mortalitas larva setiap tiga puluh menit selama empat jam. Larva dinyatakan mati apabila tidak bergerak ketika disentuh pada bagian anterior (kepala) dan posteriornya menggunakan jarum tumpul. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop stereo. Umumnya larva yang mati akan mengerut atau berkontraksi (KUMARASINGHE *et al.*, 2002).

Rancangan percobaan dan analisis data

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap. Data mortalitas larva *C. bezziana* per tiga puluh menit ditransformasikan ke dalam rumus Abbot (rumus persentase mortalitas terkoreksi):

$$P_t = \frac{P_o - P_c}{100 - P_c} \times 100 \%$$

- P_t : Persentase mortalitas terkoreksi
 P_o : Persentase mortalitas teramati
 P_c : Persentase mortalitas kontrol

Hubungan regresi antara konsentrasi minyak atsiri dan tingkat mortalitas larva dianalisis menggunakan analisis probit dengan program POLO-PC *Software*, sehingga diperoleh konsentrasi letal (LC₅₀ dan LC₉₅) dan waktu letal (LT₅₀ dan LT₉₅) dengan selang kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Minyak atsiri daun sirih

Daun sirih yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirih hijau dengan pertimbangan kandungan minyak atsirinya diduga 15% lebih banyak dibandingkan dengan daun sirih kuning. Pernyataan ini diperkuat oleh WIRYOWIDAGDO dan LOGAWA (2000) yang menyebutkan bahwa daun sirih hijau mempunyai 3 lapisan hipodermis atas dan 2 lapisan hipodermis bawah sehingga daunnya lebih tebal dibandingkan dengan daun sirih kuning yang hanya mempunyai 2 lapisan hipodermis atas dan 1 lapisan hipodermis bawah. Minyak atsiri dilaporkan banyak terkandung

pada jaringan palisade, bunga karang dan berkas pembuluh termasuk di dalam lapisan hipodermis. Semakin banyak lapisan hipodermis di dalam daun maka kandungan minyak atsirinya semakin banyak (MATERIA MEDIKA INDONESIA, 1980).

Tabel 1 menunjukkan bahwa daun sirih Bogor menghasilkan bobot kering yang lebih banyak dibandingkan dengan daun sirih Sri Lanka, yaitu 25,54% : 17%. Namun, minyak atsiri yang diperoleh lebih sedikit dibandingkan dengan daun sirih Sri Lanka. Nilai rendemen antara minyak atsiri daun sirih Bogor dan Sri Lanka, masing-masing 0,87% dan 1%. Meskipun kedua minyak atsiri tersebut mempunyai aroma sirih yang kuat dan berwarna kuning kecoklatan tetapi minyak atsiri Bogor berwarna lebih gelap (coklat gelap).

Kedua perbedaan tersebut dapat dipahami karena dua tanaman yang tumbuh pada kondisi geografis yang berbeda diduga mengandung persentase komposisi komponen yang berbeda pula. Menurut PRIJONO (2003) bahwa kandungan bahan aktif dalam suatu tumbuhan sering beragam tergantung pada keragaman genetika tanaman, keadaan geografis daerah asal tanaman tersebut, fase pertumbuhan tanaman, musim pemanenan, cara penanganan pasca panen dan proses ekstraksi. Penelitian ini membuktikan bahwa perbedaan geografis daerah asal tanaman menyebabkan hasil rendemen minyak atsiri yang berbeda meskipun berasal dari bahan dasar yang sama, yaitu daun sirih.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Perbedaan kandungan minyak atsiri daun sirih Sri Lanka dan Bogor dianalisis dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan lempeng silika gel GF 254. Uji pendahuluan KLT menunjukkan bahwa eluen dengan toluena dan etil asetat merupakan komposisi yang tepat dan mampu memisahkan senyawa minyak atsiri daun sirih dengan baik, sehingga eluen tersebut digunakan pada KLT ini. Hasil KLT menunjukkan perbedaan antara minyak atsiri Sri Lanka dan Bogor yang terletak pada hRf 79-88.

Minyak atsiri Sri Lanka menghasilkan 3 bercak yang terlihat pada lempeng silika gel GF 254, yaitu

pada hRf 53-63; 79-88 dan 89-94 (tanpa dilakukan penyemprotan yang divisualisasikan menggunakan sinar UV 254 nm). Ketiga bercak tersebut berwarna ungu muda (Tabel 2). Fenomena yang berbeda terjadi pada minyak atsiri Bogor yang hanya menghasilkan dua bercak ungu muda, yaitu pada hRf 53-63 dan 89-94. Unikinya, keduanya hanya menampakkan satu bercak (hRf 53-63) yang berwarna biru muda pada visualisasi menggunakan sinar UV 366 nm.

Penyemprotan dengan anisaldehida-asam sulfat semakin memperjelas penampakan bercak pada lempeng gel silika meskipun tanpa penyinaran UV (pengamatan dengan sinar biasa). Sebanyak 4 bercak terlihat jelas pada hasil KLT minyak atsiri daun sirih Sri Lanka sedangkan minyak atsiri Bogor hanya menghasilkan 3 bercak (Gambar 1).

Analisis KLT minyak atsiri daun sirih hijau Indonesia yang dilakukan oleh WIRYOWIDAGDO dan LOGAWA (2000) juga membuktikan bahwa tidak pernah dijumpai adanya bercak pada kisaran nilai hRf 79-88. Bercak-bercak lainnya mempunyai nilai hRf yang relatif sama dengan penelitian WIRYOWIDAGDO dan LOGAWA (2000). Hasil ini memperkuat dugaan bahwa terdapat perbedaan senyawa antara minyak atsiri Sri Lanka dan Bogor sehingga diduga akan berpengaruh terhadap efektifitasnya sebagai larvasidal. Dugaan ini dibuktikan dengan melakukan uji hayati terhadap larva *C. bezziana*.

Pengaruh minyak atsiri daun sirih terhadap L1

Sebanyak tiga konsentrasi dan dua macam kontrol digunakan pada uji *in vitro* yang diawali dengan konsentrasi minyak atsiri 2, 3 dan 4%. Air suling dan asuntol 1% masing-masing digunakan sebagai kontrol negatif (P0) dan positif (PVII). Uji pendahuluan yang dilakukan oleh KUMARASINGHE *et al.* (2002) membuktikan bahwa efek larvasidal minyak atsiri daun sirih pada larva lalat *Chrysomya megachepala* mulai terlihat pada konsentrasi 2%. Uji coba menggunakan konsentrasi 1% tidak berpengaruh terhadap daya tahan hidup larva dan masih aktif sampai akhir pengamatan (240 menit).

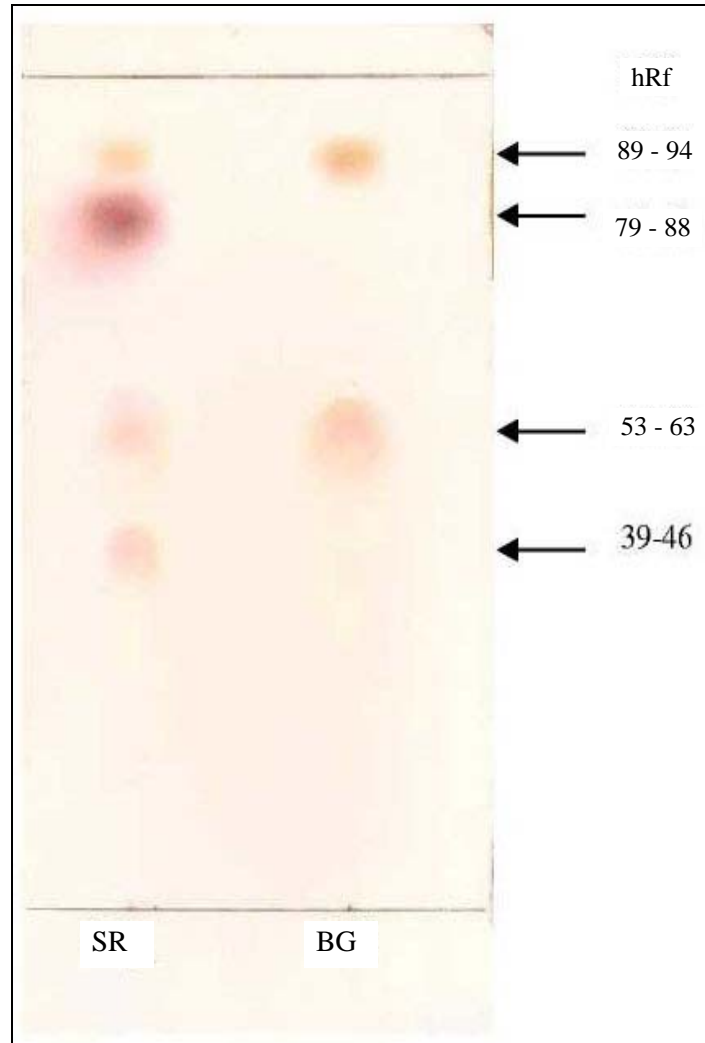
Tabel 1. Bobot daun sirih Bogor dan Sri Lanka serta hasil minyak atsirinya

Asal daun sirih	Bobot basah (kg)	Bobot kering (mg)	Minyak atsiri (ml)	% rendemen dari bobot kering
Bogor	8	1723	15	0,87
Sri Lanka	10	1700	17	1

Tabel 2. Nilai hRf kromatogram minyak atsiri daun sirih Sri Lanka dan Bogor

Asal daun sirih	No.	hRf	Sinar biasa		Sinar UV 254 nm		Sinar UV 366 nm	
			TP	DP	TP	DP	TP	DP
Kalutara	1	39 – 46	-	Coklat	-	Ungu	-	Ungu
Sri Lanka	2	53 – 63	-	Kuning merah	Ungu muda	Ungu muda	Biru muda	Ungu muda
	3	79 – 88	-	Ungu tua	Ungu muda	Biru	-	Biru
	4	89 – 94	-	Coklat muda	Ungu muda	Merah ungu	-	Merah ungu
Bogor	1	39 – 46	-	Coklat tua	-	Ungu	-	Ungu
Indonesia	2	53 – 63	-	Kuning merah	Ungu muda	Ungu muda	Biru muda	Ungu muda
	3	79 – 88	-	-	-	-	-	-
	4	89 – 94	-	Coklat muda	Ungu muda	Merah ungu	-	Merah ungu

TP: Tanpa penyemprotan anisaldehyda-asam sulfat
 DP: Dengan penyemprotan anisaldehyda-asam sulfat



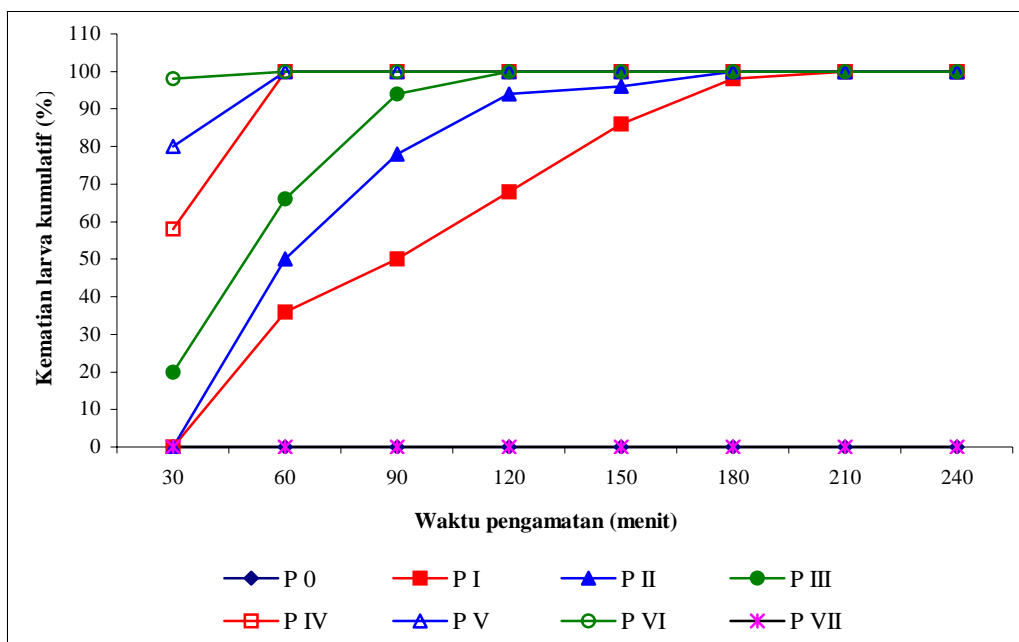
SR: Minyak atsiri daun sirih dari Sri Lanka
 BG: Minyak atsiri daun sirih dari Bogor

Gambar 1. Kromatogram pasca penyemprotan anisaldehida-asam sulfat yang divisualisasi pada sinar biasa

Pengaruh pemberian minyak atsiri daun sirih dapat terlihat pada saat memasukkan L1 dan L2 ke dalam cawan petri. Larva menjadi sangat motil yang ditandai dengan gerakannya cepat dan berusaha menghindari dari larutan minyak atsiri dengan cara merambat ke atas dinding cawan petri. Sejalan dengan waktu, larva menjadi lemas dan gerakannya mulai melemah sehingga larva jatuh ke dasar cawan kembali. Kondisi tersebut di duga karena efek minyak atsiri yang mempunyai rasa pedas sehingga mempengaruhi gerakan larva menjadi lebih cepat dibandingkan larva

kontrol (WIRYOWIDAGDO dan LOGAWA, 2000). Larva kontrol (air suling) mempunyai gerakan yang normal dan masih banyak berada didasar cawan petri.

Kematian L1 yang diberi minyak atsiri Sri Lanka 4% (PIII) pada 30 menit pertama adalah sebesar 20%. Kematian larva terus meningkat hingga mencapai 100% dalam waktu 120 menit (2 jam). Konsentrasi minyak atsiri Sri Lanka 2% (PI) dan 3% (PII) menyebabkan kematian 30% dan 50% dalam waktu 60 menit (1 jam) dan mencapai 100% dalam waktu 210 menit (3,5 jam) dan 180 menit (3 jam) (Gambar 2).



P0 = Kontrol negatif (air suling); P I = Minyak atsiri daun sirih Sri Lanka 2%; P II = Minyak atsiri daun sirih Sri Lanka 3%; P III = Minyak atsiri daun sirih Sri Lanka 4%; P IV = Minyak atsiri daun sirih Bogor 2%; P V = Minyak atsiri daun sirih Bogor 3%; P VI = Minyak atsiri daun sirih Bogor 4%; P VII = Kontrol positif (Asuntol 1%)

Gambar 2. Persentase kematian L1 *C. bezziana* pasca pemberian minyak atsiri Sri Lanka dan Bogor berdasarkan perbedaan konsentrasi dan pengamatan menit ke- n

Berbeda dengan minyak atsiri Sri Lanka, pemberian minyak atsiri Bogor berpengaruh lebih cepat terhadap kelangsungan hidup L1 (Gambar 2). Kematian L1 pada 30 menit pertama mencapai lebih dari 50%, yaitu 58% (P IV), 80% (P V) dan 98% (P VI). Semua larva telah mengalami kematian (100%) hanya dalam waktu 60 menit (1 jam) baik pada konsentrasi 2% (P IV), 3% (P V) dan 4% (P VI). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa minyak atsiri Bogor mempunyai efek larvasidal yang lebih kuat dibandingkan dengan minyak atsiri Sri Lanka. Semakin meningkat konsentrasi minyak atsiri yang diberikan pada L1 maka mengakibatkan persentase kematian L1 semakin besar.

Pengaruh minyak atsiri daun sirih terhadap L2

Perlakuan terhadap L2 sama dengan L1, yaitu meletakkan L2 kedalam cawan petri yang telah berisi minyak atsiri dengan berbagai konsentrasi. Perbedaannya terletak pada fisiologis L2 yang mempunyai lapisan kutikula lebih tebal daripada L1. Gambar 3. menunjukkan bahwa persentase kematian L2 pasca pemberian minyak atsiri Sri Lanka berjalan lebih lambat dibandingkan dengan minyak atsiri Bogor. Kematian L2 pada 30 menit pertama pasca pemberian minyak atsiri Sri Lanka kurang dari 15% sedangkan pada pemberian minyak atsiri Bogor mencapai 24%

(P IV), 38% (P V) dan 64% (P VI). Konsentrasi minyak atsiri Sri Lanka 4% (P III) mampu membunuh 100% L2 dalam waktu 240 menit (4 jam) sedangkan minyak atsiri Bogor membunuh lebih cepat, yaitu 60 menit (1 jam). Hasil ini juga mengindikasikan bahwa minyak atsiri Bogor mempunyai efek larvasidal yang lebih kuat terhadap L1 dan L2 *C. bezziana* dibandingkan dengan minyak atsiri Sri Lanka.

Meskipun kontrol negatif (P0) dan positif (P VII) tidak membunuh L1 dan L2 tetapi kondisi larva tiap-tiap perlakuan menunjukkan perbedaan. Larva instar 1 (L1) dan II (L2) pada kontrol negatif (P0) masih segar dan aktif yang ditandai dengan daya motilitas yang tinggi di dalam cawan petri. Kondisi ini berbeda dengan larva kontrol positif (P VII), yaitu larva telah menjadi lemas pada 30 menit pasca perlakuan yang ditandai dengan gerakannya yang lemah. Walaupun kondisinya lemah, tetapi hingga menit ke-240 tidak dijumpai larva yang mati. Pengamatan dibawah mikroskop masih menunjukkan adanya gerakan yang lemah ketika disentuh dengan jarum tumpul pada bagian kepala dan bagian belakangnya.

Pemberian minyak atsiri (Bogor dan Sri Lanka) menyebabkan saluran pencernaan larva berwarna coklat kehitaman. Semakin tinggi konsentrasinya menyebabkan saluran pencernaan semakin hitam. Kondisi ini jelas terlihat dari permukaan tubuh larva

yang cukup transparan. Disamping itu, pemberian minyak atsiri menyebabkan larva mengkerut. Perubahan ini diduga karena kerja dari senyawa aktif yang terkandung di dalam minyak atsiri. Larva pada kontrol (P0 dan PVII) masih menunjukkan kondisi yang normal, yaitu tidak terjadi pengerutan pada ukuran tubuhnya dan berwarna putih kekuningan.

Larva instar I (L1) dan II (L2) merupakan stadium yang penting di dalam penyakit myasis. Kedua stadium ini mutlak memerlukan jaringan hidup untuk berkembang menjadi instar III (L3) sehingga aktivitasnya akan menimbulkan kerusakan jaringan inang yang diinfestasinya. Larva instar III (L3) akan jatuh ke tanah untuk membuat terowongan dan menjadi pupa hingga menetas menjadi imago (lalat). Oleh karena itu, penelitian ini lebih diarahkan pada L1 dan L2 *C. bezziana* sehingga diharapkan kerusakan jaringan dapat diminimalkan.

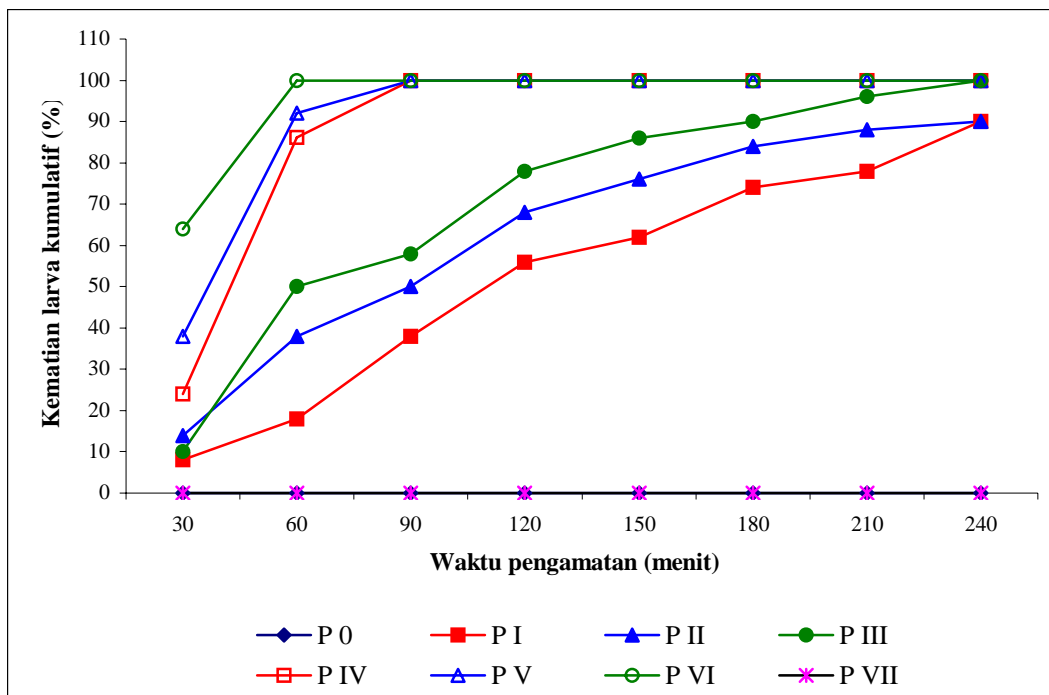
Analisis Probit

Analisis konsentrasi letal (LC₅₀ dan LC₉₅) pada tiap-tiap waktu pengamatan dan stadium instar larva memberikan nilai yang berbeda. Konsentrasi minyak

atsiri Sri Lanka yang dibutuhkan untuk membunuh L1 dan L2 lebih tinggi dibandingkan minyak atsiri Bogor (Tabel 3). Kecepatan minyak atsiri dalam membunuh larva (waktu letal/LT) juga dianalisis pada tiap-tiap konsentrasi. Daya bunuh minyak atsiri Sri Lanka terhadap L1 dan L2 lebih lambat dibandingkan dengan minyak atsiri Bogor. Semakin rendah konsentrasi minyak atsiri maka mempunyai waktu letal yang lebih lama untuk mencapai nilai LT₅₀ dan LT₉₅ (Tabel 4).

Analisis probit terhadap konsentrasi letal (LC) L1 dilakukan hingga menit ke-120 untuk minyak atsiri Sri Lanka dan menit ke-60 untuk minyak atsiri Bogor. Waktu tersebut adalah waktu maksimal yang menyebabkan kematian 100% pada konsentrasi tertinggi (4%). Hasil analisis menunjukkan bahwa konsentrasi minyak atsiri Sri Lanka yang mampu membunuh 50% (LC₅₀) dan 95% (LC₉₅) populasi L1 yang diuji, masing-masing 1,47% dan 3,34% pada menit ke-120 (2 jam). Minyak atsiri Bogor mempunyai nilai LC₅₀ dan LC₉₅ yang lebih kecil dengan waktu yang lebih cepat (Tabel 3).

Perbedaan nilai konsentrasi letal (LC) antara minyak atsiri Sri Lanka dan Bogor juga terlihat pada L2.



P0 = Kontrol negatif (air suling); P I = Minyak atsiri daun sirih Sri Lanka 2%; P II = Minyak atsiri daun sirih Sri Lanka 3%; P III = Minyak atsiri daun sirih Sri Lanka 4%; P IV = Minyak atsiri daun sirih Bogor 2%; P V = Minyak atsiri daun sirih Bogor 3%; P VI = Minyak atsiri daun sirih Bogor 4%; P VII = Kontrol positif (Asuntol 1%)

Gambar 3. Persentase kematian L2 *C. bezziana* pasca pemberian minyak atsiri Sri Lanka dan Bogor berdasarkan perbedaan konsentrasi dan pengamatan menit ke- n.

Analisis probit dilakukan hingga menit ke-240 untuk minyak atsiri Sri Lanka dan menit ke-60 untuk Bogor. Minyak atsiri Sri Lanka mempunyai nilai LC_{50} dan LC_{95} yang lebih tinggi, yaitu 0,66% dan 3,09% pada menit ke-240 (4 jam) sedangkan minyak atsiri Bogor bernilai 0,70% dan 3,20% dalam waktu 60 menit (Tabel 3).

Waktu letal dianalisis berdasarkan konsentrasi yang diuji, yaitu 2, 3 dan 4%. Berdasarkan analisis terhadap waktu letalnya terbukti bahwa konsentrasi minyak atsiri Sri Lanka 4% (PIII) mampu membunuh 50% (LT_{50}) dan 95% (LT_{95}) populasi L1 yang diuji pada menit ke-46,08 dan 93,24. Waktu yang dibutuhkan oleh minyak atsiri Bogor untuk membunuh L1 lebih cepat, yaitu 12,42 menit (LT_{50}) dan 25,13 menit (LT_{95}) (Tabel 4).

Berbeda dengan L1, daya bunuh terhadap L2 lebih lama, yaitu 69,64 menit (LT_{50}) dan 205,87 menit (LT_{95}) untuk minyak astrisi Sri Lanka 4% (Tabel 4). Minyak atsiri Bogor membutuhkan waktu yang lebih pendek, yaitu 20,03 (LT_{50}) dan 59,21 (LT_{95}). Keadaan yang serupa juga terjadi pada konsentrasi 2% dan 3%.

Hasil-hasil analisis diatas membuktikan bahwa minyak atsiri Sri Lanka mempunyai waktu daya bunuh yang relatif lambat dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan minyak atsiri Bogor. Perbedaan nilai LC dan LT pada masing-masing perlakuan sangat berhubungan erat dengan konsentrasi minyak atsiri, daerah asal tanaman termasuk stadium instar larva. Larva yang lebih tua dengan ukuran lebih besar sering lebih tahan terhadap senyawa bioaktif daripada larva yang muda.

Perbedaan kepekaan ini diduga berkaitan dengan perbedaan sifat sistem penghalang masuknya senyawa tersebut ke dalam tubuh larva (misalnya perbedaan ketebalan kutikula). Disamping itu, perbedaan luas permukaan jaringan sasaran juga menjadi faktor perbedaan kepekaan diantara stadium larva, karena kerja suatu insektisida juga melibatkan permukaan jaringan tubuh larva/serangga. Umumnya pada larva yang berukuran kecil, senyawa biokatif diduga dapat lebih cepat mencapai bagian sasaran dalam konsentrasi yang cukup untuk menimbulkan keracunan dibandingkan dengan larva yang lebih besar (PRIJONO, 2003). Hasil penelitian ini membuktikan bahwa nilai LC dan LT larva instar I (L1) lebih kecil dibandingkan dengan L2.

Mekanisme minyak atsiri daun sirih terhadap larva *C. bezziana*

ARAMBEWELA dan DISSANAYAKE (2001) melaporkan hasil analisis kromatografi gas cair pada minyak atsiri daun sirih dan mendapatkan beberapa senyawa antara lain : safrol, eugenol, allilpirokatekol diasetat, clavibitol asetat, beta phllandren, 4 terpineol, terpineol, metil kavikol, anetol, 1,8 sineol, linalool alpa pinene, metil eugenol dan senyawa lain yang tidak teridentifikasi. Senyawa-senyawa tersebut diduga mampu membunuh insekta atau bersifat insektisida (CRUZ, 2003). Namun mekanismenya sebagai larvasidal

Tabel 3. Nilai konsentrasi letal (*Lethal Concentration/LC*) L1 dan L2 *C. bezziana* berdasarkan analisis probit pada waktu pengamatan yang berbeda-beda

Menit ke-n	Larva instar I (%)				Larva instar II (%)			
	MA Bogor		MA Sri Lanka		MA Bogor		MA Sri Lanka	
	LC_{50}	LC_{95}	LC_{50}	LC_{95}	LC_{50}	LC_{95}	LC_{50}	LC_{95}
30	1,80	4,11	6,93	15,72	3,53	16,61	9,65	45,41
60	0,03	0,06	2,86	6,49	0,70	3,20	4,19	19,74
90	TD	TD	1,98	4,50	TD	TD	2,98	14,04
120	TD	TD	1,47	3,34	TD	TD	1,86	8,74
150	TD	TD	TD	TD	TD	TD	1,50	7,06
180	TD	TD	TD	TD	TD	TD	1,14	5,39
210	TD	TD	TD	TD	TD	TD	0,93	4,39
240	TD	TD	TD	TD	TD	TD	0,66	3,09

TD : Tidak dianalisis
 MA Bogor : Minyak atsiri asal Bogor
 MA Sri Lanka : Minyak atsiri asal Sri Lanka

Tabel 4. Nilai waktu letal (*Lethal Time/LT*) L1 dan L2 *C. bezziana* berdasarkan analisis probit pada konsentrasi tertentu.

Perlakuan	Larva instar I (menit)		Larva instar II (menit)	
	LT ₅₀	LT ₉₅	LT ₅₀	LT ₉₅
P I	85,56	173,14	111,45	329,48
P II	63,84	129,19	86,21	254,85
P III	46,08	93,24	69,64	205,87
P IV	26,20	53,04	33,00	97,56
P V	20,57	41,62	28,36	83,83
P VI	12,42	25,13	20,03	59,21

PI = Minyak atsiri daun sirih Sri Lanka 2%; PII = Minyak atsiri daun sirih Sri Lanka 3%; PIII = Minyak atsiri daun sirih Sri Lanka 4%; PIV = Minyak atsiri daun sirih Bogor 2%; PV = Minyak atsiri daun sirih Bogor 3%; PVI = Minyak atsiri daun sirih Bogor 4%

belum diketahui secara pasti. KUMARASINGHE *et al.* (2002) menduga bahwa senyawa alpa pinene yang terkandung di dalam minyak atsiri daun sirih berkhasiat sebagai larvasidal. Dugaan ini diperkuat dari hasil penelitiannya yang mampu membunuh larva dalam waktu 2-3 jam. Alpa pinene merupakan senyawa terpentin utama di dalam tumbuhan. Mineral terpentin sintetik telah banyak digunakan di Rumah Sakit Sri Lanka untuk pengobatan myiasis pada manusia (KUMARASINGHE *et al.*, 2000).

Metode uji *in vitro* yang digunakan pada penelitian ini menggambarkan efek racun perut dan racun kontak. Penyerapan insektisida yang mempunyai efek cerna sebagian besar berlangsung dalam mesenteron (saluran pencernaan bagian tengah). Dinding mesenteron tersusun dari sel-sel epitelium yang terdiri dari dua lapis, yaitu senyawa lipida dan protein yang tersebar pada bagian-bagian tertentu dari lapisan lipida tersebut. Secara keseluruhan, selaput sel ini bersifat lipofilik (PRIJONO, 1988). Minyak atsiri yang terminum larva diduga akan mempengaruhi sel-sel epitelium di dalam saluran pencernaan larva. Dugaan ini didukung oleh kondisi saluran pencernaan larva yang berwarna coklat kehitaman.

Penyerapan insektisida yang berefek racun kontak sebagian besar terjadi pada kutikula. Senyawa aktif akan berpenetrasi ke dalam tubuh larva melalui bagian yang dilapisi oleh kutikula yang tipis, seperti selaput antar ruas, selaput persendian pada pangkal embelan dan kemoreseptor pada tarsus. Lapisan kutikula bersifat lipofilik sehingga minyak atsiri mampu berdifusi dari lapisan kutikula terluar melalui lapisan yang lebih dalam menuju hemolimpa, mengikuti aliran hemolimpa

dan disebarkan ke seluruh bagian tubuh larva *C. bezziana* (PRIJONO, 1994).

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil di atas maka dapat disimpulkan bahwa: Minyak atsiri daun sirih Bogor mempunyai efek larvasidal yang lebih kuat dibandingkan dengan minyak atsiri daun sirih Sri Lanka terhadap L1 dan L2 *C. bezziana* secara *in vitro*. Efek racun minyak atsiri daun sirih terlihat jelas pada saluran pencernaan larva. Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka saluran pencernaan semakin menghitam. Perlu dilakukan uji lanjutan secara *in vivo* terhadap domba yang menderita myiasis. Minyak atsiri dapat diolah menjadi krem atau vaselin sehingga memudahkan untuk menyerap ke dalam luka.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Eko Setyo Purwanto yang telah banyak memberikan bantuan secara teknis di laboratorium selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- ABO-SHEHADA, M.N. 2005. Incidence of *Chrysomya bezziana* screw-worm myiasis in Saudi Arabia 1999/2000. *Vet. Record.* 156: 354-356.
- AL-AHMED, A.M. 2003. Myiasis in sheep farms in Riyadh Region, Saudi Arabia. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 34: 153-160.
- AL-IZZI, M.A. 2002. Work by the Arab Organization for Agricultural Development to control the old World screw-worm fly. Proc. Screwworm Fly Emergency Preparedness Conf. Canberra, Canberra, 12-15 November 2001. Department of Agriculture Fisheries and Forestry Australia, Canberra. pp. 187-193.
- ARAMBEWELA, L.S.R., D.S.C.T.R. DISSANAYAKE and I. WEERASINGHE. 2001. Mosquitocidal and larvicidal activities of *Piper betle* essential oil. Proc. 57th Annual Sessions, Sri Lanka Association for the Advancement of Science (SLAAS). Colombo: 26 Nov - 01 Dec 2001. pp. 249-256.
- ARAMBEWELA, L.S.R. and D.S.C.T.R. DISSANAYAKE. Insecticides activities of *Piper betle* essential oil. 2001. Proc. 57th Annual Sessions, Sri Lanka Association for the Advancement of Science (SLAAS). Colombo: 26 Nov - 01 Dec 2001: pp. 257-263.
- ISMAL, G. and F.B. AHMAD. 2003. Medicinal plants used by Kazadandusan communities around Crocker range. *ARBEK.* January – March 2003: 1-10.

- KUMARASINGHE, S.P.W., N.D. KARUNAWEEERA and R.L. IHALAMULLA. 2000. A study of cutaneous myiasis in Sri Lanka. *Int. J. Dermatol.* 39: 689-694.
- KUMARASINGHE, S.P.W., N.D. KARUNAWEEERA, R.L. IHALAMULLA., L.S.R. ARAMBEWELA and D.S.C.T.R. DISSANAYAKE, 2002. Larvacidal effects of mineral turpentine, low aromatic white spirits, aqueous extracts of *Cassia alata*, and aqueous extracts, ethanolic extracts and essential oil of betel leaf (*Piper betle*) on *Chrysomya megacheopala*. *Int. J. Dermatol.* 41: 877-880.
- MANGUNKUSUMO, E. dan R. UTAMA, 1999. Miasis hidung. *Maj. Kedok. Indon.* 49: 77- 80.
- MATERIA MEDIKA INDONESIA. 1980. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jilid IV. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. Jakarta: 92-98.
- MOSTAFAVIZADEH, K., E.A.R. NAENI dan S. MORADI. 2003. Cutaneous Myiasis. *Iran J. Med. Sci.* 28: 46-48.
- MUHARSINI, S. and T. VUOCOLO. 2000. Expression in yeast (*Pichia pastoris*) of recombinant Cb-peritrophin-42 and Cb-peritrophin-48 isolated from *Chrysomya bezziana* (the Old World Screwworm fly). *JITV* 5: 177-184.
- PARTOUTOMO, S. 2000. Epidemiologi dan pengendalian myiasis di Indonesia. *Wartazoa* 10: 20-27.
- PRIJONO, D. 1988. Pengujian Insektisida. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- PRIJONO, D. 1994. Teknik Pemanfaatan Insektisida Botanis. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- SOLSOLOY, A.D., N.D. DOMINGO, N.D. CACAYORIN and M.C. DAMO. 2001. Insecticide and fungicide effect of betel, *Piper betle* L. volatile oil on selected cotton pests. *Philippine. J. Sci.* 130: 9-19.
- SPRADBERRY, J.P. 1991. A Manual for the Diagnosis of Screwworm Fly. CSIRO Division of Entomology. Canberra. Australia.
- SUKARSIH., R.S. TOZER and M.R. KNOX. 1989. Collection and case incidence of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, in three localities in Indonesia. *Peny. Hewan.* 21: 114-117.
- SUKARSIH, S., S. PARTOUTOMO., E. SATRIA., C.H. EISEMANN and P. WILLADSEN. 1999. Pengembangan vaksin myiasis: Deteksi *in vitro* respon kekebalan protektif antigen protein *Peritrophic Membrane*, pelet dan supernatan larva L1 lalat *Chrysomya bezziana* pada domba. *JITV* 4: 202-208.
- SUKARSIH., S. PARTOUTOMO, G. WEIJFFELS and P. WILLADSEN. 2000a. Vaccination trials in sheep againts *Chrysomya bezziana* larvae using the recombinant peritrophin Antigens Cb 15, Cb 42, and C 48. *JITV* 5: 192-196.
- SUKARSIH., S. PARTOUTOMO, R. TOZER, E. SATRIA and G. WIJFFELS. 2000b. Establishment and maintenance of a colony of the old world screwworm fly *Chrysomya bezziana* at Balitvet in Bogor, West Java, Indonesia. *JITV* 5: 144-48.
- TALARI, S.A., A.Y. MOGHADAM and R. DEGHANI. 2002. *Chrysomya bezziana* Infestation. *Arch. Iran Med.*: 56-8.
- WARDHANA, A.H., S. MUHARSINI dan SUHARDONO. 2003. Koleksi dan kejadian myiasis yang disebabkan oleh *Old World Screwworm Fly, Chrysomya bezziana* di daerah endemik di Indonesia. Prosiding Seminar Teknologi Peternakan dan Veteriner 2003. Bogor, 29-30 September 2003. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 235-239.
- WARDHANA, A.H., S. MUHARSINI dan W. ASMARA. 2004. Keragaman Genetik Populasi Lalat Myiasis *Chrysomya bezziana* di Indonesia Berdasarkan Analisis DNA Mitokondria. *JITV* 9: 108-114.
- WARDHANA, A.H. dan S. MUHARSINI. 2005. Kasus myiasis yang disebabkan oleh *Chrysomya bezziana* di Pulau Jawa. Prosiding Seminar Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 12-13 September 2005. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 1078-1091.
- WIRYOWIDAGDO, S. dan B. LOGAWA. 2000. Uji Perbandingan Daun sirih (*Piper betle* Linn) Kuning dan Hijau. Fakultas Farmasi Universitas Pancasila. Jakarta. 6-11.