

**AKTIVITAS MINYAK ATSIRI KULIT BUAH JERUK
SAMBAL (*Citrus microcarpa*) SEBAGAI REPELAN
TERHADAP NYAMUK *Aedes aegypti* L
DENGAN METODE WHOPES**

NASKAH PUBLIKASI



Oleh :

AFRIA KUSUMANINGRUM

NIM. I21111021

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK**

2015

**AKTIVITAS MINYAK ATSIRI KULIT BUAH JERUK SAMBAL
(*Citrus microcarpa*) SEBAGAI REPELAN TERHADAP NYAMUK
Aedes aegypti L DENGAN METODE WHOPEP**

NASKAH PUBLIKASI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi
(S. Farm) pada Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas
Tanjungpura**



Oleh :

AFRIA KUSUMANINGRUM

NIM. I21111021

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK**

2015

NASKAH PUBLIKASI

**AKTIVITAS MINYAK ATSIRI KULIT BUAH JERUK SAMBAL
(*Citrus microcarpa*) SEBAGAI REPELAN TERHADAP NYAMUK
Aedes aegypti L. DENGAN METODE WHOPES**

Oleh:

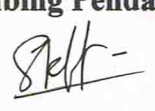
**AFRIA KUSUMANINGRUM
NIM. I 211 11 021**

Disetujui,

Rembimbing Utama,


Mohamad Andrie, M.Sc., Apt.
NIP. 198105082008011008

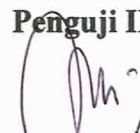
Pembimbing Pendamping,


Sri Luliana, M.Farm., Apt.
NIP. 198012262008122002

Penguji I,


Eka Kartika Untari, M.Farm., Apt.
NIP. 198301192008122001

Penguji II,


Inarah Fairiaty, M.Si., Apt.
NIP. 198004072009122002

**Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura**


dr. Arif Wicaksono, M. Biomed
NIP.198310302008121002

Lulus tanggal : 12 Agustus 2015
No. SK Dekan FK Untan : 3496/UN22.9/DT/2015
Tanggal : 25 Agustus 2015

**AKTIVITAS MINYAK ATSIRI KULIT BUAH JERUK SAMBAL (*Citrus microcarpa*)
SEBAGAI REPELAN TERHADAP NYAMUK *Aedes aegypti* L.
DENGAN METODE WHOPESES**

Afria Kusumaningrum, Moh. Andrie, Sri Luliana
Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura

ABSTRAK

Nyamuk *Aedes aegypti* L. merupakan vektor utama penyakit demam berdarah dengue (DBD). Penggunaan repelan nyamuk dapat mencegah penyebaran DBD. DEET (*N,N*-diethyl-meta-toluamide), merupakan repelan yang dikenal dan digunakan di seluruh dunia telah dilaporkan memiliki kekurangan dan toksisitas. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan repelan alami. Tujuan dari penelitian ini ialah untuk mengevaluasi aktivitas repelan dari minyak atsiri kulit buah Jeruk Sambal (*Citrus microcarpa*) terhadap nyamuk *Aedes aegypti* L. Desain penelitian ini yaitu eksperimental laboratorium berdasarkan prosedur dari *World Health Organization Pesticides Evaluation Scheme* (WHOPES). Pengujian dibagi dalam 6 kelompok uji yaitu larutan minyak atsiri 10; 20; 30; 40 dan 50%, serta etanol 70% sebagai kontrol negatif. Penelitian ini menggunakan tiga orang probandus dan 450 ekor nyamuk betina. Skrining fitokimia menunjukkan minyak atsiri mengandung komponen terpenoid. Analisis statistik yang digunakan adalah uji *One-Way* ANOVA, uji *Post-Hoc* ($P < 0,05$) dan uji regresi Probit untuk memperoleh nilai ED₅₀ dan ED₉₉. Kesimpulan dari hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak atsiri kulit buah *Citrus microcarpa* memiliki aktivitas sebagai repelan terhadap nyamuk *Aedes aegypti* L., dengan nilai ED₅₀ dan ED₉₉ masing-masing sebesar 19,25 dan 75,31%.

Kata kunci : *Aedes aegypti* L., kulit buah *Citrus microcarpa*, metode WHOPESES, minyak atsiri, repelan nyamuk

**ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF SAMBAL ORANGE (*Citrus microcarpa*) PEELS
AS REPELLENT AGAINST *Aedes aegypti* L. USING WHOPESES METHOD**

ABSTRACT

Aedes aegypti L. is a primary carrier of dengue hemorrhagic fever (DHF). Mosquito repellents may prevent the transmission of DHF. DEET (*N,N*-diethyl-meta-toluamide), a commercial repellent that is already known and used globally has been reported for its disadvantages and toxicity. Therefore, development of natural repellent is needed. The essential oil from plant can be used as a natural repellent. The aim of this study was to evaluate the repellent activity of essential oil from Jeruk Sambal (*Citrus microcarpa*) peels against *Aedes aegypti* L. This study design was laboratory experimental recommended by the World Health Organization Pesticides Evaluation Scheme (WHOPES). Trials were divided into 6 groups that each essential oil was diluted into 10; 20; 30; 40 and 50% and ethanol 70% as a negative control. Three volunteers and 450 female mosquitoes were used in this study. Phytochemical screening showed that essential oil contains terpenoid compounds. One-Way ANOVA, Post Hoc test ($P < 0,05$) and Probit regression test were used to find the value of ED₅₀ and ED₉₉. The conclusion of this study showed that the essential oil of *Citrus microcarpa* peels had repellent activity against *Aedes aegypti* L., with the value of ED₅₀ and ED₉₉ were 19.25 and 75.31%, respectively.

Keyword : *Aedes aegypti* L. *Citrus microcarpa* peels, essential oil, repellent, WHOPEs method

PENDAHULUAN

Penyakit demam berdarah *dengue* (DBD) di Kalimantan Barat selama 5 tahun terakhir menunjukkan jumlah kasus kesakitan dan kematian yang fluktuatif, dengan kasus terbanyak terjadi pada tahun 2014, yaitu sebanyak 5049 kesakitan dan 58 kematian. Penyebaran penyakit terjadi di 14 kabupaten dengan kasus terbanyak di Kabupaten Ketapang yaitu sebanyak 931 kasus⁽¹⁾.

Penggunaan repelan atau penolak nyamuk merupakan salah satu tindakan pencegahan untuk menanggulangi penyebaran penyakit yang diperantarai oleh nyamuk⁽²⁾. Produk repelan yang banyak beredar di masyarakat berbahan aktif *N,N-diethyl-meta-toluamide* (DEET), *diclorovinil dimethyl phosphat* (DDP), *malathion*, *parathion*, dan lain-lain. Penggunaan bahan kimia tersebut secara terus menerus dapat menimbulkan dampak buruk terhadap kesehatan dan lingkungan, karena residunya tidak dapat diuraikan serta dapat memasuki rantai makanan⁽³⁾. Oleh karena itu, pemanfaatan bahan alam yang memiliki aktivitas repelan nyamuk dapat menjadi salah satu alternatif dalam pencegahan penularan penyakit oleh nyamuk yang relatif lebih aman.

Tanaman jeruk sambal (*Citrus microcarpa* Bunge) banyak dijumpai di

Kalimantan Barat, kulit buahnya mengandung minyak atsiri dengan senyawa dominan golongan terpenoid yang terdiri dari monoterpen (limonen, β -mirsen, β -pinen, α -pinen, β -felandren, dan sabinen) dan seskuiterpen (elemen, farnesen dan isomer gernasren) dengan kadar limonen yang sangat tinggi yaitu lebih dari 94%^(4,5). Limonen, α -pinen, sitronelol, sitronelal, kapor dan timol merupakan senyawa golongan terpenoid dalam minyak atsiri yang memiliki aktivitas sebagai repelan terhadap kelas Insecta seperti nyamuk⁽⁶⁾.

Metode pengujian repelan menggunakan metode WHOPEs (*World Health Organization Pesticide Evaluation*) yang merupakan metode terstandar dari WHO dalam evaluasi dan pengujian insektisida termasuk repelan pada kulit⁽⁷⁾. Melalui penelitian ini diharapkan dapat dibuktikan adanya aktivitas minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* sebagai repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. serta konsentrasi efektif median (ED₅₀) dan konsentrasi efektif maksimum (ED₉₉) nya.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan: alat destilasi uap, aspirator, higrometer dan kandang uji nyamuk (ukuran 25x25x25 cm).

Bahan yang digunakan: kulit buah *C. microcarpa*, pereaksi Liebermann-Burchard, etil asetat, toluen, plat KLT *silica gel 60 GF₂₅₄*, dan etanol 70%.

Hewan uji yang digunakan adalah nyamuk *Ae. aegypti* L. betina dewasa yang dikembangbiakkan di Balai Penelitian dan Pengembangan (P2B2) Tanah Bumbu, Kalimantan Selatan.

Pengambilan dan Pengolahan Simplisia

Tanaman *C. microcarpa* dideterminasi di LIPI Bogor. Buah *C. microcarpa* diperoleh dari perkebunan jeruk sambal di Desa Kalimas Tengah, Kec. Sui. Kakap, Kab. Kuburaya. Pengambilan buah dilakukan pada bulan April – Mei 2015. Pemanenan pada pagi hari, dipilih buah yang berusia sekitar 14 – 21 hari. Sebanyak 37 Kg buah dihasilkan 8,1 Kg simplisia kulit buah segar.

Penyulingan Minyak Atsiri

Penyulingan minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* dengan metode penyulingan uap langsung. 8,1 Kg simplisia segar menghasilkan minyak atsiri sebanyak 64,5 mL, sehingga rendemennya 0,67% b/b.

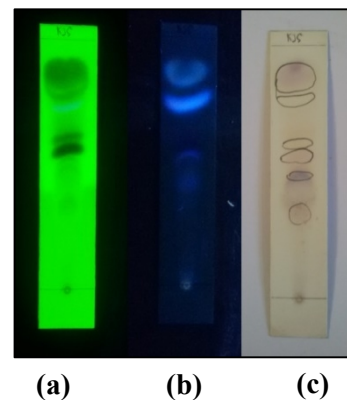
Uji Mutu Minyak Atsiri

Uji mutu minyak atsiri dilakukan untuk mengetahui kemurnian dan karakteristik minyak atsiri⁽⁸⁾. Pengujian meliputi uji organoleptik, ditunjukkan dengan minyak atsiri yang berwarna kekuningan dan bening serta berbau khas

jeruk; identifikasi umum, ditunjukkan dengan sifat minyak atsiri yang menyebar saat ditetaskan ke permukaan air dan tidak meninggalkan noda lemak saat ditetaskan pada kertas saring; pemeriksaan bobot jenis yaitu 0,8364 g/mL, dan penetapan indeks bias minyak atsiri yaitu 1,46.

Skrining Fitokimia

Uji tabung dilakukan dengan mereaksikan minyak atsiri dengan pereaksi Liebermann-Burchard, terbentuk warna merah kehitaman. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan fase gerak toluen : etil asetat (93:7) dan dideteksi dengan penyemprot pereaksi Liebermann-Burchard terbentuk warna biru-keunguan pada plat yang dipanaskan. Hasil menunjukkan minyak atsiri positif mengandung terpenoid^(9,10) (Gambar 1.)



Gambar 1. KLT Minyak Atsiri Kulit Buah *C. microcarpa*: UV 254 nm (a); UV 366 nm (b); Setelah penyemprotan dengan pereaksi Liebermann-Burchard dan pemanasan (c)

Pengembangbiakan dan Pemeliharaan Nyamuk

Telur *Ae. aegypti* L. ditetaskan dalam bak plastik (35x25x5 cm) yang diisi

air sumur setinggi $\frac{3}{4}$ bak. Telur dipelihara hingga menjadi larva. Larva diberi pakan hewan yang telah dihaluskan. Larva yang telah menjadi pupa dipindahkan dalam gelas plastik lalu dimasukkan dalam kandang pemeliharaan (35x35x35 cm). Pupa yang telah menjadi nyamuk dewasa dipelihara dengan diberi makan larutan dekstrosa 10%. Kondisi pengembangbiakan dan pemeliharaan nyamuk yaitu pada suhu $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban relatif 60 – 80%^(7,11,12).

Uji Aktivitas Repelan

Nyamuk yang digunakan dalam pengujian aktivitas repelan yaitu nyamuk betina yang berusia 3 – 5 hari. Nyamuk betina dipilih dan diambil menggunakan aspirator dari kandang pemeliharaan. Digunakan 3 kandang uji (25x25x25 cm) dalam sekali pengujian menggunakan 3 orang probandus. Tiap kandang uji berisi 50 ekor nyamuk betina dewasa. Pengujian dilakukan dengan 3 kali replikasi di hari yang berbeda.

Minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* dibuat dalam lima seri konsentrasi yaitu 10; 20; 30; 40 dan 50% dalam etanol 70%.

Kriteria probandus penelitian yaitu berjenis kelamin laki-laki, sehat, usia 18 - 44 tahun, tidak memiliki riwayat DBF dan alergi di kulit, serta tidak memiliki luka di bagian lengan. Probandus menghindari penggunaan produk wangi-wangian dan

produk repelan serta tidak merokok selama 12 jam sebelum dan selama pengujian. Probandus mencuci lengan sebelum pengujian dan mengenakan sarung tangan lateks untuk melindungi telapak tangan yang bukan merupakan area uji⁽⁷⁾.

Metode pengujian mengikuti aturan pedoman WHOPES. Area uji yaitu bagian lengan bawah hingga pergelangan tangan. Lengan kiri dioleskan etanol 70% secara merata sebagai kontrol negatif, kemudian dimasukkan ke dalam kandang uji dan diamati selama 30 detik. Jika jumlah nyamuk yang hinggap ≥ 10 ekor, maka pengujian dapat dilanjutkan dengan pengolesan minyak atsiri mulai dari konsentrasi terendah hingga tertinggi pada lengan yang sama dengan prosedur pengujian yang sama. Selanjutnya, pada lengan kanan dioleskan etanol 70% lalu dimasukkan dalam kandang uji dan diamati selama 30 detik, jika nyamuk yang hinggap ≥ 10 ekor maka data selama pengujian dapat diterima. Selama pengujian, lengan probandus diusahakan untuk tidak bergerak. Nyamuk yang digunakan tiap pengujian merupakan nyamuk yang belum pernah digunakan. Kondisi pengujian aktivitas repelan yaitu pada suhu $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban relatif 60 – 80%^(7,11,12).

Data yang diperoleh berupa data jumlah nyamuk hinggap dan diolah

menjadi data persentase daya proteksi dengan persamaan berikut ⁽⁷⁾:

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

Keterangan:

ΣC adalah rerata jumlah nyamuk hinggap pada perlakuan kontrol negatif;

ΣT adalah jumlah nyamuk hinggap pada perlakuan kelompok uji.

Data dianalisis secara statistik menggunakan aplikasi *Statistical Program SPSS 17 trial* meliputi analisis *One-Way ANOVA* dan regresi *probit-plane* untuk menentukan ED_{50} dan ED_{99} . Nilai ED_{50} dan ED_{99} menunjukkan konsentrasi yang dapat menimbulkan daya proteksi sebesar 50% dan 99% terhadap nyamuk ⁽⁷⁾.

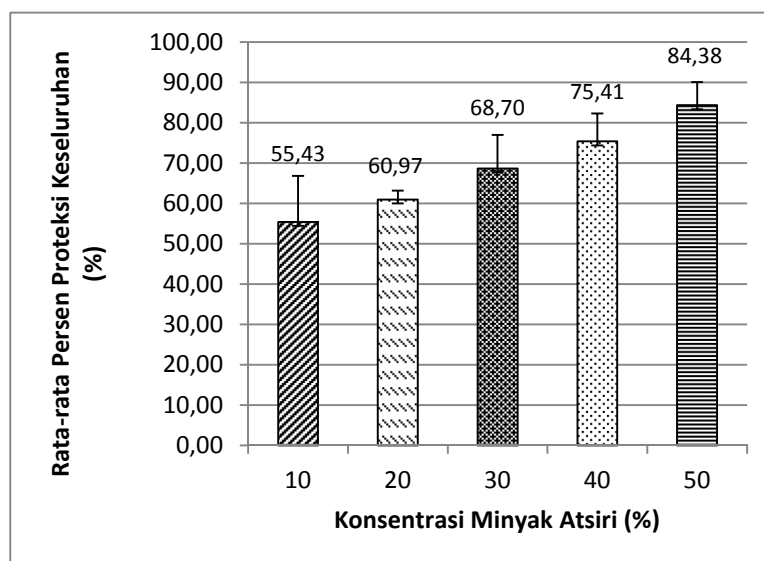
HASIL

Pengujian aktivitas repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. dilaksanakan selama 3 hari pada waktu pengujian mengikuti waktu aktif nyamuk yaitu 08.00-16.00⁽¹²⁾. Hasil pengujian

repelan berupa data rata-rata persentase daya proteksi minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* terhadap *Ae. aegypti* L. pada tiap probandus. Hubungan konsentrasi larutan uji minyak atsiri dengan rata-rata persentase daya proteksi keseluruhan dapat dilihat pada Gambar 2.

Pada grafik terlihat bahwa semakin meningkat konsentrasi minyak atsiri, semakin besar pula persentase daya proteksinya. Konsentrasi 10; 20; 30; 40 dan 50% memberikan persentase daya proteksi masing-masing sebesar 55,43; 60,97; 68,70; 75,41; dan 84,38%.

Data tersebut selanjutnya dianalisis dengan *One-Way ANOVA* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna pada kelompok perlakuan. Hasil analisis menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antar kelompok pengujian dilihat dari nilai $P < 0,05$.



Gambar 2. Grafik Hubungan Konsentrasi Minyak Atsiri Kulit Buah *C. microcarpa* terhadap Persentase Daya Proteksi

Untuk mengetahui kelompok pengujian mana yang berbeda bermakna, analisis dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc*. Berdasarkan hasil analisis diketahui bahwa terdapat perbedaan persentase daya proteksi yang bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan seluruh kelompok perlakuan. Hal ini membuktikan bahwa minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* memiliki aktivitas sebagai repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. Perbedaan bermakna juga ditemukan antara kelompok perlakuan berikut berikut:

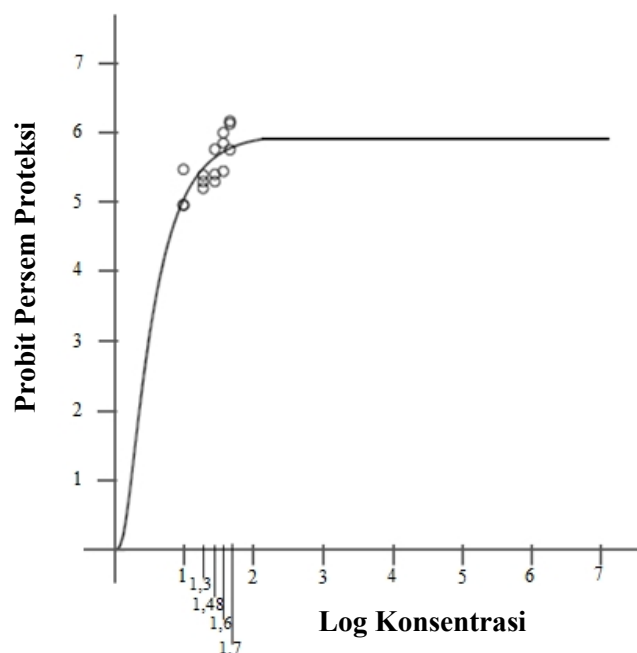
konsentrasi 10% dengan 30, 40 dan 50%; konsentrasi 20% dengan 40 dan 50%; serta konsentrasi 30% dengan 50%.

Setelah diketahui adanya aktivitas repelan pada minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L., selanjutnya dilakukan analisis statistik menggunakan regresi probit. Tujuan analisis ini ialah untuk mengetahui estimasi besar konsentrasi minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* yang memiliki daya proteksi terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. sebesar 50% dan 99% (ED_{50} dan ED_{99}).

Tabel 1. Estimasi Nilai ED_{50} dan ED_{99} Minyak Atsiri Kulit Buah *C. microcarpa* Sebagai Repelan

	Konsentrasi	Batas Atas	Batas Bawah
ED_{50} (%)	19,25	11,958	25,101
ED_{99} (%)	75,31	60,525	101,459

Gambar 3. Grafik Hubungan Log Konsentrasi dengan Probit Persentase Daya Proteksi



Hasil analisis probit disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan hasil analisis regresi probit, estimasi konsentrasi minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* yang memiliki daya proteksi 50% dan 99% terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. berturut-turut adalah 19,25 dan 75,31%. Grafik sigmoid pada Gambar 3 adalah hubungan antara log konsentrasi minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* dengan probit persentase daya proteksi yang menunjukkan identitas konsentrasi efektif minyak atsiri sebagai repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L.

PEMBAHASAN

Pengujian aktivitas repelan dimulai dengan melakukan orientasi pengujian terhadap spesies nyamuk yang tersedia di Laboratorium Entomologi, yaitu nyamuk *Cx. quinquefasciatus* S. dan *Ae. aegypti* L selama 9 hari untuk mendapatkan respon awal berupa jumlah nyamuk hinggap di lengan probandus ≥ 10 ekor saat pengujian kontrol negatif. 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 pancing, penempatan nyamuk betina dan nyamuk jantan dalam satu kandang uji, penambahan jumlah nyamuk betina dan

nyamuk dalam kandang uji (50–100 ekor nyamuk), pengkondisian kandang uji sesuai kandang pemeliharaan dan penggunaan kandang pemeliharaan sebagai kandang uji. Namun, nyamuk *Cx. quinquefasciatus* S. tidak memberikan respon yang diharapkan.

Berdasarkan orientasi-orientasi yang telah dilakukan, peneliti menyimpulkan bahwa nyamuk *Cx. quinquefasciatus* S. sangat sensitif dan mudah mengalami stres jika berada dalam kondisi yang tidak sesuai habitatnya, sehingga memerlukan teknik khusus serta waktu orientasi yang lebih lama. Beberapa penelitian menyatakan bahwa nyamuk *Cx. quinquefasciatus* S. memiliki sensitivitas yang lebih tinggi terhadap minyak esensial jika dibandingkan dengan spesies nyamuk lainnya^(12,13).

Minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* mengandung senyawa golongan terpenoid yang tersusun atas monoterpen dan seskuiterpen, yang mana menurut Kiran dan Devi (2007); Jaenson, dkk (2006); dan Sukumar, dkk (1991) golongan senyawa tersebut paling banyak ditemukan memberikan aktivitas repelan terhadap kelas Insecta (dicitasi oleh 6, h373). Berdasarkan penelitian oleh Ibrahim dan Zaki (1998); Jaenson, dkk (2006); Park, dkk (2005); dan Yang, dkk (2004), golongan monoterpen seperti α -pinen, sinol, eugenol, limonen, tripinolen,

sitronelol, sitronelal, kapor dan timol merupakan konstituen yang telah dibuktikan memiliki aktivitas repelan (dicitasi oleh 6, h373). Wai (2013) telah melakukan identifikasi senyawa volatil dalam kulit buah *C. microcarpa*, ditemukan beberapa senyawa dominan antara lain α -pinen, β -pinen, limonen, linalool, germasren dan geranil asetat, namun Jantan, dkk (1996) menyebutkan bahwa limonen merupakan senyawa yang paling dominan dengan kadar mencapai lebih dari 94%^(4,5). Berdasarkan hal tersebut, senyawa dalam minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* yang diduga paling berperan dalam memberikan aktivitas repelan adalah limonen.

Mekanisme minyak atsiri dalam menolak nyamuk yaitu minyak atsiri yang diaplikasikan ke kulit akan meresap melalui pori-pori kulit, kemudian panas tubuh akan menguapkan senyawa-senyawa volatil ke udara. Senyawa tersebut mengganggu kerja reseptor pada antena nyamuk yang berfungsi untuk mengenali keberadaan mangsanya⁽¹⁴⁾. Nyamuk mengenali mangsanya melalui bau karbondioksida, asam laktat dan bau lain yang berasal dari kulit yang hangat dan lembab. Terganggunya reseptor pada antena nyamuk menyebabkan kemampuannya dalam mengenali mangsa menjadi menurun, sehingga nyamuk cenderung menghindar dan menjauhi

lengan probandus yang telah diaplikasikan minyak atsiri.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri kulit buah *C. microcarpa* memiliki aktivitas sebagai repelan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* L. dengan ED₅₀ dan ED₉₉ pada konsentrasi 19,25 dan 75,31%.

UCAPAN TERIMA KASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

1. Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Barat. Data Kesakitan dan Kematian DBD Tahun 2009 – 2014 Provinsi Kalimantan Barat. Pontianak : Dinas Kesehatan Provinsi Kalimantan Barat; 2015
2. Perich MJ. Basic of Mosquito-borne Disease and The Mosquito Vectors. Dept. of Entomology Louisiana State University Ag Center; 2000.
3. Adebowale KO, Adedire CO. Chemical Composition and Insecticidal Properties of the Underutilized *Jatropha curcas* seed oil. African J. Biotech; 2006; 5(10): 901 – 06.
4. Wai CM. Chemical Component and Aromatic Profiles of Citrus and Coffee in Asia. Departement of Chemistry, National University of Singapore. Thesis; 2013: 96 – 9.
5. Jantan I, Ahmad AS, Ahmad AR, Ali NAM, Ayop N. Chemical Composition of Some Citrus Oil From Malaysia. Jorunal

- of Essential Oil Research; 1996; 8(6): 627 – 32.
6. Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. Repellent Activity of Essential Oil: A Review, Bioresour. Tecgnol; 2010; 101:372 – 78.
 7. WHO. Guidelines for Efficacy Testing of Mosquito Repellents for Human Skin. World Health Organization; 2009:1 – 6.
 8. Ketaren IRS. Pengantar Teknologi Minyak Atsiri. Jakarta : Penerbit Balai Pustaka; 1985:45 – 7, 67, 108, 113, 111.
 9. Kristanti AN, Aminah NS, Tanjung M, Kurniadi B. Buku Ajar Fitokimia. Surabaya : Airlangga University Press; 2008: 54.
 10. Wagner H. Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas, Springer Verlag: 1984:164, 335.
 11. Medikanto BR, Setyaningrum E, Biomed M. Pengaruh Ekstrak Daun Legundi (*Vitex trifolia* L.) sebagai *Repellent* terhadap Nyamuk *Aedes aegypti*. Medical Journal of Lampung University; 2013; 2(4):37 – 9.
 12. Tawatsin A, Wratten SD, Scott RR, Thavara U, Techadamrongsin Y. Repellency of Volatile Oils from Plants Against Three Mosquito Vectors. Journal of Vector Ecology; 2001; 26(1):233 – 4.
 13. Phukerd U, Soonwera M, Wongnet O. Repellent Activity of Essential Oils From Rutaceae Plants Against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). Thailand:Journal of Agricultural Technology; 2013; 9(6): 1585 – 94.
 14. BPOM. Bahaya DEET pada Insect – Repellent. Badan Pengawas Obat dan Makanan; 2014. [dicitasi 31 Januari 2015]. Tersedia dari: <http://ik.pom.go.id/v2014/artikel/BahayaDEETpadaInsect.pdf>