

Uji Toksisitas Minyak Atsiri Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht) terhadap Larva *Aedes aegypti* serta Profil GC-MS

Toxicity Study of Volatile Oil *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht Rhizome to Larvacide of *Aedes aegypti* and GC-MS Profile

Widyasari Putranti*, Saiful Bachri

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta Jl. Soepomo Umbulharjo Yogyakarta

ABSTRAK

Tanaman temu kunci telah lama dikenal oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Kandungan kimia tanaman ini, terutama minyak atsiri mengandung monoterpen dan sesquiterpen. Penggunaan rimpang temu kunci ini yang merupakan suatu insektisida botanik menunjukkan keamanan yang lebih tinggi karena molekulnya mudah terpecah menjadi senyawa yang tidak berbahaya terhadap lingkungan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas larvasida minyak atsiri rimpang temu kunci terhadap larva *Aedes aegypti* serta menganalisis komponen senyawa kimianya dengan GC - MS. *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht diisolasi dengan menggunakan metode destilasi uap dan air. Uji aktivitas larvasida dilakukan dengan melarutkan bahan pada air yang ditambah alkohol 70 % v/v. Konsentrasi minyak atsiri rimpang temu kunci yang digunakan yaitu: 150 ppm; 201 ppm; 270 ppm; 362 ppm; 485 ppm; 650 ppm. Tiap perlakuan menggunakan 20 ekor larva *Aedes aegypti*, kematian larva diamati selama 24 jam. Harga LC_{50} dihitung dari data kematian larva dengan metode analisis probit. Komponen senyawa kimia penyusun minyak atsiri rimpang temu kunci dianalisis dengan GC-MS. Hasil penelitian diperoleh minyak atsiri hasil destilasi uap air yang berwarna jernih agak kekuningan, rasa agak pahit, berbau khas aromatis, rendemen sebesar $0,25 \pm 0,011\%$ v/b dan indeks bias 1,4818. Harga LC_{50} minyak atsiri rimpang temu kunci sebesar $(407,06 \pm 31,6985)$ ppm, sedangkan abate sebesar $(0,0132 \pm 0,0013)$ ppm. Hal ini menunjukkan bahwa abate lebih poten terhadap larva *Aedes aegypti*. Analisis komponen kimia dengan GC-MS diperoleh 15 puncak kromatogram dan 6 puncak yang telah diidentifikasi kemungkinan senyawanya adalah champene, eucalyptol, ocimene, camphora, geraniol, methyl cinnamate.

Kata kunci: toksisitas, *Boesenbergia pandurata*, larvasida, *Aedes aegypti*, GC-MS

ABSTRACT

Boesenbergia pandurata (Roxb) Schlecht has been recognized by society as traditional drug for a long time. The active constituent of this plants especially the volatile oil, which contains monoterpenes and sesquiterpenes. The use of *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht rhizome which is a botanical insecticide shows higher safety because the molecule is easily broken down into harmless compounds against the environment. The aim of this research were to know about the activity of larvacide from the volatile oil of *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht rhizome and also to analyze its chemical compounds using GC-MS. The volatile oil was isolated from *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht with steam and water distillation method. The volatile oil in the aqueous ethanol 70 % v/v was made as the test solution for larvacide. The concentrations of the volatile oil of *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht rhizomes used were 150 ppm; 201 ppm; 270 ppm; 362 ppm; 485 ppm; 650 ppm. Abate was used as positive control at concentration 0,001 ppm; 0,0025 ppm; 0,0065 ppm; 0,016 ppm; 0,04 ppm; 0,1 ppm while aqueous ethanol 70 % v/v was used as negative control. Each treatment were used 20 larvae of *Aedes aegypti* and was observed during 24 hours. The data of died larvae were counted to estimate the values of LC_{50} with probit analysis method. The chemical compound of volatile oil of *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht was analyzed by the GC-MS. The results of this research showed that the volatile oil of *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht have clear-brass colour, bitter taste, typically aromatic, rendemen equal to $(0,25 \pm 0,011)$ % v/w and refractive index 1,4818. The value of LC_{50} for the volatile oil of *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht rhizome is

*Corresponding author : Widyasari Putranti
Email : widyasari@pharm.uad.ac.id

(407,06 ± 31,6985) ppm while abate equal to (0,0132 ± 0,0013) ppm. This matter indicates that abate more potent to larvae of *Aedes aegypti*. The result of analyze the component of the volatile oil of *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht by the GC-MS obtained of 15 peak chromatogram and 6 peak which has identified showed the possibility the existence of champene, eucalyptol, ocimene, camphora, geraniol, methyl cinnamate.

Keywords: toxicity, *Boesenbergia pandurata*, larvacide, *Aedes aegypti*, GC-MS

PENDAHULUAN

Nyamuk adalah serangga yang menyebabkan gangguan pada manusia karena selain menggigit dan menghisap darah, juga peranannya sebagai vektor pembawa penyakit yang menjadi masalah bagi kesehatan. Nyamuk adalah serangga yang paling banyak menyebabkan penyakit dan kematian sehingga dijuluki sebagai pembunuh no.1 di dunia. Nyamuk terdiri dari beberapa genus yang merupakan vektor penyakit pada manusia. Genus utama yang berhubungan dengan penyakit pada manusia adalah *Anopheles*, *Culex*, *Aedes aegypti* dan *Mansonia*. *Aedes aegypti* termasuk nyamuk dalam genus *Aedes* merupakan nyamuk demam kuning, nyamuk ini juga membawa virus dengue, cacing filariasis, encephalitis virus serta pembawa penyakit chikungunya (Brown, 1984).

Pengendalian vektor nyamuk masih digunakan bahan kimiawi sejenis insektisida. Penggunaan insektisida secara terus-menerus dalam waktu yang panjang atau penggunaan yang tidak sesuai dengan dosis yang tepat dapat menimbulkan resistensi. Tentu saja hal ini dapat menyulitkan program pemberantasan Demam Berdarah Dengue, sehingga perlu mencari alternatif insektisida lain selain insektisida kimiawi dalam upaya pengendalian vektor penyakit yaitu dengan menggunakan insektisida yang berasal dari tanaman (bioinsektisida).

Mengingat vektor yang tersebar luas dan makin meningkatnya mobilitas penduduk, maka timbul keinginan untuk mengisolasi minyak atsiri rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht) serta menguji efek toksis terhadap larva *Aedes aegypti*. Pada penelitian ini digunakan tanaman temu kunci khususnya rimpang temu kunci sebagai sampel yang disuling untuk mendapatkan bahan ekokimia yang kemudian diuji efek toksis terhadap larva *Aedes aegypti*. Serta penggunaan rimpang temu kunci ini yang merupakan suatu insektisida botanik menunjukkan keamanan yang lebih tinggi karena molekulnya mudah terpecah menjadi senyawa yang tidak berbahaya terhadap lingkungan.

Rimpang temu kunci banyak terdapat di Indonesia dan sangat mudah untuk dikembangkan di samping itu juga tanaman temu kunci mempunyai khasiat untuk memperbaiki

gangguan pencernaan, karminativa, obat batuk kering, pencahar dan merangsang keluarnya air seni, juga bersifat analgetika dan mengobati radang pada indung telur (Gunawan, dkk, 1980). Kandungan kimia temu kunci antara lain adalah minyak atsiri, damar, zat pati, saponin, flavonoid pinostrolerin dan alipinetin. Minyak atsiri temu kunci mengandung kamfer, sineol, metil sinamat, hidromirsen (Anonim, 2002), sedangkan sineol merupakan "oxide volatile oil" yang digunakan sebagai parfum, antiseptik, diaforetika dan ekspektoran.

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan bahwa minyak atsiri memiliki aktivitas larvasida. Beberapa senyawa terpen seperti farnesol, asam parnesenat dan 9 - oxo - 2 dekanolat dapat menghambat pergantian kulit larva *Aedes aegypti*, sedangkan biji mimba mengakibatkan mortalitas larva *Aedes aegypti* instar IV dan *Culex quinquefasciatus* serta menghambat perkembangan pupa menjadi dewasa (Nugroho, 1997), sehingga kemungkinan minyak atsiri rimpang temu kunci mempunyai aktivitas larvasida.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan dandang destilasi uap dengan air, destilasi Stahl. Refraktometer ABBE. cawan porselin, pipet mikro dan alat-alat gelas., Kromatografi Gas - Spektrometri Massa Shimadzu Qp-5000.

Bahan yang digunakan rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht) yang diperoleh dari Dlingo, Bantul Yogyakarta, larva *Aedes aegypti* instar IV (Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM), akuades (Kimia Farma), natrium sulfat anhidrat p.a (Merck), alkohol teknis (Brataco Chemika) dan aseton teknis (Brataco Chemika), abate (Werda Kesri), hati ayam kering (Comfeed).

Jalannya Penelitian Penyulingan minyak atsiri rimpang temu kunci

Rimpang temu kunci ditimbang 7 Kg, kemudian diletakkan diatas angas yang berupa ayakan yang terletak beberapa sentimeter diatas permukaan air dalam ketel penyuling. Alat destilasi dirangkai sehingga terpasang baik dan

benar, kemudian air dialirkan melalui pendingin dan api dinyalakan. Destilat ditampung dan minyak atsiri dipisahkan dengan air yang ada. Sisa air dikeringkan dengan natrium sulfat anhidrat. Minyak yang diperoleh disimpan dalam wadah gelas berwarna coklat dan tertutup rapat terlindung cahaya.

Uji sifat fisik minyak atsiri rimpang temu kunci

Pada uji organoleptis, pemeriksaan dilakukan terhadap warna, bau dan rasa. Sedangkan penetapan indeks bias minyak atsiri rimpang temu kunci menggunakan Refraktometer ABBE. Air dialirkan terlebih dahulu dari kran melalui termostat hingga suhu tetap selama sepuluh menit. Kedua prisma dipisahkan dengan membuka kran dan dibersihkan. Sebanyak 1-2 tetes minyak atsiri diteteskan diatas permukaan, prisma kemudian dijepitkan lagi dengan prisma diatasnya, kaca distel hingga cahaya masuk kemudian dasar prisma diputar perlahan-lahan sampai terlihat batas penglihatan gelap dan terang yang memotong titik silang. Indeks bias dibaca pada busur skala pembacaan. Setelah dicatat prisma dibuka lagi, cairan dihilangkan dengan kertas saring, kemudian dibilas dengan aseton. Sebagai kontrol dilakukan penetapan indeks bias air pada suhu yang sama. Indeks bias minyak atsiri yang diperoleh diperhitungkan terhadap indeks bias kontrol.

Rendemen minyak atsiri rimpang temu kunci

Kadar minyak atsiri yang terkandung dalam minyak atsiri diukur menggunakan alat destilasi Stahl dengan replikasi 3 kali.

$$\text{Kadar minyak atsiri} = \frac{\text{Vol Minyak Atsiri}}{\text{Bobot sampel}} \times 100\%$$

Persiapan larva nyamuk *Aedes aegypti*

Untuk memperoleh larva *Aedes aegypti* dilakukan dengan cara menetas telur nyamuk *Aedes aegypti* yang diperoleh dari hasil kolonisasi dan dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM. Pada suhu dan kelembaban kamar dilakukan penetasan, dan sebagai medium penetasan adalah 500mL akuades dalam gelas beaker 1000mL. Telur-telur tersebut ditunggu sampai menetas menjadi larva yang membutuhkan waktu 2 hari. Larva kemudian dipelihara dan diberi makan hati ayam kering (1000mL air digunakan 100-150mg hati ayam kering) sampai berumur 3 hari (instar IV).

Uji toksisitas minyak atsiri rimpang temu kunci terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*

Penelitian ini menggunakan lima kali pengulangan dimana tiap cawan berisi larutan sampel yaitu minyak atsiri rimpang temu kunci dengan konsentrasi 150ppm, 201ppm, 270ppm, 362ppm, 485ppm, 650ppm sebanyak 250mL dan alkohol sebagai pelarut, sedangkan abate digunakan sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 0,1ppm; 0,04ppm; 0,016ppm; 0,0065 ppm; 0,0025ppm; 0,001ppm. Setiap cawan berisi dua puluh ekor larva instar IV, di mana didalamnya diberi makanan larva yaitu hati ayam kering. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah kematian pada menit ke-10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 sampai 24 jam, kematian larva diawali dengan larva inaktif atau keaktifan bergerak berkurang, diam lalu mati.

Untuk mengetahui besarnya ketoksikan minyak atsiri rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht) terhadap larva *Aedes aegypti*, dihitung prosentase kematian larva lalu dianalisis dengan menggunakan metode analisa probit. Dari analisa itu kemudian diperoleh harga LC_{50} .

Analisa data

Data diperoleh dengan cara menghitung jumlah kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* pada tiap cawan setelah 24 jam perlakuan. Kemudian dihitung rata-ratanya untuk tiap konsentrasi dan masing-masing nilai persen respon kematian tersebut dikonversikan menjadi nilai probit sesuai dengan tabel probit. Data kematian kontrol digunakan untuk mengoreksi. Perhitungan persen kematian menggunakan rumus Abbot's sebagai berikut:

$$\text{Persen kematian} = \frac{R}{\text{Jumlah hewan uji}} \times 100\%$$

$R = \text{Rata-rata kematian pada kelompok uji}$

Nilai LC_{50} merupakan antilog x dengan cara memplotkan nilai probit 5 sebagai y kedalam persamaan yang diperoleh (Mursyidi, 1982). Ditetapkan nilai LC_{50} dengan batas kepercayaan 95 % (Meyer, 1982).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji organoleptis

Uji organoleptis dilakukan terhadap warna, bau dan rasa yaitu: Warna: jernih agak kekuningan; Bau: berbau khas aromatis; Rasa: agak pahit dan menimbulkan rasa agak tebal.

Tabel I. Hasil penyulingan minyak atsiri dengan metode destilasi Stahl

No.	Berat Simplisia (g)	Volume Minyak Atsiri (mL)	Rendemen Minyak Atsiri (% v/b)
1	50	0,13	0,26
2	50	0,12	0,24
3	50	0,12	0,24
Rata-rata ± SD		0,12 ± 0,006	0,25 ± 0,011

Tabel II. Harga LC_{50} tiap perlakuan kontrol positif (abate) selama 24 jam

No	Persamaan regresi linear	Koefisien korelasi (r)	R Teoritis	LC_{50} (ppm)
1	$Y = 1,8279x + 8,3605$	0,9786	0,8114	0,0145
2	$Y = 1,5375x + 7,8885$	0,9825	0,8114	0,0132
3	$Y = 1,8279x + 8,3605$	0,9786	0,8114	0,0145
4	$Y = 1,8254x + 8,4956$	0,9388	0,8114	0,0122
5	$Y = 2,1155x + 9,0871$	0,9773	0,8114	0,0117

Rendemen Minyak atsiri

Dari ketiga penyulingan tersebut diperoleh rendemen rata-rata $0,25 \pm 0,011\%$ v/b. Rendemen yang dihasilkan pada penelitian ini berbeda jika dibandingkan dengan rendemen minyak atsiri rimpang temu kunci pada penelitian terdahulu, Rediningsih (2002) menghasilkan rendemen sebesar $0,45\%$ v/b. Perbedaan rendemen ini disebabkan perbedaan asal tanaman, umur tanaman ketika dipetik, waktu pengambilan tanaman, perlakuan bahan sebelum, saat dan sesudah penyulingan serta variasi alat dan manusia. Hasil penyulingan minyak atsiri dengan metode destilasi Stahl (Tabel I).

Penetapan indeks bias

Hasil pengukuran indeks bias minyak atsiri rimpang temu kunci yang dilakukan dengan alat Refraktometer ABBE adalah 1,4818 dan dilakukan pada suhu $30,5^{\circ}\text{C}$. Penentuan indeks bias ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan.

Analisis indeks bias ini dapat digunakan untuk memeriksa pemalsuan, mutu dan kemurnian minyak atsiri. Jika minyak atsiri disimpan lama dalam kondisi tidak baik, komponen dalam minyak atsiri dapat teroksidasi sehingga menghasilkan minyak yang lebih kental, warna lebih gelap dan akhirnya membentuk sejenis damar. Hal ini menyebabkan perubahan harga indeks biasnya. Perbedaan hasil pengukuran indeks bias terjadi dimungkinkan karena perbedaan tempat tumbuh serta komponen penyusun yang mempengaruhi kualitas dari rimpang temu kunci.

Uji Aktivitas Larvasida

Larva nyamuk *Aedes aegypti* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *instar IV*

diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Kedokteran UGM. Minyak atsiri temu kunci tidak larut dalam air sebagai media uji, sehingga perlu ditambahkan alkohol 70%. Alkohol berperan sebagai pelarut antara minyak atsiri dan air. Alkohol 70% sebagai kontrol negatif juga terbukti tidak memberikan pengaruh terhadap kematian larva *Aedes aegypti*. Pada perlakuan kontrol positif (abate) yang menggunakan enam tingkat konsentrasi dengan taraf kepercayaan 95% ternyata diperoleh r hitung untuk masing-masing perlakuan lebih besar dari r teoritis. Ini berarti terdapat korelasi yang signifikan antara log konsentrasi abate terhadap respon kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* yang telah dikonversikan ke dalam nilai probit. Kemudian data dari keenam perlakuan tersebut dihitung harga LC_{50} nya. Harga LC_{50} untuk tiap perlakuan (Tabel II).

LC_{50} tiap perlakuan dihitung rata-ratanya, diperoleh harga sebesar $(0,0132 \pm 0,0013)$ ppm dan ditetapkan sebagai LC_{50} abate.

Pada perlakuan menggunakan sampel uji minyak atsiri temu kunci menggunakan enam tingkat konsentrasi dengan taraf kepercayaan 95% diperoleh r hitung untuk tiap-tiap perlakuan lebih besar dari r teoritis. Hal ini menunjukkan bahwa ada korelasi yang signifikan antara log konsentrasi minyak atsiri temukunci terhadap respon kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* yang dikonversikan ke dalam nilai probit.

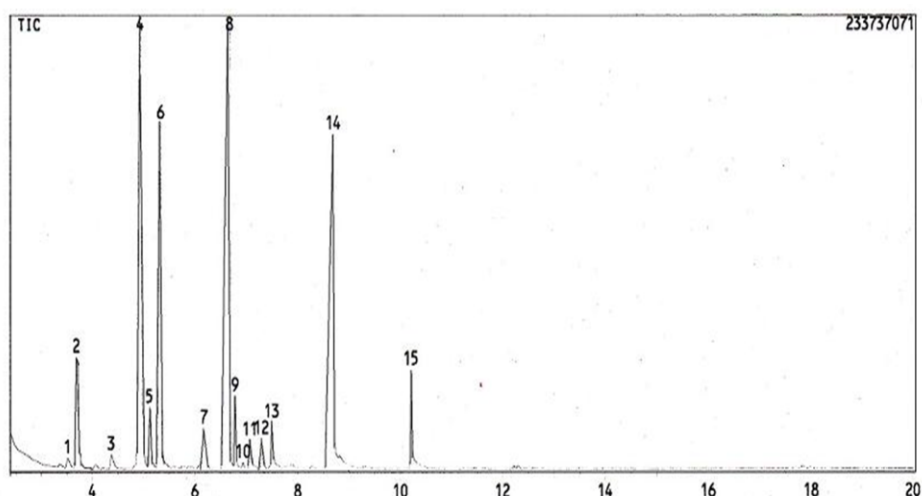
Selanjutnya data dari keenam perlakuan tersebut dihitung harga LC_{50} . Harga LC_{50} untuk tiap perlakuan (tabel III). Semakin besar harga LC_{50} maka potensi ketoksikannya semakin kecil. Dengan kata lain semakin kecil harga LC_{50} , aktivitas larvasidanya semakin besar. Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa abate memiliki LC_{50} 0,0132 ppm lebih kecil daripada LC_{50} minyak atsiri temu kunci sebesar 407,06 ppm.

Tabel III. Harga LC_{50} tiap perlakuan minyak atsiri temu kunci selama 24 jam

No	Persamaan regresi linear	Koefisien korelasi (r)	R Teoritis	LC_{50} (ppm)
1	$Y = 3,9923x - 5,3198$	0.9662	0,8114	384,53
2	$Y = 3,71 x - 4,7255$	0.9292	0,8114	418,24
3	$Y = 3,946 x - 5,4093$	0.9906	0,8114	434,45
4	$Y = 4.4387 x - 6,366$	0.9712	0,8114	363,63
5	$Y = 3,946x - 5,4093$	0.9906	0,8114	434,45

Tabel IV. Harga LC_{50} dari minyak atsiri rimpang temu kunci dan abate

Perlakuan	LC_{50} (ppm) \pm SD
Abate	0,0132 \pm 0,0013
Minyak atsiri rimpang temu kunci	407,06 \pm 31,6985



Gambar 1. Hasil kromatogram gas minyak atsiri rimpang temu kunci.

Tabel V. Data hasil analisis kromatogram gas minyak atsiri rimpang temu kunci

No.	Puncak ke-	Waktu retensi	% kadar relatif	Perkiraan komponen	% SI (similarity index)
1	2	3,692	5,65	Champene	96
2	4	4,958	19,06	Eucalyptol	90
3	6	5,342	12,94	Ocimene	95
4	8	6,675	28,44	Camphora	92
5	14	8,692	19,16	Geraniol	91
6	15	10,217	3,03	Methyl cinnamate	95

Hal ini berarti bahwa aktivitas larvasida abate lebih besar daripada minyak atsiri rimpang temu kunci. Dimana abate telah diketahui secara umum sebagai larvasida yang aman dan poten. Namun demikian, ternyata minyak atsiri rimpang temu kunci juga mempunyai aktivitas larvasida terhadap larva *Aedes aegypti*. Walaupun aktivitasnya jauh lebih kecil daripada abate, tetapi adanya respon larva yang mati menunjukkan adanya pengaruh minyak atsiri rimpang temu kunci terhadap larva *Aedes aegypti*.

Analisis Komponen Penyusun Minyak Atsiri Rimpang Temu Kunci dengan GC - MS.

Hasil kromatogram minyak atsiri temu kunci (Gambar 1). Hasil analisis kromatografi gas minyak atsiri rimpang temu kunci (Tabel V).

Kemungkinan senyawa yang dapat menyebabkan mortalitas pada larva *Aedes aegypti* adalah *geraniol*, *eucalyptol*, *camphene*, *camphora*, *methyl cinnamate*, *ocimene* yang merupakan senyawa terpen dan turunannya dimana berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan

bahwa senyawa terpen dan turunannya dapat menghambat pergantian kulit larva *Aedes aegypti* sehingga menyebabkan kematian larva.

Dalam hal ini tidak dapat ditentukan komponen penyusun dari minyak atsiri rimpang temu kunci yang aktif mempunyai efek toksik terhadap larva *Aedes aegypti* secara pasti. Untuk mengetahui dengan pasti komponen penyusun dari minyak atsiri rimpang temu kunci yang mempunyai efek toksik terhadap larva *Aedes aegypti*, maka perlu dilakukan pemisahan pada masing - masing komponen penyusun dari minyak atsiri rimpang temu kunci. Kemudian dilakukan uji aktivitas pada masing - masing komponen penyusun dari minyak atsiri tersebut.

Namun tidak menutup kemungkinan adanya senyawa kimia toksik lain selain yang terdeteksi dalam minyak atsiri rimpang temu kunci yang berperan sebagai larvasida.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan LC_{50} minyak atsiri temu kunci ($407,06 \pm 31,6985$) ppm dan LC_{50} abate sebesar ($0,0132 \pm 0,0013$) ppm. Ini berarti aktivitas larvasida abate jauh lebih besar dari minyak atsiri rimpang temu kunci. Analisa GC - MS minyak atsiri rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht) diperkirakan mengandung senyawa *camphene*, *eucalyptol*, *camphor*, *geraniol*, *ocimene*, *methyl cinnamate*.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 2002, Temukunci, http://www.republika.co.id/su/plemen/cetak_detail.asp?mid=2&id=104444&kat_id=105&kat_id1=150&kat_id2=187

- Brown, H.W., 1984, *Basic Clinical Parasitology, Third Edition*, diterjemahkan oleh Bintari Rukmono, dkk. 419-422, Penerbit Gramedia, Jakarta.
- Gunawan, dkk, 1988, *Empon-empon dan Tanaman lain dalam Zingiberaceae*, PERHIBA, Komisariat Yogya, 19-20.
- Gunawan, P., 1988, *Pestisida*, 15-17, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Meyer, B.N., Ferrigni, M.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and Laughlin, J.L., 1982, *Brine Shrimp, A Convenient Genetal Bioassay for Active Plant Constituents*, *Plata Medica*, 4, 31-34.
- Mursyidi, A., 1985, *Statistika Farmasi dan Biologi*, 72-81, 157, Ghalia Indonesia, Jakarta.
- Nugroho, S.P., 1997, Aktivitas Larvasida Minyak Atsiri Daun Jakut (*Hyptis suaveolens* (L) Poit) terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* instar IV dan Analisis Kromatografi Gas Spektroskopi Massanya, *Skripsi*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta
- Rediningsih, 2002. Uji Antibakteri Minyak Atsiri Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht) terhadap *Staphylococcus aerus* serta Profil Kromatografinya, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.
- Wahdaningsih, S., 2004, Uji Toksisitas Minyak Atsiri Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Larva *Aedes aegypti* serta profil GC-MS, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Windarti, I.W., 1991, Isolasi Eugenol Dari Kuncup Bunga Tangkai Bunga dan Daun Cengkeh (*Eugenia caryophyllata* Thumb) Tipe Zanzibar, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 7, 12.