

(12) PATEN INDONESIA

(11) IDP000058387 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL  
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 03 Mei 2019

(51) Klasifikasi IPC<sup>8</sup> : A 01N 43/00, C 11B 9/00  
// (C 11B 9:00)

(21) No. Permohonan Paten : P00201304580

(22) Tanggal Penerimaan: 19 November 2013

(30) Data Prioritas :  
(31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara

(43) Tanggal Pengumuman: 03 Juli 2014

(56) Dokumen Pembanding:  
WO2010131058 (A1) (seluruh dokumen)  
Potentiality of plants as source of insecticide principles, 2011  
Chemical Composition and Mosquito (*Aedes aegypti* Repellent  
Activity of Essential Oil Extracted from the Aril of *Torreya grandis*,  
2013

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :  
DPPM UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA  
Kampus Terpadu UII  
Jl. Kaliurang KM 14,5  
Yogyakarta

(72) Nama Inventor :  
Ir. Agus Taufiq, M.Sc., ID  
Arif Hidayat, ST., MT., ID  
dr. Diani Puspa Wijaya, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

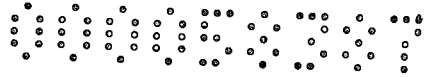
Pemeriksa Paten : Drs. Said Nafik, M.Si.

Jumlah Klaim : 2

(54) Judul Invensi : METODE PEMBUATAN LARVASIDA DARI GETAH PINUS DAN PRODUK YANG DIHASILKANNYA

(57) Abstrak :

Invensi ini berkaitan dengan kemampuan senyawa aktif komponen utama penyusun ekstrak getah pinus. Getah pinus mula-mula diekstraksi menggunakan alat soxhlet dengan pelarut metanol pada tekanan 1 atm dan temperatur 65°C selama 2 jam. Selanjutnya ekstrak getah pinus didestilasi vakum pada tekanan 0,75 atm dan temperatur 50°C, selama 3 jam. Destilat yang diperoleh kemudian dilakukan analisis senyawa penyusun menggunakan alat GC-MS. Hasil analisis GC-MS didapatkan kandungan  $\alpha$ -Pinene sebesar 41,7% dan Limonene 37,4% massa. Hasil destilat kemudian dilakukan pengujian terhadap larva nyamuk *Ae. Aegypti*. Hasil pengujian menunjukkan daya larvasidanya terhadap nyamuk *Ae. Aegypti* yang ditunjukkan dengan kematian larva sebesar 50% dari populasi ( $LC_{50}$ ) pada 43,62 ppm. Dapat dinyatakan bahwa komponen utama ekstrak getah pinus berupa  $\alpha$ -Pinene dan Limonene dapat menggantikan insektisida sintesis untuk larvasida nyamuk *Ae. Aegypti* dan dapat mengurangi ketergantungan impor insektisida sintesis serta dapat membantu usaha pemerintah dalam memberantas penyakit DBD. Invensi ini menggunakan bahan dari alam yang tersedia melimpah di Indonesia dan ramah lingkungan.



## Deskripsi

### METODE PEMBUATAN LARVASIDA DARI GETAH PINUS DAN PRODUK YANG DIHASILKANNYA

5

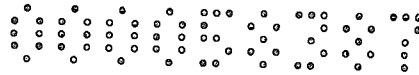
#### Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan metode pembuatan larvasida dari getah pinus dan produk yang dihasilkannya. Khususnya larvasida dari invensi ini sebagai senyawa aktif terhadap nyamuk *Aedes Aegypti*.

#### Latar Belakang Invensi

Masih tingginya mortalitas dan morbiditas penyakit infeksi tropis yang di sebabkan oleh virus dengue (DBD) di seluruh dunia, terutama di wilayah tropis maupun subtropis yang sebagian besar masih merupakan negara-negara berkembang, mendorong WHO menyusun strategi-global dalam memberantasnya. Strategi penanganan DBD yaitu penanganan kasus dan pencegahan melalui kontrol terhadap vektor. Manipulasi lingkungan merupakan upaya mengubah kondisi habitat vektor sehingga tercipta keadaan yang tidak mendukung perkembangan vektor (*vector breeding*). Penggunaan larvisida di tempat pembiakan nyamuk sehingga membunuh larva merupakan salah satu bentuk pengendalian vektor dalam mencegah atau mengurangi propagasi vektor.

Pemberantasan larva nyamuk dan nyamuk vektor secara kimiawi dapat dilakukan dengan menggunakan larvasida atau insektisida, bahan kimia yang dapat membunuh larva nyamuk atau nyamuk seperti temephos, fention, atau altosid. Didapat fakta bahwa diantara bahan kimiawi tersebut dapat berbahaya bagi kesehatan maupun lingkungan karena bersifat toksik dan dapat membunuh organisme yang hendaknya dipertahankan kehidupannya. Sementara itu, kini beberapa vektor juga ditemukan adanya resistensi terhadap bahan kimiawi tertentu sehingga upaya pengendalian vektor pun menjadi tidak efektif.



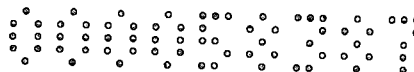
Untuk mengurangi dampak penggunaan bahan kimia berpotensi menyebabkan akumulasi di lingkungan ataupun berpotensi menimbulkan gangguan kesehatan serta resistensi, perlu dilakukan usaha untuk mengembangkan bahan kimia untuk larvisida dan insektisida yang tidak berbahaya bagi kesehatan manusia dan tidak mencemari lingkungan, namun efektif untuk mengendalikan vektor penyakit yang morbiditas dan mortalitasnya cukup tinggi seperti DBD.

Berdasar uraian di atas, didukung hasil penelitian diperolehnya komponen utama penyusun minyak terpentin getah pinus berupa  $\alpha$ -Pinene dan Limonene yang disintetis dari minyak atsiri yang berasal dari minyak terpentin yang merupakan hasil distilasi getah pohon pinus dan dapat berperan sebagai biolarvisida. Biolarvisida yang dihasilkan ini potensial untuk mengendalikan vektor DD/DBD, sehingga memungkinkan minyak atsiri kulit pinus dikembangkan sebagai biolarvisida nyamuk *Aedes aegypti*.

Dengan pemanfaatan pinus sebagai biolarvasida akan meningkatkan nilai ekonomis produk minyak atsiri dari tanaman pinus. Karena selama ini pemanfaatan tanaman pinus masih terbatas penggunaannya, yaitu sebagai pelarut dalam industri cat, perekat, maupun bahan pelapis (pernis).

Invensi sebelumnya berupa isolasi senyawa bio aktif untuk keperluan larvisida dan anti nyamuk. Pada tahun 2000 Anshari dkk telah mempelajari penggunaan minyak permen (Peppermint oil) sebagai larvisida nyamuk *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* dan *Culex quinquefasciatus*. Uji aktivitas larvisida dilakukan dengan menempatkan larva nyamuk ke dalam enamel tray dan dicelupkan ke dalam larutan minyak atsiri. Kekuatan anti nyamuk dari minyak permen ini setara dengan pemakaian mylol oil yang biasa digunakan sebagai anti nyamuk sintetis yang tersusun atas dibutyl dan dimethyl phthalates.

Pada tahun 2003 Oyedele dkk mempelajari aktivitas formulasi anti nyamuk dari minyak sereh. Minyak atsiri dari beberapa jenis sereh dilarutkan dalam larutan paraffin dan kemudian dilakukan evaluasi untuk anti nyamuk jenis *Aedes aegypti*. Anti nyamuk yang



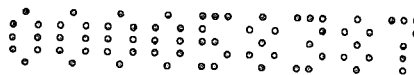
mengandung 1% volume/berat dan 15% volume/berat mempunyai kemampuan untuk menolak nyamuk. Analisis GC-MS menunjukkan bahwa komponen utama senyawa penyusun anti nyamuk adalah citral. Anti nyamuk dari minyak sereh menunjukkan aktivitas yang sama dibandingkan dengan anti nyamuk 10 komersial.

Pada tahun 2007 Zetra dan Prasetya menggunakan senyawa terpenoid yaitu  $\alpha$ -Amirin telah diisolasi dari ekstrak metanol kulit batang tumbuhan *Beilschmiedia roxburghiana* (medang) untuk larvasida nyamuk *Aedes aegypti*. Karakterisasi struktur 15 yang dilakukan secara spektroskopi ultraviolet, infra merah,  $^{13}\text{C}$ -NMR dan  $^1\text{H}$ -NMR menunjukkan bahwa senyawa yang diperoleh merupakan suatu triterpenoid pentasiklik dengan kerangka ursan. Uji bioaktivitas terhadap senyawa hasil isolasi, yaitu uji toksisitas dengan metode Brine Shrimp Lethality Test 20 (BSLT) dan insektisida terhadap larva instar III *Aedes aegypti* menunjukkan bahwa senyawa  $\alpha$ -Amirin bersifat aktif.

Pada tahun 2008 Pushpanathan telah mempelajari pemanfaatan minyak atsiri dari jahe sebagai larvisida dan anti nyamuk *Culex quinquefasciatus*. *Lethal concentration* (LC) 25 atau dosis yang dapat mengakibatkan kematian larva sebesar 50% dari populasi (LC<sub>50</sub>) pada pemaparan selama 24 jam adalah 50,78 ppm. Sedangkan dosis minyak atsiri yang dapat mengakibatkan kematian larva sebesar 90% dari populasi (LC<sub>90</sub>) pada pemaparan selama 24 jam adalah 94,01 ppm.

Pada tahun 2009 Autran dkk mempelajari minyak atsiri dari tanaman genus *Piper* dan aktivitasnya sebagai larvisida dan anti nyamuk *Aedes aegypti*. Hasil analisis GC-MS menunjukkan bahwa komponen utama penyusun minyak atsiri adalah senyawa (Z)- atau (E)-asarone and patchouli alcohol. Uji aktivitas menunjukkan bahwa minyak atsiri yang diperoleh dapat membunuh larva nyamuk pada konsentrasi 13,8 dan 20 ppm.

Pada tahun 2009 Cheng dkk menemukan bahwa minyak atsiri dari daun cengkeh dengan penyusun utama minyak daun cengkeh adalah Geranial, Neral, Spathulenol, 1,8-Cineole, dan linaool mempunyai



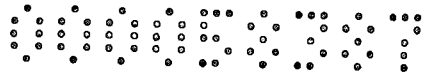
kemampuan aktivitas larvisida nyamuk *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus* dan *Armigeres subalbatus*. Uji aktivitas menunjukkan bahwa pada konsentrasi 81,7 dan 83,3 pg/ml minyak atsiri dari daun cengkeh mampu membunuh larva nyamuk dalam 24 jam.

5           Invensi ini menyediakan komponen utama penyusun distilat minyak terpentin yaitu  $\alpha$ -Pinene dan Limonene yang diperoleh dengan proses distilasi pada keadaan vakum. Prosentase  $\alpha$ -Pinen dan Limonen tertinggi diperoleh pada proses distilasi dalam keadaan vakum dengan persen massa - Pinene di atas 50 % massa. Senyawa aktif tersebut  
10 mempunyai potensi larvisida yang sangat baik yang ditunjukkan dengan kematian larva sebesar 50% dari populasi ( $IC_{50}$ ) pada 43,62 ppm. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa komponen utama minyak terpentin getah pinus berupa  $\alpha$ -Pinene dan Limonene dapat menggantikan insektisida sintetis untuk larvasida nyamuk *Aedes Aegypti* dan ke  
15 depan dapat mengurangi ketergantungan impor insektisida sintetis serta dapat membantu usaha pemerintah dalam memberantas penyakit DBD.

#### **Uraian Singkat Invensi**

20           Tujuan dari invensi ini yang untuk menyediakan suatu metode untuk pembuatan larvasida yang berperan sebagai anti nyamuk *Aedes Aegypti*. Hal ini dapat terjadi oleh karena komponen utama dari biolarvasida pada invensi ini berasal dari getah pinus. Getah pinus  
25 dimaksud memiliki kandungan minyak terpentin yaitu dalam bentuk senyawa  $\alpha$ -Pinene dan Limonene. Kedua senyawa dimaksud telah banyak digunakan sebagai biolarvasida nyamuk *Aedes Aegypti* dengan sangat baik. Hal ini ditunjukkan oleh adanya kematian larva sebesar 50% dari populasi ( $IC_{50}$ ) pada pemberian biolarvasida 43,62 ppm.

30           Metode untuk pembuatan larvasida dari getah pinus pada invensi ini adalah terdiri atas tahapan sebagai berikut:



- a. Mengekstraksi getah pinus melalui peralatan ekstraksi soxhlet dengan pelarut metanol pada tekanan 1 atm dan temperatur 65°C selama 2 jam; dan
- b. Memisahkan zat aktif yang dihasilkan melalui destilasi vakum pada tekanan 0,75 atm dan temperatur 50°C, selama 3 jam.

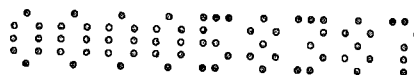
Selanjutnya juga diungkapkan produk yang dihasilkan melalui metode di atas yang disertai dengan hasil-hasil pengujiannya.

#### 10 Uraian Singkat Gambar

Gambar 1 merupakan kromatogram GC-MS hasil distilasi vakum pada temperatur 65°C dari invensi ini.

#### 15 Uraian Terperinci Invensi

Mula-mula proses pembuatan larvasida dari getah pinus mula-mula dilakukan dengan ekstraksi getah pohon pinus sebanyak 30 gram dengan alat soxhlet dengan menggunakan pelarut metanol p.a. (98,5%) sebanyak 300 mL. Ekstraksi getah pohon pinus dengan alat soxhlet dengan pelarut metanol dilakukan pada tekanan 1 atm dan temperatur 65°C selama 2 jam. Ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi kemudian dilakukan proses pemisahan lanjutan dilakukan dengan metode distilasi vakum menggunakan rotavaporator pada tekanan 0,75 atm dan temperatur 50°C, selama 3 jam sampai diperoleh destilat. Destilat kemudian diuji untuk mengetahui kandungan senyawa penyusunnya menggunakan alat Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Hasil analisis GC-MS senyawa penyusun hasil distilasi vakum dapat dilihat pada Tabel 1.



Tabel 1. Hasil Analisis Kromatogram GC-MS Senyawa Penyusun Hasil Distilasi Vakum pada Temperatur 50°C

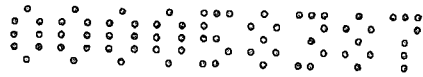
Komponen	% massa
$\alpha$ -Pinene	41,7
Limonene	37,4
Sabinene	5,7
$\beta$ -Pinene	3,8
Camphene	2,8
Caryophyllene oxide	2,3
(Z)-Caryophyllene	2
p-Cymen-8-ol	1,4
(E)- $\beta$ -ocimene	1,1
(Z)- $\beta$ -ocimene	0,9
Terpinolene	0,8

Senyawa aktif yang dihasilkan di atas selanjutnya dilakukan pengujian terhadap larva nyamuk *Ae. Aegypti*. Untuk melakukan pengujian dimaksud dimulai dengan pembiakan larva nyamuk *Ae. Aegypti* sebagai berikut:

Larva nyamuk diperoleh dengan cara ditetaskannya telur nyamuk *Ae. Aegypti*, kemudian dibiakkan di Laboratorium Parasitologi. Telur nyamuk *Aedes aegypti* dimasukkan ke dalam baki yang berisi 1500 ml air leding dan ditunggu 1-2 hari sampai menetas menjadi larva. Selama proses ini, diberikan hati ayam sebagai makanan larva. Adapun identifikasi larva instar IV dilakukan 7 hari setelah telur menetas secara makroskopis dengan menggunakan lensa pembesar.

Langkah selanjutnya yaitu melakukan uji aktivitas minyak atsiri dari terpentin untuk larvasida nyamuk *Ae. Aegypti*, pada tahap ini aktivitas larvasida minyak atsiri kulit pinus dinilai terhadap larva instar IV nyamuk *Aedes aegypti* sebagai vektor DBD. Tahap berikutnya dilakukan penilaian aktivitas larvisida senyawa bioaktif minyak terpentin dari kulit pinus. Pengujian aktivitas larvisida dibandingkan dengan kontrol negatif.

Aktivitas larvisida dinilai dengan menghitung mortalitas larva yang dihitung setelah 24 jam. Pengukuran persentase kematian larva dilakukan dengan cara menghitung jumlah larva uji yang mati selama



perlakuan kemudian dibandingkan dengan jumlah larva awal sebelum perlakuan. Dan koreksi angka kematian digunakan formulas! Abbot.

5 Hasil uji aktivitas larvasida mendapatkan besar konsentrasi bahan uji yang diperlukan untuk mengakibatkan kematian larva uji sebesar 50 % dari populasi pada pemaparan 24 jam serta waktu tercepat bahan uji yang dapat menyebabkan kematian larva uji sebanyak 50 % dari populasi seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.

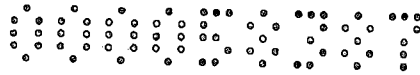
10 Tabel 2. Persentase Kematian Larva Uji Pada Pengujian Akhir Uji Daya Larvisida dari Ekstrak Getah Pinus.

No.	Konsentrasi Ekstrak Getah Pinus	Rata-rata Kematian Larva Uji (ekor)	Persentase Kematian Larva Uji (%)
1.	Kontrol	0	0
2.	50 ppm	15	60 %
3.	100 ppm	23,60	94,40 %
4.	150 ppm	24,80	99,20 %
5.	200 ppm	25	100 %
6.	250 ppm	25	100 %

15 Dari Tabel 2 menunjukkan ekstrak getah pinus memiliki daya larvisida yang berbeda pada konsentrasi ekstrak getah pinus yang berbeda. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak getah pinus tampak semakin tinggi persentase kematian larva. Data ini menunjukkan adanya potensi larvisida yang disebabkan oleh kandungan senyawa-senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak getah pinus. Hal ini didukung dengan adanya perbedaan kematian larva uji pada kelompok perlakuan sesuai dengan peningkatan konsentrasi ekstrak getah pinus  
20 dibandingkan dengan kontrol.

25 Selanjutnya dilakukan uji Kruskal Wallis untuk mengetahui ada tidaknya signifikansi perbedaan persentase kematian larva pada berbagai konsentrasi karena syarat uji Anova tidak terpenuhi. Hasil uji Kruskal Wallis diperoleh nilai  $p = 0,00$  (nilai  $p < 0,05$ ) sehingga dapat disimpulkan terdapat perbedaan rata-rata persentase kematian larva antar kelompok. Untuk menentukan perbedaan antar 2 kelompok





dilakukan analisis Mann Whitney. Hasil analisis Mann Whitney seperti dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Mann Whitney Uji Daya Larvisida Ekstrak Getah Pinus.

Kelompok Uji	Nilai p
50 ppm vs 100 ppm	0,009
50 ppm vs 150 ppm	0,007
50 ppm vs 200 ppm	0,005
50 ppm vs 250 ppm	0,005
50 ppm vs kontrol	0,005
100 ppm vs 150 ppm	0,055
100 ppm vs 200 ppm	0,018
100 ppm vs 250 ppm	0,018
100 ppm vs kontrol	0,005
150 ppm vs 200 ppm	0,317
150 ppm vs 250 ppm	0,317
150 ppm vs kontrol	0,004
200 ppm vs 250 ppm	1,000
200 ppm vs kontrol	0,003
250 ppm vs kontrol	0,003

Dari hasil tersebut tampak bahwa terdapat perbedaan yang signifikan persentase kematian larva uji pada hampir berbagai konsentrasi ekstrak getah pinus yang berbeda. Namun terdapat perbedaan yang tidak signifikan persentase kematian larva uji pada konsentrasi ekstrak getah pinus 100 ppm dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak getah pinus 150 ppm, pada konsentrasi ekstrak getah pinus 150 ppm dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak getah pinus 200 ppm, pada konsentrasi ekstrak getah pinus 150 ppm dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak getah pinus 250 ppm serta pada konsentrasi ekstrak getah pinus 200 ppm dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak getah pinus 250 ppm.

Kemudian dilakukan analisis Probit untuk menentukan LC50. Analisis Probit dilakukan pada hasil pengamatan terhadap ekstrak getah pinus komersial sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 4.

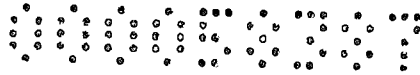


Tabel 4. Nilai LC50 Ekstrak Getah Pinus.

Kelompok Ekstrak Getah Pinus	LC 50 " Limits 95% (ppm)
Ekstrak getah pinus	43,62

Hasil analisis Probit menunjukkan bahwa potensi larvisida dimiliki oleh ekstrak getah pinus komersial sangat baik dengan LC

5 50 43,62 ppm.



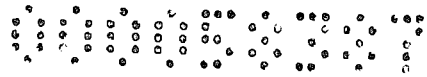
## Klaim

1. Suatu metode untuk pembuatan larvasida dari getah pinus yang  
5 terdiri atas tahapan sebagai berikut:

c. Mengekstraksi getah pinus melalui peralatan ekstraksi  
soxhlet dengan pelarut metanol pada tekanan 1 atm dan  
temperatur 65°C selama 2 jam; dan

10 d. Memisahkan zat aktif yang dihasilkan melalui destilasi  
vakum pada tekanan 0,75 atm dan temperatur 50°C, selama 3  
jam.

2. Produk yang dihasilkan sebagaimana yang diklaim dalam klaim 1.

**Abstrak****METODE PEMBUATAN LARVASIDA DARI GETAH PINUS DAN PRODUK YANG  
DIHASILKANNYA**

5

Invensi ini berkaitan dengan kemampuan senyawa aktif komponen utama penyusun ekstrak getah pinus. Getah pinus mula-mula diekstraksi menggunakan alat soxhlet dengan pelarut metanol pada tekanan 1 atm dan temperatur 65°C selama 2 jam. Selanjutnya ekstrak getah pinus didestilasi vakum pada tekanan 0,75 atm dan temperatur 50°C, selama 3 jam. Destilat yang diperoleh kemudian dilakukan analisis senyawa penyusun menggunakan alat GC-MS. Hasil analisis GC-MS didapatkan kandungan  $\alpha$ -Pinene sebesar 41,7% dan Limonene 37,4% massa. Hasil destilat kemudian dilakukan pengujian terhadap larva nyamuk *Ae. Aegypti*. Hasil pengujian menunjukkan daya larvasidanya terhadap nyamuk *Ae. Aegypti* yang ditunjukkan dengan kematian larva sebesar 50% dari populasi (LC<sub>50</sub>) pada 43,62 ppm. Dapat dinyatakan bahwa komponen utama ekstrak getah pinus berupa  $\alpha$ -Pinene dan Limonene dapat menggantikan insektisida sintetis untuk larvasida nyamuk *Ae. Aegypti* dan dapat mengurangi ketergantungan impor insektisida sintetis serta dapat membantu usaha pemerintah dalam memberantas penyakit DBD. Invensi ini menggunakan bahan dari alam yang tersedia melimpah di Indonesia dan ramah lingkungan.

10

15

20

