

## Respons Fisiologi *Crocidolomia pavonana* terhadap Fraksi Aktif *Calophyllum soulattri*

### *Physiological Response of Crocidolomia pavonana to the Calophyllum soulattri Active Fraction*

EDY SYAHPUTRA<sup>1\*</sup>, DJOKO PRIJONO<sup>2</sup>, DADANG<sup>2</sup>,  
SYAFRIDA MANUWOTO<sup>2</sup>, LATIFAH KOSIM DARUSMAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Pertanian, Universitas Tanjungpura, Jalan A. Yani, Pontianak 78124

<sup>2</sup>Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Faperta, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

<sup>3</sup>Departemen Kimia, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 23 Juli 2004/Disetujui 16 Desember 2005

The objective of this study was to evaluate the physiological response of the cabbage head caterpillar *Crocidolomia pavonana* treated with an active fraction of *Calophyllum soulattri* bark extract. Extraction of the test plant materials were performed with maceration method using methanol, continued by counter-current distribution separation in ethylacetate and water. Methanol fractionation of *C. soulattri* was performed by vacuum liquid chromatography and the bioassays were conducted by a leaf-feeding method. The results showed that the dichloromethane fraction of *C. soulattri* had strong insecticidal activity against *C. pavonana* larvae, with LC<sub>50</sub> of 0.05%. Sublethal treatments with the active fraction at LC<sub>15</sub>, LC<sub>50</sub>, and LC<sub>85</sub> reduced the relative growth rate of the fourth instars by 48.9-94.1%. The treatments with the fraction at LC<sub>15</sub> and LC<sub>50</sub> to the fourth instars reduced the activity of invertase and protease enzyme by 20.7-24.1 and 14.4-25.14%, respectively, but increased the activity of trehalase by 26.7-120% as compared with controls.

Key words: Physiological response, *Crocidolomia pavonana*, *Calophyllum soulattri*, botanical insecticide

#### PENDAHULUAN

Interaksi serangga dengan tumbuhan inangnya dalam proses pemilihan inang melewati lima tahap, yaitu penemuan habitat inang, penemuan inang, pengenalan inang, penerimaan inang, dan kesesuaian inang. Empat tahap pertama berkaitan dengan perilaku serangga sebelum makan, sedangkan tahap terakhir melibatkan proses fisiologi setelah makanan dicerna yang akhirnya menentukan kesesuaian pakan tersebut bagi pertumbuhan dan perkembangan serangga (Chapman 1995).

Setelah sampai tahap kesesuaian inang, kualitas pakan dapat mempengaruhi kelangsungan hidup serangga yang mengonsumsinya. Bila pakan sesuai serangga akan mengonsumsi makanan tersebut. Sebaliknya, bila pakan tidak sesuai pada saat tidak ada pilihan, serangga terpaksa makan sedikit atau tidak makan sama sekali. Selain faktor fisik, nilai nutrisi makanan dan kandungan zat racun pada makanan akan menentukan kesesuaian pakan tersebut untuk menunjang berbagai proses fisiologi yang berhubungan dengan pertumbuhan dan perkembangan serangga secara optimal (Chapman 1995).

Gangguan pertumbuhan serangga yang mengonsumsi pakan yang mengandung senyawa aktif tertentu dapat mengakibatkan menurunnya aktivitas kerja enzim-enzim pencernaan yang merombak dan mengabsorpsi nutrisi menjadi

zat yang dapat dimanfaatkan tubuh. Beberapa contoh enzim yang terlibat dalam proses pencernaan serangga ialah protease, lipase, amilase, dan invertase (Chapman 1995). Mimosin (asam  $\beta$ -[N-(3-hidroksi-4-oksipiridi)]- $\alpha$ -aminopropionat), senyawa aktif yang diisolasi dari tanaman *Mimosa pudica* dan *Leucaena leucocephala* dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan serangga (Ishaaya *et al.* 1991). Mimosin menurunkan aktivitas enzim invertase dan amilase yang berperan dalam proses pencernaan serangga *Tribolium castaneum* (Ishaaya *et al.* 1991).

Sejumlah parameter kuantitatif dapat digunakan sebagai dasar untuk menilai kesesuaian pakan. Beberapa diantaranya adalah laju konsumsi relatif (LKR), laju pertumbuhan relatif (LPR), daya cerna (DC), efisiensi konversi pakan yang dikonsumsi (EKK), dan efisiensi konversi pakan yang dicerna (EKC) (Waldbauer 1968). Wiyantono *et al.* (2001) melaporkan bahwa fraksi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrak aseton biji *Aglaiia harmsiana* selain memiliki pengaruh letal, pada dosis 6  $\mu$ g/larva yang diteteskan pada dorsum larva instar III *C. pavonana* menurunkan LPR, EKK, dan EKC berturut-turut sebesar 60, 54, dan 61%.

Berbagai tumbuhan telah diketahui pengaruh letalnya terhadap larva *C. pavonana*, diantaranya tumbuhan *Calophyllum soulattri* (dayak: musuk, kemusuk). Ekstrak metanol kulit batang *C. soulattri* memiliki aktivitas insektisida yang kuat terhadap larva *C. pavonana* dengan LC<sub>50</sub> 0.15% (Syahputra *et al.* 2004a, b). Hingga kini, senyawa aktif kulit

\*Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-561-710077,  
Fax. +62-561-732406, E-mail: e\_sitorus\_2000@yahoo.com

batang *C. soulattri* belum dilaporkan. Syahputra (2005) melaporkan bahwa komponen fraksi aktif kulit batang *C. soulattri* merupakan kelompok triterpenoid.

Percobaan ini menggunakan larva *C. pavonana* sebagai serangga uji. Larva tersebut merupakan hama penting pada tanaman Brassicaceae. Percobaan untuk melihat pertumbuhan dan aktivitas enzim pencernaan larva *C. pavonana* yang mengonsumsi pakan dengan diberi perlakuan sediaan kulit batang *C. soulattri* belum pernah dilakukan. Pengujian ini bertujuan untuk mengukur (i) parameter kuantitatif pakan, (ii) pertumbuhan larva, serta (iii) aktivitas enzim protease, invertase, dan trehalase pada larva *C. pavonana* yang diberi perlakuan fraksi aktif diklorometana kulit batang *C. soulattri*.

## BAHAN DAN METODE

**Perbanyak Serangga Uji.** Serangga uji yaitu larva instar II *C. pavonana*, diperbanyak di Laboratorium Fisiologi dan Toksikologi Serangga, Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan (HPT), Institut Pertanian Bogor (IPB), dengan cara seperti yang diuraikan oleh Prijono (1998). Larva dipelihara dalam wadah plastik (36 x 27 x 8 cm) berventilasi kain kasa dengan pakan daun brokoli segar. Menjelang fase kepompong, larva dipindahkan ke dalam wadah lain yang berisi tanah steril. Menjelang imago, kepompong dipindahkan ke dalam kurungan kasa (diameter 16 cm, tinggi 30 cm). Setelah keluar dari kepompong, imago diberi madu (konsentrasi 10%) yang diserapkan pada kapas. Kelompok telur dipanen setiap hari dan menjelang menetas, kelompok telur dipindahkan ke dalam wadah plastik (36 x 27 x 8 cm) yang telah diberi daun brokoli segar.

**Tumbuhan Sumber Ekstrak.** Bahan tumbuhan uji yang digunakan ialah kulit batang *C. soulattri* yang diperoleh dari Kecamatan Teluk Melano, Kabupaten Ketapang, Kalimantan Barat. Kulit batang yang digunakan dihancurkan menggunakan blender hingga menjadi serbuk dan diayak menggunakan pengayak kasa berjalanan 1 mm. Serbuk ayakan ditimbang untuk keperluan ekstraksi. Kadar air bahan yang digunakan ialah 13,4%.

**Ekstraksi dan Fraksinasi *C. soulattri*.** Serbuk ayakan kulit batang *C. soulattri* yang telah ditimbang diekstraksi dengan pelarut metanol dengan perbandingan bobot bahan dan pelarut 1:10 (w/v). Bahan direndam dalam metanol selama tidak kurang dari 3 x 24 jam, selanjutnya disaring menggunakan corong dengan alas kertas saring. Pembilasan dilakukan sebanyak tiga kali. Cairan hasil penyaringan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 55-60 °C, dan penghampaan pada tekanan 580-600 mmHg. Ekstrak yang diperoleh dipartisi dalam campuran heksana dan metanol 95% dalam labu pemisah hingga terbentuk dua lapisan larutan yang berbatas tegas. Fase metanol (lapisan pelarut bagian bawah) yang terbentuk dalam labu pemisah ditampung dan diuapkan pelarutnya. Fraksi metanol yang diperoleh dipartisi lebih lanjut dalam labu pemisah lainnya dalam campuran pelarut etil asetat dan air (1:1). Perbandingan bobot ekstrak dengan campuran pelarut 1:40 (w/v). Fase etil asetat dipisahkan dan diuapkan pelarutnya seperti di atas (Syahputra & Prijono 2006).

Fraksi etil asetat difraksinasi lebih lanjut menggunakan teknik kromatografi vakum cair (KVC) (Coll & Bowden 1986). Fase diam yang digunakan gel silika 40-63 µm dengan fase gerak berturut-turut pelarut heksana, diklorometana, etil asetat, dan metanol. Semua fraksi pelarut diuapkan dan aktivitas insektisida diuji terhadap larva *C. pavonana*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi heksana dan fraksi diklorometana memiliki aktivitas insektisida, sedangkan dua fraksi lainnya tidak aktif. Kedua fraksi aktif tersebut memiliki aktivitas yang setara namun berbeda rendemennya. Rendemen fraksi diklorometana lebih tinggi hasilnya dibandingkan dengan fraksi heksana. Selanjutnya, pada penelitian ini dipilih dan digunakan fraksi diklorometana.

**Pengaruh Fraksi Aktif Diklorometana Kulit Batang *C. soulattri* terhadap Mortalitas Larva *C. pavonana*.** Pengujian aktivitas insektisida dilakukan dengan metode residu pada daun (Prijono *et al.* 2001). Sediaan diuji pada lima taraf konsentrasi yang diharapkan mengakibatkan kematian serangga uji antara 0 hingga 100% yang ditentukan melalui uji pendahuluan. Fraksi dilarutkan dengan aseton pada berbagai konsentrasi yang telah ditentukan. Larutan fraksi dioleskan secara merata pada setiap permukaan potongan daun brokoli berdiameter 3 cm menggunakan sonde mikro sebanyak 25 µl/permukaan. Setelah pelarut menguap, dua potong daun perlakuan diletakkan pada cawan petri berdiameter 9 cm yang diberi alas tisu. Selanjutnya, ke dalam setiap cawan petri dimasukkan 15 larva instar II. Larva kontrol diberi pakan daun yang hanya diolesi aseton. Pakan daun perlakuan diberikan selama 48 jam, selanjutnya larva diberi pakan daun tanpa perlakuan hingga mencapai instar IV. Jumlah larva yang mati dan lama perkembangan larva yang bertahan hidup dicatat. Data mortalitas larva diolah dengan analisis probit menggunakan program SAS.

**Pengaruh Fraksi Aktif Diklorometana Kulit Batang *C. soulattri* terhadap Asimilasi Makanan oleh Larva *C. pavonana*.** Pengujian dilakukan pada tiga taraf konsentrasi yang setara dengan  $LC_{15}$ ,  $LC_{50}$ , dan  $LC_{85}$ , yaitu 0,03, 0,05, dan 0,075%. Cara pengujian sama dengan pengujian di atas, namun pada percobaan ini digunakan larva instar IV ( $\pm 4$  jam setelah ganti kulit). Setiap larva dan potongan daun yang digunakan sebelum dan sesudah pengujian ditimbang bobotnya. Setelah ditimbang, setiap larva dimasukkan ke dalam wadah plastik berventilasi (tinggi 5 cm, diameter 5 cm) yang berisi daun yang telah diberi perlakuan. Sebagai faktor pengoreksi bobot larva dan bobot daun, sepuluh larva contoh dan sepuluh bundaran daun contoh ditimbang secara terpisah dan dikeringkan dalam oven pada suhu 100 °C selama 48 jam hingga bobotnya stabil dan selanjutnya dihitung proporsi bobot keringnya. Hasil perkalian nilai proporsi bobot kering larva dengan bobot basah merupakan bobot kering larva awal, sedangkan hasil perkalian nilai proporsi bobot kering daun dengan bobot basahnya merupakan bobot kering daun awal.

Setelah larva mengonsumsi daun pakan perlakuan selama 24 jam, setiap larva, sisa daun pakan, dan kotoran larva dibungkus dan dikeringkan dalam oven pada suhu 100 °C selama 48 jam secara terpisah. Setelah kering, larva dan sisa daun pakan serta kotoran larva masing-masing ditimbang

kembali untuk mendapatkan bobot kering larva akhir, bobot kering daun akhir, dan bobot kering kotoran. Selanjutnya data bobot larva, daun, dan kotoran tersebut digunakan untuk menghitung LK, LP, DC, EKK, dan EKC berdasarkan metode gravimetri (Waldbauer 1968). Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan dan 20 ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji selang berganda Duncan pada taraf nyata 5%.

**Pengaruh Fraksi Aktif Diklorometana Kulit Batang *C. soulattri* terhadap Aktivitas Enzim Protease, Invertase, dan Trehalase.** Sediaan fraksi diuji pada konsentrasi subletal 0.03 dan 0.05% yang setara dengan  $LC_{15}$  dan  $LC_{50}$ . Cara pengujian sama seperti percobaan sebelumnya. Pada percobaan ini digunakan 50 potong bundaran daun perlakuan yang diletakkan dalam wadah plastik berventilasi (panjang 35 cm, lebar 27 cm, tinggi 7 cm) yang diberi alas kertas serap. Selanjutnya ke dalam setiap wadah plastik dimasukkan 150 ekor larva instar IV umur  $\pm 4$  jam. Pakan daun perlakuan diberikan selama 30 jam.

Sebagai sumber enzim digunakan homogenat larva utuh. Tubuh larva dibersihkan dari kotorannya dan ditimbang sesuai dengan kebutuhan, selanjutnya digerus dalam aquabides dengan penggerus teflon (*homogenizer*) (kapasitas 2 ml). Perbandingan antara bobot larva (mg) dan volume aquabides (ml) adalah 40:1. Untuk mendapatkan 30 ml homogenat yang diperlukan dilakukan 10-15 kali penggerusan dengan masing-masing penggerusan 1-3 ekor (30-90 mg larva)/ml aquabides. Penggerusan larva dilakukan di atas bongkahan es. Homogenat hasil gerusan disatukan dan disentrifus pada kecepatan 84 000 g selama 15 menit pada 4 °C. Supernatan dipisahkan dari endapannya dan dipindahkan ke tabung lain untuk disimpan dalam lemari pendingin suhu minimal -70 °C hingga saat dianalisis. Pembuatan homogenat diulang tiga kali.

Analisis protein homogenat dilakukan dengan metode Lowry (Kresze 1988). Kurva standar protein ditentukan dengan mereaksikan langsung substrat *bovine serum albumin* (BSA) pada lima taraf konsentrasi dengan pereaksi tembaga-alkalin. Analisis protein dilakukan dengan menggunakan campuran bahan 0.1 ml setiap homogenat; 0.5 ml  $H_2O$ ; 3 ml pereaksi tembaga-alkalin yang dimasukkan dalam tabung reaksi. Campuran bahan dikocok dengan vorteks, diinkubasi selama 10 menit, selanjutnya ditambahkan 0.15 ml larutan Folin-Ciocalteu, dikocok kembali, dan diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 500 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan secara duplo. Kandungan protein dalam sampel homogenat yang sama digunakan sebagai pengoreksi dalam analisis aktivitas enzim. Kandungan protein dari setiap homogenat yang diberi perlakuan dan kontrol dianalisis dengan sidik ragam dan uji BNT pada taraf nyata 5%.

Analisis aktivitas enzim mengikuti prosedur yang dilakukan Ishaaya *et al.* (1991). Sebagai sumber enzim adalah homogenat larva yang telah diberi perlakuan. Aktivitas enzim invertase dan trehalase diukur berdasarkan reaksi antara glukosa hasil hidrolisis substrat dan pereaksi asam dinitrosalisilat (ADNS). Analisis aktivitas enzim invertase

menggunakan campuran bahan 0.2 ml sukrosa 4%; 0.8 ml  $H_2O$ ; 0.2 ml setiap homogenat; dan 0.2 ml larutan penyangga fosfat 0.2 M pH 5.5 yang diletakkan dalam tabung reaksi. Campuran bahan tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit, selanjutnya ditambahkan 1.6 ml pereaksi ADNS yang dilanjutkan dengan proses aktivasi pada suhu 100 °C selama 5 menit, setelah itu langsung didinginkan dalam air es. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 550 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan secara duplo. Analisis aktivitas trehalase dilakukan dengan cara yang sama, substrat trehalosa 4% digunakan sebagai pengganti sukrosa 4%. Aktivitas kedua enzim tersebut dinyatakan sebagai mg glukosa terbentuk/mg protein. Kurva standar glukosa ditentukan dengan mereaksikan langsung glukosa pada beberapa konsentrasi dengan ADNS dan mengukur absorbansinya sehingga diperoleh hubungan regresi antara konsentrasi glukosa dan absorbansi.

Aktivitas enzim protease diukur berdasarkan banyaknya tirosin yang dibebaskan oleh substrat. Campuran bahan yang digunakan pada analisis enzim tersebut ialah 0.8 ml substrat kasein 1.5%; 0.6 ml  $H_2O$ ; dan 0.2 ml setiap homogenat. Kasein dilarutkan dalam 0.2 M larutan penyangga fosfat pH 6.6 dan sambil dikocok ditambahkan 1 ml (untuk 0.15 g kasein dalam 10 ml bufer fosfat) NaOH 1 M hingga larut. Campuran bahan tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit, selanjutnya ditambahkan 0.4 ml asam trikarboksilat (ATK) 15% (w/v) dan disentrifus pada 84 000 g dengan suhu 4 °C selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dari endapan yang terbentuk untuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan secara duplo. Aktivitas enzim dinyatakan sebagai mg tirosin terbentuk/mg protein. Kurva standar tirosin ditentukan dengan melarutkan langsung tirosin pada beberapa konsentrasi dalam aquabides, selanjutnya ditentukan hubungan regresi antara konsentrasi tirosin dan absorbansi. Aktivitas enzim dari homogenat yang diberi perlakuan dan kontrol dianalisis dengan sidik ragam dan uji BNT pada taraf nyata 5%.

## HASIL

**Pengaruh Fraksi Aktif Diklorometana Kulit Batang *C. soulattri* terhadap Mortalitas Larva *C. pavonana*.** Perlakuan fraksi aktif kulit batang *C. soulattri* pada konsentrasi yang diuji mengakibatkan mortalitas larva instar II maupun instar II+III *C. pavonana* yang terpaut konsentrasi (Tabel 1). Pada kisaran fraksi aktif 0.02-0.09% mengakibatkan mortalitas 1.2-87.8% untuk instar II dan 3.5-92.2% untuk instar II+III. Pada pengamatan 1 hari setelah perlakuan (HSP), perlakuan dengan bahan uji telah menyebabkan mortalitas larva. Pada perlakuan konsentrasi 0.09%, mortalitas larva telah mencapai 80%. Pertambahan mortalitas larva tampak pada 2 dan 3 HSP, dan pada hari-hari pengamatan berikutnya sudah tidak terjadi pertambahan mortalitas yang tinggi. Larva yang mati akibat perlakuan dengan sediaan fraksi aktif kulit batang *C. soulattri* menunjukkan gejala tubuh hitam dan kering. Setelah mengonsumsi daun perlakuan, sebelum mati gerakan larva lamban dan tidak makan daun perlakuan kembali.

Fraksi aktif kulit batang *C. soulattri* memiliki aktivitas insektisida yang kuat. Fraksi diklorometana memiliki LC<sub>50</sub> terhadap instar II sebesar 0.06% dan terhadap instar II+III sebesar 0.05% sedangkan LC<sub>95</sub> terhadap instar II maupun II+III adalah sebesar 0.1% (Tabel 2). Dengan memperhatikan mortalitas setiap konsentrasi yang diuji untuk menentukan LC<sub>50</sub> dan LC<sub>95</sub> tampak bahwa mortalitas larva instar II tidak berbeda nyata dengan mortalitas instar II+III ( $P \geq 0.05$ ).

**Pengaruh Sediaan Kulit Batang *C. soulattri* terhadap Asimilasi Pakan oleh Larva *C. pavonana*.** Larva instar IV *C. pavonana* yang mengonsumsi daun brokoli yang diberi perlakuan fraksi aktif *C. soulattri* menunjukkan pola indeks pemanfaatan pakan yang hampir sama. Perlakuan tersebut menurunkan secara nyata ( $P < 0.05$ ) LK, LP, LP relatif, serta EKC dan EKK dibandingkan kontrol (Tabel 3). Secara umum, perlakuan dengan bahan uji menurunkan laju pertumbuhan larva instar IV sebesar 48.9-94.1%, sebaliknya DC lebih besar daripada kontrol.

**Pengaruh Fraksi Aktif Kulit Batang *C. soulattri* terhadap Aktivitas Enzim Invertase, Protease, dan Trehalase.** Aktivitas enzim invertase dan protease larva instar IV lanjut yang berkembang dari larva instar IV awal yang diberi perlakuan fraksi aktif *C. soulattri* lebih rendah dibandingkan dengan kontrol (Tabel 4). Pada konsentrasi 0.03 dan 0.05% perlakuan fraksi tersebut, dibandingkan kontrol dapat menurunkan persentase aktivitas enzim invertase sebesar 20.7-24.1% dan aktivitas enzim protease sebesar 14.4-25.1%. Berbeda dengan enzim trehalase, perlakuan fraksi aktif *C.*

*soulattri* meningkatkan aktivitas enzim tersebut. Pada konsentrasi 0.05% perlakuan tersebut meningkatkan aktivitas enzim trehalase sebesar 120% dibandingkan dengan kontrol.

## PEMBAHASAN

Pola perkembangan mortalitas larva yang tinggi pada awal pengamatan dan relatif konstan pada pengamatan berikutnya mengindikasikan bahwa senyawa aktif yang terkandung di dalam fraksi aktif *C. soulattri* memiliki cara kerja yang relatif cepat dalam menimbulkan mortalitas larva. Pernyataan tersebut diperkuat dengan nilai LC<sub>50</sub> dan LC<sub>95</sub> bahan uji antara instar II dan instar II+III yang tidak berbeda nyata. Dengan rendahnya nilai LC ini dapat dikemukakan bahwa senyawa aktif yang terdapat dalam fraksi aktif *C. soulattri* memiliki aktivitas insektisida yang kuat terhadap larva *C. pavonana*. Syahputra (2005) melaporkan bahwa fraksi aktif sediaan tersebut bersifat sinergis. Karena aktivitas sinergis ini, untuk tujuan praktis komponen aktif yang terkandung dalam sediaan kulit batang *C. soulattri* tidak dilanjutkan pemurniannya sehingga penggunaan senyawa murninya dan atau pengembangannya sebagai senyawa model insektisida tidak dapat dilakukan. Komponen fraksi tersebut merupakan kelompok triterpenoid. Selanjutnya, pengembangan sediaan insektisida botani dari kulit batang *C. soulattri* dilakukan dengan memanfaatkan ekstrak/fraksi aktif. Ekstrak dan fraksi aktif tumbuhan tersebut juga dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri (Khan *et al.* 2002).

Tabel 1. Aktivitas insektisida sediaan fraksi aktif kulit batang *C. soulattri* terhadap larva *C. pavonana*

Konsentrasi (% w/v)	N*	Mortalitas (%)	
		Instar II	Instar II+III
Kontrol	90	0	0
0.02	86	1.16	3.5
0.03	90	0	3.3
0.04	89	16.85	22.5
0.06	89	52.81	73
0.09	90	87.78	92.2

\*Jumlah larva yang diberi perlakuan

Tabel 4. Pengaruh fraksi aktif kulit batang *C. soulattri* terhadap aktivitas enzim metabolik larva *C. pavonana* instar IV

Konsentrasi (%)	Aktivitas enzim $\pm$ SB (mg substrat/mg protein)		
	Invertase*	Protease*	Trehalase*
0 (Kontrol)	0.29 $\pm$ 0.04a	11.14 $\pm$ 3.83a	0.15 $\pm$ 0.04a
0.03 (LC <sub>10</sub> )	0.23 $\pm$ 0.08a	9.53 $\pm$ 3.68a	0.19 $\pm$ 0.01a
0.05 (LC <sub>50</sub> )	0.22 $\pm$ 0.06a	8.34 $\pm$ 0.72a	0.33 $\pm$ 0.17a

\*Angka pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata (uji selang berganda Duncan,  $\alpha = 0.05\%$ )

Tabel 2. Parameter hubungan konsentrasi-mortalitas sediaan fraksi aktif kulit batang *C. soulattri* terhadap larva *C. pavonana*

Instar*	a $\pm$ GB**	b $\pm$ GB**	LC <sub>50</sub> (sk 95%) (%)**	LC <sub>95</sub> (sk 95%) (%)***
Instar II	7.78 $\pm$ 1.15	6.32 $\pm$ 0.90	0.059 (0.049-0.072)	0.107 (0.083-0.194)
Instar II - III	7.84 $\pm$ 1.38	6.07 $\pm$ 1.04	0.051 (0.040-0.068)	0.095 (0.071-0.229)

\*Jumlah larva instar II yang diberi perlakuan 375 larva dan kontrol 75 larva. \*\*intersep garis regresi, \*\*\*kemiringan garis regresi, GB = galat baku, SK = selang kepercayaan.

Tabel 3. Pengaruh sediaan fraksi aktif kulit batang *C. soulattri* terhadap indeks pemanfaatan makanan pada larva *C. binotalis* instar IV

Konsentrasi (%)	LK (mg/hari)*	LKR (mg/mg/hari)*	LP (mg/hari)*	LPR (mg/mg/hari)*	DC (%)*	EKC (%)*	EKK (%)*
Kontrol	21.02a	6.63a	3.56a	1.12a	66.51c	17.70a	27.85a
0.03	15.33b	6.54a	1.82b	0.75b	73.64b	13.06b	20.31b
0.05	11.70bc	7.04a	0.43c	0.25c	89.20a	3.77c	4.50c
0.075	10.11c	6.59a	0.21c	0.13d	89.75a	2.40c	2.95c

\*Angka pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata (uji selang berganda Duncan,  $\alpha = 0.05\%$ ). LK: laju konsumsi, LKR: LK relatif, LP: laju pertumbuhan, LPR: LP relatif, DC: daya cerna, EKC: efisiensi konversi pakan dicerna, EKK: efisiensi konversi pakan dikonsumsi

Penurunan LK akibat perlakuan pakan menunjukkan bahwa komponen aktif sediaan tersebut berfungsi sebagai *antifeedant* primer, yakni penolakan makan oleh serangga akibat sifat langsung komponen aktif sebelum komponen aktif tersebut diserap tubuh. Hasil percobaan ini sesuai dengan Syahputra (2005) yang melaporkan bahwa fraksi tersebut memiliki aktivitas penghambatan makan terhadap *C. pavonana*. Laju pertumbuhan yang menurun tanpa adanya perbedaan LKR mengindikasikan bahwa senyawa aktif sediaan juga dapat berfungsi sebagai *antifeedant* sekunder yang mempengaruhi proses makan, pencernaan, dan penyerapan. Hal ini kemungkinan disebabkan komponen aktif kulit batang *C. soulattri* menekan aktivitas makan larva uji melalui pengaruhnya terhadap sistem syaraf pusat yang mengatur proses makan (Chapman 1995). Penurunan LPR pada perlakuan lebih disebabkan oleh penurunan EKC, dan bukan oleh LKR. Hal ini mengisyaratkan terjadinya peracunan dalam tubuh larva oleh senyawa aktif sediaan setelah pakan dicerna (Waldbauer 1968; Duffey & Stout 1996). EKC yang rendah mengindikasikan rendahnya pakan yang dicerna yang berarti pula terdapat gangguan pada proses pencernaan, misalnya adanya gangguan terhadap enzim-enzim pencernaan serangga.

Semua perlakuan fraksi menurunkan aktivitas enzim invertase dan protease dibandingkan dengan kontrol. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh gangguan terhadap fungsi bagian aktif enzim. Selain itu, kemungkinan juga disebabkan oleh toksisitas intrinsik fraksi aktif yang menyebabkan gangguan terhadap aktivitas sel epitel di saluran pencernaan yang menurunkan sekresi enzim. Ishaaya *et al.* (1991) menyebutkan bahwa mimosin (asam  $\beta$ -[N-(3-hidroksi-4-oksipiridi)]- $\alpha$ -aminopropionat), senyawa aktif yang diisolasi dari tanaman *Mimosa pudica* dan *Leucaena leucocephala* dapat mengganggu enzim pencernaan serangga *Tribolium castaneum* melalui proses penurunan aktivitas atau penurunan sintesis enzim. Sifat gangguan terhadap sel akibat senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi diklorometana kulit batang *C. soulattri* ini tampaknya dapat dijelaskan dengan kumarin yang diisolasi dari kulit batang dan buah *Calophyllum dispar* yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker (Guilet *et al.* 2001). Gangguan aktivitas kedua enzim tersebut dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan larva hingga larva mati.

Sebagai sumber energi, glukosa diperoleh dari trehalosa dalam hemolimfa serangga yang oleh enzim trehalase dipecah menjadi dua molekul glukosa. Penurunan penyerapan glukosa dalam saluran pencernaan akibat menurunnya aktivitas invertase mengakibatkan pelepasan enzim trehalase yang cukup tinggi sebagai kompensasi. Dengan demikian, meningkatnya aktivitas enzim trehalase dalam penelitian ini dapat dipahami dengan mengetahui fungsi enzim tersebut di dalam tubuh larva. Rendahnya aktivitas enzim invertase dan protease, yang masing-masing di dalam tubuh serangga memiliki fungsi memecah molekul sukrosa dan protein yang terkandung dalam pakan serangga menyebabkan larva instar IV *C. pavonana* kurang mendapat pasokan karbohidrat sebagai sumber energi dan protein sebagai zat pembangun tubuh. Rendahnya kadar protein dalam tubuh akibat

penurunan aktivitas protease dalam penelitian ini dapat menyebabkan terganggunya fungsi protein dalam tubuh, baik yang bersifat fungsional seperti gangguan pada pembentukan hormon, penyangga racun, dan pengatur pH, maupun yang bersifat struktural seperti gangguan pada pembentukan protein integumen dan otot.

Jika suatu serangga memakan senyawa aktif, sebagai reaksi serangga tertentu yang tidak tahan akan mengalami kematian, sebaliknya serangga yang toleran akan tetap bertahan. Bagi serangga yang tidak tahan terhadap senyawa aktif tersebut, sebelum akhirnya mati serangga dapat tetap bertahan dengan memaksimalkan pemanfaatan sumber energi di dalam tubuhnya. Sebagai konsekuensi dari keadaan ini larva akan mengalami hambatan pertumbuhan dan perkembangan. Serangga yang toleran, melalui sistem metabolisme senyawa asing dalam tubuh serangga, serangga akan menetralkan atau mendetoksifikasi senyawa aktif menjadi tidak aktif, sehingga serangga dapat beradaptasi dengan senyawa tersebut. Metabolisme senyawa aktif tersebut terdiri dari dua tahap. Tahap pertama melibatkan reaksi oksidasi, hidrolisis, reduksi, dan reaksi enzimatis lain yang menghasilkan senyawa polar. Pada tahap kedua, sebagian hasil reaksi tahap pertama akan diikat oleh senyawa polar tertentu yang terdapat dalam tubuh membentuk konjugat yang larut dalam air. Konjugat ini kemudian dikeluarkan dari tubuh bersama-sama dengan kotoran serangga (Matsumura 1985). Proses metabolisme tersebut membutuhkan banyak energi. Energi yang digunakan untuk detoksifikasi diperoleh dari energi yang seharusnya untuk pertumbuhan dan perkembangan serangga. Sebagai akibatnya pertumbuhan serangga akan terganggu. Beberapa jenis serangga dapat beradaptasi dengan senyawa aktif tertentu (Farrar 1989).

Mekanisme penghambatan pertumbuhan dan perkembangan serangga dapat terjadi dengan cara lain. Mimosin sebagai asam amino non protein bertindak sebagai antimetabolit yang dapat mengganti kedudukan suatu asam amino pembentuk protein. Hal itu mengakibatkan struktur protein berubah sehingga tidak dapat digunakan oleh serangga untuk pertumbuhan dan perkembangannya (Ishaaya *et al.* 1991). Senyawa aktif azadiraktin dari mimba (*Azadirachta indica*) dapat berikatan dengan protein pada reseptor protein (Rembold & Puhlmann 1993). Keadaan ini diduga menyebabkan protein tersebut tidak dapat berikatan dengan protein lain sehingga sintesis jenis protein baru tidak terjadi. Hasil pengujian di atas menunjukkan bahwa fraksi diklorometana kulit batang *C. soulattri* menunjukkan aktivitas insektisida yang kuat terhadap larva *C. pavonana*. Selain menyebabkan kematian, fraksi tersebut juga menghambat pertumbuhan larva uji. Kematian larva disebabkan oleh adanya gabungan sifat toksisitas instrinsik dan efek *antifeedant* dari senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi aktif diklorometana. Toksisitas intrinsik tersebut dapat menghambat aktivitas makan serangga melalui penekanan syaraf pusat yang mengatur aktivitas makan (*antifeedant* sekunder) selain itu juga menekan aktivitas enzim metabolik, invertase, dan enzim protease. Gangguan di atas secara keseluruhan dapat menghambat pertumbuhan serangga dan akhirnya mengakibatkan kematian serangga (Chapman 1995).

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Penelitian Hibah Bersaing X (2002) kepada Edy Syahputra. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Urai Nuryati atas bantuan pemeliharaan serangga uji.

### DAFTAR PUSTAKA

- Chapman RF. 1995. Mechanics of food handling by chewing insects. Di dalam: Chapman RF, de Boer G (ed). *Regulatory Mechanisms in Insect Feeding*. New York: Chapman & Hall. hlm 3-31.
- Coll JC, Bowden BF. 1986. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *J Nat Prod* 49:934-936.
- Duffey SS, Stout MJ. 1996. Antinutritive and toxic componen of plant defense against. *Arch Insect Biochem Physiol* 32:3-37.
- Farrar RR, Barbour JD, Kennedy GG. 1989. Quantifying food consumption and growth in insects. *Entomol Soc Amer* 89:593-598.
- Guilet D *et al.* 2001. Novel cytotoxic 4-phenylfuranocoumarins from *Calophyllum dispar*. *J Nat Prod* 64:563-568.
- Ishaaya I, Hirashima A, Yablonski S, Tawata S, Eto M. 1991. Mimosine, a non protein amino acid, inhibit growth and enzyme systems in *Tribolium castaneum*. *Pesticide Biochem Physiol* 39:35-42.
- Khan MR, Kihara M, Omoloso AD. 2002. Antimicrobial activity of *Calophyllum soulattri*. *Fitoterapia* 73:741-743.
- Kresze GB. 1988. Methods for protein determination. Di dalam: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Gral M (ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. 3<sup>rd</sup>, Vol II. Germany: VCH Verlagsgesellschaft. hlm 84-99.
- Matsumura F. 1985. *Toxicology of Insecticides*. Ed ke-2. New York: Plenum Pr.
- Prijono D. 1998. Insecticidal activity of meliaceous seed extracts against *Crocidolomia binotalis* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Bul HPT* 10:1-7.
- Prijono D, Simanjuntak P, Nugroho BW, Sudarmo, Puspitasri S. 2001. Insecticidal activity of extracts of *Aglaia* spp. (Meliaceae) against the cabbage cluster caterpillar, *Crocidolomia binotalis* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J Perl Tan Indon* 7:65-73.
- Rembold H, Puhlmann I. 1993. Phytochemistry and biological activity of metabolites from tropical Meliaceae. Di dalam: Downum KR, Romeo JT, Stafford HAP (ed). *Phytochemical Potential of Tropical Plants*. New York: Plenum Pr. hlm 107-151.
- Syahputra E. 2005. Bioaktivitas insektisida botani *Calophyllum soulattri* Burm. F. (Clusiaceae) sebagai pengendali hama alternatif [Disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Syahputra E, Manuwoto S, Darusman LK, Dadang, Prijono D. 2004a. Aktivitas insektisida bagian tumbuhan *Calophyllum soulattri* Burm. f. (Clusiaceae) terhadap larva Lepidoptera. *J HPT Trop* 4:23-31.
- Syahputra E, Prijono D, Manuwoto S, Darusman LK, Dadang. 2004b. Aktivitas insektisida ekstrak kulit batang empat famili tumbuhan terhadap ulat krop kubis *Crocidolomia pavonana* (F.). *J Perl Tan Indon* 10:13-22.
- Syahputra E, Prijono D. 2006. Effectiveness of *Calophyllum soulattri* bark extract on the cabbage heart caterpillar, *Crocidolomia pavonana* (F.) (Lepidoptera: pyralidae) in the laboratory and the field. *J Asia-Pacific Entomol (in press)*
- Waldbauer GP. 1968. The consumption and utilization of food by insects. *Adv Insect Physiol* 1:229-288.
- Wiyantono, Prijono D, Manuwoto S. 2001. Bioaktivitas ekstrak biji *Aglaia harmsiana* terhadap ulat krop kubis *Crocidolomia binotalis*. *J Ilmu Pert Indon* 10:1-7.