**PENELITIAN HIBAH PERCEPATAN GURU BESAR**

**KONSEP TEKNOLOGI NANOEMULSI UNTUK MENINGKATKAN PERFORMA FORMULASI SEDIAAN INSEKTISIDA BOTANI BERBAHAN *Tephrosia vogelii* DAN *Piper aduncum***

**TIM PENELITI**

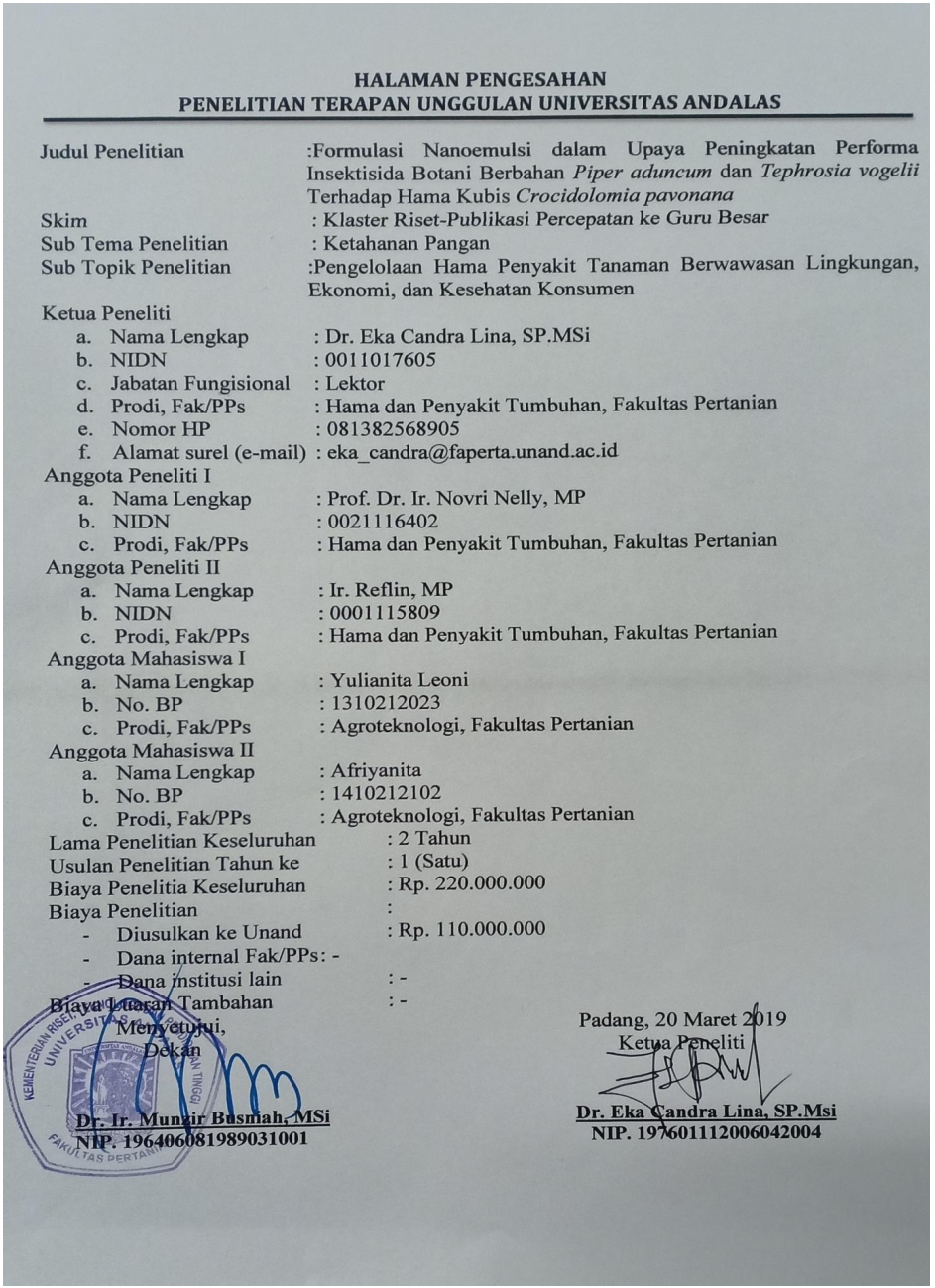
**Ketua : Dr. Eka Candra Lina, SP. MSi., 0011017605**

**Anggota 1: Prof. Dr. Novri Nelly, MS., 0021116402**

**Anggota 2: Ir.Reflin, MP 0001115809**

**UNIVERSITAS ANDALAS**

**DESEMBER 2019**



**BAB I. PENDAHULUAN**

**Latar Belakang**

Produksi sayuran dari famili Brassicaceae seperti kubis, kembang kol, sawi dan petsai lebih tinggi jika dibandingkan dengan jenis sayuran lainnya (BPS 2016). Budidaya tanaman ini terkendala oleh serangan hama *Crocidolomia pavonana* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) dan *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) merupakan hama utama tanaman famili Cruciferae. Serangan *C. pavonana* dan *P. xylostella* secara bersama-sama dapat menyebabkan kegagalan panen jika pengendalian tidak dilakukan, terutama pada musim kemarau (Sastrosiswojo & Setiawati 1993). Sejauh ini petani masih mengandalkan pestisida sintetik untuk pengendalian kedua hama tersebut. Sehingga berbagai dampak negatif muncul, di antaranya resistensi dan resurjensi hama sasaran, terbunuhnya musuh alami dan organisme bukan sasaran lainnya, pencemaran lingkungan serta bahaya residu pada hasil panen bahkan dapat merangsang perkembangan sel kanker pada manusia (Abhilash dan Sing 2009; Kohler dan Triebskorn 2013).

Berbagai permasalahan di atas mendorong orang untuk mencari alternatif yang lebih aman, di antaranya bahan insektisida dari tumbuhan (insektisida botani). Insektisida botani memiliki dampak negatif yang relatif lebih lunak dibandingkan dengan insektisida sintetik, karena lebih mudah terurai di lingkungan dan kompatibel dengan teknik pengendalian hama terpadu lainnya (Isman 1995; Schmutterer 1997). Produk pertanian yang diaplikasi dengan insektisida botani memiliki residu insektisida yang rendah. Hal ini memberi peluang besar bagi produk pertanian bisa masuk dan bersaing di pasar bebas yang bernaung di bawah World Trade Organization (WTO). Salah satu persyaratan yang ditetapkan oleh WTO adalah Sanitary and phytosanitary (SPS). Produk yang diperdagangkan harus aman bagi kesehatan konsumen, hewan, dan tanaman serta lingkungan hidup yang dilandasi oleh prinsip kajian ilmiah (Dirjen Bina Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian 2004).

Salah satu faktor penyebab rendahnya penggunaan insektisida botani sebagai alternatif pengendalian hama di kalangan petani adalah minimnya insektisida botani siap pakai yang efektif, efisien, aman, dan tersedia dalam jumlah yang cukup (Lina *et al.* 2014). Dalam upaya penyediaan insektisida botani siap pakai muncul kendala berupa keterbatasan bahan baku sumber ekstrak. Masalah ini dapat diatasi dengan metode pencampuran ekstrak dari beberapa jenis tanaman. Penggunaan insektisida dalam bentuk campuran sering disarankan untuk menunda timbulnya resistensi hama terhadap insektisida tertentu, mengendalikan beberapa jenis hama sekaligus, meningkatkan efisiensi aplikasi karena insektisida campuran digunakan pada dosis yang lebih rendah dibandingkan dengan dosis masing-masing komponennya secara terpisah dan dapat mengurangi pengaruh samping terhadap organisme bukan sasaran dan lingkungan (Prijono 2002).

Tumbuhan yang memiliki aktivitas insektisida antara lain *Tephrosia vogelii* dan *Piper aduncum*. Daun *T. vogelii* diketahui mengandung senyawa kelompok isoflavonoid seperti rotenon dan senyawa rotenoid lain yang bersifat insektisida, yaitu deguelin dan tefrosin (Delfel *et al*. 1970; Gaskins *et al* 1972; Lambert *et al*. 1993). Tumbuhan famili Piperaceae selain bersifat toksik diketahui memiliki sifat sinergis. Senyawa lignan yang mengandung gugus metilendioksifenil dapat menghambat aktivitas enzim sitokrom P450 (Metcalf 1967, Bernard *et al*.1989). Menurut Bernard *et al*. (1990) dilapiol yang berasal dari *P. aduncum* dapat menghambat aktivitas enzim sitokrom P450 dalam sediaan mikrosom dari sel-sel saluran pencernaan larva penggerek batang jagung *Ostrinia nubilalis*. Sifat sinergis ini sangat menguntungkan untuk pengembangan insektisida botani campuran sebagai alternatif pengendalian di masa yang akan datang.

Lina *et al*. (2013) melakukan penelitian menyeluruh terhadap ekstrak campuran *T. vogelii* dan *P. aduncum* (1:5). Diperoleh kesimpulan bahwa ekstrak campuran memiliki aktivitas insektisida yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak tunggalnya dengan sifat sinergistik kuat dan tidak menyebabkan fitotoksik pada daun brokoli. Ekstrak *T. vogelii* dan *P. aduncum* (1:5) mempengaruhi fungsi fisiologi serangga *C. pavonana* melalui efek penghambatan makan (*antifeedant*) dan gangguan asimilasi makanan.Komponen toksik pada campuran ekstrak *T. vogelii* dan *P. aduncum* (1:5) meningkatkan aktivitas enzim sitokrom b5 dan sitokrom P450 *C. pavonana* baik pada perlakuan in-vivo dan in-vitro (Lina *et al.* 2015). Formulasi insektisida botani berbahan *T. vogelii* dan *P. aduncum* (1:5) dibuat dalam bentuk *emulsifiable concentrate* (EC) dan *wettable powder* (WP). Formulasi EC dan WP mematikan dan menghambat pertumbuhan dan perkembangan larva *C. pavonana* (Lina *et al*. 2017). Formulasi EC dan WP campuran *T. vogelii* dan *P. aduncum* (1:5) memiliki persistensi yang rendah. Selain itu aman terhadap musuh alami *Eriborus argenteopilosus*. Formulasi EC dan WP campuran *T. vogelii* dan *P. aduncum* (1:5) efektif menekan populasi hama *C. pavonana* di lapangan dengan nilai efektivitas setara insektisida *Bacillus thuringiensis* (BT). Formulasi EC dan WP secara keseluruhan memenuhi syarat dan layak digunakan untuk pengendalian hama *C. pavonana* di lapangan (Lina *et al.* 2017).

Formulasi campuran insektisida botani harus memenuhi kriteria efektif dan efisien sebelum di produksi secara massal. Sejauh ini formulasi campuran memiliki kelarutan dan kestabilan yang belum baik secara fisikokimia, karena mudah terurai oleh cahaya matahari dan mikroorganisme. Selain itu lebih dari 90% pestisida yang diaplikasikan tidak mengenai sasaran, hal ini tidak saja berdampak kepada lingkungan tetapi juga biaya aplikasi yang dikeluarkan oleh petani (Ghormade *et al*.2011; Stephenson 2003). Salah satu teknologi yang dapat meningkatkan performa formulasi campuran insektisida botani adalah teknologi nano. Beberapa kelebihan formulasi berbasis nanoteknologi yaitu luas area permukaan aplikasi meningkat, memudahkan aktivitas sistemik, mengurangi limbah pelarut organik, melindungi bahan aktif dari penguraian oleh mikroorganisme dan cahaya matahari, meningkatkan kelarutan, memperpanjang persistensi bahan aktif dan meningkatkan kestabilan fisikokimia formulasi (Sasson *et al*. 2007).

**Tujuan Khusus**

Tujuan khusus penelitian ini adalah: a) Mengetahui ukuran partikel nanoformulasi campuran, b) Mengetahui aktivitas nanoformulasi campuran terhadap serangga uji *C. pavonana* di laboratorium.

**Keutamaan Penelitian**

Ketahanan pangan merupakan dasar suatu negara, Universitas Andalas (Unand) memiliki rencana strategis penelitian terkait ketahanan pangan. Dalam proses produksi pangan banyak kendala yang ditemukan antara lain organisme pengganggu tanaman (hama dan penyakit) yang dapat menurunkan kualitas dan kuantitas produk pertanian. Pengelolaan hama dan penyakit yang berwawasan lingkungan, ekonomi, dan kesehatan lingkungan merupakan isu strategis yang tertuang dalam renstra Unand. Hal tersebut terpecahkan diantaranya dengan teknologi aplikasi insektisida botani dengan topik penting teknologi formulasi dan aplikasi insektisida botani potensial. Hal tersebut jelas sejalan dengan penerapan konsep pengendalian hama terpadu (PHT) untuk mengendalikan hama utama tanaman sayuran famili Brassicaceae.

Saat ini realitanya di tingkat petani kubis, konsep PHT menemui beberapa kendala seperti yang telah disebutkan diatas keterbatasan bahan baku, kelarutan dan kestabilan fisikokimia yang rendah. Penggunaan insektisida yang berasal dari tanaman atau insektisida botani diharapkan mampu mengatasi kendala tersebut. Pengembangan insektisida botani dalam bentuk campuran diharapkan dapat meningkatkan aktivitasnya, menghemat sumber bahan baku dan menunda resistensi hama. Teknologi formulasi merupakan upaya menjaga kualitas suatu produk insektisida botani sehingga penggunaannya lebih efektif dan efisien. Secara keseluruhan penelitian ini akan mampu menjawab pertanyaan “dapatkah formulasi insektisida botani untuk mengendalikan hama pada tanaman Brassicaceae tersedia di tingkat petani?” Penelitian sebelumnya telah mencapai kesimpulan bahwa formulasi campuran *T. vogelii* dan *P. aduncum* (1:5) mampu mengendalikan hama kubis *C. pavonana*, aman terhadap musuh alami, residu mudah terurai dan relatif aman terhadap kesehatan manusia.

Pada saat yang bersamaan ditemukan beberapa kelemahan antara lain bahan aktif mudah terurai oleh mikroorganisme dan cahaya matahari sehingga persistensinya rendah dan efektifitasnya di lapangan kurang baik. Selain itu aplikasi formulasi dilapangan kurang efisien, cairan semprot yang membawa bahan aktif lebih banyak yang terbuang ke lingkungan dibandingkan mengenai hama dan bekerja pada target site. Permasalahan tersebut perlu dipecahkan sebelum formulasi insektisida botani di produksi secara massal. Diharapkan formulasi insektisida botani siap pakai bagi petani memiliki aktifitas baik, efisien, dan ekonomis. Pada akhirnya ketersedian pengendalian alternatif yang ramah lingkungan dapat di produksi dalam skala industri.

**BAB II. TINJAUAN PUSTAKA**

**Sifat Insektisida *Tephrosia vogelii***

Kacang babi *Tephrosia vogelii* J. D. Hooker (Leguminosae) merupakan tumbuhan asli Afrika. Tanaman kacang babi berbentuk perdu, tumbuh tegak dengan tinggi mencapai 2-3 m. Daunnya berwarna hijau dan bermanfaat untuk pupuk hijau. Bunganya berwarna ungu, merah, dan putih. Perbanyakan tanaman kacang babi dapat dilakukan dengan biji. Daun kacang babi telah dimanfaatkan sebagai racun ikan, insektisida dan naungan persemaian tanaman kopi (*Gaskins et al* 1972; Heyne 1987). Wulan (2008) melaporkan penelitian fraksi *T. vogelii* dengan metode residu padadaun, fraksi yang aktif terhadap larva *Crocidolomia pavonana* adalah fraksi heksana, fraksi etil asetat dan ekstrak metanol dengan LC50 berturut-turut 0,14%, 0,45%, dan 0,30%, sedangkan dengan metode kontak fraksi yang aktif hanya fraksi n-heksana dengan LC50 sebesar 1,1%.

Selain mengakibatkan kematian, fraksi atau ekstrak yang aktif juga berpengaruh terhadap perkembangan larva dan fraksi n-heksana juga memiliki efek *antifeedant* (penghambat makan). Abizar dan Prijono (2010) menjelaskan bahwa ekstrak etil asetat daun *T. vogelii* berbunga ungu memiliki aktivitas insektisida yang kuat terhadap larva instar II *C. pavonana* (LC50 dan LC95 pada 72 JSP masing-masing 0,091% dan 0,273%). Selain mengakibatkan kematian, perlakuan dengan ekstrak *T. vogelii* bunga ungu juga menghambat perkembangan larva *C. pavonana* akibat sifat penghambat makan dan peracunan oleh senyawa aktif. Lina *et al.* (2013) telah menguji ekstrak etil asetat daun *T. vogelii* bunga ungu terhadap ulat kubis *C. pavonana*. Hasil yang diperoleh sangat baik dengan nilai LC50 dan LC95 berturut-turut 0,05% dan 0,16%. Daun *T. vogelii* diketahui mengandung senyawa rotenon dan senyawa rotenoid lain yang bersifat insektisida, seperti deguelin dan tefrosin (Delfel *et al.* 1970; Gaskins *et al.* 1972; Lambert *et al*. 1993). Rotenoid terdapat pada seluruh bagian tanaman *T. vogelii*, namun kandungan tertinggi terdapat pada bagian daun dan yang terendah pada bagian akar (Delfel *et al.* 1970). Kandungan rotenoid semakin meningkat seiring dengan perkembangan tanaman (Hagemann *et al.* 1972).Pada tingkat sel, rotenon menghambat transfer elektron antara NADH dehidrogenase dan koenzim Q pada kompleks I dari rantai transpor elektron di dalam mitokondria (Hollingworth 2001). Hambatan terhadap proses respirasi sel tersebut menyebabkan produksi ATP menurun sehingga sel kekurangan energi yang selanjutnya dapat menyebabkan kelumpuhan berbagai sistem otot dan jaringan lainnya.

**Sifat Insektisida *Piper aduncum***

Tumbuhan sirih hutan *Piper aduncum* L. (Piperaceae) berasal dari Amerika tropis dan diperkenalkan di Indonesia pada tahun 1860. Sirih hutan tumbuh pada ketinggian 90 sampai 1000 m dpl (Heyne 1987). Perlakuan dengan minyak atsiri daun *P. aduncum* pada konsentrasi 0,1 mg/ml mengakibatkan kematian larva caplak *Rhipicephalus microplus*, parasit pada ternak seperti sapi, keledai, kuda, dan domba, sampai 100% (Silva *et al.* 2009). Sementara itu perlakuan dengan Minyak atsiri *P. aduncum* dilaporkan juga toksik terhadap kumbang daun kacang *Cerotoma tingomarianus* dengan metode aplikasi kontak, perlakuan pada konsentrasi 1% dapat mengakibatkan kematian kumbang hampir 100% (Fazolin et al. 2005). Bernard *et al.* (1995) menyebutkan bahwa ekstrak kasar daun P. aduncumpada konsentrasi 0,4% dapat menghambat perkembangan larva penggerek batang jagung *Ostrinia nubilalis* hingga 90%.

Dilapiol merupakan komponen utama fraksi aktif daun *P. aduncum.* Hasyim (2011) melaporkan bahwa komponen utama dalam fraksi aktif dari ekstrak nheksana buah *P. aduncum* adalah dilapiol (golongan fenilpropanoid), dengan area puncak pada kromatogram berdasarkan analisis dengan kromatografi gas sebesar 68,8%. Analisis GC-MS yang dilakukan Lina *et al.* (2014), juga menunjukkan bahwa komponen utama ekstrak etil asetat dan minyak atsiri hasil detilasi *P. aduncum* berturut-turut adalah dilapiol 75.18% dan 79.36%. Senyawa dilapiol memiliki gugus metilendioksifenil (MDF) yang merupakan ciri penting dari berbagai senyawa yang bersifat sebagai sinergis insektisida (Metcalf 1967; Bernard *et al.* 1990; Scott *et al*. 2008). Senyawa yang memiliki gugus MDF dapat menghambat aktivitas enzim polisubstrat monooksigenase (PSMO) yang berperan dalam menurunkan daya racun senyawa atau metabolit toksik di dalam tubuh. Terhambatnya enzim PSMO dapat mengakibatkan penumpukan senyawa atau metabolit toksik di dalam tubuh serangga yang akhirnya dapat mengakibatkan kematian (Bernard *et al.* 1995).

**Potensi Campuran Insektisida Botani**

Insektisida botani dapat digunakan dalam bentuk campuran dua jenis atau lebih ekstrak tumbuhan. Penggunaan insektisida botani yang berbahan baku campuran ekstrak tumbuhan memiliki keunggulan dibandingkan dengan ekstrak tunggal, antara lain mengurangi ketergantungan pada satu jenis tumbuhan sebagai bahan baku (Dadang & Prijono 2008). Penggunaan insektisida dalam bentuk campuran lebih ekonomis bila campuran bersifat sinergis (Stone *et al.* 1988), dapat meningkatkan spektrum aktivitas insektisida (Dadang & Prijono 2008), dan dapat menunda timbulnya resistensi hama terhadap insektisida (Georghiou 1983). Campuran ekstrak metanol buah Piper retrofractum dan ekstrak metanol daun *T. vogelii* pada perbandingan konsentrasi 1:1 bersifat sinergistik lemah baik pada taraf LC50 maupun LC95 (indeks kombinasi pada 72 JSP masing-masing 0,667 dan 0,507) dan perlakuan dengan campuran ekstrak tersebut pada konsentrasi 0,1% menghambat perkembangan larva *C. pavonana* sebesar 97% (Saryanah 2008).

Menurut (Abizar dan Prijono 2010) campuran ekstrak daun *T. vogelii* bunga ungu dan ekstrak buah *P. cubeba* (5:9) bersifat sinergistik terhadap larva *C. pavonana,* baik pada taraf LC50 (indeks kombinasi 0,245 pada 96 JSP) maupun LC95 (indeks kombinasi 0,655 pada 96 JSP). Selain mengakibatkan kematian, perlakuan dengan ekstrak uji juga bersifat sebagai penghambat makan sehingga menghambat perkembangan larva *C. pavonana*. Lina *et al*. (2014) telah melakukan penelitian menyeluruh terhadap campuran *T. vogelii* dan *P. aduncum.* Campuran dengan perbandingan 1:5 memiliki aktivitas paling tinggi terhadap hama *C. pavonana* dengan nilai LC50 dan LC95 berturut-turut 0.014 dan 0.060. Kombinasi ekstrak pada campuran bekerja dengan cara fasilitasi yaitu, bahan aktif dari *P. aduncum* menghambat aktivitas enzim yang menguraikan senyawa toksik pada tubuh serangga, akibatnya bahan aktif *T. vogelii* dan *B. javanica* tidak terurai dengan baik sehingga bisa masuk menuju sasaran dan bekerja dengan maksimal.

Famili Piperaceae diketahui memiliki sifat sinergis jika dicampurkan dengan ekstrak lainnya. Hal ini disebabkan oleh adanya senyawa lignan yang mengandung gugus metilendioksifenil yang dapat menghambat aktivitas enzim sitokrom P450, yang dapat menurunkan daya racun senyawa asing termasuk insektisida (Metcalf 1967; Bernard *et al.* 1989). Menurut Bernard *et al.* (1990) dilapiol yang berasal dari *P. aduncum* dapat menghambat aktivitas enzim sitokrom P450 dalam sediaan mikrosom dari sel-sel saluran pencernaan larva penggerek batang jagung *O. nubilalis*. Oleh karena itu, ekstrak *P. aduncum* yang mengandung dilapiol berpotensi sinergis bila dicampurkan dengan ekstrak tumbuhan lain. Lina et al. (2014) telah membuat formulasi campuran berbahan ekstrak *T. vogelii* dan *P. aduncum* (1:5) yang dikembangkan dalam bentuk *emulsifiable concentrate* (EC) dan *wettable powder* (WP). Formulasi campuran memiliki aktivitas insektisida dan menghambat perkembangan larva *C. pavonana.*

Bahan aktif formulasi mudah terurai oleh sinar matahari sehingga tidak meninggalkan residu yang berbahaya bagi manusia. Formulasi bersifat stabil pada air akuades dan air sadah yang sesuai dengan standar CIPAC (*Collaborative International Pesticides Analytical Council*). Formulasi EC dan WP aman terhadap parasitoid *Eriborus argenteop*ilosus jantan dan betina pada konsentarasi setara 2x LC95 dan tidak menyebabkan gejala fitotoksik pada daun brokoli. Uji efikasi formulasi di lapangan menunjukkan bahwa pada saat populasi hama tinggi, formulasi EC dan WP *T. vogelii : P. aduncum* (1:5) memiliki aktivitas yang setara dengan insektisida BT dan deltametrin. Pada 28 HST, formulasi EC dan WP mampu menekan populasi larva *C. pavonana* berturut-turut 80.16% dan 96.73%. Pada 56 HST perlakuan formulasi EC dan WP menekan populasi larva *C. pavonana* berturut-turut 88.56% dan 81.01%. Berdasarkan bioaktivitas insektisida, keamanan terhadap musuh alami, keamanan terhadap tanaman budidaya, persistensi residu dan keefektifan di lapangan, secara keseluruhan formulasi EC dan WP *T. vogelii* dan *P. aduncum* (1:5) dapat digunakan untuk pengendalian hama *C. pavonana* di lapangan (Lina *et al.* 2014).

**Konsep Nano Teknologi dalam Insektisida Botani**

Metode aplikasi pestisida yang aman dan efisien sangat diperlukan untuk mengurangi efek pestisida. Dalam hal ini nanoteknologi menjanjikan dan dapat digunakan sebagai alat inovasi untuk aplikasi bahan kimia pertanian secara lebih aman (Ghormade *et al* 2011; Gonzalez *et al* 2014). Beberapa kendala yang ditemukan pada insektisida botani (ekstrak, minyak essensial, bahan aktif/fraksi) adalah stabilitas fisikokimia yang rendah, mudah menguap, mudah terurai oleh panas dan mudah terurai oleh matahari (Lina *et al.* 2014). Pengembangan formulasi baru dengan sistem teknologi nano dapat meningkatkan efektivitas dan efisiensi pestisida botani (Khot *et al.* 2012; Isman 2006; Tramon 2014).

Salah satu teknologi nano yang dapat digunakan untuk mengatasi persoalan di atas adalah sistem pelepasan bahan aktif secara perlahan dapat meningkatkan spesifisitasnya pada target, mengoptimalkan kerja kerja bahan aktif dan meminimalisir dampak residu (Risch and Reineccius 1995). Penggunaan bahan-bahan yang mudah terurai atau dikenal dengan istilah nanobioteknologi sangat menjanjikan untuk pengembangan sistem. Nanobioteknologi dan nanoteknologi mengarah pada meningkatkan stabilitas dan efektifitas pestisida botani (Ghormade *et al*. 2011; Perlatti *et al.* 2013). Nanobioteknologi dan nanoteknologi memungkinkan untuk melepaskan bahan aktif langsung pada target site suatu organisme dan mengontrol pelepasan molekul pada target site tersebut.

Dua teknologi tersebut sekaligus dapat mengurangi efek pada organisme non target, meningkatkan stabilitas fisikokimia dan mencegah penguraian bahan aktif oleh mikroorganisme (Duran dan Marcato 2013; Gogos *et al.* 2012b; Perlatti *et al.* 2013). Lebih lanjut pelepasan/ sistem pembawa dapat berupa difusi terkontrol, erosi terkontrol dan pembengkakan terkontrol (Arifin *et al.* 2006; Pothakamuri dan Barbosa-Canovas 1995; Tramon 2014) tergantung pada sistem transfer yang dikembangkan. Dalam teknologi nano, ukuran partikel yang dihasilkan berkisar antara 1-5000 μm. Teknologi terseubt biasa digunakan untuk meningkatkan stabilitas, mengurangi efek samping dan efek toksik zat aktif dan memperpanjang pelepasan zat aktif (Benita, 2006).

Partikel nano meningkatkan stabilitas azadirachtin akibat radiasi ultraviolet, juga meningkatkan penyebaran pada fase cair. Nano partikel yang mengandung azadirachtin 5000mg/kg efektif mematikan larva *P. xylostella* hingga 100%. Salah satu bahan penyusun formulasi campuran adalah ekstrak *T. vogelii* dengan kandungan bahan aktif utama rotenon. Lao *et al.* (2010) mengkarakterisasi derivative amphiphilic chitosan, N-(octadecanol-1-glycidylether)-O-sulfate chitosan yang digunakan sebagai bahan pembawa rotenon. *Critical micelle concentration* (CMC) juga di tentukan, begitu juga morfologi micelle dan profil pelepasan rotenon pada media air. Hasil penelitian menunjukkan bahwa turunan chitosan sintesis dengan menggunakan metode assembly, menghasilkan micelle dengan ukuran antara 167.7 dan 214.0 nm dan zeta potensial -45 sampai 51.9 mV. Micelle yang berbentuk bola menunjukkan nilai CMC 3.55 x 10-3 hingga 5.5 x 10-3 mg/mL.

.

**BAB III. METODE PENELITIAN**

**Tempat dan Waktu**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biota Sumatera, Fakultas Farmasi dan Laboratorium Bioekologi Serangga, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas pada Bulan September sampai November 2019.

**Bahan Tumbuhan Sumber Ekstrak**

Bahan tumbuhan yang digunakan sebagai sumber ekstrak adalah daun *Tephrosia vogelii* berbunga ungu dan buah *Piper aduncum* yang di dapat dari berbagai daerah di Sumatera Barat. Daun *T. vogelii* langsung dipotong kecil-kecil lalu dikeringudarakan selama 1 minggu, sedangkan buah *P. aduncum* dikering udarakan dalam keadaan utuh selama 1 minggu tanpa terkena cahaya matahari langsung. Kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk, di ayak dan disimpan didalam alat penyimpan bersuhu 4°C hingga saat digunakan.

**Ekstraksi *Tephrosia vogelii* dan *Piper aduncum***

Ekstraksi dilakukan secara terpisah masing-masing per bahan insektisida. Metode yang dilakukan adalah dengan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat. Serbuk buah *P. aduncum* dan *T. vogelii* ditimbang sebanyak 50 g lalu dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan direndam dalam 500 ml pelarut etil asetat selama 2 x 24 jam. Kemudian cairan ekstrak disaring menggunakan corong kaca (diamater 9 cm) yang dialas kertas saring biasa dan ditampung dalam labu erlenmeyer. Hasil saringan pertama disaring lagi menggunakan corong kaca (diameter 5 cm) yang dialas kertas saring whatman No. 41 dan ditampung dalam labu uap. Hasil saringan kedua diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50 ̊C dan tekanan 240 mbar. Etil asetat yang diperoleh dari penguapan digunakan untuk merendam ulang ampas ekstrak tanaman hingga 3x perendaman (2 perendaman selanjutnya selama 1 x 24 jam).

Ekstrak yang diperoleh dalam labu berupa bahan semipadat (kental) berwarna coklat. Ekstrak tersebut dibiarkan didalam labu dengan mulut labu ditutup kain kasa selama 3 hari sampai bau etil asetat hilang. Setelah itu ekstrak dipindahkan ke botol penyimpanan dan ditutup dengan *aluminium foil* dan diberi plastik. Ekstrak disimpan didalam lemari pendingin dengan suhu 4 ̊C sampai digunakan untuk pengujian.

**Teknik Pembuatan Sediaan Nanoemulsi Campuran**

Nanoemulsi disiapkan dengan mekanisme emulsifikasi spontan dengan memodifikasi teknik metode Diba *et al*. (2014), Tama (2019) dan Erlina (2019). Nanoemulsi dengan emulsifikasi spontan yaitu nanoemulsi yang terjadi saat fase organik dan fase air dicampurkan. Sistem emulsi terdiri dari fase organik (ekstrak = *T. vogelii* dan *P. aduncum* (1:3)*,* pelarut = bioetanol) dan fase air (air = akuades dan surfaktan = Tween80). Fase organik disiapkan dengan mencampurkan kedua ekstrak dan pelarut sebanyak 10% dari total emulsi dengan komposisi 1:1 (g/v).

Fase air disiapkan dengan mencampurkan Tween 80 sebanyak 3% dan akuades kemudian diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 30 menit pada suhu ruang. Teknik emulsifikasi spontan dilakukan dengan cara menambahkan fase organik ke dalam fase air melalui penetesan (tetes demi tetes) dan dilanjutkan pengadukan magnetik selama 45 menit. Komposisi pembuatan nanoemulsi insektisida botani berbahan campuran ekstrak *T. vogelii* dan *P. aduncum* adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Komposisi nanoemulsi ekstrak *Tephrosia vogelii* dan *Piper aduncum*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Formulasi | Komposisi bahan formulasi | | | |
| Ekstrak *T. vogelli* : *P. aduncum* (1:3) (%) | Pelarut (%) | Pengemulsi (%) | Akuades (%) |
| Nanoemulsi *T. vogelli* dan *P. aduncum* | 0,25 | 0,25 | 3 | 96,50 |

Nanoemulsi yang dibuat terdiri dari 0,25% campuran ekstrak *T. vogelii* dan *P. aduncum* dengan perbandingan 1:3. Jenis pelarut yang digunakan adalah etanol 96,50% sebanyak 0,25%. Jenis pengemulsi yang digunakan adalah Tween 80 sebanyak 3%.

**Pemeliharaan Serangga Uji *Crocidolomia pavonana***

Serangga *C. pavonana* dibiakkan mengikuti prosedur yang digunakan oleh Prijono dan Hassan (1992). Imago *C. pavonana* dipelihara dalam kurungan plastik kasa berbingkai kayu (50 cm x 50 cm x 50 cm) dan diberi pakan larutan madu 10% yang diserapkan pada segumpal kapas yang digantungkan di dalam kurungan.Daun brokoli yang tangkainya dicelupkan dalam tabung film berisi air diletakkan di dalam kurungan sebagai tempat peletakan telur.Kelompok telur pada daun brokoli dikumpulkan setiap hari. Setelah telur menetas, larva dipindahkan ke dalam wadah plastik (35 cm x 26 cm x 6 cm) berjendela kasa yang dialasi kertas stensil, dan diletakkan daun brokoli bebas pestisida sebagai pakannya. Larva instar II digunakan untuk pengujian, pakan predator, dan inang parasitoid.

Bila tidak digunakan untuk pengujian, sebagian larva dipelihara lebih lanjut dalam wadah plastik berisi daun brokoli. Menjelang berpupa, larva dipindahkan ke dalam wadah plastik lain yang berisi serbuk gergaji steril sebagai medium untuk berpupa. Pupa beserta kokonnya dipindahkan ke dalam kurungan plastik-kasa seperti di atas sampai muncul imago untuk pemeliharaan selanjutnya.

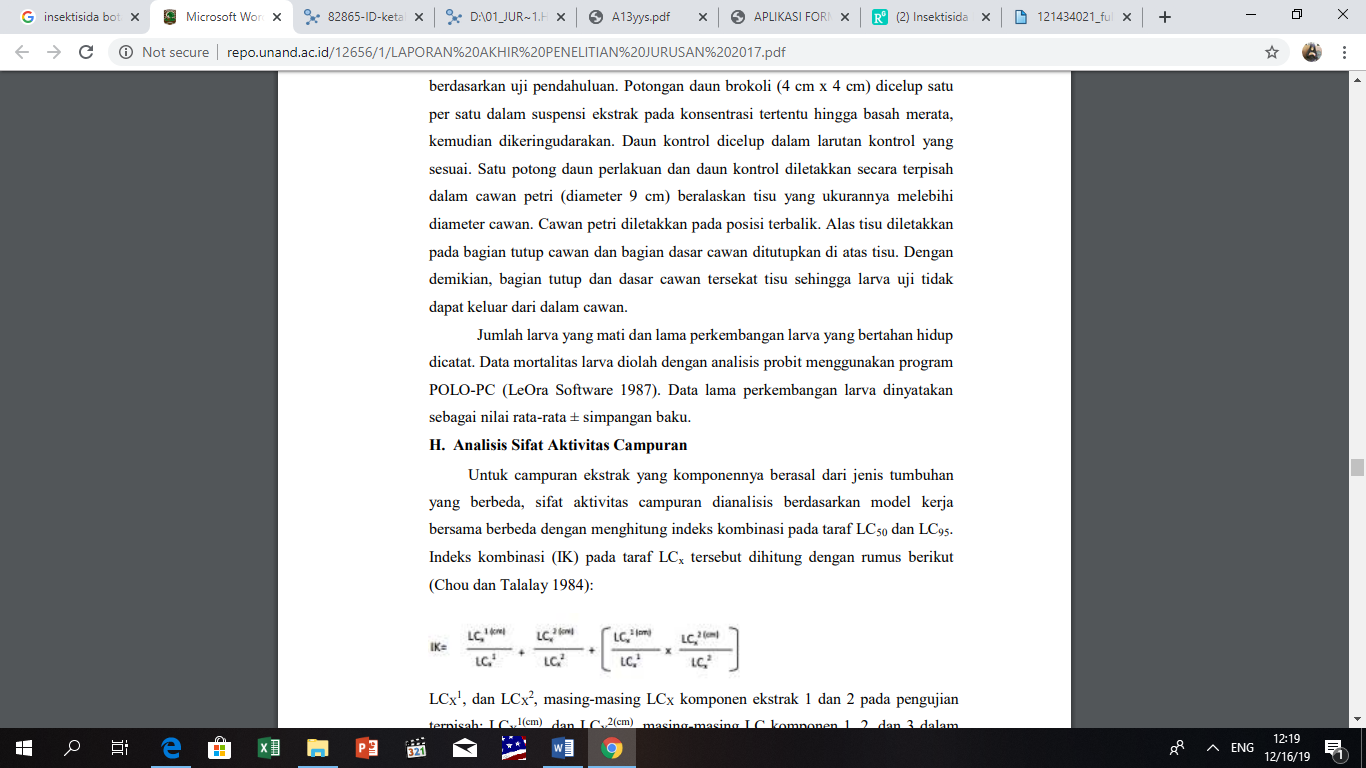
**Uji Toksisitas Nanoemulasi Campuran**

Nanoemulasi campuran diuji dengan cara menyiapkan sesuai konsentrasi yang diinginkan dan melarutkannya ke dalam air. Potongan daun brokoli (4 cm x 4 cm) dicelup satu per satu dalam larutan nanoemulsi dibolak-balik sampai seluruh permukaan daun basah merata, kemudian dikering udarakan. Daun kontrol dicelup dalam larutan kontrol yang sesuai. Satu potong daun perlakuan dan daun kontrol diletakkan secara terpisah dalam cawan petri (diameter 9 cm) beralaskan tisu yang ukurannya melebihi diameter cawan. Cawan petri diletakkan pada posisi terbalik. Alas tisu diletakkan pada bagian tutup cawan dan bagian dasar cawan ditutupkan di atas tisu. Dengan demikian, bagian tutup dan dasar cawan tersekat tisu sehingga larva uji tidak dapat keluar dari dalam cawan.

Larva *C. pavonana* instar II yang baru ganti kulit sebanyak 15 ekor dimasukkan ke dalam setiap cawan petri yang telah berisi daun perlakuan atau daun kontrol, lalu larva tersebut dibiarkan makan selama 24 jam. Masing-masing perlakuan dan kontrol di ulang 5 kali. Setelah 24 jam ditambahkan daun perlakuan dan daun kontrol seperlunya. Dua puluh empat jam berikutnya, daun perlakuan diganti dengan daun tanpa perlakuan, larva yang mati dihitung dan dibuang dari cawan sedangkan yang hidup dibiarkan dan dipelihara dengan tetap diberi makan daun tanpa perlakuan sampai larva tersebut mencapai instar IV. Jumlah larva yang mati dan lama perkembangan larva yang bertahan hidup dicatat. Data mortalitas larva diolah dengan analisis probit menggunakan program POLO-PC (LeOra Software 1987). Data lama perkembangan larva dinyatakan sebagai nilai rata-rata simpangan baku.

**Analisis Sifat Aktivitas Campuran**

Untuk campuran ekstrak yang komponennya berasal dari jenis tumbuhan yang berbeda, sifat aktivitas campuran dianalisis berdasarkan model kerja bersama berbeda dengan menghitung indeks kombinasi pada taraf LC50 dan LC95. Indeks kombinasi (IK) pada taraf LCx tersebut dihitung dengan rumus berikut (Chou dan Talalay 1984):



LCx1 dan LCx2 masing-masing LCx komponen ekstrak 1 dan 2 pada pengujian terpisah; LCx1(cm) dan LCx2(cm), masing-masing LC komponen 1 dan 2 dalam campuran yang mengakibatkan mortalitas x (misal 50% dan 95%). Nilai LC tersebut diperoleh dengan cara mengalikan LCx campuran dengan proporsi konsentrasi komponen 1 dan 2 dalam campuran. Kategori sifat interaksi campuran diadaptasi dari Kosman dan Cohen (1996) dan Gisi (1996) berdasarkan kebalikan nilai nisbah ko-toksisitas:

(1) bila IK < 0.5, komponen campuran bersifat sinergistik kuat;

(2) bila IK 0.5–0.77, komponen campuran bersifat sinergistik lemah;

(3) bila IK > 0.77–1.43, komponen campuran bersifat aditif;

(4) bila IK > 1.43, komponen campuran bersifat antagonistik.

**BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Hasil**

Nanoemulsi campuranyang telah dibuat dilakukan uji toksisitas terhadap larva *C. pavonana* dengan 6 jenis konsentrasi beserta kontrol. Data mortalitas serta lama perkembangan larva dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Mortalitas dan lama perkembangan larva *Crocidolomia pavonana* setelah perlakuan nanoemulsi campuran

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Konsentrasi (%) | Mortalitas (%) ± SD | | Lama perkembangan larva (hari) | |
| Instar II – III ± SD | Instar II – IV ± SD |
| 0,15 | 90,66 ± 0,52 | a | 4,42 ± 1,40 | 7,57 ± 1,92 |
| 0,075 | 58,66 ± 1,69 | b | 4,67 ± 1,46 | 7,22 ± 1,97 |
| 0,375 | 46,66 ± 2,71 | b | 4,00 ± 1,61 | 7,10 ± 2,30 |
| 0,018 | 18,66 ± 1,14 | c | 3,29 ± 0,34 | 5,54 ± 0,49 |
| 0,009 | 12,00 ± 1,37 | c | 3,24 ± 0,29 | 5,78 ± 0,33 |
| 0,00 (kontrol) | 0,00 ± 0,00 | d | 2,52 ± 0,06 | 4,89 ± 0,10 |

\*Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama berbeda tidak nyata menurut uji lanjut LSD 5%; SD= standar deviasi

Berdasarkan hasil penelitian insektisida botani berbahan ekstrak campuran *T. vogelii* dan *P. aduncum* dapat diketahui bahwa terdapat peningkatan mortalitas larva perlakuan seiring dengan peningkatan taraf konsentrasi. Hasil uji mortalitas nanoemulsi secara berturut-turut adalah sebagai berikut: pada konsentrasi terendah yaitu 0,00 atau kontrol tidak menyebabkan kematian pada larva uji. Konsentrasi 0,009 mematikan larva uji sebesar 12,00%, konsentrasi 0,018 mematikan larva uji sebesar 18,66%, konsentrasi 0,375 mematikan sebesar 46,66 %, konsentrasi 0,075 mematikan larva uji sebesar 58,66 % dan konsentrasi 0,15 mematikan larva uji sebesar 90,66%.

Kemudian pada pengamatan lama perkembangan larva, tidak ada pengaruh antara tingkat konsentrasi nanoemulsiterhadap lama perkembangan larva *C. pavonana* baik itu pada instar II – III maupun pada instar II – IV. Namun secara umum hasil menunjukkan adanya perpanjangan masa perkembangan larva yang bertahan hidup jika dibandingkan dengan kontrol. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 2.Lama perkembangan larva pada konsentrasi 0,00% (kontrol) adalah selama 2,52 hari untuk intar II-III dan 4,89 hari untuk instar II-IV. Kemudian lama perkembangan larva perlakuan nanoemulsi campuran adalah 3-4 hari untuk instar II-III dan 5-7 hari untuk instar II-IV.

Analisis regresi probit digunakan untuk menentukan hubungan konsentrasi nanoemulsi insektisida botani berbahan campuran ekstrak *T. vogelii* dan *P. aduncum* terhadap mortalitas larva *C. pavonana* dapat dilihat pada Tabel 3*.* Analisis Probit menghasilkan nilai kemiringan regresi (nilai b), LC50 dan LC95, sebagai berikut:

Tabel 3. Parameter regresi probit LC50 dan LC95 hubungan konsentrasi   
 nanoemulsi campuran terhadap mortalitas larva *Crocidolomia   
 pavonana* serta sifat insektisida campurannya

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nanoemulsi | Nilai b + SE | LC50 (%) | LC95 (%) | Nilai IK pada taraf | | | |
| LC50 | Kriteria | LC95 | Kriteria |
| Campuran  *T. vogelli* dan *P. aduncum* | 2.00 ± 0,44 | 0,04 | 0,3 | 0,48 | SK | 0,66 | SL |

\*b= kemiringan regresi; SE= standar error; IK: indeks kombinasi; SK: sinergistik kuat; SL: sinergistik lemah

Hasil analisis regresi probit campuran ekstrak *T. vogelii* dan *P. aduncum* menghasilkan nilai kemiringan regresi (nilai b) adalah 2.00. Nilai LC50 dan LC95 nanoemulsi berturut-turut adalah 0,04 dan 0,3. Sedangkan pada nilai indeks kombinasi terdapat 2 kriteria yang berbeda. Nilai IK LC50 dengan kriteria sinergistik kuat dan nilai IK LC95 dengan kriteria sinergistik lemah.

**Pembahasan**

Hasil penelitian menunjukan nanoemulsi campuran *T. vogelii* dan *P. aduncum* memiliki toksisitas yang sangat baik terhadap larva *C. pavonana*. Mortalitas larva pada konsentrasi tertinggi mencapai 90%. Mortalitas larva *C. pavonana* meningkat seiring dengan meningkatnya taraf konsentrasi perlakuan.Hal tersebut terjadi karena semakin banyak juga senyawa aktif *T. vogelii* dan *P. aduncum* yang terkandung dalam nanoemulsi yang dapat mematikan serangga. Kematian serangga *C. pavonana* disebabkan oleh komponen aktif ekstrak yang bekerja dengan cara berbeda dan saling bekerja sama diantara keduanya.

*Piper aduncum* mematikan serangga uji dengan kerja sebagai racun syaraf. Senyawa piperamida dari family Piperaceae (guininsin dan piperisida) bekerja sebagai racun syaraf yang menghambat aliran impuls syaraf pada akson sehingga menyebabkan kelumpuhan (Miyakado *et al.* 1989; Morgan dan Wilson 1999). Famili Piperaceae diketahui memiliki sifat sinergis jika dicampurkan dengan ekstrak lainnya. Hal ini disebabkan oleh adanya senyawa lignan yang mengandung gugus metilendioksifenil yang dapat menghambat aktivitas enzim sitokrom P450 dan menurunkan daya racun senyawa asing termasuk insektisida (Metcalf 1967; Bernard *et al.* 1989). Menurut Bernard *et al.* (1990) dilapiol yang berasal dari *P. aduncum* dapat menghambat aktivitas enzim sitokrom P450 dalam sediaan mikrosom dari sel-sel saluran pencernaan larva penggerek batang jagung *O. nubilalis*.

Kombinasi ekstrak campuran bekerja dengan cara fasilitasi yaitu, seperti yang telah dijelaskan diatas bahan aktif dari *P. aduncum* menghambat aktivitas enzim yang menguraikan senyawa toksik pada tubuh serangga, akibatnya bahan aktif *T. vogelii* tidak terurai dengan baik sehingga bisa masuk menuju sasaran dan bekerja dengan maksimal. Oleh karena itu, ekstrak *P. aduncum* yang mengandung dilapiol berpotensi sinergis bila dicampurkan dengan ekstrak tumbuhan lain. Bisa dilihat dari Tabel 1 pada proporsi konsentrasi *P. aduncum* yang lebih besar dibandingkan *T. vogelii* yaitu 3x lipat lebih banyak berkemungkinan menyebabkan penghambatan yang lebih besar terhadap aktivitas enzim PSMO sehingga senyawa aktif *T. vogelii* dapat terhindar dari penguraian oleh enzim tersebut dan dapat tetap bekerja menyerang bagian sasaran.

*Tephrosia vogelii* diketahui mengandung senyawa rotenon yang bersifat insektisida (Delfel *et al.,* 1970; Gaskins *et al,* 1972; Lambert *et al.* 1993: Lina *et al.* 2013). Rotenon memiliki aktivitas insektisida terhadap berbagai jenis serangga sebagai racun perut dan racun kontak (Perry *et al.* 1998; Djojosumarto, 2008). Gangguan ini terjadi akibat senyawa retenon yang terkandung didalam nanoemulsi insektisida botani berbahan *T. vogelii*. Retenon diketahui dapat menyebabkan kelumpuhan sistem otot dan sitem jaringan yang bekerja pada saat larva mencerna makanan. Hollingworth (2001) menjelaskan bahwasannya rotenon bersifat racun respirasi sel yang menghambat transfer elektron antara NADH dehidrogenase dan koenzim Q pada kompleks I dari rantai transpor elektron di dalam mitokondria. Rotenon menyekat pemindahan elektron dari Fe-S ke koenzim ubiquinon sehingga menghambat proses respirasi sel dan menurunkan produksi ATP. Hambatan terhadap proses respirasi sel tersebut menyebabkan produksi ATP menurun sehingga sel kekurangan energi yang selanjutnya dapat menyebabkan kelumpuhan berbagai sistem otot atau jaringan lainnya dan akhirnya serangga mati.

Nanoemulsi dengan bahan campuran ini selain dapat mematikan serangga dengan nilai mortalitas yang tinggi, juga memiliki kelebihan lain yaitu memiliki cara kerja yang berbeda sehingga dapat menunda terjadinya resistensi hama (Georghiou, 1983; Nailufar, 2011). Kemampuan serangga untuk membentuk sistem pertahanan terhadap beberapa senyawa yang berbeda sekaligus lebih sulit daripada terhadap satu jenis senyawa (tunggal) saja. Serangga tidak mudah menjadi resisten terhadap ekstrak tumbuhan dengan beberapa bahan aktif. Banyak senyawa tanaman yang memiliki cara kerja yang berbeda dengan insektisida sintetik yang umum digunakan saat ini, sehingga kemungkinan terjadinya resistensi silang cukup kecil (Prijono 1999). Selain itu, pencampuran beberapa insektisida botani juga dapat mengefisienkan sediaan bahan tanaman, seperti yang dikatakan oleh Dadang dan Prijono (2008) bahwasannya penggunaan campuran insektisida botani yang bersifat sinergistik dapat mengurangi jumlah pemakaian bahan baku dibandingkan dengan insektisida botani yang mengandung ekstrak tunggal, sehingga dapat mengatasi ketergantungan/keterbatasan bahan baku insektisida botani di tingkat petani karena tumbuhan sumber insektisida botani tidak selalu terdapat melimpah di suatu daerah. Insektisida botani dalam bentuk campuran juga bersifat lebih ekonomis (Stone *et al.* 1988; Nailufar, 2011).

Pencampuran beberapa senyawa aktif tumbuhan dapat memberikan efek seperti sinergis, antagonis atau aditif. Dalam suatu ekstrak tumbuhan, selain beberapa senyawa aktif utama biasanya juga terdapat banyak senyawa lain yang kurang aktif, namun keberadaanya dapat meningkatkan aktivitas ekstrak secara keseluruhan (sinergi) (Prijono 1999). Beberapa peneliti telah membuktikan efektivitas campuran dua jenis ekstrak tanaman untuk dijadikan insektisida botani. Sebagai contoh, campuran ekstrak daun *T. vogelii* dan *P. cubeba* (5 : 9) bersifat sinergis terhadap larva *C. pavonana*, baik pada taraf LC50 maupun LC95. (Abizar dan Prijono, 2010) serta campuran ekstrak daun *T. vogelii* dan buah *P. aduncum* (1 : 1, 5 : 1, dan 1 : 5) bersifat sinergistik kuat terhadap larva *C. pavonana* (Nailufar, 2011). Yuswanti (2002) juga melaporkan bahwa campuran fraksi asetil asetat biji *Aglaia harmsiana* dan tangkai daun *Dysoxilum acutangulum* bersifat sinergis terhadap larva instar III *Plutella xylostella* pada LC50 tetapi bersifat antagonis pada LC95.

Berdasarkan hasil analisis probit diketahui nilai b nanoemulsi campuran adalah sebesar 2,00. Menurut Lina *et al.* (2013), penambahan konsentrasi jumlah tertentu pada perlakuan nanoemulsi dengan nilai b yang tinggi akan mematikan serangga uji lebih banyak dibandingkan nanoemulsi dengan nilai b yang lebih rendah. Kemudian untuk mematikan larva *C. pavonana* sebanyak 95% dibutuhkan 0,3% nanoemulsi campuran *T. vogelii* dan *P. aduncum*. Nilai LC95 nanoemulsi campuran lebih rendah dibandingkan dengan nilai LC95 perlakuan kedua nanoemulsi tunggal secara terpisah. Tama (2019) menyatakan untuk mematikan larva *C. pavonana* menggunakan nanoemulsi insektisida botani tunggal berbahan *T. vogelii* dibutuhkan konsentrasi sebesar 1,29%. Selain itu, Erlina (2019) juga berpendapat untuk mematikan larva *C. pavonana* menggunakan nanoemulsi insektisida botani tunggal berbahan *P. aduncum* dibutuhkan konsentrasi sebesar 0,85%. Nanoemulsi campuran *T. vogelii* dan *P. aduncum* bersifat sinergis sebagai insektisida botani. Namun keduanya memiliki nilai indeks kombinasi dengan sifat sinergistik yang berbeda, yaitu bersifat lemah pada taraf LC95, sedangkan pada taraf LC50 kombinasi tersebut bersifat sinergistik kuat. Data tersebut membuktikan peran senyawa aktif dari *P. aduncum* dan *T. vogelii* secara bersama-sama membentuk sinergi yang mampu mematikan hama sasaran lebih baik dibandingkan secara tunggal.

Indikasi sinergistik kuat pada nanoemulsi campuran dibuktikan dengan nilai mortalitas perlakuan nanoemulsi campuran yang lebih tinggi dalam mematikan larva *C. pavonana* dibandingkan dengan perlakuan nanoemulsi secara tunggal/terpisah. Hal yang sama juga dijelaskan oleh Abizar dan Prijono (2010), penggunaan campuran insektisida botani yang bersifat sinergistik dapat meningkatkan efisiensi aplikasi karena insektisida campuran digunakan pada dosis yang lebih rendah dibandingkan dengan dosis komponen masing-masing secara terpisah. Penggunaan campuran insektisida botani pada dosis yang lebih rendah juga dapat mengurangi dampak samping terhadap organisme bukan sasaran dan lingkungan. Lina *et al.* (2013) menambahkan aktivitas ekstrak campuran lebih aktif mematikan larva *C. pavonana* dibandingkan dengan ekstrak tunggalnya. Analisis indeks kombinasi campuran terhadap 13 kombinasi ekstrak campuran *B. javanica, T. vogelii,* dan *P. aduncum* bersifat sinergistik kuat pada taraf LC95, kecuali pada campuran *T. vogelii: B. javanica: P. aduncum* (1:0.5:2.5) dan campuran *T. vogelii dan B. javanica* (5:1) yang bersifat sinergistik lemah. Kemudian menurut Dadang *et al.* (2007) campuran ekstrak *P. retrofractum* dan *Annona squamosa* yang diuji di laboratorium menunjukkan sinergis yang baik dengan mortalitas larva yang tinggi sebesar 100% pada konsentrasi 0,05%, dan tanpa menimbulkan fitotoksik pada tanaman.

**“Nanoemulsi insektisida botani berbahan *Tephrosia vogelii* Terhadap**

***Crocidolomia pavonana* F. (Lepidoptera: Crambidae)”**

Duma Putri Tama, Dr. Eka Candra Lina, SP, MSi, Prof. Dr. Ir. Novri Nelly, MP,

Prof. Dr. Akmal Djamaan, MS, Apt, dan Dr. Arneti, MS.

**ABSTRAK**

Nanoemulsi merupakan partikel berukuran kurang dari 500 nanometer. Nanoemulsi insektisida botani berbahan *T. vogelii* diketahui dapat meningkatkan kestabilan zat aktif dan memungkinkan melepaskan bahan aktif langsung pada organisme target. Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk menghasilkan nanoemulsi insektisida terbaik dan sangat aktif terhadap *C. pavonana.* Nanoemulsi dibuat dalam 4 tahapan (Gambar. 1), yaitu: uji pendahuluan (Tabel. 1), Optimasi Nanoemulsi mengacu pada formula A (Tabel. 2), Optimasi Nanoemulsi mengacu pada formula B (Tabel. 3) dan optimasi nanoemulsi (Tabel. 4). Sehingga nanoemulsi dihasilkan dalam 12 macam formula, yaitu: Formula A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K dan L. Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Bioekologi Serangga Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang pada bulan Oktober 2018 sampai Maret 2019. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0.5 toksisitas tertinggi dimiliki oleh formula K, sedangkan toksisitas terendah adalah formula J. Nanoemulsi yang memiliki ukuran partikel terkecil adalah formula C yaitu 134nm, sedangkan formula K memiliki ukuran partikel terbesar yaitu 1292nm. Uji stabilitas nanoemulsi menunjukan bahwa pengemulsi *tween 80* akan menghasilkan produk nanoemulsi yang lebih stabil dibandingkan dengan pengemulsi agristik.

Kata kunci: Nanoemulsi, nanoinsektisida, *C.pavonana, T.vogelii.*

**Pendahuluan**

Nanoteknologi diyakini dapat memberikan nilai tambah dalam sektor pertanian (*agroindustry*). Dalam beberapa dekade terakhir ilmuan pertanian sangat gencar melakukan riset terkait nanoteknologi. Thomson (1999) misalnya, telah melakukan riset aplikasi teknologi nano untuk memperbaiki beberapa sifat tanaman seperti buah pepaya tanpa biji. Jain dan Eija (2010) melakukan kultur jaringan dengan menggunakan metode nanoteknologi untuk menghasilkan tanaman stroberi bebas virus. Azhari (2017) mengaplikasikan nanoteknologi terhadap ekstrak *Tricodermin* sebagai antifungi *Ganoderma boninense* in vitro, dalam hasil pengujian menunjukan bahwa aktifitas antifungi enkapsulat *nano-tricodermin* memiliki nilai PIRG yang baik, sebesar 84,49%. Nanoteknologi sendiri juga memiliki peluang dibidang pengendalian hayati, khususnya pengendalian hama menggunakan insektisida botani.

Tumbuhan yang telah diketahui memiliki aktivitas insektisida potensial diantaranya adalah *Tephrosia vogelii*. Daun *T. vogelii* mengandung senyawa kelompok isoflavonoid seperti rotenone, deguelin dan tefrosin (Delfel *et al.,* 1970; Gaskins *et al.,* 1972; Lambert *et al.,* 1993). Rotenon bekerja sebagai racun respirasi sel yang menghambat transfer elektron dalam NADH–koenzim ubikuinon reduktase (kompleks I) dari sistem transpor elektron didalam mitokondria (Hollingworth, 2001). Hal tersebut lambat laun akan mengakibatkan terjadinya kelumpuhan berbagai sistem otot dan jaringan tubuh lainnya pada serangga yang akhirnya menyebabkan kematian (Hollingworth, 2001).

Pengembangan teknologi nano atau nanoteknologi pada insektisida mampu meningkatkan efisiensi penggunaan insektisida itu sendiri. Beberapa kelebihan insektisida botani berbasis nanoteknologi yaitu meningkatkan stabilisasi bahan aktif, luas area permukaan aplikasi meningkat, memudahkan aktivitas sistemik, mengurangi limbah pelarut organik, melindungi bahan aktif dari penguraian oleh mikroorganisme dan cahaya matahari, meningkatkan kelarutan, memperpanjang persistensi bahan aktif, dan meningkatkan kestabilan fisikokimia formulasi. Lebih jauh lagi, penggunaan pestisida yang langsung pada target akan meminimalisir berkembangnya mekanisme resistensi pada hama dan mengurangi kematian serangga non target. Hal ini tentu akan membawa dampak positif bagi produksi pertanian, karena banyak kasus sebelumnya dimana terjadi ledakan hama tertentu akibat penggunaan pestisida yang kurang tepat. (Abdassah, 2017).

Potensi insektisida botani berbahan *T. vogelii* berbasis nanoteknologi ini sangat besar, untuk itu perlu dilakukan penelitian terkait pengembangan nanoteknologi insektisida botani yang sangat efektif dan efisien dalam mengendalikan hama*.* Berdasarkan permasalahan di atas, peneliti tertarik melakukan penelitian dengan judul **“Nanoemulsi insektisida botani berbahan *Tephrosia vogelii* Terhadap *Crocidolomia pavonana* F. (Lepidoptera: Crambidae)”.** Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk: Mendapatkan nanoemulsi insektisida botani berbahan *T. vogelii* terbaik danaktif terhadap *C. pavonana.*

**METODE PENELITIAN**

**Tempat dan Waktu**

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Juni sampai Desember 2018 di Laboratorium Biota Sumatera, Fakultas Farmasi dan Laboratorium Bioekologi Serangga, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas.

**Metode Penelitian**

Insektisida dibuat dalam bentuk nanopartikel yang disebut nanoemulsi. Ekstrak *T. vogelii* digunakansebagai bahan aktif insektisida.Proses ekstrasi dilakukan dengan metode perendaman atau maserasi menggunakan pelarut etil asetat. Untuk mendapatkan nanoemulsi yang terbaik pembuatan nanoemulsi dilakukan dalam 4 tahapan (Gambar. 1), yaitu: uji pendahuluan (Tabel. 1), Optimasi Nanoemulsi mengacu pada formula A (Tabel. 2), Optimasi Nanoemulsi mengacu pada formula B (Tabel. 3) dan optimasi nanoemulsi menggunakan metoda (Putu, 2018) (Tabel 4). Sehingga nanoemulsi dihasilkan dalam 12 macam formula, yaitu: Formula A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K dan L.

Formula L

Formula J

Formula I

Formula H

Formula G

NANOEMULSI

Formula C

Formula F

Formula E

Formula D

Formula B

Formula A

Formula K

Gambar 1. Diagram alur pembutan nanoemulsi

Nanoemulsi dibuat menggunakan metoda *Emulsion Inversion Point* *(EIP)* yaitu pembuatan nanoemulsi menggunakan teknik energi rendah yang mengacu pada (Diba, 2014) dengan manipulasi komposisi fase organik dan fase air. Optimasi pada formula K dan L mengacu pada metoda yang dilakukan oleh (Putu, 2018). Metode emulsifikasi ini dipilih karena termasuk ke dalam metoda yang paling mudah dibuat dalam skala laboratorium, tidak membutuhkan peralatan yang rumit, tidak menggunakan temperatur yang tinggi dan dapat menghasilkan partikel berukuran kecil.Evaluasi nanoemulsi dilakukan meliputi: uji kestabilan nanoemulsi, uji PH, dan *Particle Size Analyzer (PSA).*

Uji toksisitas dilakukan menggunakan metoda celup daun pada setiap pengujian. Uji toksisitas terdiri dari uji pendahuluan dengan taraf kosentrasi 0%, 0,5%, 0,25% dan 0,10% dengan 3 kali ulangan untuk setiap nanoemulsi, hasil uji pendahuluan digunakan sebagai data untuk menentukan taraf konsentrasi pada uji lanjut, sehingga diperoleh 6 taraf konsentrasi. Perlakuan uji lanjut terdiri dari 5 kali ulangan. Data dianalisis probit menggunakan program software POLO PC untuk mengetahui nilai LC50 dan LC95. Selanjutnya data dianalisis dengan software Statistik 8 dan dilanjutkan dengan uji LSD (*Least significant different*) pada taraf nyata 5%.

**Pelaksanaan Penelitian**

1. **Persiapan bahan baku insektisida botani**

Insektisida yang digunakan adalah insektisida botani berbahan *T. vogelii.* Kriteria pengambilan daun *T. vogelii* yaitu: *T. vogelii* berbunga ungu dan sudah berbuah. Daun diambil pada bagian tengah tanaman agar mendapatkan daun yang paling baik. Kemudian daun tersebut dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam kantong plastik berukuran besar lalu dibawa ke laboratorium Bioekologi Serangga, jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas.

Daun *T. vogelii* tersebut diletakkan pada nampan rotan berdiameter 60 cm yang sudah di alas dengan kertas lalu dilakukan proses pengeringan/pemberaian. Proses pengeringan ini dilakukan selama kurang lebih 3 minggu, sampai daun benar-benar dalam keadaan kering dan kadar air pada daun sudah hilang. *T. vogelii* yang sudah kering kemudiandipotong kecil-kecil dan dihaluskan menggunakan blender. Hasil blender diayak mengunakan ayakan 0,5 mm sehingga diperoleh *T. vogelii* dalam bentuk serbuk (Lina *et al.*, 2014).

1. **Ekstraksi *T. vogelii***

Daun *T. vogelii* yang sudah berbentuk serbuk diambil sebanyak 100 gram kemudian dimasukkan kedalam labu *erlenmeyer* dan ditambahkan pelarut etil asetat sebanyak 1000 ml. Komposisi perbandingan etil asetat dengan serbuk *T. vogelii* mengacu pada penelitian yang sebelumnya (Lina *et al.*, 2014). Proses perendaman dibiarkan selama 2 × 24 jam. Kemudian cairan ekstrak disaring 2 kali menggunakan corong kaca (berdiameter 9 cm) yang beralaskan kertas saring biasa pada penyaringan I dan kertas saring whatman nomor 41 pada penyaringan II.

Hasil saringan ditampung dalam labu penguap, kemudian diuapkan dengan *Rotary evaporator* pada suhu 50ºC dan tekanan 240 mbar. Larutan yang diperoleh dari penguapan digunakan untuk merendam ulang ampas ekstrak tanaman sampai tiga kali perendaman. Eksrak yang diperoleh kemudian disimpan didalam lemari es pada suhu 4 ºC sampai digunakan untuk pengujian (Lina *et al.*, 2014).

1. **Pembuatan Nanoemulsi**

Proses pembuatannya nanoemulsi melibatkan fase air dan fase organik yang dihomogenkan dengan *magnetic stirer*. Fase organik terdiri dari ekstrak *T.vogelii* dan pengemulsi sedangkan fase air terdiri dari aquades steril dan *tween 80*. Hal pertama yang dilakukan adalah fase air dihomogenisasi menggunakan alat *hot plate* *magnetic strirer* dengan kecepatan 2.500 rpm sambil diaduk konstan menggunakan *biji strirer* selama 35 menit. Kemudian dibuat fase organik dalam erlemeyer, berupa ekstrak *T. vogeli* yang dilarutkan dengan pengemulsi etanol 70%.

Setelah fase air selesai di stirer lalu dilakukan penetesan fase organik ke dalam fase air menggunakan pipet tetes, proses penetesan dilakukan perlahan (tetes demi tetes). Pada saat meneteskan fase organik ke dalam fase air, fase air harus tetap diaduk dengan menggunakan pengaduk magnetik. Setelah fase organik selesai diteteskan, selanjutnya proses homogenisasi menggunakan pengaduk magnetik kembali dilanjutkan selama 45 menit. Komposisi Fase organik dan fase air yang digunakan mengacu pada (Diba, 2014). Nanoemulsi dibuat dalam 2 formula diantaranya, adalah:

Tabel 1. Komposisi Nanoemolsi Uji pendahuluan.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Komposisi formula** | | | | | | |
| **Formula** | **(Ekstrak :**  **(10%)** | **Ethanol 70%)** | | **(Tween80)**  **(%)** | | **(Aquadest)**  **(%)** | |
| **A.**  Fase minyak 10% | 1 : | 1 | 3 | | 87 | |
| **B.** Fase minyak 20% | 1 : | 1 | 3 | | 87 | |

Kemudian dilakukan optimasi terhadap formula A dan B. Optimasi dilakukan dengan cara membuat nanoemulsi baru namun komposisi ekstrak, pelarut dan pengemulsi diatur sedemikian rupa, guna menghasilkan nanoemulsi yang lebih optimal. Optimasi dibuat dalam 8 formula diantanya, 4 formula mengacu pada formula A (komposisi fase minyak 10%) dan 4 formula mengacu pada formula B (komposisi fase minyak 20%).

Komposisi Optimasi Nanoemulsi mengacu pada formula A, diantaranya adalah:

Tabel 2. Komposisi Optimasi Nanoemulsi mengacu pada formula A

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **For**  **mula** | **Komposisi Formula** | | | |  |
| **(Ekstrak + (10%)** | **Etanol 96%)** | **(Tween 80)**  **(%)** | **(Agristik)**  **(%)** | **(Aquadest)**  **(%)** |
| **C.** | 1 : | 3 | 3 | - | 77 |
| **D.** | 1 : | 5 | 3 | - | 77 |
| **E.** | 1 : | 3 | - | 3 | 76 |
| **F.** | 1 : | 5 | - | 3 | 76 |

Fase minyak (ekstrak : pelarut) yang digunakan pada (tabel. 2) berjumlah 10% sama dengan jumlah fase minyak yang digunakan pada formula A (Tabel.1), perbedaannya terletak pada perbandingan ekstrak dan pelarut yang digunakan. Jenis pelarut yang digunakan pada (Tabel. 2) adalah etanol 96%, sedikit berdeda dengan pelarut yang digunakan pada Formula A dan B (Tabel. 1). Pengemulsi *Tween 80* digunakan kembali formula C dan D, sedangkan formula E dan F menggunakan *Agristik* sebagai pengemulsi.

Selanjutnya optimasi dilakukan pada Formula B (Tabel. 1). Formula dibuat sejumlah 4 formula, diantaranya sebagai berikut:

Tabel 3. Komposisi Optimasi Nanoemulsi mengacu pada formula B

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Formula** | **Komposisi Formula** | | | |
| **(Ekstrak + (20%)** | **Etanol 96%)** | **(Tween 80) (%)** | **(Aquadest)**  **(%)** |
| **G.** | 1 : | 3 | 3 | 77 |
| **H.** | 1 : | 5 | 3 | 77 |
| **I.** | 1 : | 3 | 4 | 76 |
| **J.** | 1 : | 5 | 4 | 76 |

Fase minyak (ekstrak : pelarut) yang digunakan pada (tabel. 3) berjumlah 20% sama dengan jumlah fase minyak yang digunakan pada formula B (Tabel.1), perbedaannya terletak pada perbandingan ekstrak dan pelarut yang digunakan. Jenis pelarut yang digunakan pada (Tabel. 2) adalah etanol 96%, sedikit berdeda dengan pelarut yang digunakan pada Formula A dan B (Tabel. 1). Pengemulsi *Tween 80* digunakan kembali pada formula H, dan I (Tabel. 3) sebanyak 3%, lalu pada formula J dan K (Tebel.3) sebanyak 4%.

Formula dioptimasi kembali menggunakan metoda (Putu, 2018) dengan cara bahan aktif, pengemulsi dan pelarut di strirer secara bersamaan selama 60 menit. Selanjutnya ditetesi dengan aquadest sambil di stirrer kembali selama 35 menit. Nanoemulsi dibuat dalam 2 formula diantaranya, adalah:

Tabel 4. Komposisi Optimasi Nanoemulsi menggunakan metoda (Putu, 2018)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Formula** | **Komposisi Formula** | | | |
| **(Ekstrak + (20%)** | **Etanol 96%)** | **(pengemulsi)**  **(%)** | **(Aquadest)**  **(%)** |
| **K.** | 1 : | 3 | *Agristik* | 77 |
| **L.** | 1 : | 3 | *Tween 80* | 77 |

1. **Evaluasi nanoemulsi**

Evaluasi nanoemulsi penting dilakukan guna mendapatkan nanoemulsi yang stabil, aman digunakan serta efisien dalam aplikasi.

* Uji Stabilitas Nanoemulsi

Uji stabilitas nanoemulsi dilakukan sesuai dengan standart CIPAC II dengan cara menuangkan 80ml air sadah baku atau air suling kedalam gelas piala 250ml sambil dipanaskan menggunakan *hot plate* pada suhu 30℃, lalu diaduk menggunakan spatula pada kecepatan empat putaran perdetik. Selanjutnya diteteska nanoemulsi sebanyak 5ml menggunakan pipet Mohr, ketinggian pipet 2 cm dari permukaan air. Waktu Penetesan nanoemulsi harus memenuhi criteria 10-12 detik. Terakhir ditambahkan lagi air sadah baku atau air suling hingga volume campuran mencapai 100ml. setelah itu dimasukan kedalam gelas ukur dan ditutup, campuran dibolak-balik selama 10 kali.

* Uji PH

Pengukuran dilakukan menggunakan PH meter yang telah dikalibrasi sesuai petunjuk kalibrasi. Pengukuran dilakukan bertujuan untuk menentukan nilai PH dan kadar keasaman nanoemulsi sehingga diketahui apakah nanoemulsi tersebut masih bisa diterima oleh kulit manusia dan tidak memiliki efek samping atau iritasi. Pengukuran dilakukan pada suhu ruangan (Utami, 2012).

* Analisis Ukuran Partikel Nanoemulsi (Huda, 2012)

Dua tetes sampel nanoemulsi dilarutkan ke dalam 20 mL akuades di dalam gelas piala. Sejumlah cairan kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diletakkan ke dalam slot PSA. Alat PSA kemudian dioperasikan hingga diperoleh data ukuran partikel. Nilai potensial zeta kemudian diukur dengan Zetasizer. Dari analisis PSA didapatkan data rata-rata ukuran partikel dan juga distribusi ukuran partikel yang dinyatakan dalam *indeks polidispersitas (IP).* Formula emulsi terbaik ditentukan berdasarkan karakteristik terbaik (ukuran partikel, nilai indeks polidispersitas, zeta potensial) menggunakan *light-scattering Particle Size TM Analyzer Delsa Nano C* (Beckman Coulter, France).

1. **Uji toksisitas nanoemulsi**

Potongan daun brokoli (4 cm x 4 cm) dicelup satu per satu dalam nanoemulsi hingga basah merata, kemudian dikering udarakan. Daun kontrol dicelup dalam larutan kontrol yang sesuai. Potongan daun perlakuan dan daun kontrol diletakkan secara terpisah dalam cawan petri (diameter 9 cm) beralaskan tisu. Cawan petri diletakkan pada posisi terbalik. Alas tisu diletakkan pada bagian tutup cawan dan bagian dasar cawan ditutupkan di atas tisu. Dengan demikian, bagian tutup dan dasar cawan tersekat tisu sehingga larva uji tidak dapat keluar dari dalam cawan.

Larva *C. pavonana* instar II yang baru ganti kulit sebanyak 15 ekor dimasukkan ke dalam setiap cawan petri yang telah berisi daun perlakuan atau daun kontrol, lalu larva tersebut dibiarkan makan selama 24 jam. Masing-masing perlakuan dan kontrol di ulang sebanyak 5 kali. Setelah 24 jam ditambahkan kembali daun perlakuan dan daun kontrol baru. Dua puluh empat jam berikutnya, daun perlakuan diganti dengan daun tanpa perlakuan, larva yang mati dihitung dan dibuang dari cawan sedangkan yang hidup dipelihara sampai larva instar IV.

**Pengamatan**

Stabilitas nanoemulsi

Pengamatan dilakukan terhadap perubahan warna, terbentuknya krem pada bagian atas gelas ukur, terbentuknya busa, dan terjadi pemisahan fase pada nanoemulsi. Pengamatan diamati dalam jangka waktu 30 menit dan 120 menit (Lina, 2014).

PH nanoemulsi

nilai PH dan kadar keasaman nanoemulsi diukur untuk mengetahui apakah nanoemulsi tersebut masih bisa diterima oleh kulit manusia dan tidak memiliki efek samping atau iritasi. Pengukuran dilakukan pada suhu ruangan (Utami, 2012).

Analisis Ukuran Partikel Nanoemulsi

Formula nanoemulsi yang telah dihasilkan kemudian dikarakterisasi. Dalam penelitian ini karakterisasi dilakukan menggunakan hasil analisis *Particle Size Analyzer (PSA)*(Malvern).

Mortalitas larva

Mortalitas larva diamati setiap hari pada jam yang sama setiap waktu aplikasi selama 1 minggu. Pengamatan mortalitas larva dicatat dalam *logbook* dan dihitung menggunakan rumus:

Lama lerkembangan larva

Lama perkembangan larva dicatat setiap hari sampai larva tersebut mencapai instar IV.

**Analisis Data**

Analisis data pada uji stabilisasi nanoemulsi dilakukan secara deskriptif lalu dibandingkan dengan persyaratan spesifikasi yang telah ditentukan oleh CIPAC. Nilai ukuran partikel, Indeks polidispersitas (IP), dan Zeta potensial nanoemulsi dianalisis dengan menggunakan alat *Particle Size Analyzer (PSA)*. Data hasil pengamatan uji toksisitas dianalisis probit dengan menggunakan program *software* POLO PC untuk mengetahui nilai kematian pada taraf LC50 dan LC95 selanjutnya data mortalitas imago dianalisis dengan *sofware* statistik 8 dan dilanjutkan dengan uji *Least Significant Different* (LSD) pada taraf 5%.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Hasil**

1. **Stabilitas nanoemulsi**
2. **PH nanoemulsi**
3. **Analisis Ukuran Partikel Nanoemulsi (***Particle Size Analyzer***)**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka diperoleh ukuran partikel dan zeta potensial nanoemulsi masing-masing formula adalah:

Tabel 5. Hasil Analisis Ukuran Partikel Nanoemulsi **(***Particle Size Analyzer***)**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Formula** | **Z-avarange (nm)** | **% intensity** | | | **Polydispersity index** | **Zeta Potential** |
| **Peak 1** | **Peak 2** | **Peak 3** |
| Formula C  Formula D  Formula K | **134**  **156**  **1292** | 98.0  100  47,5 | 2.0  0.0  35,7 | 0.0  0.0  16,9 | 0.238  0.142  0.850 | -29.2  -24.3  -16.3 |
| Formula L | **1286** | 54,2 | 30.2 | 12,5 | 0.804 | -24.2 |

1. **Mortalitas larva**

Berdasarkan uji toksisitas yang telah dilakukan terhadap larva *C. pavonana* menghasilkan mortalitas formula sebagai berikut:

Tabel 6. Hasil uji pendahuluan formula A dan B

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Formula** | **Uji Pendahuluan** | | |
| **Konsentrasi**  **0 (%)** | **Konsentrasi**  **25(%)** | **Konsentrasi**  **50 (%)** |

A. 0.00 67.00 83.33

B. 0.00 100. 100

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Formula A pada konsentrasi 25 toksisitasnya adalah 67.00% dan pada konsentrasi 50 toksisitasnya adalah 83.33%, berdeda dengan Formula B yang dapat mematikan larva secara keseluruhan. Tabel diatas menunjukan bahwa toksisitas formula B pada konsentrasi 25 dan 50 adalah 100%.  Selanjutnya hasil toksisitas uji pendahuluan formula C sampai L, adalah sebagai berikut:  Tabel. 7 Hasil toksisitas uji pendahuluan formula C sampai L | | | | |
| **Formula** | **Uji Pendahuluan** | | | |
| **Konsentrasi 0,5**  **(%)** | **Konsentrasi 0,25 (%)** | **Konsentrasi 0,1 (%)** | |
| C.  D.  E.  F.  G. | 83.33  66.67  56.67  23.30  23,33 | -  -  -  -  26.67 | 56.67  36.67  23.33  6.66  13.33 | |
| H. | 33.33 | 40.00 | 30.00 | |
| I. | 30.00 | 13.33 | 6.67 | |
| J. | 20.00 | 36.67 | 13.32 | |
| K. | 100.00 | 90.00 | 22.67 | |
| L. | 89.33 | 60.00 | 56.00 | |

Pada uji pendahuluan diatas terlihat bahwa mortalitas formula Diba lebih rendah dibandingkan formula Putu, oleh karena itu yang di uji lanjut hanya 2 formula, yaitu: Formula G. Putu agristik dan Formula H. Putu Tween. Table diatas menunjukan bahwa mortalitas formula diba tidak ada yang melebihi 50,00 % berbanding terbalik dengan formula Putu yang mortalitasnya melebihi 50.00%.

Tabel. 8 Hasil uji lanjut formula L

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **For-**  **mula** | **Hasil Uji lanjut** | | | | |
| **Konsentrasi 0,58 (%)** | **Konsentrasi 0,31 (%)** | **Konsentrasi 0,17 (%)** | **Konsentrasi 0,09 (%)** | **Konsentasi 0,05 (%)** |
| L | 89.33 | 60.00 | 56.00 | 41.33 | 36.00 |

Berdasarkan tabel diatas dapat dilihat bahwa semakin kecil konsentrasi perlakuan makan mortalitas akan semakin rendah. Konsentrasi tertinggi yakni 0.58 mortalitasnya adalah 89.33% dan konsentrasi 0.05 mortalitasnya adalah 36.00%.

Tabel. 9 Hasil uji lanjut formula K

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **For-**  **mula** | **Hasil Uji lanjut** | | | | |
| **Konsentrasi 0,25 (%)** | **Konsentrasi 0,21 (%)** | **Konsentrasi 0,18 (%)** | **Konsentrasi 0,15 (%)** | **Konsentasi 0,13 (%)** |
| K | 73.33 | 48.00 | 44.00 | 29.33 | 22.67 |

Tabel diatas memaparkan bahwasanya konsentrasi berbanding lurus dengan mortalitas larva *C. pavonana.* Konsentrasi tertinggi pada uji lanjut yaitu 0.25 mortalitasya adalah 73.33% dan konsentrasi terendah adalah 0.13 mortalitasnya adalah 22.67%.

**Pembahasan**

Ukuran droplet renntang nanoemulsi adalah 0-500 nm. Formula diatas melebihi rentang ukuran nanoemulsi, menandakan bahwa meggunnakan energy rendah untuk membuat nanoemulsi dengan komposisi dan waktu tersebut tidak dapat menghasilkan partikel berukuran nano. Nilai intensitas menunjukan probabilitas banyaknya partikel melayang dan bergerak acak yang tertembak dalam sebuah volum larutan tersebut. Distribusi ukuran partikel dinyatakan dalam indekx polidispersitas. Rentang indeks polidispersitas berada diantara 0 sampai dengan 1. Nilai indeks polidispersitas mendekati 0 menunjukan disperse ukuran yang homogeny. Indeks polidispersitas lebih dari 0.5 menunjukan heterogenitas tinggi (Avadi et al., 2010). Formula diatas memiliki indeks polidispersitas lebih besar dari 0,5 menunjukan formula tersebut heterogenitasnya tinggi.

Zeta potensial nanoemulsi digunakan untuk mengkarakterisassi muatan permukaan. Nilai potensial zeta menunjukan stabilitas suatu system yang mengandung globul-globul terdispersi melalui adanya gaya tolak-menolak antara partikel yang bermuatan sama ketika berdekatan. Nilai potensial zeta yang lebih besar dari (+30) mV atau lebih kecil dari (-30) mV akan stabil secara elektrostatik, sedangkan nilai potensial zeta yang lebih besar dari (+20) Mv atau lebih kecil dari (-20) mV akan stabil secara sterik. Formula diatas memiliki nilai zeta potensial kecil dari (-30) mV menyatakan bahwa formula diatas stabil secara elektrostatik, Formula yang menggunakan pengemulsi tween memiliki nilai potensial zeta lebih besar dari (+20) maka formula tersebut stabil secara sterik.

Ukuran partikel yang dihasilkan dari formula tersebuat diketahui berukuran lebih dari 1.000 nm. Formula Putu tween memiliki ukuran partikel sebesar 1292 nm, sedangkan formula putu agristik menghasilkan produk yang berukuran 1292 nm. Kedua formula tersebut tidak memnuhi criteria nanopartikel sehingga kurang tepat apabila formula tersebut disebut nanoemulsi. Hal ini dapat terjadi akibat komposisi dan formula nanoemulsi diatas kurang tepat, sehingga tidak dapat menghasilkan produk berukuran nanometer.

Menurut (Chen, et al., 2011) komposisi fase minyak yang digunakan dalam pembuatan nanoemulsi akan mempengaruhi ukuran droplet dan stabilitas nanoemulsi yang terbentuk. (Martien, 2012) dalam jurnalnya juga menyatakan bahwa fase minyak dalam nanoemulsi berperan sebagai pembawa yang dapat melarutkan zat aktif yang bersifat lipofilik. Fase minyak membentuk droplet dalam medium dispersi dengan adanya bantuan surfaktan dan ko-surfaktan sehingga dapat menghasilkan partikel berukuran nano.

**KESIMPULAN**

Nanoemulsi yang dibuat menggunakan komposisi formula serta metoda diatas tidak napat menhasilkan produk berukuran nano, untuk itu perlu dilakukan optimasi lebih lanjut.

**DAFTAR PUSTAKA**

Diba, Rovie Farah, S. Yasni, S. Yuliani. 2014. Nanoemulsifikasi Spontan Ekstrak Jintan Hitam dan Karakteristik Produk Enkapsulasinya. J Teknol dan Industri Pangan. Vol. 25 No. 2 Th. 2014. ISSN: 1979-7788.

Lina, E.C. 2014. Pengembangan Formulasi Insektisida Nabati Berbahan Ekstrak *Brucea javanica*, *Piper aduncum* dan *Tephrosia vogelii* untuk Pengendalian Hama Kubis *Crocidolomia pavonana*. [Disertasi] Bogor. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 43 hal.

Lina, E.C., Arneti, Djoko Prijono, Dadang. 2010. Aktifitas Insektisida *Brucea javanica* L. Merr Terhadap Hama Kubis *Crosidolomia pavonana* (Lepidoptera: Crambidae). Departemen proteksi tanaman. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Vol.11 No.1:36-39.

Lina, E.C., Dadang, S. Manuwoto, G. Syahbirin. 2016. Gangguan Fisiologis dan Fisikokima *Crosidolomia pavonana* Akibat Perlakuan Ekstrak Campuran *Tephrosia vogelii* dan *Piper Aduncum*. Jurnal Entomologi Indonesia 12(2) 100.

Putu, nisuluh. 2018. Characteristics and Toxicity of Nanoemulsion Formulations of Piper retrofractum and Tagetes erecta Extract Mixtures. Nuryanti et al. Karakterisasi Fitoplasma. 1 J. HPT Tropika. ISSN 1411-7525 Vol. 18, No. 1: 1 – ...., Maret 2018 DOI : 10.23960/j.hptt.118xx-xx

Schmutterer H**,** editor. 1995. The Neem Tree, Azadirachta indica A. Juss, and Other Meliaceous Plants: Sources of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes. Weinheim (DE): VCH.

Wahyono, Dwi. 2010. Ciri nanopartikel kitosan dan pengaruhnya pada ukuran partikel dan efisiensi penyalut. [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.

**BAB V KESIMPULAN DAN SARAN**

**Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa nanoemulsi campuran ekstrak *T. vogelii* dan *P. aduncum* bersifat sinergis dan efektif serta efisien untuk dimanfaatkan sebagai alternatif dalam pengendalian hama *C. pavonana*.

**Saran**

Untuk mendapatkan manfaat yang lebih besar, sebaiknya nanoemulsi campuran tersebut diuji keefektifannya terhadap hama lain, keamanannya terhadap musuh alami, serta keefektifannya untuk mengendalikan hama di lapangan.

**DAFTAR PUSTAKA**

Abizar M. dan D. Prijono. 2010. Aktivitas insektisida ekstrak daun dan biji *Tephrosia vogelii* J.D. Hooker (Leguminosae) dan ekstrak buah *Piper cubeba* L. (Piperaceae) terhadap larva *Crocidolomia pavonana* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). JHPT Trop 10:1-12.

Abhilash PC, Singh N. 2009. Pesticide use and aplication: an Indian scenario. Hazard Mater :165:1-2

Benita, S., 2006. Microencapsulation Methods and Industrial Application. New York: MarcelDekker Inc.

Bernard C. B, Krishnamurty H. G, Chauret D, Durst T, Philogene B. J. R et al. 1995. Insecticidal defenses of Piperaceae from the Neotropics. J Chem Ecol 21:801-814.

Bernard CB, Arnason JT, Philogene B. J. R, Lam J, Waddell T. 1989. Effect of lignans and other secondary metabolites of the asteraceae on the monooxygenase activity of the European corn borer. Phytochemistry 28(5) 1373-1377.

Bernard CB, Arnason JT, Philogène B. J. R, Lam J, Waddell T. 1990. In vivo effect of mixtures of allelochemicals on the life cycle of the European corn borer, Ostrinia nubilalis. Entomol Exp Appl 57:17-22.

Bhabra G, Sood A, Fisher B, Cartwright L, Saunders M., dan Evans W. H. 2009. Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. Nat Nanotech4:876-83

[BPS] Badan Pusat Statistika Sumatera Barat. 2016. Produksi Tanaman Buah-buahan dan Sayuran di Sumatera Barat Pada Tahun 2010-2015 [update terakhir Februari 2015].

Cabizza. 2004. Rotenone and rotenoids in cube resins formulations, and residues or olives. J Agric Food Chem 52: 288-293.

Cabras P, Caboni P, Cabras M, Angioni A and Russo M. 2002. Rotenone residues on olives and in olive oil. J Agric Food Chem 50: 2576-2580.

Chou TC, Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regl 22:27-55.

Dadang dan D. Prijono. 2008. Insektisida Nabati: Prinsip, Pemanfaatan, dan Pengembangan. Bogor: Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor.

Dadang, N. Isnaeni dan K. Ohsawa. 2007. Ketahanan dan pengaruh fitotoksik campuran ekstrak *Piper retrofractum* (Piperaceae) and *Annona squamosa* (Annonaceae) pada pengujian semi lapangan. J. HPT Tropika. 7(2): 91 – 99

Djamaan A., Fitra F, Pusmegadewi, Dillasamola D, Asiska P. D and Anthoni A. 2016. Isolation and Identification of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Soil Sample in Tropical Forest of Anai Valley, West Sumatra, Indonesia.

Djojosumarto, P. 2008. Pestisida dan Aplikasinya. Jakarta: Agromedia Pustaka.

Delfel N. E., Tallent W. H., Carlson D. G., and Wolff I. A. 1970. Distribution of rotenone and deguelin in Tephrosia vogelii and separation of rotenoid-rich fractions. J Agric Food Chem 188(3): 385-390.

Duran N. and Marcato P. D. 2013. Nano biotecnology perspectives. Role nanotechnology in the food industry : a review. Int food sci technol. 48(6): 1127-34

Erlina, L. H. 2019. Aktivitas Insektida Sediaan Nanoemulsi *Piper aduncum* dan Efek Fisiologisnya Terhadap Larva *Crocodolomia pavonana* F. (Lepidoptera: Crambidae). [Tesis]. Padang. Program Pascasarja jurusan Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan. Universitas Andalas. 65 hal.

Gaskins M. H, White G. A, Martin F. W, Delfel N. E, Ruppel E. G, Barnes D. K. 1972. *Tephrosia vogelii*: A Source of Rotenoids for Insecticidal and Piscicidal Use. Washington DC: United States Department of Agriculture.

Georghiou G. P. 1983. Management of resistance in arthropods. Di dalam: Georghiou G. P, Saito T, editor. Pest Resistance to Pesticides. New York: Plenum Press. hlm 769-792.

Ghormade V., Deshpande M. V and Paknikar K. M. 2011. Perspectives for nanobiotechnology enabled protection and nutrition of plants. Biotechnol Adv 29(6): 792-803

Gogos, A, Knauer, K and Buchelli T. D. 2012. Nanomaterials in plant protaction and fertilization: current state, foreseen applications and research priorities. J Agric food Chem 60(39): 9781-92

Gonzalez, J. O. W, Gutierrez, M. M, Ferrero A. A., and Band B. F. 2014. Essential oils nanoformulations for stored-product pest control-characterization and biological properties. Chemopshere 100: 130-8

Grainge, M and Ahmed, S. 1988. Handbook of Plants with Pest Control Properties. New York: J Wiley Hagemann, J. W, Pearl M. B, Higgins JJ, Delfel NE, Earle FR. 1972. Rotenone and deguelin in Tephrosia vogelii at several stages of maturity. J Agric Food Chem 20:906-908.

Hollingworth, R. M. 2001. Inhibitors and uncouplers of mitochondrial oxidative phosphorylation. Di dalam: Krieger R, Doull J, Ecobichon D, Gammon D, Hodgson et al., editor. Handbook of Pesticide Toxicology. San Diego (US): Academic Press. 2: 1169-1227

Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid ke-2. Badan Litbang Kehutanan, penerjemah. Jakarta: Yayasan Sarana Warna Jaya. Terjemahan dari: De Nuttige Planten van Ned-Indië.

Higueras L, Lopez-Carballo G, Cerisuello J. P, Gavara R, and Hernandez-Munoz P. 2013. Preparation and Caracterization of chitosan/HP-cylodextrins compositers with hign sorption capacity for carvacrol. Carbohydr Polym 97(2):262-8

Isman MB. 1995. Leads and prospects for the development of new botanical insecticides. Rev Pestic Toxicol 3:1-20.

Isman MB. 2006. Botanical insecticides, deterrents and reppelents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu Rev Entomol 51(1): 45-66

Isman MB. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Prot 19(8-10) : 603-8

InTech Photakamuri UR, Barbosa-Canovas GV. 1995. Fundamental aspect of controlled release in foods. Trends food Sci Techno 6: 397-406

Jensen H. R, Philogene BJR, Arnason JT. 2008. A review of Piper spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. Phytochem Rev 7: 65-75.

Jerobin J, Sureshkumar R. S, Anjali C. H, Mukherjee A, and Chandrasekaran N. 2012. Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. Carbohydr Polym 90(4):1750-6

Keawchaoon, L. and Yoksan R. 2011. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. Colloids Surf B biointerfaces 84(1):163-71

Kohler H. R andTriebskorn R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? Science 341: 759-65

Khot L. R, Sankaran S, Maja J. M, Ehsani R., and Schuster E. W. 2012. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. Crop Prot 35-64-70

Kumar R, Sharon M and Coudhary A. K. 2010. Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. Phytol 2(4).

Lao S. B, Zhang Z. X, Xu H. H, and Ijang G-B. 2010. Novel amphiphilic chitosan derivatives: synthesis, characterization and micellar solubilization of rotenone. Carbohydr Polym 82(4): 1136-42

Lee W. M, Kwak L, and An Y. 2012. Effect of silver nano particles in crop plants Phaseolus radiatus and Sorghum bicolor: media effect on phytotoxicity. Chemosphere 86:491-9

Lim G. O, Jang S. A, and Song K. B. 2010. Physical and antimicrobial properties of gellidium corneum/nano-clay composite film containing grape fruit seed extract or thymol. J food Eng 98(4);415-20

Lina, E. C., Arneti, Djoko, P dan Dadang. 2009. Potensi insektisida melur (*Brucea javanica* L. Merr) dalam mengendalikan hama kubis *Crocidolomia pavonana* (L) (Lepidoptera: Yponomeutidae). J. Natur Indonesia 12(2): 109-116 hal.

Lina, E. C., Dadang, S. Manuwoto, G. Syahbirin and D. Prijono. 2013. Synergistic Action of Mixed Extracts of *Brucea javanica, Piper aduncum* and *Tephrosia vogelli* Against Cabbage Head Caterpillar *Crocidolomia pavonana*. Journal of Biopesticides. 6(1): 77-83.

Lina, E. C., Dadang, Syafrida, M. Dan Gustini, S. 2014. Gangguan fisiologi dan biokimia *Crocidolomia pavonana* (F.) (Lepidotera: Crambidae) akibat perlakuan ekstrak campuran *Tephrosia vogelii* dan *Piper aduncum*. Jurnal Entomologi Indonesia 12 (2): 94-101 hal.

Lina, E. C., Arneti, D. Prijono, Dadang. 2010. Aktifitas Insektisida *Brucea javanica* L. Merr Terhadap Hama Kubis *Crosidolomia pavonana* (Lepidoptera: Crambidae). Departemen proteksi tanaman. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 11(1): 36-39.

Lina, E. C., Dadang, S. Manuwoto, G. Syahbirin. 2016. Gangguan Fisiologis dan Fisikokima *Crocidolomia pavonana* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) Akibat Perlakuan Ekstrak Campuran *Tephrosia vogelii* dan *Piper Aduncum*. Jurnal Entomologi Indonesia 12(2) 94-101.

Lina, E. C., Dadang, S. Manuwoto, G. Syahbirin and D. Prijono. 2013. Synergistic Action of Mixed Extracts of *Brucea javanica, Piper aduncum* and *Tephrosia vogelii* Against Cabbage Head Caterpillar *Crocidolomia pavonana*. Journal of Biopesticides. 6(1): 77-83.

Lin D, Xing B. 2008. Root uptake and phytotoxycity of ZnO nanoparticles. Environ Sci Techno. 42:5580-5 Martin L, Liparoti S, Della Porta G, Adami R, Marques JL, Urieta JS, et al. 2013. Rotenone coprecipitation with biodegradable polymers by supercritical assisted atomizzation. Supercrit Fluids 48-54

Menezes E de LA. 2005. Insecticides botanicos: seus principions ativos.modo de acao e uso agriola. Seropedia; Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia

Metcalf R. L. 1982. Insecticides in pest management. Di dalam: Metcalf RL, Luckman WH, editor. Introduction to Insect Pest Management. Ed ke-2. New York: J Wiley. hlm 217-253.

Miyakado M, Nakayama I, Ohno N. 1989. Insecticidal unsaturated isobutylamides from natural products to agrochemical leads. In Arnason JT, Philogene BJR, Morand P, editor. Insecticides of Plant Origin. Washington DC (US): ACS. Pp 173-187.

Morgan DE, Wilson DI. 1999. Insect hormones and insect chemical ecology. In Barton SD, Nakanishi K, Meth-Cohn O, Mori K, editor. Comprehensive Natural Products Chemistry. Vol 8:264-364. Amsterdam (NL): Elsevier.

Morallo-Rejesus B. 1986. Botanical insecticides against the diamondback moth. http://www.avrdc.orgpdf86dbm86DBM23.pdf [16 Maret 2007].

Muslim, S., Salman, Fitriani, Suharti, N., Erizal, Z., Febriyenti, Aldi, Y. & Akmal, D., 2015. Use of Bioblend Polystyrene/Starch for Coating Urea Granules as Slow Release Fertilizer. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7(11), pp. 478-484

Nailufar, N. 2011. Aktivitas Insektisida Ekstrak Daun *Tephrosia vogelii* (Leguminosae) dan Buah *Piper aduncum* (Piperaceae) terhadap Larva *Crocidolomia pavonana*. [Skripsi]. Bogor. Fakultas Pertanian. Intitut Pertanian. 47 hal.

Perry A. S, Yamamoto I, Ishaaya I, Perry R. Y. 1998. Insecticides in Agriculture and Environment: Retrospects and Prospects. Berlin: Springer-Verlag.

Perlatti B, Bergo Souza, de P. L, Fernandes da Silva M. F, das G, Batista J, Rossi M. 2013.Polymeric nanoparticle-based insecticides: a controlled release purpose for agrochemicals. In: Trdan S, editor. Insectic-Dev safer More Eff Technol.

Prijono D. 1999. Prospek dan strategi pemanfaatan insektisida alami dalam PHT. Di dalam: Nugroho BW, Dadang, Prijono D, editor. Bahan Pelatihan Pengembangan dan Pemanfatan Insektisida Alami, Bogor, 9-13 Agustus 1999. Bogor: Pusat Kajian Pengendalian Hama Terpadu, IPB. Hlm 1-7.

Prijono D. 2002. Pengujian Keefektifan Campuran Insektisida: Pedoman bagi Pelaksana Pengujian Efikasi untuk Pendaftaran Pestisida. Bogor: Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Prijono D. 2006. Peranan pestisida botani dalam pengendalian hama terpadu. Di dalam: Pertemuan Koordinasi Pengembangan Pertanian Ramah Lingkungan & Organik; Bogor, 17-18 Maret 2006. Bogor: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. hlm 1-18.

Risch SJ, Reineccius GA, editors.1995. Encapsulation and controlled realease of food igredients ACS symposium series.p.590

Riyajan S-A, Sakdapipaich JT. 2009. Develophment of a controlled release neem capsule with a sodium alginate matrix, crosslinked by glutaraldehyde and coated with natural rubber. Polym Bull 63(4):609-22

Saryanah NA. 2008. Toksisitas campuran ekstrak *Piper retrofractum* Vahl (Piperaceae) dan *Tephrosia vogelii* Hook. F. (Leguminosae) terhadap larva Crocidolomia pavonana (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) [skripsi]. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Sastrosiswojo, S. and W. Setiawati. 2007. Biology and Control of *Crocidolomia binotalis* in Indonesia. Bandung. Lembang Horticultura Research Institute. 81-87.

SAS Institute. 1990. SAS/STAT User’s Guide, Version 6, Vol 2. 4th ed. Cary (North Carolina): SAS Institute.

Sasson H, Levy-Ruso G, Toledano O, Ishaaya. 2012. Nanosuspensions: emerging nove agro-chemicals formulations. In: Inlshaaya I. Nauen R, Horowitz AR. Editors. Insecticides design usign advanced technologies. Heidelberg: Springer-Verlag. P 1-32 Scott IM,

Sri, S. J, Seethadevi, A., Prabha, K.S., Muthuprasanna, P. & Pavitra, P. 2012. Microencapsulation: A Review. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 3(1): 509-531.

Stephenson G. R. 2003. Pesticide use and world food production: risks and benefits in: Coats R Yamamoto H, editors. Environmental fate and effect of pesticides.853. ACS Symposium Series. P. 261-70. Washington.

Steel R. G. D, Torrie J. H, and Dickey D. A. 1997. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 3rd ed. Boston: McGraw-Hill. Tramon C. 2014.Modelling the controlled release of essential oils froms a polymer matrik-a special case. Indus Crops Product 61:23-30

Stone ND, Makela ME, Plapp FW. 1988. Nonlinear optimization analysis of insecticide mixtures for the control of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). J Econ Entomol 81:989-994.

Tama, D. P. 2019. Nanoemulsi Insektisida Botani Berbahan *Tephrosia vogelii* dan Pengujiannya Terhadap Hama Kubis *Crocidolomia pavonana* F. (Lepidoptera: Crambidae). [Tessis]. Padang. Program Pascasarja jurusan Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan. Universitas Andalas. 57 hal.

Yamashta K, Yosioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki, and M. 2011. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice nature nanotech 6:321-8