

Potensi Campuran *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus (SeNPV) dengan Insektisida Botani untuk Meningkatkan Mortalitas Ulat Bawang *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) di Laboratorium

[Potential Mixtures Between SeNPV with Botanical Insecticides to Increase Larvae Mortality of *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Laboratory]

Luluk Sutji Marhaen¹⁾, Fahmi Aprianto²⁾, Ahsol Hasyim²⁾, dan Liferdi Lukman³⁾

¹⁾ Fakultas Pertanian, Universitas Borobudur Jakarta, Jln. Cipinang Melayu, Makasar, Jakarta Timur, Indonesia 13620

²⁾ Balai Penelitian Tanaman Sayuran, Jln. Tangkuban Parahu No. 517, Lembang, Bandung Barat, Jawa Barat, Indonesia 40391

³⁾ Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Barat, Jln. Kayu Ambon No. 80, Kotak Pos 8495, Lembang, Jawa Barat, Indonesia 40391
E-mail : ahsolhasyim@yahoo.co.id

Naskah diterima tanggal 23 September 2015 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 23 Maret 2016

ABSTRAK. Hama *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) merupakan hama penting pada tanaman bawang di Indonesia. Pengendalian hama ini dengan insektisida kimia sintetik tidak memuaskan, bahkan telah menyebabkan hama menjadi resisten. SeNPV bila diaplikasikan secara tunggal untuk pengendalian hama *S. exigua* hasilnya masih kurang memuaskan. Namun, diharapkan SeNPV bila dicampurkan dengan insektisida botani dapat memberikan hasil yang lebih baik untuk mengendalikan hama *S. exigua*. Penelitian bertujuan mengetahui potensi campuran SeNPV dengan insektisida botani terhadap mortalitas larva *S. exigua* instar 3 di laboratorium. Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Entomologi Balai Penelitian Tanaman Sayuran, Lembang (± 1.250 m dpl.), mulai bulan Juli sampai Oktober 2014. Larva *S. exigua* dikumpulkan dari pertanaman petani bawang merah di daerah Cirebon, Jawa Barat dan diperbanyak di Rumah Kasa Balai Penelitian Tanaman Sayuran. Penelitian dilaksanakan dalam dua tahap kegiatan, yaitu (1) uji pendahuluan dosis SeNPV dan empat jenis ekstrak tumbuhan, yaitu legundi (*Vitex trifolia* Linn.), serai wangi (*Cymbopogon nardus*), daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC), ubi gadung (*Dioscorea hispida*) dan (2) uji campuran beberapa dosis SeNPV dengan dosis *sublethal* dari ekstrak daun legundi (*Vitex trifolia* Linn.). Rancangan percobaan yang digunakan ialah rancangan acak lengkap yang terdiri atas enam perlakuan dan empat ulangan. Mortalitas larva *S. exigua* diamati mulai 24 jam sampai dengan 168 jam setelah perlakuan. Data mortalitas larva diolah menggunakan analisis probit untuk menetapkan nilai LC_{50} . Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai LC_{50} SeNPV sebesar 424,67 ppm dan dari empat ekstrak insektisida botani yang terendah diperoleh dari insektisida daun legundi, yaitu 2.199, 277 ppm. Berdasarkan nilai LC_{50} campuran SeNPV dengan insektisida botani daun legundi menunjukkan efektivitas sinergistik dan meningkatkan efikasi 12,24 kali lipat jika dibandingkan dengan SeNPV secara tunggal. Kombinasi SeNPV dengan ekstrak daun legundi konsentrasi *sublethal* dapat meningkatkan efikasi virus SeNPV dalam mengendalikan *S. exigua*.

Kata kunci: *Spodoptera exigua*; SeNPV; *Vitex trifolia*; Sinergisme; Mortalitas larva

ABSTRACT. The beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) is a serious pest of shallot in Indonesia. Chemical methods have failed to control this pest as this has developed resistance to almost all synthetic insecticides available. SeNPV effectiveness when applied singly for *S. exigua* result is still unsatisfactory, but it is expected when SeNPV mixed with botanical insecticides give satisfactory result to control *S. exigua*. The aim of the study was to determine the potential of SeNPV with botanical insecticides to control third instars of *S. exigua* larvae under laboratory condition. This study has been conducted at Indonesian Vegetables Research Institute Lembang ($\pm 1,250$ m asl), from July to October 2014. Sample of *S. exigua* larvae were collected from farmers' field in Cirebon, West Java and mass production done in a screen house. Two bioassay steps were performed i.e. (1) preliminary test of SeNPV doses and botanical insecticides doses of extract of *Vitex trifolia* leaves, extract of Citronelol leaves (*Cymbopogon nardus*), extract of kaffir lime leaves (*Citrus hystrix* DC), extract of *Dioscorea hispida* tuber and (2) the combination of several doses of SeNPV and sublethal doses of extract of *Vitex trifolia* leaves. The experimental design used completely randomized design consist of six treatments and four replications. Mortality of *S. exigua* larvae was observed at 24 hours after exposures and repeatedly every 24 hours up to 168 hours of exposures. The mortality data was analyzed using probit analysis to determine the LC_{50} values. The analysis showed that the LC_{50} value of the lowest SeNPV is 424,67 ppm, and from four extracts botanical insecticide the lowest LC_{50} derived from extract of *Vitex trifolia* leaves namely 2,199, 277 ppm. Based on LC_{50} value of SeNPV mix with extract of *Vitex trifolia* leaves demonstrate the effectiveness of the synergistic and 12.24 fold increased their efficacy when compared to SeNPV singly. SeNPV in combination with sublethal concentration of extract of *Vitex trifolia* leaves can be increasing the efficacy of SeNPV in controlling *S. exigua*.

Keywords: *Spodoptera exigua*; SeNPV; *Vitex trifolia*; Sinergism; Larvae mortality

Spodoptera exigua (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) merupakan hama yang menyerang tanaman bawang mulai dari fase vegetatif sampai saat panen.

Kehilangan hasil akibat serangan hama ini berkisar antara 34–54% (Setiawati et al. 2014), dan pada serangan berat dapat menyebabkan kehilangan hasil

hingga 100% bila tidak dikendalikan (Supyani *et al.* 2014). Pengendalian hama ulat bawang yang dilakukan petani hingga saat ini bertumpu pada penggunaan insektisida kimia. Lebih dari 90% petani di daerah Brebes, dalam aplikasi insektisida kimia di lapangan menggunakan dosis dan volume semprot yang tidak sesuai dengan anjuran. Di samping itu untuk mengendalikan hama *S. exigua* tersebut petani juga menggunakan campuran 2–5 jenis insektisida yang berbeda dengan interval penyemprotan yang relatif singkat, yaitu 2–3 kali seminggu (Moekasan 2004, Moekasan & Basuki 2007, Setiawati *et al.* 2014). Meskipun petani sudah berusaha meningkatkan dosis, jenis insektisida, dan frekuensi aplikasi insektisida, namun populasi ulat bawang di lapangan masih tetap sulit dikendalikan.

Secara ekologis penggunaan insektisida yang tidak bijaksana dapat merusak keseimbangan agroekosistem dan pencemaran lingkungan. Penggunaan insektisida sintetik terus menerus telah menyebabkan populasi hama ulat bawang *S. exigua* menjadi resisten (Brewer & Trumble 1994, Kerns *et al.* 1998, Moekasan & Basuki 2007, Saeed *et al.* 2012, Che *et al.* 2013, Tabashnik *et al.* 1987, Tabashnik *et al.* 2003), residu pestisida, resurgensi, pencemaran lingkungan, dan membunuh serangga berguna seperti musuh alami dan serangga penyerbuk (Frank *et al.* 1990).

Teknologi pengendalian hama ramah lingkungan merupakan cara alternatif pengendalian yang dapat menekan dampak negatif terhadap lingkungan dan lebih mengarah pada penggunaan produk hayati (Hasyim *et al.* 2015). Penggunaan produk hayati yang mempunyai prospek untuk dikembangkan ialah memanfaatkan berbagai senyawa kimia alami yang berasal dari tumbuhan yang mengandung racun bagi serangga hama (insektisida botani) (Schmutterer 1990, Musabyimana *et al.* 2001), dan virus ulat bawang, *Spodoptera exigua Nucleopolyhedrovirus* (SeNPV) (Moscardi 1999, Khatlab 2013, Smith & Vlak 1988).

Insektisida botani dapat diterapkan dalam pengendalian hama terpadu (PHT) karena insektisida ini umumnya cukup aman bagi musuh alami hama, kompatibel dengan pengendalian hama lainnya, mudah terurai di lingkungan sehingga tidak dikhawatirkan akan meninggalkan efek residu yang mengandung racun (Isman 1995, Kabar & Gichia 2001, Scott *et al.* 2003, Feng & Isman 1995, Leatemia & Isman 2004, Rembold 1984, Khater 2012). Insektisida botani diharapkan dapat mengurangi dampak negatif penggunaan insektisida sintetik. Insektisida botani merupakan bahan insektisida yang terdapat secara alami di dalam bagian tertentu dari tanaman, seperti pada akar, daun, batang atau buah. Bahan-bahan ini diolah menjadi berbagai sediaan sumber insektisida.

Spodoptera exigua Nucleopolyhedrovirus (SeNPV) merupakan salah satu agens hayati yang cukup efektif untuk mengendalikan hama ulat bawang. *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) dapat menginfeksi serangga inang bila polihedra termakan oleh serangga inang melalui pakan yang terkontaminasi (Vasconcelos *et al.* 2002, Smith & Vlak 1988, Lasa *et al.* 2007). *Nucleopolyhedrovirus* merupakan salah satu jenis virus patogen yang mempunyai potensi untuk digunakan sebagai agens hayati pengendalian hama. Virus tersebut bersifat spesifik sehingga tidak mengganggu perkembangan parasitoid dan predator serta dapat diaplikasikan dengan mudah dan murah. Moekasan (2004), melaporkan bahwa penggunaan ekstrak kasar 15 larva *S. exigua* terinfeksi SeNPV/1 air yang mengandung virus sebanyak $4,45 \times 1.010$ PIBs/ml, efektif terhadap *S. exigua* pada tanaman bawang merah.

Salah satu kelemahan SeNPV ialah cara kerjanya yang lambat dan efikasinya sering di bawah insektisida kimia sehingga kerusakan tanaman yang ditimbulkan oleh serangga hama masih tetap tinggi. Salah satu cara untuk mengatasi hal tersebut ialah melakukan pencampuran SeNPV dengan insektisida botani. Pencampuran atau kombinasi antara SeNPV dengan insektisida botani dapat menimbulkan efek sinergistik, antagonistik, atau netral. Jika bahan kimia atau insektisida tersebut mempunyai kemampuan untuk meningkatkan daya racun insektisida maka efek tersebut dinamakan sinergistik (Wang *et al.* 2006, Chatterjee 2005). Sebaliknya, jika bahan campuran menurunkan pengaruh daya racun insektisida tersebut maka dinamakan efek antagonistik dan jika bahan campuran tersebut tidak berpengaruh terhadap daya racun insektisida bersangkutan maka efeknya dinamakan netral. Campuran insektisida mikrob yang mengandung bahan aktif *B. thuringiensis* dengan insektisida kimia pada konsentrasi yang rendah (*sublethal*) memberikan efek sinergistik, yaitu meningkatnya daya kerja racun *B. thuringiensis*. Pencampuran *Spodoptera litura Nuclear Polyhedrosis Virus* (SINPV) pada dosis 5×1.011 PIBs/ha mengakibatkan kematian larva *S. litura* instar IV sekitar 64%, tetapi apabila dicampur dengan insektisida monokrotofos 1 l/ha, efikasi SINPV meningkat sebesar 82% (Arifin 1988). Campuran antara *B. thuringiensis* dengan insektisida pyrethroid dan mempunyai efek sinergistik dan efektif terhadap larva *H. armigera* (Duraimurugan & Regupathy 2005). Berdasarkan hal tersebut, diduga pencampuran SeNPV dengan insektisida botani akan meningkatkan mortalitas larva *S. exigua*. Untuk membuktikan hipotesis tersebut, diperlukan penelitian laboratorium mengenai pengaruh pencampuran SeNPV dengan beberapa ekstrak insektisida botani terhadap mortalitas larva *S. exigua*.

Penelitian ini bertujuan mengetahui efikasinya dan tenggang waktu membunuh campuran SeNPV dengan beberapa insektisida botani terhadap larva *S. exigua*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Percobaan dilaksanakan sejak bulan Juli sampai Oktober 2014 di Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Sayuran, Lembang, Bandung Barat (± 1.250 m dpl.). Pengujian dilakukan dalam dua tahap. Pengujian tahap pertama bertujuan menentukan pengaruh daya racun SeNPV dan ekstrak insektisida botani dari empat jenis tumbuhan, yaitu daun legundi (*Vitex trifolia* Linn.), daun serai wangi (*Cymbopogon nardus*), daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC), dan ubi gadung (*Dioscorea hispida*), secara tunggal terhadap mortalitas larva *S. exigua*. Pengujian tahap kedua bertujuan untuk menentukan pengaruh daya racun campuran SeNPV dengan ekstrak insektisida botani dari tumbuhan legundi (*Vitex trifolia* Linn.), serai wangi (*Cymbopogon nardus*), daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC), dan ubi gadung (*Dioscorea hispida*) dengan dosis *sublethal* terhadap mortalitas larva *S. exigua*. Pengaruh daya racun insektisida secara tunggal dan campuran masing-masing insektisida yang diuji terhadap larva *S. exigua* tersebut dihitung dengan cara menetapkan nilai LC_{50} (Busvine 1971). Pengambilan kesimpulan dihitung dengan cara menetapkan nilai nisbah sinergistik (NS) (*synergistic ratio* = SR) berdasarkan rumus yang dikemukakan oleh Hamilton & Attia (1977), yaitu sebagai berikut:

$$NS = \frac{LC_{50} \text{ insektisida secara tunggal}}{LC_{50} \text{ insektisida campuran}}$$

Keterangan:

NS = Nisbah sinergistik, NS > 1, campuran tersebut mempunyai efek sinergistik

NS = 1, campuran tersebut tidak mempunyai efek sinergistik (netral)

NS < 1, campuran tersebut mempunyai efek antagonistik

Sampel larva *S. exigua* diperoleh dari pertanaman bawang merah milik petani dari Desa Pabedilan, Cirebon. Selanjutnya larva tersebut diperbanyak di Rumah Kasa Balai Penelitian Tanaman Sayuran. Larva *S. exigua* yang digunakan pada percobaan ini ialah instar ke-2 atau instar ke-3 hasil perbanyakannya. Penetapan daya racun insektisida (nilai LC_{50}) yang diuji terhadap larva *S. exigua* menggunakan metode pencelupan (*dipping method*) sesuai dengan metode yang digunakan oleh Hamilton & Attia (1977).

Pelaksanaan Percobaan

Penyiapan Virus SeNPV

Isolat SeNPV diperoleh dari koleksi Balitsa dan diperbanyak dengan cara diinfeksi pada ulat *S. exigua* yang masih hidup. Diambil ulat yang mati terinfeksi SeNPV sebanyak 2 g, lalu digerus di atas mortal sampai halus, kemudian diencerkan dengan akuades sebanyak 1.000 ml, di tambah agistik 0,5 ml/l sehingga diperoleh larutan SeNPV dengan konsentrasi sebesar 2.000 ppm.

Penyediaan Tanaman

Bawang merah dan kubis untuk keperluan percobaan diperoleh dari tanaman yang ditanam pada polibag tanpa pemberian insektisida maupun fungisida. Tanaman bawang merah ditanam di dalam rumah kaca untuk menekan gangguan hama dan penyakit. Tanaman kubis tersebut digunakan sebagai pakan larva *S. exigua* yang akan diuji di laboratorium. Daun kubis digunakan sebagai pakan uji pengganti daun bawang merah, karena daun bawang merah mudah layu. Selain itu sulit mengamati larva *S. exigua* yang sering masuk ke dalam daun bawang merah. Tanaman kubis ditanam dalam polibag sebanyak 50 buah.

Pembuatan Ekstrak Insektisida Botani

Daun tumbuhan dipotong-potong/dihancurkan kemudian dibiarkan kering udara tanpa terkena cahaya matahari langsung. Setelah kering masing-masing bagian tanaman tersebut digiling dengan menggunakan alat *grinder*. Bahan tumbuhan yang sudah menjadi serbuk siap untuk diekstrak. Lebih kurang 500 g serbuk dari tiap tanaman dimasukkan ke dalam *baker glass* lalu direndam dalam 2.500 ml larutan metanol selama minimal 24 jam. Selanjutnya cairan ekstrak disaring menggunakan corong kaca (diameter 9 cm) beralaskan kertas saring. Hasil saringan ditampung di dalam labu penguap, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 45°C dan tekanan 337 mbar. Ekstrak yang sudah dievaporasi dipanaskan dalam *waterbath* dengan suhu 50°C hingga semua pelarut hilang dan ekstrak yang diperoleh dalam bentuk gel. Ekstrak dalam bentuk gel yang diperoleh disimpan di dalam lemari es pada suhu $\pm 4^\circ\text{C}$ sampai digunakan untuk pengujian. Untuk mengetahui komposisi senyawa yang terkandung dalam ekstrak insektisida botani telah dilakukan analisis GC-MS di Laboratorium Doping Departemen Kesehatan Jakarta Pusat.

Uji pendahuluan SeNPV dan Insektisida Botani Secara Tunggal

Uji pendahuluan SeNPV dan insektisida botani ekstrak yang berasal dari daun legundi, serai wangi, jeruk purut, dan ubi gadung secara tunggal dimaksudkan

untuk mengetahui nilai LC_{50} dan LT_{50} terendah dari beberapa insektisida botani tersebut sebelum dilakukan uji pencampuran dengan SeNPV. Konsentrasi yang diuji untuk mencari LC_{50} SeNPV ialah 2.000 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, dan 250 ppm serta kontrol (akuades). Selanjutnya konsentrasi yang digunakan untuk ekstrak yang berasal dari daun legundi, serai wangi, jeruk purut, dan ubi gadung, yaitu 4.000 ppm, 2.000 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, dan kontrol (akuades).

Pengujian campuran

Konsentrasi formulasi masing-masing campuran insektisida yang diuji ialah konsentrasi *sublethal* atau nilai di bawah nilai LC_{50} insektisida secara tunggal yang diperoleh pada pengujian pendahuluan. Penetapan daya racun insektisida (nilai LC_{50}) yang diuji terhadap larva *S. exigua* menggunakan metode pencelupan daun menurut Balfas & Willis (2009) dengan langkah kerja sebagai berikut:

- Dibuat kombinasi campuran SeNPV dengan ekstrak insektisida botani dengan konsentrasi formulasi SeNPV *sublethal* secara serial (batas atas ialah setengah nilai LC_{50} hasil pengujian pendahuluan)
- Selanjutnya pada konsentrasi formulasi SeNPV *sublethal* secara serial tersebut ditambahkan ekstrak insektisida botani dengan konsentrasi formulasi *sublethal* yang konstan hasil pengujian pendahuluan
- Formulasi campuran SeNPV dengan ekstrak insektisida botani, dilarutkan dalam akuades, kemudian ditambah dengan perata agristik (konsentrasi 0,5 ml/l). Kontrol hanya menggunakan larutan akuades dan agristik. Potongan daun kubis bebas insektisida dengan ukuran 5 cm x 5 cm dicelupkan ke dalam larutan campuran SeNPV dengan insektisida botani selama 10 detik kemudian ditiriskan dan selanjutnya dibiarkan kering di udara
- Potongan daun kubis yang telah dikeringanginkan tersebut dimasukkan ke dalam cawan plastik yang telah diberi alas kertas saring halus
- Ke dalam cawan plastik tersebut dimasukkan 10 ekor larva *S. exigua* instar ke-3 yang telah dipuasakan terlebih dahulu selama 24 jam
- Penelitian campuran beberapa dosis SeNPV dengan dosis *sublethal* dari ekstrak insektisida botani. Rancangan percobaan yang digunakan ialah rancangan acak lengkap yang terdiri atas enam perlakuan dan empat ulangan. Macam perlakuan ialah sebagai berikut: A_1-A_5 = lima serial konsentrasi SeNPV dan konsentrasi

sublethal ekstrak insektisida botani terpilih, A_6 = kontrol.

Pengamatan

Variabel yang diamati ialah:

- Mortalitas larva *S. exigua*

Jumlah larva *S. exigua* yang mati dihitung pada 24, 48, 72, 96, 120, 144, dan 168 jam setelah perlakuan, persentase mortalitas tersebut dihitung dengan menggunakan rumus:

$$P = \frac{r}{n} \times 100\%$$

Keterangan:

P = Persentase banyaknya larva yang mati

r = Larva yang mati setelah perlakuan

n = Jumlah larva yang diuji

Bila sampai batas waktu 72 jam tidak terjadi kematian, berarti insektisida yang diuji tidak efektif. Apabila terdapat kematian pada kontrol (tidak lebih dari 20%) maka dilakukan perhitungan menggunakan rumus Abbot (Busvine 1971) sebagai berikut:

$$Pt = \frac{Po - Pc}{100 - Pc} \times 100\%$$

Keterangan:

Pt = Persentase banyaknya larva yang mati setelah dikoreksi

Po = Persentase banyaknya larva yang mati pada perlakuan

Pc = Persentase banyaknya larva yang mati pada kontrol

- Nisbah sinergistik (NS). Perhitungannya sesuai dengan percobaan pertama

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh perlakuan SeNPV, ekstrak daun legundi, ekstrak serai wangi, ekstrak jeruk purut, dan ekstrak ubi gadung secara tunggal terhadap persentase mortalitas larva *S. exigua* pada 168 jam setelah perlakuan disajikan pada Tabel 1.

Pada kontrol umumnya terdapat larva *S. exigua* yang mati sehingga persentase mortalitas larva *S. exigua* harus dikoreksi menggunakan rumus Abbott (Busvine 1971). Mortalitas larva *S. exigua* yang disebabkan oleh SeNPV tertinggi diperoleh pada konsentrasi 2.000 ppm ialah 80,31%, sedangkan persentase mortalitas *S. exigua* yang disebabkan Oleh insektisida

Tabel 1. Mortalitas larva *S. exigua* pada 168 jam setelah perlakuan SeNPV dan beberapa jenis insektisida botani (Mortality of *S. exigua* larvae at 168 hours after exposure of SeNPV and several botanical insecticides)

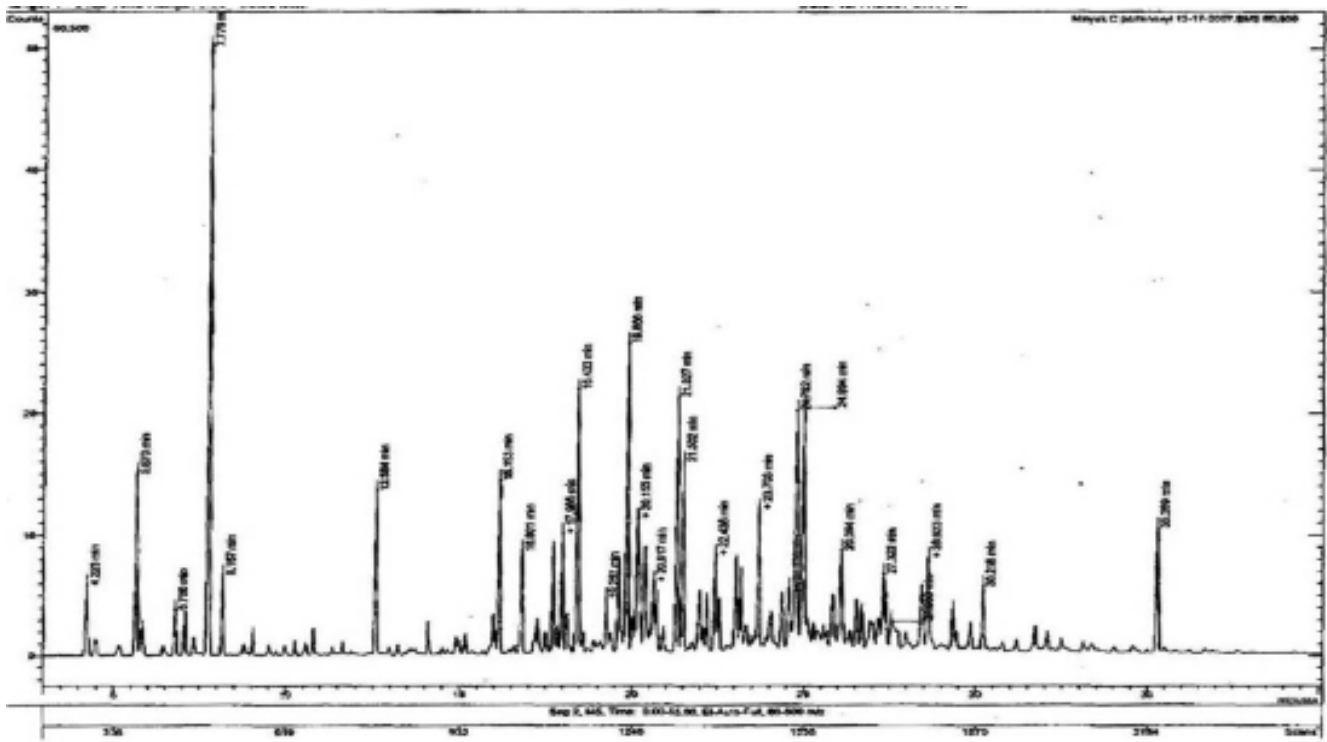
Perlakuan (Treatments)	Konsentrasi formulasi insektisida (Insecticide formulation), ppm	Mortalitas larva <i>S. exigua</i> (Mortality of <i>S. exigua</i> larvae), %	Mortalitas terkoreksi (Corrected mortality), %
SeNPV	2.000	81,50	80,31
	1.000	77,50	76,92
	500	55,00	53,85
	250	27,50	25,64
	125	22,50	20,51
	0	2,50	-
Ekstrak daun legundi (Extract of <i>Vitex trifolia</i> leaves)	5.000	72,50	71,54
	4.000	57,50	69,41
	3.000	45,00	63,59
	2.000	40,00	48,46
	1.000	32,50	30,77
	0	2,50	-
Ekstrak daun serai wangi (Extract of <i>Citronelol</i> leaves, <i>C. nardus</i>)	5.000	70,00	64,97
	4.000	55,00	53,85
	3.000	42,50	41,03
	2.000	37,50	35,90
	1.000	27,50	25,64
	0	2,50	-
Ekstrak daun jeruk purut (Extract of <i>kaffir lime</i> leaves, <i>Citrus hystrix</i>)	5.000	67,00	65,72
	4.000	42,50	41,03
	3.000	37,50	35,90
	2.000	32,50	30,77
	1.000	20,00	17,95
	0	2,50	-
Ekstrak ubi gadung (Extract of <i>gadung tuber</i> , <i>Dioscorea hispida</i>)	5.000	71,50	68,41
	4.000	47,50	46,15
	3.000	40,00	38,46
	2.000	35,00	33,33
	1.000	25,00	23,08
	0	2,50	-

botani pada konsentrasi 5.000 ppm dari ekstrak daun legundi, ekstrak serai wangi, ekstrak ubi gadung, dan ekstrak jeruk purut berturut-turut ialah 71,54%, 64,97%, 65,72%, dan 68,41%. Adanya perbedaan nilai toksisitas di antara insektisida yang diuji terhadap *S. exigua* disebabkan oleh perbedaan bahan aktif dan mekanisme kerja. Mortalitas larva *S. exigua* yang paling rendah disebabkan insektisida botani dari ekstrak serai wangi dan jeruk purut. Hal ini mungkin disebabkan oleh kandungan kimia insektisida botani serai wangi dan jeruk purut yang dapat mematikan larva relatif rendah. Jeruk purut mengandung senyawa limonoid yang merupakan teranoriterpen (Hasyim et al. 2014, Kasuan et al. 2013) berpotensi sebagai *antifeedant* (penghambat makan) terhadap serangga, zat pengatur tumbuh, dan zat toksik pada kutu beras, larvasida, anti mikrob, penolak serangga (*repellent*), dan penghambat reproduksi (Palacios et al. 2009). Selanjutnya Kasuan et al. (2013) menyatakan bahwa kandungan utama minyak jeruk purut ialah sabinene, β -pinene, limonene, α -pinene, camphene, myrcene, terpinen-4-ol, α -terpineol, linalool, terpinolene, dan citronelol. Minyak serai wangi diketahui mengandung citronelol, geraniol, dan citronelol. Senyawa citronelol yang terdapat pada minyak serai wangi berperan

sebagai bahan insektisida yang bekerja sebagai *antifeedant* dan *repellent* (pengusir dan penolak serangga) (Hasyim et al. 2010, Pinheiro et al. 2013, Thein et al. 2013).

Insektisida botani yang berasal dari daun legundi dapat mematikan larva *S. exigua* yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan insektisida botani yang berasal dari ekstrak serai wangi, ubi gadung, dan jeruk purut. Tingginya kematian larva *S. exigua* yang disebabkan oleh ekstrak daun legundi mungkin disebabkan karena ekstrak daun legundi mengandung dihydrosolidgenone abietatriene dan flavonoid. Secara umum, interpretasi data *GC-MS* menunjukkan bahwa daun legundi mengandung senyawa l-d-pinene casticin, luteolin, isoorientin, α -pinene, linalool, terpinyl acetate, β -caryophylline, caryophylline oxide, 5-methyl artemitin, β -sitosterol, vitetrifolins, dihydrosolidgenone abietatriene, vitetrifolin A, limonene, humulene oxide, α -humulemne, 20 hydroxycdysone, ecdysteroids, flavonoids, lignans, triterpenoids, iridoids, vitexin, dan β -sitosterols (Gambar 1).

Rose & Cathrine (2011) secara rinci menyatakan bahwa ekstrak minyak legundi memiliki senyawa bioaktif seperti sapanoid, alkaloids, steroids, flavonoids,



Gambar 1. GC- MS ekstrak daun legundi, *V. trifolia* (GC-MS chromatograms of extract of *V. trifolia* leaves)

aminoacids, phenols, quiones, dan pati. Ekstrak daun legundi dapat membasmi jentik nyamuk dengan cara kerja mirip bubuk Abate. Pada beberapa penelitian yang telah dilakukan, saponin dan alkaloid memiliki cara kerja sebagai racun perut dan menghambat kerja enzim kolinesterase pada larva, sedangkan flavonoid dan minyak atsiri berperan sebagai racun pernapasan sehingga menyebabkan kematian larva (Asikin 2012, Hasyim *et al.* 2014). Hasil penelitian Geetha *et al.* (2004) menyatakan bahwa kandungan utama ekstrak daun *Vitex trifolia* ialah saponins, tannins, flavonoids, dan glycosides.

Guna mengetahui toksisitas SeNPV dan insektisida botani terhadap serangga hama dilakukan dengan cara mengetahui nilai LC₅₀ dan nilai LT₅₀. Nilai LC₅₀ adalah konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian 50% dari populasi organisme dalam serangkaian kondisi percobaan yang telah ditentukan. Hasil penghitungan nilai LC₅₀ SeNPV dan insektisida botani dari ekstrak daun legundi, serai wangi, jeruk purut, dan ubi gadung secara tunggal terhadap larva *S. exigua* pada 168 jam

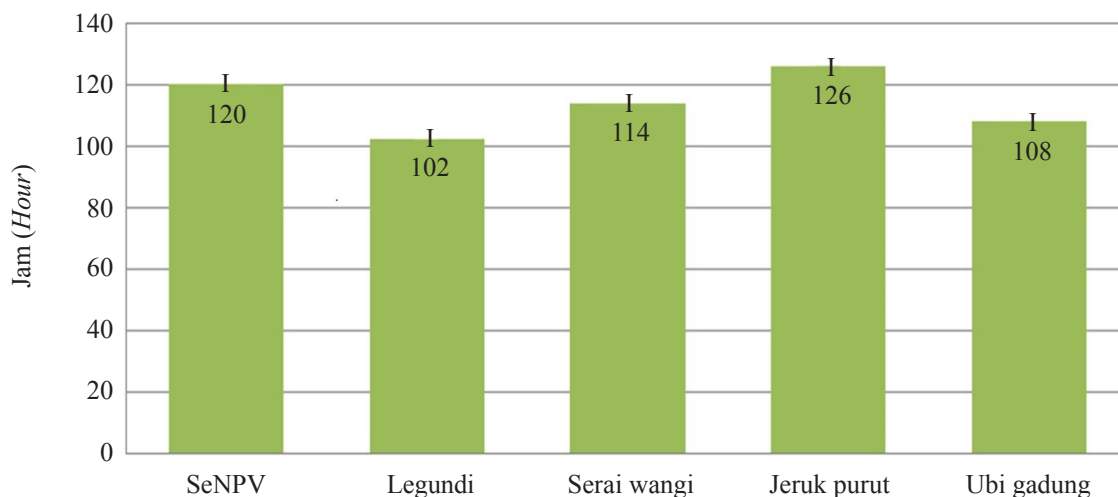
setelah perlakuan disajikan pada Tabel 2. Nilai LC₅₀ terendah diperoleh pada perlakuan SeNPV, yaitu 424,670 ppm, sedangkan nilai LC₅₀ tertinggi ialah pada perlakuan jeruk purut, yaitu 5.704,715 ppm.

Adanya perbedaan nilai toksitas di antara perlakuan yang diuji terhadap *S. exigua* disebabkan oleh perbedaan bahan aktif dan mekanisme kerja. Semakin kecil nilai LC₅₀ bahan insektisida atau insektisida botani tersebut maka bahan tersebut semakin beracun. Selanjutnya perlu juga diketahui nilai LT₅₀, yaitu waktu (dalam jam atau hari) yang dibutuhkan untuk mematikan 50% serangga uji dalam kondisi tertentu. Pada Gambar 2 terlihat bahwa nilai LT₅₀ pada konsentrasi tertinggi SeNPV (2.000 ppm), yaitu 120 jam setelah perlakuan, sedangkan nilai LT₅₀ insektisida botani pada konsentrasi tertinggi ekstrak daun legundi (5.000 ppm), yaitu 102 jam.

Berdasarkan hasil analisis perlakuan beberapa insektisida botani yang diuji secara tunggal terhadap larva *S. exigua*, terlihat bahwa nilai LC₅₀ dan LT₅₀ terendah diperoleh pada ekstrak daun legundi, yaitu

Tabel 2. Toksisitas SeNPV dan ekstrak insektisida botani terhadap larva *S. exigua* melalui uji makanan (Toxicity by SeNPV and plant extracts of botanical insecticides against *S. exigua* larva through leaf dipping method)

Perlakuan (Treatments)	Nilai LC ₅₀ (LC ₅₀ value), ppm
SeNPV	424,670
Ekstrak daun legundi (Extract of <i>V. trifolia</i> leaves)	2.199,277
Ekstrak daun serai wangi (Extract of <i>Citronelol</i> leaves, <i>C. nardus</i>)	4.650,097
Ekstrak daun jeruk purut (Extract of <i>kaffir lime</i> leaves, <i>Citrus hystrix</i>)	5.704,715
Ekstrak ubi gadung (Extract of <i>gadung tubers</i> , <i>Dioscorea hispida</i>)	3.853,576



Gambar 2. Perbandingan LT_{50} dari SeNPV dan empat jenis insektisida botani secara tunggal terhadap larva *S. exigua* (Comparison of lethal times (LT_{50}) of SeNPV and extract of four botanical insecticides singly against larva of *S. exigua*)
SeNPV 2.000 ppm, legundi 5.000 ppm, serai wangi 5.000 ppm, jeruk purut 5.000 ppm, dan ubi gadung 5.000 ppm

Tabel 3. Pengaruh efikasi SeNPV tunggal dan campuran SeNPV dengan ekstrak daun legundi, *V. trifolia* mortalitas larva *S. exigua* (Effect SeNPV singly and binary mixtures of SeNPV with extract of *V. trifolia* leaves on *S. exigua* larvae mortality)

Perlakuan (Treatments)	Persentase mortalitas larva <i>S. exigua</i> pada (Percentage of mortality of <i>S. exigua</i> larvae at), JSA(HA)*						
	24	48	72	96	120	144	168
A1	5,00 a	15,00 a	42,50 a	67,50 a	75,00 a	77,50 a	85,00 a
A2	5,00 a	10,00 ab	32,50 ab	57,50 a	65,00 a	67,50 a	72,50 a
A3	2,50 a	10,00 ab	27,50 ab	47,50 a	52,50 ab	60,00 ab	62,50 b
A4	0,00 a	5,00 bc	17,50 b	27,50 b	40,00 bc	45,00 bc	45,00 bc
A5	0,00 a	5,00 bc	17,50 b	22,50 b	32,50 c	35,00 c	40,00 c
A6	0,00 a	0,00 c	0,00 c	2,50 c	2,50 d	2,50 d	2,50 d
KK (CV), %	6,76	7,57	14,67	19,27	21,57	20,35	10,12

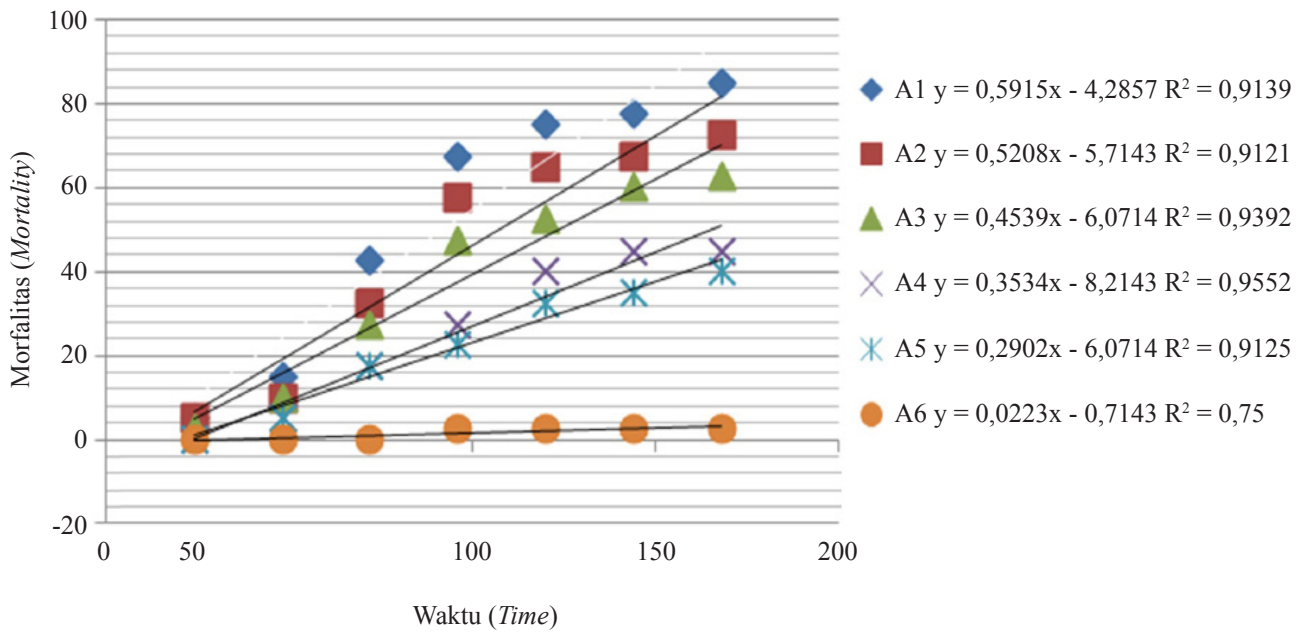
Angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf yang berbeda tidak berbeda nyata pada uji DMRT taraf 5% (Mean followed by the same letters are not significantly different according to DMRT at $\alpha = 0.05$), JSA= (jam setelah aplikasi, HA= hour after application) A₁= SeNPV 250 ppm + legundi 2.000 ppm, A₂= SeNPV 125 ppm + legundi 2.000 ppm, A₃= SeNPV 62,50 ppm + legundi 2.000 ppm, A₄= SeNPV 31,25 ppm + legundi 2.000 ppm, A₅= SeNPV 15,625 ppm + legundi 2.000 ppm, A₆= kontrol

sebesar 2.199,277 ppm dan nilai LT_{50} pada pestisida nabati ekstrak daun legundi, yaitu pada 102 jam setelah perlakuan.

Penggunaan berbagai konsentrasi campuran SeNPV dengan insektisida botani ekstrak daun legundi terhadap larva *S. exigua* memberikan pengaruh nyata terhadap persentase mortalitas larva *S. exigua* (Tabel 3). Hasil analisis statistik secara umum menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi campuran SeNPV dengan ekstrak daun legundi maka semakin tinggi persentase mortalitas *S. exigua* seiring dengan bertambahnya waktu setelah perlakuan. Pada 24 jam setelah perlakuan campuran SeNPV dengan ekstrak daun legundi masih tampak persentase mortalitas larva *S. exigua* yang relatif rendah. Hal ini diduga karena kandungan bahan aktif yang terdapat pada SeNPV

dan ekstrak daun legundi tidak dapat memperlihatkan reaksi secara cepat, tetapi membutuhkan waktu beberapa jam.

Pada pengamatan 48 jam sampai 168 jam setelah perlakuan terlihat adanya peningkatan persentase mortalitas larva *S. exigua*. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan A₁ (SeNPV 250 ppm + ekstrak daun legundi 2.000 ppm) setelah 168 jam perlakuan dapat membunuh larva *S. exigua* paling tinggi (85%) dibandingkan perlakuan A₅ dan A₆, namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan A₂ dan A₃. Tingginya kematian larva *S. exigua* pada perlakuan A₁ karena disebabkan konsentrasi campuran SeNPV dengan ekstrak daun legundi lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan A₂, A₃, A₄, dan A₅.



Gambar 3. Laju mortalitas larva *S. exigua* setelah diperlakukan dengan berbagai konsentrasi campuran ekstrak daun legundi dengan SeNPV (*Spodaptera exigua* larvae mortality rate after treatment of binary mixtures between extract of *V. trifolia* leaves at different concentration with SeNPV)

A₁ = SeNPV 250 ppm + legundi 2.000 ppm, A₂ = SeNPV 125 ppm + legundi 2.000 ppm, A₃ = SeNPV 62,50 ppm + legundi 2.000 ppm, A₄ = SeNPV 31,25 ppm + legundi 2.000 ppm, A₅ = SeNPV 15,625 ppm + legundi 2.000 ppm, A₆ = kontrol.

Tabel 4. Toksisitas campuran SeNPV dan ekstrak daun legundi terhadap larva *S. exigua* melalui uji makanan dan nisbah sinergis (*Toxicity by binary mixtures between extract of V. trifolia leaves with SeNPV against S. exigua larva through leaf dipping method and their synergistic ratio*)

Perlakuan (Treatments)	LC ₅₀ (ppm)*	Nisbah sinergistik (Synergistic ratio)
SeNPV	424,670	-
Ekstrak daun legundi (Extract of <i>V. trifolia</i> leaves)	2.199,277	-
SeNPV+ Ekstrak daun legundi (SeNPV + extract of <i>V. trifolia</i> leaves)	34,685	12,24

* Hasil analisis probit (*Probit analysis result*)

Pada pengamatan 96 jam setelah perlakuan, tingkat persentase mortalitas larva semakin tinggi. Hal ini terlihat pada perlakuan konsentrasi A₁ yang mencapai 67,50% dengan waktu kurang dari 96 jam, selanjutnya pada pengamatan 120 jam setelah perlakuan mencapai 75% dan mortalitas larva *S. exigua* terus meningkat seiring dengan bertambahnya waktu setelah perlakuan hingga dapat mencapai 85% setelah 168 jam setelah perlakuan. Laju mortalitas larva *S. exigua* pada berbagai konsentrasi campuran SeNPV dengan ekstrak daun legundi pada pengamatan 24 sampai 168 jam dapat dilihat pada Gambar 3.

Perbedaan persentase mortalitas larva *S. exigua* dipengaruhi karena adanya perbedaan konsentrasi campuran SeNPV dan ekstrak legundi. Banyaknya konsentrasi campuran yang dicelupkan SeNPV dan ekstrak legundi pada pakan mengakibatkan tubuh larva tidak mampu bertahan dari serangan patogen dan

insektisida botani. Perbedaan banyaknya konsentrasi tersebut memengaruhi lamanya mekanisme kerja dari insektisida botani tersebut pada tubuh serangga yang pada akhirnya menyebabkan kematian. Dari hasil analisis terlihat bahwa perlakuan SeNPV 250 ppm + ekstrak daun legundi 2.000 ppm dapat membunuh larva *S. exigua* lebih cepat dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi campuran lainnya.

Hasil penelitian awal menunjukkan bahwa perlakuan SeNPV dengan konsentrasi 250 ppm dan ekstrak legundi dengan konsentrasi 2.000 ppm yang diaplikasikan masing-masing secara tunggal ternyata hanya dapat mematikan larva *S. exigua* berturut-turut sebesar 25,64% dan 38,46% (Tabel 4). Jika SeNPV dengan konsentrasi 250 ppm dicampurkan dengan ekstrak daun legundi sebanyak 2.000 ppm mortalitas larva *S. exigua* meningkat hingga mencapai 85% (lihat Tabel 4).

Mortalitas larva *S. exigua* dengan perlakuan campuran SeNPV dengan dosis 250 ppm dan ekstrak daun legundi 2.000 ppm ternyata lebih tinggi (85%) dibandingkan dengan hasil penelitian Henny & Turang (2008) yang mendapatkan bahwa mortalitas campuran antara SeNPV dosis 8×10^5 dengan insektisida Curacron 500 EC dosis 1ml yang hanya dapat menyebabkan kematian larva *S. exigua* sebesar 75%.

Waktu yang dibutuhkan untuk menyebabkan kematian serangga uji bervariasi tergantung pada virulensi patogen, sifat resistensi inang, dan kondisi lingkungan mikro di tubuh inang. Kemampuan membunuh 50% serangga uji pada setiap formulasi berbeda-beda. Dari hasil penelitian diketahui bahwa formulasi yang paling cepat membunuh 50% serangga uji ialah konsentrasi SeNPV 250 ppm + ekstrak daun legundi 2.000 ppm dengan waktu kematian 90 jam (kurang lebih 4 hari) setelah perlakuan.

Hasil analisis nilai LC_{50} SeNPV dan insektisida botani ekstrak daun legundi secara tunggal dan campuran serta nilai nisbah sinergistik disajikan pada Tabel 4. Berdasarkan hasil perhitungan analisis probit dari SeNPV dan ekstrak daun legundi yang diuji, ternyata nilai LC_{50} SeNPV secara tunggal lebih besar dari nilai LC_{50} secara campuran.

Pada Tabel 4 terlihat adanya peningkatan efikasi SeNPV terhadap larva *S. exigua* dengan nisbah sinergistik sebesar 12,24 kali lipat. Ini membuktikan bahwa campuran tersebut memberikan efek sinergistik terhadap SeNPV, karena memberikan nisbah sinergistik lebih besar dari satu. Hal ini sesuai dengan rumus Hamilton & Attia (1977), jika $NS > 1$, campuran tersebut mempunyai efek sinergistik. Dengan demikian, terbukti bahwa pencampuran SeNPV dengan ekstrak daun legundi yang diuji pada percobaan ini menunjukkan hasil yang sinergis. Nathan & Kalaivani (2006) dalam penelitiannya mendapatkan informasi bahwa jika SeNPV dan insektisida botani azadirachtin dicampurkan maka akan terjadi efek sinergis dibandingkan dengan aplikasi SeNPV tunggal untuk mengendalikan hama *S. exigua*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Pencampuran SeNPV dengan insektisida botani yang berasal dari ekstrak daun legundi (*V. trifolia*) memberikan efek sinergistik terhadap mortalitas larva *S. exigua*. Nisbah sinergistik campuran SeNPV dengan insektisida yang berasal dari daun legundi (*V. trifolia*) ialah sebesar 12, 24 kali lipat dibandingkan dengan SeNPV secara tunggal terhadap mortalitas

larva *S. exigua*. Nilai LT 50 tercepat diperoleh pada pencampuran SeNPV dengan insektisida botani dari daun legundi (*V. trifolia*), yaitu kurang dari 96 jam setelah perlakuan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Arifin, M 1988, 'Pengaruh konsentrasi dan volume polyhedrosis virus terhadap kematian ulat grayak', *Penel. Pert.*, no. 8, vol. 1, hlm. 12-4.
2. Asikin 2012, 'Uji efikasi ekstrak tumbuhan rawa untuk mengendalikan hama ulat grayak (*Spodoptera litura*) skala laboratorium', *Agrosientiae*, no. 3, vol. 19, hlm. 178-83.
3. Balfas, R & Willis, M 2009, 'Pengaruh ekstrak tanaman obat terhadap mortalitas *Spodoptera litura* F. (Lepidoptera)', *Bul. Litro.*, vol. 20, no. 2, hlm. 148-56.
4. Brewer, MJ & Trumble, JT 1994, 'Beet armyworm resistance to fenvalerate and methomyl: Resistance variation and insecticide synergism', *J. Agric. Entomol.*, vol. 11, no. 4, pp. 291-300.
5. Busvine, JR 1971, *A critical review of the techniques of testing insecticides*, 2nd edition, Common Wealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Slough, SL23 BN Englan, 345 pp.
6. Chatterjee, H 2005, 'Studies on the synergistic response of some commercial biopesticides with botanicals, growth regulator, and conventional organophosphate against neonate larvae of *Phthorimaea operculella* (Zeller)', *Crop Res.*, vol. 29, pp. 499-502.
7. Che, W, Shi, T, Wu, Y & Yang, Y 2013, 'Insecticide resistance status of field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from China', *J. Econ. Entomol.*, vol. 106, no. 4, pp. 1855-62.
8. Duraimurugan, P & Regupathy, A 2005, 'Synergism effect of *B. thuringiensis* subsp. aizawai with syntetic pyrethroids against insecticide resistant *H. armigera* Hubner', *Journal of Biological Science*, vol. 5, no. 6, pp. 678-80.
9. Feng, R & Isman, MB 1995, 'Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*', *Experientia (Basel)*, vol. 51, pp. 831-213.
10. Frank, R, Braun, HE, Ripley, BD & Clegly, BS 1990, 'Contamination of rural ponds with pesticides, 1971-1985. Ontario', *Canada Bull. Environm. Contamin, J. Toxicology*, vol. 13, pp. 771-817.
11. Geetha, V, Doss, A & Pichai, AAD 2004, 'Antimicrobial potential of *Vitex trifolia* L', *Ancient Science of Life*, vol. XXIII, no. 4, pp. 30-2.
12. Hamilton, JT & Attia, FI 1977, 'Effect of mixtures of *Bacillus thuringiensis* and pesticide on *Plutella xylostella* and the parasite *Thyraeella collaris*', *J. Econ. Entomol.*, vol. 70, no. 1, pp. 146-8.
13. Hasyim, A, Setiawati, W, Murtiningsih, R & Sofiari, E 2010, 'Efikasi dan persistensi minyak serai sebagai biopestisida terhadap *H. armigera* Hubn. (Lepidoptera: Noctuidae)', *J. Hort.*, vol. 20, no. 4, hlm. 377-86.
14. Hasyim, A, Setiawati, W, Jayanti, H & Krestini, EH 2014, 'Repelensi minyak atsiri terhadap hama gudang, *E. cautella* di laboratorium', *J. Hort.*, vol. 24, no. 4, pp. 336-45.

15. Hasyim, A, Setiawati, W & Lukman, L 2015, 'Inovasi teknologi pengendalian OPT ramah lingkungan pada cabai: Upaya alternatif menuju ekosistem yang harmonis', *Jurnal Pengembangan Inovasi Pertanian*, vol. 8, no. 1, hlm. 1-10.
16. Henny, VGM & Turang, DAS 2008, *Efektivitas kombinasi SeNPV dan Curacron 500 EC terhadap larva Spodoptera exigua* Hubner (Lepidoptera : Noctuidae) pada tanaman bawang daun, Fakultas Pertanian Unsrat Manado, diunduh 16 Mei 2014, <<http://repo.unsrat.ac.id/>>.
17. Isman, MB 1995, 'Leads and prospects for the development of new botanical insecticides,' in Roe, RM & Kuhr, RJ (ed.), *Reviews in pesticide toxicology*, vol. 3, pp. 1-20, Toxicology Communication Inc., Raleigh, NC., USA.
18. Kabar, JM & Gichia, L 2001, 'Insecticidal activity of extracts derived from different parts of the mangrove tree *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae) Lam. Against three arthropods', *African Journal of Science and Technology (AJST), Science and Engineering Series*, vol. 2, no. 2, pp. 44-9.
19. Kasuan, K, Muhammad, Z, Yusoff, Z, Rahiman, MHF, Taib, MN & Haiyee, ZA 2013, 'Extraction of *Citrus hystrix* D.C. (kaffir lime) essential oil using automated steam distillation process: Analysis of volatile compounds', *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, vol. 17, no. 3, pp. 359-69.
20. Kern, DL, Palumbo, JC & Tellez, T 1998, 'Resistance of field strains of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Arizona and California to carbamate insecticides', *J. Econ. Entomol.*, vol. 91, no. 5, pp. 1038-43.
21. Khater, HF 2012, 'Prospect botanical biopesticide in integrated pest management', *Pharmacologia*, vol. 3, no. 12, pp. 641-56.
22. Khatlab, M 2013, 'Isolation of Nucleopolyhedrovirus (NPV) from the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hubner) (SpexNPV)', *International Journal of Environmental Science and Engineering (IJESE)*, vol. 4, pp. 75-83.
23. Lasa, R, Portero, CR, Alcazar, MD, Belda, JE Caballero, P & Williams, T 2007, 'Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* Multiple Nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in Southern Spain', *Biological Control*, vol. 40, pp. 89-96.
24. Leatemia, JA & Isman, MB 2004, 'Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* sp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against Lepidopteran larvae', *Phytoparasitica*, vol. 31, no. 1, pp. 30-7.
25. Moekasan, TK 2004, 'Pencampuran *Spodoptera exigua* Nuclear Polyhedrosis Virus dengan insektisida kimia untuk mortalitas larva *Spodoptera exigua* Hbn. di Laboratorium', *J. Hort.*, vol. 14, no. 3, hlm. 178-87.
26. Moekasan, TK & Basuki, RS 2007, 'Resistance status of *Spodoptera exigua* Hubn. on shallot from Cirebon, Brebes, and Tegal District to several insecticide commonly used by farmers', *J. Hort.*, vol. 17, no. 4, pp. 343-54.
27. Moscardi, F 1999, 'Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera', *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 44, pp. 257-89.
28. Musabyimana, T, Saxena, RC, Kairu, EW, Ogol CPKO & Khan, ZR 2001, 'Effects of neem seed derivatives on behavioral and physiological responses of the *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae)', *Hort. Entom.*, vol. 94, pp. 449-54.
29. Nathan, SS & Kalaivani, K 2006, 'Combined effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus (SplNPV) on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) larvae', *Biological control*, vol. 39, no. 1, pp. 96-104.
30. Palacios, SM, Bertoni, A, Rossi, Y, Santander, R & Urzua, A 2009, 'Efficacy of essential oils from edible plants as insecticides against the house fly, *Musca Domestica* L', *J. Molecules*, vol. 14, pp. 1938-47.
31. Pinheiro, PF, Queiroz, VT, Rondelli, VM Costa, AV, Marcelino, TP & Pratisoli, D 2013, 'Insecticidal activity of citronella grass essential oil on *Frankliniella schultzei* and *Myzus persicae*', *Cienc. Agrotec., Lavras*, vol. 37, no. 2, pp. 138-44.
32. Rembold, H 1984, 'Secondary plant compounds in insect control with special reference to azadirachtins', *Advances in Invertebrate Reproduction*, vol. 3, pp. 481-91.
33. Rose, CM & Cathrine, L 2011, 'Preliminary phytochemical screening antibacterial activity on *Vitex negundo*', *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, vol. 3, no. 2, pp. 99-101.
34. Saeed, Q, Saleem, MA & Ahmad, M 2012, 'Toxicity of some commonly used synthetic insecticides against *Spodoptera exigua* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae)', *Pakistan J. Zool.*, vol. 44, no. 5, pp. 1197-201.
35. Schmutterer, H 1990, 'Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*', *Ann. Rev. Entomol.*, vol. 35, pp. 271-97.
36. Scott, IM, Jensen, H, Scott, JG, Isman, MB, Arnason, JT & Philogene, BJR 2003, 'Botanical insecticides for controlling agricultural pests : Piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera : Chrysomelidae)', *Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 54, pp. 212-22.
37. Setiawati, W, Hasyim, A, Hudayya, A & Shepard, BM 2014, 'Evaluation of shade nets and nuclear polyhedrosis virus (SeNPV) to control *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on shallot in Indonesia', *Journal AAB Bioflux*, vol. 6, no. 1, pp. 88-97.
38. Smits, PH & Vlak, JM 1988, 'Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae', *J. Invertebr. Pathol.*, vol. 51, no. 2, pp. 107-14.
39. Supyani, Noviyanti, P & Wijayanti, R 2014, 'Insecticidal properties of *Spodoptera exigua* nuclear Polyhedrosis virus local isolate against *Spodoptera exigua* on shallot', *J. Entomol. Res.*, vol. 02, no. 03, pp. 175-80.
40. Tabashnik, BE, Cushing, NL & Johnson, MW 1987, 'Diamond back moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to insecticides in Hawaii: Intra-island variation and cross-resistance', *J. Econ. Entomol.*, vol. 80, no. 1091-9.
41. Tabashnik, BE, Carrie`re, Y, Dennehy, TJ, Morin, S, Sisterson, MS, Roush, RT, Shelton, AM & Zhao, JZ 2003, 'Insect resistance to transgenic Bt crops: Lessons from the laboratory and field', *J. Econ. Entomol.*, vol. 96, pp. 1031-8.
42. Thein, WM, Javier, PA & Ceballos, FA 2013, 'Insecticidal activity of crude plant extracts against *Sitophilus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) and *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae)', *Pilipp Agric Scientist*, vol. 96, no. 2, pp. 154-62
43. Vasconcelos, SD, Cory, JS, Speight, MR & Williams, T 2002, 'Host range structure and baculovirus transmission in *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: A laboratory examination of small scale epizootics', *Neotrop Entomol.*, vol. 31, no. 3, pp. 391-6.
44. Wang, WX, Zhong, GH, Liu, HM, Weng, QF & Hu, MY 2006, 'Synergism of rotenone mixed with fipronil and their effectiveness to *Phyllotreta striolata*', *Acta Phytophy. Sin.*, vol. 33, pp. 307-12.