

Skripsi

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK
(*Annona muricata* L.) SEBAGAI BIOPESTISIDA HAMA
ULAT GRAYAK (*Spodoptera frugiperda*) SECARA IN VIVO**

MUH. ALFLIADHI

H031 17 1316



DEPARTEMEN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2021

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK
(*Annona muricata* L.) SEBAGAI BIOPESTISIDA HAMA
ULAT GRAYAK (*Spodoptera frugiperda*) SECARA IN VIVO**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Sains pada Departemen Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin*

Oleh :

MUH. ALFLIADHI

H031 17 1316



MAKASSAR

2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK
(*Annona muricata* L.) SEBAGAI BIOPESTISIDA HAMA ULAT
GRAYAK (*Spodoptera frugiperda*) SECARA IN VIVO**

Disusun dan diajukan oleh

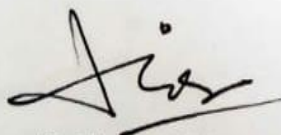
MUH. ALFLIADHI
H031171316

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada tanggal 27 Mei 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pertama



Dr. Firdaus, MS.
NIP. 196009091988101001



Syadza Firdausiah, S.Si., M.Sc.
NIP. 199005262019032013

Ketua Program Studi,



Dr. Abdul Karim, M.Si.
NIP. 196207101988031002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muh. Alfliadhi
NIM : H031171316
Program Studi : Kimia
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul “Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Sebagai Biopestisida Hama Ulat Grayak (*Spodoptera frugiperda*) secara In Vivo” adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari Skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 27 Mei 2021

Yang Menyatakan



Meterai Tempel
55A6AJX239226149

Muh. Alfliadhi

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala anugerah dan nikmat yang tiada tara, juga kepada Nabi Muhammad SAW yang telah menjadi suri tauladan bagi ummat manusia sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Sebagai Biopestisida Hama Ulat Grayak (*Spodoptera frugiperda*) secara In Vivo” dengan baik sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Banyak pihak yang telah berperan penting dalam membantu penyelesaian skripsi ini, baik secara moril maupun materil, maka dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Kedua orang tua saya, Ayahanda tercinta Sukri dan Ibunda tercinta Tahirah yang telah memberikan dukungan yang sangat luar biasa dengan segenap kasih sayang dan materi yang telah diberikan.
2. Adik tercinta Muh. Ikhsan Priadi yang telah memberikan dukungan bagi saya selama saya penelitian.
3. Seluruh keluarga saya yang berada dikampung halaman yang sangat membantu saat memulai penelitian hingga saat ini.
4. Ayahanda Dr. Firdaus Zenta, MS selaku dosen pembimbing utama sekaligus penasihat akademik yang telah memberikan begitu banyak bantuan, masukan, motivasi, dan dorongan hingga saya mampu dan bisa berada pada tahap ini.

5. Ibunda Syadsa Firdausiah S.Si, M.Sc, selaku dosen pembimbing pertama yang juga membimbing saya dengan begitu luar biasa, meluangkan banyak waktu dan memberikan dorongan, masukan dan saran-saran selama peyusunan skripsi ini hingga saya bisa menyelesaikannya dengan baik.
6. Bapak Dr. Syarifuddin Liong, M.Si dan bapak Ir. Abd. Hayat Kasim, MT. sebagai tim dosen penguji yang telah memberikan banyak ilmu dan masukan selama proses penyusunan skripsi ini.
7. Seluruh staf dosen Departemen Kimia yang telah memberikan banyak ilmu selama proses perkuliahan kepada penulis.
8. Seluruh analis laboratorim yang senantiasa membantu penulis selama proses penelitian mulai dari awal hingga selesai.
9. Seluruh staf Departemen Kimia dan Fakultas yang senantiasa membantu penulis dalam hal administrasi.
10. Taufik Hidayat dan Siti Fatima Amaliah selaku teman panel penulis, yang senantiasa menemani dan membantu dari penyusunan proposal hingga saat ini.
11. La Ode Ebet dan Yosua Tanzil yang telah bersedia menemani *hunting* ulat dari takalar sampai gowa
12. Teman-Teman Magang dari BBIHP sampai Labfor yang mau berjuang sama sama cari sertifikat dan penghilang kegabutan.
13. Andrian Nardus Yoel, Hendrianus Layuk Ada', Irzha Adiwira, Nur Alim, Muh. Amrullah, Ishar, Sultan, Aidul, Annisa Luthfiyyah, Megawati, Yuyun Sukawati Rusma, Lulu Sri Rahayu, Ramlawati, Nurhaini, Riska, Trimelinea Ramadhani, Yayuk Tri Utami, Charmelia Asma Sukmastuty, Andi Nur Annisa teman-teman yang selalu membantu dan menemani saya.

14. Muh. Fathur Rahman, Nur Faathir Supardi, Muh Rhofli, Dhani Ihza Erawan, Nik Abdul Aziz dan Naufal Pratama Putra yang telah sama sama berjuang di garis perintis kemerdekaan.

15. Teman-teman seperjuangan PROTON , ALIFATIK 2017 dan KIMIA 2017 yang selalu ada dari awal perkuliahan hingga saat ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Akhir kata semoga skripsi ini bermanfaat bagi diri penulis pribadi maupun pembaca.

Terimakasih.

Makassar, 25 Mei 2021

Muh. Alfliadhi
NIM. H031171316

ABSTRAK

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai biopestisida ialah tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) khususnya pada bagian daun, sebab mengandung senyawa aktif acetogenin yang terbukti memiliki aktivitas insektisida. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui metode ekstraksi terbaik daun sirsak berdasarkan jumlah rendemen dan analisis kandungan acetogeninnya menggunakan instrumen LC-MS/MS, serta mengetahui mortalitas ekstrak daun sirsak terhadap ulat grayak (*Spodoptera frugiperda*). Bahan yang digunakan adalah larva *Spodoptera frugiperda* instar III dan daun sirsak. Cara kerja meliputi tahap pembuatan ekstrak, analisis kandungan ekstrak, persiapan media pemeliharaan ulat grayak, persiapan ulat grayak, dan pelaksanaan Uji. Rancangan uji yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima variasi konsentrasi yaitu 2,5%; 3,5%; 4,5%; 5,5% dan 6,5%. Pengulangan masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali. Analisis data dilakukan dengan menggunakan analisis probit menggunakan aplikasi SPSS. Hasil analisis rendemen acetogenin menunjukkan metode ekstraksi terbaik adalah MAE (*microwave-assisted extraction*) dengan nilai rendemen acetogenin 4,05% dibandingkan dengan maserasi (3,48%) dan sokletasi (2,14%). Uji efektivitas ekstrak terhadap hama *S. frugiperda* menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak dengan metode MAE efektif sebagai biopestisida dengan nilai LC_{50} sebesar 4,114% pada waktu 12 jam.

Kata kunci : Ekstrak Etanol Daun Sirsak, *Spodoptera frugiperda*, Biopestisida, Mortalitas, LC_{50}

ABSTRACT

One of the plants that have potential as biopesticide is the soursop plant (*Annona muricata* L.) especially on the leaves because it contains the active compound acetogenin because it is proven to have insecticidal activity. The purpose of this study is to find out the best extraction method of soursop leaves based on the amount of yield and analysis of its acetogenin content using LC-MS/MS, as well as to know the mortality of soursop leaf extract against Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). The ingredients used are larvae of *Spodoptera frugiperda* instar III and soursop leaves. The workings include the stage of extract making, analysis of extract content, preparation of larvae maintenance media, preparation of larvae, and test implementation. The test plan used is a Completely Randomized Design (RAL) with five concentration variations of 2.5%; 3.5%; 4.5%; 5.5% and 6.5%. Repetition of each treatment is done three times. Data analysis is performed using probit analysis using SPSS applications. The results of the acetogenin yield analysis showed the best extraction method was MAE (Microwave-Assisted Extraction) with an acetogenin yield value of 4.05% compared to maceration (3.48%) and soxhletation (2.14%). The efficiency test of the extract against the pest *S. frugiperda* showed that soursop leaf ethanol extract with MAE method is effective as a biopesticide with an LC₅₀ value by 4.114% within 12 hours.

Keywords: Ethanol Extract of Soursop Leaves, *Spodoptera frugiperda*, Biopesticide, Mortality, LC₅₀

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA.....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Maksud Penelitian.....	4
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Tinjauan Umum Daun Sirsak.....	6
2.1.1 Taksonomi Sirsak.....	6
2.1.2 Morfologi Sirsak.....	7
2.1.3 Ekologi Sirsak.....	8
2.2 Metabolit Sekunder Daun Sirsak.....	8
2.3 Biopestisida Daun Sirsak.....	9
	x

2.4 Ulat Grayak (<i>Spodoptera frugiperda</i>).....	11
2.5 Ekstraksi Daun Sirsak	14
2.5.1 Ekstraksi Maserasi	14
2.5.2 Ekstraksi Sokletasi.....	14
2.5.3 Ekstraksi MAE (<i>Microwave Assisted Extraction</i>).....	15
2.6 Karakterisasi Ekstrak Etanol Daun Sirsak	16
2.6.1 Skrining Fitokimia	16
2.6.2 LC-MS (<i>Liquid Chromatography Mass Spectrofotometry</i>)..	16
2.6.3 KLT (Kromatografi Lapis Tipis)	17
2.7 Uji Mortalitas LC ₅₀	18
BAB III METODE PENELITIAN.....	20
3.1 Bahan Penelitian.....	20
3.2. Alat Penelitian.....	20
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	20
3.4 Prosedur Penelitian.....	21
3.4.1 Pembuatan Reagen.....	21
3.4.1.1 Pembuatan Reagen Libermann-Bruchard.....	21
3.4.1.2 Pembuatan Reagen Dragendroff.....	21
3.4.1.3 Pembuatan Reagen Meyer	21
3.4.1.4 Pembuatan Reagen Wagner	21
3.4.1.5 Pembuatan Reagen Vanilin-Asam Sulfat	21
3.4.2 Ekstraksi Daun Sirsak.....	22
3.4.2.1 Preparasi Sampel	22
3.4.2.2 Ekstraksi Maserasi	22
3.4.2.3 Ekstraksi Sokletasi.....	23

3.4.2.4 Ekstraksi Mikrowave	23
3.4.3 Metode Analisis Komponen Kimia	23
3.4.3.1 Analisis Data LC-MS	23
3.4.3.2 Skrining Fitokimia.....	24
3.4.3.2.1 Uji Alkaloid	24
3.4.3.2.2 Uji Flavonoid	24
3.4.3.2.3 Uji Terpenoid dan Steroid	24
3.4.3.2.4 Uji Saponin.....	25
3.4.3.2.5 Uji Tanin.....	25
3.4.3.2.6 Uji Poliketida.....	25
3.4.4 Uji Potensi Ekstrak Daun Sirsak sebagai Biopestisida	25
3.4.5.1 Pengambilan Larva Uji.....	25
3.4.5.2 Pembiakan Larva Uji	25
3.4.5.3 Uji Pendahuluan	26
3.4.5.4 Uji Toksisitas.....	27
3.4.5.5 Analisis Data.....	27
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Ekstraksi Daun Sirsak	28
4.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Sirsak (EEDS)	29
4.3 Analisis Kandungan Kimia Ekstrak Etanol Daun Sirsak (EEDS) ..	34
4.4 Uji Efektifitas Ekstrak Etanol Daun Sirsak sebagai Biopestisida...	37
4.4.1 Pembiakan Larva Uji	37
4.4.2 Uji Pendahuluan.....	37
4.4.3 Uji Toksisitas	39
4.5 Analisis Data SPSS	42

4.5.1 Uji Normalitas.....	42
4.5.2 Uji Homogenitas	43
4.5.3 Uji Kruskal-Wallis	43
4.5.4 Uji Mann-Whitney	44
4.5.5 Analisis Probit.....	45
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	47
5.1 Kesimpulan	47
5.2 Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	56

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Rendemen hasil ekstraksi	29
2. Skrining fitokimia ekstrak etanol daun sirsak.....	29
3. Persentase kandungan acetogenin ekstrak etanol daun Sirsak (EEDS).....	34
4. Hasil perhitungan analisis rendemen dan kadar EEDS	36
5. Uji pendahuluan untuk pengamatan mortalitas larva uji selama 12 jam	38
6. Uji inti untuk pengamatan mortalitas larva uji selama 12 jam	40
7. Data nilai signifikansi Uji SPSS	42
8. Uji Mann-Whitney perbedaan perlakuan EEDS terhadap mortalitas ulat grayak	44
9. Hasil LC ₅₀ ekstrak etanol daun sirsak.....	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Daun Sirsak (<i>Annona muricata L.</i>)	6
2. Senyawa Acetogenin.....	9
3. Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Dragendorf	30
4. Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Wagner	31
5. Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Mayer	31
6. Reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat.....	32
7. Reaksi Senyawa Tanin	32
8. Reaksi Senyawa Terpenoid dengan Pereaksi Liebermann-Burchard	33
9. Reaksi Senyawa Acetogenin dengan Pereaksi Vanilin-Asam Sulfat.....	34
10. Struktur senyawa annohexocin	35
11. Struktur senyawa muricatalicin.....	35
12. Struktur senyawa Epoxymurin.....	35
13. Struktur senyawa robustocin	35
14. Proses Rearing Larva Uji	37
15. Mekanisme Acetogenin pada Mitokondria	41
16. Mekanisme Acetogenin dalam Kompleks I.....	41
17. (a) kondisi larva uji sebelum diberi perlakuan, (b) kondisi larva uji sesudah diberi perlakuan	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Diagram alir penelitian	56
2. Bagan kerja	57
3. Perhitungan	65
4. Data Hasil Analisis LC-MS/MS	67
5. Data Hasil Analisis SPSS	70
6. Dokumentasi Kegiatan	73

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Arti
FAW	<i>Fall Armyworm</i>
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
LCMS	<i>Liquid Chromatography Mass-Spectroscopy</i>
EEDS	Ekstrak Etanol Daun Sirsak
LC ₅₀	<i>Lethal Concentration</i>
MAE	<i>Microwave Assisted Extraction</i>
UV	<i>UltraViolet</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Jagung termasuk bahan pangan kedua setelah beras dan penggunaannya sebagai bahan pangan dan pakan terus mengalami peningkatan, sementara ketersediaannya cukup terbatas (Purwono dan Hartono, 2005). Menurut Pabbage dkk. (2001), salah satu hambatan dalam meningkatkan produksi jagung di Indonesia adalah adanya serangan hama. Hama jagung diketahui menyerang pada seluruh fase pertumbuhan tanaman jagung, baik vegetatif maupun generatif. Hama yang biasa ditemukan pada tanaman jagung adalah lalat bibit (*Atherigona* sp.), penggerek batang (*Ostrinia furnacalis*), penggerek tongkol (*Helicoverpa armigera*), penggerek batang merah jambu (*Sesamia inferens* Walker), pemakan daun (*Spodoptera litura*, *Mythimna* sp.), belalang (*Aphis* sp.), dan tikus (Kalshoven, 1981).

Pada awal tahun 2019, muncul spesies baru yang setelah ditelaah lebih lanjut adalah bukan hama asli dari Indonesia, yakni jenis *Spodoptera frugiperda*. Menurut Maharani dkk. (2019), *Spodoptera frugiperda* merupakan hama tanaman jagung yang selama ini merupakan penghuni benua Amerika bagian tengah (beriklim tropis). Hama ini dilaporkan dapat menyerang lebih dari 200 spesies tanaman di antaranya cabai, kubis, padi, jagung, tomat, buncis, tembakau, terung, kentang, kacang tanah, dan kacang kedelai. Hama ulat grayak dilaporkan tersebar di Jepang, Cina, India, serta di berbagai negara di Asia Tenggara. Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Deole dan Paul, 2018) menjelaskan bahwa tingkat serangan

Spodoptera frugiperda sangat tinggi. Ulat grayak ini merupakan hama baru yang pertama kali ditemukan menyerang lahan pertanaman jagung di Indonesia dan akan berdampak sangat parah jika tidak ditangani secara tepat. Hingga saat ini, belum ada pestisida yang dapat melawan dampak patogenisitas dari hama ini (Firake dkk., 2019).

Petani seringkali mengendalikan hama dan penyakit tanaman dengan menggunakan bahan-bahan kimia buatan pabrik dengan harga yang relatif mahal (Pracaya, 2008). Penggunaan pestisida kimiawi yang berlebihan memberikan dampak negatif terhadap lingkungan dan manusia. Keseimbangan alam terganggu dan akan mengakibatkan timbulnya hama yang resisten, ancaman bagi predator, parasit, ikan, burung, dan satwa lain. Salah satu penyebab terjadinya dampak negatif pestisida terhadap lingkungan adalah adanya residu pestisida di dalam tanah sehingga dapat meracuni organisme nontarget, terbawa sampai ke sumber-sumber air dan meracuni lingkungan sekitar. Hal ini harus segera diupayakan pengurangannya secara berangsur-angsur dan mulai beralih kepada jenis-jenis biopestisida yang aman bagi lingkungan (Djunaedy, 2009). Biopestisida didefinisikan sebagai bahan yang berasal dari makhluk hidup (tanaman, hewan atau mikroorganisme) yang berkhasiat menghambat pertumbuhan dan perkembangan atau mematikan hama atau organisme penyebab penyakit (Sumartini, 2016).

Salah satu tanaman yang memiliki senyawa untuk digunakan sebagai biopestisida yaitu daun sirsak. Menurut Mulyaman dkk. (2000), daun sirsak mengandung senyawa acetogenin antara lain acimicin, bulatacin, dan squamocin. Pada konsentrasi tinggi senyawa acetogenin memiliki keistimewaan sebagai

antifeedant pada larva penggerek tongkol *Helicoverpa armigera*. Dalam hal ini serangga hama tidak lagi memakan bagian tanaman yang disukainya. Pada konsentrasi rendah, bersifat racun bagi pencernaan serangga sehingga dapat menyebabkan kematian.

Beberapa penelitian telah memanfaatkan daun sirsak sebagai biopestisida (Ambarningrum dkk., 2012; Mawuntu 2016; dan Sofyan dkk., 2018). Hasil penelitian Sofyan dkk. (2016) menunjukkan bahwa nilai konsentrasi 40 mL/L ekstrak daun sirsak efektif dalam mengendalikan hama ulat grayak (*Spodoptera litura*) dengan nilai mortalitas sebesar 67,5%. Penelitian Mawuntu dkk. (2016) menyatakan bahwa perlakuan ekstrak daun Sirsak pada konsentrasi 20% memberikan nilai rata-rata mortalitas 81,72%. Selain itu Ambarningrum dkk. (2012) menunjukkan hasil penelitian bahwa ekstrak daun sirsak pada konsentrasi 2,5% mempunyai aktivitas anti makan. Adanya beberapa hasil penelitian tersebut maka ekstrak yang diperoleh pada penelitian ini diharapkan memberikan nilai mortalitas yang lebih baik untuk dijadikan sebagai biopestisida ulat grayak (*Spodoptera frugiperda*).

Penelitian ini menggunakan daun sirsak sebagai bahan untuk menghasilkan ekstrak daun sirsak yang nantinya akan dijadikan biopestisida untuk tanaman jagung. Ekstraksi sampel daun sirsak menggunakan metode yang bersifat efisien dan efektif, yaitu membandingkan metode maserasi, sokletasi, dan *microwave*. Ekstrak kemudian dianalisis kandungan kimiawinya menggunakan instrumen LCMS, setelah didapatkan ekstrak yang terbaik yaitu kadar poliketida (Acetogenin) tertinggi selanjutnya diuji efektivitasnya sebagai biopestisida terhadap hama *Spodoptera frugiperda* dengan pengamatan LC_{50} . Hasil penelitian

ini diharapkan dapat menjadi langkah awal pemanfaatan daun sirsak sebagai biopestisida terbaharukan yang dapat menanggulangi patogenisitas dari hama baru *Spodoptera frugiperda* pada perkebunan jagung di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian yang ada pada latar belakang maka rumusan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. berapakah rendemen masing-masing metode ekstraksi maserasi, sokletasi, dan *microwave* dalam mengekstraksi daun sirsak *Annona muricata* L.?
2. metabolit sekunder apa saja yang terkandung dalam masing-masing ekstrak daun sirsak *Annona muricata* L. melalui analisis fitokimia dan LC-MS/MS?
3. metode ekstraksi manakah yang paling efektif berdasarkan rendemen dan kandungan metabolit sekundernya?
4. bagaimanakah efektivitas ekstrak daun sirsak *Annona muricata* L. Sebagai biopestisida hama ulat grayak *Spodoptera frugiperda*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui metode ekstraksi terbaik dan efektivitas ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) sebagai biopestisida terhadap hama ulat grayak (*spodoptera frugiperda*).

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. melakukan ekstraksi daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan metode

- maserasi, sokletasi, dan *microwave* serta menentukan rendemennya;
2. menganalisis metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) melalui analisis fitokimia dan LC-MS/MS;
 3. menentukan metode ekstraksi yang paling efektif berdasarkan rendemen dan kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak yang diperoleh;
 4. menentukan efektivitas ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) sebagai biopestisida hama ulat grayak (*Spodoptera frugiperda*).

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan informasi tentang potensi pemanfaatan ekstrak daun sirsak sebagai biopestisida terhadap mortalitas hama ulat grayak *Spodoptera frugiperda* dan juga diharapkan dapat diaplikasikan pada area perkebunan jagung yang terkena dampak OPT (Organisme Pengganggu Tanaman) secara langsung.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Daun Sirsak

2.1.2 Taksonomi Sirsak

Sirsak berasal dari Amerika Tropis, yakni sekitar Peru, Meksiko, dan Argentina kemudian menyebar ke Filipina dan juga Indonesia. Nama tanaman sirsak itu sendiri sebenarnya berasal dari bahasa Belanda *Zuurzak* yang kurang lebih berarti kantung yang asam. Adapun klasifikasi tanaman sirsak sebagai berikut (Amalia, 2017):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Magnoliales
Famili	: Annonaceae
Genus	: <i>Annona</i>
Spesies	: <i>Annona muricata</i> L.



Gambar 1. Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) (Sari, 2020)

Tanaman sirsak masih satu famili dengan srikaya (*Annona Squamosa*), buah nona (*Annona reticulate* L.), *sugar-apple*, *Sweetsop*, kemulwo, mulwo, dan cherimoya (*Annona cherimola* M.) (Listiatie, 2004).

2.1.2 Morfologi Sirsak

Secara morfologi, tanaman sirsak memiliki batang yang berkayu dan tingginya dapat mencapai hingga 9 meter. Daun tanaman sirsak berbentuk lonjong-bulat telur, ujung daun lancip dan pendek. Helai daun melekat pada tangkai daun dengan tepi lurus dan permukaan agak licin. Tanaman sirsak memiliki bunga yang sempurna (*hermafrodit*) dan termasuk bunga tunggal (*flos simplex*), artinya dalam satu bunga terdapat banyak putik sehingga disebut juga bunga berpistil majemuk. Biji berbentuk pipih dengan ujung tumpul dan berkulit keras. Jumlah biji dalam satu buah sirsak bervariasi, berkisar antara 20-70 butir biji ormal (Amalia, 2017).

Sirsak merupakan pohon yang tinggi dapat mencapai sekitar 3-8 meter. Daun memanjang, bentuk lanset atau bulat telur terbalik, ujung meruncing pendek, seperti kulit, panjang 6-18 cm, tepi rata. Bunga berdiri sendiri berhadapan dengan daun dan baunya tidak enak. Daun kelopak kecil, daun mahkota berdaging, 3 yang terluar hijau, kemudian kuning, panjang 3.5-5 cm, 3 yang terdalam bulat telur, kuning muda. Daun kelopak dan daun mahkota yang terluar pada kuncup tersusun seperti katup, daun mahkota terdalam secara genting. Tangkai putik langsing, berambut kepala silindris. Buah majemuk tidak beraturan, bentuk telur miring atau bengkok, 15-35 kali, diameter 10-15 cm. Biji hitam dan daging buah putih (Steenis, 2003).

Sirsak (*Annona muricata* L.) adalah tumbuhan berguna yang berasal dari

Karibia, Amerika Tengah, dan Amerika Selatan khususnya di Amazon, juga ditemukan di Polinesia. Masyarakat adat dari hutan Amazon menyebutnya sebagai pohon keajaiban. Penduduk setempat telah menggunakan kulit kayu, daun akar, buah, biji, dan bunga sirsak selama ribuan tahun untuk mengobati segala penyakit, mulai dari artritis ke masalah hati. Sebagai contoh, buah dan biji-bijian digunakan untuk kesehatan usus dan membasmi parasit. Kaum wanita memakan akar untuk meningkatkan laktasi; teh yang terbuat dari akar dan kulit dapat sebagai obat penenang atau tonik saraf (Sugeng, 2010).

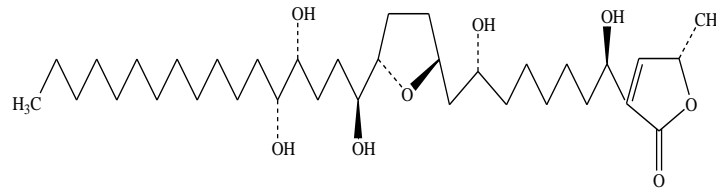
2.1.3 Ekologi Sirsak

Tanaman Sirsak merupakan jenis yang paling mudah tumbuhnya di antara jenis-jenis *Annona* lainnya dan memerlukan iklim tropik yang hangat dan lembab. Tanaman sirsak dapat tumbuh pada ketinggian sampai 1000 meter di atas permukaan laut, dan meluas sampai ke 25° LS pada lahan yang ternaung. Pertumbuhan dan pembungaannya sangat terhambat oleh turunnya udara dingin, serta hujan salju dengan intensitas yang ringan saja sudah dapat membunuh pohon sirsak (Verheij dan Coronel, 1991).

2.2 Metabolit Sekunder Daun Sirsak

Menurut Jackson (2006), menyatakan bahwa tanaman sirsak telah digunakan dalam medis untuk pengobatan karena berisi senyawa-senyawa kimia yang antara lain yaitu tannin, alkaloid dan flavonoid yang ditemukan di bagian akar, daun, buah dan bijinya. Daun sirsak mengandung beberapa bahan aktif, yaitu annonain, saponin, flavonoid, tanin (Kardinan, 2004). Bahkan Naria (2005) menyatakan pada tanaman sirsak ditemukan senyawa bersifat bioaktif yang

dikenal dengan nama senyawa *acetogenin*.



Gambar 2. Senyawa Acetogenin (Naria, 2005).

Sebagian besar penelitian berfokus pada bahan kimia yang disebut *Annonaceous acetogenins* yang hanya ditemukan dalam keluarga *Annonaceae*. *Annonaceous acetogenins* yang ditemukan dalam tanaman sirsak antara lain *annocatalin*, *annohexocin*, *annomonicin*, *annomontacin* dan masih banyak lainnya. Tanaman sirsak menghasilkan senyawa alami ini dalam daun, batang, kulit kayu, buah, dan biji. *Annonaceous acetogenins* secara umum telah dicatat memiliki sifat antitumor, antiparasit, insektisida, dan aktivitas antimikroba. *Annonaceous acetogenin* setelah menunjukkan toksisitas selektif untuk sel tumor pada dosis yang sangat rendah (Malau, 2011).

2.3 Biopestisida Daun Sirsak

Salah satu tumbuhan yang dilaporkan memiliki aktivitas insektisida adalah tumbuhan sirsak (*Annona muricata*). Ekstrak daun sirsak menurut Sumantri dkk. (2014) mengandung senyawa acetogenin yang dapat menyebabkan koagulasi pada bagian lambung serangga sehingga menyebabkan sistem pencernaan serangga mengalami kegagalan fungsi. Daun sirsak mempunyai prospek untuk dikembangkan sebagai biopestisida. Daun sirsak mengandung beberapa senyawa acetogenin antara lain asimisin, bulatasin, dan squamosin (Kardinan, 2005). Senyawa anonain yang terkandung dalam ekstrak *Annona* sp bersifat sebagai penolak serangga (Priyono, 1999).

Senyawa acetogenin yang terkandung dalam daun sirsak juga berperan sebagai repellant sehingga dapat menurunkan palatabilitas ulat grayak *Spodoptera litura* sebesar 41,6% (Tohir, 2010). Ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 40 ml/l efektif dalam mengendalikan hama ulat grayak *Spodoptera litura* pada tanaman kedelai varietas Burangrang terhadap nilai mortalitas sebesar 67,5% dan tingkat kerusakan tanaman sebesar 22,4% (Sofyan dkk., 2018).

Menurut Tjokronegoro (1987), ekstrak daun sirsak menyebabkan kematian larva *Bombyx mori* pada konsentrasi 3,5 mg dalam 1 g pakan buatan serta bersifat anti makan terhadap *Crocidolomia binotalis*. Simanjuntak dkk. (2007) mengatakan bahwa serbuk daun sirsak dapat digunakan untuk mengendalikan rayap dan dosis 6 g/toples telah menyebabkan mortalitas pada rayap uji, selanjutnya Yus (1996) melaporkan bahwa LC_{50} ekstrak biji sirsak terhadap larva instar V *Heliothis armigera* adalah sebesar 3,437%. Komansilan dkk. (2012) mengatakan bahwa ekstrak biji sirsak fraksi n-heksan dengan nilai LC_{50} sebesar 73,77 ppm efektif menekan populasi larva *Aedes aegypti* pada skala laboratorium. Menurut Dadang dkk. (2009), efikasi insektisida botani yang dicampur, yaitu berupa ekstrak *Piper retrofractum* yang dicampur dengan ekstrak *A. squamosa* dan ekstrak *Aglaia odorata* yang dicampur dengan *A. squamosa* pada konsentrasi 0,1% efektif menekan populasi larva *Crocidolomia pavonana* dan *Plutella xylostella* serta tidak mempengaruhi keberadaan parasitoid *Diadegma semiclausum* dan *Eriborus argentiopilosus*.

Batasan mengenai konsentrasi yang efektif bagi senyawa yang bersifat anti makan belum ada standarnya. Beberapa peneliti mengatakan bahwa suatu senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai anti makan terlihat berpengaruh pada

konsentrasi yang dapat menghambat makan hingga 50% (Bernays dan Chapman, 1978). Namun beberapa peneliti lainnya mengatakan bahwa senyawa anti makan efektif bila dapat menghambat makan sekitar 80-100% (Schoonhoven, 1982). Menurut Hsiao (1985), reaksi serangga terhadap senyawa alelokimia tertentu tergantung pada dosisnya. Penghambatan total oleh suatu senyawa anti makan (*feeding deterrent* atau *antifeedant*) terjadi pada kisaran dosis efektif tertentu.

Penurunan konsumsi makan larva uji diduga karena kandungan senyawa alelokimia yang terdapat dalam ekstrak daun sirsak. Kelompok senyawa pada tanaman sirsak adalah *annonain*, *annoniin*, *muricine*, *muricinine*, *reticuline*, serta asam hidrosianik (Morton, 1987). Menurut Schoonhoven (1982), alkaloid dan terpenoid sangat berpotensi sebagai penghambat makan pada sejumlah serangga. Biasanya pada larva Lepidoptera ditemukan suatu reseptor khusus berupa sel sensilla yang terdapat pada maksila. Sel tersebut dapat merespon berbagai alkaloid yang pada konsentrasi tertentu beraksi sebagai penghambat makan. Mulyaman dkk. (2000) mengatakan bahwa senyawa yang berhasil diisolasi dari tanaman sirsak adalah acetogenin yang terdiri dari *annonacin*, *asimisin*, *bulatacin*, dan *squamosin*. Pada konsentrasi yang tinggi acetogenin akan bersifat anti makan pada serangga, sedangkan pada konsentrasi rendah bersifat sebagai racun perut dan dapat menyebabkan kematian.

2.4 Ulat Grayak (*Spodoptera frugiperda*)

Ulat grayak jagung atau *fall armyworm* (*Spodoptera frugiperda*, *Lepi-doptera: Noctuidae*) merupakan hama tanaman jagung yang baru masuk ke Indonesia. Hama ini awalnya berasal dari bagian tropik dan subtropik benua

Amerika dan pada beberapa tahun terakhir telah menyebar ke berbagai wilayah di dunia seperti Afrika Barat dan Afrika Tengah tahun 2016 (Goergen dkk., 2016). Pada tahun 2019, hama *S. frugiperda* dilaporkan pertama kali menyerang beberapa tanaman jagung di daerah Lampung, Indonesia (Trisyono dkk., 2019) dan Jawa Barat (Maharani dkk., 2019).

Penyebaran *S. frugiperda* yang begitu cepat melintasi beberapa negara atau wilayah ini disebabkan oleh beberapa faktor di antaranya kemampuan adaptasi yang baik pada lingkungan baru, kemampuan terbang yang jauh mencapai ratusan kilometer dan kemungkinan terbawa alat transportasi (Westbrook dkk., 2016). Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tanaman (BBPOPT) juga telah menemukan hama ini pada tanaman jagung di 29 provinsi sampai bulan April 2020 (BBPOPT 2020, tidak dipublikasikan). Ulat grayak adalah hama yang sangat mudah berpindah dari berbagai tanaman inang. Tidak seperti kebanyakan hama dari jenis spesies migran lainnya, Ulat grayak *S. frugiperda* tidak memiliki sifat diapause atau kemampuan untuk melakukan dormansi pada kondisi yang ekstrim. Olehnya itu bila musim semi tiba, ulat grayak yang berasal dari daerah tropis ini, akan migrasi ke Utara. Migrasi dengan jarak terjauh tergantung dari pola angin yang kuat (Kementan, 2019).

Serangga *S. frugiperda* dapat menyerang seluruh stadia tanaman jagung mulai dari fase vegetatif sampai fase generatif (Prasanna dkk., 2018) dan tingkat kerusakan yang tertinggi banyak ditemukan pada fase vegetatif (Trisyono dkk., 2019). Siklus hidup berkisar antara 32-46 hari dengan stadia telur 2-3 hari, larva 14-19 hari dan pupa 9-12 hari (Sharanabasappa dkk., 2018). Hama ini menyerang titik tumbuh tanaman yang dapat mengakibatkan kegagalan pembetukan

pucuk/daun muda tanaman. Larva *S. frugiperda* memiliki kemampuan makan yang tinggi. Larva akan masuk ke dalam bagian tanaman dan aktif makan disana, sehingga bila populasi masih sedikit akan sulit dideteksi. Imagonya merupakan penerbang yang kuat dan memiliki daya jelajah yang tinggi (Anonim, 2019).

Ulat *S. frugiperda* yang lebih besar memiliki tanda dan bintik yang khas. Ulat ini memiliki kepala gelap, dengan tanda berbentuk Y pucat terbalik di bagian depan tubuhnya. Masing-masing tubuh ruas ulat memiliki pola empat titik yang menonjol jika dilihat dari atas. Ini memiliki empat bintik hitam yang membentuk persegi pada segmen tubuh kedua hingga terakhir. Kulit ulat terlihat kasar tetapi halus saat disentuh. Ulat *S. frugiperda* berukuran penuh adalah sedikit lebih pendek dari batang korek api dengan panjang berkisar 4-5 cm (Anonim, 2019).

Kerusakan pada tanaman biasanya ditandai dengan bekas gerakan larva, yaitu terdapat serbuk kasar menyerupai serbuk gergaji pada permukaan atas daun, atau disekitar pucuk tanaman jagung. Gejala Awal dari serangan FAW mirip dengan gejala serangan hama-hama lainnya pada tanaman jagung. Jika larva merusak pucuk, daun muda atau titik tumbuh tanaman, dapat mematikan tanaman. *S. frugiperda* merusak tanaman jagung dengan cara larva mengerek daun. Larva instar 1 awalnya memakan jaringan daun dan meninggalkan lapisan epidermis yang transparan. Larva instar 2 dan 3 membuat lubang gerakan pada daun dan memakan daun dari tepi hingga ke bagian dalam. Larva FAW mempunyai sifat kanibal sehingga larva yang ditemukan pada satu tanaman jagung antara 1-2, perilaku kanibal dimiliki oleh larva instar 2 dan 3. Larva instar akhir dapat menyebabkan kerusakan berat yang seringkali hanya menyisakan tulang daun dan batang tanaman jagung (Kementan, 2019).

2.5 Ekstraksi Daun Sirsak

Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Sebelum memilih suatu metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu. Ada beberapa target ekstraksi, diantaranya (Sarker dkk., 2006):

1. Senyawa bioaktif yang tidak diketahui
2. Senyawa yang diketahui ada pada suatu organisme
3. Sekelompok senyawa dalam suatu organisme yang berhubungan secara bentuk struktural.

2.5.1 Ekstraksi Maserasi

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri (Agoes, 2007). Ekstraksi pelarut dilakukan dengan cara dingin (maserasi). Proses ekstraksi dengan teknik maserasi dilakukan dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu ruang. Keuntungan cara ini mudah dan tidak perlu pemanasan sehingga kecil kemungkinan bahan alam menjadi rusak atau terurai. Pemilihan pelarut berdasarkan kelarutan dan polaritasnya memudahkan pemisahan bahan alam dalam sampel. Pengerjaan metode maserasi yang lama dan keadaan diam selama maserasi memungkinkan banyak senyawa yang akan terekstraksi (Istiqomah, 2013).

2.5.2 Ekstraksi Sokletasi

Ekstraksi dengan alat soxhlet merupakan ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, umumnya dilakukan menggunakan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi konstan dengan adanya pendingin balik (kondensor). Cara ini memiliki

beberapa kelebihan dibanding yang lain, yaitu sampel kontak dengan pelarut yang murni secara berulang, kemampuan mengekstraksi sampel lebih tanpa tergantung jumlah pelarut yang banyak (Maretniatin, 2008). Kelemahan dari metode sokletasi ini adalah dapat menyebabkan rusaknya *solute* atau komponen lainnya yang tidak tahan terhadap panas karena pemanasan ekstrak yang dilakukan secara terus menerus (Tiwari dkk., 2011).

Dibanding dengan cara terdahulu (destilasi), maka metode soxhletasi ini lebih efisien. Kelebihan metode ekstraksi bahan alam dengan alat soxhletasi (Pavia, 1995), yaitu :

1. Pelarut organik dapat menarik senyawa organik dalam bahan alam secara berulang kali.
2. Waktu yang digunakan lebih efisien.
3. Proses ekstraksi berjalan terus-menerus sesuai dengan keperluan tanpa menambah volume pelarut. Hal ini sangat menguntungkan karena selain ekonomis, akan diperoleh ekstrak yang lebih pekat. Dengan kata lain, pelarut yang dibutuhkan lebih sedikit dibandingkan dengan metode maserasi atau perkolasi.

2.5.3 Ekstraksi MAE (*Microwave Assisted Extraction*)

MAE merupakan teknik untuk mengekstraksi bahan-bahan terlarut di dalam bahan tanaman dengan bantuan energi gelombang mikro. Teknologi tersebut cocok bagi pengambilan senyawa yang bersifat termolabil karena memiliki kontrol terhadap temperatur yang lebih baik dibandingkan proses pemanasan konvensional. Selain kontrol suhu yang lebih baik, MAE juga memiliki beberapa kelebihan lain, diantaranya adalah waktu ekstraksi yang lebih singkat, konsumsi energi dan pelarut yang lebih sedikit, akurasi dan presisi yang

lebih tinggi, dan setting peralatan yang menggabungkan fitur soxhlet dan kelebihan dari microwave (Kurniasari dkk., 2008).

Microwaves merupakan gelombang elektromagnetik tak terionkan dengan frekuensi antara 300 MHz – 300 GHz dan berada di antara sinar-X dan sinar infra merah dalam spektrum elektromagnetik. Kapasitas panas dari radiasi gelombang mikro sebanding dengan properti dielektrik dari bahan dan sebaran muatan elektromagnetik (Cavalcanti dkk, 2011). Panas radiasi gelombang mikro memanaskan dan menguapkan air sel bahan. Tekanan pada dinding sel meningkat, akibatnya sel mengalami pengembangan (*swelling*). Tekanan mendorong dinding sel dari dalam, meregangkan dan memecahkan sel tersebut. Rusaknya matrik bahan mempermudah senyawa target keluar dan terekstraksi (Jain dkk., 2009).

2.6 Karakterisasi Ekstrak Etanol Daun Sirsak

2.6.1 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan memberi gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang diteliti. Metode skrining fitokimia yang dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna (Kristianti dkk., 2008). Uji fitokimia merupakan salah satu langkah penting dalam upaya untuk mengungkap adanya potensi sumber daya tumbuhan obat (Astuti dkk., 2013) sebagai antibiotik, antioksidan, dan antikanker (Atmoko dan Ma'ruf, 2009).

2.6.2 LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrofotometry*)

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) adalah suatu teknik analisis kimia yang mempunyai kemampuan pemisahan yang sangat bagus

karena mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang sangat tinggi karena teknik ini menggunakan kombinasi tandem kromatografi cair dan spektroskopi massa. LC-MS sangat umum digunakan dalam studi farmakokinetika terutama dalam hal pengembangan obat. Disamping itu, LC-MS juga dapat digunakan untuk dereplikasi bahan alam, skrining bioafinitas, skrining in vivo, stabilitas metabolit, identifikasi metabolit, identifikasi kemurnian suatu obat, identifikasi degradant, kualitas kontrol dan kuantitatif bioanalisis suatu obat (Lee dan Kerns, 1999). Data LC-MS dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu, senyawa dipisahkan atas dasar interaksi relatif dengan lapisan kimia berupa partikel-partikel (fase diam) dan dielusi menggunakan pelarut melalui kolom (fase gerak) (Himawan, 2010).

2.6.3 KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kertas tergolong kromatografi planar. KLT adalah yang metode kromatografi paling sederhana yang banyak digunakan. Peralatan dan bahan yang dibutuhkan untuk melaksanakan pemisahan dan analisis sampel dengan metode KLT cukup sederhana yaitu sebuah bejana tertutup (chamber) yang berisi pelarut dan lempeng KLT. Dengan optimasi metode dan menggunakan instrumen komersial yang tersedia, pemisahan yang efisien dan kuantifikasi yang akurat dapat dicapai. Kromatografi planar juga dapat digunakan untuk pemisahan skala preparatif yaitu dengan menggunakan lempeng, peralatan, dan juga adanya teknik khusus (Wulandari, 2011).

Pada KLT, identifikasi awal suatu senyawa didasarkan pada perbandingan

nilai Rf dibandingkan Rf standar. Nilai Rf umumnya tidak sama dari laboratorium ke laboratorium bahkan pada waktu analisis yang berbeda dalam laboratorium yang sama, sehingga perlu dipertimbangkan penggunaan Rf relatif yaitu nilai Rf noda senyawa dibandingkan noda senyawa lain dalam lempeng yang sama. Faktor-faktor yang menyebabkan nilai Rf bervariasi meliputi dimensi dan jenis ruang, sifat dan ukuran lempeng, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak, kondisi kesetimbangan, kelembaban, dan metode persiapan sampel KLT sebelumnya. Konfirmasi identifikasi dapat diperoleh dengan mengerok noda dalam lempeng kemudian analit dalam lempeng dielusi dan dideteksi dengan spektrometri inframerah (IR), spektrometri *nuclear magnetic resonance* (NMR), spektrometri massa, atau metode spektrometri lain jika senyawa hasil elusi cukup tersedia (Wulandari, 2011).

2.7 Uji Mortalitas LC₅₀

Uji toksisitas merupakan uji hayati yang berguna untuk menentukan tingkat toksisitas dari suatu zat atau bahan pencemar dan digunakan juga untuk pemantauan rutin suatu limbah. LC₅₀ (*Median Lethal Concentration*) yaitu konsentrasi yang menyebabkan kematian sebanyak 50% dari organisme uji yang dapat diestimasi dengan grafik dan perhitungan pada suatu waktu pengamatan tertentu, misalnya LC₅₀ 48 jam, LC₅₀ 96 jam sampai waktu hidup hewan uji (Rudiyanti dan Dana, 2009). Dosis LC₅₀ diperoleh dari uji ambang batas atas dan bawah. Nilai ambang batas berfungsi untuk menentukan konsentrasi perlakuan pada uji toksisitas subletal. Pengujian toksisitas subletal dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 6 perlakuan dengan masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan. Konsentrasi

perlakuan uji toksisitas subletal ditentukan dengan menggunakan perhitungan Busvine (1971), sebagai berikut:

$$\text{Log} \frac{(N)}{(n)} = K \log \frac{(N)}{(n)} \quad (1)$$

Keterangan :

N = Konsentrasi ambang atas (mL.L⁻¹)

n = Konsentrasi ambang bawah (mL.L⁻¹)

K = Jumlah interval konsentrasi