

PERHITUNGAN DAN PENGGUNAAN PARAMETER PERTUMBUHAN
SERANGGA DALAM PENGUJIAN SENYAWA PENGHAMBAT PERTUMBUHAN
SERANGGA

QUANTIFICATION AND UTILISATION OF INSECT GROWTH PARAMETER
IN BIOASSAYS OF INSECT GROWTH INHIBITOR

Agus Dana Permana

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Teknologi Bandung, Ganessa 10 Bandung 40132

Tel/Fax : (022) 250-02-58; 251-15-75

E-mail : agus@bi.itb.ac.id

ABSTRACT

*Studies of the effect of allelochemicals or other insect growth regulator on the development of insect is difficult using parameter currently employed. By measuring the effect growth-inhibiting of seed crude extract of soursop seed, (*Annona muricata*); neem seed, (*Azadirachta indica*); and leaf crude extract of lantana, (*Lantana camara*) on the *Heliothis armigera* larvae, growth index (GI) and relative growth index (RGI) calculation are demonstrated in this paper.*

Key words: Growth Index, Relative Growth Index, Annona muricata, Azadirachta indica, Lantana camara, Heliothis armigera.

INTISARI

Kajian pengaruh alelokimia atau aktifitas senyawa penghambat pertumbuhan lainnya terhadap pertumbuhan serangga tidak mudah dilakukan dengan parameter yang biasa digunakan saat ini. Dengan mengukur pengaruh pertumbuhan larva *Heliothis armigera* akibat pemberian pakan buatan yang mengandung ekstrak kasar : biji sirsak, (*Annona muricata*); biji nimba, (*Azadirachta indica*); dan daun lantana, (*Lantana camara*), naskah ini menjelaskan cara perhitungan indeks pertumbuhan (GI) dan indeks pertumbuhan relatif (RGI).

Kata kunci: Indeks Pertumbuhan, Indeks Pertumbuhan Relatif, *Annona muricata*, *Azadirachta indica*, *Lantana camara*, *Heliothis armigera*.

PENDAHULUAN

Berbagai metode pengujian senyawa toksik terhadap serangga telah banyak dikembangkan, rancangan dan penerapan strategi dari setiap metode telah menjadi banyak perhatian para peneliti (Sinden *et al.*, 1988; Wolfson, 1988). Uji hayati merupakan metode umum yang digunakan untuk tujuan-tujuan tertentu, termasuk toksisitas akut, pengatur pertumbuhan (Berenbaum, 1986), pemilihan makanan (Lewis & van Enden, 1986), dan

pemilihan media oviposisi (Singer, 1986). Keragaman uji hayati dapat dilakukan, dari tingkatan populasi, individu hingga tingkat molekuler, dan dari kajian *in vivo* sampai *in vitro*. Dari berbagai metode yang diketahui, pada umumnya parameter-parameter yang digunakan kadangkala menyulitkan peneliti untuk menjelaskan, membandingkan, dan melakukan interpretasi hasil dari beberapa uji hayati. Contohnya perhitungan LD50, yang sangat umum digunakan untuk menentukan aktivitas senyawa kimia yang menyebabkan

toksitas akut, apakah dapat digunakan pula untuk menentukan suatu senyawa yang tidak memiliki toksitas akut, tetapi senyawa tersebut memiliki pengaruh menghambat pertumbuhan.

Berbagai parameter yang berbeda telah digunakan dalam kajian senyawa penghambat pertumbuhan serangga, misalnya Indeks Nutrisi yang dikembangkan Waldbauer (1968), dapat menjelaskan laju konsumsi pakan (pakan yang dimakan/hari/berat tubuh), dan laju pertumbuhan relatif (pertambahan berat tubuh/hari/rata-rata berat tubuh). Parameter-parameter tersebut akan sangat bervariasi dari satu instar dengan instar lainnya, atau dari satu jenis alelokimia dengan jenis lainnya.

Suatu populasi larva serangga yang mengkonsumsi makanan yang mengandung senyawa penghambat pertumbuhan biasanya memperlihatkan perbedaan atau distribusi individu pada setiap tahap bila dibandingkan dengan kontrolnya. Adanya variabilitas antar- instar membutuhkan suatu evaluasi fisiologi yang khusus, mudah untuk dijelaskan dan mudah untuk dibandingkan serta dapat cepat diinterpretasikan.

Perhitungan Indeks Pertumbuhan (Growth Index/GI) dan Indeks Pertumbuhan Relatif (Relative Growth Index/RGI) telah di usulkan oleh Zhang *et al.* (1993). Metode perhitungan GI dan RGI yang diusulkan sangat mudah dilakukan dan mudah digunakan untuk menjelaskan pengaruh suatu senyawa penghambat pertumbuhan serangga. Dasar pemikiran metoda perhitungan di atas adalah karakteristik pertumbuhan serangga yang ditandai dengan adanya pergantian kulit atau *molting*, dengan demikian instar dapat

dipakai sebagai dasar dari adanya suatu pertumbuhan. Pertumbuhan dari suatu serangga didefinisikan sebagai kemampuan untuk melakukan pergantian kulit, jumlah pergantian kulit memberikan indikasi kemajuan dari suatu pertumbuhan. Apabila seekor larva serangga tidak melakukan pergantian kulit, dapat dikatakan bahwa serangga tersebut tidak melakukan pertumbuhan. Apabila suatu populasi serangga mengkonsumsi pakan yang mengandung senyawa kimia penghambat pertumbuhan, maka pengaruhnya pada satu individu dengan individu lainnya seringkali berbeda, bahkan antara satu tahap dengan tahap lainnya akan terlihat perbedaan yang jelas bila dibandingkan dengan kontrolnya. Dengan demikian, suatu populasi yang pertumbuhannya terhambat akan memiliki individu-individu yang lebih banyak pada tahap awal, dan pada tahap berikutnya akan terlihat berbeda dengan kontrolnya, sehingga penghambat pertumbuhan akan sangat erat hubungannya dengan konsentrasi senyawa pada makanannya.

Berdasarkan alasan-alasan di atas, Zhang *et al.* (1993) menggunakan instar sebagai parameter dan mengusulkan GI dapat digunakan untuk menjelaskan pertumbuhan serangga. GI adalah hasil penjumlahan dari suatu tahap yang dicapai oleh individu-individu larva serangga pada kondisi percobaan, dibagi dengan hasil kali jumlah individu (N) larva uji dengan seluruh tahap. Misalnya suatu larva serangga mengalami 5 tahap instar dan 1 tahap pupa, dengan menggunakan tahap 1 adalah instar 1 dan tahap 6 untuk pupa, perhitungan GI adalah sebagai berikut :

$$GI = \frac{n_1 \times \text{instar 1} + n_2 \times \text{instar 2} + n_3 \times \text{instar 3} + \dots + n_6 \times \text{instar 6}}{N \times 6}$$

dengan : $n_1, n_2, n_3, \dots, n_6$ adalah jumlah individu pada tahap 1, 2, 3,dan 6.

$$N = n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_6$$

Dari perhitungan di atas, dapat dibuat persamaan (I) untuk menghitung GI, sebagai berikut:

$$GI = \frac{\sum_{i=1}^{i_{max}} [n_i \times i] + \sum_{i=1}^{i_{max}} [n'_i \times (i - 1)]}{N \times i_{max}} \dots\dots\dots(I)$$

dengan i adalah jumlah tahapan; n_i adalah jumlah larva yang hidup pada i ; n'_i adalah jumlah larva yang mati pada i ; i_{max} adalah tahap tertinggi yang dapat dicapai oleh serangga (disini $i_{max} = 6$, yaitu tahap pupa); dan N adalah jumlah larva awal yang digunakan dalam setiap kelompok.

Setelah perhitungan GI untuk setiap perlakuan didapat, RGI untuk setiap perlakuan dihitung berdasarkan persamaan (II) berikut :

$$RGI = \frac{GI \text{ dari suatu perlakuan}}{GI \text{ kontrol}} \dots\dots(II)$$

Larva yang tidak berkembang atau mati turut diperhitungkan dalam menentukan GI, karena larva yang ditemukan mati pada stadium i , larva tersebut pada kenyataannya masih berkembang pada tahap $(i - 1)$. Berdasarkan cara perhitungan di atas, GI didefinisikan sebagai suatu tingkatan pertumbuhan individu yang berdasarkan pengertian teori pertumbuhan optimum. RGI adalah tingkatan pertumbuhan relatif suatu individu dalam kelompok perlakuan terhadap pertumbuhan individu kelompok kontrol. Percobaan metode perhitungan GI dan RGI diuji dengan menggunakan ekstrak kasar biji sirsak, (*Annona muricata* L.), biji nimba, (*Azadirachta indica* L.), dan ekstrak kasar daun lantana, (*Lantana camara* L.) terhadap pertumbuhan *Heliothis armigera* Hubner.

BAHAN DAN METODE

Serangga. Larva serangga *Heliothis armigera* dikoleksi dari daerah Lembang, Bandung. Larva dipelihara pada

kondisi suhu kamar, kelembaban 50–70%, dan periode terang : gelap (12 : 12 jam). Larva instar awal dipelihara secara massal, setelah memasuki instar III, ditempatkan secara individu dalam botol plastik (t = 8 cm. ; Ø = 5 cm) yang diberi pakan buatan. Pakan buatan (dalam 1 liter air) terdiri atas : agar-agar 14 g; tepung jagung 40 g; tepung gandum 30 g; tepung kedele 40 g; tepung beras 20 g; maizena 40 g; gula pasir 40 g; asam sorbit 2 g; asam askorbat 8 g; vitamin Vanderzant 12 g; nipagin 2,5 g; minyak jagung 7 ml; formalin 1%, 8 ml; dan ragi 15 g (Permana, 1997; Chan *et al.*, 1978).

Pupa yang terbentuk ditempatkan dalam kandang pleksiglas transparan (p × l × t = 30 × 30 × 40 cm), seterusnya digunakan sebagai kandang untuk pemeliharaan serangga dewasa. Sebagai makanan, serangga *H. armigera* dewasa diberi larutan madu 5%, dan pada kandang tersebut ditempatkan kain kasa sebagai tempat oviposisi.

Uji Hayati. Ekstrak kasar biji sirsak, biji nimba dan daun lantana (dalam metanol) diperoleh dari Pusat Penelitian Antar- Universitas - Ilmu Hayati ITB. Masing-masing ekstrak dilarutkan kedalam pakan buatan, kemudian dikeringanginkan untuk menghilangkan metanol (Chan *et al.*, 1978). Larva *H. armigera* yang baru menetas dimasukkan ke dalam botol plastik (t = 8 cm. ; Ø = 5 cm; satu larva/botol),

botol tersebut telah diberi 4 g pakan buatan yang mengandung ekstrak dengan konsentrasi yang diinginkan. Sebagai kontrol, larva diberi pakan buatan yang tidak mengandung ekstrak.

Duapuluh larva digunakan untuk setiap konsentrasi ekstrak. Konsentrasi ekstrak kasar biji sirsak yang digunakan adalah 0,075%; 0,125%; 0,250%; 0,500%; 0,750%; 1,000%; dan 1,500%; konsentrasi ekstrak kasar biji nimba adalah : 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5%; 3,0%; 3,5%; dan 4,0%; sedangkan konsentrasi ekstrak kasar daun lantana adalah: 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 3,0%; dan 4,0%. Pertumbuhan larva *H. armigera* dan pakan yang tersedia diamati setiap hari. Setelah sekitar ≥95% larva pada perlakuan kontrol menjadi pupa, larva diklasifikasikan

berdasarkan tahapan instarnya. Dalam penelitian ini, *H. armigera* mengalami 5 tahap instar, dan pupa merupakan tahap ke-6. Perhitungan GI dan RGI dilakukan berdasarkan persamaan (I) dan (II).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1 memperlihatkan pengaruh ekstrak kasar biji sirsak terhadap pertumbuhan individu larva *H. armigera*.

Dengan memasukkan data tersebut pada persamaan (I) dan (II), GI dan RGI dapat dihitung. Sebagai contoh, larva *H. armigera* yang diberi pakan buatan dengan kandungan ekstrak biji sirsak 0,250%, perhitungan Indeks Pertumbuhannya (GI) adalah :

$$GI_{0,250} = \frac{(3 \times 6) + (2 \times 3) + (6 \times 4) + [3 \times (2-1)] + [3 \times (3-1)] + [3 \times (5-1)]}{20 \times 6} = \frac{69}{120} = 0,57$$

Tabel 1. Pengaruh Ekstrak kasar biji sirsak terhadap Pertumbuhan larva *H. armigera*.

Konsentrasi Ekstrak (%)	L 1		L 2		L 3		L 4		L 5		Jumlah Pupa Hidup
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	
0										2	18
0,075				1						4	15
0,125				3			4			5	8
0,250				3	2	3	6			3	3
0,500			2	5	3	4	4			1	0
0,750			3	5	3	5	4				0
1,000		6	2	6	3	3					0
1,500		14		6							0

Keterangan : L1 - L5, larva instar I s/d instar 5; H, larva yang ditemukan hidup normal; M, larva yang ditemukan mati; 20 larva digunakan untuk setiap konsentrasi.

Perhitungan nilai GI untuk kontrol adalah sbb. :

$$GI_{\text{kontrol}} = \frac{(18 \times 6) + [2 \times (5-1)]}{20 \times 6}$$

$$= \frac{116}{120} = 0,96$$

Berdasarkan persamaan (II), nilai RGI (Indeks Pertumbuhan Relatif) *H. armigera* yang diberi pakan ekstrak biji sirsak 0,075% adalah :

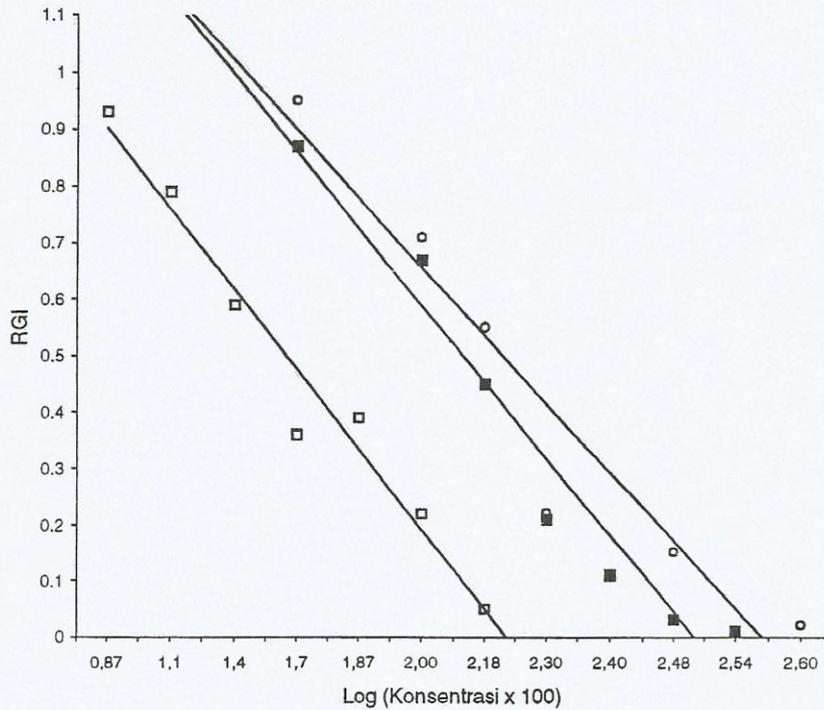
$$RGI_{0,075} = \frac{GI_{0,250}}{GI_{\text{kontrol}}} = \frac{0,57}{0,96} = 0,59$$

Pengaruh ekstrak kasar biji sirsak, biji nimba dan daun lantana terhadap GI dan RGI dari *H. armigera* secara ringkas dapat dilihat pada Tabel 2.

Dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak biji sirsak, nilai GI dan RGI semakin menurun, dan mortalitas larva *H. armigera* semakin meningkat. Analisis regresi linier (Zar, 1996) antara RGI dengan berbagai konsentrasi ekstrak tanaman, akan dapat menggambarkan nilai EC50 (konsentrasi yang dapat menurunkan pertumbuhan 50% dari populasi serangga uji) atau konsentrasi ekstrak yang menyebabkan 50% penurunan nilai RGI (Gambar 1).

Tabel 2. Nilai GI, RGI, larva *H. armigera* yang diberi beberapa ekstrak tanaman.

Ekstrak kasar	Konsentrasi (%)	GI	RGI
Biji sirsak	0,075	0,89	0,93
	0,125	0,76	0,79
	0,250	0,57	0,59
	0,500	0,35	0,36
	0,750	0,38	0,39
	1,000	0,21	0,22
	1,500	0,05	0,05
Biji nimba	0,5	0,83	0,86
	1,0	0,64	0,66
	1,5	0,43	0,45
	2,0	0,20	0,21
	2,5	0,10	0,10
	3,0	0,07	0,07
	3,5	0,00	0,00
Daun lantana	0,5	0,91	0,95
	1,0	0,68	0,71
	1,5	0,53	0,55
	2,0	0,21	0,22
	3,0	0,14	0,14
	4,0	0,02	0,02
Kontrol	-	0,96	-



Gambar 1. Pengaruh beberapa konsentrasi ekstrak terhadap RGI larva *H. armigera*.

Ekstrak kasar biji sirsak (—□—); $y = 1,044 - 0,142x$; $r^2 = 0,96$

Ekstrak kasar biji nimba (—■—); $y = 1,403 - 0,135x$; $r^2 = 0,95$

Ekstrak kasar daun lantana (—○—); $y = 1,384 - 0,121x$; $r^2 = 0,92$

Hasil perhitungan GI dan RGI dapat menggambarkan suatu nilai tingkat pertumbuhan serangga, dan uji hayati menggunakan perhitungan ini dapat dilakukan untuk mengetahui pengaruh suatu alelokimia terhadap penghambatan pertumbuhan larva serangga.

Ekstrak biji sirsak yang mengandung asetogenin (anonasin) telah diketahui dapat menyebabkan aktivitas biologis yang khusus terhadap serangga, seperti toksisitas akut, menghambat makan dan antiparasit (Rupprecht *et al.*, 1990; Rieser *et al.*, 1993). Ekstrak biji nimba diketahui mengandung berbagai senyawa bioaktif, seperti azadirachtin, nimbin, salanin dan nimbinene dapat menghambat pertumbuhan serangga, tidak terbentuknya pupa, sebagai *antifeedant* hingga terbentuknya serangga dewasa abnormal

(Banken & Stark, 1997; Koul *et al.*, 1996; Koul, 1992; Kraus *et al.*, 1980). Ekstrak daun lantana mengandung senyawa golongan triterpenoid, steroid, dan flavonoid dapat bersifat antimakan dan menghambat pertumbuhan berbagai serangga (Siddiqui *et al.*, 1995; Abeygunawardana *et al.*, 1991; Ahmed *et al.*, 1972).

Redfern (1985) telah melakukan perbandingan kuantitatif dari pertumbuhan serangga dalam pengujian hormon juvenil (JH) dan senyawa yang menyerupainya (JH mimic). Walaupun demikian, hasilnya masih sulit digunakan untuk menjelaskan adanya perbedaan hambatan pertumbuhan pada individu dalam satu kelompok uji. Lidert *et al.* (1987) menerapkan sistim skoring terhadap hambatan pertumbuhan larva dan pupa karena pengaruh berbagai

alelokimia dari bahan alam, hasilnya juga menunjukkan variasi yang sangat lebar karena adanya tanggapan yang berbeda di antara individu suatu populasi uji.

Penggunaan RGI dapat memperkecil pengaruh variasi individu dari suatu populasi uji, dan RGI juga dapat digunakan untuk mengukur pengaruh hambatan pertumbuhan serangga. Uji hayati dengan menggunakan perhitungan GI dan RGI relatif lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan metode lainnya yang telah diketahui. Beberapa hal di bawah ini dapat digunakan sebagai alasan keuntungan penggunaan perhitungan GI dan RGI.

Dengan menggunakan RGI, penentuan tingkat pengaruh suatu penghambat pertumbuhan serangga dapat dilakukan dengan lebih sederhana. Dalam suatu kajian senyawa penghambat pertumbuhan, seringkali ditemukan bahwa pada saat koleksi data hasil percobaan, individu-individu dalam satu kelompok uji memiliki perbedaan tahap/instar, dan seringkali ditemukan adanya kematian beberapa larva yang berhenti pertumbuhannya atau mati pada instar yang berbeda. Beberapa kesulitan seringkali dijumpai dalam analisis data hasil uji hayati menggunakan *relative growth rate*/laju pertumbuhan relatif (Waldbauer, 1968), maupun metode mortalitas. Kesulitan tersebut dapat diatasi dengan menghitung pengaruh penghambat pertumbuhan dengan cara GI dan RGI.

Dalam penentuan GI, individu-individu yang mati telah masuk dalam perhitungan. Pada metode uji hayati ini, jika satu larva ditemui mati pada instar tiga, larva tersebut masih hidup dan berkembang pada instar dua, sehingga larva yang hidup dan mati pada instar yang sama dikategorikan kedalam tahap perhitungan yang berbeda (persamaan II).

Selain itu, RGI dapat juga memberikan keterangan mengenai distribusi umur dari individu-individu pada kelom-

pok uji. RGI yang rendah menunjukkan bahwa banyak individu yang tidak dapat berkembang atau mati pada instar awal. RGI = 0 berarti tidak ada pertumbuhan atau seluruh larva mati pada instar satu. RGI = 1 atau mendekati 1, menunjukkan bahwa individu-individu pada kelompok uji mengalami pertumbuhan yang sempurna.

Perhitungan RGI tidak hanya menggunakan jumlah individu, tetapi tahap atau instar, sehingga dapat dikatakan bahwa kepekaan metode ini akan bertambah. Walaupun demikian, metode ini tidak dapat menjelaskan daya kerja suatu senyawa uji, sehingga penggunaan GI dan RGI sangat sesuai digunakan untuk uji hayati suatu ekstrak kasar yang biasanya memiliki pengaruh yang lebih lemah daripada suatu senyawa aktif (pada ekstrak kasar konsentrasi senyawa aktif lebih rendah).

GI dan RGI dapat digunakan untuk analisis dan membandingkan pengaruh beberapa alelokimia terhadap satu spesies serangga, bahkan terhadap beberapa spesies serangga. Selain itu metode ini dapat juga dikembangkan untuk kajian interaksi tanaman inang dengan herbivora, seperti pemilihan inang dan inang resisten (Zhang *et al.*, 1993). Perhitungan GI dan RGI akan dapat menambah analisis hasil pengujian dengan menggunakan parameter uji EC50/LC50.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari hasil penelitian Evaluasi Fisiologis Senyawa Penghambat Pertumbuhan Serangga yang dibiayai oleh Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Dasar, No. 11/PPID/DPPM/96/1996, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia. Terima kasih kepada Dadang K. Darusman (PPAU

Ilmu Hayati ITB), atas bantuan dalam pembuatan ekstrak dan Drs. Saefudin (PPAU Ilmu Hayati ITB), untuk bantuan koleksi dan pengembangbiakan serangga *H. armigera*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeygunawardana, C., V. Kumar, D.S. Marshal & H. Ronald. 1991. Furanonaphthoquinones from Two *Lantana* Species. *Phytochemistry*. 30: 041-945.
- Ahmed, Z.F., A.M. Shoib, G.M. Wassel & S.M. El-Sayyad. 1972. Phytochemical Study of *Lantana camara*. *Planta Medica*. 22: 34-37.
- Banken, J.A.O. & J.D. Stark. 1997. Stage & Age Influence on the Susceptibility of *Coccinella septempunctata* (Coleoptera : Coccinellidae) after Direct Exposure to Neemix, a Neem Insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 90: 1102-1105.
- Barnby, M.A. & J.A. Klocke. 1987. Effect of Azadirachtin on The Nutrition and Development of the Tobacco Budworm, *Heliothis armigera* (Fabr.). *J. Insect Physiol.* 33: 69-75.
- Berenbaum, M. 1986. Postingestive Effect of Phytochemicals on Insect: On Paracelsus and Plant Products, p. 121-153, In: Miller, J.R. & T.A. Miller (eds.), *Insect-Plant Interaction*: Plenum Press, New York.
- Chan, B.G., A.C. Waiss Jr., W.L. Stanley & A.E. Goodban. 1978. A Rapid Diet Preparation Method for Antibiotic Phytochemical Bioassay. *J. Econ. Entomol.* 71: 366-368.
- Grainge, M. & S. Ahmed. 1987. *Handbooks of Plant with Pest Control Properties*. John Wiley, New York.
- Koul, O., J.S. Shankar & R.S. Kapil. 1996. The Effect of Neem Allelochemicals on Nutritional Physiology of Larval *Spodoptera litura*. *Entomol. Experimentalis et Applic.* 79: 43-50.
- Koul, O. 1992. Neem Allelochemicals and Insect Control, p.389-412, In: Rizvi, S.J.H. & V. Risvi (eds.), *Allelopathy : Basic and Applied Aspects*. Chapman & Hall, London.
- Kraus W., C. Cramer, M. Bokel & G. Sawitzki. 1980. New Insect Antifeedants from *Azadirachta indica* and *Melia azedarach*, p. 53-62, In: Schmutterer, H., K.R.S. Ascher & H. Rembold (eds.), *Natural Pesticides from the Neem Tree (Azadirachta indica A. Juss.)*. Proc. of the first Internat. Neem Conf.. Rottach-Egern, Federal Republic of Germany.
- Lewis, A.C. & H.F. van Enden. 1986. Assays for Insect Feeding, p. 95-119. In: Miller, J.R. & T.A. Miller (eds.), *Insect-Plant Interaction*. Plenum Press, New York.
- Lidert, Z., K. Wing, Y. Polansky, Y. Imakura, M. Okano, S. Tani, M.Y. Lin, H. Kiyokawa & K.H. Lee. 1987. Insect Antifeedant and Growth Inhibitory Activity of Forty-six Quassinoids on Two Species of Agricultural Pests. *J. Nat. Prod.* 50: 442-448.
- McLaughlin, J.L., C.L. Chang & D.L. Smith. 1991. Bench-Top Bioassays for the Discovery of Bioactive Natural Products : An Update, In: Atta-Ur-Rahman (ed.), *Studies in Natural Product*. Vol. 9.
- National Research Council. 1992. *Neem: A Tree for Solving Global Problem*. National Academy Press. Washington DC.
- Permana, A.D. 1997. *Evaluasi Fisiologis Senyawa Penghambat Pertumbuhan Serangga*. Laporan Akhir Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan & Teknologi Dasar DPPM-DIKTI. 20 p.
- Redfern, R.E. 1985. Insect Bioassays, p.479-516, In: Mandava N.B. (ed.). *CRC Handbook of Natural Pesticides: Methods. Vol. 1, Theory, Practices, and Detection*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Rieser, M.J., X.P. Fang, J.K. Rupperecht, Y.H. Hui, D.L. Smith & J.L. McLaughlin. 1993. Bioactive Single-Ring Acetogenins from Seed Extracts of *Annona muricata*. *Planta Med.* 59: 91-92.

- Rupprecht, Y.H. Hui & J.L. McLaughlin. 1990. Annonaceous Acetogenin: A Review. *J. Nat. Prod.* 53: 237-278.
- Siddiqui, B.S., S.M. Raza, S. Begum, S. Siddiqui & S. Firdous. 1995. Pentacyclic Triterpenoids from *Lantana camara*. *Phytochemistry* 38: 681-685.
- Singer, M.C. 1986. The Definition and Measurement of Oviposition Preference in Plant-Feeding Insect, p. 66-94, In: Miller, J.R. & T.A. Miller (eds.), *Insect-Plant Interaction*. Plenum Press, New York.
- Sinden, S.L., L.L. Sanford, W.W. Cantello & K.L. Deahl. 1988. Bioassays of Segregating Plant, A Strategy for Studying Chemical Defenses. *J. Chem. Ecol.* 14: 1941-1950.
- Waldbauer, G.P. 1968. The Consumption and Utilisation of Food by Insects. *Adv. Insect Physiol.* 5: 229-288.
- Wolfson, J.L. 1988. Bioassay Technique, an Ecological Perspective. *J. Chem. Ecol.* 14: 1951-1963.
- Zar, J.H. 1996. *Biostatistic Analysis 3rd ed.* Prentice Hall Int. Inc. p. 353-369.
- Zhang, M., K. Swapan, Chaudhuri & I. Kubo. 1993. Quantification of Insect Growth and Its Use in Screening of Naturally Occurring Insect Control Agents. *J. Chem. Ecol.* 19: 1109-1118.