

## **APLIKASI *HELICOVERPA ARMIGERA* NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS SUBKULTUR (*HANPV<sub>1</sub>*) PADA *ECTROPIS BURMITRA***

**Mia Miranti, Ratu Safitri, Melanie, dan Nurullia Fitriani**

Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Padjadjaran

Jl. Raya Bandung Sumedang Km 21, Jatinangor 45363

Korespondensi : mia.miranti.r@unpad.ac.id

### **Abstrak**

*Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus (*HaNPV*) telah diproduksi pada larva *Spodoptera litura*. Virus hasil produksi tersebut adalah *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus Subkultur atau *HaNPV<sub>1</sub>*. Penelitian dilakukan menggunakan metode deskriptif eksplorasi dengan menginfeksi larva instar dua, tiga dan empat *Ectropis burmitra* (ulat jengkal daun teh) dengan sediaan *HaNPV<sub>1</sub>* yang dioleskan pada pakan larva dengan konsentrasi virus yang digunakan sebesar  $4 \times 10^2$ ,  $4 \times 10^4$  dan  $4 \times 10^6$  polihedra/ml. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat kematian larva instar dua, tiga dan empat *Ectropis burmitra* yang diinfeksi virus dengan konsentrasi  $4 \times 10^2$ ,  $4 \times 10^4$  dan  $4 \times 10^6$  polihedra/ml antara 80%-100%. Efektivitas infeksi *HaNPV<sub>1</sub>* hingga 100% pada larva *E. burmitra* instar dua untuk semua konsentrasi infeksi. Akan tetapi semakin tua instar larva, tingkat kematian turun menjadi 80% pada larva instar tiga dan empat yang diinfeksi *HaNPV<sub>1</sub>* dengan konsentrasi sebesar  $4 \times 10^2$  polihedra/ml. Pada konsentrasi virus sebesar  $4 \times 10^6$  polihedra/ml seluruh larva instar dua, tiga dan empat mencapai tingkat kematian 100%. Tingkat kematian yang tinggi terjadi pada larva ini karena *E. burmitra* masih satu ordo dengan *H. armigera* (sebagai inang utama *HaNPV*) dan *S. litura* yaitu Ordo Lepidoptera

Kata Kunci : *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus Subkultur (*HaNPV<sub>1</sub>*), *Spodoptera litura*, *Ectropis burmitra*, Polihedra, Instar..

### **PENDAHULUAN**

Penggunaan insektisida biologis terutama patogen virus, sudah mulai banyak dilakukan di beberapa negara seperti Amerika Serikat, dan Australia. Virus serangga merupakan salah satu alternatif insektisida yang ramah terhadap lingkungan. Virus ini secara alami bersifat patogen terhadap serangga dan mempunyai target yang relatif spesifik hanya pada beberapa spesies inang serangga tertentu, sehingga tidak akan mengganggu spesies serangga non target atau organisme lain (Bonning *et.al.*, 1992; Hawtin *et.al.*, 1992, Moscardi, 1999). Selain itu, penggunaan virus serangga tidak memungkinkan munculnya populasi serangga target yang resisten (Enwistle dan Evans, 1985; Bell dan Hayes, 1994) dan sebagai insektisida, sediaan kasar virus ini dapat dibuat sendiri oleh petani dengan memanfaatkan kadaver larva yang telah mati oleh virus serangga.

Penelitian terdahulu, telah berhasil mengisolasi *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus (*HaNPV*) dan isolat virus tersebut diketahui memiliki patogenitas yang tinggi pada *Helicoverpa armigera* (Utari, 2000 ; Miranti, 2001). Miranti, *et al.*, (2007), juga menemukan bahwa beberapa spesies serangga hama seperti *Spodoptera litura*, *Spodoptera exigua*, dan *Crocidolomia pavonana* juga sensitif terhadap infeksi *HaNPV*, sehingga *HaNPV* memiliki potensi yang sangat baik untuk digunakan sebagai agensia pengendali populasi *Helicoverpa armigera* dan beberapa spesies serangga hama lainnya pada kisaran terbatas.

Beberapa hasil penelitian yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa *HaNPV* memiliki patogenitas yang tinggi terhadap *H. armigera* dan penggunaannya secara berulang tidak mengakibatkan munculnya respons kekebalan pada *H. armigera*, sehingga virus ini sangat potensial untuk digunakan sebagai insektisida pengendali populasi *H. armigera*. Meskipun virus ini juga potensial untuk mengendalikan beberapa spesies serangga hama lain, akan tetapi, penyediaan virus ini masih terkendala dengan cara produksi *HaNPV* secara komersial dan ekonomis untuk diaplikasikan pada tingkat petani sayuran. Hal ini karena untuk produksi *HaNPV* yang paling ekonomis adalah secara *in vivo*, yaitu menggunakan inang hidup (Indrayani, *et al.*, 1993). Produksi *HaNPV* pada inang utama larva *H. armigera* memerlukan biaya yang lebih tinggi karena larva bersifat kanibal, harus dipelihara secara individual dan waktu panen virus memerlukan waktu yang lama (sekitar 7-14 hari) (Miranti, 2008). Berdasarkan hal itu maka dibutuhkan inang lain sebagai media untuk memproduksi *HaNPV*. Inang pengganti yang terpilih sebagai media perbanyak *HaNPV* terutama harus sensitif terhadap

infeksi *HaNPV*, dapat dipelihara secara berkelompok dan berukuran tubuh relatif lebih besar daripada ukuran tubuh larva *H. armigera*. Selain itu, *HaNPV* harus mampu bereplikasi membentuk polihedra (Polyhedral Inclusion Body/PIB). Dengan demikian, *HaNPV* dapat diproduksi dalam jumlah besar untuk penggunaan secara komersial dan biaya produksi lebih ekonomis.

Pada penelitian ini telah dilakukan produksi *HaNPV* secara *in vivo* dengan menggunakan inang pengganti sebagai media perbanyakan virus. Inang pengganti yang potensial sebagai medium perbanyakan virus adalah larva *Spodoptera litura* (Lepidoptera). Larva serangga ini rentan terhadap infeksi *HaNPV*, dapat dipelihara secara berkelompok, berukuran tubuh besar dan *HaNPV* dapat membentuk polihedra. Selanjutnya, virus yang dihasilkan dari hasil penelitian ini akan diaplikasikan dalam skala laboratorium terhadap larva *Ectropis burmitra* (ulat jengkal daun teh) untuk mengetahui sensitivitas dari larva tersebut terhadap infeksi *HaNPV<sub>1</sub>*.

## METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini spesies serangga yang digunakan untuk produksi *HaNPV* adalah *Spodoptera litura*. Larva serangga yang digunakan sebagai target untuk perlakuan percobaan adalah *Ectropis burmitra* (ulat jengkal pada tanaman teh). Larva serangga yang digunakan pada penelitian ini diambil dari Balai Penelitian Tanaman Teh-Gambung Jawa Barat.

Larva serangga ini dipelihara secara individual didalam pot zalp berukuran 75 g dengan penutup yang diberi lubang untuk sirkulasi udara. Makanan yang diberikan selama pemeliharaan adalah pakan alami dengan pemberian/penggantian makanan dilakukan setiap hari.

Virus serangga yang digunakan pada penelitian ini adalah *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus (*HaNPV*). Virus ini merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, FMIPA-Universitas Padjadjaran. Sediaan virus ini diperbanyak pada larva *S. litura* dengan cara sebanyak 30 gram pakan dicampur dengan 1 ml suspensi virus dengan konsentrasi  $4 \times 10^5$  PIB/ml. Pakan yang telah dikontaminasi virus dikeringanginkan dan diberikan pada larva.

Virus hasil perbanyakan pada larva *S. litura* disebut *HaNPV<sub>1</sub>* dan dimurnikan untuk pembuatan suspensi stok virus. Larva yang mati dipanen dan virus yang terkandung didalam larva tersebut kemudian diekstraksi dengan cara sebagai berikut.

Kadaver larva *S. litura* sebanyak 40 ekor dilumatkan dengan menggunakan mortar dan homogenatnya diencerkan dengan 10 ml larutan Tris buffer 1 mM, pH 7.6 dan 10 ml 0.1% SDS. Suspensi ini selanjutnya disaring dengan menggunakan dua lapis kain muslin dan supernatan yang dihasilkan disimpan pada suhu 4 °C (lemari pendingin) selama 24 jam. Setelah 24 jam suspensi ditambah masing-masing 7 ml larutan di atas dan disentrifugasi pada 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang dan pelet diresuspensi dengan 10 ml campuran Tris Buffer 1 mM, pH 7.6, dan SDS 0,1% dengan perbandingan 1:1 serta disentrifugasi kembali pada 3500 rpm selama 15 menit. Perlakuan ini diulangi hingga tiga kali. Supernatan dari proses pencucian terakhir dibuang dan pelet yang terbentuk diresuspensi dengan 5 ml NaCl fisiologis yang mengandung 0.02% natrium azida. Virus dihitung dengan menggunakan bilik hitung Neubauer di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Polihedra virus berbentuk bular dengan warna kehijauan.

Konsentrasi virus, yang dinyatakan dalam jumlah polihedra/ml di dalam sediaan ini dihitung dengan rumus berikut :

$$PIB = \frac{N}{0.02} \times p \times 10^3$$

Dimana PIB adalah konsentrasi virus dalam sediaan (PIB/ml), *N* adalah jumlah polihedra yang terhitung pada 5 kotak besar (80 kotak kecil) pada hemositometer, 0,02 adalah volume ( $\mu$ l) dari 5 kotak besar (80 kotak kecil) pada hemositometer, *p* adalah tingkat pengenceran sampel dan  $10^3$  adalah angka konvensi dari ml ke  $\mu$ l. Sediaan virus ini kemudian diencerkan dengan air gula 10 % untuk mendapatkan konsentrasi sediaan virus yang diinginkan pada saat akan digunakan pada percobaan. Konsentrasi virus yang digunakan sebesar  $4 \times 10^2$ ,  $4 \times 10^4$  dan  $4 \times 10^6$  polihedra/ml.

Metode deskriptif juga digunakan untuk aplikasi *HaNPV<sub>1</sub>* pada larva instar dua, tiga dan empat serangga uji yang digunakan yaitu ulat jengkal (*Ectropis burmitra*) yang banyak menyerang tanaman teh. Setiap instar larva dimasukkan dalam toples plastik berukuran bulat dengan diameter 5 cm dan tinggi 8 cm. Setiap jenis larva dimasukkan masing-masing sebanyak satu ekor. Perlakuan diulang sepuluh kali, sehingga jumlah

keseluruhan satuan percobaan ada 90 plot percobaan. Jumlah total masing-masing spesies larva serangga hama yang didedahkan pada percobaan ini adalah 90 ekor. Variabel pengamatan yang diukur adalah tingkat kematian larva.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Produksi *HaNPV<sub>1</sub>* pada Larva *Spodoptera litura*

Produksi *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus (*HaNPV<sub>1</sub>*) pada larva *Spodoptera litura* dilakukan dengan menghitung jumlah polihedra yang dihasilkan dari kadaver larva dimurnikan dengan metode Indrayani, (1993) dan Oreilly, (1994), yang telah dimodifikasi. Hasil produksi polihedra pada larva *S. litura* sebesar  $0,18 \times 10^8$  Polihedra/ml.

Beberapa peneliti menyebutkan bahwa polihedra virus yang berhasil dibentuk dalam tubuh larva inang pengganti menunjukkan bahwa larva tersebut sesuai sebagai tempat perbanyakan virus (Reid, et al., 1994 ; Finnerty, et al., 1994 ; Oreilly, et al., 1994). Meskipun demikian, jumlah polihedra yang dihasilkan tersebut sangat berkaitan dengan jumlah sel yang terkandung dalam tubuh larva. Teakle dan Byrne, (1989), menyatakan bahwa semakin besar tubuh larva maka akan semakin banyak jumlah polihedra yang dihasilkan.

Produksi virus hasil penelitian ini, selanjutnya diaplikasikan pada larva ulat jengkal (*E. burmitra*) yang sering menyerang tanaman teh dengan cara menginfeksi larva ulat jengkal tersebut dengan sediaan virus secara peroral.

### 2. Aplikasi *HaNPV<sub>1</sub>* pada Larva *Ectropis burmitra* yang didedahkan pada tanaman teh di laboratorium

Larva *Ectropis burmitra* merupakan serangga hama yang menyerang tanaman teh. Pada penelitian ini, sediaan *HaNPV<sub>1</sub>* dicoba untuk diinfeksi pada larva ini. Konsentrasi virus yang diinfeksi sebesar  $4 \times 10^2$  Polihedra/ml,  $4 \times 10^4$  Polihedra/ml dan  $4 \times 10^6$  Polihedra/ml, diberikan secara peroral pada larva *E. burmitra* instar dua, tiga dan empat, sebanyak lima ekor per perlakuan. Hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tingkat kematian (%) Larva *E. burmitra* instar dua, tiga dan empat yang diinfeksi *HaNPV<sub>1</sub>*

Instar larva	Konsentrasi infeksi		
	$4 \times 10^2$	$4 \times 10^4$	$4 \times 10^6$
Dua	100%	100%	100%
Tiga	80%	90%	100%
empat	80%	90%	100%

Kemampuan *HaNPV<sub>1</sub>* menginfeksi larva *E. burmitra* ternyata dapat mencapai 100%. Rata-rata waktu kematian dimulai pada hari keempat setelah infeksi hingga hari ketigabelas setelah infeksi. Larva instar dua, tiga dan empat masing-masing menunjukkan waktu kematian rata-rata pada hari ketigabelas. Semakin tinggi konsentrasi infeksi, waktu kematian semakin cepat. Larva instar dua, tiga dan empat yang diinfeksi *HaNPV<sub>1</sub>* pada konsentrasi  $4 \times 10^2$  Polihedra/ml rata-rata waktu kematian berturut-turut terjadi pada hari ketigabelas setelah infeksi. Akan tetapi larva instar dua, tiga dan empat yang diinfeksi *HaNPV<sub>1</sub>* dengan konsentrasi  $4 \times 10^6$  Polihedra/ml menunjukkan rata-rata waktu kematian berturut-turut pada hari ke 11, ke 12 dan ke 10 setelah infeksi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tua instar larva, waktu kematian akan semakin cepat seiring dengan semakin tinggi konsentrasi infeksi. Hal ini karena semakin tua instar larva, konsentrasi virus yang termakan akan semakin besar. Hasil dari penelitian ini sesuai dengan penelitian Miranti, (2008), yang menemukan bahwa larva *S. litura* yang diinfeksi *HaNPV<sub>1</sub>* dengan konsentrasi  $4 \times 10^5$  Polihedra/ml menunjukkan kecenderungan pola kematian yang sama yaitu menunjukkan waktu kematian yang lebih cepat pada larva instar empat dibandingkan pada larva instar tiga.

Berdasarkan hasil penelitian ini, diketahui bahwa *HaNPV<sub>1</sub>* ternyata dapat menginfeksi larva *E. burmitra*. Hal ini karena larva *E. burmitra* masih satu ordo dengan *H. armigera* dan *S. litura*. Adanya kemampuan *HaNPV<sub>1</sub>* menginfeksi *E. burmitra* menunjukkan bahwa *HaNPV<sub>1</sub>* potensial untuk digunakan sebagai agensia pengendali populasi larva *E. burmitra* di perkebunan teh.

## SIMPULAN, SARAN, DAN REKOMENDASI

Berdasarkan hasil penelitian ini, didapatkan kesimpulan sebagai berikut :

*Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus (*HaNPV*) dapat diproduksi pada larva *Spodoptera litura* dan virus ini dapat membentuk polihedra virus dengan jumlah polihedra tertinggi dihasilkan sebesar  $0,18 \times 10^8$  Polihedra/ekor.

*HaNPV* hasil subkultur (*HaNPV<sub>1</sub>*) ini diuji pada larva instar dua, tiga dan empat *Ectropis burmitra* pada konsentrasi infeksi sebesar  $4 \times 10^2$ ,  $4 \times 10^4$  dan  $4 \times 10^6$  Polihedra/ml, menunjukkan tingkat kematian larva masing-masing antara 80-100%. Semakin tinggi instar larva dan semakin rendah konsentrasi *HaNPV<sub>1</sub>* akan menyebabkan tingkat kematian larva semakin rendah. Pada konsentrasi  $4 \times 10^6$  polihedra/ml, tingkat kematian seluruh instar larva mencapai 100%.

Berdasarkan hasil penelitian ini, diketahui bahwa *HaNPV<sub>1</sub>* ternyata dapat menginfeksi larva *E. burmitra*. Hal ini karena larva *E. burmitra* masih satu ordo dengan *H. armigera* dan *S. litura*, sehingga *HaNPV<sub>1</sub>* potensial untuk agensia pengendali populasi larva *E. burmitra* di perkebunan teh.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih pada Dr. Merry Antralina atas bantuan penyediaan larva *Ectropis burmitra*. Penelitian ini dapat berlangsung dengan bantuan dana penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2009-2011, melalui dana DIPA Universitas Padjadjaran, Dirjen Dikti Kementerian Pendidikan Nasional.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bell, M.R and Hayes, J.L., 1994. Area Management of Cotton Bollworm and Tobacco Budworm (Lepidoptera noctuidae) Through Application of a Nuclear Polyhedrosis Virus on Early Season Alternate Host. *Journal of Economy and Entomology*. 87/1.54-57.
- Bonning, B.C., M.Hirst, R.D. Possee, and B.D.Hammock. 1992. Further Development of a Recombinant Baculovirus Insecticide Expressing The Enzyme Juvenile Hormon Esterase from *H. virescens*. *Insecticides Biochemistry Molecular Biology*. 22.453-458.
- Enwistle, P.F. and Evans, H.F., 1985. Viral Control, in : *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Oxford : Pergamon Press. 347-412.
- Finnerty, C.M., R.R. Granados, P.R. Hedges, and A.C. Bellotti. 1994. Bioassay of Several Baculoviruses for Virus-Induced Mortality in *Manduca sexta* Larvae and Induction of Infection-Specific Protein. *Journal of Invertebrate Pathology*. 63. 140-144.
- Hawtin, R.E., L.A. King, and R.D. Possee. 1992. Prospects for The Development of a Genetically Engineered Baculovirus Insecticide. *Pesticides Sciences*. 34. 9-15.
- Indrayani, I.G.A.A., Subiyakto, dan G. Kartono. 1993. Teknik Perbanyak *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus (*HaNPV*). *Prosiding Simposium Patologi Serangga*. 12-13 Oktober 1993. UGM-Yogyakarta. 163-170.
- Miranti, M., E. Santosa, R. Setiamihardja, dan W. Niloperbowo. 2007. Kajian tentang Patogenitas *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus pada Beberapa Spesies Serangga. *Prosiding Perhimpunan Entomologi Indonesia*. 10-11 April 2007. Sukamandi.
- Miranti, M. 2008. Produksi *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus (*HaNPV*) secara *In Vivo* pada Inang Pengganti. *Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran*.
- Moscardi, F. 1999. Assesment of The Application of Baculoviruses for Control of Lepidoptera. *Annual Review Entomology*. 44. 257-289.
- O'Reilly, D.R., L.K. Miller, and V.A. Luckow. 1994. *Baculovirus Expression Vectors : A Laboratory Manual*. Oxford University Press : New York.
- Teakle, R.E., and V.S. Byrne. 1989. Nuclear Polyhedrosis Virus Production in *Heliothis armigera* Infected at Different Larval Ages. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53. 21-24.