

PATOGENESITAS *SpltMNPV* (*Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus) YANG
DIPERBAYAK PADA SEL EPITHEL MIDGUT DI BERBAGAI REKULTURE TERHADAP
MORTALITAS LARVA *Spodoptera litura* INSTAR 3

Oleh
Mahanani Tri Asri¹, Siti Rasminah Ch. Sy²., Bambang Tri Rahardjo³.,
Sutiman B. Sumitro⁴

ABSTRAK

Spodoptera litura multiple nucleopolyhedrosis virus merupakan patogen serangga yang potensial sebagai bioinsektida. Virus ini dapat digunakan untuk mengendalikan hama *Spodoptera litura* pada tanaman kedelai. Selama ini perbanyakan *SpltMNPV* dilakukan dengan menggunakan inang aslinya yaitu larva *S. litura*. Akan tetapi pengembangan virus pada inang aslinya banyak mengalami kendala, sehingga dikembangkan perbanyakan *SpltMNPV* menggunakan kultur sel epitel larva *S. litura* yang dapat direkulture berkali-kali. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui patogenesis *SpltMNPV* yang diperbanyak pada sel epitel larva *S. litura* pada berbagai rekulture terhadap mortalitas larva *S. litura* instar 3.

SpltMNPV hasil panen dari berbagai rekulture sel (R2, R3, R4 dan R5 serta kontrol) selanjutnya diinfeksi pada *S. litura* dengan dosis $7,8 \times 10^7$ PIBs/ml. Larva *S. litura* dipelihara di laboratorium dengan menggunakan pakan buatan. Penelitian ini diulang sebanyak 3 kali, setiap ulangan digunakan ulat sebanyak 10 ekor. Data yang diperoleh berupa persentase mortalitas dianalisis menggunakan anova 1 arah, dan bila signifikan dilanjutkan dengan uji BNT.

Berdasarkan hasil analisis anova 1 arah menunjukkan bahwa *SpltMNPV* yang diperbanyak pada berbagai rekulture sel berpengaruh secara nyata (signifikan). Hasil uji BNT menunjukkan bahwa kontrol berbeda dengan semua perlakuan, tetapi antar perlakuan (R2, R3, R4 dan R5) tidak menunjukkan adanya perbedaan.

Kata kunci : Patogenesis, *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis virus (*SpltMNPV*), sel epitel midgut. rekultur

Keterangan : 1 Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Surabaya Jl. Ketintang Surabaya
2, 3. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Minat Hama dan Penyakit
Tumbuhan Jl. MT. Haryono Malang 4. Jurusan Biologi. FMIPA. Universitas
Brawijaya Jl. MT. Haryono Malang

- Artikel ini telah di seminarkan di Seminar dan Workshop: Lab.MIPA Terpadu Unesa Surabaya. Waktu; 24 – 25 November 2012
- Disertai dengan scan sertifikat di halaman terakhir.

I. PENDAHULUAN

Spodoptera litura merupakan salah satu hama tanaman pertanian yang penting terutama pada tanaman kedelai. Hama ini dikenal sebagai serangga perusak daun yang memiliki kisaran inang yang cukup variatif. Tanaman inang dapat diserang antara lain : tembakau, kapas, kedelai, padi, jarak, kacang tanah, tomat, tebu, cabai, bawang, kentang, kubis, buncis, kangkung dan beberapa spesies gulma (Sudarmo, 1987). Hama ini menyerang tanaman dalam jumlah yang banyak sehingga kerusakan yang ditimbulkan menjadi tinggi dalam terjadi dalam waktu yang singkat. Serangga ini juga sudah resisten dengan beberapa insektisida kimiawi. Salah satu alternatif dalam mengatasi masalah tersebut adalah dengan menggunakan teknik pengendalian biologi, berupa bioinsektisida dari golongan bakteri, jamur atau virus, yang pada dasarnya adalah penyakit endemik dari hama tersebut.

Virus yang sedang dikembangkan sebagai bioinsektisida adalah *SpltMNPV* (*Spodoptera litura* multiple nucleopolyhedrosis virus) yang berdasar penelitian Asri dkk (2005) efektif mengendalikan *Spodoptera litura* dengan mortalitas 80 – 90% pada konsentrasi 10^7 PIBs/ml di *greenhouse* dan di Laboratorium efektif pada konsentrasi 10^6 PIBs/ml (Asri, 2004).

Perbanyakan agensia hayati tersebut secara konvensional dilakukan secara *in vivo* yaitu menggunakan inang hidup berupa ulat *S. litura*/ulat grayak. Cara pembiakan virus seperti ini kurang efektif karena tergantung pada kelimpahan ulat di lapang, atau tergantung pada musim tanam tanaman inang. Selain itu untuk memperbanyak inang di laboratorium membutuhkan persyaratan yang cukup rumit dengan tingkat kegagalan mencapai 70%. Sehingga metode ini untuk skala besar seperti untuk perusahaan tidak efektif karena ‘kontinuitas’ inang dari virus tidak terpenuhi. Untuk itu sekarang telah dikembangkan metode baru yaitu dengan mengkultur sel insekta terutama *S. litura*, sebagai inang untuk virus. Kultur sel insekta bisa digunakan untuk menghasilkan berbagai macam bioproduk seperti produksi bioinsektisida virus (baculovirus) dalam skala besar untuk pertanian.

Kultur sel primer insekta dapat dilakukan pada sel epithel midgut larva *S. litura* instar lima. Sel tersebut dapat ditumbuhkan pada medium Ex-cell, Dulbecos, RPMI dan campuran antara Dulbecos dan RPMI dengan diperkaya fetal bovine serum serta pada media Ex-cell tanpa tambahan fetal bovine serum. Sel ini dapat direkulture sebanyak 27 kali, dapat digunakan untuk memperbanyak *SpltMNPV*. *SpltMNPV* yang dihasilkan dari perbanyakan menggunakan sel primer ini diperoleh jumlah polyhedra *SpltMNPV* sebanyak 2,5 Polyhedra/sel (Asri dan Nur, 2007). Dalam penelitian ini bertujuan untuk menguji patogenesitas *SpltMNPV* yang diperbanyak

pada sel epitel midgut larva *S. litura* hasil rekulture ke 2, 3, 4 dan 5 terhadap mortalitas larva instar 3.

II. METODE PENELITIAN

A. Peralatan dan Bahan Penelitian

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan utama dan peralatan pendukung. Peralatan utama terdiri dari : inkubator, mikroskop inverted, mikroskop stereo, Laminar Air Flow (LAF), inkubator, sterilisator kering (oven), autoclave, sentrifuse, magnetik stirer, membran millipore. Peralatan pendukung terdiri dari : cawan petri, cawan kultur, jarum pentul, stereofom, tabung sentrifuse, alat bedah mikro, spuit, Aluminium foil, penyaring bakteriologis, penyaring nilon ukuran T 100 dan 150.

Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah medium Ex-cell, Posphat Buffer saline, enzim tripsin, *SpltMNPV* isolat Wonosobo Jawa Tengah, larva *Spodoptera litura* instar 3, pakan buatan untuk larva *S. litura*, Bayclin, Na_2CO_3 Alkohol 70% sebagai agen pensteril, antibiotik penisilin-treptomisin, gentamisin dan antifungi berupa Amfoterisin-B serta akuades.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian ekperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap, 1 faktor yaitu *SpltMNPV* yang diperbanyak pada berbagai rekulture sel (R2,R3,R4 dan R5). Penelitian ini bertujuan untuk menguji patogenesitas *SpltMNPV* yang diperbanyak pada berbagai rekulture sel dengan konsentrasi $7,8 \times 10^7$ PIB's/ml terhadap larva *S. litura* instar 3, penelitian ini diulang sebanyak tiga kali dan setiap ulangan menggunakan 10 ekor larva, di beri perlakuan sebagai berikut : A. *SpltMNPV* hasil perbanyakan rekulture sel ke-2, B. *SpltMNPV* hasil perbanyakan rekulture sel ke-3 C. *SpltMNPV* hasil perbanyakan rekulture sel ke-4, dan , D. *SpltMNPV* hasil perbanyakan rekulture sel ke-5 serta G. Kontrol (Akuades). Hasil dari penelitian ini dianalisis dengan uji parametrik berupa Anova 1 arah dan apabila hasilnya signifikan diteruskan dengan uji beda nyata terkecil (BNT).

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan sel primer epitel midgut larva *S. litura* dan rekulture sel primer

Larva *S. Litura* instar 5 awal hasil pemeliharaan di laboratorium dengan pakan buatan, terlebih dahulu dibersihkan dengan menggunakan bayclin, antibiotik dan PBS (*posphat buffer saline*). Selanjutnya dilakukan pembedahan untuk mengambil midgut larva dengan menggunakan alat bedah mikro dan diamati di bawah mikroskop stereo. Jaringan epitel midgut larva yang terambil dicuci dengan PBS dan dipotong-potong sampai halus di dalam PBS. Potongan midgut

larva ditripsinasi dengan perbandingan 1 : 1 antara larutan tripsin (0,25%) dengan cairan PBS + midgut, sambil distirer selama 1 jam dalam suhu hangat. Hasil tripsinasi disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit, dengan tujuan untuk mengendapkan sel yang telah terdispersi. Selanjutnya dilakukan pengamatan di bawah mikroskop inverted untuk mengetahui apakah sel-sel epitel midgut sudah terdispersi apa belum, apabila belum terdispersi maka tripsinasi diulangi lagi. Hasil sentrifus selanjutnya supernatannya di buang sebagian, endapan ditambahkan medium Ex-cell dan difilter dengan menggunakan penyaring nilon dengan ukuran T 100 dan T150 untuk memisahkan sel epitel dengan jaringan yang tidak terdispersi. Sel-sel epitel midgut dalam medium pertumbuhan ditanam pada cawan kultur (disposable) berukuran 3 ml. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 30° C sampai sel membentuk monolayer dan siap diinfeksi dengan *SpltMNPV*.

2. Persiapan *SpltMNPV* yang akan diinfeksi

SpltMNPV murni hasil pembiakan *in vivo* dihitung dulu konsentrasinya dengan menggunakan *Haemocytometer*. Dengan konsentrasi yang bisa digunakan untuk penginfeksian adalah $1,1 \times 10^6$ PIBs/ml. Oleh karena *SpltMNPV* dalam bentuk polyhedra yang ukurannya relatif besar (bisa dilihat dengan menggunakan mikroskop biasa perbesaran 400x) dan dalam keadaan tidak steril, maka PIB's ini harus dipecah terlebih dahulu dengan menggunakan larutan alkalis yaitu Na_2CO_3 0,5M dan dimagnetic stirer (diputar di atas magnetik stirer) selama 1 jam (virusnya berukuran kurang lebih 1 mikrometer, lebih kecil dari sel primer berukuran kurang lebih 2,5 mikrometer). Selanjutnya diamati di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400 kali apabila virusnya sudah tidak terlihat berarti PIB'snya telah pecah dan virus dalam bentuk multiplenucleocapsid. Virus yang dalam bentuk multiplenucleocapsid ini lolos dari saringan membran filter ukuran 0,22 mikron, sehingga dapat diinfeksi ke sel dalam kultur.

3. Penginfeksian *SpltMNPV* pada berbagai rekulture sel epitel usus larva *S. litura*

Untuk menjaga sterilitas larutan virus sebelum virus dituang/diinfeksi dalam medium yang ditumbuhi sel primer epitel usus *S. litura* pada berbagai rekulture. Larutan *SpltMNPV*- Na_2CO_3 difiltrasi dengan membran filter bakteriologis (pori-pori 0,22 mikron) dan ditetaskan pada medium kultur sel primer. Dosis sel awal yang digunakan adalah $7,6 \times 10^7$ PIB/ml. Sel hasil rekulture ke 2, 3, 4 dan 5 diinfeksi dengan *SpltMNPV* sebanyak $1,1 \times 10^6$ Multiple nukleocapsid/ml. Selanjutnya medium kultur yang telah diinfeksi diinkubasi pada suhu 30°C. Setiap hari kultur sel terinfeksi diamati perkembangannya. Kultur yang jumlah selnya mulai sedikit-mendekati habis dan jumlah polyhedra virusnya banyak maka polyhedra virus siap

dipanen (sekitar 3 hari inkubasi). Perbanyakkan diteruskan pada rekulture sel yang diperlakukan (R2, R3, R4 dan R5) sampai mendapatkan jumlah PIB yang cukup untuk perlakuan.

2. Isolasi *SpltMNPV* pada berbagai rekulture sel

Apabila sel (bentuk bulat –oval berinti sel, dan berukuran cukup besar) dalam cawan kultur telah berubah menjadi PIB'S (bentuknya bulat-agak segi empat, terang tanpa inti sel, dan lebih kecil) artinya selnya telah dilisis oleh *SpltMNPV* biasanya pada inkubasi hari ke-3. Maka *SpltMNPV* siap untuk diisolasi/dipanen. Sel sisa dirontokkan dengan cara dispuir dan dikembalikan berulang-ulang maka media menjadi homogen antara *SpltMNPV* dan debris sel. Semua media beserta isinya diambil dan dimasukkan dalam tabung sentrifuse untuk dimurnikan. Suspensi media dan virus tersebut disentrifuse pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan dan peletnya jangan dibuang karena mengandung virus *SpltMNPV* hasil isolasi ini yang akan digunakan untuk perlakuan.

3. Persiapan *SpltMNPV* untuk perlakuan

Perlakuan A. *SpltMNPV* hasil perbanyakkan rekulture sel ke-2, B. *SpltMNPV* hasil perbanyakkan rekulture sel ke-3 C. *SpltMNPV* hasil perbanyakkan rekulture sel ke-4, dan D. *SpltMNPV* hasil perbanyakkan rekulture sel ke-5 G. Kontrol (Akuades). *SpltMNPV* yang diperoleh dari hasil isolasi virus pada berbagai rekulture sel tersebut, selanjutnya dihitung jumlah PIBsnya dengan menggunakan haemocytometer yaitu pada konsentrasi $7,8 \times 10^7$ PIB's/ml.

4. Perlakuan

Pada penelitian ini perlakuan berupa virus yang sudah disiapkan pada point 3 di atas diinfeksi ke larva *S. litura* instar 3 di laboratorium. Larva terinfeksi virus dipelihara secara individual di botol vial dengan menggunakan pakan buatan. Larva *S. litura* diinfeksi *SpltMNPV* dengan cara kontaminasi permukaan pakan. Pakan Buatan (Formula dari Ballitas Malang) diletakkan pada botol vial plastik (diameter 3 cm dan tinggi 3,5 cm)) dengan volume pakan 2,5 ml (ketinggian kurang lebih 2-3 ml). Selanjutnya ditetesi dengan larutan *SpltMNPV* sebanyak 0,1 ml dan larva *S. litura* instar 3 dimasukkan dalam botol vial tersebut dan diletakkan di meja penelitian sesuai dengan *lay out* yang telah ditetapkan. Mortalitas larva setiap harinya diamati dan dicatat sebagai data penelitian serta morfologi larva, prepupa, pupa dan imago juga diamati sebagai data pendukung.

III. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian berupa patogenesitas *SpltMNPV* yang diperbanyak pada berbagai sekulture sel epitel midgut larva *S. litura* terhadap mortalitas larva *S. litura* instar 3. Konsentrasi *SpltMNPV* yang digunakan adalah $7,8 \times 10^7$ PIB's/ml dan diinfeksi dengan metode kontaminasi pakan. Perlakuan diulang tiga kali dan setiap ulangan ada 10 ekor larva. Diperoleh hasil seperti terlihat dalam Tabel 1. sebagai berikut:

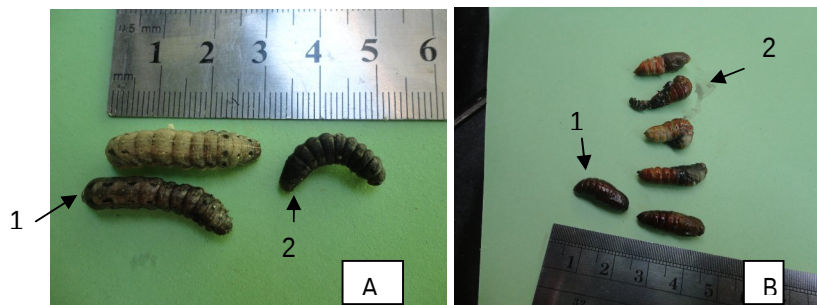
Tabel 1. Jumlah larva *S. litura* yang mati karena diinfeksi dengan *SpLtMNPV* hasil perbanyakan in vitro dosis $7,8 \times 10^7$ PIB^s/ml

Perlakuan	Jumlah <i>S. litura</i> yang mati/Ulangan				
	1	2	3	$\sum S.litura$ yang mati /30 <i>S.litura</i>	%
Kontrol	1	0	1	2/30	6,7
F2	7	5	8	20/30	67
F3	6	6	7	19/30	63
F4	5	6	8	19/30	63
F5	6	6	6	18/30	60

Berdasarkan Tabel 1 di atas terlihat bahwa mortalitas tertinggi dicapai pada *SpltMNPV* yang diperbanyak pada rekulture ke-dua dari sel epitel midgut larva *S. litura* yaitu sebanyak 67%. Berikutnya menyusul rekulture ke-3, ke-4 dengan mortalitas 63% dan yang terkecil diperoleh pada rekulture ke-5. Dari hasil tersebut terdapat kecenderungan semakin banyak rekulturenya patogenesitas *SpltMNPV* semakin menurun.

Berdasarkan hasil analisis kuantitatif menggunakan anova 1 arah menunjukkan bahwa perlakuan yang dicobakan memberikan pengaruh yang signifikan terhadap mortalitas larva *S. litura* (F hitung 37,740 > F .Tab 0,05). Pada uji lanjut menggunakan BNT (beda nyata terkecil) menunjukkan bahwa kontrol berbeda dengan semua perlakuan, tetapi antar perlakuan (R2,R3,R4 dan R5) memberikan pengaruh yang sama terhadap mortalitas larva *S. litura* . Mortalitas yang ditimbulkan oleh *SpltMNPV* yang diperbanyak pada rekulture sel ke-2, ke-3, ke-4 dan ke-5 secara berurutan adalah 67%, 63%, 63% dan 60%. Mortalitas yang ditimbulkan tersebut sudah melebihi batas minimal pengendalian hama yaitu 50%. Dengan mortalitas seperti yang dihasilkan

dalam penelitian ini diharapkan kerusakan tanaman akibat hama ini dapat dikurangi dan siklus hidup dari hama ini dapat diputus. Dalam penelitian ini mortalitas tersebut diperoleh rata-rata pada hari ke 16-18 yaitu kematian diamati sampai pada tahap awal pembentukan imago. Sisa dari ulat *S. litura* yang masih bertahan hidup menjadi prepupa, pupa (kepompong) dan imago (ngengat) banyak yang tidak normal. Prepupa yang tidak normal berwarna abu-abu dengan beberapa sekat diabdomen mengecil sementara prepupa yang normal berwarna hitam gelap kedua ujungnya meruncing, ukurannya mengecil, serta cenderung melengkung. Pupa yang terinfeksi virus juga tidak normal, beberapa mati dan yang hidup berukuran lebih kecil, dengan warna yang memucat, gerak lamban, dan bentuk pupa tidak normal. Imago yang terinfeksi virus sayapnya keriting (tidak dapat terbang), tidak mampu bertelur, dan cepat mati (3 hari mati). Berikut ini gambar prepupa dan pupa yang normal dan tidak normal;



Gambar 1. Prepupa (A) dan Pupa (B) normal dan tidak normal (terinfeksi *SpltMNPV*)
Keterangan: 1. Prepupa/pupa normal dan 2. Prepupa/pupa normal

Mortalitas larva *S. litura* yang diinfeksi dengan *SpltMNPV* hasil perbanyakan berbagai rekulture sel epitel larva *S. litura* ternyata setelah diuji BNT tidak menunjukkan perbedaan. Hal ini disebabkan karena virus yang dihasilkan dengan metode tersebut kemungkinan tidak berubah susunan material genetiknya sebagai salah satu penentu virulensi virus, sehingga virulensi yang dihasilkan tidak berubah. Material genetik virus yang tetap stabil walaupun dibiakkan pada sel yang ditumbuhkan diluar inangnya sangat penting untuk menjaga patogenesitas virus apabila virus tersebut akan digunakan di lapang sebagai bioinsektisida. Kestabilan materi genetik diperoleh karena virus tersebut tetap dibiakkan pada sel hidup yang sesuai dengan inang aslinya yaitu larva *S. litura*. Selain itu dengan tidak adanya perbedaan antar perlakuan memberikan kemudahan bagi produsen virus yang perbanyakan menggunakan teknik *in vitro*.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan data di atas terlihat bahwa *SpltMNPV* yang diperbanyak pada berbagai rekulture sel berpengaruh secara nyata (signifikan). Hasil uji BNT menunjukkan bahwa kontrol berbeda dengan semua perlakuan, tetapi antar perlakuan (R2,R3,R4 dan R5) tidak menunjukkan

adanya perbedaan. Patogenesitas *SpLtMNPV* yang diperbanyak pada berbagai rekulture sel dapat mematikan larva *S. litura* melebihi batas minimal pengendalian hayati yaitu lebih dari 50%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa *SpLtMNPV* yang diperbanyak dengan cara ini dapat digunakan sebagai bioinsektisida untuk mengendalikan larva *S. litura*.

DAFTAR PUSTAKA

Asri, M.T, Fida R.Yuliani, Evie R dan Herlina F. 2005. Pengaruh *Beauveria bassiana* dan *SpLtMNPV* terhadap Larva *S. litura* pada Tanaman Jarak. Unesa. Surabaya

Asri, M.T. 2004. Perbanyak *SpLtMNPV* Secara In Vivo Pada Larva *S. litura*. Unesa. Surabaya

Asri, M.T dan Nur Ducha. 2007. Upaya Perbanyak *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (*SpLtMNPV*) Sebagai Bioinsektisida Secara In Vitro Dengan Teknik Kultur Sel Insekta. Laporan Penelitian Hibah Bersaing. Tidak di Publikasi UNESA. Surabaya

Sudarmo, Subiyakto. 1987. Mengenal Serangga Hama Kapas Dan Pengendaliannya. Yogyakarta: Kanisius.

Sertifikat pemakalah dari artikel ini

