

Kajian histologis infeksi SINPV terhadap berat badan dan kerusakan membran peritrofik larva *Spodoptera litura*

YAYAN SANJAYA^{1,✉}, DADANG MACHMUDIN²,
NANIN DIAH KURNIAWATI²

Sanjaya, Machmudin D, Kurniawati ND. 2011. Histological study of SINPV infection on body weight and peritrophic membrane damage of Spodoptera litura larvae.

The effect of SINPV infection on body weight and peritrophic membrane damage of *Spodoptera litura* Fab. larvae has been carried out. The method was used Probit analysis, and based on LD 50 the virus was infected to know body weight and post infection damage. The damage of histological structure caused by SINPV (0, 315, 390, 465, 540 dan 615 PIB/mL) was investigated after 0, 12, 24, 72 and 96 hours post infection. The histological material was prepared by using parafin method after fixation with Bouin Solution, then slice into 7 um and colored with Hematoxilin-Eosin. The result showed that the exposure SINPV cause decreasing food consumption especially on 540 PIB/mL give average rate as amount of 0.1675 mg. The descriptive observation on structural intact of peritrophic membrane histology caused by SINPV infection shows a tendency to decrease, while in control, there was no damage at all. The longer the exposition of virion in the midgut lumen the more damage on peritrophic membrane occurred. The severest damage occurred 96 hour after infection. The result prove that haNPV virion can destroy histological structure of midgut.

♥ Alamat korespondensi:

¹ Program Studi Pendidikan Biologi,
Universitas Pendidikan Indonesia
(UPI). Jl. Setia Budhi No. 229,
Bandung 40154, West Java, Indonesia;
Tel./Fax.: +62-22-201383; email:
yayan229@yahoo.com

Manuskrip diterima: 21 Agustus
2009. Revisi disetujui: 8 November
2009.

♥♥

Edisi bahasa Indonesia dari:
Sanjaya, Machmudin D, Kurniawati
ND. 2010. Histological study of
SINPV infection on body weight
and peritrophic membrane damage
of *Spodoptera litura* larvae.
Nusantara Bioscience 2: 135-140

Key words: SINPV, *Spodoptera litura*, LD50, consumption rate, peritrophic membrane

Sanjaya, Machmudin D, Kurniawati ND. 2011. Kajian histologis infeksi SINPV terhadap berat badan dan kerusakan membran peritrofik larva Spodoptera litura.

Pengaruh infeksi SINPV pada berat badan dan kerusakan membran peritrofik larva *Spodoptera litura* Fab. telah dilakukan. Metode yang digunakan adalah analisis probit, dan berdasarkan LD 50 virus yang terinfeksi untuk mengetahui berat badan dan kerusakan pasca infeksi. Kerusakan struktur histologi yang disebabkan oleh infeksi SINPV (0, 315, 390, 465, 540 dan 615 PIB/mL) diamati setelah 0, 12, 24, 72 dan 96 jam pasca infeksi. Preparasi histologis dibuat dengan metode parafin setelah fiksasi dengan larutan Bouin, kemudian diiris setebal 7 um dan diwarnai dengan Hematoxilin-Eosin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan SINPV menyebabkan penurunan konsumsi pangan terutama pada 540 PIB/mL dengan rata-rata 0.1675 mg. Pengamatan deskriptif pada struktur histologi membran peritrofik yang terkena infeksi SINPV menunjukkan kecenderungan kerusakan, sementara pada kontrol tidak ada kerusakan sama sekali. Semakin lama paparan virion di dalam lumen midgut maka semakin tinggi terjadinya kerusakan membran peritrofik. Kerusakan paling parah terjadi 96 jam setelah infeksi. Hasilnya membuktikan bahwa virion haNPV dapat menghancurkan struktur histologi midgut.

Kata kunci: SINPV, *Spodoptera litura*, LD50, tingkat konsumsi, membran peritrophic

PENDAHULUAN

Salah satu konsep utama dari PHT adalah menjaga populasi jenis serangga hama agar tidak melebihi nilai ambang ekonomi dan menjaga fauna lainnya agar tidak terganggu, sehingga keseimbangan ekosistem tetap terpelihara (*Bonning dan Hammock 1996*). Organisme ini secara alami bersifat patogen terhadap larva serangga dengan target yang spesifik sehingga tidak mengganggu jenis serangga dan jenis

lainnya yang bukan target. Selain itu, agensia ini sangat virulen, mudah menyebar di dalam populasi dan dapat persisten dalam jangka waktu yang lama apabila kondisi lingkungan memungkinkan (*Teakle et al. 1994*).

Beberapa virus yang menyerang tanaman ternyata dapat memataikan serangga hama, misalnya anggota genus *Baculovirus* yang sering disebut *Nuclear Polyhedrosis Virus* (NPV) (*Yamagishi et al. 2003; Maramorosch 2007*). *Moscardi (1994)* menyatakan bahwa aplikasi

baculovirus cukup efektif sebagai agen kontrol serangga untuk hama Lepidoptera. NPV dapat menyerang beberapa larva Lepidoptera pemakan daun yang merusak berbagai tanaman. Sampai saat ini sekitar 700 virus telah diisolasi dan diidentifikasi dari serangga dan binatang arthropoda lainnya. Virus-virus arthropoda sebagian besar masuk dalam enam genera virus yaitu Baculovirus, Poxivirus, Iridivirus, Enterovirus dan Rhabdovirus (Cristian 1994). Menurut Barbehenn dan Marin (1994), Baculovirus bekerja spesifik dan menginfeksi beberapa jenis serangga, biasanya dari famili yang sama.

NPV dapat menekan serangan ulat *Spodoptera exigua* (SeNPV) yang menyerang daun bawang merah hingga 84% (Sutarya 1996). Penggunaan NPV pada tanaman tomat mampu menekan serangan ulat *Heliothis sp* hingga 65% dan menyelamatkan hasil panen yang hilang hingga 83% (Novizan 2004). Virus ini merupakan patogen yang mematikan karena dapat merusak membran peritrofik pada daerah usus tengah serangga jenis Lepidoptera. Granados dan Corsaro (1990) mengemukakan bahwa ketika virus menginfeksi usus tengah serangga, struktur histologis membran peritrofik yang sangat vital dalam proses pencernaan diperkirakan mengalami kerusakan, sehingga proses pencernaan terganggu dan pada akhirnya menurunkan berat larva.

Penelitian mengenai keberadaan membran peritrofik dalam melawan serangan patogen pada beberapa larva Lepidoptera telah dilaporkan. Di antaranya adalah mekanisme pertahanan larva *Trichoplusia ni* terhadap infeksi virus dengan membentuk membran peritrofik (Wang dan Granados 1998). Larva *Glossina morsitans-morsitans* juga membentuk membran peritrofik untuk melawan infeksi *Trypanosoma* (Lehane dan Msangi 1991). Menurut Utari (2000), keutuhan struktur histologi membran peritrofik pada larva *Helicoverpa armigera* akibat infeksi HaNPV menurun sejalan dengan meningkatnya dosis infeksi.

Penelitian mengenai infeksi NPV terhadap beberapa larva serangga Lepidoptera telah dilaporkan, namun penelitian mengenai pengaruh NPV terhadap daerah membran peritrofik pada usus tengah larva *S. litura* belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh infeksi SINPV terhadap berat badan dan kerusakan membran peritrofik pada larva instar-5 *S. litura*.

BAHAN DAN METODE

Penentuan Lethal Dose (LD) 50

Dalam penelitian ini digunakan 5 dosis perlakuan dengan 1 macam dosis kontrol. Dosis ini ditentukan berdasarkan kisaran LD₅₀ dengan tingkat kepercayaan 95%. Pada percobaan ini digunakan 6 larva uji untuk masing-masing perlakuan dengan 4 kali ulangan; pengamatan dilakukan sampai stadia pra-pupa. Tahapan pemberian insektisida virus tidak berbeda dengan metode yang dilakukan pada studi awal.

Spodoptera littoralis Nuclear Polyhedrosis Virus (SINPV) diberikan ke larva uji melalui metode pakan yang telah ditetesi suspensi virus sebanyak 10 µL dengan dosis yang telah ditentukan. Sebelumnya larva dilaparkan selama 24 jam. Keesokan harinya seluruh larva diberi pakan segar tanpa pemberian suspensi SINPV. Untuk kontrol, larva diberi pakan tanpa ditambahkan suspensi virus, namun ditetesi akuades.

Setiap hari selama 8 hari dicatat kematian larva yang teramati dari setiap perlakuan. Waktu yang dibutuhkan virus dalam berinteraksi dengan inangnya membutuhkan waktu beberapa hari sejak terjadinya infeksi hingga larva mati.

Pengamatan berat larva

Pengamatan ini dilakukan dengan tujuan ingin mengetahui ada tidaknya perubahan berat larva akibat infeksi SINPV pada larva *Spodoptera litura*. Pengamatan ini diawali dengan memisahkan larva instar 4 akhir yang telah berhenti makan. Apabila telah mengalami pergantian kulit, maka larva tersebut ditimbang berat tubuhnya kemudian dipisahkan secara individual dalam masing-masing botol pot zalp dengan sepotong makanan yang telah diberi suspensi virus. Pengamatan tahap ini diakhiri ketika pengamatan mortalitas pun berakhir. Selanjutnya berat akhir larva ditimbang kembali.

Pembuatan sediaan histologis

Pembuatan sayatan melintang membran peritrofik dilakukan berdasarkan Utari (2000) yang telah dimodifikasi. Larva instar-5 *S. litura* diambil usus tengahnya pada 0, 24, 48, 72, 96 jam setelah diinfeksi menggunakan dosis infeksi berdasarkan nilai LD₅₀ SINPV dari hasil penelitian, menggunakan silet tajam. Untuk memperoleh potongan yang baik, larva dijerat dalam larutan Bouin's di atas bantalan lilin. Bagian usus depan dan usus belakang tusuk dengan jarum. Sekitar lima menit setelah

perendaman, larva yang telah mati diangkat dari bantalan lilin, lalu usus tengahnya diambil. Selanjutnya usus tengah difiksasi di dalam larutan Bouin's selama 24 jam. Keesokan harinya, dilakukan proses dehidrasi dengan alkohol bertingkat, yaitu: 70%, 80%, 90%, 96%, dan 100% secara berturut-turut, masing-masing selama tiga jam.

Penjernihan organ dilakukan dengan merendam objek dalam alkohol 100%: xilol. Organ yang telah jernih, kemudian diinfiltrasi dalam parafin pada suhu 48°C selama 30 menit, 52°C selama 60 menit, dan 56°C selama 90 menit. Selanjutnya organ ditanam dalam parafin sampai beku, lalu disayat melintang setebal 8 um. Pita sayatan ditempel pada gelas objek yang telah diberi perekat albumin Mayer's. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan HE dengan cara merendam obyek selama 40 menit dalam xilol murni, alkohol 100%, 96%, dan 80% masing-masing selama 3 menit, alkohol 70% selama 30 menit, pewarna HE selama 2 menit, air 6 menit, alkohol 70%+ 3 tetes HNO₃ sebanyak dua kali celupan, alkohol 70% dan 80% masing-masing selama 3 menit, Eosin Y selama 25 menit, alkohol 96% sebanyak 3 celupan, alkohol 100% sebanyak dua kali masing-masing selama 6 menit, xilol murni selama 10 menit, kemudian diberi entelan dan ditutup dengan kaca penutup.

Pengamatan membran peritrofik

Pada pengamatan penelitian ini analisis data dilakukan secara deskriptif. Hasil sayatan penampang melintang dan memanjang usus tengah diamati di bawah mikroskop. Pengamatan terhadap struktur membran peritrofik pada nilai LD₅₀ dilakukan pada 0, 24, 48, 72 dan 96 jam setelah diinfeksi oleh SINPV. Penentuan tingkat kerusakan akibat SINPV dilakukan secara deskriptif berdasarkan ada tidaknya kerusakan membran peritrofik, sel regeneratif dan membran basal.

Analisis data

Untuk mengetahui dosis yang dapat menyebabkan kematian serangga sebanyak 50% (LD₅₀) maka jumlah individu larva *S. litura* yang mati akibat terinfeksi SINPV dicatat setiap hari beserta pengulangannya sampai stadia pre-pupa. Selanjutnya data mortalitas yang diperoleh dianalisis menggunakan Analisis Probit Polo-PC (Utari 2000). Perhitungan terhadap berat larva menggunakan uji ANAVA dengan memenuhi persyaratan harus normal dan homogen. Uji

homogenitas menggunakan uji Bartlet dan dilanjutkan dengan uji Normalitas.

Apabila dalam perlakuan kontrol terdapat kematian larva, maka data mortalitas dikoreksi menggunakan rumus formula Abbot's (Busvhine 1972), yaitu:

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

Pt: Persentase banyaknya serangga yang mati setelah dikoreksi (%)

Po: Persentase banyaknya serangga yang mati untuk setiap perlakuan serangga

Pc: Persentase banyaknya serangga yang mati pada kontrol

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan terhadap Lethal Dosis (LD) larva *S. litura* instar-5 tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai LD₁₀, LD₅₀ dan LD₉₀ terhadap larva instar-5 *S. litura* pada berbagai dosis SINPV.

LD	Nilai LD	Fiducial limit 95%
10	277	156,26-341,63
50	438	365,06-491,06
90	692	595,39-1011,18

Keterangan: Nilai fiducial limit 95% menunjukkan kisaran batas atas dan batas bawah dari insektisida SINPV yang diperoleh dengan Analisis Probit Polo-PC dengan tingkat kepercayaan 95%.

Dari data mortalitas yang diamati setiap harinya, ternyata gejala awal larva *S. litura* terinfeksi SINPV sudah mulai tampak pada 24 jam setelah perlakuan (hari ke-1) dengan nilai LD 50 sebesar 438/Inclusion Body (OB) memiliki kisaran 365,06-491,06/OB. Seperti yang dikemukakan oleh Rohrmann (1994) bahwa untuk menimbulkan pengaruh yang terjadi pada inang, jumlah *inclusion body* yang diperlukan berkisar antara 50-ribuan per serangga. Bila dilihat dari banyaknya dosis yang diberikan selama perlakuan yaitu berkisar 315-615 PIB/mL, jumlah tersebut sudah masuk ke dalam kisaran rentang dosis yang mampu menyebabkan virus untuk menginfeksi di dalam tubuh serangga inangnya. Hal ini ditunjukkan dengan respon kematian larva yang terjadi.

Selain jumlah PIB, mortalitas larva *S. litura* juga dapat dipengaruhi oleh tahapan perkembangan larva, suhu dan spesies serangga

(Cristian 1994). Menurut Dibyantoro (1996), suhu optimum bagi perkembangan larva adalah 23-24°C dengan kelembaban relatif sebesar 60-65%, sedangkan berdasarkan hasil pengukuran selama penelitian di Laboratorium Struktur Hewan-UPI Bandung diperoleh kisaran suhu antara 24-26°C dengan kelembaban relatif sebesar 59-67%. Faktor lingkungan tersebut masih berada dalam batas normal bagi perkembangan larva sehingga sangat kecil kemungkinannya apabila faktor tersebut berpengaruh terhadap kematian larva *S. litura*.

Selain banyaknya PIB yang masuk, suhu dan spesies serangga dapat mempengaruhi mortalitas larva, faktor tahapan perkembangan juga turut andil. Menurut Gothama *et al.* (1990); Laoh *et al.* (2003), pada larva muda organ tubuhnya masih lemah, terutama usus tengah yang merupakan sasaran primer serangan patogen, sehingga NPV lebih mudah menembus organ tersebut dan merusak sel-sel yang rentan. Sedangkan pada larva instar lanjut, kepekaan larva akan berkurang sejalan dengan perkembangan berat dan tubuh serta umur larva. Organ-organ dan jaringan tubuh larva mengalami perkembangan dan diferensiasi. Dinding usus, membran peritrofik dan integumen semakin tebal dan kuat, sehingga semakin sulit ditembus oleh NPV.

Adapun mekanisme terjadinya infeksi hingga menyebabkan kematian pada larva diawali dengan tertelannya polihedra yang masuk bersama makanan ke dalam tubuh serangga yang selanjutnya akan dicerna di dalam usus tengah serangga. Kemudian membran yang membungkus polihedra tersebut akan melarut di dalam usus tengah serangga karena kondisi basa pada daerah tersebut. Tahap selanjutnya, virion akan melakukan fusi dengan membran plasma dan menembus membran peritrofik atau sel-sel epitel usus tengah yang merupakan target primer infeksi NPV. Di dalam sitoplasma, virion akan melepaskan nukleokapsid. Nukleokapsid yang tersisa selanjutnya akan masuk ke dalam nukleus sambil melepaskan DNANYa dan membentuk stroma virogenik. Dalam kondisi inilah, virion tersebut melakukan replikasi atau memperbanyak diri di dalam inti sel inangnya. Selanjutnya inti sel yang telah terinfeksi membesar, kemudian lisis dan mengeluarkan turunan virion baru hasil replikasi virus.

Bila terjadi infeksi secara terus-menerus, hal ini akan merusak seluruh jaringan usus dan

kondisi di dalam jaringan hemolimfa akan terlihat keruh karena penuh cairan NPV yang merupakan hasil replikasi virion-virion yang baru terbentuk di dalam hemosol (rongga tubuh) dan jaringan lainnya seperti sel epidermis, sel lemak dan trakea (Bedjo *et al.* 2005). Jaringan yang terinfeksi tersebut dipenuhi oleh virion-virion yang menyebabkan sel menjadi lisis. Akhirnya pada tahap lanjut larva akan mati setelah sebagian besar jaringan tubuhnya terinfeksi oleh NPV.

Dari hasil pengamatan terhadap gejala yang ditimbulkan oleh larva serangga setelah diberi perlakuan tampak bahwa terjadi perubahan pada tubuh serangga setelah diinfeksi oleh SINPV. Gambaran perubahan gejala awal hingga larva mati pada semua perlakuan relatif sama kecuali pada kontrol. Mula-mula tubuh larva tampak berwarna merah terutama pada bagian perut dan mengkilat, lalu membengkak, larva akan malas bergerak dan nafsu makannya berkurang (Wigglesworth 1984). Bila disentuh terasa lembek dan mengeluarkan cairan dari tubuhnya yang keruh dan berbau. Gejala ini relatif sama dengan gejala yang ditimbulkan pada larva *Helicoverpa armigera* yang terinfeksi NPV (Laoh *et al.* 2003). Sedangkan kematian yang terjadi pada kontrol tidak menunjukkan gejala seperti yang telah disebutkan sebelumnya. Kondisi morfologi larva masih tetap, namun larva tersebut malas makan, tampak dari sisa pakan yang masih ada berbeda dengan larva yang lainnya.

Di samping kemampuan NPV sebagai virus serangga dalam membunuh inangnya sebagai respon langsung karena aktivitas biologi, ternyata dampak atau akibat yang muncul secara tidak langsung terhadap larva yang terinfeksi juga terlihat pada larva yang berhasil lulus hidup berupa respon "*debilitating effect*" (Pawana 2000). Dampak ini berupa perubahan kualitas inang, seperti tingkat kepekaan terhadap patogen yang lain, penurunan kapasitas reproduksi, fertilitas, rasio seks dan ukuran tubuh yang lebih kecil.

Serangga sebagai inang dari baculovirus tentunya memiliki potensi untuk melakukan pertahanan diri terhadap serangan patogen (Blum 1985). Selain itu serangga juga dapat mengembangkan tingkat toleransinya (Sanjaya 2000). Pada serangga dewasa, efek merugikan akibat serangan patogen diatasi dengan adanya respon *apoptosis*. Respon tersebut dapat mencegah virus untuk dapat bermultiplikasi dan mencegah penyebaran infeksi ke seluruh tubuhnya.

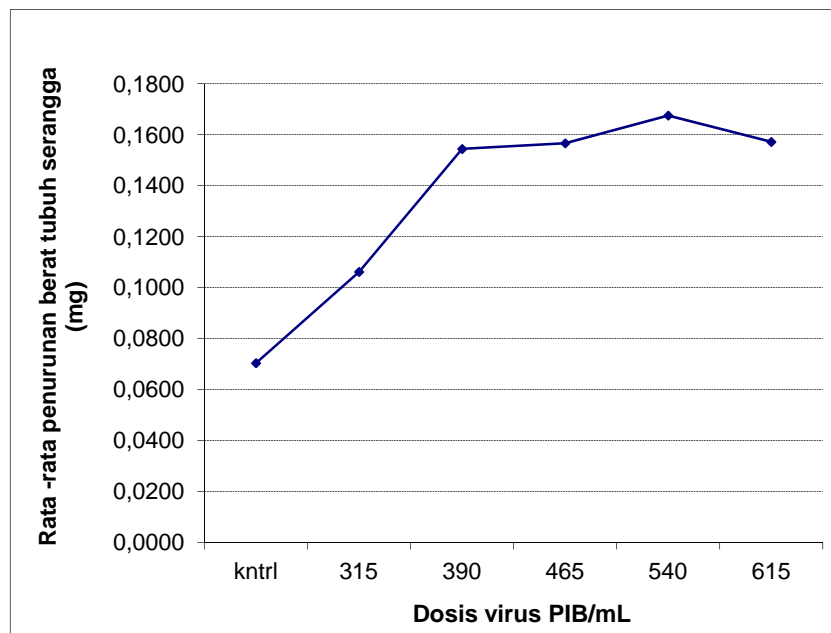
Di samping larva yang mati akibat infeksi virus, ternyata tampak pula larva yang lulus hidup meskipun diberi perlakuan yang sama dengan insektisida SINPV. Hal ini dapat terjadi karena beberapa faktor, di antaranya adanya kemampuan untuk melakukan pertahanan diri terhadap serangan patogen. Menurut Blum (1985), dosis yang rendah dari patogen sel tunggal seperti virus dan bakteri akan direspon oleh imun fagositosis, sedangkan dalam dosis yang tinggi maka respon yang terjadi adalah

pembentukan nodul. Hemosit yang berfungsi sebagai fagosit adalah plasmosit (Wigglesworth 1984). Bahkan di dalam perkembangannya, individu inang dapat melepaskan diri dari pengaruh infeksi NPV dengan adanya mekanisme "maturation resistance" yaitu sejalan dengan pertambahan umur akan diperoleh peningkatan ketahanan atau penurunan kepekaan terhadap NPV (Kurnia *et al.* 2002).

Pengamatan berat larva *S. litura*

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap berat larva *S. litura* yang telah dilakukan, maka tampak adanya suatu korelasi antara pengaruh infeksi SINPV terhadap penurunan berat larva. Dimana semakin banyak dosis yang diberikan terhadap larva uji maka laju konsumsi larva semakin menurun yang menyebabkan terjadinya penurunan berat larva uji (Gambar 1).

Setelah dilakukan perhitungan terhadap berat larva *S. litura* maka, diperoleh hasil bahwa larva yang diinfeksi SINPV mengalami penurunan berat tubuh. Penurunan ini dapat dikarenakan oleh adanya pengalihan energi, dimana energi yang semestinya digunakan untuk aktivitas metabolisme dan pertumbuhan dialihkan untuk melawan serangan patogen yang masuk ke dalam tubuh (Pawana 2000). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa larva yang diberi perlakuan berupa dosis SINPV keesokan harinya ketika diberi pakan baru yang tidak



Gambar 1. Pengaruh dosis SINPV terhadap berat larva instar 5 *Spodoptera litura*.

dikontaminasi, larva cenderung diam dan tidak langsung menyentuh makanan. Bila hal itu dilakukan secara terus-menerus maka larva akan mati. Penolakan yang dilakukan oleh larva diduga karena konsumsi SINPV melalui makanan telah menyebabkan terjadinya perubahan kualitas pakan. Perubahan pada kualitas makanan tersebut tentu saja dapat menghambat aktivitas makan bahkan larva akan menjadi lembam. Dalam dosis rendah, konsumsi pakan larva masih tetap berjalan normal sehingga respon penolakan jarang terjadi. Hal ini dikarenakan oleh jumlah patogen yang masuk masih di bawah ambang untuk dapat menyebabkan infeksi pada tubuh larva. Dengan kondisi demikian, keberadaan membran peritrofik sebagai salah satu mekanisme pertahanan tubuhnya masih berfungsi optimal dalam melawan serangan patogen yang masuk ke dalam tubuhnya.

Pada dosis yang lebih tinggi, larva mulai menunjukkan respon enggan untuk memakan makanan yang diberikan. Hal ini diduga pada saat tubuh telah diserang oleh patogen, dan tubuh akan merespon dengan sistem pertahanan tubuhnya. Namun pada waktu tertentu, sistem pertahanan tubuh larva akan mengalami penurunan. Telah disebutkan bahwa sekresi enzim protease dari epitel usus tengah memiliki peranan penting dalam perlawanan virus (Bolognesi *et al.* 2002). Aktivitasnya masih akan

berjalan dengan optimum bila tubuh tidak mengalami gangguan. Namun bila menghadapi serangan patogen maka aktivitasnya akan terganggu, akibatnya proses metabolisme menjadi tidak optimum. Dengan demikian apabila sebagian besar jaringan tubuh telah mengalami infeksi, maka seiring dengan penurunan sistem pertahanan tubuh, laju konsumsi pakan pun akan menurun, bahkan larva akan berhenti makan sama sekali yang menyebabkan penurunan berat larva dan akhirnya larva akan mati.

Menurut Blum (1985) sasaran utama infeksi NPV adalah daerah usus tengah serangga yang merupakan organ pencernaan utama karena berfungsi sebagai penyerap nutrisi dan sekresi enzim pencernaan. Oleh karena itu, jika usus tengah rusak maka aktivitas pencernaan akan terganggu. Dengan demikian, metabolisme menjadi terhambat. Berdasarkan hal tersebut, infeksi baculovirus diduga dapat menurunkan berat larva.

Histologi membran peritrofik

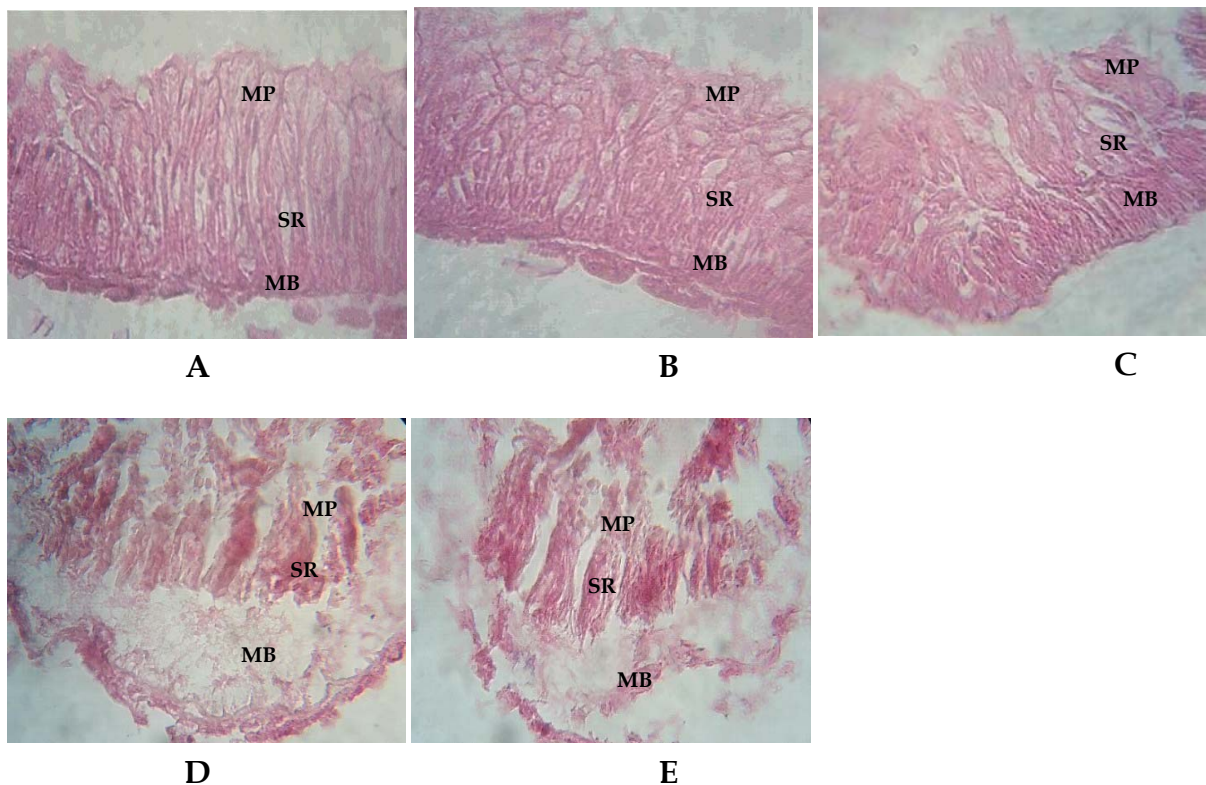
Dari hasil studi awal, diperoleh dosis yang mampu menyebabkan kematian 50% larva (LD_{50})

S. litura sebesar 465 PIB/mL. Pada nilai LD_{50} tersebut, dibuat sayatan pasca infeksi selama 0, 12, 24, 48, 72 dan 96 jam (Tabel 2 dan Gambar 2). Berdasarkan hasil pengamatan histologi terhadap usus tengah larva *S. litura* pada 0 jam, ternyata struktur membran peritrofik masih tampak utuh; jaringan penyusun dari usus tengah masih berada dalam kondisi normal. Hasil sayatan histologis terhadap perut larva *S. litura* setelah perlakuan selama 24 jam, mulai menunjukkan adanya kerusakan pada lapisan

Tabel 2. Tingkat kerusakan pada daerah usus tengah larva instar-5 *S. litura*.

Daerah usus tengah	Waktu infeksi SINPV pada dosis 438 PIB/MI n (%)				
	0	24	48	72	96
Membran peritrofik	-	3/10 (30)	5/21 (24)	5/9 (55)	3/5 (60)
Sel regeneratif	-	-	6/20 (30)	7/15 (47)	7/11 (64)
Membran basal	-	-	-	3/19 (16)	5/15 (33)

Keterangan: Dari persentase yang tercantum, selanjutnya dikelompokkan menjadi 4 kategori sebagai berikut: A. tidak ada kerusakan (0%), B. kerusakan kecil (10-29%), C. kerusakan sedang (30-59%), D. kerusakan besar (60-79%).



Gambar 2. Kerusakan struktur membran peritrofik akibat infeksi SINPV pada selang waktu tertentu. A. 0 jam, B. 24 jam, C. 48 jam, D. 72 jam, E. 96 jam. Keterangan: MP: membran peritrofik, SR: sel regeneratif, MB: Membran basal.

paling luar usus tengah larva yaitu membran peritrofik. Apabila dibandingkan dengan kontrol, maka profil membran peritrofik perlakuan ini mulai mengalami disintegrasi ke arah lumen usus tengah. Selanjutnya, setelah 48 jam masa infeksi menggunakan SINPV, penyebaran virus serangga di dalam tubuh larva mulai memasuki daerah yang lebih dalam, dimana sel-sel penyusun usus tengah (sel regeneratif) mulai mengalami degradasi hingga tampak bergerak menuju ke arah lumen usus. Setelah 72 jam perlakuan, tingkat kerusakan jaringan pada usus tengah mulai merata, hingga membran basal. Rusaknya sel-sel tersebut diperkirakan oleh infeksi SINPV di dalam tubuh larva uji yang terjadi akibat proses termakannya PIB. Setelah 96 jam perlakuan, jaringan penyusun usus tengah semakin tidak jelas, sehingga sulit menemukan bagian-bagian penyusunnya. Hal ini diperkirakan karena proses infeksi virus sudah memasuki tahap lanjut. Virus yang telah mengalami replikasi di daerah usus tengah mulai dilepaskan ke hemosol dan akan menyerang bagian tubuh yang lainnya.

Berdasarkan hasil di atas, pada 0 jam belum ditemukan kerusakan yang diakibatkan oleh SINPV pada struktur membran peritrofik larva instar-5 *S. litura*. Epithelium usus tengah masih tampak utuh dengan sel-sel penyusunnya, yang terdiri dari kumpulan sel-sel kolumnar yang tersusun rapat di bagian ujung dan terdapat sel-sel regeneratif di sebelah basal dari epithelium dan berbatasan langsung dengan membran basal (Levy *et al.* 2004). Kondisi demikian menegaskan bahwa dengan keutuhan profil membran peritrofik maka aktivitas metabolisme masih berjalan lancar karena usus tengah dapat mengoptimalkan fungsinya sebagai tempat penyerapan dan sekresi enzim (Kikhno 2002). Disebutkan oleh Wang dan Granados (1998) yang mempelajari keberadaan membran peritrofik pada *Trichoplusia ni* bahwa membran peritrofik tersusun oleh protein *insect intestinal mucin* yang merupakan protein terbesar yang dikandung oleh membran peritrofik.

Pada pengamatan selanjutnya akibat infeksi SINPV yang turut tercerna bersama makanan, maka struktur membran peritrofik pada 24 jam setelah infeksi mulai mengalami kerusakan seperti terlihat pada Tabel 2 sebesar 10%. Hal ini menegaskan keberadaan membran peritrofik juga berfungsi sebagai perlindungan usus tengah terhadap kerusakan yang kuat oleh partikel makanan (Day dan Waterhouse 1953). Kerusakan

yang terjadi meningkat sejalan dengan semakin lamanya waktu infeksi. Pada infeksi awal, serangan patogen akan direspon oleh sistem pertahanan serangga secara morfologi dengan keberadaan membran peritrofik yang berfungsi sebagai pelindung terhadap serangan patogen (Terra 2001). Funakoshi dan Aizawa (1989) menyatakan bahwa dengan adanya proses infeksi yang terus-menerus, maka fungsi dari membran peritrofik tidak dapat dipertahankan lagi.

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan virus dalam merusak struktur histologi membran peritrofik karena virus menghasilkan faktor pemercepat virus yang membuat virus mampu menginfeksi sel serangga sehingga merusak membran peritrofik (Engelhard dan Volkman 1995; Lehane 1997). Dengan demikian membran peritrofik akan lebih mudah untuk ditembus oleh virion NPV yang pada akhirnya akan menyerang sel-sel di sebelah dalamnya. Kerusakan tersebut teramati setelah 48 jam dimana sel regeneratif (rusak sebesar 30%) mulai meluruh ke arah lumen usus tengah. Dengan terganggunya sel tersebut, maka fungsi usus tengah sebagai penghasil enzim akan terganggu. Disebutkan bahwa salah satu enzim yang disekresikan oleh usus tengah adalah protease yang berperan sebagai anti virus (Bolognesi *et al.* 2002). Sehingga apabila aktivitasnya terganggu kehadiran patogen maka proses metabolisme tidak akan berjalan dengan lancar.

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap infeksi tahap lanjut pada 72 dan 96 jam setelah infeksi, membran peritrofik menjadi semakin tidak utuh. Seperti yang dikemukakan oleh Rohrmann (1994), bahwa virion NPV membutuhkan waktu beberapa hari untuk mengekspresikan interaksinya. Dengan demikian, semakin lama waktu kontak antara virion NPV dengan sel inang, maka tingkat kerusakan yang ditimbulkan semakin tinggi. Kerusakan yang terjadi pada tahap lanjut ini menyebabkan kemampuan epitel dalam membentuk membran peritrofik terganggu. Hal ini sesuai dengan pernyataan Patton (1963) bahwa membran peritrofik merupakan sekresi dari epithelium usus tengah.

KESIMPULAN

Banyaknya pemberian dosis isolat SINPV yang berpengaruh terhadap kematian larva instar-5 *S. litura* sebesar 50% (LD₅₀) adalah 438 PIB/mL. Infeksi SINPV ternyata berpengaruh pula dalam menurunkan konsumsi pakan larva *S. litura* sehingga terjadi penurunan berat larva yang terbesar pada 540 PIB/mL sebesar 0,1675 mg. Struktur histologi membran peritrofik setelah diinfeksi oleh SINPV tampak mengalami kerusakan sejalan dengan bertambahnya waktu infeksi SINPV yang diberikan dimana kerusakan yang terbesar terjadi pada saat 96 jam setelah diinfeksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Barbehenn RV, Marin M. 1994. Peritrophic envelope permeability in herbivorous insect. *J Insect Physiol* 41: 303-311.
- Bolognesi R, Terra WR, Ferreira C. 2002. Functions of insect peritrophic membrane. ESA-Entomological Society of America. Fort Lauderdale, USA.
- Bonning BC, Hammock BD. 1996. Development and recombinant *Baculovirus* for insect control. *Ann Rev Entomol* 41: 191-210.
- Busvine JR. 1972. A critical review of the technique for testing insecticides. 2nd ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. London. UK.
- Cristian P. 1994. Recombinant *Baculovirus* insecticides: catalyst for change of heart? In: *Biopesticides Opportunities for Australian Industry*. Symposium on Biopesticides, June 9-10 1991, Brisbane, Australia.
- Day MF, Waterhouse DF. 1953. *Insect physiology*. Chapman & Hall. London.
- Dibyantoro AL. 1996. Biologi ulat grayak *Spodoptera litura* F dan daya guna mikrobiota berguna dalam upaya pengendalian hama terpadu ulat grayak. Balai Penelitian Sayuran. Lembang, Bandung.
- Engelhard EK, Volkman LE. 1995. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M. Nuclear Polyhedrosis Virus. *J Virol* 209: 381-389.
- Funakoshi M, Aizawa K. 1989. Viral inhibitory factor produced in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with a Nuclear Polyhedrosis Virus. *J Invert Pathol* 54: 151-155.
- Gothama AAA, Indrayani AA, Tukimin. 1990. Kepekaan empat instar larva *Helicoverpa armigera* Hubner terhadap *Nuclear Polyhedrosis Virus* dan *Bacillus thuringiensis* Berliner pada kapas. *Penelitian Tanaman Tembakau & Serat* 5: 82-91.
- Granados RR, Corsaro NG. 1990. *Baculovirus* enhancing protein and their implications for insect control. *Proceeding of 5th Youth International Colloquium in Invertebrate Pathology & Microbial Control*, Adelaide, Australia, 1990
- Kikhno. 2002. Characterization of pif, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Vir* 83: 3013-3022.
- Kurnia NT, Anggraeni, Laksanawati A. 2002. Respon *S. litura* F. terhadap infeksi SINPV. *Prosiding Seminar Nasional Biologi XVI*. Bandung, 25-26 Juli 2002.
- Laoh JH, Puspita F, Hendra. 2003. Kerentanan larva *Spodoptera litura* F. terhadap *Virus Nuklear Polyhedrosis*. *J Natur Indonesia* 5 (2): 145-151.
- Lehane MJ, Msangi AR. 1991. Lectin and peritrophic membrane development in the gut of *Glossina morsitans* and a discussion of their role in protecting the fly against *Trypanosoma* infection. *J Med Vet Entomol* 5: 495-501.
- Lehane MJ. 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Ann Rev Entomol* 42: 525-550.
- Levy SM, Falleiros AMF, Gregorio EA, Arrebola NR, Toledo LA. 2004. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz J Biol* 64 (3B): 633-638.
- Maramorosch K. 2007. Viruses, vectors, and vegetation: an autobiography. *Adv Vir Res* 70: 1-31.
- Blum MS. 1985. *Fundamentals of insect physiology*. John Wiley & Sons. New York.
- Moscardi F. 1994. Assessment of the application of *Baculovirus* for control of *Lepidoptera*. *Ann Rev Entomol* 44: 247-249.
- Novizan. 2004. *Membuat dan memanfaatkan pestisida ramah lingkungan*. Agro Media Pustaka. Tangerang
- Pawana G. 2000. Respon *Helicoverpa armigera* Hubner terhadap infeksi subletal NPV dan dampaknya terhadap laju reproduksi. Tesis. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Patton RL. 1963. *Introductory insect physiology*. Toppan Co. Tokyo.
- Rohrmann GF. 1994. Nuclear Polyhedrosis Virus. In: *Encyclopedia of virology*. Academic Press. London.
- Sanjaya Y. 2000. Perubahan tingkat nasional toleransi *Helicoverpa armigera* Hubner yang terinfeksi *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus (*HaNPV*). Tesis. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Sutarya R. 1996. Pengujian *Spodoptera exigua* Nuclear Polyhedrosis Virus dalam hubungannya dengan sifat persistensinya untuk mengendalikan *Spodoptera exigua* Hubn. *J Hort* 6 (2): 167-171.
- Teakle RE, Jensen RE, Mulder, JC. 1985. Susceptibility of *Heliothis armiger* (Lepidoptera: Noctuidae) on sorghum to a Nuclear Polyhedrosis Virus. *J Econ Entomol* 78: 1373-1378
- Terra WR. 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol* 47: 47-61.
- Utari E. 2000. Pengaruh Infeksi *HaNPV* terhadap Kerusakan Membran Peritrofik dan Indeks Nutrisi Larva Instar V *Helicoverpa armigera* (Hubner). Tesis. Program Pascasarjana, Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Wang P, Granados RR. 1998. Observation on the presence of the peritrophic membrane in larval *Trichoplusia ni* and its role in limiting *Baculovirus* infection. *J Invert Pathol* 72: 57-62.
- Wigglesworth VB. 1984. *Insect physiology*. Toppan Company. Tokyo, Japan
- Yamagishi J, Isobe R, Takebuchi T, Bando H. 2003. DNA microarrays of baculovirus genomes: differential expression of viral genes in two susceptible insect cell lines. *Arch Virol* 148 (3): 587-597.