

TEKNIK PERBANYAKAN NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS SECARA *IN VIVO*

IG.A.A. Indrayani^{*)}

PENDAHULUAN

Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV) termasuk genus *Baculovirus*, famili *Baculoviridae*, yaitu sejenis virus patogen serangga yang mematikan serangga inang mengikuti mekanisme racun perut. Biasanya NPV menyerang nukleus sel-sel peka, terutama sel-sel di dalam saluran pencernaan, sel darah, trakea, dan badan lemak. NPV merupakan matriks protein, yang tersusun atas tiga komponen utama, yaitu: polyhedral inclusion bodies (PIB), virion, dan nukleokapsid (Ignoffo dan Couch, 1981). Nukleokapsid adalah bagian paling infeksiif dari NPV, karena bagian ini yang tersusun atas rantai DNA berperan penting dalam replikasi NPV pada nukleus sel-sel inang yang terinfeksi.

Sebagai patogen serangga, NPV memiliki beberapa keunggulan yang menjadikannya sebagai agensia yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai bioinsektisida, antara lain: spesififikasi inangnya sangat tinggi, persisten di tanah maupun tanaman, tetap efektif menginfeksi serangga yang sudah resisten terhadap insektisida kimia, aplikasinya tidak menimbulkan pencemaran lingkungan, dan relatif mudah diperbanyak secara massal.

Pengembangan suatu patogen serangga sangat membutuhkan dukungan aktivitas yang berkaitan dengan teknik-teknik perbanyakannya. NPV akan lebih mudah dikembangkan apabila teknik perbanyakannya dikuasai, karena ketersediaan NPV dalam jangka panjang sangat menentukan keberlangsungan aplikasi di lapangan. Perbanyak NPV tidak harus dilakukan dalam skala industri, tetapi dapat pula dilakukan melalui unit-unit usaha yang lebih kecil sehingga teknologi ini lebih menyebar dan lebih mudah diadopsi oleh pengguna. Oleh karena itu, teknik perbanyakannya secara sederhana sangat diperlukan.

PERBANYAKAN NPV SECARA *IN VIVO*

Cara perbanyak NPV yang paling umum saat ini adalah dengan serangga hidup (*in vivo*). Inang-inang terinfeksi dapat diperoleh melalui salah satu dari dua cara yang tersedia, yaitu cara pertama, dengan melakukan observasi lokasi-lokasi dimana terjadi ledakan serangga inang, kemudian melakukan pelepasan sejumlah inokulum NPV ke dalam populasi inang tersebut. Akibatnya, akan terbentuk suatu epizootik NPV di dalam populasi inangnya. Cara ini membutuhkan strategi survai lokasi yang sangat cermat, dan harus memahami dinamika populasi inang. Cara kedua, dengan memelihara inangnya di laboratorium, kemudian diinokulasi dengan stater NPV. Oleh karena cara ini lebih menjamin produktivitas, maka cara kedua inilah yang akan lebih banyak diuraikan dalam tulisan ini.

^{*)} Peneliti pada Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat, Malang.

Perbanyakan NPV secara *in vivo* terdiri atas beberapa tahap aktivitas, yaitu: pemeliharaan serangga inang, inokulasi NPV, panen larva mati, pemurnian NPV, formulasi dan standarisasi, serta penyimpanan NPV.

Pemeliharaan Serangga Inang

Setiap spesies serangga membutuhkan cara pemeliharaan yang berbeda-beda. Pemeliharaan serangga inang dalam perbanyakan NPV ini akan mengikuti cara-cara pemeliharaan *Helicoverpa armigera* Hubner atau *Spodoptera litura* F. Oleh karena perbanyakan massal NPV membutuhkan jumlah larva inang yang sangat banyak, maka pemeliharaannya akan lebih praktis apabila menggunakan pakan buatan. Larva *S. litura* atau *H. armigera* yang akan digunakan untuk perbanyakan, induknya diambil dari lapangan yang kemudian dipelihara di laboratorium dengan memberi pakan buatan. Semakin banyak larva yang dibutuhkan untuk perbanyakan, semakin banyak induk yang harus dikoleksi. Larva induk dipelihara sampai menjadi imago, kemudian dikawinkan. Telur-telur yang dihasilkan dari pasangan imago kawin terlebih dahulu direndam (sterilisasi) dalam larutan 0,2% sodium hipoklorit selama 5 menit, untuk menghilangkan kontaminan patogen, termasuk virus, yang biasanya menempel pada permukaan telur. Setelah larva menetas dari telur, kemudian menjadi larva instar-I dan II, dapat diberikan pakan alami daun kapas muda (*H. armigera*) atau daun jarak (*S. litura*) sebagai pakan awal. Hal ini dilakukan untuk menghemat pakan buatan, karena persentase mortalitas larva yang masih kecil cenderung lebih tinggi dibanding larva instar-III sampai VI. Setelah larva mencapai instar-III, baru pakan daun diganti dengan potongan kecil (1 cm^3) pakan buatan yang diletakkan di dalam vial-vial plastik. Baik larva *H. armigera* maupun *S. litura*, pada saat diberikan pakan buatan, sebaiknya dipelihara secara individu untuk menghindari sifat sa-ling memakan (*kanibalisme*). Instar larva yang ideal untuk perbanyakan NPV adalah larva instar-IV, karena lama waktu yang dibutuhkan untuk menjadi larva instar-VI sesuai dengan lama masa inkubasi NPV di dalam tubuhnya, sehingga kematian larva tepat pada saat ukuran tubuhnya maksimal dengan produktivitas NPV tertinggi (Indrayani et al., 1998). Untuk memperoleh produksi NPV dengan konsentrasi sedang (10^7 — 10^8), dalam satu kali termin perbanyakan minimal dibutuhkan 1.000 larva inang untuk mencapai konsentrasi $3,8$ — $9,2 \times 10^9$ PIB (Indrayani et al., 1998). Dengan demikian, NPV dari 1.000 larva instar-VI setara untuk satu kali aplikasi 4—5 hektar lahan kapas.

Inokulasi, Koleksi, dan Pemurnian NPV

Dosis inokulasi diekspresikan dalam unit *polyhedral inclusion bodies* (PIB) per ml. Dosis lethal (LC_{50}) setiap NPV berbeda-beda tergantung spesies inang yang digunakan. Biasanya pemberian dosis yang lebih tinggi dari dosis lethal menyebabkan larva mati pada instar yang kurang tepat, sehingga produksi PIB menurun. Sedangkan pada dosis sublethal kemungkinan larva lolos dari kematian, sehingga produksi PIB juga berkurang. Hal ini menyebabkan faktor ketepatan dosis dan inang sangat penting dalam perbanyakan NPV secara *in vivo*.

Penggunaan larva instar-IV dalam perbanyakan NPV berkaitan dengan adanya korelasi antara masa inkubasi NPV di dalam tubuh larva dengan umur larva. Penggunaan larva instar-I sampai III dalam perbanyakan biasanya menyebabkan larva mati sebelum mencapai instar-VI, karena masa inkubasi NPV lebih singkat dibanding waktu yang dibutuhkan larva instar-I sampai III untuk menjadi instar-VI. Makin kecil ukuran larva yang mati karena infeksi NPV, makin sedikit PIB yang dihasilkan. Demikian pula jika inokulasi dilakukan pada larva instar-V atau VI, potensinya untuk lolos dari kematian juga sangat tinggi, sehingga tidak akan dihasilkan PIB.

Larva instar-IV yang akan digunakan dalam perbanyakan kemudian dipindahkan ke vial baru yang sudah berisi pakan buatan yang masih segar yang sebelumnya sudah ditetesi isolat NPV (1—2 tetes) dengan konsentrasi 10^4 — 10^7 PIB/ml. Larva kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama \pm 10 hari, dan pengamatan larva mati dilakukan mulai satu hari setelah perlakuan. Waktu koleksi (pengumpulan) larva mati yang paling ideal adalah sesaat setelah larva mati, karena integumen larva masih relatif kuat untuk menahan cairan PIB dalam tubuhnya. Tetapi setelah periode tersebut, masih dalam hitungan jam apabila terjadi gangguan, maka integumen akan pecah dan polihedra akan sulit dikoleksi. Ketepatan waktu pengumpulan larva menjamin PIB yang dihasilkan akan maksimal. Larva mati yang sudah terkumpul di dalam wadah (*erlen meyer*) kemudian dihancurkan dengan cara menggerusnya atau dapat pula dengan menggunakan blender. Selanjutnya dilakukan penyaringan ekstrak sebanyak 3—4 kali dengan menggunakan kain kasa. Ekstrak yang diperoleh kemudian dimurnikan dengan *centrifuge* pada kecepatan 5.000 rpm. selama 30 menit untuk menghilangkan mikroorganisme kontaminan selain NPV, misalnya bakteri atau spora jamur (Ignoffo dan Shapiro, 1978).

Teknik Formulasi dan Standarisasi

Umumnya NPV diformulasi dalam bentuk bubuk kering (*wettable powder*) untuk memudahkan penyimpanan dan aplikasi di lapangan. Banyak macam bahan pembawa (*carrier*) yang dapat digunakan dalam membuat formulasi NPV. Meskipun demikian, *carrier* dengan daya lekat (*adhesi*) yang tinggi sangat dibutuhkan untuk mempertahankan persistensi NPV di lapangan. Talk merupakan salah satu *carrier* terbaik untuk NPV (Yu dan Brown, 1997).

Suspensi (ekstrak) NPV yang sudah mengalami 3—4 kali penyaringan, kemudian ditambahkan talk sedikit demi sedikit hingga suspensi menjadi bentuk pasta (seperti adonan kue). Selanjutnya, pasta dikeringkan dengan menggunakan nampan. Selama pengeringan, pasta tidak boleh terkena sinar matahari secara langsung, karena dapat merusak polihedra, sehingga mengakibatkan penurunan efektivitas. Pengeringan sebaiknya dilakukan di dalam ruangan yang kelembabannya relatif rendah. Setelah kering, lempengan-lempengan NPV kemudian digerus atau ditumbuk agar menjadi bubuk halus yang kering seperti tepung, kemudian dimasukkan ke dalam kantong-kantong plastik bersih dan kering, dan diberi label yang berisi keterangan mengenai isolat dan tanggal diformulasi.

Untuk mengetahui konsentrasi PIB dilakukan penghitungan (standarisasi) dengan bantuan alat hemocytometer dan mikroskop cahaya. Prosedur kerja standarisasi adalah mula-mula ditimbang 1 gram bubuk NPV, kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml akuades, dan diaduk hingga seluruh bubuk bercampur rata dengan akuades. Untuk memudahkan menghitung, sebaiknya larutan (suspensi) NPV diencerkan 100—1.000 kali atau lebih, tergantung kekentalan suspensi. Pengenceran yang terakhir biasanya digunakan untuk menghitung kepadatan PIB/g. Hemocytometer yang digunakan adalah yang memiliki tipe *double roulling* (dua sisi pencatat), dan biasanya penghitungan dilakukan 4—6 kali untuk memperoleh hasil yang lebih akurat.

Cara menggunakan hemocytometer adalah mengisi kedua sisi pencatat pada hemocytometer dengan suspensi NPV melalui parit-parit yang ada di bagian tepi atau depannya dengan menggunakan pipet transfer. Biarkan suspensi selama 2 menit, sebelum mulai menghitung. Paling sedikit harus ada 400 partikel PIB di dalam setiap kotak hemocytometer, dan sebaiknya dilakukan minimal 4 kali penghitungan untuk mengurangi kesalahan akibat pemasangan *cover glass* pada *double roulling* yang kurang tepat. Setiap mengulang penghitungan, perlu membersihkan kembali peralatan hitung yang digunakan, terutama sisa-sisa partikel sebelumnya yang dapat mempengaruhi

penghitungannya berikutnya. Hasil penghitungan partikel sebanyak 10^8 PIB/g sudah merupakan penghitungan yang cukup akurat. Untuk menghitung partikel PIB/g, dapat digunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi PIB/g} = \frac{\text{Rata-rata PIB}}{80} \times d \times (5 \times 10^4)$$

d adalah derajat pengenceran

5×10^4 adalah konstanta yang sudah baku

Penyimpanan NPV

Setiap patogen serangga memiliki kapasitas penyimpanan yang sangat bervariasi. Produk patogen serangga komersial idealnya harus disimpan pada suhu sangat dingin (-20°C) dan terhindar dari sinar matahari langsung, karena sinar ultraviolet atau suhu tinggi dapat menurunkan patogenitas atau mematikan patogen serangga. Demikian pula produk-produk NPV yang diformulasi dalam bentuk bubuk harus disimpan dalam kondisi kering. Apabila proses pengeringan tidak optimal, maka NPV tidak saja akan kehilangan efektivitasnya, tetapi juga sulit diaplikasikan karena terjadi penggumpalan akibat kadar airnya masih tinggi.

Polyhedral inclusion bodies (PIB) merupakan bagian NPV yang berperan melindungi virion dan nukleokapsid dari pengaruh lingkungan yang ekstrim, terutama suhu rendah selama dalam penyimpanan. Hal tersebut menyebabkan NPV sangat aman apabila disimpan pada tempat-tempat yang mempunyai suhu sangat rendah ($< 0^\circ\text{C}$). Mudah tidaknya teknik penyimpanan juga merupakan salah satu syarat dalam pengembangan suatu agensia hayati. Agensia hayati yang dapat disimpan dalam waktu lama akan sangat mendukung proses perbanyakan massal. Hal ini berkaitan dengan pemanfaatannya jangka panjang atau sewaktu-waktu diperlukan. NPV bubuk kering lebih aman dan tahan lama dalam penyimpanan dibanding NPV suspensi, karena suspensi lebih mudah terkontaminasi patogen lain. Stabilitas NPV tidak menunjukkan penurunan yang nyata meskipun sudah disimpan lama, tetapi perlu dihitung ulang konsentrasinya setiap kali akan dilakukan aplikasi. Penyimpanan NPV pada suhu idealnya dapat mempertahankan efektivitas dan stabilitasnya.

KESIMPULAN

Nuclear Polyhedrosis Virus adalah salah satu patogen serangga yang sangat berpotensi dalam pengendalian sejumlah serangga hama. Kontinuitas produksinya akan menentukan luasan aplikasinya di lapangan. Perbanyakannya secara *in vivo* sangat ditentukan oleh perbanyakan inangnya. Aktivitas yang dilakukan dalam perbanyakan NPV antara lain: inokulasi larva inang, koleksi larva mati, pemurnian ekstrak larva mati, formulasi, dan standarisasi. Penyimpanan NPV pada suhu idealnya dapat mempertahankan patogenitas maupun stabilitasnya dalam jangka panjang.

DAFTAR PUSTAKA

- Ignoffo, C.M. and M. Shapiro. 1978. Characteristic of baculovirus preparation processed from living and dead larvae. *J. Econ. Entomol.* 71(2): 186—188.
- Ignoffo, C.M. and T.L. Couch. 1981. The nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis* spp. as a microbial insecticide. *In*. H.P. Burges (ed.) *Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970—1980*. Academic Press, London. p. 329—362.
- Indrayani, IG.A.A., D. Winarno, M. Sholeh, dan Hariyanto. 1998. Penentuan dosis, waktu, dan cara penyemprotan NPV dan Bt pada hama kapas. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri* 3(5-6): 174—180.
- Yu, Z. and G.C. Brown. 1997. Auto dissemination of a beet armyworm (*Lepidoptera: noctuidae*) Baculovirus under laboratory conditions. *J. Econ. Entomol.* 90(5): 1187—1194.