

KARAKTERISASI MOLEKULER *NUCLEOPOLYHEDROVIRUS* (NPV) *HYPOSIDRA TALACA* WLK. DI PERKEBUNAN TEH GUNUNG MAS BOGOR

R. Yai Munara Kusumah, Lestia Revi, & Fitrianingrum Kurniawati

Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jl. Kamper Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680
E-mail: ymkusumah@gmail.com

ABSTRACT

Characterize molecular the Nucleopolyhedrovirus (NPV) *Hyposidra talaca* Wlk. of tea plantation at Gunung Mas Bogor. *Hyposidra talaca* is one of the most important pest in tea plantation, and generally attacks of leaves and shoots. This pest cause yield loss up to 40-100%. NPV can be pathogenic to the pest of *H. talaca* and can be developed as an alternative measure to control *H. talaca* in tea plantations and based management appears to be more ecofriendly and effective. However, information regarding characterisation molecular of *Hyta*NPV is limited. The study conducted to characterize molecular the NPV of *H. talaca* by restriction nucleotide and amino acid, by using *gens lef-8*. Molecular identification used Polymerase Chain Reaction (PCR) consisted of DNA extraction, DNA amplification, and DNA electrophoresis. DNA amplification using *gen lef-8* showed positif result with approximately 770 bp. *Gen lef-8* can identified *Hyta*NPV. DNA sequence showed that isolate *Hyta*NPV Bogor had high homology of pathogenic NPV of genus *Helicoverpa* from Brazil, Australia, Spanyol and Netherland with homology nucleotide and amino acid reached 98% and 100%. Based on phylogeny tree of *Hyta*NPV was one group with pathogenic NPV of genus *Helicoverpa*.

Key words: characterize NPV, *gens lef-8*, *Hyposidra talaca*, NPV

ABSTRAK

Karakterisasi molekuler nucleopolyhedrovirus (NPV) *Hyposidra talaca* wlk. di perkebunan teh Gunung Mas Bogor. Larva *Hyposidra talaca* termasuk hama penting pada tanaman teh yang menyerang daun yang masih muda atau pucuk daun, hama ini dapat menyebabkan kerugian mencapai 40-100% jika tidak dilakukan pengendalian. Salah satu teknik pengendalian *H. talaca* yang sejalan dengan prinsip PHT yaitu memanfaatkan agen hayati seperti *nucleopolyhedrovirus* (NPV) yang memiliki inang spesifik, tidak membahayakan lingkungan, dapat mengatasi masalah keresistansian hama terhadap insektisida, dan selaras dengan komponen PHT lainnya. Namun, informasi mengenai karakterisasi molekuler *Hyta*NPV masih sangat terbatas. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui karakteristik molekuler melalui urutan nukleotida dan asam amino isolat NPV yang berasal dari *H. talaca* dengan menggunakan *gen lef-8*. Identifikasi molekuler dengan PCR terdiri beberapa tahap yaitu ekstraksi, amplifikasi dan elektroforesis DNA. Amplifikasi DNA *Hyta*NPV menggunakan primer *lef-8* berhasil mengisolasi *gen lef-8* *Hyta*NPV dengan ukuran fragmen DNA sekitar 770 bp. Analisis urutan DNA berdasarkan *gen lef-8* menunjukkan bahwa isolat *Hyta*NPV Bogor tergolong ke dalam spesies virus yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan isolat NPV yang menyerang genus *Helicoverpa* yang berasal dari Brazil, Australia, Spanyol dan Belanda dengan nilai homologi nukleotida dan asam amino sebesar 98% dan 100%. Berdasarkan analisis filogeni, isolat *Hyta*NPV masuk dalam grup yang sama dengan NPV yang menyerang genus *Helicoverpa*.

Kata kunci: DNA, *gen lef-8*, *Hyposidra talaca*, karakteristik molekuler, NPV

PENDAHULUAN

Teh (*Camelia sinensis* L.) merupakan tanaman perkebunan penting di Indonesia dan menjadi salah satu penyumbang devisa negara yang cukup besar. BPS (2016) melaporkan bahwa produksi teh di Indonesia hanya mencapai sekitar 145.86 kg teh kering per hektar per tahun pada tahun 2013. Sedangkan, produksi teh tahun 2014 yaitu sekitar 142.72 kg per hektar per tahun.

Angka produksi tersebut masih tergolong rendah dibandingkan dengan produksi negara penghasil teh lainnya. Turunnya produksi sangat mungkin disebabkan oleh turunnya produktivitas tanaman. Menurut Widayat (1996), rendahnya produktivitas teh di Indonesia lebih banyak disebabkan oleh serangan organisme pengganggu tanaman (OPT) khususnya hama. Hama yang biasa menyerang tanaman teh adalah kepik daun teh (*Helopeltis antonii*), wereng pucuk teh (*Empoasca*

sp.), ulat penggulung daun (*Homona coffearia* (L.) Nietn), ulat penggulung pucuk (*Cydia leucostoma* (L.) Meyr), dan ulat jengkal (*Hyposidra talaca* Wlk).

H. talaca merupakan hama penting pada tanaman teh (Ghosh *et al.*, 2015). *H. talaca* umumnya menyerang daun yang masih muda atau pucuk daun. Serangan berat dapat menyebabkan daun berlubang dan pucuk tanaman gundul. Perkebunan teh milik PT. Perkebunan Nusantara VIII Gunung Mas, Bogor sering menemui permasalahan yang cukup serius akibat serangan hama *H. talaca* (Pradana, 2013). Kehilangan hasil akibat serangan *H. talaca* cukup tinggi, pada musim kemarau larva *H. talaca* dapat mengakibatkan kerugian mencapai 40-100% apabila tidak dilakukan pengendalian (Muliani *et al.*, 2011).

Pengendalian hama yang tepat dan bijaksana dapat mencegah kehilangan hasil dan menjaga kualitas serta keamanan produk. Undang-undang RI No. 12 tahun 1992 mencanangkan pelaksanaan pengendalian hama terpadu (PHT) yang melarang penggunaan sarana dan cara yang dapat mengganggu kesehatan manusia dan mencemari lingkungan (Widayat *et al.*, 1996; Kunimi, 2007).

Nucleopolyhedrovirus (NPV) merupakan salah satu patogen serangga yang efektif sebagai agen pengendali serangga hama. NPV telah diuji efektif untuk mengendalikan ulat grayak dan ulat pemakan polong (Pramono, 2000; Arifin, 2006). NPV juga efektif untuk mengendalikan ulat jengkal (*H. talaca*) dan disebut juga *Hyta*NPV dengan persentase penurunan populasi hama 50-100% dalam waktu 7-11 hari (Pradana, 2013). *Hyta*NPV telah dilaporkan patogenik terhadap hama di laboratorium (Mukhopadhyay *et al.*, 2011). NPV memiliki inang spesifik, tidak membahayakan lingkungan, dan sesuai dengan komponen PHT lainnya (Starnes *et al.*, 1993).

NPV merupakan virus dari famili Baculoviridae yang mampu menginfeksi lebih dari 400 spesies serangga. Baculoviridae merupakan famili virus yang mampu menginfeksi serangga khususnya ordo Lepidoptera (Blissard *et al.*, 2000). Informasi mengenai sekuens nukleotida *Hyta*NPV asal Indonesia saat ini belum ada di situs *GenBank*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik molekuler melalui urutan nukleotida isolat NPV yang berasal dari *H. talaca* di Perkebunan teh Gunung Mas Bogor dengan gen *lef-8*.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu. Sampel isolat NPV diperoleh dari perkebunan teh Gunung Mas Jawa Barat. Perlakuan dan pengolahan data dilakukan di Laboratorium Patologi

Serangga. Karakterisasi molekuler dilakukan di Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Penelitian dilaksanakan dari bulan Februari sampai Mei 2016.

Isolasi NPV. Sampel *cadaver* ulat *H. talaca* yang menunjukkan gejala terserang NPV diambil dari perkebunan teh Gunung Mas. *Cadaver* digerus dengan mortar dalam larutan sodium dodecyl sulphate (SDS) 0,1%, filtrat dituangkan ke dalam tabung mikro 2 ml, kemudian disentrifugasi dengan microsentrifuge Sorval Biofuge (Fresco) dengan kecepatan 2000 rpm selama 1 menit pada suhu 4 °C. Pelet yang terbentuk dibuang, supernatan diambil dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Pelet yang terbentuk ditambahkan beberapa tetes aquabides (Cheng, 1998).

Pemurnian NPV terhadap *H. talaca*. Pemurnian virus dilakukan dengan metode gradien sukrosa yang dibuat secara kontinyu pada tabung mikro 2 ml (Grzywacz *et al.*, 2011). Suspensi polihedra pada proses sebelumnya di sentrifugasi dalam gradien sukrosa dengan kecepatan 13.000 rpm selama 99 menit. Pita putih yang terbentuk diambil dengan menggunakan pipet pasteur kemudian ditambahkan beberapa tetes aquabides. Suspensi tersebut disentrifugasi kembali pada 7000 rpm selama 20 menit. Endapan yang terbentuk diambil dan diresuspensi dengan aquabides. Polihedra hasil purifikasi diamati di bawah mikroskop cahaya.

Pemurnian Virion dan Ekstraksi DNA. Hasil purifikasi sebelumnya diresuspensikan dengan larutan sodium karbonat (Na_2CO_3 , pH 11), dan dikocok pelan pada suhu 37 °C selama 30 menit, kemudian disentrifugasi kembali menggunakan tabung mikro 2 ml pada 13.000 rpm selama 1 jam. Suspensi virion dimurnikan dengan metode yang sama pada pemurnian polihedra (Cheng, 1998), selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA dengan menggunakan *Viral nucleic acid extraction kit II* (Geneaid).

Proses ekstraksi DNA genom virus meliputi beberapa tahapan yaitu pertama tahap lisis yaitu Sebanyak 200 µl virion murni dimasukkan ke dalam tabung mikro kemudian 400 µl *VB lysis buffer* ditambahkan. Suspensi tersebut dikocok menggunakan *vortex* kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 10 menit. Selanjutnya tahap pengikatan asam nukleat, pada suspensi ditambahkan 450 µl *AD buffer*, kemudian dipindahkan ke tabung mikro yang di dalamnya terdapat tabung kolom *VB*, kemudian disentrifugasi pada 13.000

rpm selama 1 menit. Tahap pencucian: sebanyak 400 μ l *W1 Buffer* ditambahkan pada tabung kolom *VB*, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Pada tabung kolom *VB* ditambahkan 600 μ l *wash buffer*, kemudian disentrifugasi kembali pada 13.000 rpm selama 1 menit. Cairan yang tertampung pada dasar tabung mikro dibuang, kemudian disentrifugasi kembali pada 13.000 rpm selama 3 menit hingga dasar tabung kolom *VB* kering. Tahap terakhir yaitu elusi asam nukleat, tabung kolom *VB* dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru, kemudian ditambahkan 50 μ l *RNAase free water*, dan didiamkan selama 3 menit. Setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Cairan akhir yang tertampung di dasar tabung mikro merupakan DNA hasil ekstraksi. DNA kemudian di nano drop untuk melihat konsentrasi DNA hasil ekstraksi.

Amplifikasi DNA NPV Menggunakan PCR.

Amplifikasi DNA menggunakan primer Gen *lef-8* dengan urutan oligonukleotida *primer forward* 5'-ATGAATTGCAAACCTCTCCGCCAG-3' dan *reverse* 3'-TCGACTGCAGACC-GCCGAAGA-5' (Kaur et al., 2014). Untuk amplifikasi isolat *HytaNPV*, sebanyak 2 μ l DNA hasil ekstraksi dicampur dengan reagen yang terdiri atas 12,5 μ l *Taq DNA polymerase*, 8 μ l ddH₂O, 1 μ l primer *forward*, 1 μ l primer *reverse*, 0,5 μ l MgCl hingga volume akhir yang digunakan dalam amplifikasi sebanyak 25 μ l untuk satu reaksi. Amplifikasi dilakukan pada mesin PCR (*gene amp system 9700*). Satu siklus amplifikasi meliputi tiga tahapan utama yaitu: pradenaturasi 94 °C selama 5 menit, denaturasi 94 °C selama 1 menit, penempelan 61 °C selama 1 menit, ekstensi 72°C selama 1 menit, dan pasca ekstensi 72 °C selama 7 menit, dengan suhu akhir penyimpanan 4 °C. Siklus diulangi sebanyak 35 kali. Proses elektroforesis dilakukan dengan memasukan 5 μ l DNA hasil amplifikasi ke dalam sumur gel agarose 1% yang direndam dalam

larutan *Tris Borate EDTA* (TBE) kemudian dialiri dengan arus listrik 50 volt selama 50 menit. Selanjutnya gel agarosa 1% direndam dalam larutan *Ethidium Bromida* (EtBr) selama 30 menit. Visualisasi DNA dilakukan dengan cara meletakkan gel agarose pada UV-transiluminator kemudian difoto dengan menggunakan kamera.

Analisis Pengurutan DNA dan Pengurutan Asam Amino.

DNA hasil amplifikasi dilakukan pengurutan fragmennya oleh 1st BASE Singapura melalui PT. Genetica Science. Urutan nukleotida sampel dibandingkan dengan urutan nukleotida NPV lain yang telah dipublikasikan di situs National Centre for Biotechnology Information (NCBI) melalui program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*). Data urutan nukleotida yang terpilih dianalisis menggunakan program penjajaran dan ClustalW serta program *Bioedit* ver 7.1.7 untuk mengetahui homologi nukleotida dan protein tiap sampel. Data asam amino dianalisis menggunakan situs www.expasy.com untuk menerjemahkan nukleotida menjadi asam amino. Data urutan asam amino dianalisis menggunakan program *Bioedit* ver 7.1.7.

Analisis Filogeni *HytaNPV*. Analisis filogeni dilakukan menggunakan pendekatan '*Neighbor-Joining*' dengan *Bootstrap* 1000x dengan program MEGA 6 (Tamura et al., 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengambilan Sampel *Hyposidra talaca* yang Terserang NPV di Lapangan.

Larva *H. talaca* yang menunjukkan gejala terinfeksi NPV di perkebunan teh diambil sebanyak-banyaknya. Larva yang terinfeksi sering ditemukan menggantung dengan kedua tungkai semu. Biasanya larva yang terinfeksi berwarna coklat



Gambar 1 Larva *H. talaca* yang sehat (A), Larva *H. talaca* yang terserang NPV (B)

kehitaman, jika bagian integumen pecah akan mengeluarkan lendir berwarna kecoklatan (Gambar 1).

Hasil Pemurian Virion NPV dan Nano Drop. Hasil sentrifugasi membentuk awan putih yang berkumpul di bagian tengah tabung yang merupakan kumpulan virion murni *HytaNPV*. Hasil nano drop virion murni menunjukkan bahwa konsentrasi DNA virion yaitu sebesar 50%. Hasil tersebut dapat digunakan untuk bahan perbanyak DNA dengan menggunakan metode PCR.

Pengamatan Polihedra *HytaNPV*. Polihedra *HytaNPV* diamati menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x berbentuk seperti butiran-butiran kecil (Gambar 2). Ukuran dan bentuk polihedra NPV bervariasi tergantung spesiesnya (Cheng, 1998). Adapun bentuk polihedra yang pernah dilaporkan yaitu kuboid, dodekahedral, tetrahedral dan bentuk tidak beraturan. Pada umumnya polihedra *HytaNPV* berbentuk tetrahedral dengan diameter 0,476-0,274 (μm –SE) dan memiliki tipe multinukleotida (Lestari, 2008).

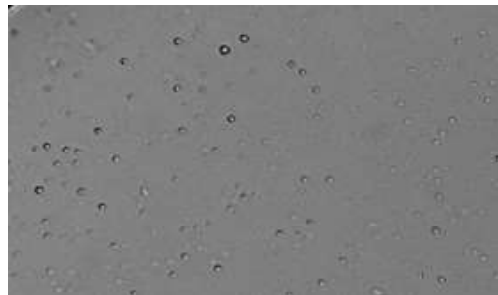
Karakterisasi Molekuler. Pengamatan karakter molekuler dengan amplifikasi DNA *HytaNPV* menggunakan primer *forward* dan *reverse* gen *lef-8* menunjukkan hasil yang baik. Hal itu dilihat dari

terbentuknya pita DNA sesuai dengan ukuran target yang diinginkan yaitu sekitar 770 pb (pasang basa) (Gambar 3).

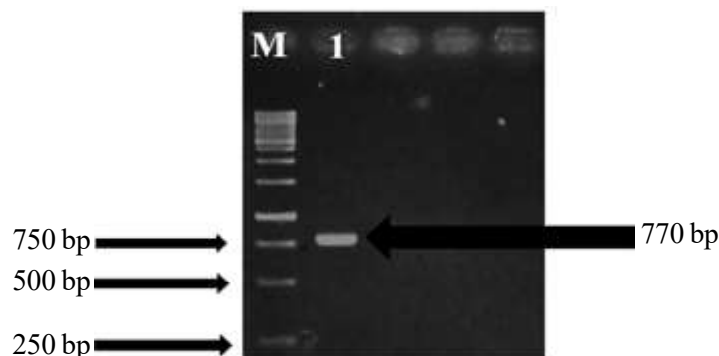
Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sangat sensitif untuk mengklasifikasikan *Baculovirus*. Gen *lef-8* merupakan salah satu gen transkripsi dalam genom *Baculovirus* yang merupakan gen ekspresi pada RNA polymerase yang cukup stabil mengkode subunit DNA dan menempelkan langsung pada RNA polymerase virus secara spesifik (Herniou *et al.*, 2003). Gen *late expression factor-8 (lef-8)* merupakan gen yang banyak digunakan untuk menganalisis DNA NPV Lepidoptera (Acharya & Gopinathan, 2002). Yu *et al.* (2013) telah mengarakterisasi gen *late expression factor-10 (lef-10)* dari *Bombyx morii nucleopolyhedral virus*.

Pengurutan Fragmen DNA *HytaNPV*. Fragmen nukleotida *HytaNPV* Bogor dikirim dalam bentuk kromatogram. Kromatogram *HytaNPV* menunjukkan hasil yang baik dengan tidak ada pengusutan yang terjadi pada kromatogram. Hasil fragmen berisi nukleotida *forward* dan *reverse* dicontig menggunakan *software bioedit* untuk mendapatkan sekuens lengkap dari *HytaNPV*.

Pengurutan DNA *HytaNPV* Bogor dilakukan untuk menentukan persentase kemiripan berdasarkan



Gambar 2. Polihedra *HytaNPV* dibawah mikroskop cahaya (400x)



Gambar 3. Hasil visualisasi DNA *HytaNPV* Bogor menggunakan primer gen *lef-8* Marker (M), *HytaNPV* (1)

gen *lef-8*. Hasil BLAST diperoleh beberapa spesies NPV yang memiliki kemiripan yang cukup tinggi dengan isolat *Hyta*NPV (Tabel 1). Parameter yang diamati pada hasil BLAST yaitu *Query discovery* yang berfungsi untuk mengetahui persen dari total panjang dari urutan nukleotida sampel yang cukup baik untuk disejajarkan dengan urutan nukleotida yang dimiliki oleh *GenBank* NCBI dan *Max/total score* berfungsi untuk mengetahui persen kesamaan antara urutan nukleotida sampel yang disejajarkan dengan urutan nukleotida bank data (Agustin, 2013). Dua spesies dikatakan identik jika memiliki persentase kemiripan >73% (Li *et al.*, 2009). Besarnya tingkat keragaman di dalam suatu spesies bergantung pada jumlah individu, penyebaran wilayah geografis, dan sistem genetiknya (Elrod & Stansfield, 2007). Isolat *Hyta*NPV Bogor memiliki nilai kemiripan tinggi dengan NPV yang menyerang genus *Helicoverpa* dengan persentase kemiripan mencapai 99%. Nilai tersebut membuktikan bahwa sampel teridentifikasi sebagai NPV.

Hasil BLAST berdasarkan gen *lef-8* pada Tabel 1 menunjukkan bahwa isolat *Hyta*NPV Bogor memiliki nilai *max/total score* yang tinggi dengan NPV yang menyerang genus *Helicoverpa* yaitu berkisar 1362 sampai 1380, untuk persentase kemiripan dan *query discovery* mencapai 99%. Nilai *max/total score* pada NPV yang menyerang genus lain seperti dari genus *Agrotis*, *Spodoptera*, *Bombyx*, dan *Mamesta* memiliki nilai *max/total score* ≤ 500 , dengan persentase kemiripan dan *query coverage* sebesar $\leq 76\%$ dan

98%. Hal ini menunjukkan semakin tinggi nilai *max/total score* pada NPV yang menyerang suatu genus maka persentase kemiripannya semakin tinggi dengan sampel *Hyta*NPV Bogor.

Homologi Nukleotida dan Asam Amino *Hyta*NPV.

Karakterisasi molekuler dari susunan dan organisasi gen berfungsi menunjukkan hubungan evolusi diantara anggota Baculoviridae. Sekuen polihedrin baik nukleotida maupun asam amino digunakan untuk mengidentifikasi kekerabatan yang ditunjukkan oleh protein. Isolat *Hyta*NPV dari Bogor memiliki nilai homologi nukleotida dan nilai homologi asam amino yang berbeda dengan 12 NPV yang menyerang genus lain yang terdapat di *Genbank* (Tabel 2 dan 3). Nilai homologi nukleotida dan asam amino tertinggi terdapat pada NPV yang menyerang genus *Helicoverpa* yaitu sebesar 98% dan 100%.

Berdasarkan Tabel 2, homologi nukleotida isolat *Hyta*NPV asal Bogor Jawa Barat menunjukkan kekerabatan tinggi, yaitu sebesar 98% dengan homologi nukleotida pada isolat *Hear*NPV Australia (No. akses: JN584482.1), *Hear*NPV Spanyol (No. akses: KJ701033.1), *He*SNPV Australia (No. akses: KU738899.1), *Heze*NPV Brazil (No. akses: KM596835), *Heze*NPV Australia (No. akses: U67265.1), dan *Heze*NPV Belanda (No. akses: AF334030.1).

Selain keenam spesies *Helicoverpa* NPV, digunakan juga spesies pembandingan dari NPV yang menyerang spesies lainnya dari ordo Lepidoptera.

Tabel 1. Hasil BLAST gen *lef-8* genom penuh (www.ncbi.nlm.nih.gov)

| Asal | Kode akses | Panjang DNA (pb) | Persentase kemiripan (%) | <i>Query coverage</i> | <i>Max/total score</i> |
|----------------------------------|------------|------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|
| <i>H. armigera</i> NPV Australia | JN584482.1 | 130992 | 99 | 99 | 1362/1362 |
| <i>H. armigera</i> NPV Spanyol | KJ701033.1 | 132265 | 99 | 99 | 1389/1389 |
| <i>H.SNPV</i> Australia | KU738899.1 | 130435 | 99 | 99 | 1380/1380 |
| <i>H. zea</i> sNPV Brazil | KM596835.1 | 129694 | 99 | 99 | 1380/1380 |
| <i>H. zea</i> NPV Australia | U67265.1 | 6517 | 99 | 99 | 1380/1380 |
| <i>H. zea</i> NPV Belanda | AF334030.1 | 130869 | 99 | 99 | 1380/1380 |
| <i>A. segetum</i> NPV Poland | DQ123842.1 | 147544 | 75 | 97 | 500/500 |
| <i>S. exigua</i> NPV Belanda | AF169823.1 | 135611 | 72 | 97 | 412/412 |
| <i>B. mori</i> NPV Japan | AB009987.1 | 3682 | 72 | 97 | 407/407 |
| <i>M. configurata</i> NPV Canada | U59461.2 | 155060 | 72 | 96 | 421/421 |
| <i>P. xylostella</i> MNPV USA | DQ457003.1 | 134417 | 71 | 97 | 389/389 |
| <i>S. litura</i> NPV Cina | AF325155 | 139342 | 70 | 98 | 345/345 |

Tabel 2. Persentase homologi nukleotida *Hyta*NPV Bogor, Jawa Barat, gen *lef-8* dengan sampel dari *GenBank*

| Asal Isolat | Persentase homologi (%) | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| 1 | ID | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 98.6 | ID | | | | | | | | | | | |
| 3 | 98.6 | 100 | ID | | | | | | | | | | |
| 4 | 98.8 | 99.7 | 99.7 | ID | | | | | | | | | |
| 5 | 98.6 | 100 | 100 | 99.7 | ID | | | | | | | | |
| 6 | 98.6 | 100 | 100 | 99.7 | 100 | ID | | | | | | | |
| 7 | 98.8 | 99.7 | 99.7 | 100 | 99.7 | 99.7 | ID | | | | | | |
| 8 | 73 | 73.5 | 73.5 | 73.5 | 73.5 | 73.5 | 73.5 | ID | | | | | |
| 9 | 70.5 | 70.6 | 70.6 | 70.7 | 70.6 | 70.6 | 70.7 | 79.4 | ID | | | | |
| 10 | 70.2 | 70.7 | 70.7 | 70.6 | 70.7 | 70.7 | 70.6 | 67.5 | 68 | ID | | | |
| 11 | 71.5 | 71.4 | 71.4 | 71.5 | 71.4 | 71.4 | 71.5 | 75.8 | 75.5 | 66.5 | ID | | |
| 12 | 0.355 | 35.2 | 35.2 | 35.2 | 35.2 | 35.2 | 35.2 | 35 | 35.6 | 35.5 | 34.2 | ID | |
| 13 | 0.363 | 35.9 | 35.9 | 35.9 | 35.9 | 35.9 | 35.9 | 34.7 | 35.3 | 35.2 | 33.7 | 67.8 | ID |

1. *Hyta*NPV Bogor, 2. *Hear*NPV Australia, 3. *Hear*NPV Spanyol, 4. *HeS*NPV Australia, 5. *Heze*NPV Brazil, 6. *Heze*NPV Australia, 7. *Heze*NPV Belanda, 8. *Agse*NPV Poland, 9. *Spex*NPV Belandam, 10. *Bomo*NPV Japan, 11. *Maco*NPV Canada, 12. *Plyx*MNPV USA, 13. *Spli*NPV Cina.

Tabel 3. Persentase homologi asam amino *Hyta*NPV Bogor, Jawa Barat, gen *lef-8* dengan sampel dari *GenBank*

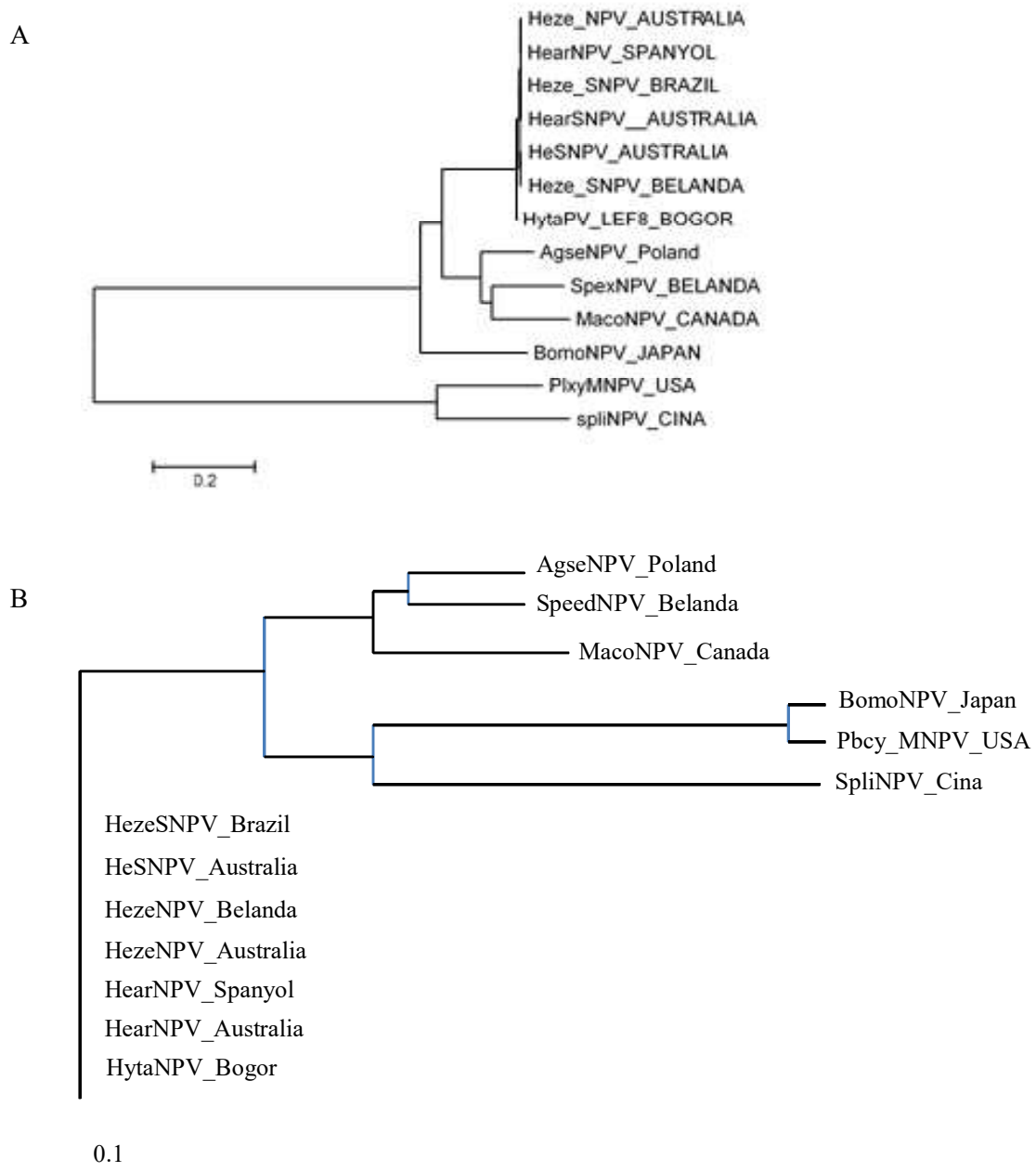
| Asal Isolat | Persentase homologi (%) | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| 1 | ID | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 100 | ID | | | | | | | | | | | |
| 3 | 100 | 100 | ID | | | | | | | | | | |
| 4 | 100 | 100 | 100 | ID | | | | | | | | | |
| 5 | 100 | 100 | 100 | 100 | ID | | | | | | | | |
| 6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | ID | | | | | | | |
| 7 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | ID | | | | | | |
| 8 | 78.6 | 78.6 | 78.6 | 78.6 | 78.6 | 78.6 | 78.6 | ID | | | | | |
| 9 | 77.4 | 77.4 | 77.4 | 77.4 | 77.4 | 77.4 | 77.4 | 86.6 | ID | | | | |
| 10 | 69.4 | 69.4 | 69.4 | 69.4 | 69.4 | 69.4 | 69.4 | 68.3 | 69.8 | ID | | | |
| 11 | 76.2 | 76.2 | 76.2 | 76.2 | 76.2 | 76.2 | 76.2 | 83.7 | 80.3 | 63.3 | ID | | |
| 12 | 69 | 69 | 69 | 69 | 69 | 69 | 69 | 67.9 | 69.4 | 98.8 | 63 | ID | |
| 13 | 67.6 | 67.6 | 67.6 | 67.6 | 67.6 | 67.6 | 67.6 | 66.5 | 67.6 | 66.1 | 61.2 | 66.1 | ID |

1. *Hyta*NPV Bogor, 2. *Hear*NPV Australia, 3. *Hear*NPV Spanyol, 4. *HeS*NPV Australia, 5. *Heze*NPV Brazil, 6. *Heze*NPV Australia, 7. *Heze*NPV Belanda, 8. *Agse*NPV Poland, 9. *Spex*NPV Belanda, 10. *Bomo*NPV Japan, 11. *Maco*NPV Canada, 12. *Plyx*MNPV USA, 13. *Spli*NPV Cina.

Tujuannya yaitu untuk melihat jarak kekerabatan antara isolat *HytaNPV* Bogor dengan spesies Lepidoptera NPV lainnya. Homologi nukleotida *HytaNPV* Bogor dengan *AgseNPV* Poland (No. akses: DQ123842.1) sebesar 73%, *SpexNPV* Belanda (No. akses: AF169823.1) sebesar 70%, *BomoNPV* Japan (No. akses: AB009987.1) sebesar 70%, *MacoNPV* Canada (No. akses: U59461.2) sebesar 71%, *PlxyMNPV* USA (No. akses: DQ457003.1) sebesar 35%, dan *SpliNPV* Cina (No. akses: AF325155) sebesar 36%.

Isolat *HytaNPV* asal Bogor Jawa Barat pada tabel homologi asam amino menunjukkan kekerabatan tinggi dengan NPV yang menyerang genus *Helicoverpa* yaitu sebesar 100%. Isolat *HytaNPV* jika dibandingkan dengan spesies lain nilai homologi asam amino dari ordo Lepidoptera tidak mencapai 80%.

Berdasarkan hasil tabel homologi nukleotida dan tabel asam amino gen *lef-8*, *HytaNPV* diduga berasal dari spesies yang sama dengan NPV menyerang genus *Helicoverpa* karena memiliki nilai homologi nukleotida



Gambar 4. Pohon filogeni urutan nukleotida NPV (A) dan filogeni urutan asam amino (B) diolah menggunakan software Mega 6 berdasarkan gen *lef-8* menggunakan metode *neighbour-joining* dengan *bootstrap* 1000x.

dan asam amino yang tinggi. Virus dikelompokkan ke dalam spesies yang sama apabila menunjukkan kesamaan sekuen nukleotida (tingkat homologi) di atas 89% (King *et al.*, 2012).

Hasil tabel homologi urutan nukleotida dan urutan homologi asam amino dari setiap isolat menunjukkan perbedaan. Homologi urutan nukleotida mempunyai nilai kekerabatan terbesar sebesar 98% sedangkan pada homologi urutan asam amino mempunyai nilai mencapai 100%. Adanya perbedaan urutan basa nukleotida pada *HytaNPV* dengan NPV yang menyerang genus *Helicoverpa* yang tidak menimbulkan perbedaan pada translasi dalam menghasilkan asam amino bisa terjadi karena adanya mutasi diam (*silent mutation*), yaitu perubahan suatu pasang basa dalam gen yang menimbulkan perubahan suatu kode genetik tetapi tidak mengakibatkan perubahan atau pergantian asam amino yang dikode (Stansfield *et al.*, 2003).

Analisis Filogeni *HytaNPV*. Konstruksi pohon filogeni urutan nukleotida dan pohon filogeni urutan asam amino (Gambar 4) dengan menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ) menunjukkan sedikit perbedaan pada percabangan antara *HytaNPV* dengan NPV lainnya. *HytaNPV* dari Bogor pada pohon filogeni NJ berada dalam kelompok yang sama dengan NPV yang menyerang genus *Helicoverpa* asal Australia, Belanda, Brazil, Spanyol, sedangkan NPV Lepidoptera dari genus lain berada pada kelompok yang terpisah.

SIMPULAN

Gen *lef-8* berhasil mengidentifikasi *HytaNPV*, analisis urutan DNA berdasarkan gen *lef-8* menunjukkan bahwa isolat *HytaNPV* Bogor tergolong ke dalam spesies virus yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan isolat NPV yang menyerang genus *Helicoverpa* yang berasal dari Brazil, Australia, Spanyol, dan Belanda dengan nilai homologi nukleotida dan asam amino sebesar 98% dan 100%. Berdasarkan analisis filogeni, isolat *HytaNPV* masuk dalam grup yang sama dengan NPV yang menyerang genus *Helicoverpa*.

SANWACANA

Terimakasih kepada Perkebunan Gunung Mas PTPN 8, Laboratorium Virologi Tumbuhan dan Laboratorium Patologi Serangga, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor atas kerjasama serta fasilitas penelitian yang telah diberikan selama penulis melaksanakan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya A & Gopinathan KP. 2002. Characterization of late gene expression factors *lef-9* and *lef-8* from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen Virol.* 83: 2015–2023.
- Agustin HSW. 2013. Analisis potensi bakteri kitinolitik asal limbah udang dan kepiting kandidat penghasil enzim kitinase serta anti jamur *Saprolegnia* sp. menggunakan marka molekuler gen 16S rRNA Tesis. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Arifin M. 2006. Kompatibilitas *S/NPV* dengan *HaNPV* dalam pengendalian ulat grayak dan ulat pemakan polong kedelai. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 25(1): 65–70.
- Blissard G, Black B, Crook N, Keddie BA, Possee R, Rohrmann G, Theilmann D, & Volkman L. 2000. Family Baculoviridae. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, McGeoch DJ, Maniloff J, Mayo MA, Pringle CR, & Weckner RB (Eds.). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. pp. 195–202. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego.
- [BPS] Badan Pusat Statistik 2016. Produksi Tanaman Perkebunan menurut Propinsi dan Jenis Tanaman, Indonesia (000 Ton), 2012-2015. BPS. Jakarta.
- Cheng XW. 1998. Characterization of two nucleopolyhedrosis viruses from *Thysanoplusia orichalcea* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) from Indonesia. Dissertasion. Clemson University. Amerika Serikat.
- Elrod SL & Stansfield WD. 2007. *Genetika*. Damaringtyas (penerjemah). Erlangga. Jakarta.
- Ghosh B, Mukhopadhyay A, Das A, & Bahadur M. 2015. Restriction endonuclease fragment analysis of *Hyposidra talaca* nucleopolyhedrovirus genome. *Int. J. Curr. Res. Aca. Rev.* 3(8): 81–87.
- Grzywacz D, Rabindra RJ, Brown M, Jones KA, & Parnell M. 2011. *The Helicoverpa armigera NPV Manual Production*. FAO <http://www.fao.org/docs/eims/upload/agrotech/2011/hanpvmanual-pt2.pdf>. Diakses pada 3 April 2016.
- Herniou EA, Luque T, Chen X, Vlak JM, Winstanley D, Cory JS, & O'Reilly DR. 2003. Use of whole

- genome sequence data to infer *Baculovirus* phylogeny. *J. Virol.* 75(17): 8117–8126.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, & Lefkowitz EJ. 2012. *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Ninth Report of the International Commite on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego.
- Kaur B, Gupta VK, & Jindal V. 2014. Molecular filogenetic analysis of Indian strains of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV). *Indian J. Biotechnol.* 13: 186–194.
- Kunimi Y. 2007. Current status and prospects on microbial control in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 95: 181–186.
- Lestari MP. 2008. Karakterisasi Morfologi dan Molekuler *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) pada *Hyposidra talaca* Wlk (Lepidoptera: Geometridae). Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Li Y, Yang BS, Wang H, Zia RX, Wang L, Zhang ZH, Qil L, & Liu YQ. 2009. Mitochondrial DNA analysis reveals a low nucleotide diversity of *Caligula japonica* in China. *Afr. J. Biotec.* 8(12): 2707–2712.
- Mukhopadhyay A, Khewa S, & De D. 2011. Characteristics and virulence of nucleopolyhedrovirus isolated from *Hyposidra talaca* (Lepidoptera: Geometridae), a pest of tea in Darjeeling Terai, Indian. *Int. J. Trop. Insect. Sci.* 31(1–2): 13–19.
- Muliani Y, Widayat W, & Solihin A. 2011. Penggunaan jamur entomopatogen *Paecilomyces fumosoroseus* Bain. (PFR) terhadap mortalitas ulat jengkal (*Hyposydra talaca* Wlk.) hama pada tanaman teh (*Camellia sinensis* (L). O. Kuntze). Dalam: Intan A, Putra RE, Turmuktini T, Muliani Y, Kantikowati E, Kinasih I, Meliansyah R, & Bari IN (Eds.). *Hidup Sejahtera Bersama Serangga. Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Entomologi Indonesia (PEI) Cabang Bandung*. pp. 449–453. Bandung, 16-17 Februari 2011.
- Pradana R. 2013. Pengelolaan Kebun dan Upaya Pengendalian Ulat Jengkal dengan Aplikasi *Hyposidra talaca* Nucleopolyhedrovirus pada Tanaman Teh di PT Perkebunan Nusantara VIII Gunung Mas Bogor Jawa Barat. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Pramono S. 2000. Efek penyimpanan terhadap virulensi nuclear polyhedrosis virus yang diaplikasikan pada tanaman kedelai terserang ulat grayak (*Spodoptera litura* Fabr.). *J. HPT Tropika* 1(1): 29–32.
- Stansfield WD, Colome JS, & Cano RJ. 2006. *Schaum's Easy Outlines Biologi Molekuler dan Sel*. Fahmi V (Penerjemah). Erlangga. Jakarta.
- Starnes RL, Liu CL, & Marrone PG. 1993. *History, Use, and Future of Microbial Insecticides*. American Entomologist, Amerika Serikat.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, & Kumar S. 2011. *MEGA5: Molecular Evolutionary*. Cambridge University. Amerika Serikat.
- Widayat W. 1996. *Hama-hama pada Tanaman Teh dan Cara Pengendaliannya*. Balai Penelitian Teh dan Kina, Gambung. Bandung.
- Yu W, Du YC, Quan YP, Nie ZM, Chen J, Lv ZB, & Zhang YZ. 2013. Characterization of late gene expression factor LEF-10 of *Bombyx mori* nucleopolyhedro virus. *Virus Res.* 175(1): 45–51.