

**Respon Imun Humoral Pada Larva *Helicoverpa armigera* hubner (Lepidoptera : Noctuidae) Pasca Infeksi HaNPV (*Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus) dan Keturunannya (Humoral Immune Response on *Helicoverpa armigera* Hubner Larvae (Lepidoptera : Noctuidae) Post HaNPV (*Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus) Infection and its Progeny)**

**Nani Kurnia**

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Makassar

**Abstract**

NPV is one of the biological insecticides that kill the target by infecting their cells including hemocytes. Hemocytes play a key role on defense mechanism against pathogens like NPV. This defense mechanism may cause the insect to become more tolerant as well as to chemical insecticides. The tolerances of insect to NPV could be induced by humoral immune system (HIS). The HIS can be recorded by watch prophenoloxidase (PPO) activity or the presence of antibacterial compound (AC). Based on that assumption, this research was conducted to observe the alteration of PPO and AC due to sublethal infection of HaNPV (*Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis viruses) on *Helicoverpa armigera* larvae and their offspring. PPO was detected as PO and measured spectrometrically on microplate-reader. Protein concentration was measured based on the color which appears due to protein-CBG (PO and Bradford reagent) bond at 570 nm. Protein concentration was calibrated with BSA. The occurrence of antibacterial activity was tested using modified Hoffman method. Inhibition zones were used to measure the antibacterial activity from *E. coli* (Gram negative) and *B. cereus* (Gram positive). Immune responses were observed on the fifth instar *Helicoverpa armigera* after 24 hpi by HaNPV (NPV-P) and their offspring (NPV-F1 and NPV-F2). Also, immune response on control larvae (K-P) were monitored and their filial (K-F1 and K-F2). The titer of PO enzyme were not significantly different for each generation. There was no inhibition zone on antibacterial activity test in every generation on NPV-P and K-P larvae.

**Keywords:** *Helicoverpa armigera*, HaMNPV, humoral immune system, prophenoloxidase (PPO), antibacterial activity

**A. Pendahuluan**

Infeksi serangga oleh NPV terjadi jika virus ini masuk ke dalam usus tengah larva dan infeksi awal terjadi pada sel epitel usus tengah. Pada larva Lepidoptera, turunan virion hasil replikasi pada epitel usus tengah tersebut akan dilepaskan ke hemosol (Flipsen, 1995) yang mengandung hemolimf dan hemosit.

Hemosit, berperan penting dalam sistem pertahanan untuk menghadapi benda asing termasuk patogen (Pech and Strand, 1996). Sistem pertahanan yang dapat dilakukan oleh hemosit diantaranya adalah sistem imun seluler dan humoral. Secara seluler, hemosit dapat melakukan koagulasi hemolimf, fagositosis serta enkapsulasi dan nodulasi. Secara humoral, hemosit merupakan sumber senyawa

humoral dan enzimatik yang berperan penting dalam sistem seluler seperti enzim phenoloxidase dan peptida anti bakteri (Azambuja *et al.*, 1999).

Penelitian-penelitian yang telah dilakukan telah memberikan kesimpulan bahwa infeksi serangga oleh virus dapat mengganggu sistem imun serangga. Namun bentuk gangguan respon imun tersebut belum diketahui. Karenanya perlu dilakukan penelitian bagaimana sistem imun humoral serangga inang bereaksi terhadap infeksi NPV. Adapun respon imun yang akan diuji adalah aktivitas Prophenoloxidase (PPO) dan kehadiran senyawa antibakteri.

## B. Metode penelitian

### 1. Serangga Uji

Penelitian ini dimulai dengan aklimasi instar 5 *H. Armigera* yang diperoleh dari lapangan, selama 1 hari di laboratorium. Larva tersebut kemudian diinfeksi dengan HaNPV dan selanjutnya dipelihara kembali selama 1 hari. Keesokan harinya, sebagian larva diamati respon imunnya dan sisanya dipelihara kembali sampai menghasilkan keturunan F1 dan F2. Pengamatan respon imun juga dilakukan pada instar 5 dari masing-masing generasi tersebut.

### 2. Perlakuan

Dalam penelitian ini serangga uji yang digunakan adalah instar 5 awal *Helicoverpa armigera*. Infeksi dilakukan dengan cara mengkontaminasi pakannya dengan dosis subletal ( $1,1 \times 10^6$  PIB/larva) HaNPV. Dosis subletal ini menyebabkan kematian 40% populasi instar 5 *H. armigera*.

Pengamatan respon dilakukan pada 24 jam setelah infeksi (jsi) (NPV-P) serta pada instar 5 generasi pertama (NPV-F1) dan generasi kedua (NPV-F2). Sebagai kontrol digunakan instar yang sama baik untuk parental (K-P) maupun keturunannya (K-F1 dan K-F2).

### 3. Aktivitas Prophenoloxidase

Prophenoloxidase (PPO) dapat dideteksi dengan melihat bentuk aktifnya, yaitu phenoloxidase (PO). Dalam penelitian ini, PO diketahui dengan menggunakan reagen Bradford dan konsentrasinya diukur dengan menggunakan panjang gelombang 570 nm pada alat "mikroplate reader". Sebagai standar konsentrasi protein, digunakan (BSA) (Trudeau *et al.*, 2001).

Aktivitas phenoloxidase dikaji dengan menggunakan L-DOPA sebagai substrat. 10 µl hemolimf ditambah dengan 90 µl buffer kakodilat dan dikocok dengan menggunakan vorteks, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Selanjutnya 50 µl tripsin ditambahkan untuk mengaktifkan PPO, dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruangan. Terakhir, 50 µl L-DOPA 10mM ditambahkan untuk berikatan dengan PO, kemudian diinkubasi kembali selama 5 menit. Reaksi PO dengan L-DOPA kemudian dihentikan dengan menambahkan PTU dan konsentrasinya diencerkan dengan menambahkan buffer kakodilat 800 µl (Cheng *et al.*, 2002). Kehadiran PO dideteksi dengan menggunakan reagen Bradford (Trudeau *et*

*al.*, 2001). Berdasarkan perbandingan "Assay reagent" Bradford dengan BSA yang tepat dan sample PO diuji dengan menggunakan alat *microplate reader* dengan panjang gelombang 570 nm. Sebagai blanko, digunakan semua bahan yang digunakan dalam ekstraksi PO kecuali hemolimf yang digantikan dengan air.

### 4. Aktivitas Antibakteri

Kehadiran peptida antibakteri dilakukan dengan metode Hoffman (1981) yang dimodifikasi (dalam Kaaya, 1998). Pertama, hemolimf ditambah dengan PTU kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Uji zona inhibisi dilakukan pada medium *nutrien agar* yang telah diinokulasi bakteri pada fase log. 10 µl sampel supernatan hemolimf dan akudes steril, sebagai pembanding, ditetaskan pada agar untuk kemudian diinkubasi pada suhu ruang.

Uji antibakteri ini dilakukan pada bakteri Gram negatif (*Escherichia coli*) dan Gram positif (*B. cereus*) yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi ITB. Kedua bakteri yang digunakan dalam uji antibakteri ini merupakan bakteri pada fase log (Kaaya, 1993)

## C. Hasil dan Pembahasan

### 1. Aktivitas Prophenoloxidase

Dalam penelitian ini enzim prophenoloxidase (PPO) diamati dalam bentuk aktifnya yaitu phenoloxidase (PO). PO diuji dengan "Bradford protein assay" (BPA). BPA merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk mengetahui total konsentrasi protein pada sample. Metode ini berdasarkan pada proporsi ikatan antara CBG dengan protein. Bila konsentrasi protein tinggi maka ikatan CBG dengan protein akan semakin banyak pula. Hal ini diperlihatkan dengan semakin gelapnya warna sampel. Metoda ini mengukur ikatan CBG terhadap protein sampel dan membandingkannya dengan ikatan antara CBG dengan konsentrasi protein standar seperti BSA. Untuk itu, metoda ini memerlukan kurva standar konsentrasi protein BSA terhadap absorbansi (Bickar, 2000 dan Tekin & Hansen, 2000). Kurva standar BSA dalam penelitian ini dibuat dengan mencampurkan 3 kali volume "Assay reagent" dengan 1 volume BSA dengan konsentrasi yang berbeda (Lampiran E). Panjang gelombang maksimum yang dapat digunakan dalam BPA adalah adalah 595 nm untuk bentuk yang berikatan dan 470 untuk yang tidak berikatan.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa titer PO yang terdeteksi pada larva kontrol maupun perlakuan tidak berbeda nyata pada semua generasi (Tabel 1.). Jika dikaitkan dengan peran PO menghadapi infeksi, yaitu melanisasi kapsul dan nodul (Pech & Strand, 1996) serta dalam penyembuhan luka (Lee *et al.*, 2000), maka dapat diduga bahwa tidak ada infeksi pada semua larva baik NPV-P maupun K-P. Dengan kata lain, larva NVP-P sudah kembali sehat dan sistem imunnya kembali berfungsi dengan baik pada 24 jam setelah infeksi.

Trudeau *et al.* (2001) mengamati titer PO pada *H. virescens* dan *H. zea* yang masing-masing diinfeksi dengan AcMNPV dan menyebabkan kematian 100% dan 58% populasinya. Titer PO pada kedua spesies itu tidak berbeda nyata sampai 24 jam setelah infeksi, namun setelah 72 jam titer PO melonjak tinggi pada 20% populasi *H. Zea*. Penelitian tersebut tidak membandingkan larva perlakuan dengan kontrol, namun mereka menjelaskan bahwa kerentanan terhadap infeksi awal kedua spesies adalah sama meskipun dosis yang diberikan menyebabkan kematian yang jauh berbeda. Namun demikian belum dapat dijelaskan korelasi antara titer PO, dosis dan waktu kehadiran BV pada hemolimf dengan titer PO. Berdasarkan hal tersebut, dapat diduga bahwa infeksi awal yang terjadi dalam penelitian ini sama dengan infeksi awal pada *H. Zea* dan *H. Virescens*, sehingga ada kemungkinan titer PO, pada *H. Armigera*, juga dapat meningkat setelah 72 jam infeksi.

Tabel 1. Titer enzim PO larva *H. armigera* ( $\mu\text{g/ml}$ )

Perlakuan	Generasi		
	F0	F1	F2
Kontrol (K)	130,242± 31,351 a	141.053± 11923 a	121,226± 58,529 a
NPV	130,425± 10,287 a	141.373± 34015 a	142,991± 38,775 a

Keterangan: angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada  $\alpha = 0,05$ .

Shelby & Webb (1999) mengatakan bahwa infeksi polydnavirus dapat mengurangi aktivitas PO dalam hemolimf inang. Namun, selanjutnya mereka mengatakan bahwa eliminasi sel yang terinfeksi akan diikuti dengan pulihnya fungsi sel imun. Dengan demikian dapat diduga bahwa semua sistem

imun inang akan kembali normal. Sehingga, dalam penelitian ini, titer PO pada larva perlakuan akan kembali normal seperti halnya pada larva kontrol.

## 2. Uji Aktivitas Peptida Antibakteri

Sintesis peptida antibakteri merupakan langkah selanjutnya dalam sistem imun serangga, apabila respon seluler tidak mampu mengatasi invasi bakteri (Kaaya, 1993). Peptida tersebut dinamakan antibakteri karena dapat membunuh atau menetralkan bakteri Gram negatif dan positif, fungi, parasit, sel kanker, dan bahkan virus berselaput seperti HIV dan virus simplex herpes. Namun demikian ada juga antibakteri yang selektif terhadap mikroba (Hancock & Scott, 2000).

Pada serangga, peptida antibakteri disintesis oleh badan lemak (Lavine & Strand, 2002) namun pada beberapa serangga hemosit mampu menghasilkan peptida tersebut (Lowenberger, 2001), untuk kemudian di lepaskan ke hemolimf (Lamberty, 1999). Dalam penelitian ini peptida antibakteri diisolasi dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan tersebut diharapkan terdiri dari peptida antibakteri.

Dalam penelitian ini, aktivitas antibakteri tidak ditemukan baik pada perlakuan maupun kontrol, pada semua generasi (Tabel 2.). Hal ini menunjukkan tidak ada infeksi lanjut pada larva NPV-P. Ini mungkin terjadi jika dikaitkan dengan pernyataan bahwa jika respon seluler tidak mampu mengatasi invasi patogen, maka sintesis peptida antibakteri adalah langkah selanjutnya (Kaaya, 1993). Berarti, dapat dikatakan bahwa, dalam penelitian ini respon seluler telah mampu menghentikan invasi patogen (NPV).

Tabel 2. Uji aktivitas antibakteri pada hemolimf *H. Armigera*

Perlakuan	GENERASI					
	P		F1		F2	
	G(-)	G(+)	G(-)	G(+)	G(-)	G(+)
Akuades	-	-	-	-	-	-
Kontrol (K)	-	-	-	-	-	-
NPV	-	-	-	-	-	-

Keterangan: G(-): Gram negatif, G(+): Gram Positif

Nampaknya peptida antibakteri akan disintesis jika infeksi yang terjadi berkelanjutan. Dengan kata lain, peptida antibakteri akan ditemukan pada larva yang sakit. Hal ini, dikarenakan pada pengamatan hanya dilakukan pada larva yang sehat baik dari kelompok perlakuan maupun kontrol. Seperti yang dikatakan oleh Kaaya (1993) bahwa sintesis antibakteri akan terjadi apabila masih ada patogen dalam jaringan tubuh serangga yang tidak dapat mati oleh sistem imun seluler. Berdasarkan hal tersebut dapat diduga juga bahwa dalam penelitian ini larva perlakuan benar-benar sudah dapat menghilangkan virus dari tubuhnya sehingga sistem imun kembali normal.

Chernysh *et al.* (1996) berpendapat lain. Mereka menginduksi *Palomena prasina* (Hemiptera) dengan *Escherichia coli* mati. Mereka menemukan peptida metalnikowin I (peptida kaya prolin). Peptida tersebut kemudian diuji dengan metoda zona hambat. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa peptida ini dapat menghambat bakteri Gram negatif namun konsentrasinya harus tinggi sekitar 200  $\mu$ M. Berdasarkan hal tersebut, mungkin dalam penelitian ini peptida terekspresi tapi konsentrasinya sangat rendah sehingga belum dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Konsentrasi minimal, untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme oleh peptida antibakteri, berbeda untuk setiap organisme (Lamberty *et al.*, 1999, Lamberty *et al.*, 2001, Lauth *et al.*, 1998). Seperti Lamberty *et al.*, (2001) yang memperlihatkan konsentrasi minimal peptida termisin, heliomisin dan defensin untuk menghambat pertumbuhan beberapa mikroorganisme. Adapun mikroorganisme yang diuji berasal dari kelompok bakteri Gram positif, Gram negatif, fungi berfilamen serta ragi. Peptida-peptida tersebut diisolasi dari *Pseudacanthotermes spiniger* (Isoptera), *H. Virescens* (Lepidoptera) dan *Phormia terranova* (Diptera) yang kemudian diperbanyak secara rekombinan. Berdasarkan hal tersebut, dapat diduga bahwa dalam penelitian ini, konsentrasi peptida antibakteri yang disekresikan ke dalam hemolimf masih rendah, sehingga tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

## D. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa dosis subletal NPV tidak mengubah respon sistem imun humoral serangga. Hal ini dapat diketahui dari aktivitas enzim prophenoloksidase dan kehadiran aktivitas antibakteri yang tidak berbeda nyata antara perlakuan dengan kontrol pada setiap generasi yang diuji.

## E. Daftar Pustaka

- Azambuja P., D. Feder, C.B. Mello, S.A.O. Gomes, and E. S. Garcia, 1999, Immunity in *Rhodnius prolixus*: Trypanosomatid-vector interaction, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 94 (Suppl. I):219-222.
- Bickar D., 2002, Total protein assays, [http://www.science.smith.edu/departments/biochem\\_353/Bradford.htm](http://www.science.smith.edu/departments/biochem_353/Bradford.htm)
- Cheng W., C. Liu, J. Chen, 2002., Effect of nitrite on interaction between the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its pathogen *Lactococcus garvieae*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 50, 189-197.
- Chernysh S., S.I. Kim, G. Bekker, V.A. Pleskach, N.A. Filtova, V.B. Anikin, V.G. Platonov, and P. Bulet, 2002, Antiviral and antitumor peptides from insects, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:12628-12632.
- Flipsen H., 1995, *Pathogenitas Induced by (Recombinant) Baculovirus in Insect N W O*, Netherlands.
- Hancock R.E.W., and M.G. Scott, 2000, The role of antimicrobial peptides in animal defenses, Colloquium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:8856-8861.
- Hoffmann J.A., 1995, Innate immunity of insects, *Curr. Opin. In Immun.*, 7, 4-10
- Kaaya, G.P., 1993, Inducible humoral antibacterial immunity in insects, *dalam Insect Immunity* (Pathak J.P.N, 1993), Kluwer Academic Publishers.
- Lamberty M., D. Zachary, R. Lanot, C. Bordereus, A. Robert, J.A. Hoffmann, and P. Bulet, 1999, Insect immunity. Isolation from the Lepidopteran *Heliothis virescens* of novel insect defensin with potent antifungal activity, *J. Biol. Chem.* 274(14):9320-9326.
- Lamberty M., D. Zachary, R. Lanot, C. Bordereus, A. Robert, J.A. Hoffmann, and P. Bulet, 2001, Insect immunity. Constitutive expression of cysteine-rich and a linear

- antibacterial peptide in termite insect, *J. Biol. Chem.*, 276(6):4085-4092.
- Lauth X., A. Nesin, J. Briand, J. Roussel, and C. Hetru, 1998, Isolation, characterization and chemical synthesis of new insect defensin from *Chironomus plumosus* (Diptera), *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28:1059-1066
- Lavine M.D., and M.R. Strand, 2002, Insect hemocytes and their role in immunity, *Insect Biochem and Mol Biol.*, 32:1295-1309.
- Lee K.M., K.Y. Lee, H.W. Choi, M.Y. Cho, T.H. Kwon, S. Kawabata, and B.L. Lee, 2000, Activated phenoloxidase from *Tenebrio molitor* larvae enhances the synthesis of melanin by using a vitelogenin-like protein in the presence of dopamine, *Eur. J. Biochem.*, 267, 3695-3703.
- Lowenberger C., 2001, Innate immune response of *Aedes aegypti*, *Insect Biochem. and Mol. Biol.* 31:219-229.
- Pech L.L., and M.R. Strand, 1996, Granular cell are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes, *J. Cell Sci.*, 109:2053-2060.
- Shelby K. S., and B. A. Webb, 1999, Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity, *J. Insect physiol.*, 45:507-514.
- Tekin S., and P.J. Hansen, 2000, *Use of the Bradford Protein Assay*, <http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/mini Bradford.htm>.
- Trudeau D., J.O. Washburn, and L.E. Volkman, 2001, Central role of hemocytes in *Autographa California* M Nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*, *J. of Virology*, 75: 996-1003.