



# Analisis filogenetik *Hyposidra talaca* nucleopolyhedrovirus (*HytaNPV*) yang diisolasi dari perkebunan teh Gunung Mas, Bogor, Jawa Barat dan virulensinya terhadap *Hyposidra talaca* Walker

Phylogenetic analysis of *Hyposidra talaca* nucleopolyhedrovirus (*HytaNPV*) isolated Gunung Mas tea plantation from Bogor, West Java and its virulency against *Hyposidra talaca* Walker

Yayi Munara Kusumah<sup>1</sup>\*, Fitrianingrum Kurniawati<sup>1</sup>, Eka Dana Kristanto<sup>2</sup>, Franciskus Parasian<sup>2</sup>, Michael Christian<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, IPB University  
Jalan Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

<sup>2</sup>Kementrian Pertanian Republik Indonesia  
Jalan Harsono RM No.3, Ragunan, Ps. Minggu, Jakarta 12550, Indonesia

(diterima Februari 2023, disetujui Juli 2023)

## ABSTRAK

*Hyposidra talaca* (Walker) merupakan hama penting tanaman teh. Larva *H. talaca* dapat menyebabkan kerugian antara 40–100% pada musim kemarau jika tidak dilakukan pengendalian yang tepat. Hama ini memiliki musuh alami berupa predator, parasitoid, dan patogen. Salah satu entomopatogen *H. talaca* adalah NPV. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kekerabatan molekuler dari *HytaNPV* asal Bogor melalui sekuens gen DNA polimerase dan mengukur tingkat virulensi isolat NPV yang berasal dari *H. talaca*. Spesies yang sama dari lokasi yang berbeda dapat memiliki variabilitas genetik. Oleh karena itu, karakterisasi molekuler dengan *polymerase chain reaction* (PCR) pada sekuens DNA polimerase merupakan salah satu cara untuk mempelajari genetik *HytaNPV*. NPV diisolasi dari larva *H. talaca* terinfeksi yang dikumpulkan dari lapangan. Isolat DNA tersebut digunakan sebagai cetakan PCR untuk amplifikasi gen DNA polimerase dengan target ampikon  $\pm 1.000$  pb. Proses sekuensing mengikuti hasil PCR untuk mendapatkan data sekuens nukleotida. Hasil sekuensing DNA polimerase *HytaNPV* diselaraskan dengan data BLAST GenBank untuk memberikan informasi tentang hubungan *HytaNPV* dengan NPV yang diisolasi dari wilayah lain. Berdasarkan analisis karakteristik molekuler dengan sekuens gen DNA polimerase, *HytaNPV* Bogor memiliki tingkat homologi sebesar 93,9% dengan *HytaNPV* yang diisolasi dari India. *HytaNPV* Bogor memiliki hubungan genetik dengan NPV yang menginfeksi *Buzura suppressaria* dari China dan Australia. Uji virulensi isolat *HytaNPV* terhadap *H. talaca* menunjukkan nilai  $LT_{50}$  tertinggi sebesar 1,92 hari ditemukan pada perlakuan konsentrasi  $1,58 \times 10^7$  POBs/ml pada larva instar 2.

**Kata kunci:** entomopatogen, karakteristik molekuler, reaksi berantai polimerase, teh, variabilitas genetik

## ABSTRACT

*Hyposidra talaca* (Walker) is an important pest of tea plant. *H. talaca* can cause losses of between 40–100% in the dry season if proper control is not carried out. *H. talaca* has natural enemies such

\*Penulis korespondensi: Yayi Munara Kusumah. Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, IPB University.  
Jalan Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia, Tel: 0251-8629364/0251-8629362, Email: yayiku@apps.ipb.ac.id

as predators, parasitoids, and pathogens. One of the entomopathogens is NPV. This study aims to obtain molecular characteristics through DNA polymerase sequences and determine the virulence level of NPV isolates from *H. talaca*. The same species from different locations can have genetic variability. Therefore, molecular characterization by polymerase chain reaction (PCR) on DNA polymerase sequences is one way to study the genetics of *HytaNPV*. NPV was isolated from infected *H. talaca* larvae collected from the field. The DNA isolates were used as templates for PCR for DNA polymerase gene amplification with an amplicon target of  $\pm 1,000$  bp. A sequencing process followed the PCR provides nucleotide sequence. *HytaNPV* DNA polymerase sequencing results were aligned with GenBank's BLAST data to provide information on the relationship of *HytaNPV* to NPVs isolated from other regions. Based on molecular character analysis using DNA polymerase gene sequence, *HytaNPV* Bogor has a homology level of 93.9% with *HytaNPV* isolated from India. *HytaNPV* Bogor has a genetic relationship with the NPV that infects *Buzura suppressaria* from China and Australia. *HytaNPV* Bogor is similar to the NPV that infects *H. talaca* from India. The bioassay of *HytaNPV* isolate against *H. talaca* showed the highest  $LT_{50}$  value of 1.92 days was found in concentration of  $1.58 \times 10^7$  POBs/ml in second instar larvae.

**Key words:** entomopathogen, genetic variability, molecular characteristic, polymerase chain reaction, tea

## PENDAHULUAN

*Baculovirus* adalah patogen serangga yang menginfeksi berbagai spesies arthropoda, baik darat maupun air. Patogen ini dapat menginfeksi dengan cepat hingga menyebabkan kematian pada inangnya. *Baculovirus* pertama kali ditemukan menyerang ulat sutera (*Bombyx mori* (Linnaeus)) di China (Yi-peng et al. 2013). Entomovirus ini merupakan virus yang paling potensial untuk digunakan sebagai agens pengendali hayati hama serangga pada tanaman budi daya. Famili Baculoviridae memiliki dua anggota genera utama yang dibedakan berdasarkan bentuk badan oklusinya, yaitu *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) dengan struktur oklusi polihedron/polihedral yang mengandung banyak virion dan granulosis virus (GV) dengan struktur yang lebih kecil disebut granula yang mengandung hanya satu virion (Williams et al. 2023).

*Nucleopolyhedrovirus* (NPV) adalah virus dari keluarga Baculoviridae dan patogen serangga yang efektif sebagai agens pengendalian hama serangga. Federici (1997) menyatakan bahwa metode kerja NPV terbilang cepat; dalam 4–7 hari dapat menurunkan populasi larva serangga target lebih dari 90%. NPV juga telah teruji efektif mengendalikan ulat *Hyposidra talaca* (Walker) dan disebut juga *HytaNPV*, dengan persentase penurunan populasi hama 50–100% dalam waktu 7–11 hari. NPV memiliki beberapa keunggulan, yaitu spesifik inang, tidak merusak lingkungan,

dapat mengatasi masalah resistensi hama terhadap insektisida, dan kompatibel dengan komponen PHT lainnya (Pradana 2013).

Populasi *H. talaca* juga dapat dipengaruhi oleh serangga patogen salah satunya *Nucleopolyhedrovirus* (NPV). *Hyposidra talaca* pertama kali dilaporkan merusak tanaman budi daya di Indonesia pada tahun 1925. Beberapa tanaman budi daya dilaporkan diserang, yaitu teh, kopi, kina, dan coklat (Sudjarwo 1987). Pada tahun 1970-an, *H. talaca* menyerang beberapa perkebunan kakao di Jawa Timur dan Sumatera Utara. Saat ini *H. talaca* merupakan hama penting pada tanaman teh, umumnya menyerang daun atau pucuk muda. Serangan yang berat dapat mengakibatkan daun berlubang dan pucuk gundul sehingga serangan ini dapat menyebabkan kehilangan hasil yang tinggi. Larva *H. talaca* merupakan hama yang dapat menyebabkan kerugian antara 40–100% pada musim kemarau jika tidak dilakukan pengendalian yang tepat (Kusumah & Halala 2014). *H. talaca* memiliki musuh alami berupa predator dan parasitoid yang menyerang telur, larva, pupa, dan imago.

Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui karakteristik molekuler NPV. Karakterisasi molekuler melalui teknik *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan salah satu cara untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi suatu gen pada *HytaNPV*. Dalam penelitian ini, sekuens DNA polimerase digunakan untuk menganalisis filogeni dan homologi *HytaNPV*. Informasi filogeni dan

homologi diperlukan untuk melihat kekerabatan genetik antara *HytaNPV* Bogor, Indonesia, dan isolat NPV yang terdaftar di GenBank. Informasi ini menunjukkan karakter molekuler *HytaNPV* dan tempatnya di pohon filogenetik. Penelitian ini bertujuan menganalisis kekerabatan molekuler dari *HytaNPV* asal Bogor melalui sekuens gen DNA polimerase dan mengukur tingkat virulensi isolat NPV yang berasal dari *H. talaca*.

## BAHAN DAN METODE

Isolat *HytaNPV* merupakan koleksi dari Laboratorium Patologi Serangga yang diperoleh dari perkebunan teh Gunung Mas, Jawa Barat. Perlakuan dilakukan di Laboratorium Patologi Serangga, Laboratorium Bakteriologi, Laboratorium Nematologi, dan Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, IPB University.

### Pengambilan serangga uji

Larva pengujian dikoleksi dari perkebunan teh Nirmala Agung, Jayanegara, Kabupaten Sukabumi. Larva yang dikoleksi adalah larva instar ke-2, 3, dan 4 yang sehat. Larva pengujian tidak menunjukkan ciri-ciri larva yang terkena NPV, seperti tubuh berwarna pucat, lambat bergerak, terlihat diam, dan larva menggantung di pucuk tanaman teh. Larva yang dikoleksi, kemudian dikumpulkan ke dalam kotak plastik berdasarkan instar larva.

### Pengambilan sampel larva yang terinfeksi *HytaNPV*

Isolat virus yang akan digunakan untuk karakterisasi molekuler diperoleh dari PTPN VIII Kebun Gunung Mas dengan mengambil larva *H. talaca* yang mati dan menunjukkan gejala kematian akibat infeksi NPV. Ciri khas larva ulat yang mati akibat infeksi NPV di lapangan umumnya terdapat pada pucuk tanaman teh dengan posisi menggantung pada tungkai belakang membentuk huruf V. (Gambar 1). Kulit larva yang terinfeksi NPV sangat rapuh sehingga larva mudah patah saat disentuh. Cairan kental berwarna kecoklatan akan keluar melalui kulit tubuh larva yang pecah (Pradana 2013). Isolat *HytaNPV* yang diperoleh dari Kebun Gunung Mas disimpan dalam botol dan *cool box*. Isolat ini kemudian disimpan dalam lemari es pada suhu 4 °C hingga digunakan pada tahap selanjutnya.

### Isolasi dan purifikasi polyhedra *HytaNPV*

Larva yang mati akibat infeksi *HytaNPV* digerus dalam buffer SDS 0,1% hingga halus dengan menggunakan mortar steril. Penambahan SDS 0,1% dilakukan untuk mendapatkan tingkat pengenceran yang diinginkan. Suspensi ini dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml, kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 2.000 rpm. Pelet yang terbentuk dibuang dan diambil supernatannya. Supernatan yang diperoleh kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5.000 rpm selama 20 menit. Pelet yang diperoleh kemudian diresuspensi menggunakan



**Gambar 1.** Gejala infeksi *HytaNPV* pada *Hyposidra talaca* A: kadaver larva menggantung pada tanaman teh; B: tubuh larva yang pecah mengeluarkan cairan berwarna kecoklatan.

**Figure 1.** Symptoms of *HytaNPV* infection in *Hyposidra talaca*. A: the larva cadaver hangs on the tea plant; B: the ruptured body of the larva secretes a brownish liquid.

akuabides. Kemudian dilakukan sentrifugasi berulang seperti semula hingga diperoleh pelet murni dengan ciri air tersuspensi jernih dan pelet berwarna kecoklatan (Cheng 1998). Pelet hasil sentrifugasi diresuspensi dengan akuades dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 40x untuk melihat kemurnian polihedra dari pengotor.

### Ekstraksi DNA *HytaNPV*

Ekstraksi DNA *HytaNPV* dilakukan dengan menggunakan metode Cetyl-TrimethylAmmonium Bromide (CTAB) yang dimodifikasi (Doyle & Doyle 1990). Sampel yang diekstrak terdiri atas 50 µl dan 100 µl pelet polyhedra murni. Setiap sampel dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* 1,5 ml kemudian ditambahkan 500 µl bufer CTAB yang mengandung 1% β-mercaptoethanol.

Sampel kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 60 °C menggunakan penangas air dan setiap 10 menit tabung dibolak-balik hingga homogen. Setelah itu, sampel diinkubasi selama 3 menit pada suhu 28 °C, dan ditambahkan 500 µl chloroform-isoamylalcohol (24:1), kemudian disentrifugasi pada 11.000 selama 20 menit. Supernatan pada lapisan atas diambil sebanyak ½ volume larutan tanpa menyentuh pelet, kemudian ditambahkan 1/10 volume natrium asetat larutan yang diambil, dan 2/3 volume isopropanol diambil. Supernatan kemudian diinkubasi semalaman pada suhu -20 °C. Supernatan yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Pelet yang terbentuk kemudian dikeringkan dengan meletakkan tabung secara perlahan di atas kertas tisu selama 2–3 jam. Pelet kering disuspensikan kembali dengan 50 µl bufer TE pH 8 dan disimpan dalam lemari es pada suhu 4 °C.

### Amplifikasi DNA *HytaNPV* menggunakan PCR

Amplifikasi DNA *HytaNPV* menggunakan primer yang dirancang di Laboratorium Patologi Serangga. Primer yang digunakan adalah EDK-F (5'- CGA CGG CAA CAT CAA CGA TTA C – 3') dan EDK-R (5'- GTG CAA TGT GCT AGC CGT AT– 3'). Setiap reaksi amplifikasi *HytaNPV* menggunakan 2 µl *HytaNPV* DNA (±40 ng/µl), 12,5 µl Dream Taq Green PCR Master Mix (2X),

1 µl *forward* primer, 1 µl *reverse* primer, dan 8,5 µl ddH<sub>2</sub>O. Amplifikasi dengan PCR melalui beberapa tahapan, yaitu predenaturasi pada suhu 94 °C selama 4 menit, denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 60 °C selama 1 menit, *elongasi* pada suhu 72 °C selama 2 menit, dan post-*elongasi* pada 72 °C selama 10 menit, dan 4 °C untuk suhu penyimpanan akhir hasil amplifikasi. Siklus ini diulang sebanyak 30 kali.

Elektroforesis dilakukan pada gel agarosa 1% yang telah ditambahkan 1 µl *FloroVue*<sup>TM</sup> yang direndam dalam larutan Tris Borate EDTA (TBE) pada 50 V selama 50 menit. Hasil elektroforesis gel kemudian divisualisasikan menggunakan UV-transilluminator, dan hasil yang terlihat difoto menggunakan kamera digital.

### Analisis urutan DNA, asam amino, dan homologi

Urutan DNA dari mesin sekuensing dirapikan melalui proses *trimming* untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat. *Trimming* dilakukan karena data sekuens DNA mentah yang berasal dari mesin sekuensing umumnya memiliki beberapa faktor kesalahan dasar sehingga perlu dilakukan perbandingan dengan data lain untuk mendapatkan data yang lebih akurat (Yang et al. 2019). Sekuens hasil *trimming* disejajarkan menggunakan program *CAP contig assembly* pada program BioEdit versi 7.26 untuk mendapatkan sekuens DNA keseluruhan dari kedua pasangan primer *sequencing HytaNPV* (contig). Sekuens DNA contig digabungkan dengan contig *HytaNPV* dari penelitian sebelumnya (Sinulingga 2017), yang menjadi dasar perancangan primer untuk mendapatkan sekuens DNA polimerase yang lebih lengkap, panjang, dan spesifik.

Hasil sekuens dianalisis menggunakan program *basic local alignment search tool* (BLAST) dengan program yang dioptimalkan untuk mendapatkan sekuens basa yang mirip (algoritma agak mirip/BLASTn) yang terdapat pada *website* National Center for Biotechnology Information (NCBI). Urutan nukleotida yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan *multiple alignment* ClustalW pada *software sequence alignment editor* BioEdit versi 7.2.6. Analisis homologi asam amino dilakukan dengan menerjemahkan nukleotida menggunakan [www.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\_transeq/ dari European Bioinformatics Institution.

Analisis filogenik dilakukan dengan menggunakan pendekatan *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1.000x dengan program Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) X.

### Uji virulensi *HytaNPV* terhadap *H. talaca*

Percobaan dilakukan berdasarkan rancangan acak lengkap dengan dua faktor, yaitu konsentrasi dan instar larva. Faktor konsentrasi terdiri atas enam taraf, yaitu 0,  $1,58 \times 10^7$  POBs/ml,  $1,58 \times 10^6$  POBs/ml,  $1,58 \times 10^5$  POBs/ml,  $1,58 \times 10^4$  POBs/ml,  $1,58 \times 10^3$  POBs/ml dan faktor instar larva terdiri atas tiga taraf, yaitu instar ke-2, 3, dan 4. Setiap ulangan terdiri atas 10 larva *H. talaca*. Daun teh berukuran 3 cm x 3 cm dicelupkan ke dalam suspensi NPV, kemudian daun dikeringanginkan. Daun teh selanjutnya diberikan pada larva *H. talaca* yang telah dipuasakan selama 12 jam. Setelah 24 jam, pakan diganti dengan daun teh yang segar. Daun teh dicelupkan ke dalam air destilata steril sebagai perlakuan kontrol.

Pengamatan mortalitas larva pada seluruh perlakuan dilakukan setiap hari selama tujuh hari. Jumlah larva yang mati setiap hari pada tiap perlakuan konsentrasi dihitung sebagai variabel yang diamati. Data diolah dengan program POLO PC. Apabila terdapat mortalitas pada perlakuan kontrol (tidak lebih dari 20%) maka mortalitas larva dikoreksi dengan formula Abbott (1925) dengan rumus:

$$P = \frac{P' - C}{P' - 100} \times 100\%, \text{ dengan}$$

P: mortalitas terkoreksi; P': mortalitas hasil pengamatan pada setiap perlakuan *HytaNPV*; dan C: mortalitas pada kontrol.

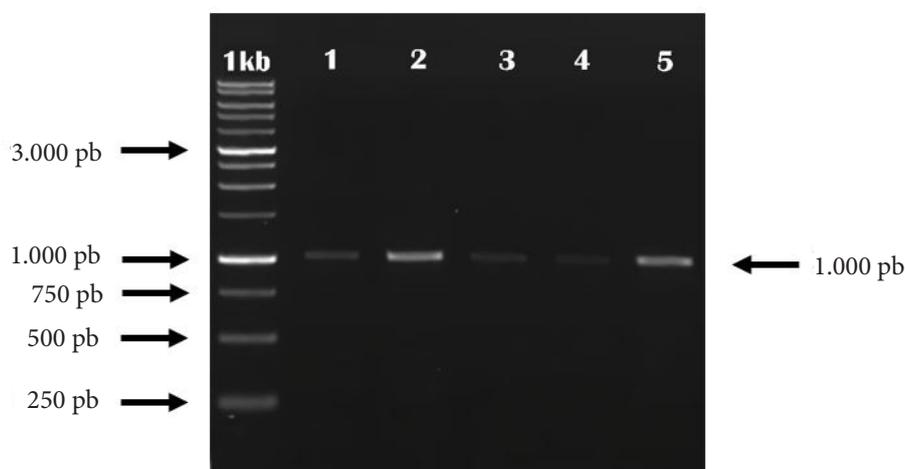
## HASIL

### Hasil amplifikasi DNA *HytaNPV* menggunakan metode PCR

Hasil amplifikasi menggunakan PCR menunjukkan hasil positif berdasarkan pengamatan dengan UV-transiluminator. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa produk PCR berukuran  $\pm 1.000$  pb (Gambar 2). Amplifikasi DNA *HytaNPV* pada penelitian ini menggunakan primer yang menargetkan urutan DNA polimerase *HytaNPV* pada base sequence 65.557–66.061 dari genom *HytaNPV*.

### Analisis filogeni *HytaNPV* berdasarkan nukleotida dan asam amino

Pohon filogenetik berdasarkan nukleotida menggunakan metode NJ menunjukkan bahwa isolat *HytaNPV* Bogor berada dalam kelompok yang sama dengan Genus *Buzura*, isolat dari Cina dan Australia (Gambar 3). Sementara, berdasarkan asam amino *HytaNPV*, isolat Bogor cenderung berada dalam kelompok yang sama dengan NPV dari Genus *Sucra* (Gambar 4).



**Gambar 2.** Visualisasi DNA *HytaNPV* pada agarose menggunakan UV-transiluminator. Marker 1 kb (Thermoscientific, US), 1–5 (*HytaNPV* isolat Bogor, Jawa Barat).

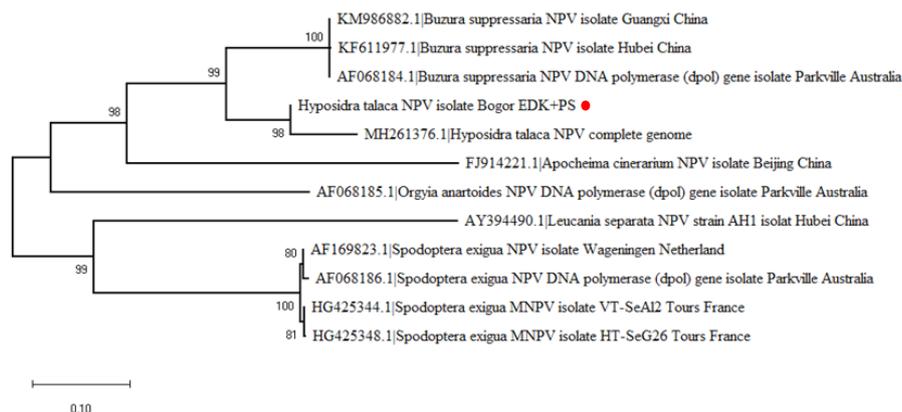
**Figure 2.** Visualization of *HytaNPV* DNA on agar media using UV-transilluminator. Marker 1 kb (Thermoscientific, US), 1–5 (*HytaNPV* isolate Bogor, West Java).

### Uji virulensi *HytaNPV* terhadap *H. talaca*

Hasil uji virulensi *HytaNPV* menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi  $1,58 \times 10^7$  POBs/ml dan konsentrasi terendah  $1,58 \times 10^3$  POBs/ml mengakibatkan mortalitas larva *H. talaca* berturut-turut sebesar 91,85 dan 59,41% pada 7 hari setelah inokulasi (HSI) (Tabel 1). Persentase mortalitas larva dengan konsentrasi  $1,58 \times 10^7$  POBs/ml pada beberapa tingkatan instar menunjukkan nilai yang berbeda pada instar ke-2, 3, dan 4 secara berturut-turut sebesar 71; 60,49; dan 62,22% pada 7 HSI (Tabel 2). Analisis probit menunjukkan adanya perbedaan virulensi pada ketiga tingkatan instar dengan beberapa tingkat konsentrasi yang berbeda. Perlakuan konsentrasi  $1,58 \times 10^7$  POBs/ml pada larva instar 2 memiliki nilai  $LT_{50}$  tertinggi, yaitu 1,92 hari, sedangkan nilai  $LT_{50}$  terendah sebesar 6,89 hari ditemukan pada perlakuan konsentrasi  $1,58 \times 10^3$  POBs/ml pada larva instar 4 (Tabel 3).

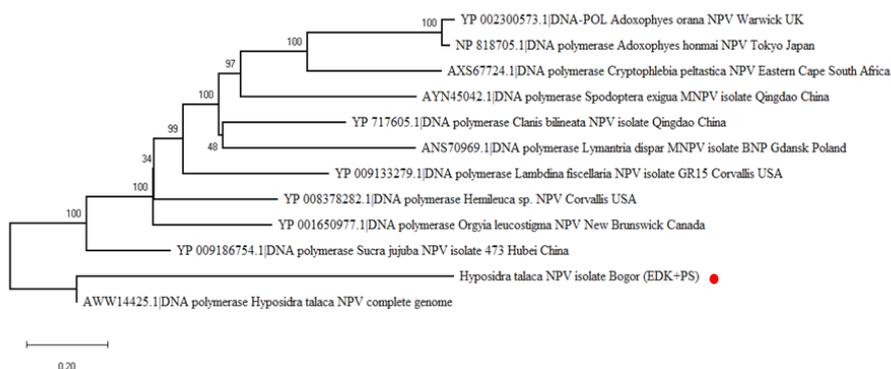
### PEMBAHASAN

Hasil pensejajaran urutan DNA dari urutan DNA polimerase *HytaNPV* dibandingkan dengan data DNA NPV yang tersedia di GenBank. Tahapan ini dilakukan untuk mengidentifikasi hubungan kekerabatan antar spesies NPV yang tercatat di GenBank. Selain menggunakan sekuens nukleotida, hubungan kekerabatan dan evolusi anggota Baculoviridae juga dapat dianalisis menggunakan sekuens asam amino (Jose et al. 2013). Prinsip analisis hubungan kekerabatan atau homologi adalah menggunakan variasi genetik untuk melihat kekerabatan suatu organisme dengan organisme lain sehingga dapat membedakan spesies makhluk hidup berdasarkan sifat genetiknya (keanekaragaman). Berdasarkan hasil BLAST, isolat *HytaNPV* Bogor memiliki hubungan kekerabatan dengan berbagai isolat



**Gambar 3.** Pohon filogenetik sekuens nukleotida NPV asal Bogor (●) dengan beberapa isolat pembanding yang diproses menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1.000x.

**Figure 3.** Phylogeny of NPV DNA nucleotide sequence from Bogor (●) with several comparison isolates based on DNA polymerase sequences using the *Neighbor-Joining* method. (1.000x bootstrap).



**Gambar 4.** Pohon filogenetik sekuens asam amino NPV asal Bogor (●) dengan beberapa isolat pembanding yang diproses menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan *bootstrap* 1.000x.

**Figure 4.** Phylogeny of NPV DNA amino acid sequence from Bogor (●) with several comparison isolates based on DNA polymerase sequences using the *Neighbor-Joining* method. (1.000x bootstrap).

**Tabel 1.** Persentase rata-rata mortalitas larva *Hyposidra talaca* pada perlakuan beberapa konsentrasi *HytaNPV*

**Table 1.** The average mortality percentage of *Hyposidra talaca* larvae in several concentration of *HytaNPV*

Konsentrasi <i>HytaNPV</i> (Concentration of <i>HytaNPV</i> ) (POBs/ml)	Mortalitas rata-rata* (Average mortality*) (%) <sup>a</sup>
	7 HSI**
Kontrol	0,00 e
1,58 x 10 <sup>3</sup>	59,41 d
1,58 x 10 <sup>4</sup>	72,78 c
1,58 x 10 <sup>5</sup>	79,97 b
1,58 x 10 <sup>6</sup>	83,43 b
1,58 x 10 <sup>7</sup>	91,85 a

<sup>a</sup>Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata dengan uji Duncan pada taraf 5%; \*Rerata mortalitas terkoreksi (Abott 1925); \*\*: hari setelah inokulasi. (<sup>a</sup>Numbers followed by different letters show significant differences with Duncan's test at the 5% level; \*Mean corrected mortality (Abott 1925); \*\*: day after inoculation).

**Tabel 2.** Persentase rata-rata mortalitas larva *Hyposidra talaca* dengan perlakuan *HytaNPV* pada beberapa tingkatan instar

**Table 2.** The average mortality percentage of *Hyposidra talaca* larvae in each instar stage of *H. talaca*

Instar	Mortalitas rata-rata* (Average mortality*) (%) <sup>a</sup>
	7 HSI**
2	71,00 a
3	60,49 b
4	62,22 b

<sup>a</sup>Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata dengan uji Duncan pada taraf 5%; \*Rerata mortalitas terkoreksi (Abott 1925); \*\*: hari setelah inokulasi. (<sup>a</sup>Numbers followed by different letters show significant differences with Duncan's test at the 5% level; \*Mean corrected mortality (Abott 1925); \*\*: day after inoculation).

**Tabel 3.** Nilai lethal time (LT<sub>50</sub>) instar larva *Hyposidra talaca* pada perlakuan beberapa konsentrasi *HytaNPV*

**Table 3.** The lethal time value (LT<sub>50</sub>) of *Hyposidra talaca* larvae in several concentration of *HytaNPV*

Larva (Larvae)	LT <sub>50</sub> (HSI*)				
	Konsentrasi <i>HytaNPV</i> (Concentration of <i>HytaNPV</i> ) (POBs/ml)				
	1,58 x 10 <sup>3</sup>	1,58 x 10 <sup>4</sup>	1,58 x 10 <sup>5</sup>	1,58 x 10 <sup>6</sup>	1,58 x 10 <sup>7</sup>
Instar II	4,36	3,35	2,84	2,51	1,92
Instar III	5,28	4,14	3,60	3,39	2,60
Instar IV	6,89	5,74	5,32	4,82	3,80

\*: hari setelah inokulasi (days after inoculation).

*NPV* menggunakan pencocokan nukleotida dan asam amino. Parameter yang diamati pada hasil BLAST adalah identitas dan *query cover*. Identitas menunjukkan persentase kesesuaian antara sekuens nukleotida sampel dan sekuens nukleotida di GenBank. Sebaliknya, *query cover* menunjukkan persentase panjang nukleotida sampel yang cocok dengan urutan nukleotida di GenBank (Newell et al. 2013).

Menurut Gerdol et al. (2018) bahwa spesies yang sama, tetapi letak geografisnya berbeda dapat memiliki keragaman genetik. Tingkat keragaman genetik dalam suatu spesies dipengaruhi oleh jumlah individu, distribusi geografis, dan sistem genetik. Hasil BLAST sekuens DNA polimerase dengan nukleotida menunjukkan bahwa isolat *HytaNPV* Bogor memiliki kemiripan paling tinggi dengan isolat *HytaNPV* India dengan *query cover* 99%, identitas 96,68%, dan skor maks/total 5809 pb (No Akses: MH261376 .1). Berdasarkan hasil BLAST juga diketahui bahwa isolat *HytaNPV* asal Bogor memiliki kesamaan genetik dengan isolat *Buzura suppressaria* NPV asal Guangxi, China, dengan skor max/total 3377 pb, *query cover* 99%, identitas 81,61% (Nomor akses: KM986882.1) dan *Buzura suppressaria* NPV mengisolasi Hubei, China dengan skor maks/total 3376 pb, *query cover* 99%, identitas 81,52% (No Akses: KF611977.1), dan *Buzura suppressaria* NPV mengisolasi Parkville, Australia dengan skor maks/total 2107 pb, *query cover* 54%, identitas 84,69% (Nomor akses: AF068184.1). Isolat *HytaNPV* Bogor juga dilakukan perbandingan BLAST dengan isolat NPV yang menyerang Ordo Lepidoptera lainnya. Isolat *HytaNPV* Bogor dibandingkan dengan NPV yang menyerang spesies lain, seperti *Apocheima cinerarium* (Erschoff), *Orgyia anartoides* (Walker), dan *Spodoptera exigua* (Hubner), menunjukkan nilai

kesamaan genetik yang lebih rendah dengan *query cover* 36–76% dan identitas 67–70%.

Berdasarkan hasil BLAST sekuens DNA polimerase menggunakan asam amino, diketahui bahwa *HytaNPV* asal Bogor memiliki kemiripan dengan DNA polimerase asal *HytaNPV* asal India dengan skor maks/total 1133/1577, *query cover* 87% dan identitas sebesar 79,62% (No. akses: AWW14425.1). Isolat *HytaNPV* Bogor juga memiliki kemiripan genetik dengan isolat *Clanis bilineata* NPV Qingdao, China, dengan skor maks/total 960/1568, *query cover* 85%, dan identitas 68,10% (No Akses: YP\_717605.1). Isolat NPV yang menyerang spesies lain, seperti *S. exigua*, *Adoxophyes orana* (Fischer von Röslerstamm), *Adoxophyes honmai* Yasuda, *Cryptophlebia peltastica* (Meyrick), *Lambdina fiscellaria* Guenée, *Orgyia leucostigma* (J. E. Smith), *Hemileuca* sp. dan *Lymantria dispar* Linnaeus. Umumnya, mereka menampilkan *query cover* >80%, tetapi memiliki identitas rendah <55%.

Menurut Shapiro et al (1991) NPV dari spesies yang sama, tetapi dari lokasi geografis yang berbeda dapat memiliki keragaman genetik yang besar. Sementara, menurut Goto et al. (1992) Spesies *Baculovirus* dari spesies berbeda yang berasal dari lokasi yang sama cenderung memiliki tingkat homologi yang tinggi. Perbedaan hasil homologi antara nukleotida dan asam amino diduga terjadi karena adanya perbedaan lokasi dan pola sebaran geografis antara isolat *HytaNPV* Bogor dengan isolat lainnya. Perbedaan lokasi dan pola distribusi dapat menyebabkan perbedaan pengacakan gen virus dalam gen pool, yang dapat menyebabkan pergeseran dan keragaman genetik.

Analisis filogenetik memberikan pemahaman mendalam tentang bagaimana spesies berevolusi melalui perubahan genetik. Filogenetik dapat digunakan untuk mengevaluasi jalur yang menghubungkan organisme masa kini dengan asal leluhurnya, serta dapat memprediksi divergensi genetik yang mungkin terjadi di masa depan (Gorbalenya & Lauber 2017). Pohon filogenetik berdasarkan nukleotida menggunakan metode NJ menunjukkan bahwa isolat *HytaNPV* Bogor berada dalam kelompok yang sama dengan Genus *Buzura*, isolat dari Cina dan Australia (Gambar 3). Sementara, berdasarkan asam amino *HytaNPV*, isolat Bogor cenderung berada dalam kelompok

yang sama dengan NPV dari Genus *Sucra* (Gambar 4). Keanekaragaman genetik ini menunjukkan besarnya pengaruh kondisi lingkungan terhadap adaptasi NPV yang juga mempengaruhi susunan nukleotida dan asam amino. Hasil analisis memperkuat pernyataan bahwa kondisi geografis dan sebaran geografis inang sangat mempengaruhi tingkat keragaman genetik NPV (Shapiro et al. 1991; Goto et al. 1992).

Estimasi hubungan evolusi antar spesies yang lebih akurat sekarang dimungkinkan dalam analisis filogenetik molekuler menggunakan data pengurutan gen (Battistuzzi & Kumar 2020). Analisis filogenetik dapat berguna dalam genomik komparatif, yang mempelajari hubungan antara genom dari spesies yang berbeda. Dalam konteks ini, salah satu aplikasi utamanya adalah prediksi gen atau penemuan gen, yang berarti menemukan wilayah genetik tertentu di sepanjang genom (Nagy et al. 2020). Dalam mikrobiologi, analisis filogenetik dapat diterapkan untuk mengidentifikasi dan mengklasifikasikan berbagai mikroorganisme, termasuk virus (Franco-Duarte et al. 2019).

Uji virulensi menunjukkan bahwa tingkat virulensi *HytaNPV* dipengaruhi oleh konsentrasi polihedra virus dan umur larva. Nilai persentase mortalitas dan nilai  $LT_{50}$  menunjukkan tingkat virulensi virus terhadap inang. Semakin tinggi persentase mortalitas menunjukkan kemampuan virus dalam menyebabkan kematian pada populasi serangga yang diuji, sedangkan nilai  $LT_{50}$  yang semakin rendah menunjukkan kecepatan virus dalam mengakibatkan kematian pada inang. Secara umum, Peningkatan konsentrasi virus dapat meningkatkan persentase mortalitas dan menurunkan  $LT_{50}$  pada *H. talaca*, sedangkan peningkatan umur instar dapat menurunkan persentase mortalitas dan meningkatkan  $LT_{50}$  pada *H. talaca*.

Peningkatan tingkat konsentrasi polihedra yang diinokulasikan mengakibatkan semakin banyak jumlah polihedra virus yang tertelan oleh larva sehingga mengakibatkan semakin banyak jaringan larva yang terinfeksi (Yasin et al. 2020). Larva yang terinfeksi *HytaNPV* menunjukkan gejala perubahan warna tubuh menjadi coklat kehitaman dan posisi tubuh menggantung (Gambar 1). Menurut Tanada & Kaya (1993) Larva terinfeksi NPV umumnya menunjukkan

gejala tubuh melunak dan mudah pecah disertai dengan keluarnya cairan kental berwarna coklat susu dengan bau yang menyengat, serta sering ditemukan dalam posisi menggantung dengan tungkai semu menempel pada daun atau ranting tanaman.

Percobaan yang dilakukan oleh Mukhopadhyay et al. (2011) pada isolat *Hyta*NPV asal India dengan kerapatan  $10^6$  POBs/ml dapat menyebabkan mortalitas *H. talaca* hingga 83,33% dengan  $LT_{50}$  4,05 hari. Pada kerapatan yang lebih rendah, yaitu  $10^3$  POBs/ml, mortalitaskan larva uji mencapai 46,66% dengan  $LT_{50}$  5,45 hari. Kemudian perbedaan instar juga mempengaruhi virulensi *Hyta*NPV karena adanya perbedaan tingkat kerentanan pada masing-masing instar. Menurut Laoh & Puspita (2003) larva instar awal memiliki organ tubuh yang lemah terutama di bagian *midgut* yang merupakan tempat sasaran infeksi patogen, sehingga NPV lebih mudah menembus organ dan merusak sel-sel yang rentan. Pernyataan ini didukung oleh penelitian Vega & Kaya (2012) yang menyatakan bahwa berdasarkan stadium inang, lama waktu kematian larva akibat infeksi NPV bervariasi dari 2 hari pada larva muda (instar-1 sampai 3) dan 4–9 hari pada larva tua (instar-4 sampai 6).

Struktur pohon filogenetik DNA polimerase yang lebih lengkap dapat menjadi indikator yang dapat diandalkan mengenai evolusi DNA polimerase. Hubungan filogenetik antara *Hyta*NPV dan isolat lain yang terlihat dalam penelitian ini dapat menjadi penting dalam memahami adaptasi biologis antara virus dan inangnya dan untuk berkontribusi pada pemahaman kita tentang sejarah evolusi *Hyta*NPV.

## KESIMPULAN

Sekuens gen DNA polimerase pada *Hyta*NPV asal Bogor memiliki kekerabatan genetik paling tinggi dengan *Hyta*NPV dari India dan *Buzu*NPV dari China dan Australia, yang ditunjukkan berdasarkan percabangan pada pohon filogeni dan persentase kemiripan dengan analisis BLAST mencapai lebih dari 70%. Berdasarkan uji virulensi, isolat *Hyta*NPV terhadap *H. talaca* menunjukkan nilai  $LT_{50}$  tertinggi sebesar 1,92 hari

pada perlakuan konsentrasi  $1,58 \times 10^7$  POBs/ml pada larva instar 2.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18:265–267. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Battistuzzi F, Kumar S. 2020. Molecular phylogeny reconstruction. *eLS*. 1:558–564. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0029212>.
- Cheng XW. 1998. *Characterization of Nuclearpolyhedrosis viruses from Thysanplusia orichalcea (L) (Lepidoptera: Noctuidae) from Indonesia*. Disertasi. Amerika Serikat: Clemson University.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*. 12:13–15.
- Federici BA. 1997. Baculovirus pathogenesis. In: Miller LK (Ed.) *The Baculoviruses*. hlm. 33–56. New York: Springer Science + Business Media, LLC. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1834-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1834-5_3).
- Franco-Duarte R, Černáková L, Kadam S, S Kaushik K, Salehi B, Bevilacqua A, Corbo MR, Antolak H, Dybka-Stępień K, Leszczewicz M, Relison Tintino S, Alexandrino de Souza VC, Sharifi-Rad J, Melo Coutinho HD, Martins N, Rodrigues CF. 2019. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. *Microorganisms*. 7:130. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>.
- Gerdol M, Zhao H, Wang Y, Xing F, Liu X, Yuan C, Qi G, Guo J, Dong Y. 2018. The genetic diversity and geographic differentiation of the wild soybean in northeast China based on nuclear microsatellite variation. *International Journal of Genomics*. 2018:8561458. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/8561458>.
- Gorbalenya AE, Lauber C. 2017. Phylogeny of viruses. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95723-4>.
- Goto C, Minobe Y, Izuka T. 1992. Restriction endonuclease analysis and mapping of the genomes of granulosis viruses isolated from *Xestia c-nigrum* and five other noctuid species. *Journal of General Virology*. 73:1491–1497. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-6-1491>.
- Jose J, Jalali SK, Shivalingaswamy TM, Kumar NKK, Bhatnagar R, Bandyopadhyay. 2013. Molecular

- characterization of nucleopolyhedrovirus of three Lepidopteran pest using late expression factor-8 gene. *Indian Journal of Virology*. 24:59–65. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0126-3>.
- Kusumah YM, Halala YT. 2014. Biologi *Hyposidra talaca* Wlk. pada beberapa jenis tanaman selain tanaman teh di sekitar perkebunan teh Gunung Mas PTPN VIII Bogor. In: Nawangsih et al. (Eds.), *Prosiding Seminar Nasional Perlindungan Tanaman II: Strategi Perlindungan Tanaman dalam Memperkuat Sistem Pertanian Nasional Menghadapi ASEAN Free Trade Area (AFTA) dan ASEAN Economic Community (AEC) 2015, (Bogor, 13 November 2014)*. hlm 45–58. Bogor: PKPHT.
- Laoh JH, Puspita F. 2003. Kerentanan larva *Spodoptera litura* F. terhadap virus nuklear polyhedrosis. *Jurnal Natur Indonesia*. 5:145–151.
- 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, India. *International Journal of Tropical Insect Science*. 31:13–9. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1742758411000026>.
- Nagy LG, Merényi Z, Hegedüs B, Bálint B. 2020. Novel phylogenetic methods are needed for understanding gene function in the era of mega-scale genome sequencing. *Nucleic Acids Research*. 48:2209–2219. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1241>.
- Newell PD, Fricker AD, Roco CA, Chandransu P, Merkel SM. 2013. A small-group activity introducing the use and interpretation of BLAST+. *Journal of Microbiology & Biology Education*. 14:238–243. DOI: <https://doi.org/10.1128/jmbe.v14i2.637>.
- Pradana R. 2013. *Pengelolaan Kebun dan Upaya Pengendalian Hama Ulat Jengkal (Hyposidra talaca) dengan Aplikasi Hyposidra talaca Nucleopolyhedrovirus pada Tanaman Teh di PT Perkebunan Nusantara VIII Gunung Mas Bogor, Jawa Barat*. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Shapiro, M, Fuxa JR, Braymer HD, Pashley DP. 1991. DNA restriction polymorphism in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58:96–105. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90167-O](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90167-O).
- Sinulingga P. 2017. *Analisis Filogenetik Hyposidra Talaca Nucleopolyhedrovirus dengan Sekuens DNA Polimerase*. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sudjarwo. 1987. *Sejarah Hidup Hyposidra talaca Wlk. (Lepidoptera: Geometridae) di Kebun Coklat*. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Tanada Y, Kaya HK. 1993. *Insect Pathology*. California: Academic Press.
- Vega FE, Kaya HK. 2012. *Insect Pathology 2<sup>nd</sup> ed*. California: Academic Press.
- Williams T, Melo-Molina GdC, Jiménez-Fernández JA, Weissenberger H, Gómez-Díaz JS, Navarro-de-la-Fuente L, Richards AR. 2023. Presence of *Spodoptera frugiperda* multiple Nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) occlusion bodies in maize field soils of mesoamerica. *Insects*. 14:80. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects14010080>.
- Yang SF, Lu CW, Yao CT, Hung CM. 2019. To trim or not to trim: Effects of read trimming on the de novo genome assembly of a widespread East Asian Passerine, the Rufous-capped Babbler (*Cyanoderma ruficeps* Blyth). *Genes*. 10:737. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10100737>.
- Yasin M, Qazi MS, Wakil W, Qayyum MA. 2020. Evaluation of nuclear polyhedrosis virus (NPV) and emamectin benzoate against *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 30:1–6. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00271-8>.
- Yi-Peng Xu, Ruo-Lin Cheng, Yu Xi, Chuan-Xi Zhang. 2013. Genomic diversity of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus strains. *Genomics*. 102:63–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2013.04.015>.