

UJI PATOGENISITAS *ACINETOBACTER PITTII* 3.1 SEBAGAI BIOINSEKTISIDA HAMA ULAT GRAYAK *SPODOPTERA LITURA* F.

Verrent Vanessa ¹, Theresia Desy Askitosari ^{1*}, Hari Purwanto ²

¹ Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Raya Kalirungkut, Surabaya 60293

² Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Teknika Selatan, Yogyakarta 55281

*Corresponding author: desy_askito@staff.ubaya.ac.id

Abstract —Cabbage gives the largest production contribution to total vegetable production in Indonesia (12,05%). Indonesia has the potential to become an exporter due to the ability to produce the finest quality cabbage at a relatively inexpensive price. Unfortunately, cabbage pests remain a challenge for the farmers because the excessive use of chemical pesticides will endanger the consumer's health. This is also supported by the fact that cabbage often consumed in a raw form in Indonesia. From the previous study, *Acinetobacter pittii* 3.1 was proven to be pathogenic to *Tenebrio molitor*. This study aims to test the pathogenicity effect of *Acinetobacter pittii* 3.1 to cabbage's common pest, Armyworm, *Spodoptera litura* F. This research used two types of methods, orally and parenterally, and three types of bacterial concentrations, 10^5 , 10^6 , and 10^7 . The presence of the tested bacteria was also identified by sampling the hemolymph and fat body from the larvae's body. The results showed that *Acinetobacter pittii* 3.1 is proven to be neither pathogen nor causing sub-lethal effects for *S.litura*. The results that are not in line with the previous studies are alleged because the type of interaction between host and microbe is a host-specific interaction. Order differences between *A. pittii* (Lepidoptera) and *T. molitor* (Coleoptera) cause different pathogenicity effects. Nevertheless, *A. pittii* still has the potential to be a bioinsecticide, but possibly with other hosts that are closely related to *Tenebrio molitor*.

Keywords: *Acinetobacter*, *Bioinsecticide*, *Spodoptera litura*

Abstrak— Kubis merupakan sayuran dengan kontribusi produksi terbesar terhadap total produksi sayuran di Indonesia (12,05%). Indonesia berpotensi menjadi eksportir kubis karena mampu menghasilkan kubis dengan kualitas terbaik dan harga yang relatif murah. Namun, banyaknya hama kubis masih menjadi tantangan bagi para petani kubis karena penggunaan pestisida kimia yang terlalu banyak akan membahayakan kesehatan konsumen. Hal ini dikarenakan kubis sering dikonsumsi dalam bentuk mentah di Indonesia. *Acinetobacter pittii* 3.1 terbukti dapat membunuh *Tenebrio molitor* pada penelitian sebelumnya. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efek patogenesis dari *Acinetobacter pittii* 3.1 terhadap hama utama kubis, yaitu ulat grayak, *Spodoptera litura* F. Penelitian ini dilakukan dengan dua metode, yaitu oral dan parenteral, serta tiga konsentrasi bakteri uji yang berbeda, yaitu 10^5 , 10^6 , dan 10^7 . Identifikasi keberadaan bakteri uji juga dilakukan dengan pengambilan hemolimfe dan *fat body* pada tubuh ulat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Acinetobacter pittii* 3.1 terbukti tidak menunjukkan efek patogenesis maupun efek sub-lethal terhadap *S. litura*. Hasil yang tidak sesuai dengan penelitian sebelumnya diduga dikarenakan interaksi antara *host* dan mikroba bersifat *host-specific*. Perbedaan ordo antara *A. pittii* (Lepidoptera) dengan *T. molitor* (Coleoptera) menyebabkan efek patogenesis yang berbeda pula. Walaupun begitu, *A.pittii* tetap berpotensi menjadi bioinsektisida, namun kemungkinan dengan *host* lain yang berkerabat dekat dengan *T.molitor*.

Kata kunci: *Acinetobacter*, *Bioinsektisida*, *Spodoptera litura*

Pendahuluan

Kubis merupakan sayuran yang memberikan kontribusi produksi terbesar terhadap total produksi sayuran di Indonesia (12,05%) sehingga berpeluang untuk memajukan perekonomian Indonesia (Susilawati, 2017). Namun, hama kubis masih menjadi tantangan hingga saat ini, karena kubis sering dikonsumsi dalam bentuk mentah sehingga insektisida berbahan kimia bukanlah pilihan yang tepat. Penggunaan insektisida secara terus menerus dapat menimbulkan efek samping seperti pencemaran lingkungan, residu kimia, dan timbulnya resistensi serangga yang memicu resurgensi (Tampubolon *et al.*, 2013). Kingsley George *et al.* (2020) juga telah mendeteksi kadar toksik yang melampaui batas pada kubis. Tingkat kerusakan yang disebabkan oleh ulat grayak (*Spodoptera litura*) dapat mencapai 57% dari total kerusakan (Safirah *et al.*, 2016).

Bioinsektisida merupakan pengendalian hama serangga dengan memanfaatkan mikroorganisme dan makroorganisme (Osman *et al.*, 2015). Selain itu, bioinsektisida tidak

menyebabkan resistensi hama, bekerja secara selektif sebagai “musuh alami”, dan bersifat permanen untuk jangka panjang sehingga lebih murah. *B. thuringiensis* (Bt) merupakan bioinsektisida yang umum digunakan, di mana memiliki cara kerja infeksi sistemik. Namun, Bt memiliki kelemahan, yaitu mudah terinaktivasi oleh cahaya UV, panas, dan pH ekstrim; rentan terdegradasi oleh protease yang dilepas oleh eksudat daun, tidak melekat dengan sempurna pada permukaan tanaman (terbawa angin dan hujan) sehingga perlu diaplikasikan berulang-ulang (Sanahuja *et al.*, 2011). Selain itu, Yuningsih (2016) menyatakan bahwa hasilnya sulit diprediksi dalam waktu singkat, membutuhkan biaya yang cukup besar untuk penelitian, dan umur penyimpanannya pendek. Bt bersifat sangat spesifik (*narrow spectrum*) sehingga dibutuhkan banyak varietas untuk melindungi tanaman secara utuh. Oleh karena itu, selain dengan upaya mengoptimasi Bt, juga perlu dilakukan upaya menemukan bakteri pengganti Bt.

Pada penelitian sebelumnya, Askitosari *et al.* (2021) menyatakan bahwa diperoleh isolat yang berpotensi menjadi bioinsektisida, karena dapat membunuh ulat hongkong *Tenebrio molitor*, yaitu isolat 3.1 yang memiliki kemiripan dengan *Acinetobacter pittii* strain ATCC 19004. *A. pittii* memiliki dinding sel yang bersifat hidrofobik sehingga dapat membantu perlekatannya pada dinding sel *host* serta melindungi dirinya dari fagositosis. Selain itu, juga terdapat enzim-enzim destruktif yang meningkatkan patogenisitasnya. Khanghahi *et al.* (2021) menyatakan bahwa *A. pittii* mampu melakukan fiksasi nitrogen dan melarutkan senyawa kalium yang tak larut, sehingga juga berperan sebagai *Plant Growth Promoting Bacteria* (PGPB).

Penelitian ini bertujuan menguji patogenisitas *A. pittii* 3.1 sebagai alternatif bioinsektisida untuk membunuh hama utama kubis, yaitu ulat grayak *Spodoptera litura* F. Penelitian ini diharapkan dapat membantu meminimalisir kerugian petani serta dampak buruk dari pestisida bagi konsumen. Hipotesis penelitian ini adalah LC_{50} *Acinetobacter pittii* 3.1 cukup rendah, memiliki *Mode of Action* berupa racun perut, serta kinerjanya lebih baik dibandingkan insektisida kontrol.

Metode Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi *Acinetobacter pittii* 3.1, yaitu 10^5 , 10^6 , dan 10^7 . Perlakuan kontrol yaitu pemberian insektisida biologis komersial (Dipel WP) sebagai kontrol positif dan Luria Bertani sebagai kontrol negatif. Parameter yang diuji meliputi nilai OD_{600} , jumlah *Colony Forming Unit* (CFU), morfologi, jumlah kematian/mortalitas, dan perilaku makan.

Uji Pendahuluan

Dilakukan uji berbagai kombinasi pewarna dan pelarut, yaitu pewarna merah dan hijau serta pelarut akuades dan NaCl (1:10) pada 1 *cube* pakan buatan berukuran 5 x 5 x 5 mm.

Perhitungan Jumlah Koloni

Analisis Lempeng Total (ALT) dilakukan. Diawali dengan pengenceran bakteri pada NaCl. 10^{-1} dibuat dengan menginokulasikan 1 mL kultur 10^0 ke dalam 9 mL NaCl. Divorteks agar kultur terdistribusi merata pada setiap larutan. Kultur diinokulasikan sebanyak 100 μ L ke dalam media LB 100 mL dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20-24 jam dengan kecepatan *shaker* 150 rpm. Kultur diencerkan ke 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} . Diambil 100 μ L dari setiap pengenceran dan ditanam pada media NA (dalam *petri dish*) dengan metode *spread plate*. Diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam dan dilakukan Analisis Lempeng Total (ALT) menggunakan *colony counter* dan perhitungan koloni mengikuti aturan ALT di mana koloni yang diambil yaitu diantara 30-300

Uji Patogenisitas Metode Oral

Ulat uji diambil dari kebun Ngampel, Jawa Tengah dan dipelihara di laboratorium hingga didapatkan F2 untuk pengujian. Uji patogenisitas dilakukan dengan 2 metode, yaitu secara oral dan parenteral. Secara oral, yaitu dengan memberi pakan buatan yang telah diinokulasikan oleh kultur

Acinetobacter pittii 100 µL kultur 10^5 , 10^6 , dan 10^7 serta ditambahkan pewarna hijau hingga volume 10 mL. Campuran diteteskan pada permukaan pakan buatan yang berukuran 5 x 5 x 5 mm. Sebanyak 1 dadu pakan dan 1 ekor ulat diletakkan dalam *cup* plastik yang tutupnya telah dilubangi dan diberikan tisu tipis sebanyak ½ lembar. Ulat uji merupakan instar IV yang telah dipuasakan selama 6 jam dan telah diseleksi panjang tubuhnya ($\pm 0,4 - 1$ cm). Ulat Golongan Kecil (K) ($\pm 0,4 - 0,6$ cm) dan Ulat Golongan Besar (B) ($\pm 0,7 - 1$ cm). Total larva yang diuji adalah 150 ekor dengan pembagian sebanyak 30 ekor (10 ekor, 3 replikasi) untuk setiap perlakuan dan kontrol, di mana digunakan ulat kecil untuk kontrol positif dan ulat besar untuk kontrol negatif. Pada perlakuan, dilakukan pembagian secara acak pula, yaitu pada konsentrasi 10^7 digunakan ulat kecil untuk ulat 1-20 dan ulat besar untuk ulat 21-30, sedangkan pada konsentrasi 10^5 dan 10^6 digunakan ulat besar untuk ulat 1-20 dan ulat kecil untuk ulat 21-30. Dilakukan penambahan pakan buatan berukuran 1 x 1 x 1 cm sesaat setelah ulat telah memakan kultur, yang dicirikan dengan kotoran ulat yang berwarna hijau. Pengujian dilakukan selama 6 hari, di mana setiap harinya akan dilakukan pengecekan seluruh ulat serta pergantian pakan buatan yang telah mengering. Metode pengecekan ulat meliputi menyentuh ulat dengan kuas, mengamati warna dan jumlah kotoran yang dihasilkan, serta mengamati ciri kematian pada ulat. Ulat yang mati akan dihitung, didokumentasikan, dan diamati secara langsung serta dengan mikroskop fase kontras.

Uji Patogenisitas Metode Parenteral

Pengujian secara parenteral dilakukan dengan pemberian injeksi sebanyak ± 10 µL kultur *A.pittii* dengan variasi konsentrasi 10^5 , 10^6 , dan 10^7 . Larutan injeksi dipurifikasi dari kontaminan dengan cara mencampurkan 200 µL stok dengan 1 mL NaCl 0,9% pada tabung Eppendorf. Campuran divorteks dan disentrifugasi selama 5 menit dan pelet diambil. Pelet kemudian dibilas dengan NaCl 1 mL sebanyak 2x dengan perlakuan yang sama. Pelet hasil pembilasan kedua dicampurkan dengan 200 µL NaCl dan siap untuk diinjeksikan. Digunakan 10 ulat instar V, yaitu 5 ekor ulat sisa perlakuan uji oral dan 5 ekor ulat dari kontrol negatif. Ulat dipuasakan selama 3 jam dan telah diseleksi panjang tubuhnya (> 1 cm). Penyuntikkan dilakukan di area *haemocoel* dengan sudut 45° . Dilakukan penambahan pakan buatan berukuran 1 x 1 x 1 cm 1 hari pasca injeksi. Pengamatan dilakukan selama 2 hari. Ulat yang mati dihitung, didokumentasikan, dan diamati secara langsung serta dengan mikroskop fase kontras perbesaran 1000x.

Identifikasi Keberadaan Bakteri Uji

Penyebaran bakteri dalam tubuh ulat juga diidentifikasi melalui *sampling* hemolimfe dan *fat body* dari ulat yang mencirikan efek *sub-lethal* (sakit). Digunakan sebanyak 3 ekor ulat yang sakit serta 3 ekor ulat yang sehat sebagai kontrol negatif. Ulat dikatakan sakit apabila menunjukkan ciri: *Sluggish* (tidak aktif bergerak/diam), ukuran tidak normal, dan naik ke atas tutup atau berdiam di atas tisu. Ulat dibunuh dengan cara dibekukan dalam *freezer* selama 10 menit. Bagian kepala dan anus ulat diikat dengan benang, kemudian ulat dibersihkan dengan cara direndam dalam bayclin 1% dan dibilas 2x dengan akuades steril. Kaki ulat digunting dan hemolimfe yang keluar dipipet, lalu dimasukkan pada cawan petri berisikan media NA dengan metode *Spread plate* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 2 hari. Ulat yang sama akan digesekkan pada kaca preparat untuk pengamatan *fatbody* dengan menggunakan mikroskop fase kontras perbesaran 1000x.

Analisis Korelasi antara Konsentrasi dengan Mortalitas Ulat Uji

Dilakukan analisa secara statistik menggunakan *software* SPSS untuk mengetahui adanya korelasi antara konsentrasi yang diberikan dengan kematian ulat uji. Normalitas dan homogenisitas data diuji terlebih dahulu. Kemudian korelasi data dianalisa menggunakan uji *Chi Square* dan dilanjutkan dengan uji *Fischer's Exact*.

Pembahasan

Media Luria Bertani dipilih sebagai media karena dapat memfasilitasi pertumbuhan yang lebih cepat dan *yield* yang banyak untuk banyak spesies (International Conference on Advances in Civil Engineering (ICACE), 2020). Pengujian metode oral dilakukan selama 6 hari dan dilakukan pemberian pakan tambahan selama pengujian yang bertujuan untuk mencegah kematian ulat karena faktor selain bakteri uji, seperti penurunan nafsu makan atau faktor pakan yang kering dan berjamur. Selain itu, juga ditambahkan pewarna makanan pada kultur yang berfungsi sebagai indikator apabila ulat telah memakan bakteri uji. Berdasarkan hasil uji pendahuluan, dapat disimpulkan bahwa adanya kandungan pewarna, NaCl dan LB tidak memberikan pengaruh terhadap nafsu makan ulat. Oleh karena itu, konsentrasi 10^5 dan 10^6 dapat diujikan. Angka Lempeng Total (ALT) dilakukan untuk mengetahui konsentrasi bakteri uji pada stok serta menjadi dasar pemilihan variasi konsentrasi. Dari hasil ALT didapatkan bahwa jumlah sel dalam setiap 100 μL stok yang diberikan pada pakan adalah 105×10^7 CFU). Pengenceran tertinggi stok berada di konsentrasi 10^7 , dikarenakan 10^5 dan 10^6 menunjukkan koloni >300 , sedangkan pada 10^8 menunjukkan koloni <30 . Uji patogenisitas diawali dari konsentrasi tertinggi, yaitu 10^7 , 10^6 , dan 10^5 .

Tabel 1. Rekapitulasi Kematian Ulat Uji

Hari ke-	Konsentrasi <i>A. pittii</i>			Kontrol (+)*	Kontrol (-)*
	10^7	10^6	10^5		
1	0	1	2	2	0
2	0	0	2	10	0
3	0	0	0	15	0
4	2	0	1	0	0
5	1	1	2	1	0
6	0	2	2	0	0
Sub total	3	4	9	28	0
Total		16		28	0

*Keterangan:

(+): Kontrol positif, yaitu Dipel WP (*Bacillus thuringiensis* varietas kurstaki strain HD-7).

(-): Kontrol negatif, yaitu Luria Bertani Broth.

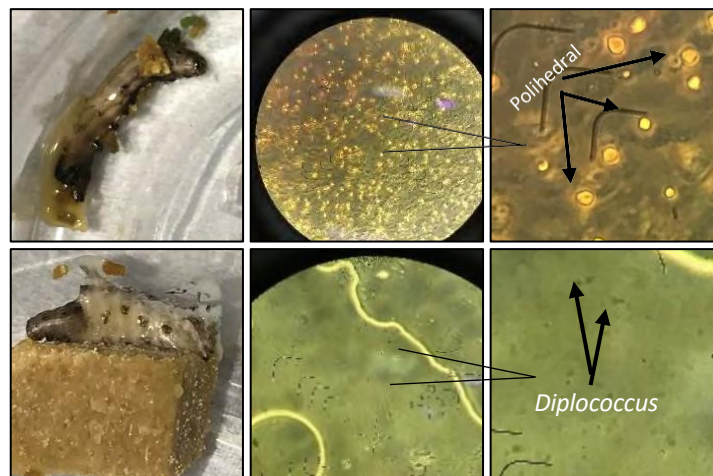
Berdasarkan hasil pengujian metode oral yang dilakukan selama 6 hari, diamati bahwa 16 dari 30 ulat mati akibat perlakuan, 28 dari 30 ulat mati pada kontrol positif, dan kontrol negatif tidak mengalami kematian. Ulat pada kontrol positif dan negatif terbukti telah memakan pakan yang terlihat dari kotoran yang berwarna hijau. Selain itu, pola kematian ulat pada kontrol positif juga tidak terjadi secara acak dan menunjukkan ciri kematian yang sesuai dengan *Bacillus thuringiensis*, yaitu tidak nafsu makan, mengkerut, dan menghitam. Hal ini sesuai dengan pernyataan Steinhilber (1951), di mana ciri infeksi Bt adalah hilangnya nafsu makan, tingkah laku lebih pasif, adanya diare yang ditandai dengan kecenderungan larva melekat pada dinding tempat *rearing* nya (dikarenakan anus lengket pada dinding), perubahan warna (hijau zaitun gelap, coklat tua, atau hitam) pada bagian punggung larva. Ketika mati, larva akan mengkerut ataupun menjadi lembek dan isi tubuh dapat keluar setelah ditekan dengan benda tumpul dan berbentuk cair. Larva yang mati umumnya akan mengeluarkan bau busuk. Kontrol positif dan kontrol negatif yang valid menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan sudah benar. Kondisi ruang uji juga telah dijaga konstan dengan tidak adanya kenaikan/penurunan suhu $>2^\circ\text{C}$ dan kelembapan $>2\%$, di mana suhu rata-rata adalah $29,4^\circ\text{C}$ dan kelembapan $67,5\%$. Oleh sebab itu, faktor perlakuan dan kondisi ruang uji dapat dieliminasi.



Gambar 1. Variasi Kematian *S.litura* setelah Paparan *A. pittii* konsentrasi 10^5 , 10^6 , dan 10^7 selama 6 hari

Hasil uji menunjukkan pola kematian yang tidak wajar, di mana keseluruhan perlakuan menunjukkan total kematian pada konsentrasi 10^5 lebih tinggi dibandingkan 10^7 , sehingga diduga ulat mati karena faktor lain. Berdasarkan hasil pengamatan ciri kematian (Gambar 1), terlihat bahwa sebagian ulat mati secara tergeletak, sedangkan sebagian tampak meleleh. Ulat yang mati secara tergeletak diduga dikarenakan ulat tidak nafsu makan sehingga mati (hal ini serupa dengan kontrol positif), sedangkan ulat yang mati secara meleleh diduga disebabkan oleh dua kemungkinan, yaitu disebabkan bakteri uji atau kontaminasi *Baculovirus*. Hal ini didukung dengan pernyataan Samsudin (2016), yaitu infeksi *Baculovirus* dicirikan dengan tubuh larva menggantung dengan kedua tungkai semu bagian abdomen menempel pada daun atau ranting tanaman membentuk huruf “V” terbalik, adanya cairan berwarna putih susu, serta tubuh ulat lunak.

Virus dapat menyebabkan ulat meleleh melalui 2 tahap, yaitu infeksi primer dan sekunder. Infeksi primer terjadi di usus tengah (*midgut*) yang memiliki kondisi alkalis sehingga badan inklusi akan melepas virion dari selubung proteinnya dan virion-virion nya akan menembus jaringan peritrofik dan mikrovili. Kemudian pada infeksi sekunder, virion-virion akan menginfeksi seluruh sel pada jaringan sel darah, trakea, hipodermis, dan sel lemak hingga membentuk badan inklusi (polihedra) (Gambar 2). Pada akhir infeksi tubuh larva menjadi rapuh dan hancur dengan mengeluarkan cairan yang berisi partikel virus (Samsudin, 2016).



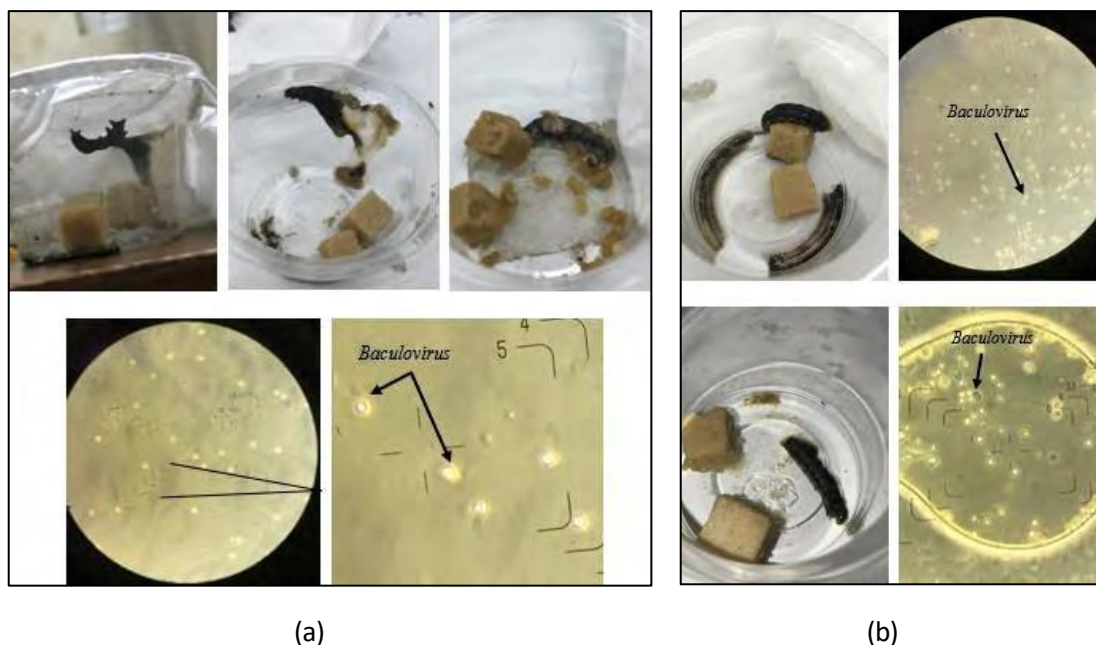
Gambar 2. Hasil Mikroskop Lelehan Ulat (Perbesaran 1000x)

Berdasarkan hasil mikroskop ulat yang mati (Gambar 2), terlihat bahwa terdeteksi keberadaan bakteri uji yang berbentuk *diplococcus* (sesuai morfologi *A.pittii*) dan ulat juga positif terinfeksi *Baculovirus* yang dicirikan dengan bentuk sel yang *irregular* (memiliki banyak sisi/poliedral), ukuran relatif besar, dan berkilau. Hasil ini menyerupai hasil mikroskop fase kontras Hussain *et al.* (2019). Diduga terjadi infeksi bakteri uji yang menyebabkan ulat menjadi semakin rentan terinfeksi virus. Infeksi NPV ini dapat terjadi karena infeksi umumnya terjadi secara oral, di mana polihedra NPV harus tertelan bersama dengan pakan yang dikonsumsi melalui alat mulut, kemudian pada saluran pencernaan, virus akan menginfeksi nukleus dan memperbanyak diri (Samsudin, 2016). Dugaan lainnya, yaitu bakteri bersifat patogen, namun gagal melewati seluruh tahapan patogenesis. Patogenesis merupakan suatu *sequential process* (berurutan) yang dapat menyebabkan penyakit apabila patogen berhasil melewati 4 tahapan patogenesis, yaitu pemaparan (kontak), adhesi (kolonisasi), invasi, dan infeksi (Pratiwi, 2017). Oleh karena rentannya infeksi virus pada metode oral serta perlunya pembuktian terhadap dugaan tersebut, maka uji patogenesis perlu dilanjutkan secara parenteral (injeksi) dan dilakukan identifikasi bakteri uji melalui hemolimfe dan sel lemak (*fat body*) dari larva hasil uji metode oral.

Tabel 2. Hasil Uji Patogenesis Metode Parenteral

Hari ke-	Jumlah Kematian 10 ⁷	(-)	Kondisi Ruang
1	1	2	Temp: 29,3 °C; Hmd: 65%
2	1	0	Temp: 29,3 °C; Hmd: 66%
Total	2	2	

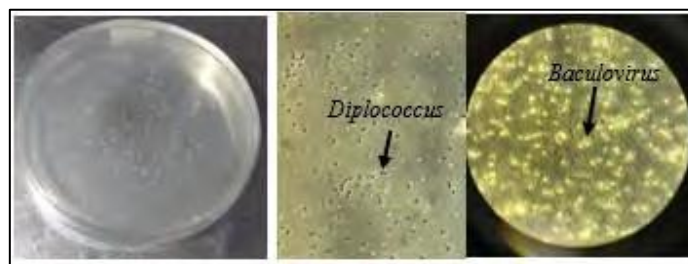
Pengujian metode parenteral selama 2 hari dan didapatkan hasil yang serupa, yaitu kematian secara acak, di mana pada hari pertama kematian kontrol negatif lebih banyak dibandingkan perlakuan.



Gambar 3. Ciri Kematian dan Hasil Mikroskop (Perbesaran 1000x)) (a) Konsentrasi 10⁷ (b) Kontrol Negatif

Hasil mikroskop (Gambar 3a dan 3b) menunjukkan kontaminasi *Baculovirus* pada seluruh ulat, sehingga disimpulkan ulat mati karena terinfeksi virus. Kematian pada kontrol negatif menunjukkan bahwa perlakuan mungkin menimbulkan efek *stress* atau luka pada ulat yang membuatnya menjadi rentan terkena virus. Hal ini didukung juga dengan banyaknya cairan yang

dimuntahkan oleh ulat selama proses injeksi. Menurut Kavanagh dan Reeves (2004), penanganan larva uji yang kurang hati-hati (kasar) dapat mempengaruhi *survival* dan dapat memicu ekspresi dari protein stres. Cairan berwarna hitam merupakan bukti adanya perlawanan sistem imun serangga. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kavanagh dan Fallon (2010) bahwa setelah injeksi, larva akan berubah menjadi cokelat atau hitam dalam waktu yang singkat, dikarenakan timbulnya melanisasi, yaitu respon imun serangga yang dihasilkan dari pemecahan *prophenoloxidase* menjadi *phenoloxidase* aktif yang dirancang untuk mencegah pertumbuhan patogen di dalam hemocoel. Teramati bahwa 3 dari 5 ulat yang masih hidup naik ke atas tisu dan menunjukkan ciri pupasi, yaitu mencari tempat kering dan mengeluarkan cairan tubuhnya. Keinginan untuk pupasi menunjukkan bahwa tidak terjadi penurunan pada persentase pembentukan pupa, ulat masih sehat dan tidak menampilkan efek *sub-lethal*. Seharusnya, jika memang bakteri uji bersifat patogen, metode langsung seperti injeksi akan langsung mematikannya, sebab bakteri uji tidak perlu melewati seluruh tahapan pathogenesis yang ada dan sudah pasti sampai ke dalam hemolimfe ulat. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa *A. pittii* tidak menyebabkan kematian maupun efek *sub-lethal* pada *S. litura*.



Gambar 4. Hasil Identifikasi Keberadaan Bakteri Uji (Perbesaran 1000x)

Identifikasi bakteri uji dilakukan dengan mengambil hemolimfe dan *fatbody* dari tubuh ulat. Kedua organ ini dipilih karena merupakan tempat agregasi patogen pada Lepidoptera (Hilyer, 2016). Seluruh ulat yang sakit pasti memiliki kontaminan dalam hemolimfe nya. Toksin polar/*soluble* akan berada di hemolimfe sedangkan toksin nonpolar, seperti logam berat akan cenderung terakumulasi di *fatbody* (Xiu *et al.*, 2005). Dari hasil analisa hemolimfe dan *fat body* ulat yang sakit, *A.pittii* terdeteksi pada hemolimfe dan *fat body*. Namun, *baculovirus* hanya terdeteksi pada *fat body*. Selain itu, kontrol negatif secara seragam tidak menumbuhkan koloni apapun pada hemolimfe nya dan tidak menunjukkan keberadaan *baculovirus* maupun sel berbentuk *diplococcus* pada *fat body* nya. Terdapat 2 dari 3 petri tidak berhasil menumbuhkan koloni. Hal ini diduga karena hemolimfe merupakan pusat respon imun yang mengandung sel dan peptida yang bersifat anti mikroba (*lysozyme*) sehingga mampu melakukan imobilisasi dan membunuh patogen (Vilmos dan Kurucz, 1998). Selain itu, terjadi peningkatan metabolisme oksidatif selama fagositosis, di mana oksigen terkonversi sebagai *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI) yang terbukti dapat membunuh patogen. Produksi ROI juga umum terjadi di hemolimfe dan hemosit (Kavanagh dan Reeves, 2004). Terdapat 1 dari 3 petri yang berhasil menumbuhkan koloni, hal ini mungkin dikarenakan sistem imun ulat sedang rendah, sehingga berhasil diinvasi oleh *A. pittii*.

Fat body merupakan "*liver*" bagi ulat yang juga merupakan tempat utama sintesis peptida antimikroba dan pengikatan berbagai hemosit (Kavanagh dan Reeves, 2004). Menurut Wijonarko *et al.* (2007), keberadaan polihedra paling melimpah di sel sekitar trakea, hemosit, dan sel lemak. Namun, tidak ditemukan di malphigi dan sistem saraf. Famili *Baculoviridae* diketahui merupakan gabungan antara dua genera, yaitu GranuloVirus (GV) dan NucleoPolyhedroVirus (NPV). Menurut Wijonarko *et al.* (2007), Entomopoxvirus dan Granulovirus cenderung tersebar di dalam sel, sedangkan beberapa mikrosporidia yang diisolasi dari *S. litura* cenderung tersebar di sistem saraf (namun tidak ada di area malphigi). Oleh karena itu, *fat body* dipilih sebagai sampel untuk mendeteksi keberadaan *baculovirus*. Keberadaan *baculovirus* pada sel lemak mengindikasikan

bahwa virus telah mencapai tahap infeksi sekunder. 2 dari 3 sel lemak yang tidak menunjukkan keberadaan *baculovirus* mungkin saja memang tidak terinfeksi atau baru saja memasuki tahap infeksi primer.

Dugaan bahwa infeksi bakteri uji meningkatkan kerentanan ulat terhadap virus akan terbukti apabila keberadaan *A.pittii* selalu dijumpai bersamaan dengan *baculovirus* pada ulat yang sakit. Namun, hasil identifikasi bersifat *inconclusive* dan *hypothetical*. Dapat diduga bahwa bakteri uji tidak memberikan efek pada ulat karena pada ulat yang meleleh sering kali hanya ditemukan *baculovirus* saja dan *A. pittii* sangat jarang ditemukan. Selain itu, terdapat 1 ulat sakit yang tidak menunjukkan keberadaan *baculovirus* maupun *A. pittii* di dalamnya. Namun, untuk membuktikan dugaan ini, diperlukan replikasi yang lebih banyak dan diperlukan *sampling* dari beberapa organ lain, seperti *midgut* dan trakea untuk memudahkan deteksi infeksi primer. Hal tersebut tidak dilakukan karena keterbatasan waktu dan larva yang tersedia di saat pandemi.

Dilakukan uji statistik dengan hipotesa penelitian sebagai berikut:

H_0 : Tidak ada hubungan antara konsentrasi *Acinetobacter pittii* dengan mortalitas pada ulat uji

H_a : Ada hubungan antara konsentrasi *Acinetobacter pittii* dengan mortalitas pada ulat uji

Tabel 2. Uji Normalitas Hasil Percobaan

Tests of Normality							
Konsentrasi		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Mortalitas	10^5	0.392	6	0.004	0.701	6	0.006
	10^6	0.293	6	0.117	0.822	6	0.091
	10^7	0.392	6	0.004	0.701	6	0.006
a. Lilliefors Significance Correction							

a. Lilliefors Significance Correction

Nilai signifikansi (p) Shapiro-Wilk dari 10⁵ dan 10⁷ (0,006) < α (0,05), sehingga H_0 ditolak, sedangkan Nilai p dari 10⁶ (0,091) > α (0,05), sehingga H_0 diterima

∴ Distribusi data 10⁵ dan 10⁷ tidak normal, sedangkan 10⁶ terdistribusi normal.

Tabel 3. Uji Homogenitas Hasil Percobaan

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Mortalitas	Based on Mean	0.000	2	15	1.000
	Based on Median	0.106	2	15	0.900
	Based on Median and with adjusted df	0.106	2	12.178	0.900
	Based on trimmed mean	0.004	2	15	0.996

Berdasarkan *mean/rata-rata* data, nilai signifikansi (p) 1.000 > α (0,05)

Tabel 4. Uji Chi Square

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	3.600 ^a	2	0.165
Likelihood Ratio	3.855	2	0.146
Linear-by-Linear Association	3.300	1	0.069
N of Valid Cases	12		

a. 6 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.00.

Berdasarkan nilai *Asymptotic Significance* (2-sided) (0,165) > nilai α (0,05), maka H_0 diterima dan H_a ditolak.

Tabel 5. Uji *Fischer's Exact*

Chi-Square Tests						
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	3.086 ^a	1	0.079	0.242	0.121	
Continuity Correction ^b	1.371	1	0.242			
Likelihood Ratio	3.256	1	0.071	0.242	0.121	
Fisher's Exact Test				0.242	0.121	
Linear-by-Linear Association	2.829 ^c	1	0.093	0.242	0.121	0.114
N of Valid Cases	12					

a. 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.50.

b. Computed only for a 2x2 table

c. The standardized statistic is -1.682.

Nilai *p-value* > α (0,242 > 0,05), sehingga H_0 diterima

Terlihat dari hasil analisa statistik, bahwa data 10^5 dan 10^7 tidak terdistribusi normal, sedangkan 10^6 terdistribusi normal. Selain itu, data tidak memenuhi syarat pengujian chi-square karena frekuensi harapan di bawah 5. Oleh karena itu, data 10^5 dan 10^7 diuji menggunakan *Fischer's Exact Test* dan hasil menunjukkan bahwa tidak ada hubungan antara variasi konsentrasi *Acinetobacter pittii* dengan mortalitas pada ulat uji. Hal ini disebabkan oleh serangan dari faktor lain, yaitu *baculovirus*. Kontaminasi ini dapat terjadi karena *baculovirus* diketahui merupakan agensia alami yang sering ditemui pada *S. litura* dan memiliki virulensi tinggi pada *S. litura* (Wijonarko *et al.*, 2007) sehingga virus dapat turun dari generasi ke generasi (penyebaran vertikal). Persistensi polihedra juga diketahui dapat bertahan lama di alam, NPV dapat bertahan ± 3 tahun di dalam tanah (Okada, 1977 dalam Samsudin, 2016). Oleh karena laboratorium diketahui memiliki sejarah dalam meneliti *baculovirus*, maka serangan virus diduga berasal dari kontaminasi ruangan. *A.pittii* memang diketahui memiliki potensi patogenisitas yang baik karena memiliki hidrofobisitas dinding sel, enzim destruktif, siderofor, polisakarida lendir yang beracun, dan protein membran luar (OMPs) yang meningkatkan patogenisitasnya (Doughari *et al.* 2011). Walaupun begitu, interaksi mikroba dan serangga cenderung bersifat *host-specific*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Federici dan Maddox (1996), di mana tingkat spesifisitas inang yang relatif tinggi dan kecepatan membunuh yang lambat dibandingkan insektisida kimia spektrum luas sering menjadi hambatan untuk pengembangan lebih lanjut. Oleh karena itu, DNA rekombinan dan rekayasa genetika sering kali digunakan untuk meningkatkan spektrum inang dan virulensi dari patogen. Misalnya, dengan mengkombinasikan plasmid Bt dari isolat yang berbeda dengan spektra *host* yang berbeda dalam *strain* tunggal, sehingga dapat diperoleh Bt dengan spektrum yang lebih luas.

Menurut Federici dan Maddox (1996), semakin jauh hubungan antar *host* target, maka semakin kecil kemungkinan perkembangbiakan virus akan berhasil. Kompleksitas inilah yang menyebabkan tingkat spesifisitas *host* sangat tinggi. Sejauh ini, kutikula dari serangga diketahui merupakan faktor utama penentu spesifitas *host*. Hasil penelitian Federici dan Maddox (1996) menunjukkan bahwa setiap tipe protein Cry memiliki toksisitas yang sangat spesifik, bahkan untuk *host* dalam 1 ordo yang sama (Lepidopteran). CryIA(c) terbukti sangat toksik terhadap ulat tunas tembakau, *Heliothis virescens*, namun nontoksik terhadap ulat kubis, *Mamestra brassicae*. Perbedaan ordo antara *A. pittii* (Lepidoptera) dengan *T. molitor* (Coleoptera) menyebabkan efek patogenisitas yang berbeda pula. Maka, dapat disimpulkan bahwa, walaupun *A. pittii* tidak dapat mematikan *S. litura*, *A.pittii* tetap berpotensi menjadi biopestisida, namun bagi *host* yang lain yang berkerabat dekat dengan *T. molitor*, misalnya dari sesama ordo Coleoptera.

Kesimpulan

Acinetobacter pittii 3.1 terbukti tidak lebih baik dibandingkan insektisida kontrol untuk mengendalikan populasi larva *Spodoptera litura* F. Selain itu, *A. pittii* tidak menunjukkan efek patogenisitas maupun efek *sub-lethal* terhadap *S. litura*, sehingga nilai LC₅₀ dan *Mode of Action* (MoA) tidak dapat ditentukan. Penelitian *Acinetobacter pittii* 3.1 dapat dilanjutkan dengan larva uji yang lebih dekat kekerabatannya dengan *T. molitor*. Sebaiknya pengujian dilengkapi dengan serangkaian pengujian tambahan yang lebih lengkap dan selektif, seperti pengamatan dengan *Transmission Electron Microscope* (TEM) dan karakterisasi protein membran dengan *Sodium Dodecyl Sulphate – Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Selain itu, diperlukan sterilisasi ruangan, seperti penyinaran sinar UV untuk meminimalisir risiko serangan Virus Patogen Serangga (VPS), seperti *baculovirus*.

Pustaka Acuan

- Askitosari, T. D., Pantjajani, T., Nathania, S., Fedoragnes Wahyudi, A., & Sugianto, N. C. (2021). Identification of Entomopathogenic Nematode-Associated Bacteria Originating from Mojokerto. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 5(1), 31–38. www.ncbi.nlm.nih.gov
- Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., & Benade, S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *acinetobacter* spp.: An overview. *Microbes and Environments*, 26(2), 101–112. <https://doi.org/10.1264/JSME2.ME10179>
- Federici, B. A., & Maddox, J. V. (1996). Host Specificity in Microbe-Insect Interactions. *BioScience*, 46(6), 410–421. <https://doi.org/10.2307/1312875>
- Hillyer J. F. (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and comparative immunology*, 58, 102–118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>
- Hussain, B., Sivakumar, G., Kannan, M., War, A. R., & Ballal, C. R. (2019). First record of a nucleopolyhedrovirus infecting brown-tail moth larvae, *euproctis chrysorrhoea* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) in India. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/S41938-019-0117-9/TABLES/1>
- International Conference on Advances in Civil Engineering (ICACE). (2020). Advances in Civil Engineering. (Edited by Scott Arthur, Masato Saitoh, Sudip Kumar Pal). *Prosiding ICACE ke-5*. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-5547-0>
- Kavanagh, K., & Reeves, E. P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS microbiology reviews*, 28(1), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.002>
- Kavanagh, K. & Fallon, J.P. (2010). *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biology Reviews*. 24. 79-83. [10.1016/j.fbr.2010.04.001](https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.04.001).
- Khanghahi, M. Y., Strafella, S., Allegretta, I., & Crecchio, C. (2021). Isolation of Bacteria with Potential Plant-Promoting Traits and Optimization of Their Growth Conditions. *Current Microbiology*, 78(2), 464. <https://doi.org/10.1007/S00284-020-02303-W>
- Kingsley George, O., Joseph Issifu, A., John Asiedu, L., Sally Amponsah, B., & Albert, B. (2020). Analysis of insecticide residues in cabbage (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) from three major markets in Kumasi. *Annals of Environmental Science and Toxicology*, 4(1), 019–023. <https://doi.org/10.17352/AEST.000021>
- Osman, G., Already, R., Assaedi, A., Organji, S., El-Ghareeb, D., Abulreesh, H., dan Althubiani, A. (2015). Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a comprehensive review. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 25. 271-288.
- Pratiwi, R. H. (2017). Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik. *Jurnal Pro-Life*, 4(3), 421. <https://core.ac.uk/download/pdf/236429717.pdf>
- Safirah, R., Widodo, N., dan Budiyanto, M. A. K. (2016). Uji Efektifitas Insektisida Nabati Buah *Crescentia cujete* dan Bunga *Syzygium aromaticum* terhadap Mortalitas *Spodoptera litura*

- secara *In Vitro* sebagai Sumber Belajar Biologi. *Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia*, 2(3): 265-276
- Samsudin. (2016). Prospek Pengembangan Bioinsektisida Nucleopolyhedrovirus (NPV) untuk Pengendalian Hama Tanaman Perkebunan di Indonesia. *Perspektif*, 15(12), 18–30. <https://doi.org/10.21082/psp.v15n1.2016.18-30>
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), 283–300. <https://doi.org/10.1111/J.1467-7652.2011.00595.X>
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of bacteriology*, 189(23), 8746–8749. <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- Steinhaus E.A. 1951. Possible Use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an Aid in the Biological Control of the Alfalfa Caterpillar. *Hilgardia*, 20(18): 359-381.
- Susilawati. 2017. *Mengenal Tanaman Sayuran (Prospek dan Pengelompokkan)*. Palembang: Unsri Press
- Tampubolon, D. Y., Pangestiniingsih, Y., Zahara, F., & Manik, F. (2013). Uji PATOGENISITAS *Bacillus thuringiensis* dan *Metarhizium anisopliae* TERHADAP MORTALITAS *Spodoptera litura* Fabr (Lepidoptera: Noctuidae) DI LABORATORIUM. *Jurnal Agroekoteknologi*, 1(3), 95413. <https://doi.org/10.32734/JAET.V1I3.3004>
- Vilmos, P. and Kurucz, E. (1998) Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol. Lett.* 62, 59–66.
- Wijonarko, A., Hartono, S., dan Harjaka, T. 2007. Characterization of a Baculovirus of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) Isolated From Yogyakarta. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 13(1): 63-72.
- Xia, Qiang & Sun, Hongxia & Hu, Xinjun & Shu, Yinghua & Gu, Dexiang & Zhang, Guren. (2005). Apoptosis of *Spodoptera litura* larval hemocytes induced by heavy metal zinc. *Chinese Science Bulletin*. 50. 2856-2860. 10.1007/BF02899656.
- Yuningsih. (2016). Bioinsektisida sebagai Upaya Reharmonism Ekosistem. *Prosiding Symbion (Symposium on Biology Education)*, 521–532.