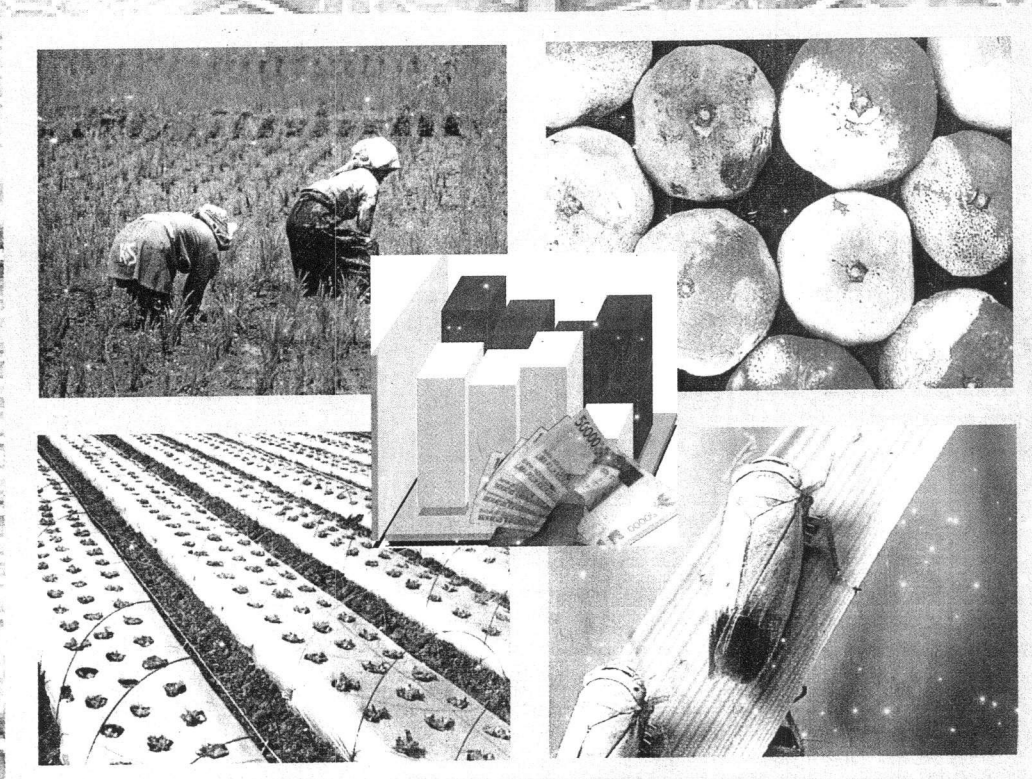


Jurnal **Agrikultura**

Volume 17, Nomor 3, Desember 2006



Terakreditasi oleh Direktorat Jenderal
Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional

Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran
Jatinangor, Bandung 40600

80 Pengaruh Rokaglamida dan Parasitoid *Eriborus argenteopilosus* Terhadap Kadar dan Profil Protein Hemolimfa Larva *Crociodolomia pavonana* serta Melanisasi Kutikula

Danar Dono*, Djoko Prijono**, Syafrida Manuwoto**, Damayanti Buchori**, Dadang**, dan Hasim***

*Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Bandung

**Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

***Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

Dono D, D Prijono, S Manuwoto, D Buchori, Dadang, and Hasim. 2006. Effect of rocaglamide and parasitoid (*Eriborus argenteopilosus*) on profile and hemolymph protein content of *Crociodolomia pavonana* larvae and cuticle melanization. *Agrikultura* 17: 185-194.

Rocaglamide and its derivatives have been reported to be cytotoxic and inhibit proliferation of tumor and certain cancer cell. Derivatives of rocaglamide were also reported to inhibit protein synthesis in cultured cell. Study on the influence of rocaglamide on insect immunity system which involve in parasitoid elimination has never been conducted. The objective of this research was to study immunity system of *Crociodolomia pavonana* larvae treated with rocaglamide through poisonous food leaf and parasitized by *Eriborus argenteopilosus*. The results indicated that protein content of hemolymph of *C. pavonana* larvae treated with rocaglamide at LC₂₅, LC₅₀, and LC₇₀ was lower compared to control. Rocaglamide treatment inhibited the formation of hemolymph protein of molecular weight of 60 kDa in *C. pavonana* larvae. This protein was assumed to involve in biochemical immunity mechanism of host larvae against immature parasitoid of *E. argenteopilosus*. Rocaglamide relative did not inhibit phenoloxydase activity, but it is assumed to inhibit protein synthesis processes, including enzyme and hemaglutinin. Rocaglamide treatment seemed to suppress immunity reaction of *C. pavonana* larvae to endoparasitoid *E. argenteopilosus*. Therefore, the use of rocaglamide to control crop cabbage caterpillar is potential to improve survival of endoparasitoid *E. argenteopilosus* on *C. pavonana* larvae.

Key words: rocaglamide, immunity, melanization, phenoloxydase

ABSTRAK

Rokaglamida dan turunannya dilaporkan bersifat sitotoksik dan dapat menghambat proliferasi sel tumor/kanker tertentu. Turunan rokaglamida juga dilaporkan menghambat sintesis protein pada kultur sel. Pengujian pengaruh senyawa rokaglamida terhadap sistem imunitas serangga inang yang berperan dalam proses kekebalan terhadap parasitoid belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari sistem kekebalan larva *Crociodolomia pavonana* yang mendapat perlakuan rokaglamida melalui peracunan daun makanan terhadap pradewasa parasitoid *Eriborus argenteopilosus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan protein hemolimfa larva *C. pavonana* yang mendapat perlakuan rokaglamida pada LC₂₅, LC₅₀, dan LC₇₀ lebih rendah dibandingkan kontrol baik untuk larva inang tidak terparasit maupun terparasit. Pemberian rokaglamida menyebabkan larva *C. pavonana* tidak mampu membentuk protein hemolimfa berbobot molekul 60 kDa. Protein tersebut diasumsikan berperan dalam mekanisme imunitas biokimia larva *C. pavonana* terhadap pradewasa parasitoid *E. argenteopilosus*. Rokaglamida relatif tidak menghambat aktivitas fenoloksidase tetapi diasumsikan menghambat pada tingkat sintesis protein termasuk fenoloksidase dan hemaglutinin. Hasil percobaan ini mengungkapkan bahwa perlakuan rokaglamida dapat menekan reaksi kekebalan larva *C. pavonana* terhadap endoparasitoid *E. argenteopilosus*. Oleh karena itu, penggunaan senyawa rokaglamida untuk pengendalian ulat krop kubis berpotensi meningkatkan keberhasilan parasitoid *E. argenteopilosus* berkembang pada inang *C. pavonana*.

Kata kunci: rokaglamida, imunitas, melanisasi, fenoloksidase

PENDAHULUAN

Serangga mengalami serangan berbagai parasitoid secara terus menerus, akan tetapi kenyataan di alam serangga tetap mampu mempertahankan keberadaannya karena serangga mempunyai sistem imunitas fisiologi dan biokimia yang kompleks dan efisien terhadap serangan parasitoid. Sistem imunitas tersebut meliputi: 1) induksi sintesis peptida dan protein yang terjadi terutama pada badan lemak dan 2) respons populasi hemosit yang terkoordinasi (Gillespie *et al.*, 1997).

Hemolimfa sangat berperan dalam sistem imunitas serangga yang meliputi sistem imunitas humoral dan seluler (Dunn, 1986; Gupta, 1991a, 1991b; Marmaras *et al.*, 1996). Imunitas humoral melibatkan protein hemolimfa hemaglutinin (Gupta, 1991a). Infeksi bakteri pada *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera) mengakibatkan terjadinya induksi protein hemolimfa hemolin yang merupakan golongan immunoglobulin (Sun *et al.*, 1990; Landendorf & Kanost, 1991). Protein p47 (bobot molekul 47 kDa) yang terdapat secara intraseluler dan pada permukaan hemosit berperan dalam pengaturan sifat-sifat adhesif sel-sel hemosit. Marmaras *et al.* (1996) mengemukakan bahwa p47 penting dalam reaksi pertahanan humoral dan seluler. Durliat (1991) menyebutkan bahwa protein antibodi heteroaglutinin dari Crustacea mempunyai bobot molekul 55 kDa sampai 68 kDa.

Imunitas serangga terhadap invasi parasitoid umumnya terjadi melalui proses enkapsulasi. Ada dua tipe enkapsulasi yaitu enkapsulasi seluler yang terutama melibatkan sel darah golongan plasmatosit dan granulosit serta enkapsulasi humoral (*melanotic encapsulation*) yang tidak melibatkan sel-sel darah tetapi selalu berasosiasi dengan aktivitas fenoloksidase. Enkapsulasi seluler dapat terjadi dengan atau tanpa memperlihatkan gejala melanisasi (Gillespie *et al.*, 1997). Dalam proses melanisasi tersebut selalu melibatkan fenoloksidase yang dicirikan dengan warna coklat atau hitam (Nappi *et al.*, 1992; Kayser, 1985).

Fenoloksidase pada serangga ditemukan dalam hemosit, plasma darah, badan lemak, dan pada integumen. Ada dua tipe fenoloksidase yang telah dikenal yaitu tipe tirosinase yang terdapat dalam hemosit, serum, integumen dan badan lemak serta tipe lakase yang ditemukan pada integumen (Ashida & Yamasaki, 1990; Charalambidis *et al.*, 1994b). Fenoloksidase yang berasal dari plasma dan hemosit larva *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) mempunyai bobot molekul sama yaitu 93 kDa

(Charalambidis *et al.*, 1994b; Marmaras *et al.*, 1994). Cherqui *et al.* (1996) melaporkan bahwa profenoloksidase yang diisolasi dari hemolimfa *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) mempunyai bobot molekul 250 kDa yang tersusun atas tiga sub unit non-kovalen dengan bobot molekul 81 kDa. Enzim lain yang terlibat dalam proses enkapsulasi seluler adalah flavin adenin dinukleotida (FAD)-glukosa dehidrogenase yang teramati setidaknya pada larva *Manduca sexta*. Enzim tersebut terdeteksi pada sel plasmatosit yang menyebar pada gelas objek dan pada sel hemosit yang mengenkapsulasi batangan lateks mikro (Cox-Foster & Stehr, 1994).

Hasil penelitian Dono dkk. (1998) mengungkapkan bahwa sifat toksik dan sifat penghambat perkembangan ekstrak biji *Aglaia harmsiana* (Meliaceae) pada LC₅ dan LC₂₅ berperan dalam menekan enkapsulasi telur dan larva *E. argenteopilosus* oleh larva *C. pavonana*. Perlakuan fraksi etil asetat ekstrak metanol ranting *A. odorata* pada LC₂₅, LC₅₀ dan LC₇₀ mampu menekan enkapsulasi pradewasa parasitoid (Sudarmo dkk., 2001). Penekanan terhadap proses enkapsulasi tersebut memperbesar peluang keberhasilan *E. argenteopilosus* berkembang dalam tubuh larva *C. pavonana*. Namun, penelitian yang dilakukan oleh Dono dkk. (1998) dan Sudarmo dkk. (2001) menggunakan ekstrak yang belum dimurnikan sehingga untuk memahami penghambatan enkapsulasi dengan lebih baik maka dalam penelitian ini digunakan senyawa murni rokaglamida yang diisolasi dari tanaman *A. odorata*.

Senyawa rokaglamida telah sering diteliti pengaruhnya terhadap beberapa spesies serangga hama dan terbukti memiliki potensi yang menjanjikan (Satasook *et al.*, 1994; Ishibashi *et al.*, 1993; Janprasert *et al.*, 1993; Nugroho *et al.*, 1997a, 1997b, 1999; Gussregen *et al.*, 1997). Rokaglamida dan turunannya (golongan benzofuran) dari tanaman marga *Aglaia* dilaporkan bersifat toksik terhadap sel tumor/kanker tertentu (King *et al.*, 1982; Dumontet *et al.*, 1996; Cui *et al.*, 1997). Selain itu, beberapa senyawa turunan rokaglamida dapat menghambat sintesis protein yang berperan dalam pembentukan dan perkembangan sel (Ohse *et al.*, 1996). Walaupun senyawa rokaglamida terbukti efektif terhadap beberapa spesies serangga hama, tetapi pengaruhnya terhadap interaksi inang-parasitoid masih belum diteliti secara mendalam.

Penelitian ini bertujuan untuk : 1) mempelajari pengaruh rokaglamida pada konsentrasi subletal LC₂₅ (14,9 ppm), LC₅₀ (23,39 ppm), dan LC₇₀ (33,06 ppm) dan pemasaran oleh

E. argenteopilosus terhadap kadar protein hemolimfa larva *C. pavonana*, 2) menganalisis profil protein hemolimfa larva *C. pavonana* yang diberi perlakuan rokaglamida dan pemaparan, dan 3) mempelajari proses melanisasi kutikula larva *Oryctes rhinoceros* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) yang diberi perlakuan rokaglamida pada konsentrasi 300 ppm dengan cara perlakuan setempat.

BAHAN DAN METODE

Senyawa rokaglamida yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi oleh Nugroho *et al.* (1999) dari ekstrak daun dan ranting *A. Odorata*.

Pemeliharaan serangga *C. pavonana* dan parasitoid *E. argenteopilosus* dilakukan menurut metode yang dikemukakan oleh Prijono & Hassan (1992) dan Sudarmo dkk. (2001).

Pengaruh Rokaglamida dan Parasitoid Terhadap Kadar Protein Hemolimfa Larva *C. Pavonana*

Konsentrasi subletal rokaglamida yang diuji adalah LC₂₅ (14,9 ppm), LC₅₀ (23,39 ppm), dan LC₇₀ (33,06 ppm) sesuai hasil percobaan Dono dkk. (2004). Larva instar 2 *C. pavonana* diberi perlakuan rokaglamida pada konsentrasi tersebut. Rokaglamida dilarutkan dalam aseton untuk memperoleh larutan dengan konsentrasi yang diinginkan. Setiap larutan rokaglamida pada konsentrasi tersebut disebar secara merata sebanyak 25 µl pada setiap permukaan bundaran daun brokoli berdiameter 3 cm dengan sonde mikro (*microsyringe*). Daun kontrol diberi perlakuan aseton saja dengan volume yang sama. Dua bundaran daun perlakuan atau kontrol ditempatkan dalam cawan petri berdiameter 9 cm yang dialasi kertas isap. Larva yang bertahan hidup dan akan berganti kulit ke instar 3 dipaparkan satu per satu pada imago betina parasitoid. Larva tersebut segera dikeluarkan dari kurungan setelah tampak diparasiti yaitu jika imago betina parasitoid telah menusukkan ovipositorinya. Setelah pemaparan, larva *C. pavonana* dipindahkan ke dalam cawan petri berdiameter 9 cm yang berisi makanan daun brokoli tanpa perlakuan.

Pengukuran kadar protein hemolimfa larva *C. pavonana* dilakukan dengan metode Lowry (Kresze, 1988) dan pengukuran absorbansi larutan dilakukan dengan spektrofotometer pada λ 500 nm. Pereaksi yang digunakan adalah folincioalteau dan tembaga alkalin. Pereaksi tembaga alkalin terdiri atas dari campuran 1% CuSO₄.5H₂O, 2% Na-tartrat, dan 2% Na₂CO₃ dalam 0,1 N NaOH. Sebagai blangko digunakan aquades 3 ml. Standar protein yang digunakan adalah BSA (Bovine Serum Albumin).

Percobaan disusun sebagai percobaan faktorial dalam rancangan acak lengkap dengan 2 faktor dan 3 ulangan. Faktor pertama adalah perlakuan rokaglamida dengan 4 taraf, yaitu 0% (kontrol), LC₂₅, LC₅₀ dan LC₇₀, sementara serta faktor kedua adalah pemaparan dengan 2 taraf, yaitu tanpa atau dengan pemaparan. Data jumlah hemosit ditransformasi ke \sqrt{y} yang kemudian dianalisis dengan sidik ragam. Perbandingan nilai tengah rata-rata antar perlakuan dilakukan dengan uji Tukey (Steel & Torrie, 1993).

Pengaruh Rokaglamida dan Parasitoid Terhadap Profil Protein Hemolimfa Larva *C. pavonana*

Konsentrasi subletal rokaglamida yang diuji adalah LC₂₅, LC₅₀ dan LC₇₀ sesuai hasil percobaan Dono dkk. (2004). Cara perlakuan rokaglamida dan pemaparan oleh *E. argenteopilosus* serta teknik pengumpulan hemolimfa larva *C. pavonana* instar 3 dan instar 4 sama seperti pada percobaan 1. Hemolimfa dari larva perlakuan dan kontrol sebanyak 10 ul dilarutkan dalam 500 ul buffer fosfat klorida (0,15 M NaCl, 0,5 mM KH₂PO₄, pH 6,5) (Stoltz & Guzo, 1986), kemudian disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang diperoleh siap untuk dianalisis. Profil protein hemolimfa dianalisis dengan teknik elektroforesis gel poliakrilamida dengan konsentrasi gel 12% (Laemmli, 1970). Pendugaan bobot molekul protein plasma dilakukan dengan menggunakan protein penanda *Sigma wide molecular weight range*.

Pengaruh Rokaglamida Terhadap Aktivitas Fenoloksidase dalam Melanisasi Kutikula

Serangga yang digunakan untuk perlakuan adalah larva *Oryctes rhinoceros* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) instar 3 dengan panjang tubuh 8,5-9 cm dan lebar 2,5-2,7 cm. Sebagai perlakuan adalah senyawa insektisida rokaglamida yang diuji pada konsentrasi 300 ppm (4,3 x LC₉₅ terhadap larva *C. pavonana* sesuai hasil percobaan Dono *et al.* (2004)). Sebagai perlakuan pembanding digunakan sodium azida (NaN₃) 2%, trikloro asetik asid (TCA) 40% dan kontrol. Sodium azida merupakan senyawa penghambat fenoloksidase (Sugumaran *et al.*, 1992; Charalambidis *et al.*, 1994b; Longankumar *et al.*, 1996). Kutikula larva *O. rhinoceros* dikikis (aberasi) pada bagian dorsal abdomen dengan ampelas No. 22, kemudian diteteskan 10 µl larutan rokaglamida pada permukaan kutikula tersebut. Perlakuan sodium azida 2% dan TCA 40% dilakukan dengan cara dan volume yang sama. Larva kontrol ditetesi dengan pelarut (aseton) dengan volume yang sama. Proses melanisasi diamati hingga 24 jam. Menurut

Longankumar *et al.* (1996), waktu yang diperlukan untuk terjadinya melanisasi sempurna adalah 16 jam. Tingkat atau derajat melanisasi ditentukan dengan mengamati perubahan warna kecoklatan yang terjadi pada kutikula larva *O. rhinoceros* yang dikikis dan membandingkan dengan warna kecoklatan bertingkat standard sebagai berikut: 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%.

Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 ulangan. Data persentasi derajat melanisasi ditransformasi ke arcsin \sqrt{y} yang kemudian dianalisis dengan sidik ragam. Perbandingan nilai rata-rata antar perlakuan dilakukan dengan uji Tukey (Steel & Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Rokaglamida dan Parasitoid Terhadap Kadar Protein Hemolimfa Larva *C. pavonana*

Kandungan protein hemolimfa semua larva *C. pavonana* yang mendapat perlakuan

rokaglamida melalui makanan secara nyata lebih rendah daripada kandungan protein hemolimfa larva kontrol. Perlakuan rokaglamida mampu menekan kadar protein hemolimfa larva hingga 67%. Namun, kandungan protein hemolimfa antar larva perlakuan rokaglamida tidak berbeda nyata (Tabel 1).

Data pada Tabel 1 juga mengindikasikan bahwa rokaglamida menghambat sintesis protein. Penurunan kadar protein hemolimfa larva *C. pavonana* akibat memakan daun brokoli yang telah diberi rokaglamida dapat disebabkan senyawa rokaglamida menghambat protease yang berperan dalam penguraian protein dari makanan sebelum diserap oleh dinding mesenteron sehingga protein dari makanan yang diperlukan untuk kebutuhan pertumbuhan tubuh tidak tersedia. Broadway (1995, 1996) melaporkan bahwa serangga *Trichoplusia ni* yang makan penghambat proteinase yang berasal dari tanaman kubis mengalami hambatan pertumbuhan dan perkembangan.

Tabel 1. Kadar protein hemolimfa larva *C. pavonana* yang diberi perlakuan rokaglamida dan pemasaran oleh *E. Argenteopilosus*.

Perlakuan	Kadar protein (x ± sb) (mg/ml)	Penekanan relatif (%)	
		Terparasit - Tidak terparasit ¹	Perlakuan - Kontrol ²
Kontrol	Terparasit	37,86 ± 2,34 b	-
	Tidak terparasit	38,19 ± 4,11 b	0,86
LC ₂₅ (14,99 ppm)	Terparasit	17,57 ± 1,69 a	-
	Tidak terparasit	19,99 ± 1,69 a	12,11
LC ₅₀ (23,39 ppm)	Terparasit	12,43 ± 1,70 a	-
	Tidak terparasit	18,38 ± 0,89 a	32,37
LC ₇₀ (33,06 ppm)	Terparasit	16,69 ± 0,16 a	-
	Tidak terparasit	19,83 ± 4,11 a	15,83
Regresi-korelasi	$Y = 35,33 - 2,96X_1 - 0,63X_2;$ $r = 0,819;$ $R^2 = 0,6708$		

Keterangan: x = rata-rata; sb = simpangan baku. ¹ Penekanan relatif = (Tdk terparasit - Terparasit / Tdk terparasit) x 100%. ² Penekanan relatif = (Kontrol - Perlakuan / Kontrol) x 100%. Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata (Uji Tukey $\alpha = 0,05$).

Kandungan protein hemolimfa terendah tampak pada larva yang diberi perlakuan rokaglamida pada LC₅₀, sedangkan pada perlakuan LC₇₀ kandungan protein hemolimfa cenderung meningkat kembali. Hal ini diduga disebabkan populasi larva yang bertahan hidup pada perlakuan LC₇₀ tersebut adalah populasi yang

secara fisiologis/biokimia lebih toleran atau mampu memetabolisme senyawa rokaglamida sehingga mampu tumbuh/berkembang normal.

Penurunan kadar protein hemolimfa larva inang ini dapat juga disebabkan terjadinya penghambatan sintesis protein oleh rokaglamida pada tingkat gen yang menyandi atau mengatur

sintesis protein. Hasil penelitian Ohse *et al.* (1996) menunjukkan bahwa senyawa turunan rokaglamida rokaglaol, pyrimidinone dan aglaistatin dilaporkan mempunyai aktivitas penghambat sintesis protein dan penghambat pertumbuhan sel kanker K-ras-NRK dengan nilai konsentrasi penghambatan (IC_{50}) antara 1-10 ng/ml. Penurunan kadar protein hemolimfa ini diasumsikan berkaitan dengan protein yang terlibat dalam respons imun dari larva *C. pavonana* terhadap pradewasa parasitoid *E. argenteopilosus* sehingga penurunan kadar protein ini juga menurunkan kemampuan larva inang untuk mengenkapsulasi telur atau larva parasitoid.

Penurunan kadar protein akibat perlakuan rokaglamida tersebut juga dapat mengakibatkan gangguan pada keseluruhan proses-proses pembangunan tubuh larva inang misalnya dalam pembentukan sel-sel darah (hemosit). Telah diketahui bahwa hemosit berperan penting dalam mekanisme pertahanan seluler khususnya dalam proses enkapsulasi. Penurunan jumlah hemosit yang berperan dalam proses enkapsulasi akan menurunkan kemampuan larva *C. pavonana* untuk mengeliminir pradewasa parasitoid sehingga memperbesar peluang keberhasilan parasitoid *E. argenteopilosus* untuk berkembang dalam tubuh inang. Sedikitnya jumlah total hemosit akibat perlakuan rokaglamida mengakibatkan kemampuan larva *C. pavonana* untuk mengenkapsulasi telur dan larva parasitoid menurun seperti yang ditunjukkan hasil percobaan yang dilakukan oleh Dono dkk. (2006) yaitu bahwa penurunan jumlah hemosit larva *C. pavonana* menurunkan kemampuan larva tersebut untuk mengenkapsulasi pradewasa parasitoid *E. argenteopilosus*.

Selain itu, menurut Gupta (1991a, 1991b) pada saat granulosit mengalami lisis karena kontak dengan telur atau larva parasitoid akan melepaskan protein hemaglutinin, faktor pengenal, faktor pertumbuhan, faktor koagulasi dan profenoloksidase. Hemaglutinin berperan menarik kelompok granulosit dan plasmatosit yang lain untuk beragregasi disekitar telur atau larva parasitoid. Lebih lanjut Gupta (1991a, 1991b) mengemukakan fungsi hemaglutinin yang berkaitan dengan sistem imunitas serangga yaitu sebagai molekul pengenal benda asing (antigen), merangsang proliferasi granulosit dan plasmatosit, reseptor permukaan sel, pergerakan sel dan fagositosis. Namun demikian, mekanisme molekuler enkapsulasi banyak melibatkan proses-proses yang saling berkaitan. Serangkaian penelitian dengan metode-metode yang spesifik diperlukan untuk memahami proses penghambatan enkapsulasi oleh rokaglamida secara tepat.

Secara umum, larva *C. pavonana* yang terparasit oleh *E. argenteopilosus* mempunyai kandungan total protein hemolimfa lebih rendah daripada kandungan protein hemolimfa larva yang tidak terparasit. Fenomena ini tampaknya disebabkan larva parasitoid *E. argenteopilosus* yang berkembang dalam tubuh larva inang *C. pavonana* memanfaatkan protein dan nutrisi lainnya yang terkandung dalam tubuh inang sehingga dapat menurunkan kadar protein hemolimfa inang. Hasil penelitian ini sejalan dengan yang dikemukakan oleh Pennacchio *et al.* (1994) bahwa larva *Heliothis virescens* (F) (Lepidoptera: Noctuidae) yang terparasit oleh *Cardichiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) memiliki kandungan protein hemolimfa yang lebih rendah daripada larva yang tidak terparasit. Rendahnya kandungan protein larva *H. virescens* yang terparasit tersebut disebabkan karena larva parasitoid memanfaatkan protein hemolimfa inangnya.

Pengaruh Rokaglamida dan Parasitoid Terhadap Profil Protein Hemolimfa Larva *C. pavonana*

Gambar 1 lajur 3 hingga 8 memperlihatkan profil protein hemolimfa larva *C. pavonana* yang mendapat perlakuan rokaglamida. Dari gambar tampak adanya pita protein hemolimfa yang hilang dan juga tampak adanya penurunan ketebalan pita protein hemolimfa dari larva *C. pavonana* yang mendapat perlakuan rokaglamida. Rokaglamida tampaknya mengakibatkan tidak terbentuknya protein tertentu dari hemolimfa larva *C. pavonana*. Hasil percobaan Ohse *et al.* (1996) menunjukkan bahwa senyawa siklopentabenzofuran seperti rokaglaol, pyrimidinon dan aglaistatin dari *A. odorata* bersifat penghambat sintesis protein.

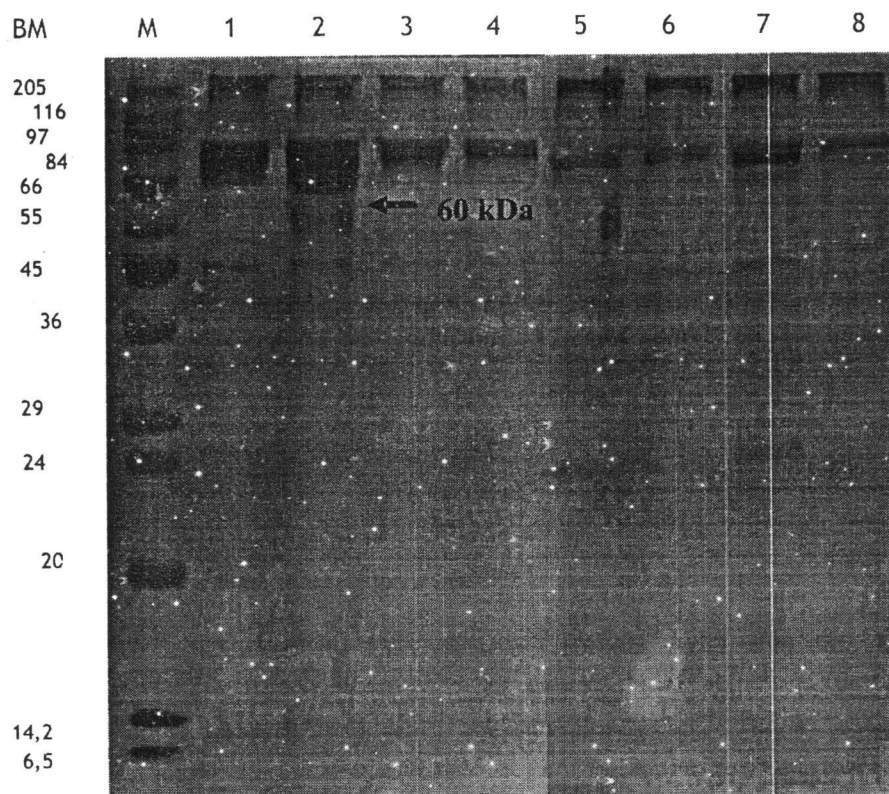
Pita protein yang hilang atau menurun kadarnya mempunyai bobot molekul di antara 55 kDa sampai 84 kDa. Diasumsikan bahwa pita protein yang hilang atau yang menurun kadarnya pada larva perlakuan rokaglamida adalah jenis protein yang berperan dalam reaksi imun larva *C. pavonana* terhadap pradewasa parasitoid *E. argenteopilosus*.

Pada larva kontrol terparasit (Gambar 1 lajur 2) tampak adanya pita protein dengan bobot molekul (BM) 60 kDa. Bobot molekul protein tersebut diprediksi berdasarkan regresi kurva standar $Y = 2,1163 - 1,2427r$, $r = -0,96$. Pita protein berbobot molekul 60 kDa tersebut tidak ditemukan pada larva kontrol yang tidak terparasit (Gambar 1 lajur 1) dan pada larva perlakuan rokaglamida (Gambar 1. lajur 3 hingga 8). Protein dengan bobot molekul 60 kDa tersebut diduga berperan dalam reaksi imun dari larva *C. pavonana*, selain protein dengan BM 66 kDa dan 84 kDa yang meningkat kadarnya

(Gambar 1, pita tebal pada lajur 2). Durliat (1991) menyebutkan bahwa protein antibodi heteroaglutinin dari Crustacea mempunyai bobot molekul 55 kDa sampai 68 kDa.

Ketidakmampuan larva *C. pavonana* yang mendapat perlakuan rokaglamida mensintesis protein yang berperan dalam imunitas terhadap pradewasa parasitoid *E. argenteopilosus* akan meningkatkan peluang keberhasilan perkembangan dan kemunculan imago parasitoid. Namun, bekerjanya sistem imunitas humoral tersebut tidak terlepas dari mekanisme imunitas seluler. Menurut Gupta (1991a) bahwa hemaglutinin ini disintesis pada hemosit dan badan lemak. Hasil percobaan Dono dkk. (2006) menunjukkan bahwa perlakuan rokaglamida mengakibatkan penurunan jumlah sel plasmatosit

dan granulosit larva *C. pavonana*. Penurunan jumlah sel darah tersebut mengakibatkan penurunan kemampuan larva dalam mengenkapsulasi predewasa parasitoid *E. argenteopilosus*. Menurut Gupta (1991a), pada saat granulosit mengalami lisis karena kontak dengan telur atau larva parasitoid akan melepaskan hemaglutinin. Hemaglutinin berperan menarik granulosit dan plasmatosit yang lain beragregasi disekitar telur atau larva parasitoid. Berkaitan dengan sistem imunitas serangga, lebih lanjut Gupta (1991a) mengemukakan bahwa hemaglutinin berfungsi sebagai molekul pengenalan benda asing, merangsang proliferasi granulosit dan plasmatosit, reseptor permukaan sel, pergerakan sel dan fagositosis.



Gambar 1. Profil protein larva *C. pavonana* instar 4 yang diberi perlakuan rokaglamida dan pamarasitan oleh *E. argenteopilosus*. Tanda panah menunjukkan protein terinduksi dengan bobot molekul (BM) 60 kDa. a) Konsentrasi gel poliakrilamida 12%. BM : Bobot molekul (kDa), M : marker, 1: Kontrol tidak terparasit, 2: Kontrol terparasit, 3: Perlakuan rokaglamida LC₂₅ tidak terparasit, 4: rokaglamida LC₂₅ terparasit, 5: rokaglamida LC₅₀ tidak terparasit, 6: rokaglamida LC₅₀ terparasit, 7: rokaglamida LC₇₀ tidak terparasit, 8: rokaglamida LC₇₀ terparasit.

Selain protein hemaglutinin, fenoloksidase juga berfungsi sebagai mekanisme pertahanan untuk mengeliminir benda asing. Fenoloksidase yang berasal dari plasma, hemosit dan integumen

larva *C. capitata* mempunyai bobot molekul sama yaitu 93 kDa (Charalambidis *et al.*, 1994b; Marmaras *et al.*, 1994). Cherqui *et al.* (1996) melaporkan bahwa profenoloksidase yang diisolasi

dari hemolimfa *L. migratoria* mempunyai bobot molekul 250 kDa yang tersusun atas tiga sub unit non-kovalen dengan bobot molekul 81 kDa. Dari Gambar 1, pada perlakuan rokaglamida (lajur 3 hingga 8) tampak terjadi perubahan kadar atau bahkan hilangnya pita protein pada kisaran bobot molekul protein enzim 81 kDa dan 93 kDa tersebut. Protein tersebut disintesis oleh larva *C. pavonana* sebagai reaksi terhadap adanya telur atau larva parasitoid *E. argenteopilosus*. Diduga protein tersebut berperan dalam reaksi imun terhadap adanya telur atau larva parasitoid.

Hasil percobaan ini mempertegas bahwa senyawa rokaglamida menghambat sintesis protein yang berperan dalam reaksi imun larva *C. pavonana* terhadap pradewasa parasitoid *E. argenteopilosus*. Dengan demikian rokaglamida berpeluang digunakan sebagai insektisida yang dapat meningkatkan kinerja parasitoid *E. argenteopilosus* dalam menekan populasi *C. pavonana* melalui penekanan sistem imunitasnya.

Pengaruh Rokaglamida Terhadap Aktivitas Fenoloksidase dalam Melanisasi Kutikula

Derajat melanisasi kutikula larva *O. rhinoceros* antara kontrol dan perlakuan rokaglamida secara statistik tidak berbeda nyata pada semua waktu pengamatan (Tabel 2). Perlakuan rokaglamida secara topikal pada kutikula larva *O. rhinoceros* yang dilukai dengan

ampelas menunjukkan bahwa rokaglamida tidak menghambat proses melanisasi. Hal ini ditunjukkan dengan kesamaan intensitas melanisasi antara larva kontrol dengan larva perlakuan rokaglamida pada konsentrasi 300 ppm (Tabel 2).

Melanisasi kutikula adalah proses yang dikatalisis oleh enzim fenoloksidase yang mengikuti proses penyembuhan luka pada kutikula serangga. Pada hewan dikenal ada 2 tipe melanisasi yaitu phaeomelanin dan eumelanin. Phaeomelanin (polidihidrobenzotiazina) dicirikan dengan kelarutan dalam alkali, berwarna kuning hingga coklat kemerahan, merupakan pigmen yang mengandung sulfur, dan merupakan siklus oksidatif dari sisteinildopaquinon. Eumelanin dicirikan berwarna coklat atau hitam, heteropolimer yang tidak larut dan tersusun atas o-hidroquinon dan o-quinon (Nappi *et al.*, 1992). Ashida & Yamasaki (1990) dan Charalambidis *et al.* (1994b) melaporkan ada dua tipe fenoloksidase yaitu tipe tirosinase yang terdapat dalam hemosit, serum, integumen, dan badan lemak, sedangkan tipe lakase ditemukan pada integumen. Tipe tirosinase berperan dalam proses melanisasi, reaksi pertahanan dan penyembuhan luka. Tipe lakase terutama berperan dalam sklerotisasi (Ashida & Yamasaki, 1990; Charalambidis *et al.*, 1994a).

Tabel 2. Derajat melanisasi kutikula larva *O. rhinoceros* yang mengalami aberasi dan diberi perlakuan.

Waktu pengamatan	Perlakuan	Derajat melanisasi (%) ($\bar{x} \pm SB$)	
4 jam	Kontrol	56,67 ± 5,77	b
	Rokaglamida (300 ppm)	53,33 ± 5,77	b
	Sodium azida (2%)	0	a
	TCA 40%	6,67 ± 5,77	a
6 jam	Kontrol	80,0 ± 10,0	b
	Rokaglamida (300 ppm)	73,33 ± 5,77	b
	Sodium azida (2%)	26,67 ± 5,77	a
	TCA 40%	26,67 ± 5,77	a
18 jam	Kontrol	100 ± 0	b
	Rokaglamida (300 ppm)	100 ± 0	b
	Sodium azida (2%)	83,33 ± 5,77	a
	TCA 40%	86,67 ± 5,77	a

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada waktu pengamatan yang sama tidak berbeda nyata (Uji Tukey $\alpha = 0,05$).

Pada perlakuan sodium azida 2% dan asam trikloro asetat (TCA) proses melanisasi pada kutikula larva *O. rhinoceros* mengalami perlambatan dibandingkan kontrol dan perlakuan rokaglamida yang ditunjukkan dengan warna yang lebih pucat sesuai waktu pengamatannya. Hasil uji statistik perlakuan sodium azida dan TCA berbeda nyata dengan kontrol dan perlakuan

rokaglamida (Tabel 2). Sodium azida diketahui menghambat aktivitas fenoloksidase tipe lakase dan tirosinase yang terdapat pada integumen (Charalambidis *et al.*, 1994b). Hasil penelitian Sugumaran *et al.* (1992) menunjukkan bahwa sodium azida 0,5 mM menghambat aktivitas fenoloksidase tipe lakase dari *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) dengan

tingkat penghambatan 82%. Dilain pihak, feniltiourea yang diketahui sebagai penghambat spesifik fenoloksidase pada konsentrasi 5 mM hanya mengakibatkan penghambatan aktivitas fenoloksidase 15%. Charalambidis *et al.* (1994b) mengemukakan bahwa sodium azida menghambat aktivitas fenoloksidase tipe lakase yang berasal dari integumen larva *C. capitata*, tetapi tidak atau sedikit menghambat aktivitas fenoloksidase tipe tirosinase yang diisolasi dari serum dan hemosit. Hasil percobaan Longankumar *et al.* (1996) menunjukkan bahwa penghambatan melanisasi kutikula larva *O. rhinoceros* oleh sodium azida relatif lebih lemah dibandingkan dengan penghambatan melanisasi oleh feniltiourea dan sodium dithiokarbamat.

Telah diketahui bahwa proses melanisasi kutikula maupun melanisasi yang terjadi dalam proses enkapsulasi selalu melibatkan fenoloksidase (Ashida & Yamasaki, 1990; Charalambidis *et al.*, 1994b; Marmaras *et al.*, 1994; Cherqui *et al.*, 1996; Marmaras, 1996). Diduga fenomena rokaglamida yang mampu menekan enkapsulasi telur dan larva parasitoid *E. argenteopilosus* (Dono dkk., 2005) terjadi pada tahap penghambatan sintesis protein enzim tersebut atau enzim lain yang berperan dalam proses enkapsulasi. Seperti telah diketahui bahwa enkapsulasi selain melibatkan peranan fenoloksidase juga melibatkan dopa dekarboksilase (DDC) (Marmaras *et al.*, 1996) dan flavin adenin dinukleotida (FAD)-glukosa dehidrogenase (Cox-Foster & Stehr, 1994). Oleh karena itu diperlukan studi mendalam terhadap kedua jenis enzim tersebut.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Perlakuan rokaglamida melalui daun makanan mampu menurunkan kadar protein dan mengakibatkan tidak terbentuknya protein plasma hemolimfa larva *C. pavonana* berbobot molekul 60 kDa serta relatif tidak menghambat aktivitas fenoloksidase. Protein plasma dan fenoloksidase tersebut diasumsikan berperan dalam sistem imunitas larva *C. pavonana* terhadap pradewasa parasitoid *E. argenteopilosus*. Dengan demikian, rokaglamida dapat meningkatkan keberhasilan parasitoid berkembang dalam tubuh larva *C. pavonana*.

Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi jenis dan peranan protein terinduksi pada larva *C. pavonana* terparasit oleh *E. argenteopilosus*. Mekanisme kerja senyawa rokaglamida pada tingkat molekuler

penghambatan sintesis protein juga perlu diteliti lebih lanjut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada Dr. Bambang Wahyu Nugroho, Ir., MSc. (alm) disampaikan terima kasih atas penyediaan senyawa rokaglamidanya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashida, M and HI Yamasaki. 1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. In Ohnishi E and H Ishizaki (eds.). Molting and Metamorphosis. Tokyo: Japan Sci Soc Press; Berlin: Springer-Verlag, pp 239-265.
- Broadway, RM. 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors?. J Insect Physiol 41: 107-116.
- Broadway, RM. 1996. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut protease. Arch Insect biochem physiol 32: 39-53.
- Charalambidis, ND, SN Bournazos, M Lambropoulou, and VJ Marmaras. 1994a. Devense and melanization depend on eumelanin pathway, occur independently and are controled differentially in developing *Ceratitidis capitata*. Insect Biochem Mol Biol 24: 655-662.
- Charalambidis, ND, SN Bournazos, CG Zervas, PG Katsoris, and VJ Marmaras. 1994b. Glycosylation and adhesiveness differentiate *Ceratitidis capitata* tyrosinases. Arch Insec Biochem Physiol 27: 235-248.
- Cherqui, A, B Duvic, and M Brehelin. 1996. Purification and characterization of prophenoloxidase from the haemolymph of *Locusta migratoria*. Arch Insect Biochem Physiol 32: 225-235.
- Cox-Foster, DL and JE Stehr. 1994. Induction and localization of FAD-glucose dehydrogenase (GLD) during encapsulation of abiotic implants in *Manduca sexta* larvae. J Insect Physiol 40: 235-249.
- Çui, B, H Chai, T Santisuk, V Reutrakul, NR Farnsworth, GA Cordell, JM Pezzuto, and AD Kinghorn. 1997. Novel cytotoxic 1H-cyclopenta[b]benzofuran lignans from *Aglaia elliptica*. Tetrahedron 35: 17625-17632.
- Dono, D, D Prijono, S Manuwoto, dan D Buchori. 1998. Pengaruh ekstrak biji *Agalaia harmsiana* Perkins terhadap interaksi antara larva *Crociodolomia binotalis* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) dan parasitoidnya, *Eriborus argenteopilosus* (Cameron)

- (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Bul HPT* 1: 38-46.
- Dono, D, D Prijono, S Manuwoto, D Buchori, Dadang, dan Hasim. 2004. Aktivitas insektisida rokaglamida terhadap larva *Crocidolomia pavonana* (F.) dan imago betina parasitoid *Eriborus argenteopilosus* (Cameron). *Agrikultura* 15(3): 178-184.
- Dono, D, D Prijono, S Manuwoto, D Buchori, Dadang, dan Hasim. 2005. Penghambatan enkapsulasi pradewasa parasitoid *Eriborus argenteopilosus* (CAMERON) oleh larva *Crocidolomia pavonana* (F.) dengan rokaglamida. *Bionatura* 8 (1): 24-38.
- Dumontet, V, O Thoison, OR Omobuwajo, MT Martin, G Perromat, A Chiaroni, C Riche, M Pais, and T Sevenet. 1996. New nitrogenous and aromatic derivatives from *Aglaia argentea* and *A. forbesii*. *Tetrahedron* 52: 6931 - 6942.
- Dunn, PE. 1986. Biochemical aspects of insect immunology. *Ann Rev Entomol.* 31: 321-339.
- Durliat, M. 1991. Coagulation in Crustacea, pp 239-272. *In* Gupta AP (ed.), *Immunology of insects and other arthropods*. New York: CRC Press.
- Gillespie, JP, MR Kanost, and T Trenczek. 1997. Biochemical mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol* 42: 611-643.
- Gupta, AP. 1991a. Insect immunocytes and other hemocytes: roles in cellular and humoral immunity, pp. 19-118. *In* Gupta AP (ed.), *Immunology of Insects and Other Arthropods*. New York: CRC Press.
- Gupta, AP. 1991b. Gap cell junction, cell adhesion molecules, and molecular basis of encapsulation, pp. 133-167. *In* Gupta AP (ed.), *Immunology of Insects and Other Arthropods*. New York: CRC Press.
- Gussregen, B, M Fuhr, BW Nugroho, V Wray, L Witte, and P Proksch. 1997. New insecticidal rocaglamide derivatives from flower of *Aglaia odorata*. *Z Naturforsch* 52C: 339-344.
- Ishibashi, F, C Satasook, MB Isman, and GHN Towers. 1993. Insecticidal 1 H-cyclopentatetra-hydro[b]benzofurans from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry* 32: 307-310.
- Janprasert, J, C Satasook, P Sukumalanand, DE Champagne, MB Isman, P Wiriyaichitra, and GHN Towers. 1993. Rocaglamide, a natural benzofuran insecticide from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry* 32: 67-69.
- Kayser, H. 1985. Pigments, pp. 347-365. *In* Kerkut GA and LI Gilbert (eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. England: Pergamon Press.
- King, ML, CC Chiang, HC Ling, Fujita, Ochiai, and AT McPhail. 1982. X-ray crystal structure of rocaglamide, a novel antileukemic 1H-cyclopenta[b]benzofuran from *Aglaia elliptifolia*. *JSC Chem Commun* 1982:1150-1151.
- Kresze, GB. 1988. Methods for protein determination. *In* Bergmeyer HU, J Bergmeyer, and M Gral (eds.). *Methods of Protein Enzymatic Analysis*. 3rd, voll II. Weinheim (Germany): VCH Verlagsgesellschaft. P 84-99.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Landendorf, NE and MR Kanost. 1991. Bacteria-induced protein p4 (hemolin) from *Manduca sexta*: A member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation. *Arch Insect Biochem Physiol* 18: 258-300.
- Longankumar, K, T Thangaraj, M Manimegalai, M Aruchami, and A Vinayakam. 1996. Latent larval cuticular phenoloxidase in the coconut pest, *Oryctes rhinoceros*. *Arch Insect Biochem Physiol* 33:27-38.
- Marmaras, VJ, ND Charalambidis, and CG Cervas. 1996. Immune response in insect: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Arch Insect Biochem Physiol* 31: 119-133.
- Marmaras, VJ, ND Charalambidis, and M Lambropoulou. 1994. Cellular defense mechanisms in *C. capitata*: Recognition and entrapment of *E. coli* by hemocyte. *Arch Insect Biochem Physiol* 26: 1-14.
- Nappi, AJ, E Vass, Y Carton, and F Frey. 1992. Identification of 3,4-dihydroxyphenylalanine, 5,6-dihydroxyindole, and N-asetylarterenone during eumelanin formation in immune reactive larvae of *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol* 20: 181-191.
- Nugroho, BW, RA Edrada, B Güssregen, V Wray, L Witte, and P Proksch. 1997a. New insecticidal rocaglamide derivatives from *Aglaia duperreana* (Meliaceae). *Phytochemistry* 44: 1455-1461.
- Nugroho, BW, RA Edrada, V Wry, L Witte, M Gehling, and P Proksch. 1999. New insecticidal rocaglamide derivatives and related compound from *Aglaia odorata* (Meliaceae). *Phytochemistry* 51: 367-371.
- Nugroho, BW, B Gussregen, V Wry, L Witte, G Bringmann, and P Proksch. 1997b. New insecticidal rocaglamide derivatives from

- Aglaia eliptica* and *Aglaia harmsiana* (Meliaceae). *Phytochemistry* 45: 1579-1585.
- Ohse, T, S Ohba, T Yamamoto, T Koyano, and K Umezawa. 1996. Cyclopentabenzofuran lignan protein synthesis inhibitors from *Aglaia odorata*. *J Nat Prod* 59: 650-652.
- Pennacchio, F, SB Vinson, Tremblay, and T Tanaka. 1994. Biochemical and developmental alterations of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera, Noctuidae) larvae induced by the endophagous parasitoid *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera, Braconidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 26: 211-233.
- Prijono, D and E Hassan. 1992. Life cycle and demography of *Crociodomia binotalis* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) on broccoli in Laboratory. *Indon J Trop Agric* 4: 18-24.
- Satasook, C, MB Isman, F Ishibashi, S Medbury, P Wiriyachitra, and GHN Towers. 1994. Insecticidal bioactivity of crude extracts of *Aglaia* species (Meliaceae). *Biochem System Ecol* 22: 121-127.
- Steel, RGD and JH Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistik: Suatu Pendekatan Biometrik. Alihbahasa Bambang Sumantri. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Stoltz, DB and D Guzo. 1986. Apparent haemocytic transformations associated with parasitoid-induced inhibition of immunity in *Malacosoma distriae* larva. *J Insect Physiol* 32: 377-388.
- Sudarmo, D Prijono, S Manuwoto, dan D Buchori. 2001. Selektivitas ekstrak ranting *Aglaia odorata* Lour. (Meliaceae) terhadap *Crociodomia binotalis* Zeller dan *Eriborus argenteopilosus* (Cameron). *Hayati* 8: 112-116.
- Sugumaran, M, LB Giglio, H Kundzicz, S Saul, and S Semensi. 1992. Studies on the enzymes involved in puparial cuticle sclerotization in *Drosophila melanogaster*. *Arch insect Biochem Physiol* 19: 271-283.
- Sun, SC, I Lindstrom, HG Boman, I Faye, and O Schmidt. 1990. Hemolin: An insect immunoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science* 250: 1729-1732.