



**Mekanisme Infeksi *Spodoptera litura* Multiple  
Nucleopolyhedrosis Virus (SpLtMNPV) Pada Sel Line Epithel  
Usus Ulat Grayak (*Spodoptera litura*)**

Dra. Mahanani Tri Asri, M.Si.  
Guntur Trimulyono, S.Si., M.Sc.

Dibiayai melalui DIPA Universitas Negeri Surabaya  
Nomor: 0110/023-04.2/XV/2010 tanggal 31 Desember 2009,

Sesuai Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian  
Nomor :120/H38.11.4/KU.05.16/2010 tanggal 26 April 2010

DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI  
DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam/Jurusan Biologi  
UNIVERSITAS NEGERI SURABAYA  
2010

## DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
RINGKASAN .....	iv
PRAKATA .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan masalah.....	2
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	3
A. Tinjauan Ulat Grayak ( <i>Spodoptera litura</i> ).....	3
B. Tinjauan <i>Spodoptera litura Multiple Nucleaopolyhedrosis</i> <i>Virus</i> (SpLtMNPV) .....	4
1. Struktur SpLtMNPV .....	4
2. Mekanisme dan Gejala Infeksi.....	5
3. Mekanisme reproduksi baculovirus terutama NPV dalam sel inang....	6
C. Tinjauan Tentang Kultur Sel Line pada Insekta .....	11
D. Penelitian Pendahuluan yang pernah dilakukan.....	11
<b>III. TUJUAN DAN MANFAAT</b> .....	15
A. Tujuan.....	15
B. Manfaat.....	15
<b>IV. METODE PENELITIAN</b> .....	16
A. Tempat dan Waktu Penelitian .....	16
B. Jenis Penelitian.....	16
C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel Penelitian .....	16
1. Variabel Penelitian.....	16
2. Definisi Operasional Variabel Penelitian.....	16
D. Alat dan Bahan .....	16
1. Alat .....	16

2. Bahan .....	17
D. Cara Kerja.....	17
1. Pembiakan <i>S. litura</i> .....	17
2. Pembuatan sel line dari sel epitel usus <i>S. litura</i> instar 5.....	17
3. Teknik perbanyak dan pemurnian virus secara <i>in vivo</i> .....	18
4. Persiapan virus sebelum penginfeksian secara <i>in vitro</i> .....	19
5. Teknik penginfeksian sel menggunakan SpLTMNPV .....	19
6. Persiapan pemotretan sel terinfeksi .....	19
7. Proses pengeblokan sampel menggunakan SPURR.....	20
<b>V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>23</b>
A. Pembuatan kultur sel line epitel usus larva <i>S. litura</i> dari sel primer .....	23
B. Penginfeksian sel line epitel usus larva <i>S. litura</i> dengan SpLTMNPV <i>in vivo</i> yang telah dipecah polihedronya.....	24
C. Mekanisme infeksi SpLTMNPV dalam sel line epitel usus larva <i>S. litura</i> .....	25
1. Tahap pertama: pelekatan virus pada sel inang .....	25
2. Tahap kedua: penetrasi dan pelepasan selubung di sitoplasma .....	27
3. Tahap ketiga: biosintesis komponen virus (stroma virogenik) .....	30
4. Tahap keempat: perakitan komponen virus .....	32
5. Tahap kelima: pelepasan SpLTMNPV .....	33
<b>VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>36</b>
A. Kesimpulan .....	36
B. Saran .....	37
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>38</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>40</b>

**HALAMAN PENGESAHAN  
LAPORAN AKHIR PENELITIAN FUNDAMENTAL**

1. Judul : Mekanisme Infeksi *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (SpLtMNPV)  
Pada Sel Line Epithel Usus Ulat Grayak (*Spodoptera litura*)

2. Ketua

2.1. Data Pribadi

a. Nama Lengkap : Dra. Mahanani Tri Asri, M.Si.  
b. Jenis Kelamin : P  
c. NIP/Golongan : 196707241992032002/4a  
d. Jabatan Struktural :  
e. Srata/Jab. Fungsional : S2/Lektor kepala  
f. Fakultas/Jurusan : FMIPA/Biologi  
g. Bidang Ilmu : Mikrobiologi  
h. Alamat Kantor : Kampus Unesa Jl. Ketintang Surabaya  
i. Telepon/Faks/E-mail : (031) 8298382/(031) 8298382  
j. Alamat Rumah : Jl. Karah IV No. 30 E Surabaya  
k. Telepon/Faks/E-mail : (031) 8297267

2.2. Matakuliah yang diampu dan jumlah SKS

a. Matakuliah I : Mikrobiologi Dasar 3 sks  
b. Matakuliah II : Mikrobiologi Terapan 3 sks  
c. Matakuliah III : Mikologi 2 sks  
d. Matakuliah IV : Biologi Umum 3 sks

2.3. Penelitian Terakhir

a. Judul Penelitian I : Patogenesis SpLtMNPV in vitro pada larva *S. litura* instar 3 skala laboratorium, Green house dan lapang terbatas.  
b. Judul Penelitian II : Upaya perbanyak SpLtMNPV sebagai bioinsektisida secara in vitro dengan teknik kultur sel insekta.  
c. Judul Penelitian III : Resistensi larva *S. litura* yang diinfeksi SpLtMNPV dan *B. bassiana* selama beberapa generasi.  
d. Judul Penelitian IV : Efektifitas SpLtMNPV yang disinari dengan sinar matahari pada berbagai lama waktu penyinaran terhadap lama hidup larva *S. litura* yang terinfeksi.

3. Lokasi Penelitian

: Lab. Mikrobiologi dan Kultur Jaringan Jurusan Biologi FMIPA UNESA, Ballitas Malang, Lembaga Eijkman Jakarta

4. Jangka Waktu Penelitian

: 8 bulan

5. Pembayaran

: Biaya diajukan ke DIKTI

Biaya dari Instansi lain

- Biaya Tahun ke-1 Rp. 28.500.000,-

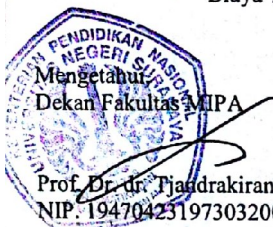
Rp.

- Biaya Tahun ke-2 Rp.

Rp.

Rp.

Rp.

  
Mengetahui  
Dekan Fakultas MIPA  
Prof. Dr. dr. Tjandrakirana, M.S., Sp.And.  
NIP. 194704231973032001

Surabaya, 15 November 2010  
Ketua Peneliti,

  
Dra. Mahanani Tri Asri, M.Si.  
NIP. 196707241992032002

  
Mengetahui  
Ketua Lembaga Penelitian  
Prof. Dr. dr. Yulianto, M.Pd.  
NIP. 196007241973031003

# **Mekanisme Infeksi *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (SpLtMNPV) Pada Sel Line Epithel Usus Ulat Grayak (*Spodoptera litura*)**

## **Ringkasan**

*Spodoptera litura* merupakan hama tanaman pertanian yang sulit diberantas karena sudah mulai kebal dengan insektisida kimia. Oleh karena itu sekarang dikembangkan insektisida biologi diantaranya adalah dengan menggunakan Virus. Hama ini bisa dikendalikan dengan menggunakan musuh alaminya yaitu *Spodoptera litura Multiple Nucleopolyhedrosis Virus*. Virus ini terbukti dapat mematikan inangnya dengan gejala tubuhnya lunak dan bila disentuh akan hancur mengeluarkan cairan yang berisi virus. Berdasarkan kenyataan tersebut memunculkan pertanyaan bagaimana mekanisme SpLtMNPV dalam menginfeksi sel sehingga ulat dapat mati hancur.

Penelitian ini merupakan penelitian observasional, yaitu untuk mengamati mekanisme infeksi dari SpLtMNPV pada sel epithel usus larva *S. litura* secara *in vitro* yaitu menggunakan sel line epithel usus *S. litura*. Sel line monolayer diinfeksi dengan SpLtMNPV dan diinkubasi selama 6 jam dan 24 jam. Mekanisme infeksi diamati dengan bantuan mikroskop elektron transmisi (TEM).

Hasil pemotretan TEM menunjukkan bahwa mekanisme SpLtMNPV dalam menginfeksi sel dilakukan dalam 5 tahap yaitu: tahap 1: penempelan SpLtMNPV pada membran inang yang cocok, tahap 2: penetrasi dan pembentukan saluran serta pelepasan selubung, tahap 3: biosintesis komponen-komponen virus dalam inti sel, tahap 4: tahap perakitan dari komponen-komponen virus yang sudah dibentuk dan tahap 5: pelepasan MNPV/*multiplenucleocapsid* melalui penguncupan/*budding* dan selanjutnya SpLtMNPV bebas berada di dalam medium untuk menginfeksi sel lain yang peka.

## PRAKATA

Alhamdulillahirobbil'alamin, puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang, pada-Nyalah tempat untuk bergantung, memohon pertolongan dan petunjuk sehingga penulis diberi kemudahan dan dapat melalui segala kesulitan dalam melakukan penelitian maupun penyusunan laporan ini.

Penelitian dengan judul “Mekanisme Infeksi *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (SpLtMNPV) Pada Sel Line Epithel Usus Ulat Grayak (*Spodoptera litura*)” telah dilakukan dan disusun menjadi sebuah laporan penelitian agar dapat dipergunakan sebagai mana mestinya. Besar harapan kami, hasil dari penelitian ini dapat memberikan sumbangsih terhadap ilmu pengetahuan terkait dengan informasi ilmiah yang diperoleh dari penelitian ini.

Kami dalam melakukan penelitian dan penyusunan laporan banyak mendapatkan dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karenanya dengan ketulusan hati yang mendalam kami menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Bambang Yulianto, M.Pd, selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Negeri Surabaya yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian.
2. Prof. Dr. dr. Tjandrakirana, MS, Sp.And, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya yang telah memberikan dukungan yang besar sehingga penelitian dapat terlaksana.
3. Dra. Wisanti, M.S. selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Surabaya yang telah memberikan ijin pada penulis untuk meneliti dan menggunakan sarana dan prasarana yang ada di jurusan untuk terlaksananya penelitian ini.
4. Dra. Yuliani, M.Si, selaku Ketua Laboratorium Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Surabaya yang telah memberikan banyak kemudahan dalam penggunaan laboratorium sehingga penulis dapat melakukan penelitian sesuai dengan waktu yang ditetapkan .
5. Pihak-pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu.

Kami menyadari dengan segala kerendahan hati atas keterbatasan kami sehingga hasil penelitian ini mungkin masih jauh dari sempurna, meskipun demikian kami sangat mengharapkan penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut. Semoga hasil dari penelitian ini dapat bermanfaat.

Surabaya,

Tim Peneliti

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Struktur SpLtMNPV.....	5
Gambar 2.	Interaksi virus dengan sel ( <i>chitin binding domains</i> ) .....	7
Gambar 3.	Mekanisme Infeksi NPV .....	9
Gambar 4.	Proses pembuatan sel line.....	17
Gambar 5.	Diagram perbanyak dan pemurnian virus secara <i>in vitro</i> .....	18
Gambar 6.	Diagram persiapan virus sebelum diperbanyak secara <i>in vitro</i> .....	19
Gambar 7.	Diagram penginfeksian sel menggunakan SpLtNPV .....	19
Gambar 8.	Sel epitel usus larva <i>S. Litura</i> .....	23
Gambar 9.	Mikrofili yang terdapat di tepi membran sel epitel usus larva <i>S. litura</i> .....	24
Gambar 10.	Gambar sel epitel usus.....	25
Gambar 11.	Pengenalan <i>multiple nucleocapsid</i> pada membran sel ephitel usus larva <i>S. Litura</i> .....	26
Gambar 12.	Membran sel terlihat melekok ke dalam (invaginasi) .....	26
Gambar 13.	Pembentukan saluran pada membran sel untuk menyalurkan MNPV.....	28
Gambar 14.	Pelepasan <i>envelope</i> MNPV.....	28
Gambar 15.	Sel yang terinfeksi virus tetapi belum menyerang inti sel sehingga inti selnya masih terlihat utuh .....	29
Gambar 16.	Biosintesis komponen virus (pembentukan viroplasma/stroma virogenik).....	30
Gambar 17.	<i>Multiplynucleocapsid</i> di sitoplasma .....	32
Gambar 18.	Proses perakitan dari <i>nucleocapsid</i> menjadi <i>multiple nucleocapsid</i> .....	32
Gambar 19.	Mekanisme pelepasan <i>multiplynucleocapsid</i> pada sel epitel usus larva <i>S. litura</i> .....	34
Gambar 20.	Pembentukan <i>polyhedra</i> dari membran inti sel dan membran sel inang .....	34
Gambar 21.	<i>Polyhedra</i> SpLtMNPV keluar dari sel inang.....	34
Gambar 22.	<i>Polydedra inclusion bodies</i> dari SpLtMNPV setelah keluar dari sel inang .....	34

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Daftar Riwayat Hidup Anggota Tim Peneliti .....	40
---	----

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Penelitian ini merupakan penelitian dasar yang mengkaji mekanisme masuknya SpLtMNPV pada sel inang sampai virus tersebut keluar dari sel inang dan sel inang menjadi lisis dan mati. Akan tetapi pada penelitian awal kami melakukan pemotretan pada inkubasi virus di sel inang dalam waktu 24, 48, dan 72 jam yang waktu tersebut sesuai dengan kajian teori bahwa virus melakukan siklus reproduksi lengkap pada sel inang (*in vivo*) selama 72 jam. Akan tetapi, temuan yang diperoleh ternyata siklus reproduksi virus secara *in vitro* hanya 24 jam sehingga dalam penelitian ini kami ingin mencari bukti empiris (foto) tentang tahapan perkembangan virus dalam sel inang yang meliputi tahap:(1)pelekatan pada membran sel inang yang cocok dan absorpsi pada membran sel inang, (2) penetrasi dan pelepasan selubung di sitoplasma, (3) reproduksi/replikasi dan biosintesis komponen virus di inti sel, (4) perakitan komponen virus, dan (5) pelepasan virus dari sel inang. Setiap tahap ini diharapkan akan diperoleh dengan jalan memotret virus dalam tahapan inkubasi yang berbeda yaitu 6 dan 24 jam. Pemotretan dilakukan di lembaga Eigmment Jakarta dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi (TEM)

Aspek-aspek yang diamati pada foto/gambar yang diperoleh dari hasil pemotretan TEM adalah setiap tahap reproduksi virus yang dimulai dengan (1) pelekatan pada membran sel inang yang cocok dan absorpsi pada membran sel inang, (2) penetrasi dan pelepasan selubung di sitoplasma, (3) reproduksi/replikasi dan biosintesis komponen dengan terlihatnya daerah yang disebut stroma virogenik di dalam sel, (4) perakitan komponen virus, dan (5) pelepasan virus dari sel inang. Kemudian akan dikolaborasi dengan kajian teoritik tentang siklus reproduksi virus secara *in vivo*.

Mekanisme infeksi ini perlu diketahui untuk memperkirakan kapan dan berapa lama virus tersebut bereplikasi serta menghancurkan sel. Hal ini penting untuk diketahui terutama jika kita ingin memperkirakan berapa waktu yang dibutuhkan oleh sel yang terinfeksi menjadi hancur lebih luasnya organ terinfeksi kapan menjadi rusak sehingga bisa memperkirakan waktu yang diperlukan untuk

meluasnya penyakit yang ditimbulkan oleh virus ini. Lebih jelasnya lagi kalau virus ini dibiakkan secara *in vitro* untuk tujuan produksi virus skala besar sebagai bioinsektisida maka dengan pengetahuan ini dapat diketahui waktu produksi virus yang tepat sehingga efisiensi waktu dan biaya dapat diraih.

### **B. Rumusan masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat di buat suatu rumusan masalah: “Bagaimanakah mekanisme infeksi *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (SpLtMNPV) pada sel line epitel usus ulat grayak (*Spodoptera litura*) yang dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi?”

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### E. Tinjauan Ulat Grayak (*Spodoptera litura*)

Ulat *S. litura* yang dikenal sebagai ulat grayak atau ulat tentara merupakan serangga hama polifag yang memiliki daerah penyebaran cukup luas di dunia. Daerah penyebarannya yaitu: Pakistan, India, Indonesia, Malaysia, Thailand dan juga sampai ke Australia dan Kepulauan Pasifik (Harahap dan Budi, 2003). Serangga hama ini dapat merusak tanaman sejak fase vegetatif hingga fase generatif. Imago berbentuk ngengat berwarna kecoklatan dengan panjang tubuh antara 14-17 mm dan rentang sayapnya antara 35-45 mm. Hama ini aktif di malam hari dan pada siang hari bersembunyi di tempat-tempat gelap. Sebagai serangga polifag, perkembangan siklus hidup *S. litura* termasuk metamorfosis sempurna (holometabola) yaitu terdiri atas stadia telur, larva, pupa, dan imago. Telur *S. litura* berwarna putih kekuningan, berbentuk bulat dengan garis tengah 0,5 mm. (Rukmana dan Sugandi, 1997).

Larva *S. litura* yang panjangnya  $\pm 1$  mm memiliki warna hijau bening dengan kepala berwarna hitam. Perilaku hidup larva *neonate* hingga menjadi larva instar kesatu masih tetap berkelompok, tetapi 2-3 hari berikutnya mulai menyebar ke berbagai bagian tanaman, terutama daun. Larva instar ketiga hingga keenam memiliki kulit halus dengan corak warna kombinasi antara merah dan kuning disertai garis memanjang berwarna hijau dan garis hitam melintang pada bagian mesotoraks. Sebagai serangga hama pemakan daun (*defoliator*), pertumbuhan larva *S. litura* terdiri atas enam instar yang masing-masing memiliki ukuran tubuh berbeda-beda, dengan total lama stadia larva mencapai sekitar 10 - 12 hari (Chari dan Patel, 1983 *cit.* Indrayani, 2003).

Periode pupa diawali dengan periode prepupa yang masih dalam bentuk ulat hanya aktivitas makannya saja yang berkurang dan cenderung membenamkan diri dalam tanah. Lama periode prepupa 2 - 4 hari (Kurniawati, 2001). Sudarmo (1987), menjelaskan bahwa pupa atau kepompong berwarna kemerahan, panjang berkisar 16 - 20 mm, pada bagian ekor pupa apabila disentuh bergerak-gerak, berada dalam tanah selama 8 - 10 hari. Imago *S.*

*litura* berupa ngelat berwarna kecoklatan. Pada sayap depan terdapat bercak-bercak hitam dan putih dengan garis bergelombang yang berwarna kuning sedangkan sayap belakang berwarna putih (Harahap dan Budi, 2003).

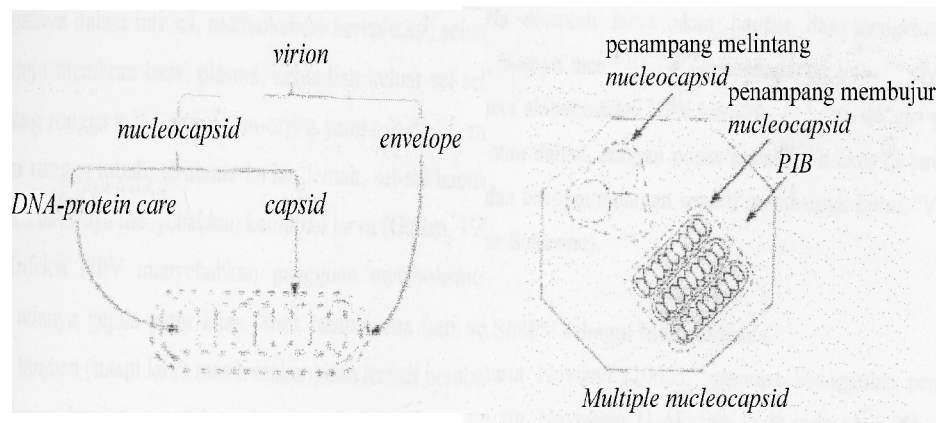
## **F. Tinjauan *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (SpLtMNPV)**

*Nuclear Polyhedrosis Virus* (NPV) adalah patogen serangga obligat yang dimanfaatkan untuk mengendalikan populasi serangga. Cara penularan virus NPV yang termasuk dalam famili Baculoviridae, genus Baculovirus ini hanya terjadi melalui saluran pencernaan serangga inangnya (Gothamaet *al.*, 1994).

### **1. Struktur SpLtMNPV**

SpLtMNPV adalah salah satu jenis virus yang termasuk dalam golongan virus DNA, menyerang *Spodoptera litura* dan lebih dikenal dengan NPV, memiliki pita DNA ganda yang terbungkus mantel protein (kapsid) dan disebut nukleokapsid. Nukleokapsid mempunyai sifat infeksi terhadap serangga. Selanjutnya nukleokapsid ini masih dibungkus lagi dengan lapisan/amplop dan disebut virion. Virion ini ada dua macam yaitu virion dengan satu nukleokapsid disebut *Nucleocapsid Single-Enveloped* (NSE) dan virion yang mempunyai lebih dari satu nukleokapsid disebut *Nucleocapsid Multiple-Enveloped* (NME) (Gothamaet *al.*, 1994). Pada penelitian ini yang dipakai adalah yang NME sehingga disebut *Multiple nucleopolyhedrosis virus*.

Virion-virion tersebut umumnya membentuk kristal dan diliputi oleh matrik protein, berbentuk segi banyak dan disebut *Polyhedral Inclusion Body* (PIB). Umumnya konsentrasi PIB ini digunakan sebagai ukuran dalam inokulasi NPV pada inang percobaan dan struktur SpLtMNPV ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Struktur SpLtMNPV(Bilimoria, 1986 *cit.* Wahyuni, 2002).

## 2. Mekanisme dan Gejala Infeksi

Secara umum NPV/SpLtMNPV menginfeksi inang pada stadium larva melalui saluran pencernaan. Pada sebagian besar inang Lepidoptera, NPV menyebabkan infeksi sistemik karena replikasinya dilakukan pada sejumlah jaringan dan organ tubuh inang, terutama badan lemak, matrik trakhea, dan haemosit (sel darah).

Mekanisme infeksi NPV umumnya terjadi melalui kontaminasi pakan. SpLtMNPV setelah masuk ke dalam usus tengah larva, sifat basa (pH 9,5–11,5) dari usus tengah larva menyebabkan PIB terurai dan melepaskan virion. Pada tahap pertama, virion yang terlepas tersebut menembus membran peritrofik usus tengah, selubung nukleokapsid (amplop) lepas sehingga tinggal nukleokapsid. Proses selanjutnya adalah pinositosis, yaitu masuknya nukleokapsid melalui mikrovili ke dalam usus tengah untuk memulai infeksi. Di dalam sel usus tepatnya dalam inti sel, *nucleocapsid* bereplikasi, selanjutnya *nucleocapsid* ke luar dari inti menuju membran basal plasma, kemudian ke luar sel sehingga sel hancur. Tahap kedua menyerang rongga tubuh dan organ-organ yang ada di dalamnya. Virion menyerang jaringan di dalam rongga tubuh, terutama badan lemak, sel-sel haemosit (sel darah), matrik trakhea, yang pada akhirnya menyebabkan kematian larva.

Infeksi NPV menyebabkan gangguan metabolisme pada larva yang ditunjukkan dengan adanya gejala yang khas. Satu sampai dua hari setelah

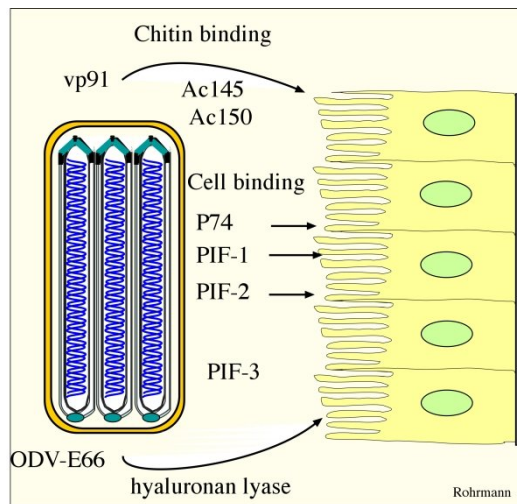
terinfeksi, aktivitas larva menjadi lamban (tetapi larva masih makan) dan terjadi perubahan warna pada tubuhnya. Pada infeksi lanjut, bagian ventral larva berwarna coklat kemerahan, kulit menjadi mengkilat dan lembek, bila disentuh larva akan hancur dan mengeluarkan cairan berwarna coklat kemerahan, baunya menyengat dan mengandung jutaan *polyhedral*. Pada kondisi lapangan, kematian larva akibat infeksi NPV biasa ditunjukkan dengan gejala tubuh larva menggantung pada daun atau dahan, dengan posisi kepala dan ekor di bawah dan kedua kaki abdominal melekat pada bagian tanaman seperti membentuk huruf “V” terbalik (Ignoffo dan Couch, 1981 *cit.* Setiawan, 2003).

### 3. Mekanisme reproduksi baculovirus terutama NPV dalam sel inang yaitu sel epitel usus/midgut inang (Rohrmann, 2008).

Pada tahap pertama infeksi virus pada sel adalah penempelan selubung virus pada lapisan khitin yang ada di sel epitel usus larva. Proses ini diawali dengan dihancurkan *polyhedral* virus secara *in vitro*, maka *multiplenucleocapsid* atau disebut juga dengan ODV (*occlusion-derived-virus*) akan mendekati sel epitel usus larva dengan cara terjadi interaksi pada selubung protein dari *multiplenucleocapsid* berupa vp91 (*viral protein*) dengan sel *midgut*. VP91, Ac145 dan Ac150 dari virus semuanya memiliki tempat pengikatan kitin (*chitin binding domains*) yang menunjukkan bahwa mereka dapat berinteraksi dengan sel penghasil kitin termasuk sel epitel kolumnar dari *midgut* serangga yang dikultur. P74, PIF-1 (*per os (oral) infectivity factors*) dan -2 pada *envelope* juga berperan untuk berikatan dengan sel epitel *midgut*. Peran PIF-3 tidak diketahui. *Multiplenucleocapsid-E66* memiliki aktivitas enzimatis (*lyase hyaluronan*) yang dapat membantu dalam memulai infeksi.

Meskipun PIF-3 merupakan protein pada ODV, protein tersebut tampaknya tidak terlibat dalam pengikatan spesifik dan fungsinya tidak diketahui. Walaupun telah dikemukakan bahwa ODV dapat berikatan dengan *proteinase reseptor* yang sensitif dan sekali terikat, amplop ODV berfusi dengan membran sel epitel dan melepaskan nukleokapsid ke dalam

sitoplasma sel. Kitin berikatan dengan 2 protein virus yaitu protein Ac145 dan Ac150 (Ac protein = protein pada *Autografa californica* virus) memiliki sifat yang mirip dengan protein PIF yaitu diperkirakan untuk mengenali kode tempat pengikatan pada sel. Selain itu Ac83 (VP91) sebuah protein virion struktural juga diperkirakan untuk mengenali kode dari tempat pengikatan yang spesifik pada kitin. Ada dua kemungkinan interaksi yang melibatkan pengikatan kitin yang mungkin terjadi selama infeksi di *midgut* yaitu yang pertama kitin diikat oleh Ac185 dan Ac150 atau dikenali oleh Ac83 (VP91).



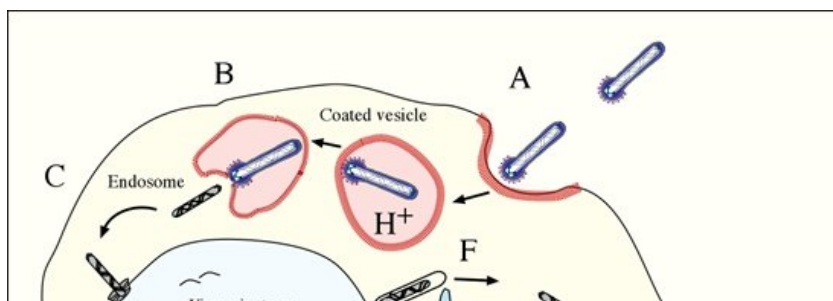
Gambar 2. Interaksi virus dengan sel (*chitin binding domains*) (Rohrmann, 2008)

Tahap kedua yaitu penetrasi virus/masuknya virus ke sitoplasma. Pada sel insekta dan vertebrata masuknya virus diperantarai oleh GP64 (Glicoprotein64) melalui proses *endocytosis* yang diperantarai oleh 'chlathrin' (*clathrin-mediated*), 'clathrin' menjadi terkonsentrasi di lekukan atau lubang pada permukaan membran plasma. Virus umumnya melekat pada reseptor inang yang mengandung sinyal internal dan setelah reseptor ini berikatan dengan protein penyerangan virus sel terangsang untuk melekukkan membran selnya ke dalam sitoplasma (invaginasi, endositosis). Lekukan ini menyerupai vesikula yang disebut *vesikula endosome* atau *endocytic*. Di dalam vesikula virus diasamkan yang menyebabkan protein fusi virus mengubah konformasi yang mengakibatkan penggabungan amplop virus dengan membran endosome. Penggabungan ini

mengakibatkan pori membran sel terbuka dan *nucleocapsid* dapat masuk dalam sitoplasma sel.

Pada tahap ketiga yaitu Biosintesis komponen virus. Proses ini diawali dengan masuknya *nucleocapsid* ke inti sel melewati pori membran inti dan melalui proses yang disebut polimerisasi aktin. Nucleocapsid ini diangkut melalui pori-pori membran inti sebagai nukleokapsid kosong karena DNA-nya telah disuntikkan melalui pori-pori membran inti sel. Kompleks pori pada membrane inti menyerupai saluran sepanjang 38 nm. Virion dari baculovirus (SpLtMNPV) mempunyai diameter 30-60 nm, dengan panjang 250-300 nm. Setelah di dalam inti, peristiwa transkripsi dan replikasi dimulai untuk membentuk material genetik virus dan protein virus. Pada akhirnya menghasilkan nukleokapsid. Komponen-komponen virus hasil dari replikasi dan transkripsi berada dalam daerah yang disebut stroma virogenik, di daerah ini tampaknya terdiri dari DNA dan protein-protein selubung dengan letak DNA yang terkonsentrasi dengan jelas (tersendiri) dibatasi oleh ruang intrastromal, ruang ini nantinya akan digunakan sebagai tempat perakitan virion. PP31 (Ac36) terkait dengan pembentukan stroma virogenik karena dengan tidak adanya Ac36 akan menurunkan tingkat transkripsi dari beberapa gen sampai semua transkripsi gen berakhir (transkripsinya berhenti).

Tahap keempat yaitu perakitan komponen virus. Setelah nukleokapsid dibentuk dalam inti sel epitel *midgut*, untuk memperoleh selubung protein, *nucleocapsid* keluar dari nukleus dan memperoleh selubung dari membran inti. Pada selubung ini setidaknya berisi satu protein virus, yaitu GP16. Akan tetapi selubung ini hilang selama melalui sitoplasma. Sedangkan protein-protein penyusun selubung (kedua) ditempelkan dan menumpuk pada membran plasma.



Tahap kelima yaitu pelepasan virus. Pelepasan virus terjadi melalui penguncupan. Pada proses ini *nucleocapsid* akan mendapatkan selubungnya dari membran sel inang.

Pada virus lain, misalnya anggota Kelompok II NPVs yang kehilangan/tidak punya gp64 (glycoprotein 64), membrannya mungkin dimodifikasi oleh homolog protein F (Protein aktin-filamen). Modifikasi membran sel inang oleh GP64 diperlukan untuk penguncupan virus dan ditujukan untuk infeksi sekunder. Distribusi GP64 dalam sel *midgut* awalnya ditemukan pada larva *Trichoplusia ni* yang terinfeksi AcMNPV pada daerah basal dan lateral dari sel. Hal ini ditargetkan virion untuk tempat bertunas yang lokasinya jauh dari lumen usus dan mendekat ke jaringan lain yang rentan, termasuk sel-sel tetangga. Selain itu adanya vfgf (*virus fibroblas growth factor*) yang dihasilkan oleh sel yang terinfeksi juga memainkan peran dalam penyebaran virus terutama dalam sel serangga inang dengan cara menarik sel lain yang rentan menuju sel yang terinfeksi dan mensekresi vfgf sehingga memfasilitasi penyebaran infeksi.

Pada beberapa virus terutama virus yang *multiplenucleocapsid* (seperti SpLtMNPV), mereka dapat menginfeksi sel *midgut* tanpa melakukan replikasi. Dalam beberapa keadaan *nucleocapsid* dapat masuk ke

dalam sel-sel usus dan menyebar ke sel-sel rentan lain, tanpa replikasi, *nucleocapsid* yang masuk kesitoplasma langsung melakukan penguncupan yang mengarah ke *hemolymph*, atau ke sel trakea. Ini mungkin sebuah mekanisme untuk mempercepat infeksi sistemik dan menghindari replikasi dalam sel usus yang nantinya akan mengelupas dan dikeluarkan dari serangga. Ekspresi gen gp64 dapat mempersiapkan membran sel untuk *budding*/menguncup dari beberapa *nucleokapsid* dan dapat langsung berpindah ke sel lain tanpa mengalami replikasi. Selain itu GP64 atau bentuk aktif dari protein F, diperlukan untuk infeksi sekunder. GP64 merupakan selubung protein yang tugasnya untuk berfusi dengan sel inang, diperlukan untuk proses keluar dari sel, dan terlibat dalam memulai infeksi ke sel lain karena berfungsi sebagai faktor penyerangan

Peristiwa ini hanya berlaku untuk jenis MNPV virus karena tergantung pada sekelompok *nucleocapsid* yang masuk secara bersamaan dalam menginfeksi sel tunggal, setelah itu mereka terpisah di sitoplasma dan beberapa memasuki inti untuk menjalani replikasi seperti biasanya. Material genetik virus yang bereplikasi akan mensintesis GP64 awal untuk mempersiapkan tunas pada membran sel dan *nucleokapsid* yang tidak bereplikasi dapat langsung transit melalui sel. Teori ini rumit oleh karena kurangnya pemahaman tentang jenis morfologi virion MNPV yang tidak memiliki gen penentu/*determinant genetic*.

Sel insekta (Lepidoptera) yang terinfeksi oleh NPVs intinya akan mengalami reorganisasi yaitu akan berkembang sedemikian rupa sehingga mereka mengisi sebagian besar volume sel. Telah dihitung bahwa diameter Sf-9 (*Spodoptera frugiperda*) sel dapat meningkat hingga 1,45 kali lipat selama infeksi (membentuk "*Giant cell*"). Reorganisasi ini disebabkan oleh adanya gerakan dan konsentrasi aktin dalam inti sel. P10 juga dapat berkontribusi untuk reorganisasi *cytoskeletal* karena berinteraksi dengan tubulin dan mungkin terlibat dalam memodifikasi mikrotubulus. Polimerisasi pada aktin intidiperlukan untuk koordinasi pembentukan *nucleocapsid* termasuk asosiasi yang tepat antara ODV dengan amplopselain itupolimerisasi aktin juga dapat memfasilitasi gerakan

*nucleocapsid* melalui sitoplasma. Proses ini dibantu oleh protein struktural virion dari *nucleocapsid* yaitu PP78/83.

Selain mekanisme infeksi virus terutama baculovirus di atas ada tahapan reproduksi virus secara umum dalam sel inang terdiri atas 5 tahap yaitu:

- a. Pelekatan pada sel inang yang cocok dan adsorpsi
- b. Penetrasi virus ke sel inang dan pelepasan selubung
- c. Replikasi dan biosintesis komponen virus
- d. Perakitan komponen virus
- e. Pembebasan/pelepasan virus

### **G. Tinjauan Tentang Kultur Sel Line pada Insekta**

Kultur sel insekta mulai dikembangkan sekitar akhir 1950 dengan tujuan untuk mempelajari insekta. Perkembangan selanjutnya kultur sel insekta tidak hanya untuk mempelajari sel insekta dengan kultivasi tetapi juga untuk menumbuhkan dan mengembangkan virus sebagai bioinsektisida (Goosenet *al.*, 1993) karena virus untuk hidupnya membutuhkan sel hidup (Pelczar dan Chan, 1986)

Sel pada awalnya ditumbuhkan secara stationer pada cawan kultur. Vaughen (1968) melaporkan pada tahun 1967 telah berhasil pertama kali menumbuhkan sel insekta di dalam suspensi. King *et al.*, 1990 telah berhasil menumbuhkan sel insekta di dalam kultur suspensi. Kepadatan maksimum untuk sel insekta adalah  $4 \times 10^6$  sel / ml tetapi kepadatan sampai dengan  $10^7$  masih terjangkau. Beberapa macam sel seperti sel-sel nyamuk *Aedes albopictus* dapat tumbuh di dalam suspensi. Hink (1982) telah memelopori kultur sel insekta dari jenis ulat pada kubis (*Trichoplusia ni*, TN-368) untuk menghasilkan *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcNPV).

### **H. Penelitian pendahuluan yang pernah dilakukan**

Penelitian pendahuluan yang pernah dilakukan oleh peneliti maupun ahli virus yang lain adalah: (1) SpltMPNV yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari hasil uji berbagai virus lokal di Indonesia dan yang terbaik berasal

dari Pulau Jawa dan telah dikarakterisasi gen polyhedrinnya yaitu total mengandung 747 nukleotida yang mengkode 249 asam amino (Wahyuni, 2002). (2) Virus ini juga telah diuji patogenesisnya terhadap larva *S. litura* instar 3 dengan dosis efektif (mampu mematikan ulat antara 80 – 90%)  $2 \times 10^6$  PIBs/ml di laboratorium (Asri dan Isnawati, 2005). (3) Sedangkan untuk mengendalikan ulat yang sama pada tanaman jarak di *greenhouse* dosis efektifnya adalah  $2 \times 10^7$  PIBs/ml (Asri, *et al.*, 2007) (4) Oleh karena Virus ini efektif maka penelitian dilanjutkan dengan menguji ketahanannya terhadap radiasi UV terutama apabila akan diterapkan di lapang. Berdasarkan penelitian Mulyani (2005) SpltMNPV ternyata “toleran” terhadap radiasi UV tipe C di laboratorium (panjang gelombang 290–320 nm, yang mempunyai kemampuan merusak paling tinggi karena dapat mencapai gen virus), radiasi 17 jam hanya menurunkan patogenesis sebesar 22,5% dan pada radiasi 13 jam patogenesisnya hanya turun 2,5%. Keuntungan terkenanya SpltMNPV oleh radiasi UV-C adalah dapat mempercepat waktu kematian ulat (hari ke-1 setelah perlakuan mortalitas larva mencapai 37,5%). (5) Walaupun demikian berdasarkan penelitian Kristiningsih (2006) *SpLtNPV* hasil pembiakan secara *in vivo* yang diradiasi UV-C (di laboratorium) dan diradiasi sinar matahari terlihat adanya penurunan patogenesis seiring dengan lamanya radiasi yaitu patogenesis terendah pada radiasi UV sinar matahari selama 3 hari. (6) Penelitian dilanjutkan dengan meradiasi *SpLtMNPV* pada paparan sinar matahari langsung dalam kurun waktu yang berurutan yaitu 12 jam, 24 jam, dan 36 jam, lama hidup larva semakin meningkat dari 3 hari menjadi 5 hari berarti tingkat patogenesis virus semakin menurun setelah terkena paparan sinar matahari langsung (Isnawati dan Asri, 2005).

(7) Jumlah PIBs yang dapat dihasilkan oleh ulat *S. litura* yang terinfeksi SpltMNPV secara *in vivo* pada berbagai instar telah diteliti oleh Asri dan Isnawati (2004). Pada instar 3 diperoleh jumlah SpltMNPV sejumlah  $\pm 6 \times 10^8$  –  $31 \times 10^8$  PIBs/ml, pada instar 4 sejumlah  $3 \times 10^9$  –  $43 \times 10^9$  PIBs/ml, dan pada instar 5 diperoleh  $12 \times 10^9$  –  $10 \times 10^{10}$  PIBs/ml. Penelitian ini akan memudahkan petani untuk mencari dosis virus dari ulat mati terinfeksi virus di lapang untuk penyemprotan berikutnya.

(8)Perbanyak agen hayati tersebut terutama virus secara konvensional dilakukan secara *in vivo* yaitu menggunakan inang hidup ulat *S. litura* banyak mengalami kendala (mortalitas inang yang diperbanyak di laboratorium mencapai 70%) (Asri dan Isnawati, 2004) selain itu ketersediaan inang juga terbatas karena mengikuti musim yaitu hanya banyak dimusim penghujan. (9)Sehingga penelitian diteruskan untuk menumbuhkan inang aslinya dalam laboratorium (*in vitro*) yaitu sel target (sel usus) karena virus tidak dapat ditumbuhkan pada medium buatan. Perbanyak sel inang secara *in vitro* sudah berhasil dilakukan pada sel epitel ususlarva *S. litura* instar 4,5, dan 6 (sel primer) dalam medium Grace's di laboratorium (Asriet *al.*, 2007). (10) Kultur sel primer ini sudah diuji kemampuannya dalam memperbanyak SpLtMNPV secara laboratorium yaitu mempunyai kemampuan mereproduksi SpLtMNPV dalam tiap sel usus hasil kultur *in vitro* adalah 2,5 PIB's. (Asri *et al.*, 2007) dan (11) Virus hasil perbanyak *in vitro* telah diuji patogenesisnya pada konsentrasi  $10^6$  PIBs/ml dan mencapai mortalitas larva *S. litura* instar 3 sebesar 53 % (Asridan Ducha, 2008). Kemampuan patogenesis virus ini cukup tinggi walaupun pengujiannya baru skala laboratoium yang faktor penunjang patogenesisnya terbatas.(12) Hal menguntungkan lain dari virus ini apabila diterapkan di lapang adalah tidak adanya kekebalan pada inangnya yaitu Ulat *S. litura* karena berdasarkan penelitian (Hidayat *et al.*, 2008) ternyata ulat *S. litura* yang terinfeksi virus ini sampai 4 generasi tidak muncul kekebalan, artinya ulatnya masih bisa mati sampai 4 generasi tanpa adanya penyemprotan virus berulang. (13) Kerusakan tanaman jarak akibat larva yang terinfeksi SpltMNPV juga sudah diteliti (Isnawati dan Asri, 2007). Kerusakan daun jarak semakin besar seiring dengan lama hidup larva.

Selanjutnya penelitian dilanjutkan (14) untuk mengkaji proses/mekanisme reproduksi SpLtMNPV dalam sel primer dalam waktu inkubasi 24, 48, dan 72 jam yang ternyata proses reproduksi virus sampai inangnya lisis hanya membutuhkan waktu 24 jam. Dengan penelitian ini tiap tahap reproduksi virus menjadi belum terjawab karena bukti empiris berupa foto TEM belum lengkap. Selain itu sel inang yang dipakai juga masih sel

primer yang pola pertumbuhan dan perkembangannya belum mantap. Sehingga penelitian tentang sel primer diteruskan untuk mendapatkan sel line yang pola pertumbuhan dan perkembangannya telah mantap dari generasi ke generasi **(15)**. Sel line yang mantap pola pertumbuhan dan perbanyakkan telah dilakukan untuk 10 generasi dan sudah menunjukkan pola pertumbuhan dan perkembangan yang mantap.

### III. TUJUAN DAN MANFAAT

#### C. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui mekanisme infeksi *Spodoptera litura Multiple Nucleopolyhedrosis Virus* (SpLtMNPV) pada sel line epitel usus ulat grayak (*Spodoptera litura*) yang diamati dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi.

#### D. Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai mekanisme infeksi *Spodoptera litura Multiple Nucleopolyhedrosis Virus* (SpLtMNPV) pada sel line epitel usus ulat grayak (*Spodoptera litura*). Informasi tersebut berupa dokumentasi (foto) menggunakan mikroskop elektron transmisi. Mekanisme infeksi ini perlu diketahui untuk memperkirakan kapan dan berapa lama virus tersebut bereplikasi serta menghancurkan sel sehingga lebih jauh manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi bagi tujuan produksi virus skala besar sebagai bioinsektisida sehingga dapat diperoleh waktu dan biaya yang efisien.

## IV. METODE PENELITIAN

### E. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologidan Kultur Jaringan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Ballitas Malang, sedangkan preparasi dan dokumentasi menggunakan mikroskop elektron transmisi dilakukan di Lembaga Eijkman Jakarta.

### F. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian pengamatan dengan aspek-aspek pengamatan meliputi proses masuknya SpLtMNPV ke dalam sel inang yang berupa sel line epitel usus ulat grayak (*S. litura*) serta proses keluarnya virus dari sel inang.

### G. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. **Variabel penelitian** ini ialah mekanisme infeksi *Spodoptera litura Multiple Nucleopolyhedrosis Virus* (SpLtMNPV) pada sel line epitel usus ulat grayak (*S. litura*).
2. **Definisi operasional variabel** mekanisme infeksi ialah tahapan infeksi SpLtMNPV pada sel line epitel usus ulat grayak (*S. litura*) yang meliputi: tahap (1) pelekatan pada membran sel inang yang cocok dan absorpsi pada membran sel inang, (2) penetrasi dan pelepasan selubung di sitoplasma, (3) replikasi dan biosintesis komponen virus di inti sel, (4) perakitan komponen virus, dan (5) pelepasan virus dari sel inang.

### H. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah botol kultur, cawan petri *disposable* spesifik untuk kultur, tabung reaksi (Pyrex, 10x160 mm), mikroskop stereo dan inferted, mikropipet, *magnetic stirer*, *sput injection*, tabung endprof, tabung sentrifuse, gelas objek, pipet tetes, *haemocytometer*,

botol kapsul/botol vial, toples plastik, kuas kecil, *autoclave*, oven, *incubator*, *refrigerator* suhu  $-70^{\circ}\text{C}$ , *laminar air flow*, dan sentrifuse. Peralatan bedah ulat seperti pinset mikro, gunting mikro dan jarum steril. Mikroskop elektron transmisi digunakan untuk mengamati mekanisme infeksi virus.

## 2. Bahan

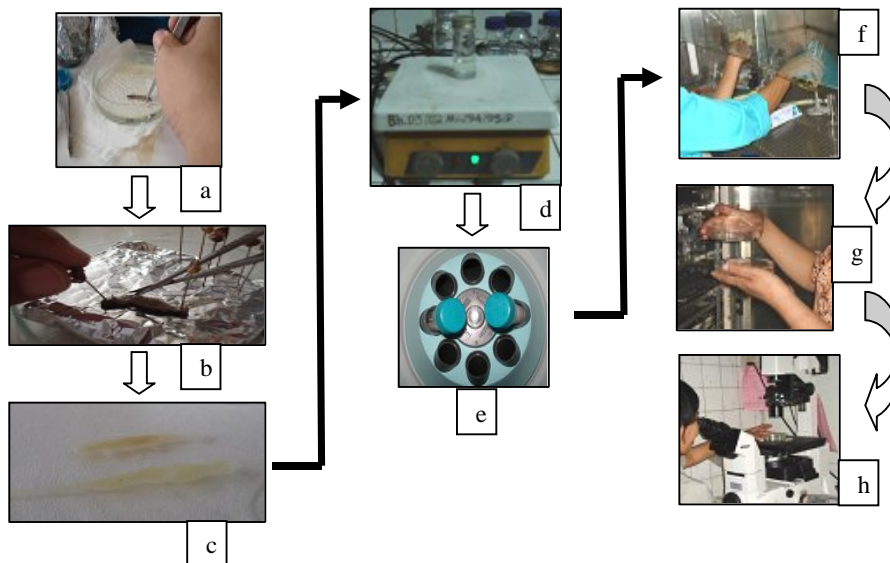
Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah larva *S. litura* instar 3,4, dan 5, biakan murni SpLtMNPV, pakan buatan untuk ulat *S. litura*, kapas, *tissue*, akuades, agen pensteril seperti alkohol 70%, formalin dan  $\text{KMnO}_4$  serta bayclin, media Grace's, *phosphat buffer saline*, *fetal bovine serum*, antibiotik penisilin-streptomisin, antijamur amfoterisin-B, dan enzim tripsin.

## D. Cara Kerja

### 1. Pemiakan *S. litura*

Pemiakan *S. litura* secara massal dilakukan untuk memenuhi kebutuhan larva pada saat perlakuan. Larva *Spodoptera litura* diperoleh dari Ballitas Malang dipelihara dalam toples plastik dan diberi pakan buatan (Ballitas) hingga diperoleh ulat instar 4 dan 5. Ulat ini akan diambil sel epitel usus yang nantinya akan dikultur menjadi sel primer.

### 2. Pembuatan sel line dari sel epitel usus *S. litura* instar 5.



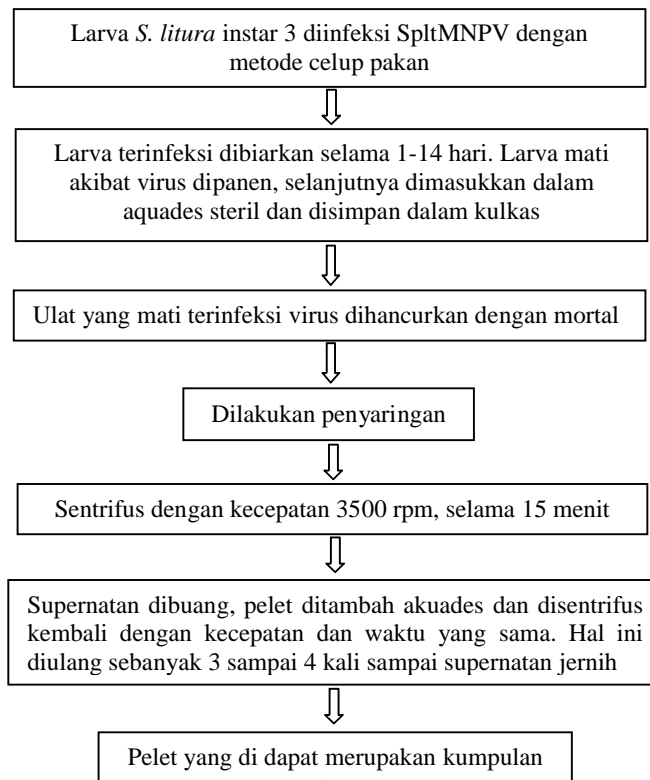
Gambar 4. Proses pembuatan sel line

Keterangan gambar:

- a. Sterilisasi ulat yang akan diambil sel epitelnya dengan menggunakan *Phosphat buffer saline* dan bayclin
- b. Pembedahan sel usus dari ulat yang telah disteril
- c. Sel usus yang akan diambil sel epitelnya
- d. Epitel sel usus di potong kecil-kecil dan ditripsinasi menggunakan *magnetic stirrer* agar selnya lepas
- e. Sentrifugasi untuk mengumpulkan sel epitel yang telah lepas dari jaringannya
- f. Penanaman sel pada media kultur
- g. Inkubasi pada inkubator dengan suhu kurang lebih 30°C selama 10 hari
- h. Pengamatan perkembangan sel primer menggunakan mikroskop inferted.

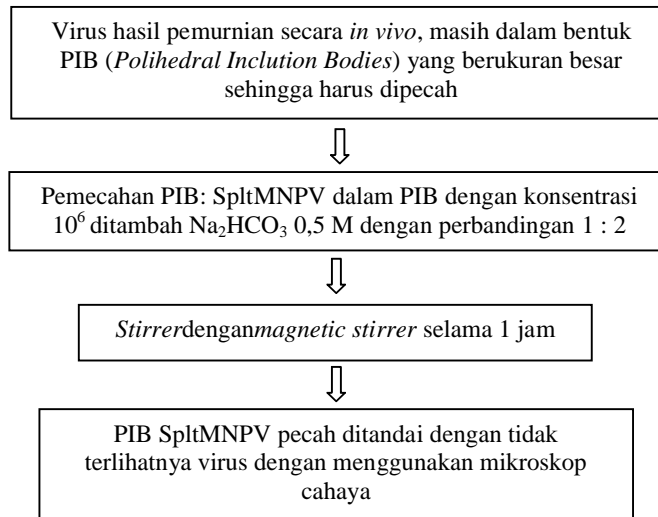
**Pada pembuatan sel line: sel primer direkultur berulang- ulang sampai pola pertumbuhan dan perkembangannya mantap**

### 3. Teknik perbanyak dan pemurnian virus secara *in vivo*



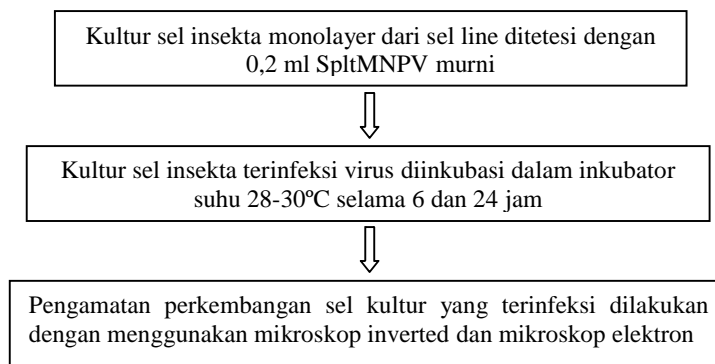
Gambar 5. Diagram perbanyak dan pemurnian virus secara *in vitro*

#### 4. Persiapan virus sebelum penginfeksian secara *in vitro*



Gambar 6. Diagram persiapan virus sebelum diperbanyak secara *in vitro*

#### 5. Teknik penginfeksian sel menggunakan SpltMNPV



Gambar 7. Diagram penginfeksian sel menggunakan SpLtNPV

#### 6. Persiapan pemetretan sel terinfeksi

Sel line yang terinfeksi virus selama 6 dan 24 jam difiksasi dengan cara:

- Kultur sel yang berada dalam disk/flask/cawan petri dirontokkan
- Sel yang telah rontok dimasukkan dalam *falcon tube* 15 ml/10 ml
- Sentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit
- Supernatan di buang dan ditambahkan *cacodylate buffer* (1,5 ml) kocok pelan hingga sel tercampur.

- e. Pindahkan ke dalam tabung endprof dan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit
- f. Supernatan dibuang, peletnya dicuci dengan *cacodylate buffer* (1ml)
- g. Sentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit
- h. Supernatan dibuang dan ditambahkan fiksatif 2,5% *glutaraldehyde* (1ml) dalam *cacodylate buffer*
- i. Kocok pelan hingga sel tercampur dan simpan sampel dalam suhu 4°C dan sampel siap dikirim ke Lembaga Eigmment untuk preparasi berikutnya.

## 7. Proses pengeblokan sampel menggunakan SPURR

Sampel diproses lebih lanjut dengan metode pengeblokan sampel menggunakan SPURR dengan tahapan seperti di bawah ini:

### Tahap Fiksasi

- a. Letakkan 100 µl sampel atau 1x1x1 mm sampel jaringan ke dalam tabung endprof.
- b. Tambahkan 500 µl dari 0,1M *sodium cacodylate* (pH 7,4) sebagai *buffer*
- c. Sentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, selanjutnya supernatan dibuang.
- d. Celupkan pelet dalam 500 µl 5% (v/v) *buffer glutaraldehyde* dalam *Sodium cacodylate* + 3% sukrosa selama 24 jam sambil dishaker pada suhu 4°C.
- e. Pelet di bilas menggunakan *buffer* 3 kali setiap 15 menit dengan di shaker pada suhu 4°C
- f. Kerjakan tahap 3 lagi dengan merubah *buffer*-nya
- g. Campurlah pelet tersebut dalam 500 µl 2% *osmium tetroxide* + 2,5%  $K_3Fe(CN)_6$  dalam *buffer* dengan dishaker pada suhu 4°C selama 2 jam
- h. Cuci kembali seperti tahap 3 dengan menggunakan *buffer* ke-2

### Tahap Dehidrasi

- a. Pelet didehidrasi secara berurutan dengan seri alkohol sambil di shaker pada suhu 4°C:

- 10% *Ethanol* selama 5 menit
- 20% *Ethanol* selama 5 menit
- 30% *Ethanol* selama 5 menit
- 40% *Ethanol* selama 10 menit
- 50% *Ethanol* selama 10 menit atau semalam
- 60% *Ethanol* selama 10 menit
- 70% *Ethanol* selama 10 menit
- 80% *Ethanol* selama 10 menit
- 95% *Ethanol* selama 10 menit (2 kali)
- Absolut *Ethanol* selama 20 menit (2 kali)

- b. Sentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit selanjutnya supernatan dibuang setiap kali mengganti seri alkohol.

#### **Tahap infiltrasi/peresapan**

- a. Celupkan pelet pada 500 µl *ethanol absolute* dan *propylene oxide* dengan perbandingan tertentu pada suhu ruang selama 30 menit (menggunakan shaker);
  - Ethanol absolute* : *propylene oxide* = 2:1 (30 menit)
  - Ethanol absolute* : *propylene oxide* = 1:1 (30 menit)
  - Ethanol absolute* : *propylene oxide* = 1:2 (30 menit)
  - Ethanol absolute* : *propylene oxide* = 0:pure (30 menit)
- b. Sentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit selanjutnya supernatan dibuang setiap kali mengganti cairan.

#### **Tahap Embedding/Penanaman**

- a. Celupkan pelet dalam *propylene oxide* dan campuran SPURR'S dengan perbandingan 1:1 dengan di shaker pada suhu ruang selama 30 menit
- b. Sentrifuse pada kecepatan 3000 rpm dan buanglah supernatannya
- c. Buanglah setengah dari campuran ini dan tambahkan dalam jumlah yang sama campuran plastik murni dengan di shaker pada suhu ruang selama 30 menit.

- d. Hentikan penuangan dan campur kembali dengan campuran plastik murni (2 – 3 jam untuk spesimen kecil dan semalaman untuk spesimen yang lebih besar) dalam kondisi vakum pada suhu ruang.
- e. Bersihkan campuran tersebut
- f. Letakkan sampel blok dalam tabung
- g. Celupkan kembali sampel dengan campuran SPURR'S plastik murni pada inkubator vakum suhu 70°C selama 8 – 16 jam.

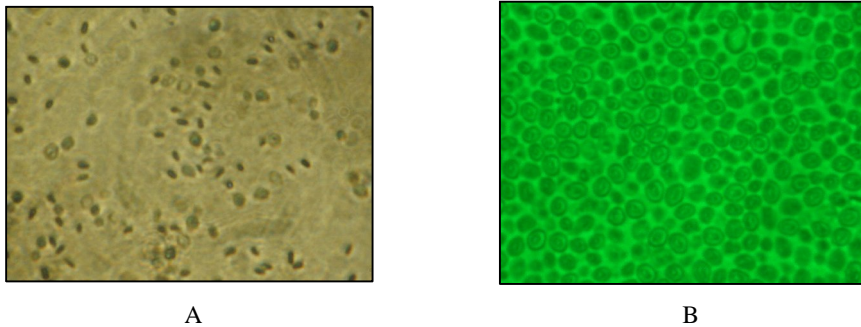
Tahap berikutnya adalah membuat sayatan dari sampel blok yang bertujuan memotong sayatan setipis mungkin agar mudah diamati di bawah mikroskop. Preparat dilapisi dengan monomer resin melalui proses pemanasan kemudian dilanjutkan dengan pemotongan menggunakan mikrotom. Umumnya mata pisau mikrotom terbuat dari berlian karena berlian tersusun dari atom karbon yang padat sehingga sayatan lebih rapi. Sayatan yang telah terbentuk diletakkan diatas cincin berpetak untuk diamati. Pelapisan/pewarnaan biasanya juga dilakukan untuk memperbesar kontras antara preparat yang akan diamati dengan lingkungan sekitarnya.

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan beberapa data yang diperoleh pada saat persiapan untuk pemotretan sel line epitel usus larva *S. litura* yang terinfeksi SpLtMNPV, dapat dibahas beberapa hal yaitu:

### D. Pembuatan kultur sel line epitel usus larva *S. litura* dari sel primer

Sebelum pembuatan sel line epitel usus larva *S. litura* dari sel primer. Sel primer yang akan digunakan sebagai induk diinkubasi dalam inkubator suhu 28 – 30°C selama kurang lebih 10 hari.

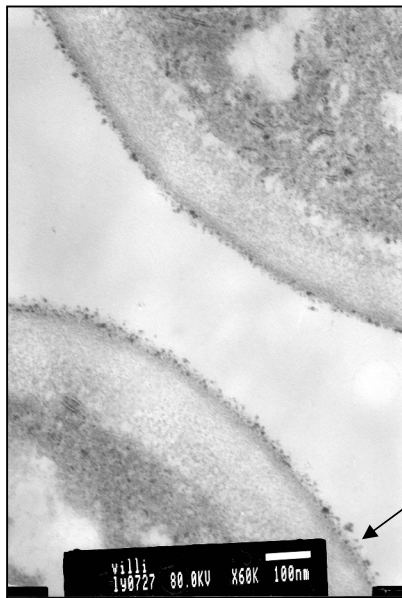


Gambar 8. Sel epitel usus larva *S. Litura*. A. belum monolayer; B. sudah monolayer.

Sel primer yang diinkubasi tersebut pada mulanya belum menempel, kemudian mulai menempel pada cawan kultur dan mulai tumbuh serta berkembang biak dari sel yang jumlahnya sedikit menjadi sedang (belum *monolayer*) (Gambar 8.A) sampai mendapatkan sel yang rapat dalam 1 lapis yang disebut *monolayer* (Gambar 8.B). Sel *monolayer* yang pertama ini disebut sebagai sel primer.

Kultur sel line dibuat dari hasil rekultur sel primer berkali-kali sehingga pola pertumbuhan sel sudah tetap. Artinya kemampuan membentuk *monolayer* relatif stabil pada waktu dan suhu inkubasi yang hampir sama. Pada penelitian ini kemampuan membentuk *monolayer* yang stabil diperoleh pada generasi 10. Sel line yang terbentuk sudah siap untuk diinfeksi dengan SpLtMNPV. Sel ini berbentuk bulat *polygonal* (bentuknya bulat tidak beraturan) karena tumbuh sangat rapat sehingga bentuk sel epitel aslinya yaitu *columnar* tidak terlihat lagi. Sel tumbuh seragam dengan inti sel yang terlihat jelas di tengah sel. Pada pemotretan dibawah mikroskop inverted perbesaran 400x dengan latar belakang

hijau terlihat membran sel yang jelas, sitoplasma berwarna hijau muda dan inti terlihat bulat kehitaman, sel ini kelihatannya tidak melekat dengan kuat karena ada beberapa yang masih bisa bergerak pelan. Apabila dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi terlihat bahwa sel epitel usus larva *S. litura* mempunyai filii yang bertujuan untuk memperluas permukaan membran sel sehingga dapat memperluas daerah penyerapan makanan (Gambar 9) dan pada kultur *in vitro* menjadikan sel ini terlihat bergerak lambat (pergerakannya ada ditempat, selnya tidak berpindah tempat).



Gambar 9. Mikrofilii yang terdapat di tepi membran sel epitel usus larva *S. litura*.

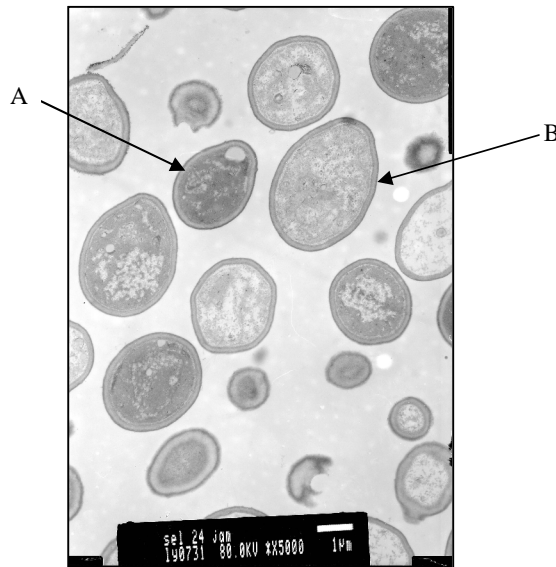
Mikrofilii

#### **E. Penginfeksiian sel line epitel usus larva *S. litura* dengan SpLtMNPV *in vivo* yang telah dipecah polihedronya.**

Sel line yang telah membentuk *monolayer* diinfeksi dengan SpLtMNPV dosis  $7,6 \times 10^7$  PIB/ml menunjukkan pola pertumbuhan sel yang tidak normal, sel epitel usus larva menjadi besar (*Giant cell*) (Gambar 10).

Membesarnya sel ini disebabkan karena di dalam selnya sudah dipenuhi oleh stroma virogenik yang berisi semua komponen virus seperti material genetik (DNA), protein kapsid dan protein *envelope* dan beberapa dari rakitan komponen tersebut seperti *nucleocapsid* dan *multiplenucleocapsid* (MNPV). MNPV ini siap keluar menjadi SpLtMNPV dalam bentuk polihedra melalui mekanisme yang disebut *Budding*/penguncupan. Selain itu inti sel juga mengalami reorganisasi

yaitu akan berkembang sedemikian rupa sehingga mereka mengisi sebagian besar volume sel. Misalnya diameter sel Sf-9 (*Spodoptera frugiperda*) dapat meningkat hingga 1,45 kali lipat selama infeksi. Peristiwa ini juga terjadi pada sel epitel usus larva *S. litura*. Reorganisasi ini disebabkan oleh adanya gerakan dan konsentrasi aktin dalam inti sel. Polimerisasi pada aktin inti diperlukan untuk koordinasi pembentukan *nucleocapsid* termasuk asosiasi yang tepat antara ODV (*occlusion-derived-virus/multiplenucleocapsid*) dengan selubung selain itu polimerisasi aktin juga dapat memfasilitasi gerakan *nucleocapsid* melalui sitoplasma menuju membran sel. Proses ini dibantu oleh protein struktural virion dari *nucleocapsid* yaitu PP78/83 (Rohrmann, 2008).



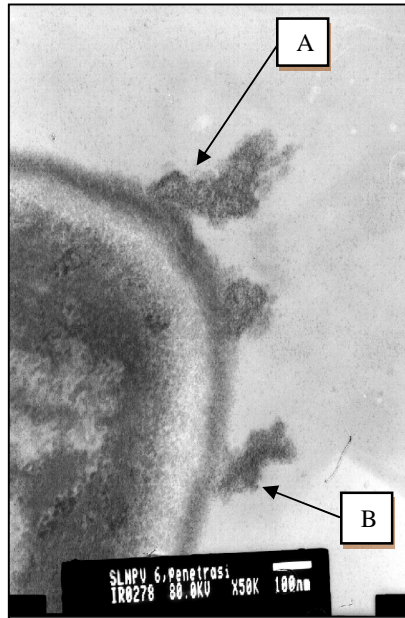
Gambar 10. Gambar sel epitel usus. (A) Sel epitel normal/belum terinfeksi virus;(B) Sel epitel yang terinfeksi virus membesar membentuk “Giant cell”.

#### **F. Mekanisme infeksi SpLtMNPV dalam sel line epitel usus larva *S. litura* (pengamatan menggunakan mikroskop elektron transmisi).**

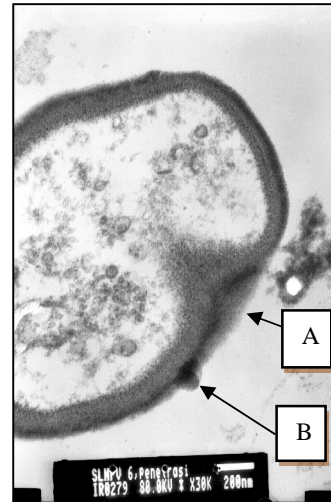
Hasil pemotretan mikroskop elektron pada kultur yang terinfeksi SpLtMNPV yang diinkubasi selama 6 jam dan 24 jam dapat ditemukan 5 tahap dari mekanisme infeksi virus yaitu:

##### **1. Tahap pertama: pelekatan virus pada sel inang**

Pada tahap pertama ini terjadi pengenalan virus pada membran sel inang seperti terlihat pada Gambar 11 di bawah ini:



Gambar 11. Pengenalan *multiple nucleocapsid* pada membran sel ephitel usus larva *S. litura*(A, B: MNPV yang melekat pada membran sel) (Perbesaran 50.000 kali).



Gambar 12. Membran sel terlihat melekok ke dalam (invaginasi) (A: MNPV di dalam lekukan; B: MNPV melekat pada membran)(Perbesaran 30.000 kali).

Pada Gambar 11 terlihat bahwa beberapa *multiple nucleocapsid* terlihat mulai mengenali membran sel inang dengan cara menempel pada tempat yang spesifik (*reseptor*) dan mengeluarkan senyawa yang dapat menyebabkan adanya perubahan pada membran sel sehingga membran sel terlihat lebih terang (Gambar 11). Hal ini menunjukkan bahwa terjadiperubahan konformasi dari senyawa yang ada di dalam membran sel. Mekanisme tersebut diteruskan pada Gambar 12 yaitu beberapa *multiple nucleocapsid* yang mengenali membran sel inang dengan cara menempel pada tempat yang spesifik (*reseptor*) dan mengeluarkan senyawa yang dapat menyebabkan adanya perubahan pada membran sel sehingga sel menjadi melekok ke dalam (invaginasi) sambil membawa MNPV (*Multiplemnucleocapsid*) (Gambar 12).

Proses ini diawali dengan dihancurkan polihedra virus secara *in vitro*, maka *multiplenucleocapsid* atau disebut juga dengan ODV (*occlusion-derived-virus*) atau pada virus NPV ini diketahui sebagai MNPV (*multiple nucleocapsid virus*) akan mendekati sel epitel usus larva dengan cara terjadi interaksi pada selubung protein dari *multiplenucleocapsid* virus berupa vp91 (*viral protein*)

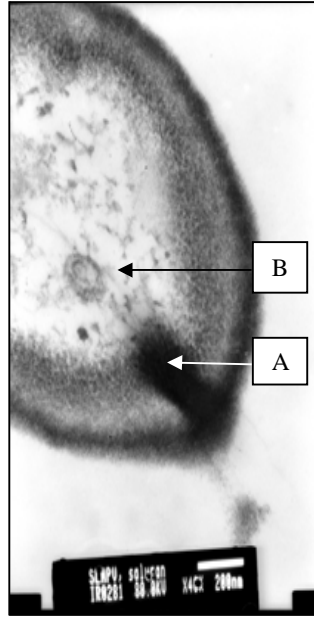
dengan sel *midgut*. VP91 dari virus memiliki tempat pengikatan kitin (*chitin binding domains*) yang menunjukkan bahwa mereka dapat berinteraksi dengan sel penghasil kitin termasuk sel epitel kolumnar dari *midgut* serangga yang dikultur. P74, PIF-1 (*per os (oral) infectivity factors*) dan -2 pada *envelope* MNPV juga berperan untuk berikatan dengan sel epitel *midgut* yang berkitin. Selain itu, sebuah protein virion struktural VP91 juga diperkirakan berperan untuk mengenali kode dari tempat pengikatan yang spesifik pada kitin. Ada dua kemungkinan interaksi yang melibatkan pengikatan kitin yang mungkin terjadi selama infeksi di *midgut* yaitu: yang pertama kitin diikat oleh PIF-1 dan PIF-2, vp91 serta P74; yang kedua juga dibantu oleh senyawa *multiplenucleocapsid-E66* yang memiliki aktivitas enzimatis (*lyase hyaluronan*) yang dapat membantu dalam memulai infeksi (Rohrman, 2008).

Selain PIF-1 dan PIF-2 di dalam membran *envelope* dari MNPV juga terdapat PIF-3, protein tersebut tampaknya tidak terlibat dalam pengikatan spesifik dan fungsinya tidak diketahui. Walaupun telah dikemukakan bahwa MNPV dapat berikatan dengan *proteinase reseptor* yang sensitif dan sekali terikat, *envelope* MNPV merubah konformasi senyawa dalam membran sel epitel sehingga membran nampak lebih terang (Gambar 11.B).

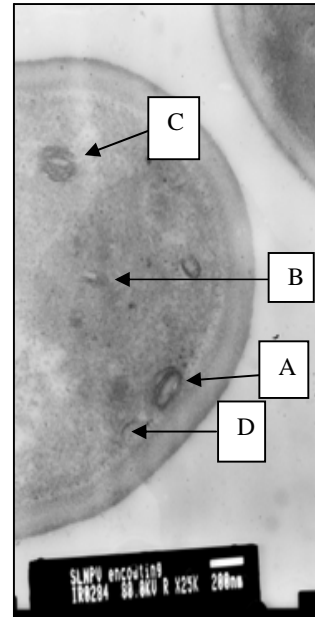
## **6. Tahap kedua: penetrasi dan pelepasan selubung di sitoplasma**

Pada tahap kedua ini terjadi penetrasi dan pelepasan selubung dari MNPV menjadi *single nucleocapsid*. Peristiwa tersebut dapat dilihat pada Gambar 13, 14, dan 15.

Pada tahap kedua ini terlihat bahwa MNPV yang sudah menempel pada inang menyebabkan sel melakukan invaginasi membentuk saluran ke dalam sel. Setelah MNPV masuk ke dalam sel (Gambar 13) *envelope* dari MNPV akan dibuka dan isinya dilepas sehingga dalam sel terlihat *envelope* yang kosong (Gambar 14.B) dan *nucleocapsid* yang terlepas (Gambar 14.C. dan D).



Gambar 13. Pembentukan saluran pada membran sel untuk menyalurkan MNPV. A.Saluran membran; B. MNPV(Perbesaran 40.000 kali ).

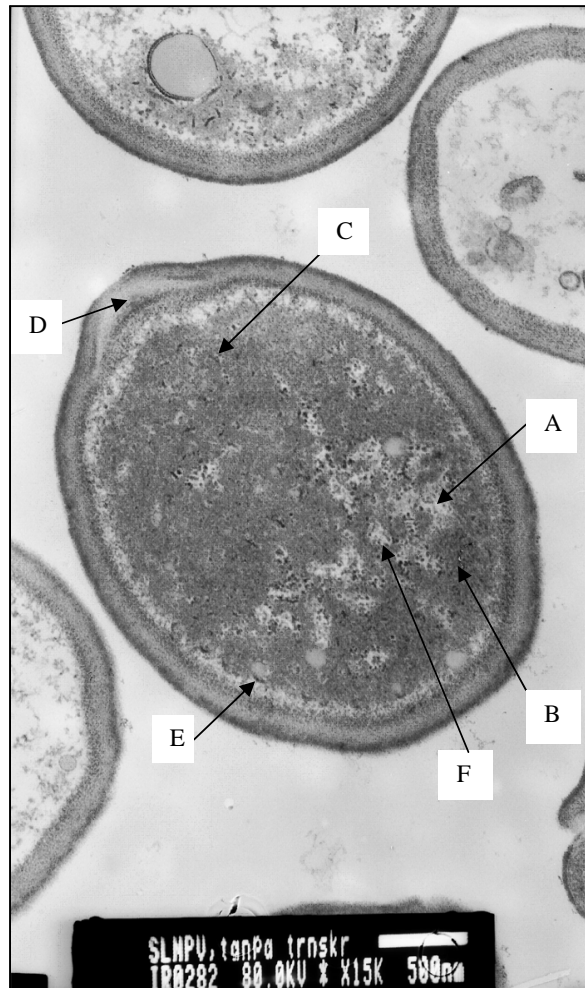


Gambar 14. Pelepasan *envelope* MNPV. A.Pembukaan selubung; B. Kapsid yang kosong; C dan D: Nucleocapsid yang sudah lepas dari *envelope* (Perbesaran 25.000 kali).

Penetrasi/masuknya virus diperantarai oleh GP64 (Glicoprotein 64) melalui proses *endocytosis* yang diperantarai oleh ‘clathrin’ (*clathrin-mediated*), ‘clathrin’ menjadi terkonsentrasi di lekukan atau lubang pada permukaan membran plasma. Virus umumnya melekat pada reseptor inang yang mengandung sinyal internal dan setelah reseptor ini berikatan dengan protein penyerangan virus sel terangsang untuk melekukkan membran selnya ke dalam sitoplasma (*invaginasi, endositosis*).Lekukan ini menyerupai vesikula yang disebut *vesikula endosome* atau *endocytic*. Virus diasamkan di dalam vesikula yang menyebabkan protein fusi virus mengubah konformasi yang mengakibatkan penggabungan *envelope* virus dengan membran *endosome*. Penggabungan ini mengakibatkan pori membran sel terbuka dan *nucleocapsid* dapat masuk dalam sitoplasma sel. Pada Gambar 13 terlihat bahwa *invaginasi* membran plasma melekuk ke dalam.

Pada tahap ini terlihat ada keunikan (Gambar 15) yaitu setelah *multiplenucleocapsid* masuk ke dalam ini sel maka *envelope* dari MNPV akan segera di lepas disitoplasma. Akan tetapi pada sel yang berbentuk MPNV setelah dipecah di sitoplasma ada sebagian *nucleocapsid* yang memasuki inti sel inang dan sebagian lainnya langsung keluar dengan cara melakukan *budding* atau

penguncupan dan segera keluar dari sel untuk mencari sel inang yang lain (Rohrmann, 2008).



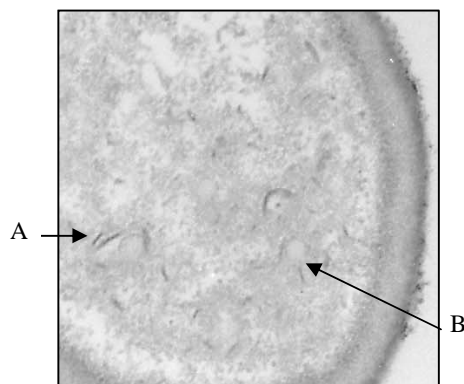
Gambar 15. Sel yang terinfeksi virus tetapi belum menyerang inti sel sehingga inti selnya masih terlihat utuh. (A. Inti sel; B. Sitoplasma; C. *Singlenucleocapsid*; D. Sel yang menguncup; E. *Singlenucleocapsid*; F. *Nucleocapsid* di dalam inti sel).

Pada Gambar 15 tersebut terlihat bahwa sel yang terinfeksi bagian dalamnya masih utuh, inti sel masih terlihat belum membesar dan sitoplasma masih terlihat gelap. Hal ini berbeda dengan sel yang terinfeksi namun sudah pada tahap lanjut yaitu terbentuknya stroma virogenik. Pada gambar tersebut proses infeksi masih awal akan tetapi sudah terlihat adanya *budding* (Gambar 15.D), hal ini sesuai dengan pendapat Rohrmann (2008) bahwa untuk MPNV, *nucleocapsid* yang dilepas di sitoplasma tidak semuanya memasuki inti sel (Gambar 15.F) hanya terlihat ada 2 *nucleocapsid* di dalam inti sel. Sementara di sitoplasma

*single nucleocapsid* terlihat banyak dan ada sebagian yang sedang menuju ke membran sel untuk melakukan *budding* (Gambar 15.C). *Nucleocapsid* yang berhasil masuk ke dalam inti sel akan segera melakukan transkripsi dan diteruskan dengan translasi untuk membentuk protein-protein virus.

### 7. Tahap ketiga: biosintesis komponen virus (stroma virogenik)

Untuk menjelaskan tahap ketiga dari mekanisme infeksi virus dalam sel yaitu tahap biosintesis komponen virus dapat dilihat pada Gambar 16 di bawah ini.



Gambar 16. Biosintesis komponen virus (pembentukan viroplasma/stroma virogenik). A. *Nucleocapsid*; B. *Envelope*.

Pada Gambar 16 terlihat bahwa tahap ketiga dari mekanisme infeksi SpLtMNPV pada sel epitel usus larva sudah pada tahap biosintesis komponen virus. Tahap ketiga ini diperoleh pada masa inkubasi virus dalam sel kultur selama 24 jam. Pada gambar tersebut terlihat sudah terbentuk stroma virogenik yang berisi: material genetik (Gambar 16.A) yang menyerupai benang berbentuk batang yang tersebar dalam inti sel. Pada gambar tersebut membran inti sel melebar mendekati membran plasma. Material genetik virus terlihat sudah memadat dan memendek ada yang berbentuk batang pendek, agak panjang dan ada juga yang melengkung, material genetik terlihat jelas berada dalam suatu rongga yang kosong akan tetapi selubung *capsid*-nya (selubung protein pertama/terdalam) tidak terlihat, mungkin terlalu kecil atau terlalu tipis sehingga terlihat seperti menyatu dengan material genetik. Sedangkan Gambar 16.B. memperlihatkan protein dari selubung virus yang masih kosong dan belum berisi material genetik,

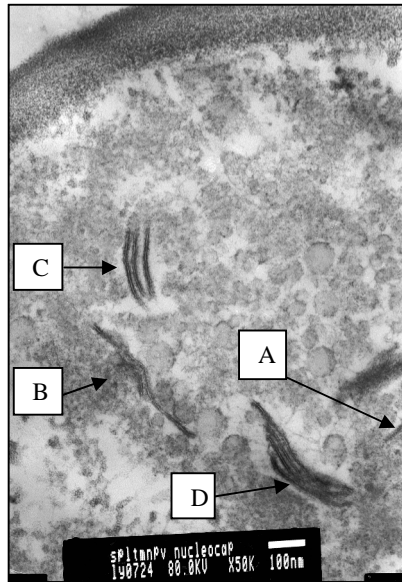
protein selubung tersebut terlihat membulat dengan tengah yang kosong. Ada beberapa protein selubung yang didalamnya sudah berisi material genetik (seperti titik).

Stroma virogenik terbentuk karena sebagian *nucleocapsid* ada yang berhasil memasukkan material genetiknya (DNA) ke dalam inti sel. Pada peristiwa ini terlihat *nucleocapsid* yang sudah kosong di dalam inti sel. *Nucleocapsid* tersebut masuk ke dalam inti sel melalui lubang pori yang berukuran kurang lebih 38nm. Virion baculovirus (*SpLTMNPV* termasuk baculovirus) mempunyai diameter 30-60 nm, dengan panjang 250-300 nm sehingga bisa masuk melalui pori inti sel. Walaupun pada sel ini tidak terlihat adanya membran inti sel. Hal ini disebabkan karena sel epitel usus larva *S. litura* selnya masih "elementary" atau sederhana (di dalam sitoplasma sel hanya terlihat sekumpulan materi genetik yang bentuknya tidak teratur, ribosom tersebar, beberapa vakuola, dan sitoplasmanya diselubungi oleh membran sel, di dalam sel tidak terlihat adanya mitokondria ataupun retikulum endoplasma). Pembentukan stroma virogenik diatur oleh protein virus yang disebut PP31 (*Ac36*). Protein ini diyakini terlibat dalam pembentukan stroma virogenik karena dengan tidak adanya *Ac36* akan menurunkan tingkat transkripsi dari beberapa gen sampai semua transkripsi gen berakhir (transkripsinya berhenti) (Rohrmann, 2008).

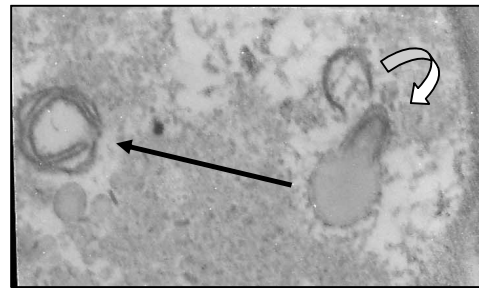
Menurut Rohrmann (2008) menyatakan bahwa virus yang *multiplenucleocapsid* mempunyai mekanisme replikasi yang hanya terjadi pada sebagian *nucleocapsid* yang masuk ke inti sel. *Nucleocapsid* yang lain tidak melakukan replikasi tetapi setelah masuk ke sitoplasma akan diteruskan dengan tahap penguncupan hal ini dimaksudkan agar virus cepat menyebar ke sel lain yang rentan dan ada didekatnya. Kemungkinan peristiwa tersebut yang menyebabkan sel dalam kultur menjadi cepat kosong. Dalam penelitian ini ternyata pada inkubasi sel terinfeksi virus selama 6 jam sudah terlihat banyak sel yang kosong. Protein polihedra yang ditempelkan di membran plasma dan diambil oleh *nucleocapsid* yang tidak mengalami replikasi diperoleh dari transkripsi material genetik *nucleocapsid* yang berhasil masuk ke dalam inti sel.

#### 4. Tahap keempat: perakitan komponen virus

Untuk menjelaskan tahap keempat dari mekanisme infeksi virus dalam sel adalah tahap perakitan komponen virus yang diperlihatkan pada Gambar 17 dan 18 di bawah ini.



Gambar 17. *Multiplenucleocapsid* di sitoplasma  
 A. Nucleocapsid tunggal  
 B. *Multiplenucleocapsid* berjejer 2  
 C. *Multiplenucleocapsid* berjejer 3  
 D. *Multiplenucleocapsid* berjejer 4  
 (Perbesaran 50.000 kali)



Gambar 18. Proses perakitan dari *nucleocapsid* menjadi *multiple nucleocapsid*.

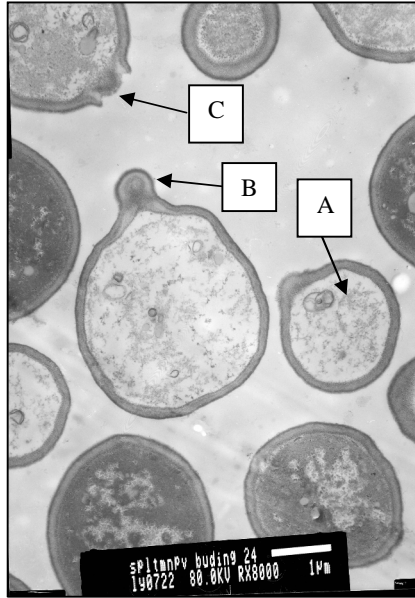
Pada Gambar 17 terlihat bahwa *nucleocapsid* baru sudah terbentuk pada infeksi dengan masa inkubasi 24 jam. *Nucleocapsid* sudah terbentuk di inti sel yang pada mulanya masih tunggal (Gambar 17.A) kemudian *nucleocapsid* tersebut saling berdekatan membentuk sekumpulan *nucleocapsid* yang disebut *multiplenucleocapsid*. Pada Gambar 17.B,C dan D terlihat *nucleocapsid* tersebut berjejer 2, berjejer 3 dan berjejer 4 yang belum diselubungi oleh selubung protein kedua. Mekanisme selanjutnya dapat diamati pada Gambar 18, pada gambar tersebut terlihat bagaimana mekanisme *nucleocapsid* yang sedang memasuki selubung proteinnya (selubung kedua, untuk membedakan dengan selubung pertama yaitu *capsid* kita menyebutnya sebagai *envelope*). *Nucleocapsid* yang pada mulanya berbentuk batang panjang kemudian melengkung menyesuaikan dengan bentuk *envelope* dan selanjutnya memasuki *envelope*. *Nucleocapsid* berikutnya juga mengikuti jejak yang pertama yaitu melengkung dulu baru masuk

ke dalam protein selubung kedua/*envelope*. Mekanisme ini menyebabkan efisiensi tempat dapat tercapai. Protein selubung yang sempit ternyata bisa dimasuki oleh *nucleocapsid* yang jumlahnya lebih dari satu. Hal ini berbeda dengan teori yang sudah ada yang menyatakan bahwa *nucleocapsid* terdapat dalam keadaan berjejer rapi tegak lurus satu dengan yang lain (Bilimoria, 1986 *cit.* Wahyuni, 2002). Pada SpLtMNPV yang menginfeksi sel ephitel usus larva *S. litura* ternyata *nucleocapsid*-nya dalam bentuk melengkung yang saling bertumpuk di dalam *envelope*-nya membentuk *multiple nucleocapsid* yang berbentuk *oval*(bulat memanjang).

##### **5. Tahap kelima: pelepasan SpLtMNPV**

Pada tahap terakhir/kelima yaitu tahap pelepasan SpLtMNPV dari sel epitel usus larva diperlihatkan pada Gambar 19, 20, dan 21. Pada Gambar 19 terlihat bahwa sel mulai membentuk kuncup, selain itu juga pada Gambar 19.A. terlihat adanya pergerakan *multiplenucleocapsid* menuju membran inti sel dan membran sel untuk mendapatkan selubung (*polyhedra*). Pada Gambar 19.B. terlihat membran sel menguncup berisi *multiplenucleocapsid* dan Gambar 19.C. terlihat membran sel membuka mengeluarkan *Polyhedra* SpLtMNPV. Pada Gambar 19 memperlihatkan gambaran yang jelas tentang mekanisme lepasnya SpLtMNPV dari sel, yaitu diawali terlebih dahulu dengan perakitan *multiplenucleocapsid* dengan membran inti sel dan membran sel. Mekanisme perakitan dengan membran inti sel terlihat pada Gambar 20 pada gambar tersebut terlihat ada 2 MNPV yang sedang menuju membran inti sel, selanjutnya membran inti menguncup dan mulai lepas untuk menuju ke membran berikutnya yaitu membran sel, membran sel menguncup dan selanjutnya membuka untuk melepaskan SpLtMNPV yang sempurna (Gambar 21).

Pada Gambar 21 ini arah penguncupan tidak simetris dan terlihat tidak terpola. Hal ini disebabkan karena virus berada dalam kumpulan sel di dalam medium *in vitro* yang semua menjadi target infeksi berikutnya. Pada virus yang menyerang sel *in vivo* penguncupan berada dalam ujung basal dan lateral yang menjauh ke lumen tetapi mendekat ke sel trakrea sebagai target infeksi berikutnya (Rohrmann, 2008)



Gambar 19. Mekanisme pelepasan *multiplenucleocapsid* pada sel epitel usus larva *S. litura*. (Perbesaran 8000 kali)

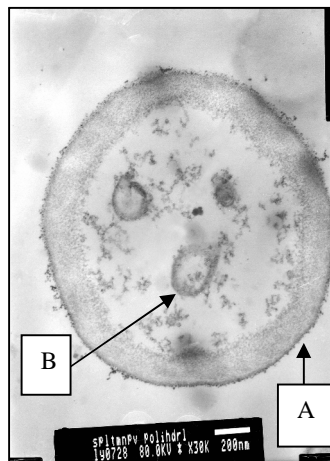
- A. Multiplenucleocapsid sedang menuju membran sel untuk mendapatkan selubung baik dari membran inti maupun membran sel (*polyhedra*)
- B. Membran sel menguncup berisi multiplenucleocapsid
- C. Membran sel membuka mengeluarkan *polyhedra* SpLtMNPV



Gambar 20. Pembentukan *polyhedra* dari membran inti sel dan membran sel inang (A).



Gambar 21. *Polyhedra* SpLtMNPV keluar dari sel inang (Perbesaran 28.000 kali)



Gambar 22. *Polyhedra inclusion bodies* dari SpLtMNPV setelah keluar dari sel inang. A. Fili dari *Polyhedra*; B. *Multiplenucleocapsid* (Perbesaran 30.000 kali).

*Polyhedra Inclusion bodies* (PIB) dari SpLtMNPV yang sempurna terlihat pada Gambar 22, pada gambar tersebut terlihat PIB SpLtMNPV berbentuk bulat dengan membran yang ganda. Membran dalam diperoleh dari 'membran' inti sel sedangkan membran yang kedua diperoleh dari membran sel. Pada membran yang terluar terlihat adanya filii seperti pada membran luar sel epitel usus larva *S. litura*. Hal ini yang menyebabkan SpLtMNPV dapat bergerak. Gerakan ini terlihat lambat dan berputar-putar ditempat apabila dilihat dengan mikroskop inverted perbesaran 400 kali. Gerakan dari virus ini bermanfaat dalam menyebarkan virus di media. Bentuk virus tersebut berbeda dengan pendapat Bilimoria, 1986 *cit.* Wahyuni, 2002 yang menyatakan bahwa *Polyhedral Inclusion Body* (PIB) umumnya membentuk kristal dan diliputi oleh matrik protein, berbentuk segi banyak (Gambar 1). Selain itu kebanyakan pendapat para ahli menyatakan bahwa virus tidak bergerak karena virus diluar sel hidup adalah benda mati. Dalam penelitian ini terlihat bahwa virus tersebut mempunyai filii dan terlihat bergerak di medium *in vitro* yang masih ada sel hidupnya. Ada kemungkinan pergerakan virus ini dipengaruhi oleh pergerakan media karena virus yang sudah dimurnikan dari kultur sel yang terinfeksi ternyata apabila dilihat dengan menggunakan mikroskop sudah tidak bergerak lagi. Apabila dikaitkan dengan teori lain yang menyatakan bahwa sel yang terinfeksi mengeluarkan vfgf (*virus fibroblas growth factor*) untuk menarik sel lain yang rentan menuju sel yang terinfeksi. Adanya senyawa ini menjadikan sel sehat bergerak pelan mendekati sel yang terinfeksi dan PIB virus yang berada diantaranya menjadi terkena arus dari pergerakan sel tersebut sehingga virus menjadi terlihat bergerak. Vfgf ini kemungkinan di sandi dalam material genetik virus yang diekspresikan oleh inang yang terinfeksi agar virus mudah mencari inang berikutnya (Rohrmann, 2008).

## VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. Kesimpulan

Dari hasil pemotretan dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi pada *sel line* epitel usus larva yang diinfeksi dengan *Spodoptera litura* *Multiplenucleopolyhedrosis* pada inkubasi 6 jam 24 jam diperoleh tahapan mekanisme infeksi sebagai berikut :

1. Tahap pertama yaitu penempelan MNPV (*Multiple Nucleopolyhedrosis virus*) pada sel inang diperoleh pada infeksi 6 jam. Pada tahap ini MNPV menempel pada reseptor spesifik dari sel inang dan merubah konformasi senyawanya sehingga sel mengalami invaginasi (endositosis)
2. Tahap kedua yaitu penetrasi MNPV ke Sitoplasma yang dilakukan dengan cara membuat saluran memanjang dari membran sel inang ke dalam sitoplasma sel dan membuka ujung dari saluran tersebut sehingga MNPV lepas ke sitoplasma. Selanjutnya *envelope* dari MNPV di pecah dan keluarlah *nucleocapsid* tunggal di sitoplasma.
3. Tahap ketiga yaitu biosintesis komponen virus. Proses ini dilakukan setelah *singlenucleocapsid* masuk ke dalam inti sel dan melakukan replikasi untuk menduplikasi material genetiknya serta mentranskripsi dan mentranslasi material genetiknya untuk mendapatkan protein-protein virus yang diletakkan dalam stroma virogenik.
4. Tahap keempat yaitu perakitan komponen-komponen virus. Perakitan ini terjadi di stroma virogenik yaitu daerah inti sel yang meluas hampir memenuhi seluruh sel. Di daerah ini, material genetik dan *capsid* dirakit menjadi *nucleocapsid* kemudian *nucleocapsid* saling berjejer dan dirakit menjadi *multiplenucleocapsid*.
5. Tahap terakhir yaitu tahap kelima yaitu pelepasan SpLtMNPV dalam bentuk *polyhedra*. Proses ini terjadi dengan cara penguncupan/*budding* pada saat penguncupan sesungguhnya adalah mengambil protein *polyhedra* yang ditempelkan di membran sel inang. Hal ini dilakukan untuk mempermudah pengenalan pada inang selanjutnya.

**B. Saran**

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan terutama mengenai interaksi virus dengan sel line epitel usus *Spodoptera litura* dalam hal ini mengenai protein-protein yang berperan dalam interaksi selama mekanisme infeksi secara *in vitro*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Asri, M.T.&Isnawati. 2004. Efektivitas dan Karakteristik *Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus (S/NPV) yang Telah Terpotong Material Genetiknya Terhadap Larva *Spodoptera litura* Fabr. Hasil Penelitian Tidak Dipublikasikan. Surabaya: Universitas Negeri Surabaya.
- Asri, M.T.& Isnawati, 2005. *Efektifitas dan Karakterisasi SpLtMNPV yang Telah Terpotong Material Genetiknya*. Laporan penelitian Dosen Muda. Unesa. Surabaya
- Asri, M.T., N. Ducha & Dian P. 2007. *Upaya Perbanyak SpLtMNPV Sebagai Bioinsektisida Secara In vitro Dengan Teknik Kultur Sel Insekta*. Laporan penelitian hibah bersaing Th 1. Universitas Negeri Surabaya. Surabaya
- Asri, M.T & N. Ducha. 2008. *Upaya Perbanyak SpLtMNPV Sebagai Bioinsektisida Secara In vitro Dengan Teknik Kultur Sel Insekta*. Laporan penelitian hibah bersaing Th 2. Universitas Negeri Surabaya. Surabaya
- Goosen, M.F.A., Daugulis & A.J. Faulkner. 1993. *Insect Cell Culture Engineering*. Marcel Dekker. Inc. New York.
- Gothama, A.A.A., Indrayani, I.G.A.A. & Subiyakto, S. 1994. *Prospek Penggunaan NPV untuk Pengendalian Ulat Buah H. armigera dan Ulat Grayak S. litura*. Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian. XII.(4): 106 – 110
- Harahap, I.S., & T. Budi. 2003. *Pengendalian Hama Penyakit Padi*. Bogor: Penebar Swadaya.
- Hink. 1982. *Microbial and Viral Pesticides*. Marcel Dekker. Ink. New York.
- Hidayat, M.T., Isnawati dan M. T. Asri. 2008. *Resistensi Larva Spodoptera litura selama 4 generasi yang tetuanya diinfeksi dengan SpLtMNPV dan Beauveria bassiana pada tanaman Jarak*. Universitas Negeri Surabaya. Surabaya
- Indrayani, I.G.A.A. 2003. Pengaruh Dosis Nuclear Polyhedrosis Virus Sublethal Terhadap Perkembangan Larva *Spodoptera litura* F. (Lepidoptera: Noctuidae) dan Potensinya dalam Transmisi Virus Secara Vertikal. Tesis tidak dipublikasikan. Malang: Universitas Brawijaya.
- Isnawati & M.T. Asri, 2007. Efektifitas SINPV Yang Di Sinari Dengan Sinar Matahari Dengan Berbagai Lama waktu Penyinaran Terhadap Lama Hidup Larva. Prosiding Seminar Nasional Biologi-IPA. UNESA. Surabaya.
- King, G.A., Dougulis, A.J., Faulker, P. Bayly, D & Goosen, M.F.A. 1990. *Biotechnology*. Left
- Kristiningsih, Y. 2006. *Perbandingan Efektifitas Spodoptera litura Nuclear Polyhedrosis Virus (SINPV) yang Disinari Ultraviolet-c dan yang Disinari dengan Sinar Matahari dengan Lama Penyinaran yang Identik terhadap Lama Hidup Larva Spodoptera litura* Fabr. Skripsi (Tidak Dipublikasikan). Surabaya: Universitas Negeri Surabaya

- Kurniawati, N. 2001, *Uji Filtrat Daun Pacar Cina (Aglaia odorata) dan daun Legundi (Vitex trifonola) terhadap daya hidup ulat Spodoptera litura*. Skripsi (Tidak Dipublikasikan). Surabaya: Universitas Negeri Surabaya.
- Mulyani, I. 2005. Pengaruh Lama Penyinaran Sinar Ultraviolet-C terhadap Patogenitas *Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus pada Larva *Spodoptera litura* Fabr. Skripsi tidak dipublikasikan. Surabaya: UNESA.
- Pelczar, M.J & Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Terjemahan. Oleh R.S. Hadiutomo dkk. UI. Press. Jakarta
- Rohrmann, G. 2008. *Baculovirus Molecular Biology*. Department of Microbiology, Oregon State University, Corvallis.
- Rukmana, R. & Sugandi. 1997. *Hama Tanaman dan Teknik Pengendalian*. Yogyakarta: Kanisius.
- Setiawan, F. 2003. Pengaruh Lama Penyinaran Ultraviolet A Terhadap Patogenitas *SINPV (Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus) Pada Larva *Spodoptera litura* Fabr. Skripsi tidak dipublikasikan. Malang: UNIBRAW.
- Sudarmo, S. 1987. *Mengenal Serangga Hama Kapas Dan Pengendaliannya*. Yogyakarta: Kanisius.
- Vaughn, J.K. 1968. *Invertebrate Tissue Culture*. Lambardo, Porissa. Italia
- Wahyuni, E. 2002. Molecular Analysis of *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrovirus (SplMNPV) From Different regions in Indonesia. Yogyakarta: Gadjah Mada University.

## Lampiran 1. Daftar Riwayat Hidup Anggota Tim Peneliti

### Anggota 1

1. Nama lengkap dan gelar : Dra. Mahanani Tri Asri, M. Si
2. Umur / kelamin : 39th / wanita
3. NIP : 132014884
4. Pangkat / Golongan / Jabatan : Lektor / III-d / Penata tk 1
5. Instansi : Jurusan Biologi FMIPA  
Universitas Negeri Surabaya
6. Alamat Instansi : Jurusan Biologi / FMIPA UNESA,  
Jl. Ketintang Surabaya  
Tlp (031) 8280009 Pesawat 303
7. Riwayat Pendidikan :  
S1 Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto, lulus tahun 1991  
S2 FMIPA Jurusan Biologi UGM, Yogyakarta, lulus tahun 1996
8. Pengalaman di bidang penelitian :
  - Uji mikrobiologis empek-empek lele Dumbo yang disimpan pada suhu ruang dan suhu refrigerator ( $\pm$  2005).
  - Kualitas daging lele dumbo asap yang diasap dengan suhu dan lama berbeda ( $\pm$  2005).
  - Daya hambat senyawa flavonoid dari sejenis pakua-pakuan terhadap pertumbuhan miselium jamur *Alternaria solanaceae* ( $\pm$  2003).
  - Potensi *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus Isolat Bogor dan Yogyakarta dalam Pengendalian Ulat Penggerek Buah Kapas (1992)
  - Pengaruh Radiasi Ultra Violet Terhadap Patogenisitas *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus (1999)
  - Pengaruh Pemberian Pupuk, Pakan dan Campuran keduanya Terhadap Pertumbuhan Ikan Nila Merah (*Oreochromis sp*) ( $\pm$  1993)
  - Pertumbuhan dan Mortalitas Benih Ikan Nila Merah Pada Pendederan Tingkat Pertama Tanpa Pemberian Pakan Buatan ( $\pm$  1993)
  - Optimalisasi Kegiatan Laboratorium Mikrobiologi Dalam Menunjang Perkuliahan Mikrobiologi (1998)
  - Perbanyak mikroba pengurai sampah organik pada limbah air cucian beras dan filtrat kulit kecambah kacang hijau ( $\pm$  2000).
  - Patogenesitas SINPV yang sudah terpotong material genetiknya terhadap larva *Spodoptera litura* instar 3. ( $\pm$  2002)
  - Efek Penambahan gula pada air minum ayam pedaging terhadap serangan penyakit gumboro. ( $\pm$  2002)
  - Resistensi berbagai antibiotik terhadap *Pasteuralla multocida* ( $\pm$  2002)
  - Efek histologis SINPV pada larva *S. litura* (2006)
  - Efektifitas SINPV yang diradiasi UV sinar matahari dan UV-C pada larva *S. litura* serta daya rusaknya terhadap tanaman jarak skala green house (2007)

- Efektifitas SLNPV dan Jamur *Beauveria bassiana* terhadap larva *S. litura* di tanaman jarak skala green house (2006)
- Pengendalian Larva lalat pada KRT dengan menggunakan *B. bassiana* dan *Steirinema carpocapsae* untuk meningkatkan kecepatan pengomposan sekaligus kompos yang dihasilkan (2007).
- Upaya perbanyak SLMNPV secara in vitro dengan teknik kultur sel insekta (2007-2008)
- Efektifitas Spodoptera litura Nuclear Polyhedrosis Virus yang disinari dengan sinar matahari dengan berbagai lama waktu penyinaran terhadap lama hidup Spodoptera litura yang terinfeksi (2008)
- Resistensi Larva Spodoptera litura selama 4 generasi yang tetuanya diinfeksi dengan SpLtMNPV dan *Beauveria bassiana* pada tanaman Jarak (Penelitian Fundamental) (2008)
- Patogenesitas Spodoptera Litura Multiple Nuclear Polyhedrosis (SpLtMPNV) Hasil Perbanyak Kultur Sel line USUS Larva Ulat Grayak (*Spodoptera litura*)(Penelitian strategis Nasional 2009)

#### 9. Pengalaman dibidang pengabdian kepada masyarakat

- a. Pelatihan pembuatan yoghurt di Pujon Malang
- b. Pelatihan pembuatan masinan didesa Gisik Cemandi, Sedati Sidoarjo
- c. Pelatihan budidaya Jamur Tiram putih di Kebonsari Surabaya
- d. Pelatihan pembuatan nata de coco di Jambangan Surabaya
- e. Pelatihan penerapan kurikulum berbasis kompetensi di Guru-guru SD di Kabupaten Jombang.
- f. Pelatihan pembuatan Yoghurt dan Nata de Coco pada siswa SMAN I klas 3 Babat Lamongan
- g. Instruktur pada dinas P3P mengenai Pengelolaan Sampah Tuntas dengan menggunakan metode komposter komunal dan komposter aerob skala Rumah tangga bagi Instansi/ Dinas Kebersihan se Indonesia Timur ( satu tahun 4 kali)
- h. Instruktur pada dinas P3P mengenai Vermicomposting bagi Instansi/ Dinas Kebersihan se Indonesia Timur ( satu tahun 4 kali)
- i. Instruktur pada dinas P3P mengenai Pengelolaan Sampah Tuntas dengan menggunakan metode fermentasi bagi Instansi/ Dinas Kebersihan se Indonesia Timur ( satu tahun 4 kali)
- j. Instruktur pada dinas P3P mengenai Pengelolaan Sampah Tuntas dengan menggunakan metode efektif mikroorganismenya bagi Instansi/ Dinas Kebersihan se Indonesia Timur ( satu tahun 4 kali)
- k. Pelatihan pemanfaatan KRT di Kandangan Kalimantan
- l. Pelatihan pemanfaatan komposter komunal dan KRT di Jambangan Surabaya
- m. Pelatihan pemanfaatan komposter rumah tangga di Rungkut Asri Surabaya
- n. Pelatihan pemanfaatan KRT di bantaran/daerah sekitar sungai di Simokerto Surabaya
- o. Pelatihan Budidaya jamur tiram putih di pondok pesantren Madura

#### 10. Publikasi

- a. Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDs). Jurnal IKIP Surabaya. Februari 1998.
- b. Potensi Virus HaNPV yang diradiasi UV pada Larva *Helicoverpa armigera* instar 3. Jurnal Terakreditasi.HAYATI. ISSN: 0852-6834. September. 2000.
- c. Konsentrasi HaNPV isolat Yogyakarta yang Efektif untuk Mengendalikan Larva. *H. armigera* instar 3. Jurnal Pendidikan Matematika dan Sains, terakreditasi, ISSN: 1410-1866, No. 3. November. 2003
- d. Simtopatologi dan Histopatologi ulat *H. armigera* Yang Terserang Virus HaNPV Jurnal Terakreditasi HAYATI. ISSN:0852-6834. No. 2. Tahun 2003
- e. Pemanfaatan Virus HaNPV Untuk Pengembangan Mata Kuliah Mikrobiologi Pokok Bahasan Virus. Proceeding Seminar Nasional. ISBN. 979-96880-1-9. 26 Oktober 2002
- f. Bakteri yang tumbuh pada lele asap berbumbu. Jurnal Penelitian Matematika dan Sains. No. 24 tahun XII 2005 ISSN 0852-0518.

## Anggota 2

1. Nama lengkap dan gelar : Guntur Trimulyono, S.Si., M.Sc.
2. Umur / kelamin : 30 th / laki-laki
3. NIP : 198004092005011002
4. Pangkat / Golongan / Jabatan : Asisten ahli / III-a
5. Instansi : Jurusan Biologi FMIPA  
Universitas Negeri Surabaya
6. Alamat Instansi : Jurusan Biologi / FMIPA UNESA,  
Jl. Ketintang Surabaya  
Tlp (031) 8280009 Pesawat 303
7. Riwayat Pendidikan :
  - S1 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta, lulus tahun 2003.
  - S2 Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, lulus tahun 2010
8. Pengalaman di bidang penelitian :
  - Pertumbuhan Kalus dan Kandungan Minyak Atsiri Nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Bth.) dengan Perlakuan Asam  $\alpha$ -Naftalen Asetat (NAA) dan Kinetin (2003).
  - Bakteri Asam Laktat Penghasil Antimikrobia (2010).
9. Pengalaman dibidang pengabdian kepada masyarakat
  - Workshop Pembuatan dan Pengembangan Penilaian IPA (Biologi) yang Sesuai Dengan Kurikulum Berbasis Kompetensi Bagi Guru-Guru SMP Kecamatan Candi Sidoarjo.
  - Percepatan Produksi dan Peningkatan Kualitas Nata Siap Konsumsi Melalui Penerapan Pisau Pengiris Nata Otomatis di Home Industri Nata "Sukses" di Surabaya Jawa Timur.