

LAMA WAKTU LISISNYA SEL PRIMER EPITHEL USUS LARVA
SPODOPTERA LITURA YANG DI INFEKSI DENGAN *Spodoptera litura*
Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (*SpLtMNPV*) DILIHAT DENGAN MIKROSKOP
ELEKTRON TRANSMISI

Oleh
Mahanani Tri Asri
Nur Ducha

ABSTRAK

Sel primer epitel usus larva *Spodoptera litura* merupakan salah satu sel hasil perbanyakan invitro dan telah berhasil dikerjakan serta dapat digunakan untuk perbanyakan *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (*SpLtMNPV*). Perbanyakan virus ini pada umumnya masih dilakukan secara in vivo atau menggunakan inang aslinya. Akan tetapi perbanyakan dengan cara ini masih mendapatkan banyak kendala yaitu ketersediaan inang dalam jumlah banyak sulit dikerjakan. Selain itu perbanyakan virus secara in vivo membutuhkan waktu yang cukup lama yaitu untuk melisiskan selnya membutuhkan waktu 3 hari dan untuk bisa panen virus dari larva yang terinfeksi membutuhkan waktu sekitar 10 – 12 hari. Oleh karena itu sekarang dikembangkan Kultur sel insekta secara in vitro untuk perbanyakan virus. Dalam penelitian ini ingin diketahui lama waktu lisisnya sel primer epitel usus larva *S. litura* yang diinfeksi dengan *SpLtMNPV*. Sel primer yang terinfeksi virus di ambil gambarnya dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi pada waktu inkubasi 24, 48 dan 72 jam. Hasil pemotretan menunjukkan bahwa sel epitel usus larva *S. litura* untuk lisis dan dapat mengeluarkan virus baru dalam waktu 24 jam. Dalam waktu 24 Virus sudah dapat diproduksi dengan kemampuan produksi 2,5 PIBs/sel.

Kata kunci : Lama waktu lisis , kultur primer epitel sel insekta, *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis virus (*SpLtMNPV*) .

I. PENDAHULUAN

Salah satu insekta yang sering dianggap sebagai hama yang sangat merugikan adalah *Spodoptera litura*. Pada stadium larva/ulat dapat menyerang berbagai tanaman seperti kapas, tembakau, jarak, jagung, kedelai, dan kobis (Sudarmo, 1987) dengan tingkat kerusakan mencapai 50 % (Naito, 1983). Hama ini dapat dikendalikan dengan agen biologis berupa virus. Virus yang sedang dikembangkan sebagai bioinsektisida adalah *SpLtMNPV* (*Spodoptera litura*

multipel nucleopolyhedrosis virus) in vivo, yang berdasar penelitian Asri (2005) efektif mengendalikan *Spodoptera litura* dengan mortalitas 80 – 90% pada konsentrasi 10^7 PIBs/ml di *greenhouse* dan di Laboratorium efektif pada konsentrasi 10^6 PIBs/ml (Asri, 2004).

Perbanyakan agensia hayati virus tersebut secara konvensional dilakukan secara in vivo yaitu menggunakan inang hidup berupa ulat *S. Litura*/ulat grayak. Cara pembiakan virus seperti ini kurang efektif karena tergantung pada kelimpahan ulat di lapang, atau tergantung pada musim yang biasanya banyak ditemukan pada musim penghujan. Selain itu untuk memperbanyak inang di laboratorium membutuhkan persyaratan yang cukup rumit dengan tingkat kegagalan mencapai 70% dan membutuhkan waktu yang relatif lama yaitu 12 hari (Asri, 2000). Sehingga metode ini untuk skala besar seperti untuk perusahaan tidak efektif karena 'kontinuitas' inang dari virus tidak terpenuhi. Untuk itu sekarang telah dikembangkan metode baru yaitu dengan mengkultur sel insekta terutama *S. litura*, sebagai inang untuk virus. Menurut Agathos, *et al* (1990), prospek dari kultur sel insekta adalah untuk menghasilkan berbagai macam bioproduk seperti produksi bioinsektisida virus (baculovirus) dalam skala besar untuk pertanian dalam waktu yang relatif singkat.

Oleh karena pembiakan SpLtMNPV secara in vivo mengalami banyak kendala maka dalam penelitian ini dikembangkan kultur sel insekta secara in vitro yang nantinya diharapkan dapat untuk memperbanyak virus dalam waktu yang relatif singkat. Kultur sel insekta telah berhasil dilakukan pada sel epitel usus larva *S. Litura* instar 3,4 dan lima, yaitu telah diperoleh sel primer yang ditumbuhkan pada medium Grace's dengan penambahan fetal bovine serum. Sel primer ini juga dapat digunakan untuk memperbanyak SpLtMNPV (Asri, 2008), sehingga dalam penelitian ini bertujuan mencari lama waktu lisisnya sel epitel usus larva yang diinfeksi dengan SpLtMNPV dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi. Penelitian ini dilakukan karena dengan pembiakan secara in vivo membutuhkan waktu yang lama untuk lisis yaitu sel yang terinfeksi membutuhkan waktu 72 jam (3 hari) (untuk dapat melisis sel-selnya yang terinfeksi (Falcon dalam Mangoendiharjo dan Pollet 1991). Sedangkan untuk

sampai bisa panen yang ditunjukkan dengan matinya larva *S. litura* membutuhkan waktu sekitar 12 hari

II. METODE PENELITIAN

A. Peralatan dan Bahan Penelitian

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan utama dan peralatan pendukung. Peralatan utama terdiri dari : inkubator, mikroskop inverted, mikroskop stereo, Laminar Air Flow (LAF), inkubator, sterilisator kering (oven), sentrifuse, magnetik stirer, membran millipore. Peralatan pendukung terdiri dari : cawan petri, cawan kultur, jarum pentul, stereofom, tabung sentrifuse, botol vial, alat bedah mikro, spuit, Aluminium foil, penyaring bakteriologis, penyaring nilon (plankton net) ukuran T 100 dan 150, mikroskop elektron transmisi.

Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah medium Grace's, Foetal Bovine serum, Posphat Buffer saline, enzim tripsin, SpLtMNPV, larva *Spodoptera litura*, pakan buatan untuk larva *S. Litura*, Bayclin, Na₂CO₃ Alkohol 70% sebagai agen pensteril, antibiotik penisilin-treptomisin, gentamycin sulfat dan antifungi berupa Amfoterisin-B, akuades.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasi yang dilakukan untuk melihat lama waktu lisisnya sel epitel usus larva yang terinfeksi oleh SpLtMNPV dan diinkubasi selama 24, 48 dan 72 jam.

C. Prosedur Penelitian

1. Preparasi Sel primer epitel usus larva *S. litura*

Larva *S. Litura* instar 5 awal hasil pemeliharaan di laboratorium dengan pakan buatan, terlebih dahulu dibersihkan dengan menggunakan bayclin, antibiotik dan PBS (posphat buffer saline). Selanjutnya dilakukan pembedahan untuk mengambil organ usus larva dengan menggunakan alat bedah mikro dan diamati di bawah mikroskop stereo. Jaringan epitel usus larva yang terambil

dicuci dengan PBS dan dipotong-potong sampai halus di dalam PBS. Potongan Usus larva ditripsinasi dengan perbandingan 1 : 1 antara larutan tripsin (0,25%) dengan cairan PBS + usus, sambil distirer selama 1 jam dalam suhu hangat. Hasil tripsinasi disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit, dengan tujuan untuk mengendapkan sel yang telah terdispersi. Selanjutnya dilakukan pengamatan di bawah mikroskop inverted untuk mengetahui apakah sel-sel epitel usus sudah terdispersi apa belum, apabila belum terdispersi maka tripsinasi diulangi lagi. Hasil sentrifus selanjutnya supernatannya di buang sebagian, endapan ditambahkan medium + serum (FBS) dan difilter dengan menggunakan penyaring nilon dengan ukuran T 100 dan T150 untuk memisahkan sel epitel dengan jaringan yang tidak terdispersi. Sel-sel epitel usus dalam medium pertumbuhan ditanam pada cawan kultur berukuran 2,5 ml. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 27° C. Setelah 10 hari sel sudah membentuk monolayer dan siap diinfeksi dengan SpLtMNPV.

2. Persiapan SpLtMNPV yang akan diinfeksi

SpLtMNPV murni hasil pembiakan in vivo dihitung dulu konsentrasinya dengan menggunakan *Haemocytometer*. Dengan konsentrasi yang bisa digunakan untuk penginfeksian adalah $1,1 \times 10^6$ PIBs/ml. Oleh karena SpLtMNPV dalam bentuk polyhedra yang ukurannya relatif besar (bisa dilihat dengan menggunakan mikroskop biasa perbesaran 400x) yang tidak memungkinkan untuk bisa masuk ke dalam sel primer usus larva *S. litura*. maka PIB's ini harus dipecah terlebih dahulu dengan menggunakan larutan alkalis yaitu Na_2CO_3 0,5M. Dan dimagnetic stirrer (diputar di atas magnetik stirrer) selama 1 jam (virusnya berukuran kurang lebih 1 mikrometer lebih kecil dari sel primer berukuran kurang lebih 2,5 mikrometer). Selanjutnya diamati di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400 kali apabila virusnya sudah tidak terlihat berarti PIB'snya telah pecah dan virus dalam bentuk multiplenucleocapsid.

3. Penginfeksian SpLtMNPV dalam sel primer epitel usus larva *S. litura*

Untuk menjaga sterilitas larutan virus sebelum virus dituang/diinfeksi dalam medium yang ditumbuhi sel primer epitel usus *S. litura*. Larutan SpLtMNPV- Na_2CO_3 difiltrasi dengan membran filter bakteriologis (pori-pori 0,22 mikron) dan ditetaskan pada medium kultur sel primer. Selanjutnya medium kultur yang telah diinfeksi diinkubasi selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam. setiap 24 jam sel terinfeksi di fiksasi/ didormankan untuk memprosesan pembuatan preparat berikutnya supaya bisa dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi.

3. Persiapan sel untuk pengamatan dengan mikroskop elektron transmisi (TEM) Pengamatan sel terinfeksi virus dengan TEM dilakukan di Lembaga Eigment Jakarta. Sedangkan persiapan pengiriman sampel dilakukan di laboratorium mikrobiologi dan kultur jaringan Unesa dengan proses sebagai berikut :

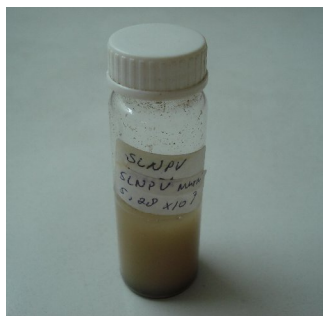
- a. Kultur sel yang berada dalam disk/flask/cawan petri dirontokkan
- b. Sel yang telah rontok dimasukkan dalam falcon tube 15 ml/10 ml
- c. Disentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit
- d. Supernatan di buang dan ditambahkan Cacodylate buffer (1,5 ml) kocok pelan hingga sel-sel tercampur.
- e. Dipindahkan ke dalam tabung ependrof dan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit
- f. Supernatan dibuang, peletnya dicuci lagi dengan cacodylate buffer (1ml)
- g. Disentrifuse lagi pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit
- h. Supernatan dibuang dan ditambahkan fiksatif 2,5% glutaraldehyde (1ml) dalam cacodylate buffer
- i. Dikocok pelan hingga sel-sel tercampur dan simpan sampel dalam suhu 4°C dan sampel siap dikirim ke Lembaga Eigment Jakarta untuk preparasi berikutnya.

Sampel yang terkirim akan diproses lebih lanjut dengan Proses pengeblokan sampel dengan menggunakan metode SPURR yang terdiri dari : Tahap

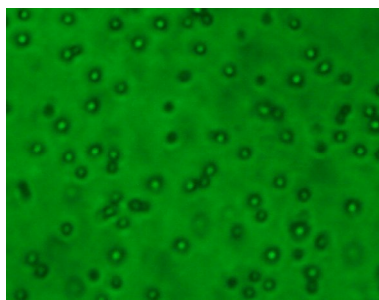
Dehidrasi, Tahap infiltrasi/peresapan, dan Tahap Embedding/Penanaman. Selanjutnya dibuat sayatan dari sampel blok tadi yang bertujuan memotong sayatan setipis mungkin agar mudah diamati di bawah mikroskop. Praparat dilapisi dengan monomer resin melalui proses pemanasan. kemudian dilanjutkan dengan pemotongan 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 di atas cincin berpetak untuk diamati. Pelapisan/pewarnaan biasanya juga dilakukan untuk memperbesar kontras antara preparat yang akan diamati dengan lingkungan sekitarnya.

III. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

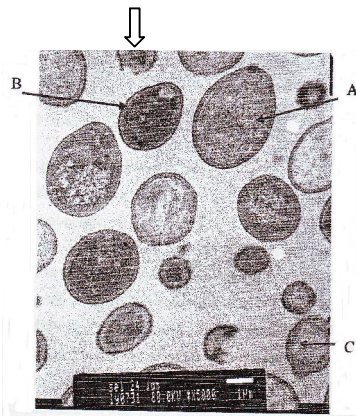
Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel epitel usus larva *S. litura* yang diinfeksi dengan SpLtMNPV dan diinkubasi pada waktu 24, 48 dan 72 jam menunjukkan sel terinfeksi lisis di waktu inkubasi 24 jam sedangkan pada waktu 48 dan 72 jam hampir semua selnya sudah lisis sehingga pada gambar yang tertangkap tinggal PIBs (*Polyhedra inclusion bodies*) virus serta sisa-sisa dari sel yang lisis tersebut. Gambar dari sel yang lisis pada waktu inkubasi 24 jam adalah :



Gambar 1, SpLtMNPV stater in vivo



Gambar 2. PIBs dari SpLtMNPV dengan mikroskop inverted (400x)



Gambar 3. Sel kultur yang normal Dan terinfeksi SpLTMNPV
A. Giant Cell B. Sel normal
C. Sel budding berisi virus
↓ Sel yang sudah terbuka/lisis
Pada waktu inkubasi 24 jam
(Perbesaran 5000 kali)



Gambar 4. Sel yang sudah terbuka dan mengeluarkan *Polyhedra inclusion bodies* (PIBs) dilihat dengan TEM pada waktu inkubasi 24 jam (Perbesaran 20.000 kali)

Berdasarkan gambar yang diperoleh baik menggunakan mikroskop inferted maupun mikroskop elektron transmisi terlihat bahwa PIBs dari SpLTMNPV berbentuk bulat. Pada waktu inkubasi 24 jam ternyata virus sudah pada tahap reproduksi yang terakhir yaitu pelepasan virus (Gambar 3 dan 4). Tahap reproduksi virus pada umumnya terdiri dari 5 tahap yaitu 1. Pelekatan pada membran sel inang yang cocok dan absorpsi pada membrane 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. Sedangkan berdasarkan penelitian dari Falcon dalam Mangoendiharjo dan Pollet (1991) keseluruhan dari tahapan reproduksi NPV adalah 1. Partikel virus termakan inang (0 jam), 2. Melepaskan partikel-partikel pertamanya ke dalam cytoplasma (4 – 8 jam), 3. Mengalami modifikasi pertama dalam inti sel yang terinfeksi (16 jam), 4. Pembentukan viroplasma (24 jam), 5. Replikasi nucleocapsid (36 jam), 6. Replikasi Polyhedra (48 jam) dan 7. Pembentukan PIB lengkap (72 jam). Proses pelepasan NPV yang membutuhkan waktu 72 jam tersebut dilakukan secara in vivo, sedangkan pada penelitian ini dilakukan secara in vitro sehingga waktu lisis/lepasnya PIB dari sel lebih singkat yaitu 24 jam.

Berdasarkan data tersebut dapat dijelaskan bahwa lama waktu lisisnya sel epitel yang terinfeksi secara in vitro lebih singkat (24 jam) karena virus yang dimasukkan dalam cawan kultur sudah dipecah terlebih dahulu polyhedranya dengan menggunakan larutan Na_2CO_3 0,5M, sehingga yang diinfeksi adalah multiplenucleocapsidnya yang berukuran lebih kecil. Hal ini bisa mempersingkat waktu untuk memulai tahap pertama dari infeksi virus yaitu penetrasi dan absorpsi. Pada infeksi in vivo Polyhedra virus harus dipecah terlebih dahulu oleh larutan alkalis dari saluran pencernaan larva *S. litura* yang menurut Falcon *dalam* Mangoendiharjo dan Pollet (1991) membutuhkan waktu 0 – 4 jam, selain itu sebelum mencapai sel target virus juga harus menghadapi system kekebalan inang yang tersebar diseluruh tubuh inang. Tahap berikutnya setelah penetrasi dan absorpsi tidak tergambar karena pada penelitian ini pemotretan dilakukan setelah sel terinfeksi selama 24 jam. Pada waktu ini terlihat sel sudah membentuk Giant cell/ selnya membesar (Gambar 3) dan hampir semua organel sel telah dihancurkan, serta didalamnya sudah dipenuhi dengan rakitan virus (multiplenucleocapsid). Selain itu juga ditemui sel yang sedang lisis, membran selnya terbuka dan terlihat PIB yang akan keluar (Gambar 4).

Pada sel kultur yang terinfeksi 48 dan 72 jam (dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi) tidak terlihat lagi sel yang terinfeksi, yang terlihat hanya PIBs SpLtMNPV yang sudah lengkap dan siap menginfeksi sel lain. Sedangkan dengan mikroskop inferted perbesaran 400 kali, tidak nampak adanya PIBs maupun sel kultur, yang nampak hanya medianya yang keruh penuh dengan debrisnya sel. Hal ini disebabkan karena seluruh sel sudah lisis sehingga tinggal PIBs yang lepas dari sel kultur tersebut.

Selain waktu lisis yang diperoleh dari pemotretan tersebut, juga dapat diketahui kemampuan tiap sel kultur untuk menghasilkan virus. Berdasarkan jumlah sel kultur yang diinfeksi dan jumlah virus yang diinfeksi maka dapat ditentukan kemampuan tiap sel dalam memperbanyak virus yaitu kurang lebih 2,545 PIB's/ml (angka ini diperoleh dari $23,67 \times 10^6 \text{ PIB's/ml} : 9,3 \times 10^6 \text{ sel/ml} = 2,545 \text{ PIB's/ml}$)

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa lama waktu lisisnya sel primer epitel usus larva *S. Litura* yang diinfeksi dengan *SpLtMNPV* dengan lama inkubasi 24, 48 dan 72 jam menunjukkan bahwa sel kultur tersebut lisis dalam waktu 24 jam. Dan tiap sel kultur mampu memproduksi PIBs sebanyak 2,545.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang mekanisme infeksi secara lengkap pada sel terinfeksi hasil kultur secara in vitro, sehingga mekanisme infeksi virus ini dapat dipastikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Asri, M.T. dan Isnawati, 2005. **Effektifitas dan Karakterisasi SpLtMNPV yang Telah Terpotong Material Genetiknya**. Unesa. Surabaya
- Asri, M.T dan Fida R, Yuliani, Evie R dan Herlina. F. 2005. **Pengaruh *Beauveria bassiana* dan SpLtMNPV Terhadap Larva *S. Litura* Pada Tanaman Jarak**. Unesa. Surabaya.
- Asri, M.T. 2004. **Perbanyakan SINPV secara in Vivo Pada Larva *S. Litura***. Unesa. Surabaya
- Freshney, R.I. 2000. **Culture of Animal Cell**. A. John Wiley & Sons, Inc. Publication, New York
- Mangoendiharjo,S dan Pollet, 1991. **Insect viruses and the Possible Application and NPV for the Control of Army Worm *Spodoptera litura***. In Risalah Lokakarya Pengendalian Hama Terpadu Tanaman Kedelai. Departemen Pertanian. Balai Penelitian Tanaman Pangan. Malang.

