

MORFOLOGI *SpltMNPV* (*Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus) ISOLAT JAWA DI LIHAT DENGAN MENGGUNAKAN MIKROSKOP ELEKTRON TRANSMISI DAN SCANING

Mahanani Tri Asri

Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Surabaya
Jl. Ketintang no 3,4 Surabaya
mahananitria@gmail.com

ABSTRAK

Spodoptera litura multiple nucleopolyhedrosis virus merupakan salah satu virus yang dapat menyebabkan penyakit pada insekta khususnya hama *Spodoptera litura*. Virus ini sudah digunakan sebagai biopestisida yang efektif untuk mengendalikan hama *Spodoptera litura*. Penelitian ini bertujuan untuk melihat morfologi *SpltMNPV* apabila dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi (TEM) dan mikroskop elektron scanning (SEM). Morfologi *SpltMNPV* dibagian permukaan dapat diamati dengan menggunakan SEM dan TEM dapat digunakan untuk melihat bagian dalam dari virus. Pengamatan dengan TEM dilakukan di lembaga Eijkment Jakarta dengan preparasi menggunakan metode SPURR dan pengamatan dengan SEM dilakukan di laboratorium Hayati Universitas Brawijaya, dengan preparasi menggunakan pelapis emas dan pelarut DMSO. Hasil dari penelitian ini diperoleh hasil bahwa morfologi *SpltMNPV* dengan menggunakan mikroskop elektron scanning berbentuk seperti dadu (segi 6) dan dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi berbentuk bulat, bermembran, di dalamnya terdapat multiple nucleocapsid, serta mempunyai fili.

Kata kunci: morfologi, *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (*SpltMNPV*), Mikroskop elektron transmisi dan scanning

PENDAHULUAN

SpltMNPV yang digunakan dalam penelitian ini merupakan *SpltMNPV* murni yang diisolasi dari larva *S. litura* di daerah Wonosobo, Jawa Tengah. Pemberian nama *SpltMNPV* berdasarkan studi tentang *sequence/urutan* nucleotide polyhedrin sehingga diperoleh pohon filogenetik yang telah dilakukan oleh Wahyuni, 2002. Pada pohon filogenetik tersebut *SpltMNPV* isolat Jawa diberi kode JT1 yang dimasukkan dalam kelompok *SpltMNPV* tipe C. NPV (Nuclear Polyhedrosis Virus) merupakan virus yang termasuk dalam famili Baculoviridae yang banyak menyerang serangga ordo Lepidoptera (Seufi, A. 2008; Gothama, 1994; Murphy *et al.*, (1995). Nucleopolyhedrovirus genus (NPV) ditandai oleh adanya bentuk polyhedral virus (OBs/*Oclution bodies*), yang masing-masing mengandung beberapa virion yang terbentuk di dalam nukleus. Menurut Herniau, *et al.*, (2004). *SpltMNPV* termasuk ke dalam NPV lepidopterans Grup II, satu kelompok dengan WiceNPV 344 (*Wiseana cervinata* NPV 344 ordo Lepidptera)

Morfologi NPV: Baculoviridae ditandai dengan bentuk nucleocapsid yang seperti batang. Nucleocapsid berisi DNA yang diselubungi oleh selubung protein yang disebut capsid. Beberapa nucleocapsid dibungkus lagi oleh selubung yang disebut *envelope*. Material genetik dan protein kapsid dinamakan virion. Virion ini yang bersifat infeksius. Virion *SpltMNPV* berbentuk batang

(O'Reilly, *et al.*, 1992). Gabungan dari beberapa virion tersebut berbentuk kristal yang berisi protein polyhedrin sehingga disebut *Polyhedra Inclusion Bodies* (PIB). Fungsi polihedra adalah sebagai pelindung DNA virus dari degradasi akibat sinar ultra violet matahari serta menjaga viabilitasnya di alam. Polyhedra *SpltMNPV* apabila dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali berbentuk bulat agak segi empat (Asri, 2005). Menurut Ahmad, *et al.*, (2000) Polihedra mempunyai banyak bentuk misalnya bulat, spherical, oval dan bersegi banyak (Samsudin, 2000). Polyhedra mengandung banyak virion dengan nukleokapsid yang lebih dari satu pada tiap virionnya, mempunyai ukuran berkisar antara 1,9-2,8 mikrometer, sedangkan menurut Samsudin (2000), virion mempunyai diameter 0.2 - 20 nm. Virus yang menyerang *S. litura* diberi nama *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus karena mempunyai banyak nucleocapsid dalam *Polyhedra inklution bodies* (PIB)nya sehingga disebut Multiplenucleocapsid. (Wahyuni, 2002).

Mikroskop electron transmisi dapat digunakan untuk melihat morfologi sel sampai ke struktur dalam dari sel. Sedangkan mikroskop electron scanning bisa digunakan untuk melihat morfologi dari permukaan suatu sampel misalnya sel atau virus. Berdasarkan hal tersebut maka dalam penelitian ini ingin diketahui bentuk morfologi *SpltMNPV* apabila dilihat dengan

menggunakan mikroskop electron transmisi maupun bila dilihat dengan menggunakan mikroskop electron scanning sebagai langkah awal identifikasi virus yang ditemukan di daerah Wonosobo. Jawa Tengah.

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, mikroskop elektron transmisi, mikroskop elektron scanning, Laminar Air Flow (LAF), inkubator, sterilisator kering (oven), autoclave, sentrifuse, magnetik stirer, membran millipore. Peralatan pendukung terdiri dari : cawan petri, cawan kultur, jarum pentul, stereofom, tabung sentrifuse, alat bedah mikro, spuit, Aluminium foil, penyangkai bakteriologis, penyangkai nilon ukuran T 100 dan 150.

Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah medium Ex-cell, Posphat Buffer saline, enzim tripsin, *SpltMNPV* isolat Wonosobo Jawa Tengah, larva *Spodoptera litura* instar 3, pakan buatan untuk larva *S. litura*, Bayclin, DMSO, Na_2CO_3 , Alkohol 70% sebagai agen pensteril, antibiotik penisilin-treptomisin, gentamisin dan antifungi berupa Amfoterisin-B serta akuades.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional karena hanya melakukan pengamatan terhadap morfologi *SpltMNPV* yang telah ditumbuhkan pada kultur sel epitel midgut larva *S. litura*. Morfologi *SpltMNPV* diamati dengan menggunakan 2 macam mikroskop yaitu mikroskop electron transmisi untuk melihat struktur dalam dari *SpltMNPV* dan mikroskop elektron scanning untuk melihat morfologi *SpltMNPV* pada bagian permukaan luar. Proses Penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu:

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan sel primer epitel midgut larva *S. litura* dan rekulture sel primer

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 midgut larva dengan menggunakan alat bedah mikro dan diamati di bawah mikroskop stereo. Jaringan epitel midgut larva yang terambil dicuci dengan PBS dan dipotong-potong sampai halus di dalam PBS. Potongan midgut larva ditripsinasi dengan perbandingan 1 : 1 antara larutan tripsin (0,25%) dengan cairan PBS + midgut, 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 midgut sudah terdispersi apa belum, apabila belum terdispersi maka tripsinasi diulangi lagi. Hasil sentrifus selanjutnya supernatannya di buang sebagian, endapan ditambahkan medium Ex-cell dan difilter dengan menggunakan penyaring nilon dengan ukuran T 100 dan T150 untuk memisahkan sel epitel dengan jaringan yang tidak terdispersi. Sel-sel epitel midgut dalam medium pertumbuhan ditanam pada cawan kultur (*disposable*) berukuran 3 ml. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 30° C sampai sel 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) dan dalam keadaan tidak steril, maka PIB's ini harus dipecah terlebih dahulu dengan menggunakan larutan alkalis yaitu Na_2CO_3 0,5M dan dimagnetik stirer (diputar di atas magnetik stirer) 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. Virus yang dalam bentuk multiplenucleocapsid ini lolos dari saringan membran filter ukuran 0,22 mikron, sehingga dapat diinfeksi ke sel dalam kultur.

3. Penginfeksian *SpltMNPV* pada sel 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 diteteskan pada medium kultur sel primer. Dosis sel awal yang digunakan adalah $7,6 \times 10^7$ PIB/ml. Sel hasil rekulture ke 2, 3, 4 dan 5 diinfeksi dengan *SpltMNPV* sebanyak $1,1 \times 10^6$ Multiple nukleocapsid/ml. Selanjutnya medium kultur yang telah diinfeksi diinkubasi pada suhu 30°C . Setiap hari kultur sel terinfeksi diamati perkembangannya. Kultur yang jumlah selnya mulai

sedikit- sampai sedang maka inokulum ini dapat diteruskan untuk preparasi mikroskop electron.

4. Preparasi *SpltMNPV* untuk pengamatan dengan menggunakan mikroskop electron transmisi.

Preparasi *SpltMNPV* dalam kultur sel epithel midgut larva *S. litura* dilakukan dengan menggunakan metode SPUUR'S yaitu sampel sebanyak 100 µl atau 1x1x1 mm di **Fiksasi** dengan menggunakan 500 µl dari 0,1M sodium cacodylate (pH 7,4) dan 500 µl buffer glutaraldehyde 5% dalam Sodium cacodylate + 3% sukrosa (v/v) serta 500 µl 2% osmium tetroxide + 2,5% $K_3Fe(CN)_6$ dalam buffer. Tahap berikutnya adalah **Dehidrasi dengan cara** Pelet didehidrasi secara berurutan dengan seri ethanol (10,20,30,selama 5 menit dan konsentrasi 40, 50,60,70,80 dan 95% selama 10 menit) sambil di shaker kecepatan 3000. Selanjutnya tahap **infiltrasi/peresapan pada** 500 µl ethanol absolut dan propylene oxide dalam perbandingan tertentu (2:1; 1:1;1:2; dan 0) pada suhu ruang selama 30 menit (menggunakan shaker); Disentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, selanjutnya supernatan dibuang setiap kali mengganti cairan. Tahap berikutnya adalah **Tahap Embedding/Penanaman:** Pelet dicelupkan dalam propylene oxide dan campuran SPURR'S dengan perbandingan 1:1 dengan di shaker pada suhu ruang selama 30 menit. Disentrifuse dan sebagian ditambah campuran plastik murni . Sampel blok diletakkan dalam tabung dicelupkan kembali dengan campuran SPURR'S plastik murni pada inkubator vakum suhu 70°C selama 8 – 16 jam. Tahap berikutnya adalah membuat sayatan dari sampel blok tadi yang bertujuan memotong sayatan setipis mungkin agar mudah diamati di bawah mikroskop. Praparasi 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.

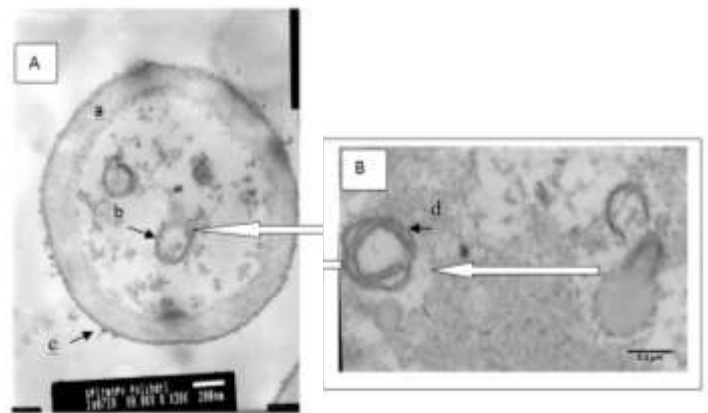
5. Preparasi *SpltMNPV* untuk pengamatan dengan menggunakan mikroskop electron scanning

SpltMNPV dalam kultur sel epithel midgut larva *S. litura* dalam media Ex-cel dilarutkan terlebih dahulu dengan menggunakan DMSO, selanjutnya virus dalam kultur di spread/ditebar langsung ke alas khusus, yang sebelumnya ditutupi dengan pita tembaga , kemudian di keringkan dengan oven. Kemudian sampel dilapisi

dengan karbon dan emas, dan virus dapat dilihat dengan SEM (mikroskop electron scanning)

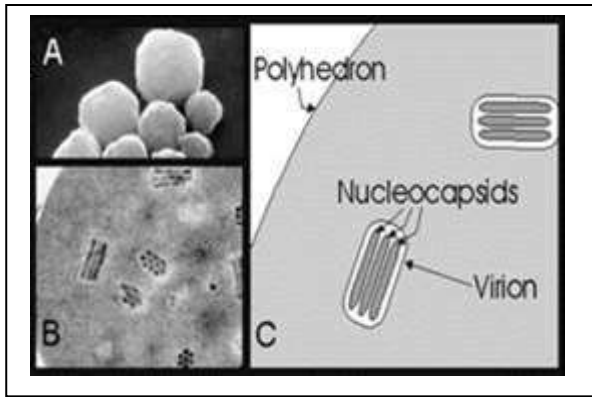
HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil pengamatan dengan menggunakan mikroskop electron transmisi Morfologi dari *Polyhedra inclusion bodies* dari *SpltMNPV* yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai bentuk bulat tidak teratur, dengan beberapa multiplenucleocapsid didalamnya. Mempunyai membrane yang doble serta ditepi membrane luar terdapat “fili (Gambar 1). Fili yang terdapat di permukaan membrane luar ini menyebabkan *SpltMNPV* dapat berpindah tempat apabila *SpltMNPV* ditumbuhkan pada sel kultur dengan menggunakan



Gambar 1. Morfologi *Polyhedra SpltMNPV* diamat dengan menggunakan Mikroskop elektron transmisi (a= membran, b= multiple nucleocapsid, c. fili, d. multiple nucleocapsid yang berisi nucleocapsid)

Bentuk polyhedra *SpltMNPV* apabila dilihat dengan TEM berbentuk bulat tidak teratur, akan tetapi bila dilihat dengan SEM berbentuk segienam/hexagonal (Gambar 3) seperti pendapat Bilimoria, 1986 dalam Wahyuni, 2002 yang menyatakan bahwa *Polyhedral Inclusion Body (PIB)* umumnya membentuk kristal dan diliputi oleh matrik protein, serta berbentuk segi banyak. Morfologi *SpltMNPV* yang berbentuk bulat tersebut apabila dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron Scanning ini sama dengan morfologi NPV yang ditemukan oleh Amico, (1997). Di dalam polyhedra NPV yang ditemukan oleh Amico, 1997 juga terdapat multiple nucleocapsid yang sama dengan *SpltMNPV* yang digunakan dalam penelitian ini. Perbedaannya hanya susunan nucleocapsidnya. Pada NPV yang ditemukan Amico, 1997 posisi nucleocapsidnya adalah tegak lurus sedangkan nucleocapsid *SpltMNPV* dalam penelitian ini ternyata dalam posisi melengkung.



Keterangan:

A = partikel polihedra

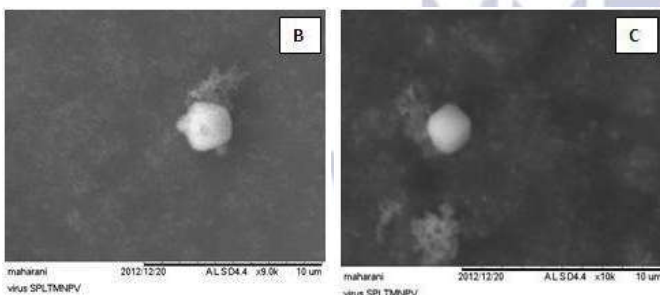
B = irisan melintang polihedra, terlihat nucleocapsid dalam bentuk lurus yang berjajar 3.

C = diagram irisan melintang polihedra

Gambar 2. Struktur NPV (Sumber: Amico, 1997)

Perbedaan lain yang ditemukan pada penelitian ini adalah adanya ‘fili’ yang terdapat pada membrane luar dari polyhedral *SpltMNPV*. Adanya fili ini disebabkan karena sel inang dari virus ini adalah sel epitel midgut larva *S. litura* yang berfili. Fili ini diperoleh dari membrane luar sel inang pada saat proses perakitan dari *spltMNPV* yang mengambil membrane luar dari sel inang untuk membentuk polyhedral dari *SpltMNPV* (Asri, 2013). Fili ini menyebabkan *SpltMNPV* dapat berpindah tempat.

Polyhedra *SpltMNPV* apabila dilihat dengan menggunakan mikroskop electron scanning berbentuk seperti ‘dadu’ atau segi enam/hexagonal seperti terlihat pada Gambar 3. Polyhedra *SpltMNPV* berukuran 2,5 μm . Polyhedra *SpltMNPV* berukuran lebih besar daripada *HaNPV* yaitu 0,5 – 0,7 μm , Lua and Reid, (2000).



Gambar 4. Polyhedra inclusion bodies dari *SpltMNPV* dilihat dengan mikroskop elektron scanning (A perbesaran 9000 kali, Gambar B dan C perbesaran 10.000 kali)
Bar = $\pm 42 \text{ mm} = 10 \mu\text{m}$ maka polyhedra yang panjangnya $\pm 10 \text{ mm} = 2,5 \mu\text{m}$

Berdasarkan Gambar 4 terlihat bahwa Polyhedral Inclusion Bodies dari *SpltMNPV* tidak sama ukurannya ada yang besar dan ada yang kecil (Gambar 4A).

Keanekaragaman bentuk ini akan mempengaruhi jumlah Nucleocapsid yang dikandung oleh polyhedral tersebut. Jumlah nucleocapsid yang berbeda akan menyebabkan infektivitas virus ini berbeda.

SIMPULAN

Hasil dari penelitian ini diperoleh kesimpulan morfologi *SpltMNPV* dengan menggunakan mikroskop elektron scanning berbentuk seperti dadu (segi 6) dan dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi berbentuk bulat, bermembran, di dalamnya terdapat multiple nucleocapsid, serta mempunyai fili.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmads. Sajapi., James. R. Kotulap., Mohamadd A. Bakir., Lau W. Hong., Norania A., Samad and Hussana A. Kadir. 2000. Pathogenicity and Characteristics of *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus from Peninsular Malaysia. *Pertanika J. Trap. Agric. Sci.* 23(1): 23 – 28. ISSN: 1511-3701
- Asri, Mahanani Tri, 2013. Mekanisme Infeksi Dan Efektivitas *Spodoptera Litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (*Spltmnpv*) *In Vitro* Dalam Formula Foto-Protektan Terhadap Mortalitas Larva *Spodoptera Litura*. Desertasi. Tidak dipublikasikan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Asri, M.T dan Isnawati, 2005. Efektivitas dan Karakterisasi *SpltMNPV* yang Telah Terpotong Material Genetiknya. Laporan Penelitian. Tidak di Publikasi. Unesa. Surabaya
- Gothama, A.A.A, Indrayani, I.G.A.A., dan 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
- Herniou, E.A., Julie A. Olsszewski., David R. O'Reilly., and Jenny S. Cory. 2004. Ancient Coevolution of Baculovirus and Their Insect Host. *Journal of Virology*. P. 3244-3251
- Linda H. L. dan Steven Reid. 2000. Morphogenesis Virus of *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* Serum-free Suspension Culture. *Journal of General Virology*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10993944>
- Murphy, F.A.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.; Ghabrial, S.A.; Jarvis, A.W.; Martinelli, G.P.; Mayo, M.A. and Summers, M.D. 1995. *Virus Taxonomy*. Springer Verlag, Vienna
- .Seufi A.M. 2008. Characterization of an Egyptian *Spodoptera littoralis* Nucleopolyhedrovirus and a Possible Use of a Highly Conserved Region from Polyhedrin Gene for Nucleopolyherovirus Detection. *Virology Journal* 5:13

- O, Reilly, D.R. Lois, L.M., Verne, A.L. 1992. Baculovirus Expression Vector. A Laboratory Manual. W.H. Freeman and Company. New York
- Wahyuni, E. 2002. Molecular Analysis of *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrovirus (*SpltMNPV*) From Different regions in Indonesia. Yogyakarta: Gadjah Mada University.

