

## **PENGEMBANGAN METODE PENGINFEKSIAN SPODOPTERA LITURA MULTIPLE NUCLEOPOLYHEDROSIS VIRUS (SpLtMNPV) PADA SEL PRIMER EPITEL USUS LARVA *SPODOPTERA LITURA***

**Mahanani Tri Asri, Nur Ducha**

*Jurusan Biologi FMIPA UNESA*

### **Abstrak**

*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. Pengembangan virus hanya bisa dilakukan dengan menggunakan inang aslinya (in vivo). Sementara perbanyakan inang aslinya banyak mengalami kendala sehingga dikembangkan Kultur sel insekta (in vitro). Kultur sel primer insekta telah berhasil dikembangkan dari sel epitel usus larva *S. Litura*. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode penginfeksi *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (SpLtMNPV) pada sel Primer Epitel Usus *Spodoptera litura*. Penelitian ini merupakan penelitian observasi untuk mengembangkan metode penginfeksi SpLtMNPV pada sel Primer Epitel Usus *Spodoptera litura*. Data yang diperoleh meliputi metode penginfeksi virus yang berupa 1. Pemurnian virus (in vivo) 2. Pemecahan Polyhedra Virus dengan menggunakan larutan alkalis (Natrium karbonat 0,5 M). 3. Dosis infeksi SpLtMNPV dalam cawan kultur adalah  $1,1 \times 10^6$  Multiple nukleokapsid/ml. 4. Sterilisasi SpLtMNPV tanpa Polyhedra menggunakan filter bakteriologis (0,22 mikron). 5. Sel kultur terinfeksi diinkubasi selama 3 hari. 6. Pemurnian virus (in vitro). Hasil dari penelitian ini adalah adanya peningkatan jumlah virus yang berhasil diisolasi dari medium kultur in vitro ( $2,367 \times 10^7$  PIBs/ml).

**Kata kunci :** Metode infeksi, kultur primer sel insekta, *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis virus (SpLtMNPV) .

### **PENDAHULUAN**

Penggunaan insektisida kimiawi selama ini cukup efektif karena mampu mengatasi serangan hama dalam waktu singkat. Namun pestisida kimiawi ini selain memberikan manfaat juga menimbulkan kerugian terutama terhadap keseimbangan lingkungan. Di lain pihak harga pestisida kimiawi di Indonesia cukup tinggi, sehingga dapat membebani biaya produksi pertanian. Untuk mengatasi masalah tersebut, sekarang telah dikembangkan alternatif pengendalian hama diantaranya dengan pengendalian secara biologi, yaitu bioinsektisida. Bioinsektisida menggunakan musuh alami untuk mengendalikan hama, diantaranya dari golongan bakteri, jamur atau virus.

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*) 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 tersebut virus 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% (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.

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, sehingga dalam penelitian ini bertujuan mencari metode yang tepat untuk penginfeksi tersebut sehingga kita dapat memperbanyak virus secara *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### 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.

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, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Alkohol 70% sebagai agen pensteril, antibiotik penisilin-treptomisin dan antifungi berupa Amfoterisin-B, akuades.

### Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasi yang dilakukan untuk menemukan metode yang tepat guna menginfeksi sel primer epitel usus larva *S. Litura* dengan SpLtMNPV, sehingga SpLtMNPV dapat dibiakkan secara *in vitro* serta dapat dimurnikan kembali.

### 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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5M. Dan dimagnetic 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.

## 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- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  difiltrasi dengan membran filter bakteriologis (pori-pori 0,22 mikron) dan diteteskan pada medium kultur sel primer. Selanjutnya medium kultur yang telah diinfeksi diinkubasi selama 3 hari. Dan setiap hari diamati terjadinya perubahan morfologis dari sel kultur dengan menggunakan mikroskop inferted. Sel primer pada awalnya akan berbentuk bulat oval kemudian membesar dan akhirnya selnya hilang serta muncul PIB's yang bentuknya berbeda dengan sel primer.

## 3. Isolasi SpLtMNPV hasil perbanyakan secara *in vitro*.

Apabila sel primer (bentuk bulat –oval berinti sel, dan berukuran cukup besar) dalam cawan kultur telah berubah menjadi PIB'S (bentuknya bulat-agak segi empat, terang tanpa inti sel, dan lebih kecil) artinya selnya telah dilisis oleh SpLtMNPV biasanya pada inkubasi hari ke-3. Maka SpLtMNPV siap untuk diisolasi/dipanen. Sel sisa dirontokkan dengan cara dispuir dan dikembalikan berulang-ulang maka media menjadi homogen antara SpLtMNPV dan debrisnya sel primer. Semua media beserta isinya diambil dan dimasukkan dalam tabung sentrifuse untuk dimurnikan. Suspensi media dan virus tersebut disentrifuse pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan dan peletnya jangan dibuang karena mengandung virus. SpLtMNPV hasil isolasi ini dapat digunakan sebagai bioinsektisida.

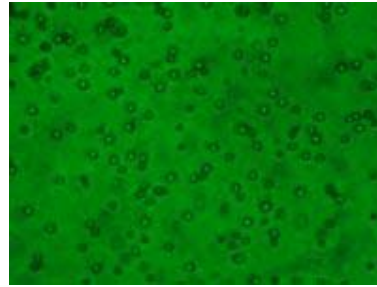
## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan metode yang bisa diterapkan untuk memperbanyak SpLtMNPV pada sel primer epitel usus *S. litura* adalah 1. Pemurnian virus (*in vivo*) 2. Pemecahan Polyhedra Virus dengan menggunakan larutan alkalis (Natrium karbonat 0,5 M). 3. Dosis infeksi SpLtMNPV dalam cawan kultur adalah  $1,1 \times 10^6$  Multiple nukleocapsid/ml. 4. Sterilisasi SpLtMNPV tanpa Polyhedra menggunakan filter bakteriologis (0,22 mikron). 5. Sel kultur terinfeksi diinkubasi selama 3 hari. 6. Pemurnian virus (*in vitro*). Hasil dari penelitian ini adalah adanya peningkatan jumlah virus yang berhasil diisolasi dari medium kultur *in vitro* ( $2,367 \times 10^7$  PIBs/ml).

Pada tahap pertama yaitu pemurnian virus secara *in vivo* dimaksudkan untuk mendapatkan stater virus (Gambar 1 dan 2) yang akan dibiakkan secara *in vitro*. Virus stater *in vivo* diperoleh dari pemurnian ulat *S. litura* yang mati virus dengan ciri tubuhnya berwarna coklat susu, lunak, mengkilap dan bila disentuh tubuh ulat akan pecah serta mengeluarkan cairan berwarna putih keruh yang berisi PIB's virus. Ulat yang mati terinfeksi virus dihancurkan dalam akuades dan disaring dengan kain tipis serta dimasukkan dalam tabung sentrifuse dan sentrifuse pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet kembali diisi akuades serta disentrifuse dengan kecepatan dan waktu yang sama, supernatan dibuang. Dan sentrifuse diulangi sampai supernatan jernih. Pelet yang diperoleh digunakan sebagai stater virus awal.



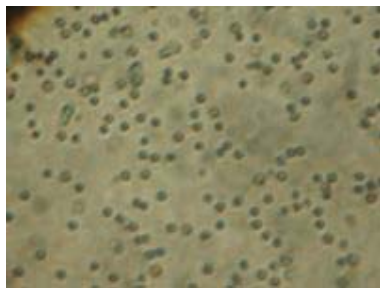
Gambar 1, SpLtMNPV stater in vivo



Gambar 2. Hasil foto virus SpLtMNPV dengan mikroskop inverted

Pada tahap kedua adalah penghitungan konsentrasi virus. Karena SpLtMNPV dalam bentuk polyhedra yang besar sehingga dapat dilihat dengan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali, maka konsentrasi virus yang akan digunakan untuk menginfeksi sel primer dapat dihitung dengan menggunakan *Haemocytometer*. Konsentrasi virus yang dapat menginfeksi sel primer sekitar  $1,1 \times 10^6$  PIB's/ml. Kerapatan dari virus yang diinfeksi penting untuk diperhatikan karena kemungkinan 1 sel hanya bisa diinfeksi oleh satu virus karena ada mekanisme setelah virus masuk ke dalam sel maka sel ini akan menutup kembali membran sel yang rusak. Hal ini juga berkaitan dengan kompetisi virus dalam mendapatkan komponen sintesis virus. Jumlah sel primer per ml sekitar  $9,3 \times 10^6$  sel/ml.

Tahap ketiga dari mekanisme penginfeksi SpLtMNPV pada kultur sel primer adalah pemecahan Polyhedra Inclusion Bodies (PIB'S) karena PIB ini berukuran besar sedangkan sel primernya relatif kecil sehingga PIB's tidak bisa masuk ke dalam sel. Apabila infeksi in vivo PIB ini akan dipecah oleh larutan alkali saluran pencernaan ulat *S. litura*. Sehingga dalam penelitian ini digunakan larutan alkali  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M yang mempunyai pH 10,02. Virus dimasukkan dalam larutan alkali ini dan di putar dengan magnetik stirer selama 1 jam. SpLtMNPV yang sudah pecah PIB'Snya ditandai dengan hilangnya penampakan SpLtMNPV di bawah mikroskop inverted perbesaran 400 kali. (Gambar 3 dan 4)



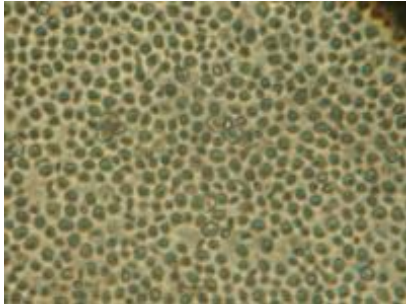
Gambar 3 Virus SpLtMNPV dalam PIB



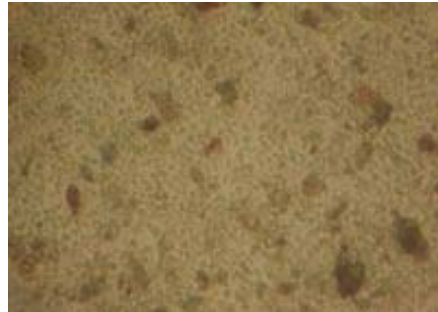
Gambar 4 Virus SpLtMNPV Multiple nucleocapsid tanpa PIB (setelah diberi perlakuan larutan alkalis morfologi virus tidak bisa terlihat dengan menggunakan mikroskop biasa maupun inverted)

Tahap keempat adalah sterilisasi virus yang sudah tidak berPIB's dengan menggunakan membran filter bakteriologis (porinya 0,22 mikron) tujuannya untuk mensteril larutan virus dari mikroba sebelum dimasukkan dalam kultur sel primer yang steril. Selanjutnya larutan virus steril dimasukkan ke dalam cawan yang berisi kultur sel primer dan diinkubasi selama 3 hari serta diamati kepadatan dari sel primernya. Pada hari pertama infeksi sel masih monolayer, kemudian di hari kedua selnya mulai jarang dan muncul sel primer yang berukuran besar (Giant Cell) serta di hari ketiga sel primernya mulai menghilang dan muncul beberapa sel yang budding (menguncup). Bentuk sel primer yang berubah tersebut berkaitan dengan proses reproduksi virus yang terjadi di

dalam sel primer. Pada saat virus baru menginfeksi sel. Morfologi virus (diamati dengan mikroskop inferted perbesaran 400 kali) asih normal dan monolayer tetapi dihari kedua ternyata virus suha mulai berkembang biak dan terbentuk banyak komponen virus ( asam nukleat/DNA, kapsid dan envelope dalam sitoplasma yang selanjutnya dirakit menjadi multiplenucleocapsid yang terkumpul dalam sitoplasma dalam jumlah banyak sehingga sel primer membengkak membentuk Giant cell. Selanjutnya perakitan berikutnya adalah membentuk polyhedra yang diambil dari membran sel primer epitel usus sehingga sel tampak budding (menguncup). Oleh karena selubung terluar virus berasal dari membran sel primer yaitu sel epitel usus larva S. Litura yang mempunyai villi untuk penyerapan makanan maka polyhedra SpLtMNPVpun mempunyai villi sehingga dapat bergerak mengikuti arus apabila berada dalam cairan (Gambar 5, dan 6).



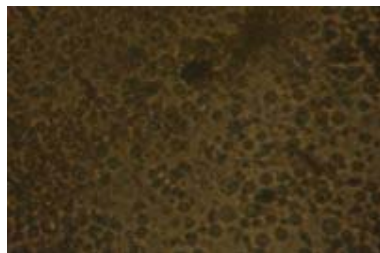
Gambar 5.



Gambar 6.

Gambar 5. Kultur sel primer monolayer yang siap diinfeksi dengan virus

Gambar 6. Kondisi sel primer setelah 24 jam perlakuan virus. Sel-sel tampak mulai jarang kerapatannya



Gambar 7.



Gambar 8.

Gambar 7. Kondisi sel primer setelah 48 jam perlakuan virus. Sel-sel tampak jarang kerapatannya, tampak beberapa sel berukuran besar (*giant cell*)

Gambar 8. Kondisi sel primer setelah 72 jam perlakuan virus. Tampak adanya sel yang membentuk kuncup (*budding*).

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metode penginfeksian SpLtMNPV pada sel primer epitel usus larva S. litura meliputi : 1. Pemurnian virus (in vivo) 2. Pemecahan Polyhedra Virus dengan menggunakan larutan alkalis (Natrium karbonat 0,5 M). 3. Dosis infeksi SpLtMNPV dalam cawan kultur adalah  $1,1 \times 10^6$  Multiple nukleocapsid/ml. 4. Sterilisasi SpLtMNPV tanpa Polyhedra menggunakan filter bakteriologis (0,22 mikron). 5. Sel kultur terinfeksi diinkubasi selama 3 hari. 6. Pemurnian virus (in vitro). Hasil dari penelitian ini adalah adanya peningkatan jumlah virus yang berhasil diisolasi dari medium kultur in vitro ( $2,367 \times 10^7$  PIBs/ml).

**Saran**

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang dosis larutan alkali yang bisa memecah PIB'S dari SpLtMNPV tetapi tidak mempengaruhi pH media kultur.

**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