

**ELEKTRON MIKROSKOPI DAN IMUNOGENISITAS *BACULOVIRUS ORYCTES*
ISOLAT YOGYAKARTA**

**ELECTRON MICROSCOPY AND IMUNOGENICITY *BACULOVIRUS ORYCTES*
YOGYAKARTA ISOLATE**

Y.B. Sumardiyono

Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Palm rhinoceros beetle (*Oryctes rhinoceros*) was infected *per os* with Yogyakarta isolate of *Baculovirus oryctes* in laboratory condition. Midguts of infected beetle obtained were then extracted for further nucleoprotein purification by centrifugation method. Electron microscopy studies on purified nucleoprotein revealed rod-shape viruses with rounded end measured 190 x 94 nm in average. One end of the particle showed tail-like structure. Antibodies against the virus were obtained by immunisation to rabbit, and reacted against either purified virus or extract of infected beetle, but not against extract of healthy beetle.

Key words : *Baculovirus oryctes*, polyclonal antibody

INTISARI

Kumbang kelapa (*Oryctes rhinoceros*) diinfeksi *per os* dengan *Baculovirus oryctes* isolat Yogyakarta. Usus tengah kumbang terinfeksi dihomogenisasi dalam PBS, untuk pemurnian virus dengan sentrifugasi. Sediaan virus murni kemudian diamati dengan mikroskop elektron dan untuk imunisasi kelinci. Hasil pengamatan dengan mikroskop elektron menunjukkan bahwa virion berbentuk batang dengan ujung membulat dengan ukuran 190 x 94 nm, dan pada salah satu ujungnya ditemukan struktur seperti ekor. Virus dapat mengimbas terbentuknya antibodi, yang pada uji ELISA tak langsung dapat bereaksi dengan ekstrak kumbang terinfeksi virus dan sediaan virus, tetapi tidak bereaksi dengan ekstrak kumbang sehat maupun coating buffer.

Kata kunci : *Baculovirus oryctes*, antibodi poliklonal

PENGANTAR

Infeksi *Baculovirus oryctes* pada kumbang kelapa (*Oryctes rhinoceros*) telah dikenal di beberapa negara, antara lain di Malaysia, Filipina, Indonesia dan beberapa negara di kawasan Pasifik (Huger, 1966; Zelazny, 1977). Baik larva maupun kumbang dewasa rentan terhadap infeksi *B. oryctes*. Tetapi efek patogenik berbeda-beda tergantung pada strain virus, stadium serangga, dan lingkungan hidup serangga. Pada larva infeksi virus umumnya bersifat letal, tetapi infeksi pada kumbang beragam antara laten sampai letal. Saat ini virus dimanfaatkan untuk pengendalian hayati kumbang kelapa (Bedford, 1981).

Virus termasuk di dalam *Baculovirus* dari kelompok *nonoccluded Baculovirus*, nukleokapsid tunggal terbungkus dua lapis membran. Virion berbentuk batang, dengan ukuran panjang antara 200 - 235 nm dan lebar antara 100 - 120 nm. Genom virus berupa sebuah molekul DNA untai

ganda, dengan kisaran berat molekul antara 60.10^6 sampai 92.10^6 Dalton. Persentase kandungan C+G sekitar 43 - 44% (Huger dan Krieg, 1991).

Partikel virus banyak ditemukan di dalam *nucleus of fat body cells*, dan nukleus sel epitelium usus tengah serangga yang terinfeksi. Multiplikasi virus terutama terjadi dalam sel epitelium usus tengah. Pada kumbang dewasa afinitas virus terutama dengan sel epitelium usus tengah, dan pada sel-sel tersebut multiplikasi virus terutama berlangsung. Partikel virus dari sel epitelium usus tengah larva maupun kumbang terinfeksi dapat terbawa faeces, yang akan menjadi sumber inokulum dalam penular *per os* ke serangga lain (Payne, 1974). Penularan cara lain terjadi melalui kopulasi antara jantan terinfeksi dengan betina sehat, yang menyebabkan sebagian besar dari progeni ikut terinfeksi.

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari kajian purifikasi virus, yang bertujuan untuk

mengamati morfologi virion dan imunogenisitas virus bila diimmunisasikan dalam tubuh kelinci.

BAHAN DAN METODE

Isolat Virus

Baculovirus oryctes isolat Yogyakarta diperoleh dari kumbang terinfeksi secara alamiah di lapangan. Perbanyakkan massal serangga untuk propagasi isolat virus dilakukan di laboratorium lapangan Dinas Perkebunan Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta di Wonocatur, berdasarkan metode pemeliharaan yang dianjurkan oleh Dinas Perkebunan. Larva sehat dikumpulkan dari lapangan, kemudian kumbang sehat yang diperoleh diinokulasi *per os* dengan beberapa tetes ekstrak usus tengah kumbang sakit. Dua minggu kemudian dilakukan pembedahan untuk mengambil usus tengah yang terinfeksi, yang selanjutnya digunakan untuk bahan purifikasi virus.

Purifikasi

Purifikasi dilakukan dari jaringan usus tengah kumbang terinfeksi hasil perbanyakkan massal, menurut cara Kobayashi dan Somowiyarjo (1995). Usus tengah dari 10 kumbang terinfeksi dengan gejala yang jelas dilumatkan dalam *Phosphate-buffered saline* pH 6,2. Homogenat disentrifugasi pada 1.800 x g selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh disentrifugasi pada 85.000 x g selama satu jam pada 15°C. Pelet kemudian diresuspensikan dengan sedikit PBS, dan kemudian disentrifugasi pada gradien sukrose 10 - 40%. Setelah sentrifugasi selama 30.000 x g selama 30 menit pada 15°C. Lapis yang diperoleh diambil dan di-larutkan dalam larutan penyangga TRIS-EDTA (10mM Tris HCL; 1 mM EDTA, pH 8,0). Kemudian disentrifugasi pada 85.00 x g selama satu jam pada 15°C, pelet yang diperoleh kemudian resuspensi dalam 1 ml larutan penyangga Tris-EDTA dan disimpan pada suhu 20°C untuk studi berikutnya.

Elektron mikroskopi

Sediaan virus hasil purifikasi diamati dengan mikroskop elektron metode pengecatan negatif dengan uranyl asetat 2 persen. Pengamatan

dilakukan di Laboratorium Mikroskopi Elektronik Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu; dengan mikroskop elektron JEM 100C pada 100 kV.

Imunisasi Kelinci dan Preparasi Antibodi

Virus hasil pemurnian disuntikkan ke dalam tubuh kelinci secara intramuskular dengan interval waktu satu bulan. Penyuntikan pertama dilakukan dengan 200 µl virus murni ditambah *Freund's complete adjuvan* dengan volume yang sama. Penyuntikan kedua dan ketiga ditambah dengan *Freund's incomplete adjuvan*. Booster dilakukan seminggu setelah penyuntikan ketiga tanpa penambahan adjuvan secara intravena pada vena tepi telinga kelinci. Sepuluh hari setelah booster darah kelinci dikoleksi di dalam tabung gelas piala, kemudian diletakkan di dalam suhu 4°C. Serum yang berupa cairan yang memisah dari gumpalan darah di sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan Na-azide 0.02% kemudian disimpan pada -20°C sebelum digunakan.

Uji Serologi

Uji serologi dengan menerapkan cara *indirect enzyme-linked immunosorbent assay* (Indirect-ELISA) tanpa prapelapisan (*nonprecoating*) (Koenig, 1981). Pengujian dilakukan pada *polysyrene microtiter plate*. Antigen penguji terdiri dari ekstrak jaringan usus tengah kumbang terinfeksi, jaringan usus tengah kumbang yang tampak sehat. Sebagai pembanding digunakan suspensi virus murni dan *buffer coating* (larutan penyangga Na-karbonat pH 9,6). Pengujian dilakukan dalam dua tingkat pengenceran antibodi, yaitu 10⁻², dan 10⁻³.

Pemakaian antigen, antibodi dan konjugate untuk setiap lubang mikroplate sebanyak 200 µl. Inkubasi antigen, antibodi, dan konjugate (antibodi terhadap serum kelinci yang dikonjugasi dengan enzim alkalin fosfatase) selama 4 jam dalam suhu 37°C. Sedangkan substrat digunakan sebanyak 250 µl (1 mg/ml p-nitrophenil phosphate dalam 10% diethanolamine pH 9.8), dinkubasikan selama 90 menit pada suhu 25°C.

Tiga kali pencucian masing-masing selama tiga menit dilakukan pada tiap-tiap tahap

pengujian. Larutan pencuci adalah 0.02 M PBS yang mengandung 0.05% Tween-20 (PBS-T).

HASIL DAN PEMBAHASAN

ELEKTRON MIKROSKOPI

Nilai absorbansi ultraviolet pada pengamatan spektrofotometri terhadap hasil purifikasi menunjukkan sifat nukleoprotein. Nilai absorbansi ultraviolet yang diperoleh adalah $A_{260}/A_{280} = 1.6$. Partikel nukleoprotein (virus) berbentuk batang dengan ujung bulat ditemukan dalam kajian mikroskopi elektron. Ukuran virion rata-rata adalah: panjang 190 nm, dan lebar 94 nm (Gambar 1). Ukuran virion hasil penelitian morfologi *Baculovirus oryctes* yang pernah dilakukan antara lain adalah 235 x 110 nm (Bedford, 1981; Monsarrat *et al.*, 1971), 200 - 235 x 100-120 nm (Huger and Krieg, 1993), dan 210 - 80 nm (Kobayashi and Somowiyarjo, 1994). Hasil ini mengindikasikan bahwa ukuran virion *Baculovirus oryctes* isolat Yogyakarta berada dalam kisaran ukuran virion *Baculovirus oryctes* strain atau isolat lain yang pernah diteliti. Tetapi berdasarkan hasil pengamatan dengan mikroskop elektron saja belum dapat menyimpulkan bahwa virus yang diteliti sama dengan salah satu strain atau isolat yang pernah dilaporkan.

Seperti pada beberapa penelitian lain, pada penelitian ini juga ditemukan struktur seperti ekor yang panjangnya 270 nm yang berada pada salah satu ujung virion. Struktur seperti ekor tidak ditemukan pada isolat HZ-1 dari *Baculovirus* yang menginfeksi Lepidoptera dan *Baculovirus* pada *Gryllus campestris* (Huger and Krieg, 1993).



Gambar 1. Partikel virus oryctes
(a). struktur seperti ekor

UJI SEROLOGI

Hasil uji ELISA tidak langsung (I-ELISA) antibodi yang diperoleh dengan ekstrak jaringan usus tengah kumbang terinfeksi *Baculovirus oryctes*, ekstrak midgut kumbang tampak sehat, dan *coating buffer* (PBST) tercantum dalam tabel 1.

Tabel 1. $A_{405 \text{ nm}}$ hasil uji I-ELISA

Antigen:	Pengenceran antibodi	
	10^{-2}	10^{-3}
Ekstrak jaringan usus tengah:		
Kumbang terinfeksi <i>B. oryctes</i>	1,324	0,965
Kumbang sehat	0,547	0,400
Sediaan virus	1,234	1,131
<i>Coating buffer</i>	0,111	0,112

Hasil uji ELISA pada tabel 1 menunjukkan bahwa pada kedua tingkat pengenceran antibodi, absorbansi ultraviolet pada panjang gelombang 405 nm untuk reaksi antibodi dengan antigen

berupa ekstrak usus tengah kumbang terinfeksi *B. oryctes* dan sediaan virus *Baculovirus oryctes* memberikan nilai hampir sama. Sedang absorbansi untuk reaksi antibodi dengan ekstrak kumbang sehat kurang dari seperduanya. Hasil uji ini membuktikan bahwa sediaan virus hasil purifikasi dapat mengimbas terbentuknya antibodi poliklonal yang bereaksi spesifik terhadap antigen semula.

Nilai absorbansi ultraviolet dari reaksi antibodi dengan ekstrak usus tengah kumbang sehat lebih tinggi dibandingkan reaksinya dengan *coating buffer* dapat disebabkan terjadinya reaksi antara antibodi dengan ekstrak jaringan usus tengah serangga sehat. Penyebab reaksi non spesifik tersebut karena antigen yang diimmunsasikan masih mengandung protein kumbang sehat.

Dari hasil penelitian tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa :

Morfologi dan ukuran partikel virus *Baculovirus oryctes* isolat Yogyakarta menunjukkan kesamaan dengan strain atau isolat lain yang pernah dilaporkan oleh peneliti lain. Tetapi berdasarkan hasil pengamatan dengan mikroskop elektron belum dapat disimpulkan apakah isolat yang diteliti sama dengan strain atau isolat lain.

Sediaan virus dapat mengimbas terbentuknya antibodi poliklonal dalam tubuh kelinci yang diimmunsikasi. Reaksi antibodi dengan ekstrak kumbang terinfeksi *Baculovirus oryctes* sama reaksinya dengan sediaan virus murni, dengan nilai absorbansi ultraviolet pada 405 nm lebih dari dua kali dari pada reaksinya dengan kumbang sehat.

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Prof. D. Hosokawa dan Prof. T. Hukuhara, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fucu (Jepang) untuk fasilitas pengamatan elektron mikroskopi, dan Ir. Sedyo Hartono untuk bantuan teknis dalam uji serologi. Penelitian ini merupakan sebagian penelitian yang dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan & Kebudayaan dalam bentuk Proyek Hibah Bersaing Perguruan T i n g g i d e n g a n N o m o r 091/P4M/DPPM/PHB/1/2/1993.

DAFTAR PUSTAKA

- Bedford, G.O. 1981. Control of the rhinoceros beetle by Baculovirus. In : Microbial Control of Pests and Plant Disease 1970 -1980 (Ed. : Burges, H.D.) Acad. Press. London : 406 - 427.
- Huger, A.M. 1966. A virus disease of the Indian Rhinoceros Beetle, *Oryctes rhinoceros* L. caused a new type of insect virus. *J. Invert. Pathol.* 8: 38
- Huger, A.M. and A. Krieg. 1991. Baculoviridae. Nonoccluded Baculoviruses. In : Atlas of invertebrate viruses (Eds.; Adam J.R. and J. Bonami) CRS Press: 187 - 319.
- Kobayashi, J. and S. Somowiyarjo. 1994. Properties of *Oryctes* Baculovirus isolated in Indonesia. Manuscript for publication.
- Koenig, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 40: 309 - 314.
- Monsarrat, P., J.C. Veyrunes, G. Meynadier, G. Croizier, C. Vago. 1973. Purification et etude structurale du virus du coleoptere *Oryctes rhinoceros*. *C.R. Acad. Sc Paris* 277: 1413 - 1415.
- Payne, C.C. 1974. The isolation and characterization of a virus from *Oryctes rhinoceros*. *J. Gen. Virol.* 25; 105 - 116.
- Zelazny, B. 1976. Transmission of a baculovirus in population of *Oryctes rhinoceros*. *J. Invert. Pathol.* 27: 221 - 227.