



Peran *Brush Border Membrane Vesicle* (BBMV) dalam Proses Infeksi Baculovirus

ARMAN WIJONARKO

Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada
Jl. Sekip Unit 1, Yogyakarta

(diterima Maret 2004, disetujui Agustus 2005)

ABSTRACT

The Role of *Brush Border Membrane Vesicle* (BBMV) in The Baculovirus Infection. Although baculovirus becoming recognized as potential important agents for control pests, there are several important obstacles for commercial use as insecticide. One important obstacle is their narrow host. The other obstacle is due to its developmental resistance, the phenomenon whereby host larvae become progressively more resistant to fatal infection as they age within and among instars. From practical stand point, this phenomenon impacts the effectiveness of baculovirus control programs against agricultural and forest insect pests that is necessary to adjust application levels in the response to the demography of the target insect population. Purified columnar cells derived from midgut of armyworm *Pseudaletia separata* was used for fusion assay and observed by means of fluorescence assay based on self-quenching of octadecylrhodamine B chloride (R18). Confocal microscopy of the columnar cells that had been combined with labeled virus showed that the fluorescence appeared on the apical part in the brush border membrane, this indicated that there was fusion between virus and the cells. Two dimensional SDS-PAGE and immunoblotting assay confirmed that the receptor exist within the columnar cell.

KEY WORDS: BBMV, baculovirus, infection.

PENDAHULUAN

Kebanyakan mikrobia patogen serangga (MPS) seperti bakteri, protozoa, dan virus, masuk ke dalam tubuh inangnya lewat saluran pencernaan. MPS secara pasif bersama-sama dengan makanan melewati usus depan hingga sampai usus tengah serangga. Usus tengah serangga mempunyai berbagai fungsi penting diantaranya pencernaan, penyerapan, pengeluaran air, dan menjaga keseimbangan konsentrasi ion, serta sebagai "barrier" untuk mencegah masuk

nya mikrobia patogen ke bagian tubuh yang lain (Boucias and Pendland, 1998).

Lapisan *epithelial* usus tengah terdiri atas tiga sel utama, yaitu : *columnar cells*, *regenerative cells*, dan *goblet cells*. *Columnar cells*, yang merupakan bagian terbanyak berfungsi sebagai tempat pembentukan enzim pencernaan sekaligus menyerap makanan. Kondisi kimiawi dan biologis saluran pencernaan di usus tengah ini memainkan peranan sangat penting dalam proses infeksi MPS (Granados and Frederici, 1986).

Salah satu keperluan dasar berkaitan dengan penggunaan Baculovirus sebagai biopestisida adalah pengetahuan dasar tentang biologi Baculovirus baik secara *in vivo* maupun *in vitro*, serta pengetahuan ekologi Baculovirus dalam kaitannya dengan manipulasi lingkungan. Memahami bagaimana suatu MPS termasuk di dalamnya Baculovirus, menginfeksi inang, mulai dari proses inisiasi infeksi hingga perkembangannya di dalam tubuh adalah termasuk bagian dari pengetahuan dasar untuk bisa memahami karakteristik hubungan antara Baculovirus dan inangnya (Barbosa, 1998).

Berawal dari fenomena bahwa inokulasi oral *Autographa californica* MNPV pada larva *Pseudaletia separata* yang ternyata memberikan hasil negatif, sedangkan bila disuntikkan secara *intra hemocoelic* atau diberi tambahan "Viral Enhancing Factor (VEF)" memberikan hasil yang sebaliknya, maka diasumsikan terdapat "sesuatu" di dalam usus tengah yang menghalangi terjadinya infeksi. Pada kesempatan ini disajikan hasil-hasil pemurnian *columnar cell* dan uji pendahuluan fusi antara virion Baculovirus dengan *columnar cells* tersebut.

BAHAN DAN METODE

Serangga

Larva *Pseudaletia separata* dipelihara dengan pakan buatan menurut Hattori and Atsuzawa (1980). Telur *P. separata* di sterilisasi dengan 2% formaldehida dan 70% etanol, kemudian dipelihara secara

aseptis di dalam labu erlenmeyer hingga stadia yang diinginkan untuk keperluan pemurnian BBMV.

Melabeli Virus

Pseudaletia unipuncta NPV (Psun NPV) diperbanyak dan dimurnikan menurut Wijonarko and Hukuhara (1998). Hasil akhir NPV disimpan dalam lemari pendingin -20°C. Virion dari hasil pemurnian PsunNPV diberi label *octa decylrhodamine B chloride* sesuai dengan diskripsi Hukuhara and Wijonarko (2001) di dalam gelap selama 1 jam dengan menggunakan *rotary shaker* dan selanjutnya disimpan dalam *Hepes buffer*.

Pemurnian *Columnar Cell*

Columnar cell dimurnikan dengan cara mengambil 5-7 usus tengah larva instar enam, kemudian dibersihkan dari trakea, badan *malpighi*, atau jaringan lain yang dianggap tidak perlu. Usus ini kemudian diinkubasikan di dalam 25% *trypsin* selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah dibilas 3 kali dalam PBS *buffer*, hasil inkubasi disaring dengan menggunakan unit penyaring yang terdiri atas 2 lapis kertas pembersih lensa. Hasil akhirnya kemudian dilihat di mikroskop untuk melihat kemurnian *columnar cell*-nya. Total BBMV dimurnikan menurut cara Hukuhara *et al.* (2003).

Percobaan Fusi

Percobaan ini dilakukan dengan cara memasukkan virion PsunNPV ke dalam *columnar cell*, kemudian diamati dengan menggunakan 2 alat, yaitu :

1) Confocal mikroskop untuk melihat visualisasi fusi antara *columnar cell* dan virus; dan 2) Spektrofotometer untuk mengukur tingkat intensitas fusi yang terjadi.

Reseptor untuk VEF

Percobaan untuk mengetahui adanya reseptor bagi VEF di *microvilli*, dilakukan dengan cara melakukan SDS-PAGE 2 dimensi terhadap protein *microvilli*, kemudian ditransfer ke nitrocellulose membrane (Towbin *et al.*, 1979) selanjutnya diinkubasi dengan anti-VEF rabbit serum selama semalam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

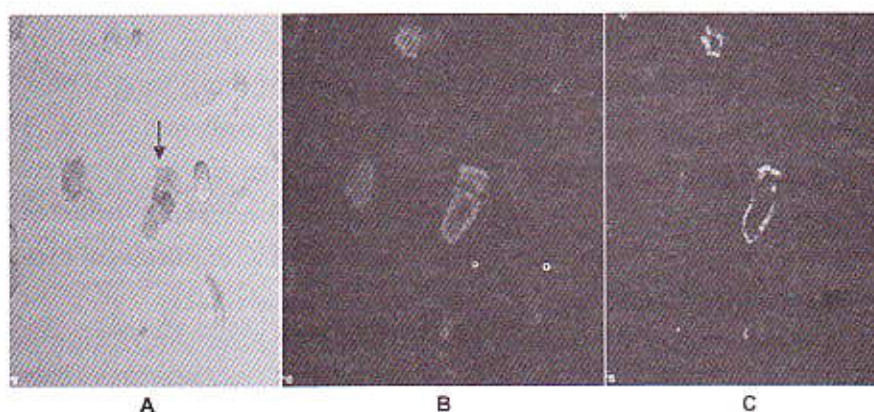
Hasil Visualisasi dengan Mikroskop

Midgut yang memperoleh perlakuan *trypsin* akan menjadi sel tunggal kolumnar dengan *microvilli* pada bagian ujungnya (Gambar. 1A). Setelah dikombinasi dengan virion yang juga sudah

dilabel dengan pewarna berpendar, terlihat bahwa pada bagian *microvilli* intensitas berpendarnya cukup kuat (Gambar. 1B) dibandingkan dengan bagian yang lain. Gambar 1C menunjukkan adanya reseptor VEF pada *columnar cell*. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi fusi antara virus dengan *microvilli* pada bagian ujung *columnar cell*.

Kuantifikasi Fusi

Hasil percobaan dengan spektrofotometer menunjukkan bahwa fusi yang terjadi sangat dipengaruhi oleh pH buffer yang digunakan. Pada pH 7,4 persentase fusi rendah. Sedangkan pada pH mendekati kondisi usus tengah yang sebenarnya (pH 10,8) terjadi perbedaan persentase nilai fusi yang cukup tajam (Gambar. 2). Hal ini menunjukkan bahwa fusi antara virus yang berasal dari *polyhedra* dengan *microvilli* menuntut adanya lingkungan pH tinggi.



Gambar 1. *Microvilli* larva *P. separata* hasil permurnian dengan trypsinisasi (A) Pengamatan secara Nomarski (B), Hasil pengamatan dengan filter TRTIC, (C) Hasil pengamatan dengan filter FTIC

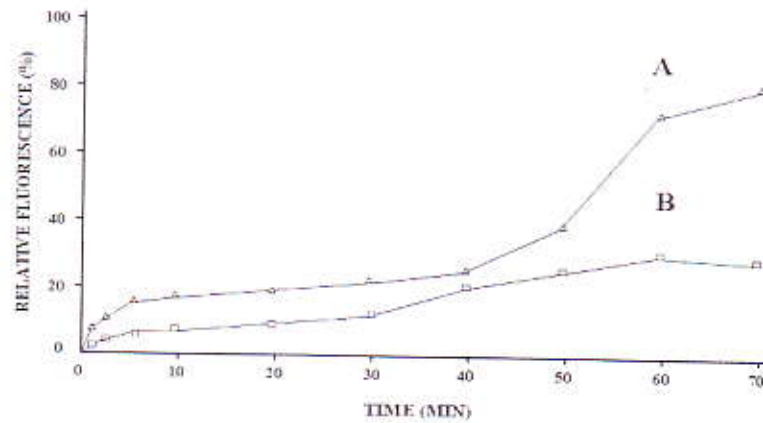
Reseptor

Hasil SDS-PAGE dan *immuno-blotting* menunjukkan bahwa sangat besar kemungkinan terdapatnya reseptor VEF di *microvilli*, yang diindikasikan dengan *band* pada *membrane* hasil *blotting* (Gambar. 3A dan B). Bolah jadi VEF berperan besar dalam menghilangkan “*barrier*” dalam usus tengah yang

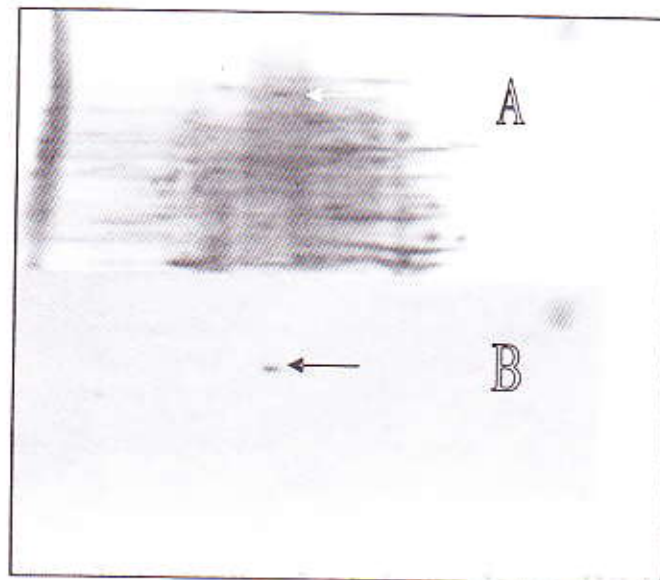
menghalangi proses masuknya virus ke dalam tubuh serangga, dengan cara meningkatkan fusi virus di *columnar cell*.

KESIMPULAN

Microvilli larva *P. separata* yang diamati dengan menggunakan filter FTIC menunjukkan adanya fusi antar virus dengan *microvilli* pada bagian ujung



Gambar 2. Fusi kinetik antara Baculovirus dan BBMVs larva *P. separata* (A) pada pH 10.8, dan (B) pada pH 7.4.



Gambar 3. (A) *Electrophoregram* protein BBMVs hasil SDS-PAGE 2 dimensi. (B) Visualisasi *immunoblotting* dari protein yang sama

columnar cell. Terjadinya fusi tersebut dipengaruhi oleh pH terutama diperlukan pH yang tinggi. Berdasarkan hasil SDS-PAGE dan *Immunoblotting* ditemukan adanya reseptor VEF di *microvilli* yang berperan besar dalam menghilangkan "barrier" dalam usus tengahnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Barbosa, P. 1998. Conservation Biological Control. Academic Press. San Diego. 396 p.
- Boucias, D.G. and J.C. Pendland. 1998. Principles of Insect Pathology. Kluwer Academic. Massachussets. 537 p.
- Granados, R.R. and B.A. Federici. 1986. The Biology of Baculovirus. Vol II. Practical Application for Insect Control. CRC Press. Florida. 276 p.
- Hattori M. and S. Atsuzawa. 1980. Mass Rearing of The Cabbage Armyworm, *Mamestra brassicae* Linn. and Common Armyworm, *Mythimna separata* Wlk. on a Simple Artificial Diet. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* (in Japanese). (24)36-38.
- Hukuhara, T. and A. Wijonarko. 2001. Enhanced of a Nucleopolyhedrovirus With Cultured Cells by a Virus Enhancing Factor from an Entomopoxvirus. *J. Invertebr. Pathol.* (77)62-67.
- Hukuhara, T., A. Wijonarko, H. Iwano, and Y. Hosokawa. 2003. Enhanced infection of an Entomopoxvirus in Larvae of The Armyworm, *Pseudaletia separata*, by a Granulovirus. *J. Appl. Entomol. and Zool.* (38) 255-259.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic Transfer of Protein from Polyacrylamide Gels into Nitrocellulose Sheet. Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (76)4350-4354.
- Wijonarko, A. and T. Hukuhara. 1998. Detection of a Virus Enhancing Factor in The Spheroid, Spindle, and Virion of an Entomopoxvirus. *J. Invertebr. Pathol.* (72)82-86.