

# MEMBANDING KANDUNGAN PROTEIN YANG TERDAPAT PADA OVARIUM EKTO- PARASIT *Varroa jacobsoni* DENGAN HAEMOLIMFA DARI LEBAH MADU *Apis mellifera carnica*

(To Compare Protein Contents of Ovarium From  
The Ectoparasite *Varroa jacobsoni* OUD and The  
Haemolymphs of Her Hospes *Apis mellifera carnica*)

*Nilla Djuwita Abbas*

## ABSTRACT

*The haemolymphs of honey bees is the absolutely nutrition resources of their ectoparasite, Varroa jacobsoni OUD. In 1983, Tewarson found the molecules of these haemolymphs were not changed in metabolism, therefore all of macromolecules of found again in egg of the ectoparasite, Varroa jacobsoni OUD. There is a big question of metabolism, what happens by this ectoparasite. Through this research, the proteins of the ectoparasite's ovarium were compared to proteins of the honeybees's haemolymphs from her hospes, some post embrionic stages of Apis mellifera carnica were injected on SDS PAGE. It was found 10 special molecule bands on ovarium from 166 kilodalton to 18 kilodalton which has not found on the haemolymphs of the ectoparasite. On the haemolymphs were found 26 special protein bands from 246 kilodalton to 17 kilodalton. It means that the ectoparasite digest the haemolymphs of honeybees.*

## PENDAHULUAN

*Varroa jacobsoni* OUD adalah parasit obligat pada kelompok lebah madu (Anshakova, 1977). Pada mulanya ektoparasit ini ditemukan pada tahun 1904 pada *Apis cerana* F di Pulau Jawa dan berikutnya di Sumatra pada tahun 1912 oleh Jacobson seorang ahli Belanda (Oudemans, A.C. 1904). Menjelang 30 tahun yang lalu ektoparasit ini sangat terkenal hanya memparasiti lebah madu jenis Asia, *A. cerana* dan *A. dorsata*. Namun pada saat ini kutu ini sudah melakukan koevolusi terhadap lebah madu jenis Eropa *A. mellifera* (Abbas, N.D. 1990). Didunia yang masih bisa mengisolir lebah madunya dari serangan parasit ini hanya dua daerah yaitu Australia dan Inggris. Kedua negara ini melakukan karantina yang ketat sekali terhadap pemasukan lebah madu ke daerah mereka. Kerugian yang ditimbulkan ektoparasit ini sangat besar. Dari hasil penelitian diketahui bahwa dalam waktu 3 bulan inkubasinya didalam satu koloni dapat menghancurkan koloni tersebut sampai tidak memproduksi madu sama sekali disebabkan kerusakan

pada lebah pekerja akibat darah atau haemolimfanya yang diserap oleh parasit mengakibatkan kondisi tubuh jadi lemah sehingga akhirnya tak dapat mengumpul polen dan madu sama sekali (Scheineder, P and Drescher, W.1987). Oleh sebab itu mulai ditemukan parasit ini di Eropa tepatnya di Jerman Barat ditahun 1965 mulai saat itu para ilmuwan tak henti-hentinya melakukan penelitian tentang parasit ini yang ditujukan untuk pengontrolannya dilapangan(Griffith, D.A. & Bowman, C.E. 1981). Sampai saat ini ada ratusan jenis pestisida dapat dipakai pengontrol parasit ini namun pada kenyataannya bahwa bagaimanapun residunya ternyata selalu ditemukan di dalam madu. Para ilmuwan mulai beralih penelitiannya kearah biokontrol namun yang menjadi problem adalah kehidupan reproduksi ektoparasit ini yang tersembunyi bersama perkembangan postembrionik dari pupa lebah madu. Baru pada tahun 1988 Abbas telah pertamakali menemukan cara in-vitro pemeliharaan dari ektoparasit ini bersama dengan hospesnya dalam tabung artifisial yang transparan hingga kegiatan reproduksinya dapat diikuti atau direkam secara visual.

Diketahui bahwa hampir semua stadia dari lebah madu disenangi oleh *Varroa jacobsoni* OUD kecuali stadia larva satu sampai empat yang ukuran tubuhnya masih kecil (Ifantidis, 1983) karena jumlah haemolimfanya sedikit dibandingkan dengan larva stadia lima sampai stadia dewasa baik dari jenis pekerja, ratu maupun pejantan. Setelah diteliti ternyata pada lebah madu jenis Eropa, *A. mellifera* ektoparasit ini sangat menyenangi lebah jantan disebabkan ukuran tubuhnya besar dan kandungan haemolimfanya jauh lebih banyak. Suatu hal yang menarik untuk melakukan penelitian kandungan protein dari parasit ini adalah disebabkan sumber makanan atau sumber protein satu-satunya pada parasit ini adalah darah dari lebah madu. Peneliti satu-satunya yang melakukan percobaan ini adalah Tewarson pada tahun 1983. Dia membandingkan kandungan protein dari haemolimfa dari lebah madu, *Apis mellifera carnica* dengan telur yang baru dioviposisikan oleh induk *Varroa* didalam koloni. Kesimpulan dari hasil penelitiannya bahwa ektoparasit ini tidak merombak makromolekul protein yang diisapnya dari haemolimfa hospesnya untuk dijadikan bahan penyusun protein dari telurnya. Disebabkan sampel yang dipakai Tewarson (1983) sebagai pembandingan adalah telur *Varroa jacobsoni* OUD yang sudah diletakkan di luar tubuh. Dimana telur ini sebetulnya pada perkembangan embriologi isi dari pada telur ini sudah berkembang cukup jauh pada tingkat nimfa sempurna dan tidak dapat dikatakan mewakili telur yang dibentuk didalam ovarium. Dilain pihak bahwa ektoparasit ini mempunyai saluran pencernaan yang lengkap dan dapat dilihat dengan jelas dari hasil diseksi. Pertanyaan timbul disini apakah tidak terjadi perombakan sama sekali dalam proses metabolisme pencernaannya hingga input dan output sama saja. Dan selanjutnya ada kemungkinan bahwa setelah terjadi fertilisasi protein ini dirombak menurut kebutuhan sampai tingkat preprotonympha yang sudah selesai perkembangannya dan terbentuk protein yang sama seperti susunan haemolimfa kembali. Inipun diterima bila hasil penelitiannya bisa dipertanggung

jawabkan. Tertarik dengan hal tersebut diatas maka penulis merancang penelitian ini dengan objek pembandingan dari haemolimfa adalah ovarium yang sedang bertumbuh dan berisi ovum yang sedang matang dipakai sebagai sampel dan berasal dari induk *Varroa* yang dalam keadaan stadia reproduksi bersama pupa dalam sel tertutup. SDS PAGE adalah metoda yang cukup akurat untuk media percobaan ini.

## **METODA PENELITIAN**

Pembandingan kandungan protein ini dilakukan dengan metoda SDS-PAGE 5%-20% campuran gradien gel poliakrilamid gunanya untuk memantau protein yang terkandung dengan konsentrasi rendah baik pada ovarium dari ektoparasit *Varroa jacobsoni* OUD maupun pada haemolimfa dari beberapa stadia posembrionik dari lebah madu *Apis mellifera carnica* yang diperbandingkan.

### **Persiapan sampel ovarium ektoparasit *V.jacobsoni* OUD.**

3 sampel ovarium adalah hasil diseksi dari ektoparasit yang sedang berada didalam sel lebah madu pada 3 stadia yaitu stadia mengokon, stadia prepupa dan stadia pupa bermata putih. Metoda diseksi adalah merupakan modifikasi dari metoda de Ruijter (1983) dan Alberti (1985) dan Abbas(1990). Segera setelah diseksi ovarium bersama larutan bufer disimpan pada temperatur -20°C menjelang dilakukan homogenasi dengan gelombang ultra dengan alat ultra sonifer dari BRAND.

### **Persiapan haemolimfa dari lebah madu**

4 sampel haemolimfa dari 4 stadia posembrionik lebah madu *Apis mellifera carnica* berasal dari stadia 1) stadia larva 5 terakhir (L5) yaitu 1 jam sebelum sel ditutup oleh pekerja, 2) stadia mengokon, 3) stadia prepupa dan 4) stadia pupa mata putih. Keempat stadia posembrionik ini adalah stadia dimana ektoparasit *V.jacobsoni* OUD mengisap haemolimfanya dalam rangka persiapan reproduksi telur. Haemolimfa ini setelah diisap dengan pipa kapiler BRAND disentrifusir selama 5 menit dengan alat haemofuge dari BECKMAN untuk membuang haemosit dan jaringan lain yang terbawa dalam cairan haemolimfa. Menjelang diinjeksikan pada SDS-PAGE sampel disimpan didalam temperatur -70°C.

### **Pembuatan SDS-PAGE dan pelaksanaan percobaan**

Dengan tebal 0,5 mm SDS-poliakrilamidgel dengan konsentrasi gradien 5

dan 20% dan ditambah 24% gliserin dibiarkansatu malam pada temperatur 4°C untuk polimerisasi kemudian dicuci dengan 3% bufer penggabungnya. Gel dikeluarkan dari refrigerator dan pada lobang 1 sampai delapan berturut-turut diinjeksikan 1) 20ul sampel ovarium pada pupa mata putih, 2) 20 ul sampel ovarium ektoparasit pada prepupa, 3) 20 ul sampel ovarium ektoparasit pada stadia mengokon, 4) 20 ul sampel haemolimfa pupa mata putih, 5) 20 ul haemolimfa dari prepupa, 6) 20 ul sampel haemolimfa dari larva stadia mengokon, 7) 20 ul haemolimfa L5 akir dan 8) 20 ul marker protein dari Amersham. Sebelum diinjeksikan kedalam gel semua sampel didenaturasi selama 10 menit pada temperatur 60°C dalam waterbath. Elektroforesis berlangsung 24 jam pada temperatur 8°C dengan kuat arus 12 mA/gel. Selesai satu malam gel diwarnai dengan perak nitrat dari metoda Heukeshoven dan Dernick (1985) dan selanjutnya warna diperlunak dengan pemberian Farmerschem dari pabrik Tetenal hingga terakhir terlihat warna coklat kemerahan dari garis-garis polipeptida diatas gel dengan nyata. Hasil akhir difoto dengan Panfilm ASA 25.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada gambar 1 dapat dilihat kurva dasar dari marker protein yang dipakai yang ditentukan dengan SDS-PAGE 5%-20% yang terdiri dari myosin (M), beta galaktose (G), fosforilase (F), rinderserumalbumin (R), ovalbumin (O) dan karbohidrase (K) dengan berat molekul berturut-turut 205 kilodalton, 116 kd, 97,4 kd, 66 kd, 45 kd dan 29 kd. Selanjutnya hasil elektroforesis ini dapat dilihat pada gambar 2 dimana ketebalan gel yang dipakai setinggi 0,5 mm dan kombinasi gel 5% dan 20% sangat membantu menemukan protein yang ada pada ovarium dari *Varroa* yang ukurannya sekitar 10 um.

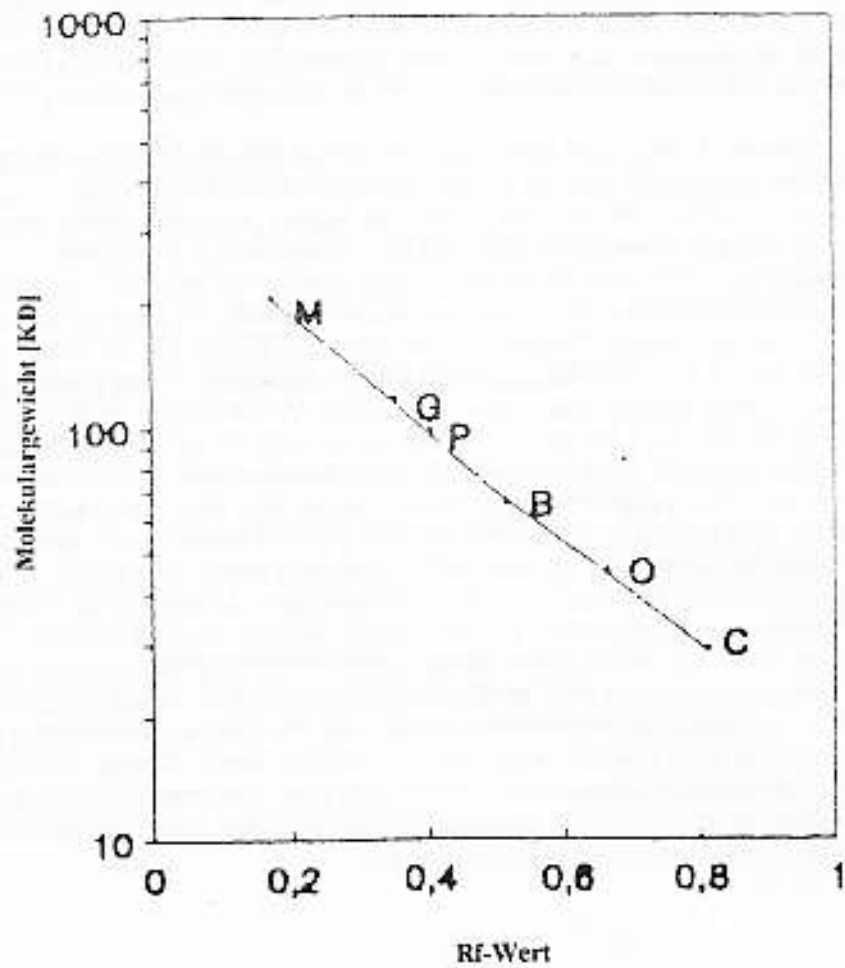
Selanjutnya berdasarkan kurva standar dari marker pada gambar 1 didapatkan hasil ban protein dari gambar 2 pada tabel 1.

Hasil tabel 1 ini dapat kita lihat pertama bahwa sampel 1,2 dan 3 yang merupakan sampel ovarium dari induk *Varroa* yang sedang dalam masa reproduktif didalam sel tertutup didapatkan 21 ban polipeptida yang sama dengan berat molekul 193 kilodalton sampai dengan 16 kilodalton. Dengan ditemukannya ban protein yang sama diantara ketiga sampel ovarium tersebut ini menyatakan bahwa jenis polipeptida yang teridentifikasi ini adalah merupakan kandungan protein yang tetap atau asli dari ovum *Varroa*.

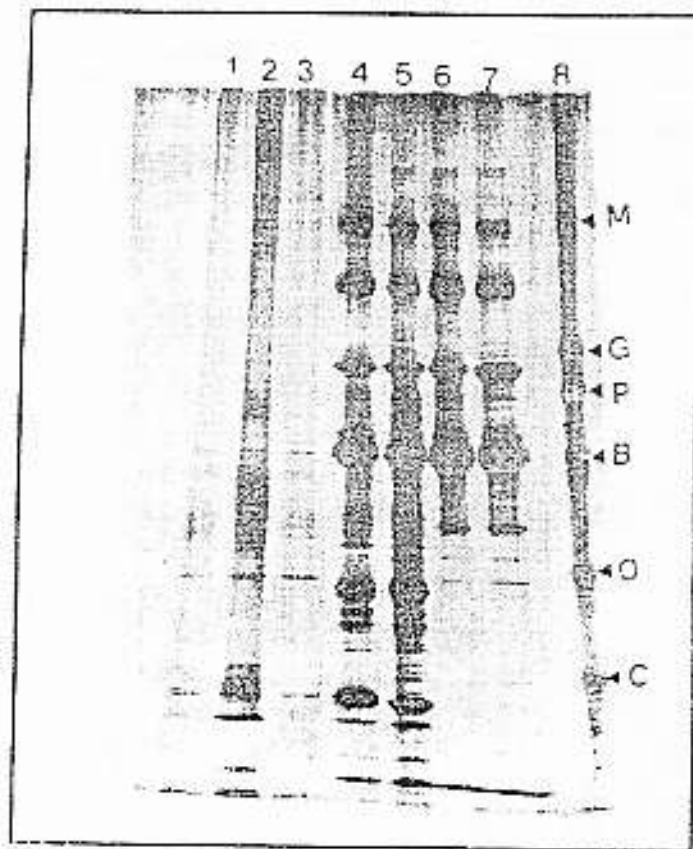
Hal kedua yang bisa dilihat pada tabel 1 bahwa pada sampel 4,5,6 dan 7 yang berasal dari haemolimfa lebah madu *Apis mellifera carnica* berturut-turut dari stadia pupa mata putih (4), prepupa (5), larva mengokon (6) dan L5 terakhir (7) terpisah atas dua kelompok protein dimana sampel 4 dan 5 mempunyai jumlah ban protein 37 buah yang ternyata lebih banyak 11 ban dari sampel 6 dan 7 yang hanya mempunyai 26 jenis polipeptida.

Hal ini dimungkinkan karena sampel 4 dan 5 adalah haemolimfa yang berasal dari stadium pupa dimana proses metabolismenya sedang aktif untuk membangun organ dalam maupun organ bagian luar tubuh lebah madu dalam rangka menuju perkembangan yang sempurna untuk mencapai tingkat dewasa. Sedangkan sampel 6 dan 7 adalah haemolimfa dari stadia larva akhir dan stadia mengokon yang secara morfologis luar dan dalam tubuh masih dalam stadia larva dimana perombakan organ dalamnya belum dimulai dan proses metabolismenya tidak seaktif seperti pada stadia pupa.

Poin ke 3 yang dapat kita lihat disini adalah bila dibandingkan ban protein dari kelompok ovarium dengan kelompok haemolimfa hospes ditemukan 4 perbedaan yaitu pertama jumlah ban protein jauh lebih sedikit dibandingkan dengan haemolimfa baik dari larva maupun dari pupa yaitu 11 ban dibanding 37 ban dari pupa dan 26 ban dari larva. Yang ke-dua adalah dengan terdapatnya protein yang sama antara larva dan pupa sebanyak 7 ban yaitu dari protein dengan berat molekul 193 kd, 93 kd, 81 kd, 74 kd, 42 kd dan 24 kd. Yang ketiga adalah dengan didapatkan 4 ban protein dari ovarium yang terdapat hanya pada pupa yaitu protein dengan berat molekul 86 kd, 35 kd, 22,4 kd dan 16 kd, hal ini dimungkinkan karena di dalam ovarium dibentuk juga protein yang sama dengan pupa. Perbedaan yang keempat adalah yang terpenting dimana hampir 50% dari ban protein yang keluar dari ovarium tidak terdapat pada protein hospes baik dari pupa maupun larva yang merupakan sumber makanan pokok dari induk *Varroa* disaat dia akan bertelur. Dari hasil pengamatan Abbas (1990) dengan penemuan sel transparannya bahwa induk *Varroa* sebelum bertelur dan dalam masa reproduktifnya sangat aktif menghisap haemolimfa dari hospesnya sedangkan dari hasil penelitian ini tidaklah semua protein itu diteruskan kedalam ovum dengan begitu saja dan ternyata ditemukan protein-protein yang spesifik yang dibentuk didalam ovum. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa proses metabolisme dari ektoparasit ini juga aktif didalam merombak protein sehingga dia membutuhkan pula protein-protein spesifik untuk kebutuhan pertumbuhannya.



Gambar 1. Kurva standar untuk penentuan berat molekul dari protein dengan SDS-PAGE 5% -20%. Marker protein : M = Myosin (205 kd), G = beta Galaktosidase (116 kd), P = Fosforilase b (97,4 kd), B = Rinderserumalbumin (66 kd), O = Ovalbumin (45 kd), C = Karbohidrase (29 kd).



*Gambar 2.* Muster dari hasil SDS-PAGE 5%-20% dengan pewarnaan AGNO3 dari sampel ovarium(1,2,3) dan 0,15 ul haemolimfa dari lebah madu *Apis mellifera carnica* stadia pupa mata putih (4), prepupa (5), larva stadia mengokon (6) dan larva stadia 5 terakhir (L5) (7) dan marker protein dari Sigma.

Daftar 1 Susunan kandungan protein dari ovarium *Varroa jacobsoni* OUD (sampel 1, 2, 3) dan Susunan Protein dari haemolimfa *Apis mellifera carnica* stadia pupa mata putih (4), prepupa (5), larva sedang mengokon (6) dan larva lima (L<sub>5</sub>) akhir (7) dalam kilodalton (Kd) hasil analisa dengan SDS-PAGE (5%-20%).

Band	Ovarium			Haemolimfa				
	No.	1	2	3	4	5	6	7
1					246	246	246	246
2					232	232	232	232
3	193	193	193		193	193	193	193
4					182	182	182	182
5					180	180	180	180
6					170	170	170	170
7	166	166	166					
8					158	158	158	158
9					153	153	153	153
10					144	144	144	144
11					111	111	111	111
12					107	107	107	107
13					105	105	105	105
14	98	98	98					
15					95	95	95	95
16	93	93	93					
17					90	90	90	90
18					87	87		
19	86	86	86					
20					85		85	85
21					83		83	83
22	81	81	81					
23	74	74	74					
24	72	72	72					
25	68	68	68					
26					62		62	62
27					61		61	61
28	57	57	57					
29	53,5	53,5	53,5					
30	51	51	51					
31					51		51	51
32	48	48	48					
33					47		47	47
34	42	42	42					
35					38		38	38
36	35	35	35					
37					34			
38					30			
39					27,5		27,5	27,5
40	27	27	27					
41	24	24	24					
42	22,4	22,4	22,4					
43	19	19	19					
44					18,5			
45	18	18	18					
46					17		17	17
47	16	16	16					



## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ternyata didalam proses metabolismenya ektoparasit *Varroa jacobsoni* OUD terjadi juga perombakan molekul atau makromolekul protein yang dihisapnya dari darah lebah madu *Apis mellifera carnica*. Hal ini dapat dibuktikan dengan ditemukannya hampir 50% protein baru pada ovariumnya yang tidak ditemukan sama sekali pada haemolimfa yang merupakan sumber makanan induk *Varroa jacobsoni* OUD disaat masa reproduktifnya. Protein tersebut adalah dengan berat molekul sebagai berikut 166 kilodalton(kd), 98 kd, 72 kd, 68 kd, 57 kf, 53,5 kd, 48 kfd 27 kd, 19 kd dan 18 kd..

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ditujukan kepada semua person yang telah ikut membantu terlaksananya penelitian ini dan pada kesempatan ini saya ingin mengucapkan rasa simpati dan terima kasih saya terutama pada **Dr.H.Kaatz** dan **Dr.K.Hartzfelder** beserta kawan-kawan kelompok biokimia di Insitut Fisiologi Perkembangan Universitas Tuebingen.

## LITERATUR

- Abbas, N.D. and Engels, W. (1989). Rearing of *Varroa* in artificial cell on drones. Proc. EC Experts Group Meeting in Udine 1988. In R. Cavalero (ed.), Brussels Luxembourg 223-228.
- Abbas, N. D. (1990). In vitro-Reproduktion der parasitischen Bienenmilbe *Varroa jacobsoni*. Diss. Univ. Tuebingen 1990.
- Anshakova, O.V. (1977). Contribution to biological study of *Varroa jacobsoni* and its fluence on honey bees. Pchelovodstvo 10: 24 in rerrisch.
- Alberti, G. and Zuck-Kapp, G. (1986). The nutritmentary egg development of the mite, *Varroa jacobsoni* (Acari, *Arachnida*), an ectoparasite of honeybee. Acta zoologica 67: 11-25; Stockholm.
- Griffith, D.A. and Bowman, C.E. (1981). World distribution of the mite *Varroa jacobsoni*, a parasite of honeybees. Bee Wld. 62: 154 - 163.
- Heukeheven, J. and Dernick, R. (1986). Neu Ergebnisse zum Mechanismus der Silberfärbung. In : Radola, B.J. (ed.). Elektrophorese Forum 86. Technische Universität Muenchen. Muenchen 1986 : 22-27.
- Hantidis, M.D. (1983). Ontogenesis of *Varroa* mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone brood cells. J. Apicult. Res. 22 : 200-206
- Oudemans, A. C. (1904). On a new genus and species of parasitic acari. Notes from the Leyden Museum. 24 : 216-222.
- Ruijter, A. de and Kaus, J.P. (1983). The Anatomy of the *Varroa* mite. Prop. EC Experts' Group Meeting in Wageningen 1983. In : R. Cavallero (ed.), A.A. Balkema, Rotterdam : 45-47.